

## 9232 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/プロラクチンの構造とそれらのレセプターの動態

助成研究者:中島 邦夫(三重大学 医学部)

共同研究者:田中 実(三重大学)

:大久保 武(三重大学)

水中で棲息する魚類は淡水、汽水、海水等、塩濃度の異なる環境に応じて体内の塩濃度を調節し浸透圧の維持を行なっている。すなわち海水中においてはNaClを体内より汲み出し、また淡水中では体内にNaClを取り込み浸透圧を調節している。このような魚類の浸透圧調節作用のうち海水適応には成長ホルモンが関与し、また淡水適応にはプロラクチンが関与している。両ホルモンはともに脳下垂体で産生され、類似の構造を有しており、そのホルモン作用は標的器官の細胞に存在するそれぞれのホルモンの受容体を介して発揮される。しかし両ホルモンの浸透圧調節の分子機構は未だ明らかではない。

本研究では魚類における成長ホルモンとプロラクチンの浸透圧維持機構の解明を目的とし、先ず魚類の成長ホルモンの遺伝子とそのプロモーター領域の構造解析を行なった。すなわちヒラメとブリの精巢の遺伝子DNAから、ポリメラーゼチェーン反応によりそれぞれの成長ホルモン遺伝子およびプロモーター領域の遺伝子断片を増幅した。増幅された遺伝子断片を大腸菌にクローニングし、そのヌクレオチド配列を決定し、構造解析を行なった。その結果、ヒラメの成長ホルモン遺伝子は全長が2.3 kb, またブリの成長ホルモン遺伝子は全長が3.8 kbで、ともに6つのエクソンより構成されていることが判明した。ヒラメの成長ホルモンには、他の成長ホルモンとの比較において、14アミノ酸の欠失が見られるが、この欠失は遺伝子の対応する部位に認められた。ヒラメ成長ホルモン遺伝子の転写開始点をプライマー伸長法により決定し、プロモーター領域の構造解析を行なったところ、転写開始点より26ヌクレオチド上流にTATAボックス様配列(TTATAA)が認められた。ブリ成長ホルモン遺伝子のプロモーター領域にも、転写開始点から26ヌクレオチド上流にTATAボックス(TATAA)が存在した。ヒラメとブリのプロモーター領域全般においては65%の相同性が認められた。哺乳類において、成長ホルモンおよびプロラクチン遺伝子の脳下垂体における発現は、転写因子のPit-1/GHF-1が両遺伝子のプロモーター領域の特定配列に結合することにより誘導されることが明らかにされている。最近、サケのPit-1/GHF-1のcDNAがクローニングされ魚類の成長ホルモンおよびプロラクチンの遺伝子発現もこの転写因子により制御されていると考えられるが、その結合部位は未だ同定されていない。ヒラメ及びブリの成長ホルモン遺伝子のプロモーター領域におけるPit-1/GHF-1の結合部位の解析を進めたい。



## 9232 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/プロラクチンの構造とそれらのレセプターの動態

助成研究者: 中島 邦夫(三重大学 医学部)

共同研究者: 田中 実(三重大学)

: 大久保 武(三重大学)

### [研究目的]

魚類は、淡水、汽水、海水等棲息環境に応じて体内の塩濃度を調節し、浸透圧の調節及び維持を行なっている。すなわち海水中においては、高塩濃度に対抗して体内から $\text{Na}^+$ 、 $\text{Cl}^-$ を汲み出し、また淡水中では低塩濃度に対抗して体内に $\text{Na}^+$ 、 $\text{Cl}^-$ を取り込み浸透圧を維持している。このような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ており、また淡水適応には、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明らかにされてきている。両脳下垂体ホルモンの作用は標的器官に存在する受容体を介して発揮されるが、浸透圧調節作用の分子機構は両ホルモンともに未だ不明である。

本研究では、(1) 魚類の成長ホルモン遺伝子とその調節領域のクローニングと構造解析、(2) 脳下垂体における成長ホルモンおよびプロラクチン遺伝子の転写調節因子であるPit-1/GHF-1の魚類成長ホルモン遺伝子調節領域への結合様式の解析(3) 魚類の成長ホルモンおよびプロラクチン受容体の構造、組織分布、動態の解析を行い、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]

#### ヒラメとブリの遺伝子DNAの単離

ヒラメおよびブリの精巢を液体窒素で凍結し、乳鉢で細砕後、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、EDTA、プロテイナーゼKを含むトリス塩酸緩衝液中で37℃、16時間緩やかに振盪する。等量のフェノール、ついでフェノール・クロロホルム(1:1)、さらにクロロホルムで抽出した後、2倍量のエタノールを加え、析出した遺伝子DNAを70%エタノールで洗い、EDTAを含むトリス塩酸緩衝液に溶解する。

#### ポリメラーゼチェーン反応(PCR)によるヒラメとブリの成長ホルモン遺伝子の増幅とクローニング

ヒラメとブリの成長ホルモン遺伝子をPCRで増幅するために、当研究室で明らかにした両成長ホルモンcDNAのヌクレオチド配列を基にセンスプライマー、アンチセンスプライマーを数組化学合成する。ヒラメとブリの精巢より単離した遺伝子DNAを鋳型として合成したプライマーと耐熱性菌ポリメラーゼ(Taqポリメラ

ーゼ)を用いてPCRを行い、両成長ホルモン遺伝子の断片を増幅する。PCRの条件は、鋳型DNAの変性を95℃、1分、プライマーのアニーリングを55℃、2分、ポリメラーゼによる伸長反応を72℃、3分とする。増幅されたDNA断片をアガロースゲル電気泳動で分離精製後、プラスミドベクターに組込み大腸菌に導入しクローニングする。大腸菌クローンよりプラスミドDNAを調製しダイデオキシチェインターミネーション法(サンガー法)によりヌクレオチド配列を決定する。

#### ヒラメ成長ホルモン遺伝子の転写開始部位のプライマー伸長反応法による解析

ヒラメ脳下垂体より調製したpoly(A)<sup>+</sup>RNAを鋳型とし、ヒラメ成長ホルモンcDNAの5'末端近くの配列に対するアンチセンスプライマーを用い、逆転写酵素にてヒラメ成長ホルモンmRNAの5'末端まで伸長したcDNAを合成する。また同じプライマーを用いてヒラメ成長ホルモン遺伝子のシーケンス反応を行い、伸長反応で生成したcDNAを同じゲル上で電気泳動し、ヒラメ成長ホルモン遺伝子の転写開始部位を決定する。

#### PCRによるヒラメとブリの成長ホルモン遺伝子のプロモーター領域のクローニング

ヒラメとブリの精巢の遺伝子DNAを鋳型とし、ヒラメとブリの成長ホルモン遺伝子の5'末端近くの配列に対するアンチセンスプライマーを用いて、両成長ホルモン遺伝子のプロモーター領域まで伸長したDNAを合成する。このDNAの3'末端に末端転移酵素を用いてポリ(A)配列を付加した後、オリゴdTプライマーと5'末端アンチセンスプライマーを用いてPCRを行い、ヒラメとブリの成長ホルモン遺伝子のプロモーター領域を含む遺伝子断片を増幅する。増幅したDNAをプラスミドベクターに組込みクローニングし、ヌクレオチド配列を決定する。

#### ブリの脳下垂体における転写調節因子Pit-1/GHF-1のcDNAクローニングと成長ホルモン遺伝子の転写調節機構の解析

ブリの脳下垂体よりmRNAを調節し、ラムダgt10ファージをベクターとするcDNAライブラリーを作製する。このcDNAライブラリーより、すでに当研究室で得られているマウスのPit-1/GHF-1cDNAをプローブとして、ハイブリダイゼーションによるスクリーニングを行い、ブリPit-1/GHF-1cDNAをクローニングする。得られたcDNAを大腸菌発現ベクターに組込み、Pit-1/GHF-1蛋白質を大腸菌に大量発現させて精製し、ゲルシフトアッセイ法、およびDNaseフットプリント法により、ヒラメとブリの成長ホルモン遺伝子のプロモーター領域におけるPit-1/GHF-1転写因子の結合部位を同定する。またブリPit-1/GHF-1cDNAを動物細胞発現ベクターに組込み、魚類培養細胞に導入して発現させる。同時にクロラムフェニコルトランスアセチラーゼ(CAT)遺伝子に連結したヒラメおよびブリの成長ホルモン遺伝子のプロモーター部のcDNAを同じ細胞に導入し、その細胞におけるCATの活性を測定し、Pit-1/GHF-1の成長ホルモン遺伝子プロモーターを介する転写促進作用を解析する。

魚類成長ホルモン受容体とプロラクチン受容体の構造と組織分布、動態の解析

魚類の成長ホルモン受容体とプロラクチン受容体はともにその構造が解明されておらずプロラクチン受容体ではその組織分布も不明である。そこで、哺乳類、鳥類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cDNAのヌクレオチド配列のうち、保存されている部分をそれぞれ選びオリゴヌクレオチドを合成する。このオリゴヌクレオチドをプローブとして、コイの肝臓のcDNAライブラリーをスクリーニングし、コイの成長ホルモン受容体とプロラクチン受容体のcDNAをクローニングし、それらのヌクレオチド配列と構造を解析する。さらに両ホルモン受容体の組織分布および実験的に変化させた塩濃度中の魚における両受容体の発現量の変動を解析する。

[研究結果]

ヒラメとブリの成長ホルモン遺伝子のPCRによるクローニング

ヒラメとブリの成長ホルモン遺伝子を迅速にクローニングするため、PCRによるクローニングを行なった。すなわち当研究室でクローニングしたヒラメとブリの成

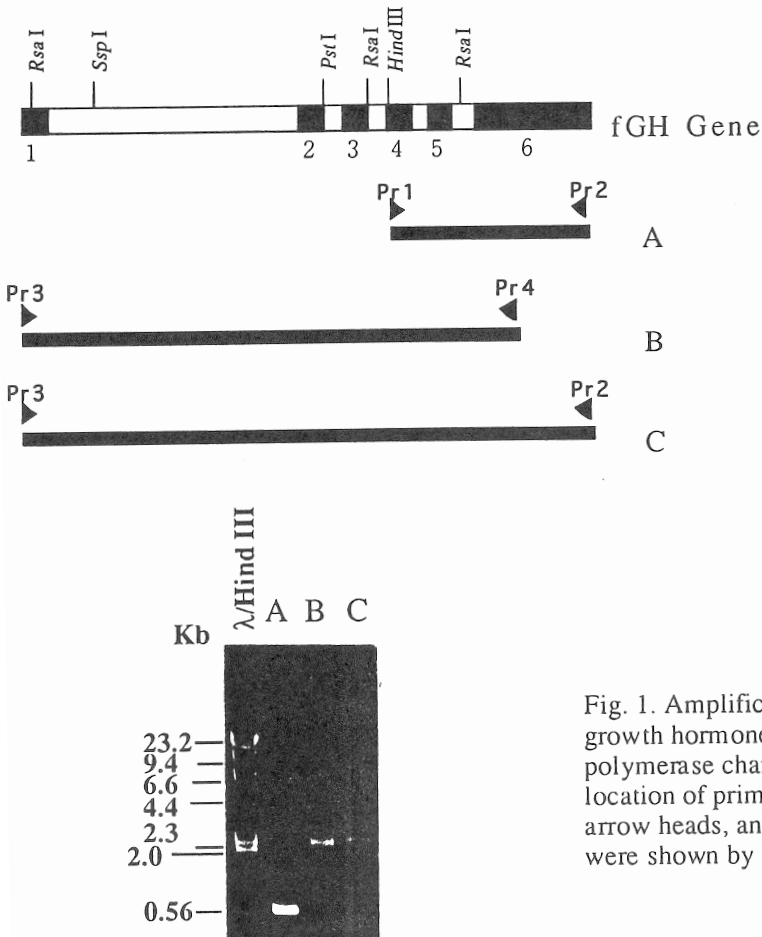


Fig. 1. Amplification of flounder growth hormone gene fragments by polymerase chain reaction (PCR). The location of primers are indicated by arrow heads, and the amplified DNAs were shown by lines

長ホルモン cDNA のヌクレオチド配列に従い合成したプライマーを用いて、ヒラメとブリの精巢の遺伝子DNAからPCRにより両成長ホルモン遺伝子断片の増幅をおこなった。ヒラメの成長ホルモン遺伝子では Fig. 1 に示したように、プライマー1と2、3と4、3と2でのPCRでそれぞれ0.6、2.1、2.3、Kbの長さの断片が増幅された。このうちプライマー3と2でのPCRによりヒラメ成長ホルモン遺伝子の全長が増幅された。またブリの成長ホルモン遺伝子では Fig. 2 に示したようにプライマー5と4、6と7、8と7でのPCRで成長ホルモン遺伝子全長をカバーする断片が増幅された。

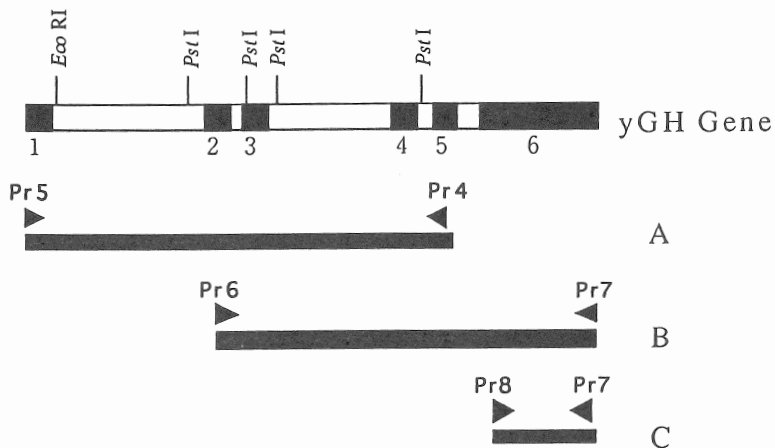


Fig. 2. Amplification of yellowtail growth hormone gene fragment by polymerase chain reaction (PCR). The location of primers are indicated by arrow heads, and the amplified DNAs were shown by lines.

これらの増幅断片をプラスミドベクターに組み込みクローニングし、そのヌクレオチド配列を解読した。

#### ヒラメとブリの成長ホルモン遺伝子の構造解析

Fig. 3 にヒラメとブリの成長ホルモン遺伝子のエクソンとイントロンの構造を示す。ヒラメの成長ホルモン遺伝子は全長2.3 kb、ブリの成長ホルモン遺伝子は全長3.8 kb ともに6つのエクソン、5つのイントロンより構成されていた。ヒラメのイントロン1およびブリのイントロン1と3には繰り返し構造が存在するため1 kb 以上の長さを有していた。哺乳類、鳥類の成長ホルモン遺伝子は5つのエクソンで構成されているが、ヒラメとブリの成長ホルモン遺伝子はサケおよびニジマスの場合と同様、哺乳類のエクソン5に相当する領域がイントロンで分断されており、6つのエクソンとなっていた。

当研究室においてcDNAがクローニングされ構造解析のなされたヒラメの成長ホルモンは他の成長ホルモンとの比較において、C末端近くの14アミノ酸が欠失しており、これまでに構造が判明している成長ホルモン分子の中で最小のものである。ヒラメ成長ホルモンにおけるこの14アミノ酸の欠失部に相当する遺伝子領域、す

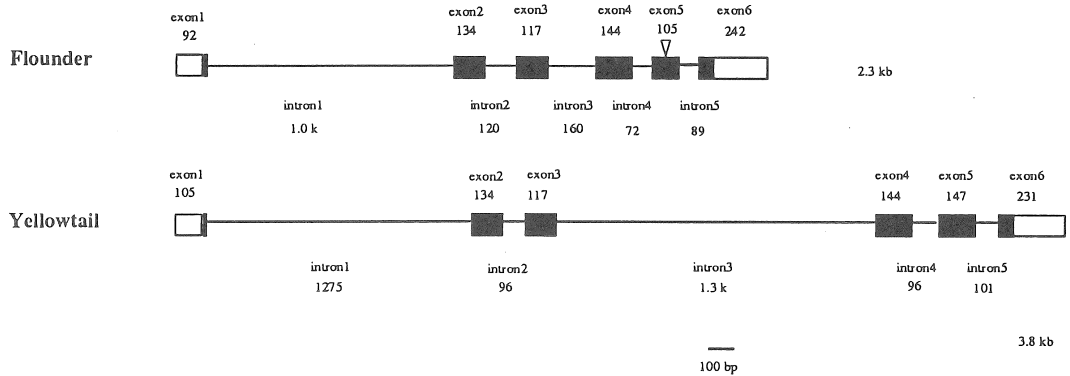


Fig. 3. Structure of flounder and yellowtail growth hormone genes.

```

                Intron4      1      Exon5
f  tgactgaccaactcacccttaag GCCAATCAGGATGGAGCAGGTGGATTCTCTGAGAGTTCGGTGCTC
   *****  *****  ** ***** ***** ***** *****
y  atcttgaccaacttaccctgcag GCCAATCAGGACGGAGCAGAGATGTTTCTCTGACGTCTCGGCCCTC

                63

f  CAGCTCACGCCGTATGGA-----AACTCTGAA
   *****  *  *  ***** *****
y  CAGCTCGCTCCATATGGAACTTCTATCAGAGTCTGGGAGGCGAAGAGTTGCTGAGACGAACTACGAA

                105      Intron5
f  CTGTTGCCTGCTTTAAGAAGGATATGCACAAG gtgggggttaatgaaaatgtaatgatgatgtaatg
   *  *  *****  *  ***** ***** ***** ***** *  *
y  TTGCTGGCCTGTTTCAAGAAGGACATGCACAAG gtgggagtcgggtggggatggaacagtgaggagtac

                147
    
```

Fig. 4. Nucleotide sequences of exon5 in flounder (f) and yellowtail (y) growth hormone genes.

なわちエクソン5のヌクレオチド配列をブリの配列と比較するとFig. 4に示したごとく、14アミノ酸をコードする42ヌクレオチドがヒラメにおいて欠失しており、この欠失は遺伝子レベルでの変化であることが判明した。

#### ヒラメ成長ホルモン遺伝子の転写開始部位の同定

ブリ成長ホルモンの転写開始部位はすでに判明していたがヒラメの成長ホルモン遺伝子の転写開始部位は明らかになっていない。遺伝子の発現を制御する領域すなわちプロモーター領域を解析するためにはその遺伝子の転写開始部位を明らかにすることが不可欠である。そこでヒラメ成長ホルモン遺伝子の転写開始部位をプライマー伸張反応法により分析した。

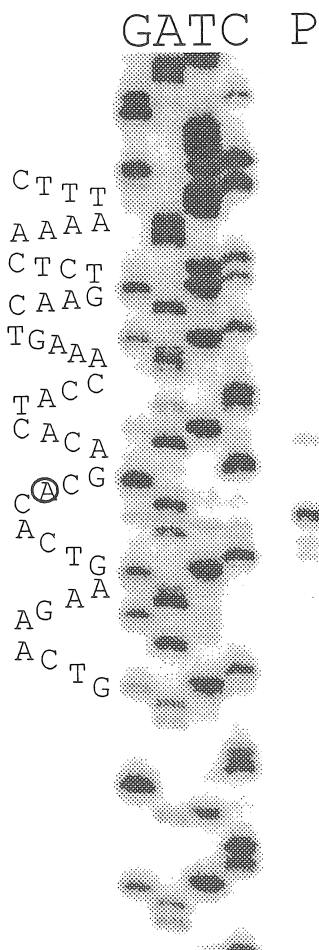


Fig. 5. Determination of the transcription start site.

Primer extension analysis was carried out using flounder pituitary poly(A)<sup>+</sup>RNA and synthetic primer complementary to a 5'-end region of flounder growth hormone gene. Lane P is the primer extension product, and lanes G, A, T, C are the sequencing ladder of flounder growth hormone gene using the same primer.

Fig. 5に示すごとく、ヒラメ脳下垂体mRNAよりプライマー伸張反応で合成された成長ホルモンcDNAの長さをしめすシグナルは、同じプライマーを用いた



成長ホルモン遺伝子のシーケンス反応のシグナルの印で示したアデニンの位置と一致した。またこの位置のアデニンは当研究室ですでにクローニングしたヒラメ成長ホルモンcDNAの5'末端のアデニンと一致していた。したがってヒラメ成長ホルモン遺伝子の転写開始点はFig. 6に示したヒラメのプロモーター配列の237番目のアデニンであり、当研究室で得られていたcDNAクローンは完全長の成長ホルモンcDNAクローンであることも判明した。

ヒラメとブリの成長ホルモン遺伝子のプロモーター領域のクローニングと構造解析

PCR法によりヒラメとブリの成長ホルモン遺伝子の5'側、すなわちプロモーター領域のクローニングを行なった。クローニングされた両プロモーター領域のヌクレオチド配列を比較してFig. 6に示す。

判明したヒラメとブリの成長ホルモン遺伝子のプロモーター領域の配列には65%の相同性が認められた。ブリにおいて転写開始点から26塩基上流にTATAボックス(TATAAAA)が存在した。一方ヒラメの配列においては、転写開始点から24塩基上流と43塩基上流の2ヶ所にTATAボックスに類似した配列が認められた。

TATAボックスは通常その遺伝子の転写開始点から30塩基以内に存在することから、24塩基上流に位置するTTTAAAA配列がヒラメの成長ホルモン遺伝子のTATAボックスとして機能していると考えられる。

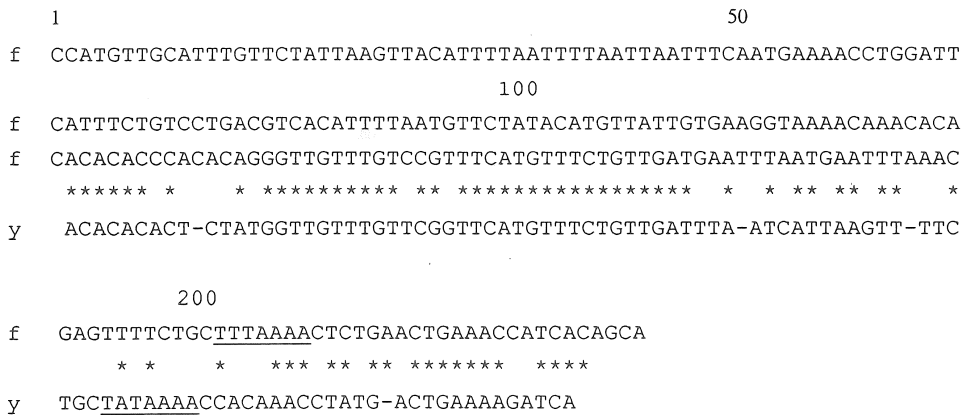


Fig. 6. Comparison of nucleotide sequences of promoter regions for flounder (f) and yellowtail (y) growth hormone genes. Arrows indicate transcription start sites. Asterisks show matching residues in both sequences. Gaps are introduced to maximize the matching.

[考察]

PCRを用いた迅速クローニング法によりヒラメとブリの成長ホルモン遺伝子およびそのプロモーター領域をクローニングし構造解析を行なった。明らかになったヒラメとブリの成長ホルモン遺伝子の構造を他の魚類および哺乳類、当研究室で明らかにした鳥類(ニワトリ)の成長ホルモン遺伝子の構造と比較してFig. 7に示した。

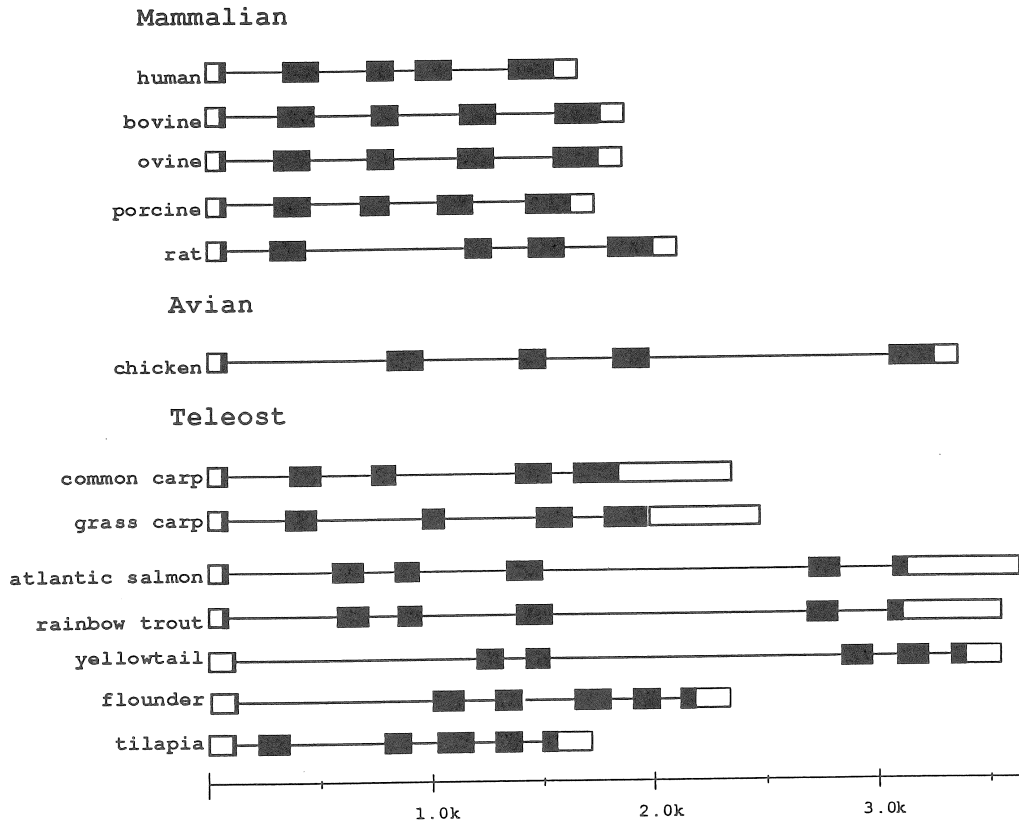


Fig. 7. Comparison of mammalian, avian and teleost GH genes. Exons are shown by boxes.

哺乳類、鳥類の成長ホルモン遺伝子は5つのエクソンより構成されているが、これまでに明らかにされていた魚類の成長ホルモン遺伝子のうち、コイとソウギョの遺伝子は5つのエクソンから、またサケ、ニジマス、ティラピアおよび今回明らかにしたヒラメとブリの成長ホルモン遺伝子は、哺乳類、鳥類の5番目のエクソンがさらにイントロンで分断されており、6つのエクソンから構成されている。

脳下垂体における成長ホルモンおよびプロラクチン遺伝子の発現は脳下垂体の転写因子であるPit-1/GHF-1が、両ホルモン遺伝子のプロモーター領域の特定配列に結合することにより促進されることがラット等の哺乳類で明らかにされている。

最近、鳥類の七面鳥や魚類のサケにおいてもPit-1/GHF-1 cDNAがクローニングされ、動物種全般においてこの転写因子が脳下垂体での成長ホルモン、プロラクチンの遺伝子発現を制御していると考えられる。哺乳類の成長ホルモン遺伝子のプロモーター領域の配列は極めて相同性が高く、Pit-1/GHF-1の結合配列も保存されている。一方、魚類の成長ホルモン遺伝子のプロモーター領域の配列においては、哺乳類のPit-1/GHF-1の結合配列に共通に認められるコンセンサス配列と完全に一致する配列は見られず、その結合領域は未だ明らかでない。

#### [今後の課題]

今後の課題としては、成長ホルモンとプロラクチンの浸透圧調節機構をあきらかにするため、魚類のPit-1/GHF-1のcDNAのクローニングと魚類の成長ホルモンのプロモーター領域における結合部位の解析、魚類成長ホルモン受容体、プロラクチン受容体のcDNAクローニングと構造解析、および淡水適応、海水適応における両受容体の組織分布と動態の解析を行う必要がある。

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

Kunio Nakashima, Minoru Tanaka and Takeshi Ohkubo\*

Department of Biochemistry, Mie University Faculty of Medicine and

\*Center for Molecular Biology and Genetics

Summary

Teleosts living in plane or sea water, regulate salt concentration in their body to maintain osmotic pressure. In sea water,  $\text{Na}^+$  and  $\text{Cl}^-$  are excreted from the body and in plane water, these ions are incorporated into the body. It has been known that growth hormone (GH) is involved in the adaptation of fishes to sea water and that prolactin (PRL) is involved in their adaptation to plane water. Both hormones are produced in the pituitary and shear structural similarity. Their hormone actions are mediated by their specific receptors localizing on plasma membrane of target organs but the molecular mechanisms for the osmotic regulation by GH and PRL have not yet been known.

In an effort to elucidate the mechanisms of regulatory action of GH and PRL for the maintenance of osmotic pressure in teleosts, we have cloned and analyzed two teleost GH genes and their promotor regions. Flounder and yellowtail GH genes have been amplified by polymerase chain reaction from the testis genomic DNAs of each teleost, cloned into a *E. coli* plasmid vector and determined their nucleotide sequences. The flounder and yellowtail GH genes are 2.3 kb and 3.8 kb in length, respectively, and consist of six exons. Compared to yellowtail GH gene, flounder GH gene has 42 bp deletion in the exon 5, consisting with the 14 amino acid deletion in its protein. The transcription start point in flounder GH gene was determined by a primer extension analysis. TATA boxes were found at 24 bases and 26 bases upstreams from the transcription start points in flounder and yellowtail GH genes, respectively. The promotor regions of both GH genes shear 65% nucleotide sequence homology. In mammals, the expression of GH and PRL has been known to be regulated by the pituitary-specific transcription factor, Pit-1/GHF-1. A cDNA for teleost Pit-1/GHF-1 has been recently cloned, but its binding sites in promotor regions of teleost GH genes have not yet been identified.