

クロマグロ甲状腺ホルモン結合タンパク transthyretin 遺伝子の発現と機能解析

川上 優,¹ 瀬岡 学,² 宮下 盛,³ 太田博巳^{4*}
(^{1,3,4}種苗生産・養殖グループ, ²飼料・食品安全・加工グループ)
¹⁻³近畿大学水産研究所, ⁴近畿大学大学院農学研究科
* Ohata@nara.kindai.ac.jp

甲状腺ホルモン結合蛋白は甲状腺ホルモン [3, 3', 5-triiodo-L-thyronine (T₃), L-thyroxine (T₄)] の血中における輸送システムに寄与していることが知られ,¹⁾ ほ乳類では albumin や prealbumin, thyroxine-binding globulin などが結合蛋白として知られている。生体内においてほとんどの甲状腺ホルモンは結合蛋白と結合した状態で存在し、遊離した甲状腺ホルモンの比率は1%にも満たないことが報告されているが、この遊離甲状腺ホルモンが生体内においてホルモン作用を担っていると考えられている。²⁾ そのため甲状腺ホルモン結合蛋白は、生体内の遊離甲状腺ホルモン量を制御し恒常性を維持する機能を有していると考えられる。

魚類において甲状腺ホルモンは、発生および変態といった初期成長に重要な役割を果たすホルモンと考えられているが、³⁻⁵⁾ ほ乳類同様、遊離甲状腺ホルモンが存在することがサケ科魚類において報告されている。⁶⁾ 近年、魚類の主要な甲状腺ホルモン結合タンパクとして transthyretin (TTR) が報告されており、⁷⁾ このタンパクが血中内で甲状腺ホルモンと結合し、甲状腺ホルモン作用を制御している可能性は極めて高いと考えられる。

我々はクロマグロ (bluefin tuna, *Thunnus orientalis*) の種苗生産効率の向上を目的として、本種の卵質に影響を及ぼす諸要因の解析を進めており、その有力候補として卵内に含まれる甲状腺ホルモンに着目している。魚卵内には

卵黄画分の他、親魚由来のホルモンの存在が報告されており、甲状腺ホルモンもこれまでにサケ (*Oncorhynchus keta*) 等の魚卵から検出されている。^{4,5)} また仔稚魚において甲状腺ホルモンを投与すると成長や生残率が向上すると言った事例も報告されているため、^{8,9)} 親魚由来と思われる卵内甲状腺ホルモンが、受精成績や、初期の生残、成長におよぼす影響は無視できないものと考えられる。そこで我々は、甲状腺ホルモンが卵質に及ぼす影響を解析するため、先ず卵内の甲状腺ホルモンの動態を明らかにすることを目標とした。上述のごとく、甲状腺ホルモンの多くは甲状腺ホルモン結合タンパクと結合し、結合タンパクから解離した微量な遊離甲状腺ホルモンが受容体と結合して作用を及ぼしていると考えられるため、本研究では、先ず主要な甲状腺ホルモン結合タンパクである TTR がクロマグロにおいても存在するか否かを確認し、さらにその生理学的機能について解析することを目的とした。

試料および方法

供試魚 サンプルは、鹿児島県の近畿大学水産研究所奄美実験場で飼育された、完全養殖クロマグロ (体重 10-14 kg) を用いた。各組織は RNAlater (Takara) に投入し、-20℃で凍結保存した後、近畿大学農学部キャンパスに持ち帰り-80℃で解析まで保存した。

TTR cDNA のクローニング 凍結保存したクロマグロ肝臓組織から、TRIzol (Invitrogen) を用いて total RNA を抽出し、Oligo-dT-30 (Takara) を用いて、Poly (A)⁺-RNA を抽出した。次に 1 μ g Poly (A)⁺-RNA を Oligo-dT プライマーを用いて、Superscript II (Invitrogen) による逆転写反応を行い、1st cDNA とした。

他生物で報告されている transthyretin 遺伝子の既知の配列から、degenerated primer を作製しサブクローニングを行った。さらに得られたサブクローンをもとに 3' , 5' RACE 法を用いて残りの配列を得た。RACE 法は Kawakami et al.¹⁰⁾ に準拠した。

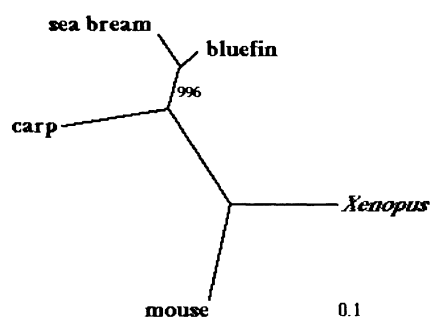


Fig. 1. Phylogenetic tree of 5 vertebrate TTR. Lengths of horizontal lines indicate the genetic distance. One thousand bootstrap replicates were performed, and values are shown at the inner nodes. GenBank Accession Nos. for each sequence are: mouse (BC086926); *Xenopus* (AB026996); sea bream (AF059193); carp (A544193).

RT-PCR 各組織から TRIzol を用いて total RNA を抽出した。10 μ g の total RNA から、random プライマー、M-MLV を用いて逆転写を行い、1st cDNA とした。各組織の TTR の発現解析に用いたプライマー対は、5' -TCCTCTGATGGTGAATACTCTGGACGC-3' , 5' -ATATGGACTGAGCAGCAAGGCCAAGG-3' である。内部標準遺伝子として β -actin 遺伝子を用いた。

T₃ バインディングアッセイ クロマグロ (bluefin tuna) TTR (bTTR) の配列を pcDNA3.1(+) (Invitrogen) に挿入し (pcDNA-bTTR) 発現ベクターとした。同ベクターをウナギ肝細胞由来の Hepa-E1 細胞にリポフェクション法を用いて導入し、28°C で 24 時間

培養した。培養後、細胞溶解液を加え細胞溶出液とした。細胞溶出液に T₃ を 10 nM になるように加え、4°C でオーバーナイト反応させた。反応液をドットブロッターを用いて PVDF メンブレンに転写させ洗浄を行った後、T₃ 抗体 (Biogenesis) を 1 次抗体、2 次抗体として AP 標識抗体 (Sigma-Aldrich) を用い、NBT/BCIP によって発色させた。

レポーター遺伝子アッセイ法を用いた甲状腺ホルモン受容体競合アッセイ ヒラメ甲状腺ホルモン受容体 β 1 (Japanese flounder thyroid hormone receptor β 1: fTR β 1) の配列 (D45245) を pcDNA3.1(+) に挿入した (pcDNA-fTR β 1)。pGV2-TRETK2 (TH-dependent transcription from the TH-responsive promoter) (未発表) ベクターをレポーターベクターとして用いた。

48 穴プレートに 4 x 10⁵ 個の濃度で蒔いた Hepa-E1 細胞内に、pGV2-TRETK2 をベースとして、さらに pcDNA-fTR β 1, pcDNA-bTTR, pcDNA3.1(+) の 3 つを組み合わせてリポフェクション法によって導入した。導入後 T₃ を 1 μ M 添加し 24 時間 28°C でインキュベートし、Dual Luciferase Assay System (Promega) を用いて測定を行った。

結果および考察

bTTR は翻訳領域において 453 塩基、151 アミノ酸残基を有していた。他種との相同性を比較したところ、マウス (*Mus musculus*) で 38.7%, *Xenopus laevis* で 37.7%, コイ (*Cyprinus carpio*) で 55.4%, gilthead seabream (*Sparus aurata*) で 81.3% と、同じスズキ目魚類との間で高い相同性が認められた (Fig. 1)。これより TTR はクロマグロにおいても存在していることが確認された。

RT-PCR による発現解析から肝臓においてもっとも高い発現が認められた (Fig. 2)。一方、gilthead seabream においても肝臓や脳下垂体

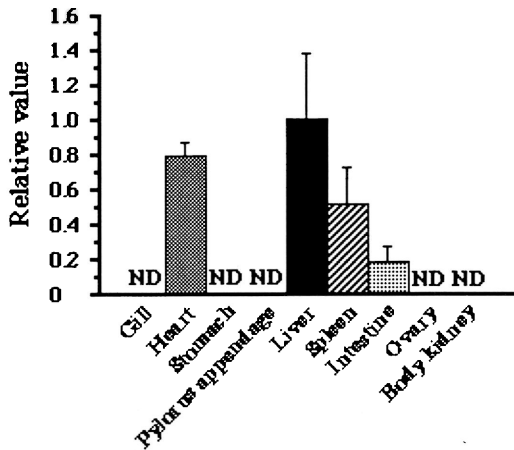


Fig. 2 Expression of bTTR genes in various blue fin tuna tissues using RT-PCR method. Average of bTTR of liver was set at one unit. Three independent experiments were carried out, and the data are represented as means \pm SE. ND, not detected.

において高い発現が報告されている。⁷⁾ 本研究では脳および脳下垂体についての解析は行っていないが、発現様式に関しても gilthead seabream と類似しているものと考えられた。

bTTR が含まれた細胞溶出液と T_3 との結合性を調べたところ、細胞溶出液量の増加に伴い、 T_3 に対するシグナルの増加が認められた (Fig. 3)。一方、bTTR を挿入していない pcDNA3.1 (+) をコントロールとして用いた場合、シグナルは検出されなかった。以上の結果から、bTTR は T_3 と結合することが示された。

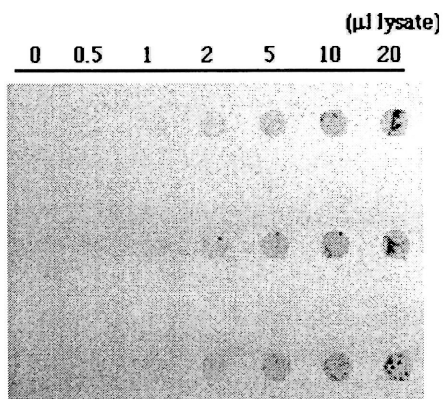


Fig. 3 Dot blots of T_3 binding to bTTR synthesized *in vitro*. Lysates containing bTTR were incubated with 10^{-6} M T_3 for over night.

次に、スズキ目魚類の上位に位置するヒラメで報告されている甲状腺ホルモン受容体、fTR β 1 を用いたレポーター遺伝子アッセイ系に T_3

を投与したところ、fTR β 1 は活性化された。このアッセイ系を用い、bTTR を fTR β 1 と共発現させて T_3 を加えたところ、ルシフェラーゼ活性値は有意な低下を示した (Fig. 4)。これは bTTR が fTR β 1 の競合体として機能し、fTR β 1 の転写活性が抑制されたためと考えられた。

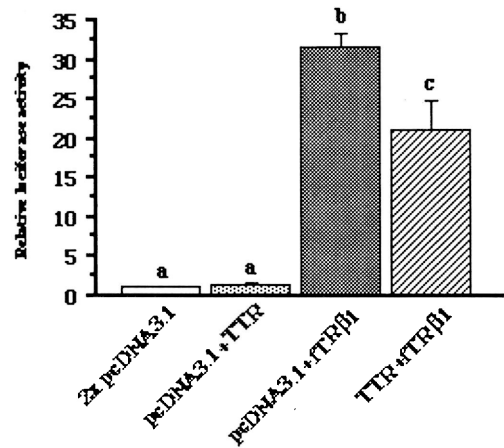


Fig. 4 Transcriptional activities of fTR β 1 for 3,5,3'-L-triiodothyronine (T_3). Hepa-E1 cells were transfected with the PGV-2TRETK-luciferase vector together with the fTR β 1 or bTTR expression vector. Cells were seeded at a density of 0.4×10^5 per well and incubated with 10^{-6} M T_3 for 24 h. Each value represents the mean \pm SEM of three independent experiments. The mean value of 2x pcDNA3.1 was set at a relative value of 1. a, b and c groups sharing the same letter codes were not significantly different at $p < 0.01$ by Fisher's PLSD test.

生体内では、甲状腺ホルモンはそのほとんどが甲状腺ホルモン結合蛋白と結合した状態で存在し、遊離甲状腺ホルモンが生理作用を引き起こすと考えられている。²⁾ 本研究の結果から、TTR が遊離甲状腺ホルモンと結合すること、また TTR が存在することにより甲状腺ホルモン作用が低減化されることが明らかとなった。このことから、魚類においても甲状腺ホルモン作用は、TTR 等の甲状腺ホルモン結合蛋白との結合と解離の度合いによって制御され、遊離した甲状腺ホルモンが生体内作用を誘起している可能性が示唆された。

今後はクロマグロ未受精卵や発生途中の卵内、並びに仔稚魚期の体内に存在する遊離甲状

腺ホルモン量とTTRに結合した甲状腺ホルモンの動態を解析し、それらと卵の受精能、発生能、生残率や成長率との相関を明らかにしていく必要があると考えている。

文 献

- 1) Robbins J, Cheng S-Y, Gershengorn MC, Glinoeer D, Cahnmann HJ, Edelnoch H. Thyroxine transport proteins of plasma. Molecular properties and biosynthesis. *Rec. Prog. Hormone Res.* 1978; **34**: 477-519.
- 2) Mendel CM. The free hormone hypothesis: a physiologically based mathematical model. *Endocrine Rev.* 1989; **10**: 232-274.
- 3) Inui Y, Miwa S. Thyroid hormone induces metamorphosis of flounder larvae. *Gen. Comp. Endocrinol.* 1985; **60**: 450-454.
- 4) Tagawa M, Hirano T. Presence of thyroxine in eggs and changes in its content during early development of chum salmon, *Oncorhynchus keta*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 1987; **68**: 129-135.
- 5) Tagawa M, Tanaka M, Matsumoto S, Hirano T. Thyroid hormones in eggs of various freshwater, marine and diadromous teleosts and their changes during egg development. *Fish Physiol. Biochem.* 1990; **8**: 515-520.
- 6) Eales JG, Shostak S. Free T₄ and T₃ in relation to total hormone, free hormone indices, and protein in plasma of rainbow trout and arctic charr. *Gen. Comp. Endocrinol.* 1985; **58**: 291-302.
- 7) Santos CRA, Power DM, Identification of transthyretin in fish (*Sparus aurata*): cDNA cloning and characterisation. *Endocrinology* 1999; **140**: 2430-2433.
- 8) Lam TJ. Thyroxine enhances larval development and survival in *Sarotherodon (Tilapia) mosambicus* Ruppel. *Aquaculture* 1980; **21**: 287-291.
- 9) Nacario JF. The effects of thyroxine on the larvae and fry of *Sarotherodon niloticus* L. (*Tilapia nilotica*). *Aquaculture* 1983; **34**: 78-83.
- 10) Kawakami Y, Tanda M, Adachi S, Yamauchi K. cDNA cloning of thyroid hormone receptor β s from the conger eel, *Conger myriaster*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2003; **131**: 232-240.