

9124 魚類の塩による浸透圧維持機構に関与する成長ホルモン

中島 邦夫(三重大学)

塩(NaCl)は生物にとって不可欠な要素として、生体内においてさまざまな生理作用を担っている。特に、淡水、海水あるいは汽水中に生活する魚類においては浸透圧を一定に保つためNaClの役割は重要であり、体内のNaCl濃度を常に調節して維持する必要がある。最近の研究から、魚類の浸透圧調節のうち海水適応、すなわちNaClの生体からの汲み出しには下垂体ホルモンの成長ホルモンが関与し、淡水適応、すなわち生体へのNaClの取り込みと維持には、成長ホルモンと共通の祖先遺伝子を持ってファミリーを形成しているプロラクチンが関与していることが判明して来た。成長ホルモンは元来、成長促進ホルモンとして、またプロラクチンは保育促進ホルモンとして知られて来たが、各魚類の成長ホルモンおよびプロラクチンの構造解析については、これまであまり進展を見ていなかった。また、それらホルモンのレセプターの構造、分布、動態、さらにはホルモンのシグナル伝達機構と浸透圧維持の分子機構の解明については、すべて今後に残された課題となっている。

本研究では成長ホルモンとプロラクチンによって調節される塩による浸透圧維持機構の解明を目的とし、先ず魚類の両ホルモンの構造特異性を解析すべくcDNAクローニングを行った。ブリ、シマアジ、ヒラメの脳下垂体から、それぞれの成長ホルモンのcDNAクローンを得ることに成功し、それぞれの構造解析を行った。その結果、ブリ成長ホルモンはアミノ酸187個、シマアジ成長ホルモンはアミノ酸188個、ヒラメ成長ホルモンはアミノ酸173個からなり、特にヒラメ成長ホルモンはこれまで解明された成長ホルモンのうち最小のものであることが判明した。これらの成長ホルモンの構造を基に保存された領域の解析を行ったところ、成長ホルモンには5つの強く保存された領域があり、その活性発現に重要な役割を果たしていることが示唆された。これらの5つの保存領域をGD (Growth hormone domain)1からGD5と名付けた。

次いで、活性あるブリおよびヒラメ成長ホルモン蛋白質を得るため、これらのcDNAを用いて大腸菌発現ベクターを構築した。大腸菌内にて発現させたところ、全菌体蛋白質の8~15%にまでホルモン蛋白質を産生したので、これらを精製してリフォールディングさせ、活性ある組換え型ブリ成長ホルモンおよびヒラメ成長ホルモンをそれぞれ得ることが出来た。

9124 魚類の塩による浸透圧維持機構に関与する成長ホルモン

中島 邦夫(三重大学)

【研究目的】

地球上の生物にとって塩(NaCl)は不可欠要素であり、生体内において塩は様々な生理作用を担っている。このため生物は、体内に常に一定のNaCl濃度を維持する必要がある。また、水中で棲息する魚類では、淡水、海水、汽水など環境に応じてNaClの体内濃度を調節することにより、浸透圧の調節と維持を行っている。たとえば、海水中の魚類は、周囲の高塩濃度に抵抗して体内から Na^+ 、 Cl^- を汲み出して海水適応をする必要があり、また淡水中の魚は周囲の低い塩濃度に対抗して浸透圧を維持するため体内に Na^+ 、 Cl^- を取り込んで保持し、淡水適応を行っている。

最近の研究から、魚類の海水適応には脳下垂体ホルモンの成長ホルモンが関与し、淡水適応には成長ホルモンの遺伝子ファミリーであるプロラクチンが関与していることが判明して来た。成長ホルモンは元来脊椎動物の成長促進ホルモンとして知られ、またプロラクチンは乳汁分泌、保育、母性行動、父性行動に関するホルモンとして知られているが、共に一つの祖先遺伝子から進化して来たと考えられている。当教室では、分子進化解明の見地と、ホルモン・受容体構造相互関係とシグナル伝達機構解明の見地から、種々の脊椎動物の成長ホルモン／プロラクチン／胎盤性ラクトゲン遺伝子ファミリーの構造解析を行うと共に、それらのホルモンの受容体構造と情報伝達機構の解析を進めて来た。

本研究では、①魚類成長ホルモンとプロラクチンのcDNAクローニングを行い、②その塩基配列からホルモンの構造を解析すると共に、③cDNAを使用して組換え型の魚類成長ホルモンおよびプロラクチンを産生し、リフォールディングにより活性型とした後、④種々の活性実験に使用する。⑤さらに魚類における成長ホルモンおよびプロラクチンの受容体について、その構造、分布、動態を解析し、⑥ホルモンと受容体の構造相関性を検討しつつ⑦成長ホルモンとプロラクチンのシグナル伝達の分子機構を究明する。これらの実験を通じ、⑧最終的に、魚類における成長ホルモンとプロラクチンによる塩濃度調節と浸透圧維持の分子機構を解明することを目的とする。

【研究方法】

魚類成長ホルモン、プロラクチンcDNAのクローニング

ブリ、シマアジ、ヒラメ、サクラマス、コイから脳下垂体を摘出し、グアニジンチオシアネート／塩化セシウム法にてRNAを抽出し、ポリ(A)⁺RNAをオリゴd(T)セルロースカラムにて精製する。得られたポリ(A)⁺RNAを使用し、当教室で開発した大腸菌プラスミド・クローニングベクターに組込んでcDNAライブラリーを構築する。構築されたベクターを大腸菌DH1株にトランスフォームして、組換え体を1枚のプレートにつき二〜三百個ずつ撒き、近種由来の当該ホルモンcDNAをプローブにしてスクリーニングする。シグナル陽性コロニーからプラスミドを抽出し、ホルモンcDNA部分の塩基配列をジデオキシ法およびマキサム・ギルバート法により決定する。

成長ホルモン、プロラクチンの大腸菌による発現とリフォールディング、精製

各ホルモンのcDNAを、先ず最初にtacプロモーターを持つ大腸菌発現ベクターpKK223-3に組込む。得られた組換えプラスミドにより大腸菌株JM109またはJM103をトランスフォームする。トランスフォーマントをアンピシリンにて選別、培養し、これに1mMのイソプロピルチオガラクトシド(IPTG)を作用させて、ホルモン蛋白質を大量に産生させる。このtacプロモーターを持つ発現ベクターにてうまく発現しないcDNAについては、P_Lプロモーターを持つ大腸菌発現ベクターpKKPL12に組込んで別種のホルモン発現ベクターを構築する。構築されたプラスミドを大腸菌株N4830-1にトランスフォームした後、30°Cにてアンピシリン存在下にて培養する。OD_{660nm}が0.8に達した時点で培養温度を42°Cに15分間上げ、ホルモン蛋白質の発現を誘導する。以後の培養を37°Cにて続行して、ホルモン産生を十分なものとする。

ホルモンの産生をSDS-PAGEによって確認した後、菌体を遠心によって集める。菌体をリゾチーム処理、超音波処理、凍結融解処理によって破碎した後、再び遠心によって菌体内不溶性画分を得る。この画分はほとんどホルモン蛋白質であるので、6M塩酸グアニジンに溶解してグルタチオンRed/Oxバッファーに希釈する。これを数日間攪拌してリフォールディングさせ、透析して活性型ホルモン蛋白質とする。さらにイオン交換クロマトグラフィーを行って均一な組換え型成長ホルモンまたはプロラクチンを得る。

成長ホルモン、プロラクチンの活性測定法

成長ホルモンの活性測定は、ニジマス稚魚の腹腔内へ1g体重当たり0.1〜1μgを週に1回注射により投与し、体長および体重の増加を対照と比較することにより行う。対照には、生食水を注射する。20尾を1グループとし、小型水槽にてグループ毎に分けて自然彩光のもと、15°Cにて飼育する。

プロラクチンの活性測定は、ラットNb2細胞に対する増殖刺激作用によって行う。

塩濃度保持機構における成長ホルモン、プロラクチンの作用機構の解析

ニジマスに成長ホルモンを種々の量投与して、汽水または海水に入れた場合、血中の塩濃度がどのように変化するかを測定し、どこまで塩水に適応出来るかを解析する。同様にヒラメにプロラクチンを投与して、汽水または淡水にて飼育し、血中の塩濃度の変化を測

定すると共に、淡水適応におけるプロラクチンの役割を検討する。

また、Nb2等の培養細胞はプロラクチンに依存して増殖するが、培地のNaCl濃度は常に0.15M前後に保たれているのが通例である。そこでNaCl濃度を変化させて、細胞の増殖機能におけるNaCl依存性を解析する。

魚類体内の成長ホルモン受容体とプロラクチン受容体の構造と分布動態

魚類における成長ホルモン受容体とプロラクチン受容体は、共にその構造も、cDNAの塩基配列も解明されていない。プロラクチン受容体に至ってはその組織分布状況も判明していない状況である。そこで、ヒト、ラット、家兎で判明している成長ホルモン受容体およびプロラクチン受容体のcDNA配列のうち、保存されている部分をプライマーとして、コイの各組織から抽出したポリ(A)⁺RNAに由来するcDNAを鋳型としてPCR反応を行なう。得られたDNA断片をゲル電気泳動上で検出し、コイの各組織における成長ホルモン受容体およびプロラクチン受容体のmRNA発現状況を解析する。

さらに、得られたDNA断片をサブクローニングして、これを元に魚類の成長ホルモン受容体およびプロラクチン受容体のcDNAをPCRによってダイレクトクローニングして、それらの塩基配列と受容体構造の解析を行なう。

次いで、これら両ホルモンの受容体が淡水魚、降海魚、海水魚、帰川魚および実験的に変化させた塩濃度中の魚においてどのように変動するかを解析する。

【研究結果】

ブリ成長ホルモンcDNAのクローニング

新鮮なブリの頭から脳下垂体を取り出し、ブリ成長ホルモンのcDNAをブタ成長ホルモンcDNAをプローベとしてクローニングした。図1に示されたストラテジーに則って塩基配列の解読を行ったところ、約1 kbの full-lengthブリ成長ホルモンcDNAがクローン化された。

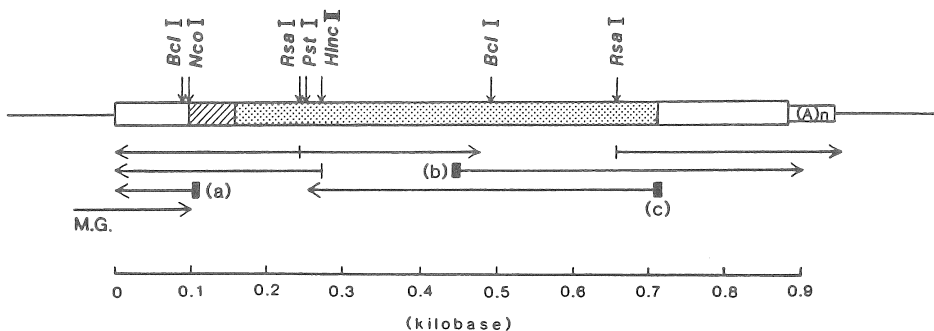


図1. ブリ成長ホルモンcDNAの制限酵素地図とシーケンス・ストラテジー
 斜線部分はシグナルペプチド部分で、点領域は成熟ホルモン部分、白の太い部分は5' および3' 非翻訳領域。矢印はシーケンシングの方向、a、b、c はプライマーを示す。

```

1
5'ACAACACACTGAACAACTGAACTCAGCTCAGATTAACAGAACCTGAACCTGAAGCAGACCCCTGAACCAGAACCTGA
78
ACTTGAACCCCTGATCAGCC ATG GAC AGA GTT GTC CTT CTG CTG TCA GTC CTG TCT CTG GGC GTC
Met Asp Arg Val Val Leu Leu Leu Ser Val Leu Ser Leu Gly Val
-17
(-19)
141
TCC TCT CAG CCA ATC ACA GAC AGC CAG CAT CTG TTC TCC ATC GCT GTC AGC AGA ATC CAA
Ser Ser Gln Pro Ile Thr Asp Ser Gln His Leu Phe Ser Ile Ala Val Ser Arg Ile Gln 18
-1 1 (-1) (1)
201
AAC CTC CAC CTG CTC GCT CAG AGA CTC TTC TCC AAC TTC GAG AGT ACT CTG CAG ACG GAG
Asn Leu His Leu Leu Ala Gln Arg Leu Phe Ser Asn Phe Glu Ser Thr Leu Gln Thr Glu 38
261
GAC CAG CGT CAA CTC AAC AAA ATC TTC CTA CAG GAT TTC (TGT) AAC TCT GAT TAC ATC ATC
Asp Gln Arg Gln Leu Asn Lys Ile Phe Leu Gln Asp Phe (Cys) Asn Ser Asp Tyr Ile Ile 58
321
AGT CCC ATT GAC AAG CAT GAG ACA CAA CGC AGC TCT GTT CTG AAG CTG TTA TCG ATC TCC
Ser Pro Ile Asp Lys His Glu Thr Gln Arg Ser Ser Val Leu Lys Leu Leu Ser Ile Ser 78
381
TAT CGA TTG GTG GAG TCT TGG GAG TTC TCC AGT CGC TTT CTG TCT GGA GGT TCT GCT CTG
Tyr Arg Leu Val Glu Ser Trp Glu Phe Ser Ser Arg Phe Leu Ser Gly Gly Ser Ala Leu 98
441
AGG AAC CAG ATT TCA CCC AGA CTG TCT GAA CTC AAG ACA GGA ATC CAA CTG CTG ATC ACA
Arg Asn Gln Ile Ser Pro Arg Leu Ser Glu Leu Lys Thr Gly Ile Gln Leu Leu Ile Thr 118
501
GCC AAT CAG GAC GGA GCA GAG ATG TTC TCT GAC GTC TCG GCC CTC CAG CTC GCT CCA TAT
Ala Asn Gln Asp Gly Ala Glu Met Phe Ser Asp Val Ser Ala Leu Gln Leu Ala Pro Tyr 138
561
GGA AAC TTC TAT CAG AGT CTG GGA GGC GAA GAG TTG CTG AGA CGA AAC TAC GAA TTG CTG
Gly Asn Phe Tyr Gln Ser Leu Gly Gly Glu Glu Leu Leu Arg Arg Asn Tyr Glu Leu Leu 158
621
GCC (TGT) TTC AAG AAG GAC ATG CAC AAG GTG GAG ACG TAC CTG ACG GTG GCT AAA (TGT) CGG
Ala (Cys) Phe Lys Lys Asp Met His Lys Val Glu Thr Tyr Leu Thr Val Ala Lys (Cys) Arg 178
681
CTC TCT CCA GAA GCT AAC (TGC) ACC CTG TAGCCCCGTCTCTCCACAGTGAAGCCTGTCGTTGATGATGTA
Leu Ser Pro Glu Ala Asn (Cys) Thr Leu *
187
(185)
751
TCCTGTATGTTCTCAAGCTCCGCCCTATGTTAGCATTAGTGTTTACCTCTGTCAGGTGCTGAAGTCCAACCTGATGAT
879
GTCATAGTGATGTCATACATTACAGCTTGTGAATAAAAGTGTGTTAAATCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA..... 3'

```

図2. ブリ成長ホルモンcDNAの全塩基配列と解読されたアミノ酸配列

配列の上の数字はヌクレオチド番号を示し、下の数字はアミノ酸番号を示す。マイナスのアミノ酸番号は、予測されるシグナルペプチド領域を示し、カッコ内の数字は第2候補の切断部位を示す。丸で囲んだアミノ酸は、ジスルフィド結合を形成するシステインを示す。アンダーラインはシグナル付加シグナルを示す。

解読されたブリ成長ホルモンcDNAの全塩基配列と、予測されるアミノ酸配列を示すと、図2のごとくであった。従って、ブリ成長ホルモンの成熟型は、アミノ酸187個ないしは185個からなるものと予測された。

シマアジ成長ホルモンcDNAクローニング

同様にシマアジ成長ホルモンのcDNAをクローニングして塩基配列を決定し、アミノ酸配列を解読した。シマアジ成長ホルモンはアミノ酸 188個からなり、ブリ成長ホルモンとアミノ酸配列上79%の相同性を有することが判明した。ホルモン蛋白質構造の疎水性を解析したところ、図3に示すようにシマアジ成長ホルモンとブリ成長ホルモンは極めて類似したhydropathyを示したので、両蛋白質は極めて類似した構造を持つものと思われた。

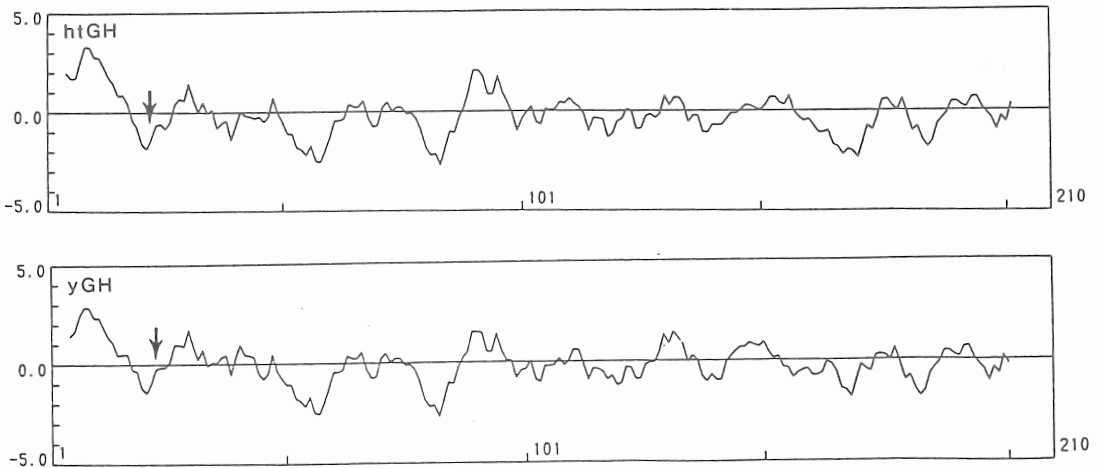


図3. シマアジ成長ホルモンとブリ成長ホルモンの構造疎水性

シマアジ成長ホルモン(htGH)とブリ成長ホルモン(yGH)の疎水性を、9アミノ酸残基法によりコンピュータ計算した。矢印は、予測されるシグナルペプチド切断部位である。

ヒラメ成長ホルモンcDNAのクローニング

次いでヒラメ成長ホルモンcDNAを、ブリ成長ホルモンcDNAをプローブとしてクローニングし、塩基配列を決定した。アミノ酸配列を解読したところ、ヒラメ成長ホルモンは、通常の成長ホルモンよりアミノ酸が約15個少ない、これまで解析された中で最も小さいものであることが判明した(図4)。

成長ホルモン分子の保存領域と保存アミノ酸

ブリ、シマアジ、ヒラメの成長ホルモンを中心として、これまで解明された種々の成長ホルモンの一次構造を比較すると、5つの領域が保存されていることが判明した。この5つの領域を、GD(Growth hormone domain)1からGD5と名付けた(図5)。これらの領域には、29個のアミノ酸が全成長ホルモンを通じて保存されており、受容体への結合と活性発現・シグナル伝達に重要な働きをしていることが示唆された。

ブリ成長ホルモン発現ベクターの構築

図6に示されたごとく、温度によって発現誘導されるP_Lプロモーターを持つブリ成長ホルモンおよびヒラメ成長ホルモンの発現ベクターをそれぞれ構築した。

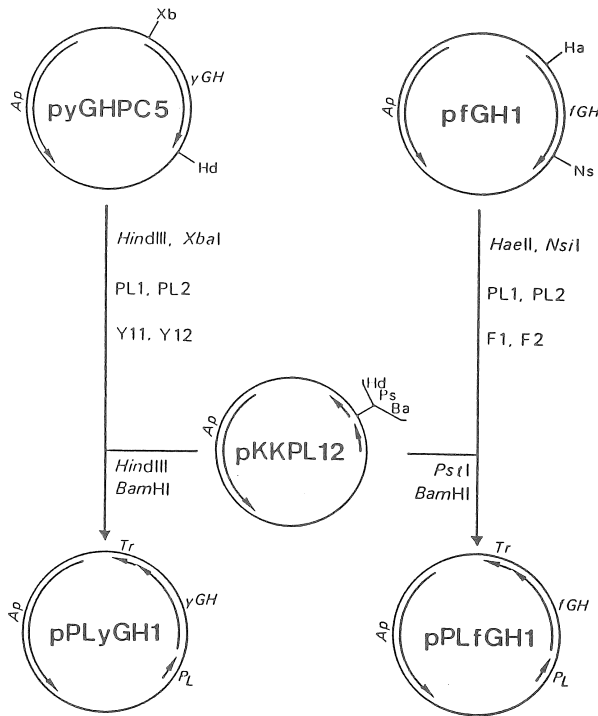


図6. P_Lプロモーターを持つブリ成長ホルモン発現ベクター (pPLyGH1) とヒラメ成長ホルモン発現ベクター (pPLfGH1)

ブリ成長ホルモンの発現

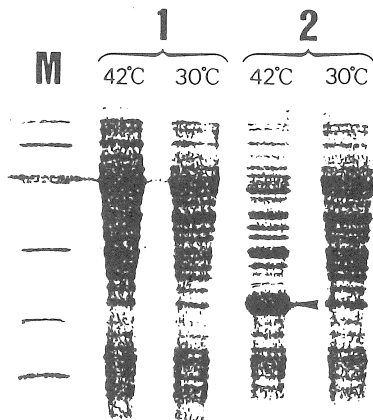


図7. ブリ成長ホルモンのP_Lプロモーターによる発現
1、pPLfGH1 導入大腸菌
2、pPLyGH1 導入大腸菌

pPLfGH1 または pPLyGH1でトランスフォームした大腸菌 N4830-1株の培養温度を30°Cから42°Cにシフトさせて、P_Lプロモーターを誘導したところ、図7に示されるごとく、ブリ成長ホルモンは発現したが、ヒラメ成長ホルモンは発現しなかった。発現した組換え型ブリ成長ホルモンは全大腸菌蛋白質の15%に達した。

ヒラメ成長ホルモン発現ベクターの構築

P_Lプロモーターによってはヒラメ成長ホルモンが発現しなかったので、これに関しては tacプロモーターを持つ発現ベクターを構築した。通常の pBR322 由来の複製点を持つヒラメ成長ホルモン発現ベクター-pKKfGH1 と pUC19由来 multicopy replication originを持つ同ホルモン発現ベクター-pUCfGH1 を構築した(図8)。

ヒラメ成長ホルモンの発現

pKKfGH1 または pUCfGH1にてトランスフォームした大腸菌 JM109株を37°Cにて培養し、IPTG添加によってヒラメ成長ホルモンを誘導発現させたところ、multicopy replication originを持つ pUCfGH1ベクターのみが発現した(図9)。

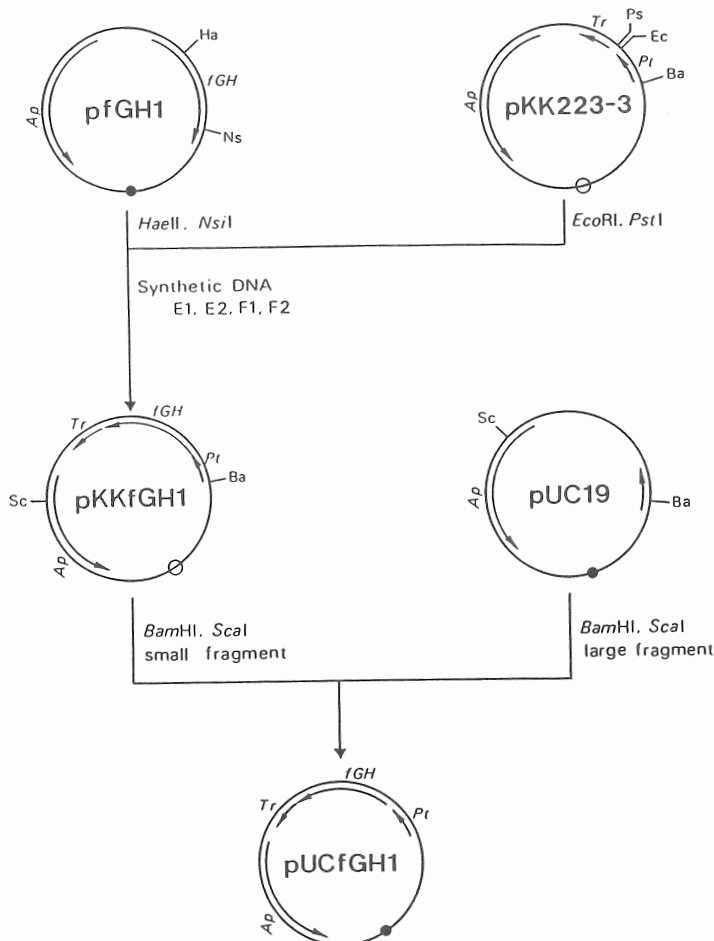


図8. tac プロモーターを持つヒラメ成長ホルモン発現ベクター pKKfGH1 と多コピー複製点を持つ同ホルモン発現ベクター pUCfGH1 の構築

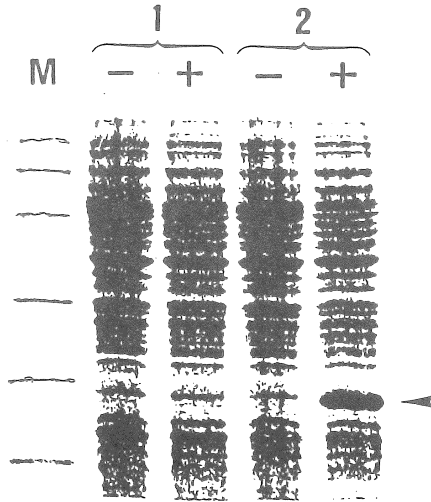


図9. ヒラメ成長ホルモンの大腸菌による発現

1、pKKfGH1 導入大腸菌

2、pUCfGH1 導入大腸菌

-+は IPTG 添加の有無を示す

組換え型ブリ成長ホルモンおよび組換え型ヒラメ成長ホルモンの精製と活性化

発現させたブリ成長ホルモンおよびヒラメ成長ホルモンを菌体から抽出し、遠心法、ゲル濾過クロマト、イオン交換クロマトにて精製し、Glutathione red/oxバッファー中にてリフォールディングさせた。最終的にそれぞれ均一タンパク質にまで精製した(図10)。

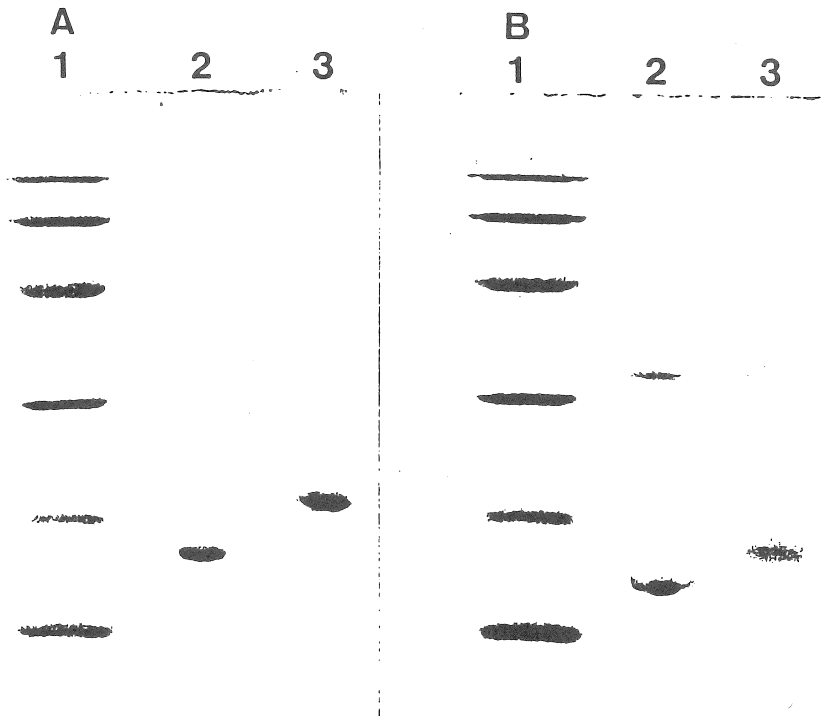


図10. 精製した

(A) ブリ

(B) ヒラメ成長ホルモン

1、マーカー

2、- 2-ME

3、+ 2-ME

組換え型ブリ成長ホルモンと組換え型ヒラメ成長ホルモンの生物活性

精製、リフォールディングした組換え型ブリおよびヒラメ成長ホルモンを、それぞれニジマス稚魚に投与したところ、コントロールに比べ2倍前後の成長を促進した(図11)。構造的に小さいヒラメ成長ホルモンも、ブリ成長ホルモンに比肩する成長促進活性を示した。

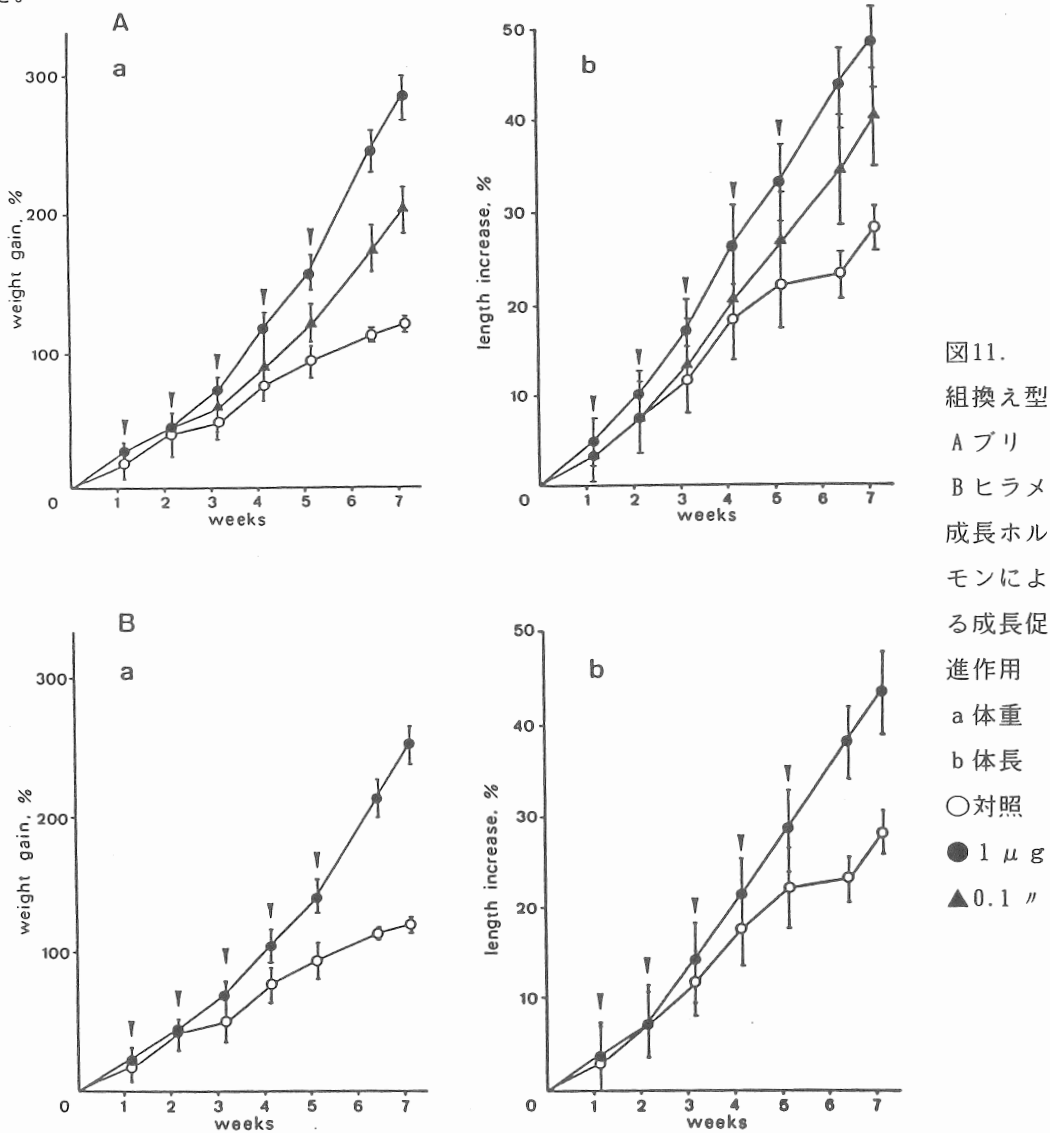


図11.
組換え型
Aブリ
Bヒラメ
成長ホル
モンによ
る成長促
進作用
a体重
b体長
○対照
●1 μg
▲0.1 μg

【考察】

以上の研究結果から、魚類成長ホルモンは魚種によってアミノ酸配列がかなり異っているが、哺乳類等の他の脊椎動物の成長ホルモンと共通な保存領域を5つ持っていることが判明した。ヒラメ成長ホルモンは他の種のものに比べ約15アミノ酸少ないが、欠落した部

分は全く保存されていない部位であった。このヒラメからクローン化された成長ホルモンcDNAクローンは、大腸菌によって産生させた組換え型蛋白質が強い成長促進活性を示したことから、まさにヒラメ成長ホルモンcDNAクローンであることが証明された。

遺伝子工学を使って大腸菌内でホルモン蛋白質を発現する場合、よく似た構造を持ったcDNAでも、cDNA、cDNAによって発現の効率が著しく異なり、発現システムを変更する必要があることも示唆される。

【今後の課題】

魚類の成長ホルモン2種類が遺伝子工学によって産生され、活性も確認されたので、今後活性発現機構の研究への利用が可能となった。今後の課題としては、①浸透圧調節作用を中心として、②種々の活性発現機構の研究を行うと共に、③魚類における成長ホルモン、プロラクチンの受容体のcDNAをクローニングしてその構造を解析すると共に、④両受容体の組織分布と動態を解析する必要がある。

Teleost Growth Hormones and Prolactins which Regulate Osmotic Pressure in Fish:
Their Structures, Receptors and Signal Transductions

Kunio Nakashima, Minoru Tanaka, Yoshitaka Hosokawa and Hiroshi Ushiro
Department of Biochemistry, Mie University School of Medicine

Summary

Salt (NaCl) is an essential agent in the lives living on earth and exhibits various physiological functions. Particularly, in teleosts living in plane or sea water, NaCl has an important role to maintain osmotic pressure of the body regulating its concentration. Recent investigations have shown that pituitary growth hormone is involved in the adaptation of fishes to sea water excreting Na^+ and Cl^- from the body and that another member of the gene family, prolactin, is involved in their adaptation to plane water incorporating Na^+ and Cl^- into the body. The structure of teleost growth hormone or prolactin has analyzed in limited species of teleost, and the majority of the hormones in that kingdom are remained to be analyzed. Moreover, the structures, distributions and signal transduction mechanisms of these teleost hormones have not yet been elucidated.

In an effort to investigate the regulatory actions of growth hormone and prolactin on the maintenance of osmotic pressure by NaCl in teleosts, we have cloned and analyzed three teleost growth hormone cDNAs and two recombinant teleost growth hormones has been synthesized in the present study. Yellowtail and hard-tail growth hormones are composed of 187 and 188 amino acid residues, respectively, and exhibit 79% homology in their sequences. Flounder growth hormone, on the other hand, has been shown to have the minimal size of the known growth hormones, being composed of only 173 amino acid residues. However, flounder and other teleost or vertebrate growth hormones have been revealed to conserve five distinct domains. These conserved domains have been designated GD (growth hormone domain) 1 to GD 5.

Yellowtail growth hormone cDNA and flounder growth hormone cDNA have been integrated into *E. coli* expression vectors to obtain the recombinant hormone proteins, respectively. Expressions of these proteins have been successful reaching at the levels of 8 to 15% of the total proteins. The recombinant hormones have been fully activated by refolding in a glutathione red/ox buffer.