

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 亀井 宏泰

脊椎動物の下垂体から分泌される2種類の生殖腺刺激ホルモン (gonadotropin; GTH)、すなわち卵濾胞刺激ホルモン (follicle-stimulating hormone; FSH) および黄体形成ホルモン (luteinizing hormone; LH) は、個体の性成熟を制御する生殖内分泌系の主要因子である。ウナギでは他の魚と同様、FSHの単離が困難でありその性状・作用ともに不明な点が多い。

ウナギ (*Anguilla japonica*) は我が国における重要な水産資源のひとつであるが、飼育環境下において自発的に性成熟することはないため、親魚に他種のLHを主成分とするGTHの投与が行われている。しかし、必ずしも良質の受精卵が安定的に得られるわけではなく、未だウナギ種苗生産技術の確立には至っていない。その理由のひとつとして、FSHに関する基礎的知見を欠くことが挙げられる。

そこで本研究では、遺伝子工学的手法と生化学的手法を用い、これまで入手困難とされてきたウナギFSHの調製およびその生理活性の解析を行った。

第1章 酵母発現系を用いた組換えウナギFSHの作製

まず組換えウナギFSHを酵母発現系により作製した。ウナギFSHの α および β サブユニットを同一ベクター中に構築した発現ベクターを用い、メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* を形質転換した。得られた形質転換体をメタノールで発現誘導することで、組換え体を発現させ酵母培養液中へ分泌させた。その後、上清をエタノール沈殿、ゲル濾過に供し組換え体の回収を行った。組換えウナギFSHはヒト絨毛性GTH (hCG) と同様に、未熟精巣からのテストステロン (T) および11-ケトテストステロン (11-KT) 分泌を有意に促進した。組換えウナギFSHの活性量をhCGの活性単位 (IU) を基準とすると、酵母培養液1Lに含まれる活性は約1,500 IUであった。

第2章 未成熟ウナギ下垂体からの天然型ウナギFSHの単離・精製

未熟ウナギの下垂体抽出物を数段階のクロマトグラフィーに付し、ウナギFSHを精製した。精製したFSHは約33kDaのタンパク質で、各サブユニットはそれぞれAsn結合型糖鎖によって修飾されていた。精製ウナギFSHは、未熟ウナギの下垂体抽出物、hCG、および組換えウナギFSHと同様に、用量依存的にTおよび11-KTの分泌を促進した。これらの結果より、酵母で作製した組換えウナギFSHは天然型ウナギFSHと同様の生殖腺刺激作用を有することが示された。

第3章 組換えウナギ FSH の雌雄生殖腺における性ステロイド産生作用の解析

組換えウナギ FSH は未熟精巣における T および 11-KT の分泌を顕著に促進したが、成熟の進行した精巣ではその効果は見られなかった。そのためウナギ FSH は未熟な状態の精巣において重要な働きをもつことが考えられた。一方、ウナギ FSH の卵巣における性ステロイド産生能は卵濾胞が十分に発達する卵黄蓄積期の間上昇することが示された。

第3章 組換えウナギ FSH の化学構造、比活性および生体内投与の検討

今後、組換えウナギ FSH の有効利用を目指す上で、その詳細な化学構造、比活性および *in vivo* における生理活性についての知見は必須である。そこで組換えウナギ FSH を含む酵母培養上清をゲル濾過および数段階の陰イオン交換クロマトグラフィーに付し、抗ウナギ FSH β 血清に対する免疫反応性および未熟ウナギ精巣における 11-KT 産生促進を指標に、生理活性型組換えウナギ FSH を精製した。酸耐性試験において、精製した生理活性型組換えウナギ FSH は天然型と同様に酸不耐性を示した。生理活性型組換えウナギ FSH の活性は天然型と比較して 1/100 程度であったが、天然型と組換え体の化学構造の差異がその比活性に影響を与えていると考えられた。

海水条件化に馴致した未熟雄ウナギに 12 日間に 3 回の組換えウナギ FSH の投与を行ったところ、生理食塩水投与群と比べ 1.0 IU/g 体重の組換えウナギ FSH 投与群において生殖腺体重比の有意な増加が認められた。また、投与した組換えウナギ FSH により血中 11-KT 量に顕著な増加が認められた。以上の結果より、本研究で作製した組換えウナギ FSH は、生体内においても生理活性を発揮しうることが示された。

以上、本論文は、生理活性を有する組換えウナギ FSH を酵母発現系を構築して初めて作製し、精製した天然型ウナギ FSH とともに、その生理作用の一端を明らかにしたもので、学術上、応用上寄与するところが大きい。よって審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。