

受賞者総説

## サケ科魚類成長ホルモンの作用機構に関する研究

(平成 16 年度日本水産学会賞奨励賞受賞)

深 田 陽 久\*

高知大学農学部栽培漁業学科

Growth hormone and its receptor in growth control of salmonid fish

HARUHISA FUKUDA

*Department of Aquaculture, Faculty of Fisheries, Kochi University,  
200 Monobe, Nankoku, Kochi 783-8502, Japan*

成長ホルモン (GH) は脳下垂体の前葉主部で產生・分泌されるペプチドホルモンであり、魚類の体成長、性成熟、海水適応<sup>1)</sup>や免疫<sup>2)</sup>において重要な役割をしている。下垂体より分泌された GH は血流を介し、その特異的な受容体である成長ホルモンレセプター (GHR) に結合した後に、主に肝臓で合成されるインシュリン様成長因子-I 型 (IGF-I) を介して間接的に作用すると考えられている。<sup>3)</sup> 数年前まで明らかにされていなかった魚類 GHR の遺伝子は、現在、多くの魚種でクローニングされ、<sup>4,5)</sup> 魚類における詳細な GH の作用機構がより明らかになることが期待されている。魚類増養殖において、養魚を効率的に成長させることは最重要課題の一つである。GH の作用はこれに深く関わり、またその作用は GHR によって調節されていると考えられることから、我々はサケ科魚類を対象に成長における GH の作用機構を明らかにすることを目的として研究を行ってきた。ここでは、これまで得られた GH および GHR に関する知見を紹介する。

**1. 高感度イムノアッセイの確立**

はじめに、血中 GH 量を測定して GH の分泌動態を調べることにより GH の成長作用の解明を試みた。これまで血中の微量な GH の定量は放射性同位体を用いたラジオイムノアッセイ (RIA) で行われてきた。<sup>6,7)</sup> しかしながら RIA には専用の施設が必要であり、さらに RIA の廃棄物等に問題があった。そこで放射性同位体を用いない two-site 法による酵素免疫測定法による GH 測定系の確立に着手した。確立した測定系の測定範囲は 0.5 ng/mL～50 ng/mL であり、従来のラジオイムノア

ッセイとほぼ同等の感度および測定範囲が得られた。<sup>8)</sup> しかしながら、本測定系では少量の血清しか得られない稚魚の血中 GH 量を測定するには感度が不十分であった。そこで、標識に高感度な化学発光物質であるアクリジニウムを用いてサケ GH 化学発光イムノアッセイ (CLIA) の確立を行った。酵素免疫測定法と同様に two-site 法を用いて CLIA では検出限界 3.9 pg/mL を達成した。<sup>9)</sup> 続いて孵化直後の仔魚等の得られる血清量がより少ない個体の血中 GH 量を測定するために、非特異反応を減少させることにより高感度化ができる Immune complex transfer two-site 法による CLIA の確立を行った。その結果、検出限界 7.8 fg/mL とラジオイムノアッセイに比べて約 20,000 倍高感度な測定系を確立した。<sup>10)</sup>

**2. 血中 GH 量測定**

確立した測定系を用いて、血中 GH 量の変動を観察した。成熟年令のサクラマス *Oncorhynchus masou* では、雌雄ともに産卵の 4 ヶ月前の 5 月に他の月（約 30 ng/mL）に対し、約 2 倍量となる GH の大きなピークが見られた。<sup>11)</sup> その後、5 月から 6 月のわずか 1 ヶ月の間に体重が約 2 倍になるという著しい増加が観察された。以上のことから、GH のピークは成熟年令のサクラマスにおいて成長に反映されていると考えられた。次にシロサケ *Oncorhynchus keta* 仔魚の血中 GH 量の変動を孵化 1 週間後より測定した。シロサケ仔魚の血中 GH 量は河川に遡上した成魚の 10 倍量にあたる約 100 ng/mL の高値を示し、この値は孵化 7 週後まで維持された。稚魚の浮上期にあたる孵化 8 週後から血中 GH 量

\* Tel : 81-88-864-5156. Fax : 81-88-864-5158. Email : fukaharu@cc.kochi-u.ac.jp

は減少しはじめ、孵化 17 週後には成魚とほぼ同じ値となつた。シロサケ血中 GH 量が高値を示す原因として、体成長はもちろんのこと海水適応能の獲得や稚魚の卵黄嚢における卵黄の分解等にも関わっていることが推察された。

### 3. GHR 遺伝子のクローニング

これまでの研究においてサクラマスでは高濃度血中 GH 量が成長に反映されていたが、血中 GH 量は絶食によつても著しく増加することが報告されている。<sup>12,13)</sup> 先に述べたサクラマスやシロサケにおける血中 GH 量の測定だけでは、その作用を推測することしかできない。GH はその特異的な受容体を介して作用することから、GH の作用機構をさらに詳細に解析するためには、GHR に着目する必要があると考えられた。当時、魚類 GHR の塩基配列は明らかにされていなかつた。そこで、魚類 GHR 遺伝子のクローニングをサクラマスで試みた。<sup>4)</sup> 得られた塩基配列は 2542 bp であり、アミノ酸 595 残基をコードしていた。推定されるアミノ酸の相同性を他の GHR と比較すると、ギンザケ *Oncorhynchus kisutch* GHR を除いては魚類 GHR とも 49% 以下とそれほど高い値を示さなかつた。魚類と魚類以外の代表的な脊椎動物 GHR のアミノ酸配列を基に近隣接合法で分子系統樹を描くと、魚類とそれ以外の脊椎動物に大別され、さらにサクラマス GHR はサケ科魚類のグループに分類された。GHR の特徴としてその構造が細胞外領域、膜貫通領域および細胞内領域からなつておつり、さらに細胞外領域には 7 ヶ所のシステイン残基（3 組のジスフィルド結合を形成）と蝶番の役目をする（Y/F）GEFS motif、細胞内領域には GH が結合した後のシグナル伝達に重要である配列 Box 1 と Box 2 がある。<sup>14,15)</sup> サクラマス GHR では（Y/F）GEFS motif、Box 1 および Box 2 が保存されていたが、細胞外領域のシステイン残基数は 5 であり 2 ヶ所欠いていた。さらに GH が結合する site B の配列を他の GHR と比較するとは乳類 GHR とは異なつてゐたが、魚類間では良く保存されていた。以上のアミノ酸配列における比較では得られたクローンがサクラマスの GHR であることを同定できなかつた。そこで、サクラマス GHR タンパクを作製し、その基質特異性を明らかにする必要とされた。得られた GHR 遺伝子の全塩基配列をもとに、基質の結合に重要である GHR 細胞外領域のリコンビナントタンパク（rGHR-ECD）を大腸菌発現系をもちいて作製した。

<sup>125</sup>I-標識 GH (<sup>125</sup>I-GH) と精製 rGHR-ECD を用いて Sandowski ら<sup>16)</sup>の方法に従つてバインディングアッセイを行つた。<sup>125</sup>I-GH と rGHR-ECD 間の特異結合量は <sup>125</sup>I-GH 濃度に依存して増加した。これをもとに作成した Scatchard plot から結合親和定数 (Ka) を求めた。

得られた Ka は  $1.77 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$  であり、これまでの肝臓膜画分を用いたサケ科魚類 GHR のバインディングアッセイの結果<sup>17-19)</sup>と比較すると、約 10~50 倍低かった。しかしながらこのようにリコンビナントタンパクとして細胞外領域のみを用いた時の Ka の低下はラットのプロラクチンレセプター (PRLR) においても観察されており、<sup>16)</sup> さらにヒトにおいて生体内に存在する GH 結合タンパク (GH-BP : GHR の細胞外領域のみで構成されている) も同様な傾向がみられる。<sup>20)</sup> 魚類でもニジマス *Oncorhynchus mykiss* において GH-BP が報告されており、<sup>21)</sup> その Ka は  $6.6 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$  であり rGHR-ECD の Ka とほぼ同等であった。引き続いて、サクラマス GHR の基質特異性を明らかにするために競合バインディングアッセイを行つた。<sup>125</sup>I-GH と rGHR-ECD 間の特異結合は非標識 GH でのみ特異的に置換され、同じホルモンファミリーのプロラクチンとソマトラクチンでは置換されなかつた。以上の結果から、rGHR-ECD が GH を結合し、またその結合は GH によってのみ置換されたことからクローニングした遺伝子が機能的なサクラマス GHR であると同定した。

次に、魚類の GH の作用部位を推測するためにギンザケ 1 年魚を供試魚として用い、GHR mRNA の組織分布を調べた。組織分布を定量的に解析するために、GHR mRNA 定量系をリアルタイム RT-PCR 法により確立した。GHR は試験に供した全ての組織および器官（脳、下垂体、鰓、心臓、前腎、後腎、肝臓、脾臓、筋肉、内臓脂肪および生殖腺）で発現しており、なかでも肝臓、内臓脂肪および生殖腺で発現量が高いことが確認された。また、この結果は過去の <sup>125</sup>I-GH を用いたバインディングアッセイの結果<sup>17)</sup>とほぼ一致していた。

### 4. 肝細胞培養系を用いた GHR 遺伝子の発現調節機構の解析

肝臓 GHR 遺伝子の発現調節機構を解析するために、ギンザケ肝細胞培養系を用いて、ホルモン添加による GHR 遺伝子の発現量変動を観察した。培養系のポジティブコントロールとして GH によって発現が誘導される IGF-I mRNA 量を測定した。IGF-I mRNA 量は GH 添加濃度 2.5 nM から増加しはじめ、5 nM でコントロール (0 nM) より有意な増加を示したことから、本培養系が機能していることが確認できた。同サンプルの GHR mRNA 量を測定した結果、IGF-I と同様にその発現量は添加濃度 2.5 nM から増加し始め、濃度依存的に増加した。また、Insulin (5 nM) 添加により GHR mRNA 量はコントロールに対し有意に減少し、Dexamethasone (5 nM) 添加では劇的に増加した。共同研究者の Pierce ら<sup>22)</sup>によって、GH の存在下で Insulin と Dexamethason は IGF-I mRNA 量を減少させることが

確認されている。このことから、IGF-I 遺伝子の発現調節には GHR が直接関与する場合とそれとは別の調節機構があることが推察された。また、Glucagon (5 nM) と甲状腺ホルモン (T<sub>3</sub> : 5 nM) 添加では GHR mRNA 量に変化が観察されなかった。

### 5. 絶食と再給餌による血中 GH 量と肝臓 GHR および IGF-I 遺伝子発現量の変化

異なる栄養条件に対する GHR の発現調節機構を解析するために、ギンザケ 1 年魚を用いて 4 週間の絶食後に再び給餌 (2% / BW) を 2 週間行い、異なる栄養条件下での血中 GH 量と肝臓における GHR と IGF-I mRNA 量を観察した。コントロール群には試験期間中、1 日 1 回、2% / BW で給餌を行った。絶食により体重の増加は抑制され、肥満度は著しく減少した。再給餌により体重は増加し始め、肥満度は再給餌 1 週間後には速やかにコントロール群とほぼ同じ値まで回復した。血中 GH 量は絶食により有意に上昇した (100 ng / mL 以上) が、再給餌後、コントロール群 (10 ng / mL) とほぼ同じ血中量に戻った。肝臓における IGF-I mRNA 量は絶食により減少し、再給餌により増加しはじめた。肝臓 GHR mRNA の発現は絶食により抑制され、再給餌 2 週目より増加し始めた。肝臓 IGF-I mRNA 量はコントロール群と実験群で肝臓 GHR mRNA 量と正の相関を示した。以上の結果から、肝臓 GHR は肝臓 IGF-I 遺伝子の発現を調節する重要な要因の一つであることを確認した。さらにこれまで絶食条件下の魚類で観察されてきた高濃度の血中 GH 量にもかかわらず、成長が停滞するという相反する現象の原因が明らかとなった。

### おわりに

これまでの研究から GH の作用機構において GHR が魚類の成長に重要な役割を果たしていることがわかった。しかしながら、肝細胞培養での dexamethasone 添加実験の結果のように IGF-I mRNA 量の増加を伴わない GHR mRNA 量の増加も観察されている。また肝細胞では GHR mRNA 量が GH 添加によって上昇したが、絶食時の魚体では高値の血中 GH 量にもかかわらず、肝臓 GHR mRNA 量が減少することも観察された。魚類の成長において GH の作用機構をより理解するためには、今後、GHR の発現調節機構の解明や GH が GHR に結合した後の IGF-I 遺伝子発現に至る過程とその調節機構の解明が必要と思われる。

現在、様々な魚種から GHR 遺伝子がクローニングされている。これまでサケ科魚類だけで確認されていた細胞外領域にシステインを 5 残基しかもたない GHR もヨーロッパヘダイでクローニングされた。<sup>5)</sup> Pérez-Sánchez 博士らの研究グループでは魚類 GHR を細胞外領

域のシステイン残基数で分類することを提唱しており、システイン残基数が 7 つのものを GHR type I, 5 つのものを GHR type II としている。しかしながら、GHR の基質特異性を確認した報告は少なく、GH / プロラクチンファミリーに属する下垂体ホルモンであるソマトラクチンまで含めて解析を行ったのは本研究のみである。また、我々のグループはソマトラクチンレセプター (SLR) のクローニングに成功し、それは GHR と良く似た特徴を有している。<sup>23)</sup> 脊椎動物の GHR, PRLR および SLR のアミノ酸配列を基に分子系統樹を描くと GHR と PRLR に大別され、それぞれの中で魚類と魚類以外に分けられる。SLR は魚類 GHR に大別され、さらに主に海産魚 GHR (GHR type I) で構成されるグループに分類される。これらの状況から、GHR type I は GH に特異的なレセプターなのか、もしくは SL も結合するのか等が早急に解明されることが望まれる。

今後は、これまでの成果を踏まえつつ、魚類における成長と飼料 (栄養) の関係に着目し、栄養条件が GH, GHR および IGF-I に与える影響を詳細に解析する予定である。その解析結果をもとに、より効率的な成長を望める飼料を開発し、水産増養殖事業に貢献していきたいと考えている。

### 謝 辞

本研究を行うにあたり常に格段のご指導とご助言を賜った、北海道大学大学院水産科学院 原 彰彦教授に深く感謝を申し上げます。また、多くの有用なご意見を賜りました北海道大学大学院水産科学院 山内皓平教授と足立伸次教授に深く感謝を申し上げます。化学発光イムノアッセイの確立には北海道大学医学部 千葉仁志教授に GHR のクローニングに際しては愛媛大学農学部 尾崎雄一博士に多大な指導、ご協力を頂きました。留学期間中には、Northwest Fisheries Science Center (米国 NOAA) Walton W. Dickhoff 教授および Penny Swanson 博士には多くの有用なご意見と御討論そしてご指導を頂きました。本研究を遂行するにあたり、北海道大学水産学部 原研究室の卒業生には多大なご協力を頂きました。この場をお借りして厚くお礼申し上げます。

### 文 献

- 1) Björsson BT. The biology of salmon growth hormone - from daylight to dominance. *Fish Physiol. Biochem.* 1997; 17: 9-24.
- 2) Yada T, Nagae M, Moriyama S, Azuma T. Effects of prolactin and growth hormone on plasma immunoglobulin M levels of hypophysectomized rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 1991; 81: 72-82.
- 3) Argetsinger LS, Cater-Su C. Mechanism of signaling by growth hormone receptor. *Physiol. Rev.* 1996; 76: 1089-1107.

- 4) Fukada H, Ozaki Y, Pierce AL, Adachi S, Yamauchi K, Hara A, Swanson P, Dickhoff WW. Salmon growth hormone receptor: molecular cloning ligand specificity, and response to fasting. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2004; **139**: 61–71.
- 5) Saera-Vila A, Caldúch-Ginger JA, Pérez-Sánchez. Duplication of growth hormone receptor (GHR) in fish genome: gene organization and transcriptional regulation of GHR type I and II in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Gen. Comp. Endocrinol.* (in press).
- 6) Bolton JP, Takahashi A, Kawauchi H, Kubota J, Hirano T. Development and validation of a salmon growth hormone radioimmunoassay. *Gen. Comp. Endocrinol.* 1986; **62**: 230–238.
- 7) Wagner GF, McKeown BA. Development of a salmon growth hormone radioimmuno assay. *Gen. Comp. Endocrinol.* 1986; **62**: 452–458.
- 8) Fukada H, Hiramatsu N, Gen K, Hara A. Development of an ELISA for chum salmon (*Oncorhynchus keta*) growth hormone. *Comp. Biochem. Physiol.* 1997; **117B**: 387–392.
- 9) Fukada H, Hiramatsu N, Kitamura M, Chiba H, Hara A. Chemiluminescent immunoassay (CLIA) for salmon growth hormone (GH). *J. Biolumin. Chemilumin.* 1997; **12**: 271–275.
- 10) Fukada H, Ban M, Chiba H, Hara A. Immune complex transfer two-site chemiluminescent immunoassay for serum growth hormone in alevin chum salmon. *J. Biolumin. Chemilumin.* 1998; **13**: 107–111.
- 11) Fukada H, Kitamura M, Hiramatsu N, Shimizu M, Hara A. Changes of serum growth hormone and vitellogenin levels during vitellogenesis in female masu salmon. *Fish. Sci.* 2000; **66**: 789–791.
- 12) Duan C, Plisetskaya EM. Nutritional regulation of insulin-like growth factor-I mRNA expression in salmon tissues. *J. Endocrinol.* 1993; **139**: 243–252.
- 13) Moriyama S, Kawauchi H, Kagawa H. Nutritional regulation of insulin-like growth factor-I plasma levels in smoltling masu salmon *Oncorhynchus masou*. *Bull. Natl. Res. Inst. Aquacult. Suppl.* 1999; **1**: 7–11.
- 14) Bazan JF. Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor super family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990; **87**: 6934–6938.
- 15) Kopchick JJ, Andry JM. Growth hormone (GH), GH receptor, and signal transduction. *Mol. Gen. Metab.* 2001; **71**: 293–314.
- 16) Sandowski Y, Nagano M, Bignon C, Djiane F, Kelly PA, Gertler A. Preparation and characterization of recombinant prolactin receptor extracellular domain from rat. *Mol. Cell. Endocrinol.* 1995; **115**: 1–11.
- 17) Gray ES, Young G, Bern HA. Radioreceptor assay for growth hormone in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) and its application to the study of stunting. *J. Exp. Zool.* 1990; **256**: 290–296.
- 18) Gray ES, Tsai RW. Characterization of striped bass growth hormone in coho salmon. *J. Exp. Zool.* 1994; **268**: 428–435.
- 19) Yao K, Niu PD, Le Gac F, Le Bail PY. Presence of specific growth hormone binding site in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) tissues: characterization of the hepatic receptor. *Gen. Comp. Endocrinol.* 1991; **81**: 72–82.
- 20) Leung DW, Spencer SA, Cachianes G, Hammonds RG, Collins C, Henzel WJ, Barnard R, Waters M, Wood MI. Growth hormone receptor and serum binding protein: purification, cloning, and expression. *Nature* 1987; **330**: 537–543.
- 21) Sohm F, Manfroid I, Pezet A, Rentier-Delrue F, Rand-Weaver M, Kelly PA, Bouef G, Postel-Vinay MC, de Luze A, Edery M. Identification and modulation of a growth hormone-binding protein in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) plasma during sea water adaptation. *Gen. Comp. Endocrinol.* 1998; **111**: 216–224.
- 22) Pierce AL, Fukada H, Dickhoff WW. Metabolic hormones modulates the effect of growth hormone (GH) on insulin-like growth factor-I (IGF-I) mRNA level in primary culture of salmon hepatocytes. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2005; **184**: 341–349.
- 23) Fukada H, Ozaki Y, Pierce AL, Adachi S, Yamauchi K, Hara A, Swanson P, Dickhoff WW. Identification of the salmon somatotropin receptor, a new member of the cytokine receptor family. *Endocrinology* 2005; **146**: 2354–2361.