

クロマグロ稚魚における 下垂体ホルモンの概日リズムに関する研究

足立亨介,¹ 家戸敬太郎,¹ 石丸克也,^{1*} 山本昌義,² 村田 修,¹ 熊井英水^{1,2}

(種苗生産・養殖グループ)

¹近畿大学水産研究所, ²近畿大学大学院農学研究科

* ishimaru@cypress.ne.jp

クロマグロは仔稚魚期に非常に速い成長を示す。成長を制御するのは下垂体から分泌される成長ホルモン (Growth Hormone; 以下 GH) であり¹⁾, マグロの高い成長速度を理解する上で GH およびその周辺因子の特質を明らかにすることは不可欠である。魚類の下垂体からは GH と遺伝子ファミリーを構成するプロラクチン (Prolactin; 以下 PL) およびソマトラクチン (Somatolactin; 以下 SL) が分泌されている²⁻³⁾。GH と PL の分泌には概日リズムがあり, ほ乳類および魚類においてはその発現が相関性を示すことが明らかになっている⁴⁻⁵⁾。しかしながら SL は近年同定されたホルモンで魚類以外にその所在は確認されておらず, その詳細についても不明な点が多い。

本研究ではこれら三種のホルモンが概日的にいかなる挙動で発現し, 相関し合っているのかを, リアルタイム PCR による遺伝子発現の定量によって明らかにした。

試料および方法

供試魚 近畿大学水産研究所大島実験場で種苗生産された平均体重 15.2±4.2g 平均全長 144.3±8.9mm の 42 日齢のクロマグロ稚魚を用いた。2004 年 9 月 5 日午前 10 時から翌 6 日午後 0 時まで 27 時間, 1 時間毎に 5 尾ずつ下垂体を摘出した。尚, サンプルング時には 20W の電球で水槽を点灯した。またサンプルング前 24 時間は無給餌とした。

全 RNA の抽出 摘出した下垂体から AGPC 法によって全 RNA を抽出した。DNase I 処理によりゲノ

ム DNA の除去したサンプルを 50 μ l の蒸留水に溶解し, 逆転写反応に用いた。

Table 1 Primers for GH/PL/SL gene
Sequence 5' to 3'

tuna GH-F	AGCAGCGTCAGCTCAACAAA
tuna GH-R	AACTCCACGATTCCACCAA
tuna PL-F	AACTGCACTCCCTCAGCACA
tuna PL-R	CGAGCCAATGACAGCAGGTT
tuna SL-F	TATGGGCTGTGTTGCTCTGG
tuna SL-R	GCAGTGGGAATGGGACAAAC
tuna β -F	ACCCACACAGTGCCCATCTA
tuna β -R	TCACGCACGATTTCCCTCT

逆転写反応 M-MLV RTase (TAKARA Bio INC) 50unit, dNTP 0.5mM, Random 6mers 50pmol, RNase Inhibitor 10unit および全 RNA 溶液 2 μ l を含む反応溶液 20 μ l を調製し, 42°C, 15 分反応後, 70°C で 15 分処理することにより反応を停止した。

リアルタイム PCR GH, PL および SL 各々の特異的プライマーはソフトウェア Primer3 を用いて設計した (Table 1)。2 \times SYBER Premix Ex Taq (タカラバイオ)12.5 μ l, 10 μ M のプライマーセット, および鋳型 DNA 2 μ l を含む 25 μ l の反応溶液を調製し, Smart Cycler II System (Cepheid社)を用いて 95°C10 秒 \times 1 サイクル, 95°C5 秒, 60°C20 秒 \times 45 サイクルで PCR を行い, 検量線法によって

各遺伝子のコピー数を算出した。同条件では非特異的な増幅が見られないことはPCR後の電気泳動および増幅産物のシーケンシングによる確認した。内部標準としてベータアクチン遺伝子を用いた。

結 果

GH の発現リズム GH 相対的発現量が最も多くなる時間帯は深夜の 2 時から 4 時の間であった (Fig. 1)。Scheffe' s F test により発現量が最も多くなる午前 4 時の発現量と午前 2 時, 午前 3 時および午前 8 時をのぞく時間帯の発現量との間に有意差が確認された ($p < 0.05$)。さらにこのときの GH 発現量は基準とした午前 10 時の GH 発現量の約 90 倍であった。深夜の時間帯以外にも小さなピークが確認できた。

PL および SL の発現リズム PL および SL ともに発現量が最も多くなる時間帯は午前 6 時から 7 時であった (Fig. 1)。しかしながら GH の場合と比べ個体差が大きく, 最も多く発現した時間帯とそれ以外の時間帯との発現量の明確な差は確認できなかった。PL と SL の発現パターンを比べた場合, 両者は非常に類似していた。

GH, PL および SL の発現量の相関性 三種のホルモンの発現量の相関性を検討するため, 同一個体で得られた二つの遺伝子の発現量を散布図として Fig. 2 に示した。GH と PRL との発現量, および GH と SL との発現量を示した図では $|r| < 0.4$ となり相関性はみられなかった。一方 PL と SL との発現量には $|r| = 0.82$ ($p < 0.05$) の強い相関関係が認められた。

考 察

本研究ではクロマグロをもちいて下垂体ホルモンである GH, PL および SL 発現の概日リズムを解析した。その結果, GH は深夜の 2 時から 4 時にその発現が明瞭なピークをむかえることが示された。PL および SL は やや遅れて午前 6 時から 7 時に最

大の発現を示すが, GH ほど明らかな結果は得られなかった。また PL と SL は強く同調して発現していることが示された。

内分泌のレベルでは Falcon らによって魚類の GH および PL の発現量はメラトニンに支配されているとの報告がある⁶⁾。メラトニンは光周期によってその松果体からの分泌リズムが決定され深夜にサージを迎えることから⁷⁾, 今回の得られた結果を最上流で支配するのは光周期によるメラトニン分泌量の制御であると考えられる。

これらのホルモンの発現を転写レベルで制御しているのは Pit-1 (Pituitary transactivation activator-1) および CREB (cAMP-responsive element binding protein) と呼ばれる転写因子で魚類でも各々の遺伝子の転写調節領域にこれらの結合モチーフが同定されている。その他, GH では甲状腺ホルモン受容体, PL ではエストロゲン受容体の結合モチーフが転写調節領域に確認されている⁸⁻⁹⁾。

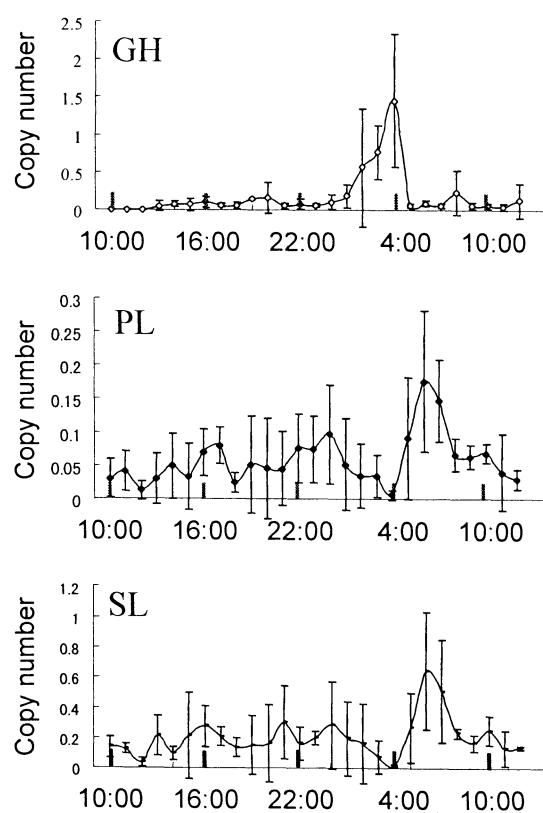


Fig.1 Daily expression rhythm of GH/PL/SL

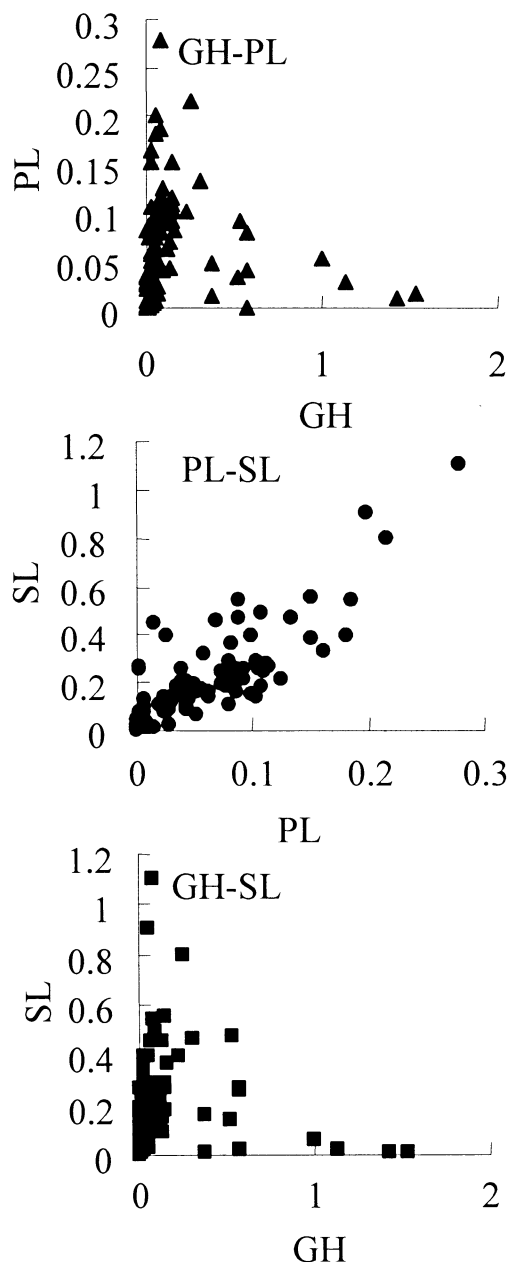


Fig. 2 Correlation analysis for expression of GH/PL/SL

今回得られた結果を解釈すると明瞭な概日発現リズムを示した GH においてはメラトニンに制御をうける比較的単純な系によって支配されていると考えられる。これに対し PL と SL は GH とは異なる因子 (群) の制御下にあり、概日的に両者を制御するのは非常に類似した転写機構であると予想される。

今後はクロマグロとは異なる成長様式を示すマ

ダイおよびマサバも含めて日齢を追い GH/PL/SL の発現量を解析する予定であるが、今回の結果から日齢ごとに昼間と夜間、両方のサンプリングをする必要があることが示された。またクロマグロは仔稚魚に一日で全長の 0.5% 程度の成長を見せる。明け方の GH のサージを受け一日のどの時間帯で最も成長するのか、解析手法も含めて検討していく予定である。

謝 辞

本研究の実施にあたり、ご協力を頂きました岡田貴彦様をはじめとする本学水産研究所大島実験場の方々に心より感謝致します。

文 献

- 1) 入江實. 成長ホルモンの歴史「成長ホルモンのすべて」科学評論社, 東京, 2002; 15: 1-9
- 2) 小野雅夫. 成長ホルモン・プロラクチン・ソマトラクチン「ホルモンの分子生物学2」(日本比較内分泌学会編) 学会出版センター, 東京, 1996; 1-26
- 3) Ono M, Takayama Y, Rand-Weaver M, Sakata S, Yasunaga T, Noso T, Kawauchi H. cDNA cloning of somatolactin, a pituitary protein related to growth hormone and prolactin.. Proc Natl Acad Sci USA. 1990; 87: 4330-4334.
- 4) Leatherland JF and Mckeown BA and John TM. Circadian Rhythm of Plasma Prolactin, Growth Hormone, Glucose and Free Fatty Acid in Juvenile Kokanee Salmon *Oncorhynchus nerka*. Comp. Biochem. Physiol. 1974; 47: 821-828
- 5) Nussey SS, Whitehead SA. The pituitary gland. In: Nussey SS, Whitehead SA. (eds) Endocrinology. BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford. 2001; 283-331.
- 6) Falcon J, Besseau L, Fazzari D, Attia J, Gaildrat P, Beauchaud M, Boeuf G. Melatonin modulates secretion of growth hormone and prolactin by trout pituitary glands and cells in culture. Endocrinology. 2003; 144: 4648-58.

7) Vanecek J. Cellular mechanism of melatonin action. *Physiological Reviews*. 1998; 78: 687-721.

8) 巽圭太 転写調節因子 Pit-1/GHF-1「ホルモンの分子生物学2」(日本比較内分泌学会編) 学会出版センター, 東京, 1996; 151-171

9) Takayama Y, Rand-Weaver M, Kawauchi H and Ono M. Gene structure of chum salmon somatolactin, a presumed pituitary hormone of the growth hormone/prolactin family. *Mol Endocrinol*. 1991;5:778-86.