

真骨魚類9種の卵巣と脳におけるアロマターゼ活性の比較

誌名	日本水産學會誌
ISSN	00215392
著者	佐々木, 俊博 朝比奈, 潔
巻/号	72巻6号
掲載ページ	p. 1077-1081
発行年月	2006年11月

真骨魚類 9 種の卵巣と脳におけるアロマターゼ活性の比較

佐々木俊博, 朝比奈 潔*

(2006年3月17日受付, 2006年5月26日受理)

日本大学生物資源科学部海洋生物資源科学科

Comparison of ovarian and brain aromatase activity in several teleost species

TOSHIHIRO SASAKI AND KIYOSHI ASAHINA

Department of Marine Science and Resources, College of Bioresource Sciences, Nihon University, Fujisawa, Kanagawa 252-8510, Japan

The activities of P450 aromatase (P450arom), which converts androgens into estrogens, were measured in ovarian and brain tissues of 9 teleost species; *Chasmichthys dolichognathus*, *Leucopsarion petersii*, *Acanthogobius flavimanus* (Gobiidae), *Oncorhynchus mykiss*, *O. kisutch* (Salmonidae), *Takifugu niphobles* (Tetraodontidae), *Rudarius ercodes* (Monacanthidae), *Enneapterygius theostomus* (Tripterygiidae), and *Oryzias latipes* (Adrianichthyidae). Ovarian follicle and brain tissue samples were taken from yolk-accumulating mature females of each species. Cell free homogenate was prepared from each sample, and incubated with [1β - ^3H] androstenedione as a substrate. Radioactivities of free- $^3\text{H}_2\text{O}$ were measured and P450arom activities were calculated. Ovarian follicle tissues of *C. dolichognathus*, *L. petersii*, *A. flavimanus*, and *O. mykiss* represented high P450arom activity followed by *O. kisutch*. Conversely, ovarian follicle tissues of *T. niphobles*, *R. ercodes*, *E. theostomus*, and *O. latipes*, exhibited relatively low P450arom activities. P450arom activities of brain tissues did not differ greatly among species. The activities were, therefore, higher in the ovary than in the brain in the former five species, and vice versa in the latter four species.

キーワード: アロマターゼ, 活性比較, 真骨魚類, 性成熟, 脳, 卵巣

チトクローム P450 アロマターゼ (以下, P450arom) は P450 側鎖切断酵素, コレステロール側鎖切断酵素, 17α ヒドロキシラーゼなどのステロイド代謝酵素と同様, P450 ファミリーに属す。C19 ステロイドから C18 ステロイドの合成反応を担うステロイド生合成経路の最終段階に位置する律速酵素であり, 女性ホルモンであるエストロゲンの生成に必須である。¹⁾ P450arom は卵巣, 胎盤などの生殖組織に局在し, 小胞体電子伝達系の末端酵素として働いていることが知られている。^{2,3)} このほか, 脳など生殖腺以外の組織にも存在し, 種々の重要な生理作用に関与している。⁴⁾ 真骨魚類の脳では単位タンパク量あたりの P450arom 活性が高く, 哺乳類の脳に比べ 100~1000 倍に達する。⁵⁾ また, 真骨魚類では卵巣に比較して, 脳における P450arom 活性が 10 倍程度に達するとする報告もある。⁶⁾ しかし, この真骨魚類の脳組織における高い P450arom 活性の意義は未だに解明され

ていない。

これらの活性の比較については, 1つの問題がある。すなわち, 従来は乳類で用いられてきた単位タンパク量あたりの酵素活性による比較をそのまま魚類を含む卵性脊椎動物に適用すると, 卵巣に含まれる多量の卵黄タンパク質のため, みかけの活性値は脳と比較して相対的に低くなると考えられる。また, 卵黄タンパク質は成熟に伴い増加するため, 各成熟段階における卵巣での P450arom 活性の比較にも影響する。

本研究では卵黄タンパク質の影響をできるだけ除いた卵巣 cell free homogenate の調製法を検討し, この改良法により脳と卵巣における P450arom 活性を数種類の魚種で比較・検討した。

材料と方法

供試魚 実験に用いた魚種はいずれも 2003 年~2004

年に採集または購入し、いずれも卵巣の肉眼的観察から判別して卵黄蓄積中の雌を用いた。供試魚から卵巣を摘出し、卵巣重量と魚体重から生殖腺体指数 (GSI: 卵巣重量 \times 100/体重) を求めた。種類と入手法および GSI は以下の通りである。

ニジマス *Oncorhynchus mykiss* (サケ科): 独立行政法人水産総合研究センター中央水産研究所日光庁舎において 2003 年 10 月に 3 歳魚雌 3 尾をサンプリングして用いた。GSI は 3.43~5.34 の範囲であった。ギンザケ *Oncorhynchus kisutch* (サケ科): 独立行政法人水産総合研究センター中央水産研究所日光庁社において 2003 年 8 月に 3 歳魚雌 2 尾をサンプリングして用いた。GSI は 4.76~7.34 の範囲であった。アミメハギ *Rudarius ercodes* (カワハギ科): 神奈川県横須賀市秋谷港で 2003 年 6 月から 7 月にかけてサンプリングしたものから、成熟雌 7 尾を用いた。GSI は 8.43~13.61 の範囲であった。クサフグ *Takifugu niphobles* (フグ科): 神奈川県藤沢市江ノ島で 2003 年 5 月から 6 月にかけてサンプリングしたものから、成熟雌 3 尾を用いた。GSI は 13.42~18.71 の範囲であった。ヘビギンポ *Enneapterygius theostomus* (ヘビギンポ科): 神奈川県三浦市水戸浜で 2003 年 6 月から 8 月にかけてサンプリングしたうち、成熟雌 8 尾を用いた。GSI は 6.72~10.95 の範囲であった。メダカ *Oryzias latipes* (メダカ科): ヒメダカを観賞魚店より購入し、明期 14 時間、暗期 10 時間、水温 26 度で馴致し、毎日産卵を行っている雌個体からアロマトーゼ発現量が高くなるとされる産卵 4 時間後の雌個体 24 尾を用いた。GSI は 6.84~8.07 の範囲であった。シロウオ *Leucopsarion petersii* (ハゼ科): 2003 年 4 月に築地市場で購入した卵黄蓄積中の雌 32 尾を用いた。GSI は 7.11~11.36 の範囲であった。アゴハゼ *Chasmichthys dolichognathus* (ハゼ科): 神奈川県藤沢市江ノ島で 2003 年 4 月、2005 年 1 月~6 月にかけてサンプリングしたものから、成熟雌 7 尾を用いた。GSI は 10.86~17.46 の範囲であった。マハゼ *Acanthogobius flavimanus* (ハゼ科): 神奈川県平塚市相模川河口で 2004 年 9 月から 11 月にかけてサンプリングし、明期 10 時間、暗期 14 時間、水温 15°C で馴致し成熟を誘起した成熟雌 3 尾を用いた。GSI は 2.79~4.22 の範囲であった。

卵巣 cell free homogenate の調製 組織 10 mg あたり 250 μ L の 0.067 M リン酸緩衝液 (pH 7.4, 以下 PB) を加え、氷冷下テフロンガラスホモジナイザーを用いてホモジナイズし、4°C, 800 \times g, 20 分間の遠心分離で得られた上清を卵黄を含む卵巣 cell free homogenate とした。また、上記と同様に卵巣組織をホモジナイズした後、4°C, 18,000 \times g, 10 分間遠心分離し、卵黄タンパク質を含む上清を除去した後、沈殿を等量の PB で再懸

濁したものを再度 800 \times g, 20 分間遠心分離し、その上清を卵黄を含まない卵巣 cell free homogenate とした。

脳 cell free homogenate の調製 それぞれの種について、氷冷下、頭蓋骨より終脳、視蓋、小脳、下垂体、および延髄の一部を含む脳全体を取り出し、卵巣組織と同様にホモジナイズした後、4°C, 800 \times g, 20 分間の遠心分離で得られた上清を脳 cell free homogenate とした。

P450arom 活性測定 基質として [1β - 3 H] androstenedione (Perkin Elmer, Wellesley; 936 GBq/mmol) を 92.5 KBq/mL となるよう PB に溶解した。補酵素として NADPH (Sigma, St. Louis) を 2.5 mg/mL の濃度で PB に溶かして用いた。2 mL エッペンドルフチューブに cell free homogenate 100 μ L, 基質液 100 μ L, 補酵素液 100 μ L, PB 700 μ L を加え、室温 (20~22°C) で一定時間インキュベートした後、10% トリクロロ酢酸溶液を 200 μ L 加えて反応を停止させた。これに dextran-charcoal 液 (0.5% charcoal, 0.05% dextran) 300 μ L を加えてよく混合した後、3,000 rpm, 15 分間遠心し、上清 500 μ L と ACSII Scintillation Cocktail (Amersham, Piscataway) 5 mL をバイアル瓶に加えてよく混合し、シンチレーションカウンターを用いて、遊離したトリチウム水の放射活性をカウントした。反応時間は 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50 分とした。また得られた放射活性 (dpm) をタンパク質 1 mg 当たりの、基質として転換された androstenedione の mol 数に換算し P450arom の相対的活性値とした。すなわち、活性値を dpm/60 (60 dpm = 1 Bq) / 基質の比放射活性 / cell free homogenate 100 μ L 中のタンパク量 で算出した。

タンパク質の定量 調製した cell free homogenate を適当な濃度に希釈し、Bradford 法によりタンパク質濃度を測定した。標準タンパク質には牛血清アルブミンを用いた。すなわち、5 倍希釈したタンパク質定量試薬 (BIO-RAD, Hercules) 1 mL と適当な濃度に希釈したサンプル 20 μ L を加えよく混合し、15 分間静置した後、波長 600 nm の吸光度を測定し、検量線よりタンパク量を求めた。

検定 それぞれの魚種の卵巣と脳の活性値について、Mann-Whitney の U 検定を行い、有意差を求めた (両側検定, $P < 0.05$)。

結 果

P450arom 活性値を反応開始から経時的にプロットしたところ、いずれのサンプルにおいても反応開始 20 分後までは、ほぼ直線的な増加を示した (Fig. 1)。このことから酵素反応の初速度を維持したと考えられる反応開始 20 分後の活性値を 1 時間あたりの活性値に変換し、各組織および魚種間での活性比較を行った。

卵巣試料調製法の検討 サケ科魚類を含む、いずれの

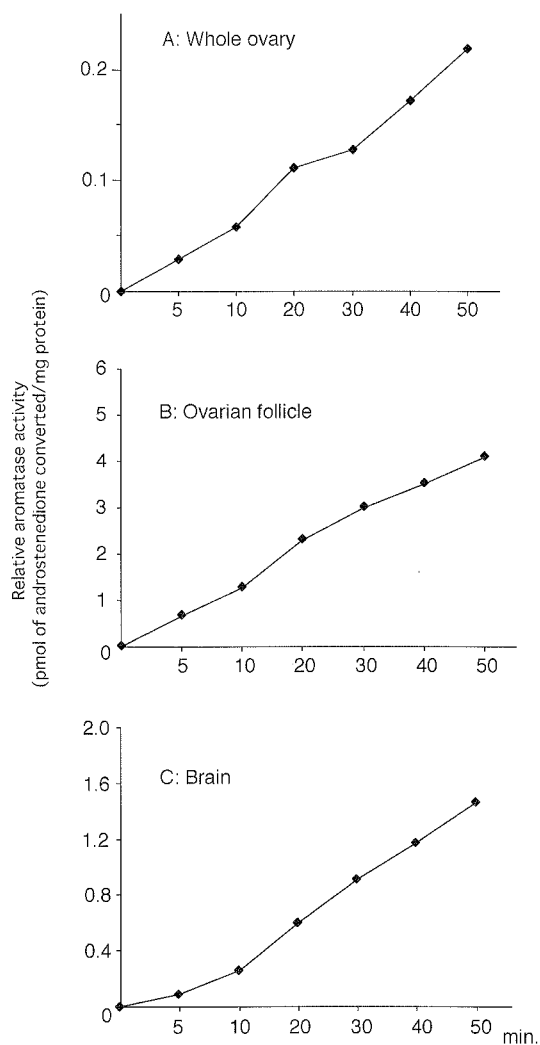


Fig. 1 Comparison of P450 aromatase (P450arom) activity among whole ovary (A), ovarian follicle (B), and brain tissues (C) of mature (yolk-accumulating) female rainbow trout. Tissue samples were incubated with [1β - ^3H]androstenedione and NADPH, and radioactivities of free $^3\text{H}_2\text{O}$ were measured at 0, 5, 10, 20, 30, 40 and 50 min. after the start of incubation. P450arom activity was expressed by pmol of androstenedione converted per mg protein of tissue samples. Note the activities increased lineally, at least until 20 min after the start of incubation.

種の卵巣においても、今回用いたPBのイオン強度においてホモジナイズ後に卵黄タンパク質の沈殿が生じることはなかった。

平均GSI=4.54の雌ニジマス3尾を用いて従来の卵巣 cell free homogenate の調製法と改良した卵巣 cell free homogenate の調製法を比較した。その結果、従来法での活性値 (0.38 ± 0.11 pmol/mg protein/h : 平均値 \pm 標準誤差, 以下同様) に比べ、改良した調製法では有意な活性値の増加 (6.96 ± 0.96 pmol/mg protein/h) が

認められた ($P < 0.05$) (Fig. 1A, B)。ハゼ科のアゴハゼにおいても、本改良法により従来法に比べ著しい活性値の上昇が認められたため (データは示していない)、改良法は魚類卵巣の P450arom 活性測定に有効であると判断し、以後の活性測定には改良法を用いた。

魚類数種における卵巣および脳の P450 アロマターゼ活性の比較 (Fig. 2) ニジマス: 平均 GSI は 4.54 であった ($n=3$)。P450arom 活性は卵巣において 6.96 ± 0.96 pmol/mg protein/h, 脳においては, 2.49 ± 0.66 pmol/mg protein/h となり前者は後者に比べ有意に高かった ($P < 0.05$)。ギンザケ: 平均 GSI は 6.05 であり ($n=2$)、活性は卵巣において 2.31 ± 0.83 pmol/mg protein/h, 脳では 1.92 ± 0.94 pmol/mg protein/h となり、有意差はなかった。アミメハギ: 平均 GSI は 11.67 であり ($n=7$)、活性は卵巣において 0.46 ± 0.15 pmol/mg protein/h, 脳では 2.27 ± 0.27 pmol/mg protein/h となり、脳における活性は卵巣に比べ有意に高かった ($P < 0.01$)。ヘビギンポ: 平均 GSI は 8.52 であり、活性は卵巣において 0.38 ± 0.09 pmol/mg protein/h, 脳では 2.17 ± 1.05 pmol/mg protein/h となり、脳における活性は卵巣に比べ有意に高かった ($P < 0.05$)。クサブリ: 平均 GSI は 15.35 であり ($n=3$)、活性は卵巣において 0.41 ± 0.15 pmol/mg protein/h, 脳では 0.81 ± 0.03 pmol/mg protein/h となり、脳における活性は卵巣に比べ有意に高かった ($P < 0.05$)。メダカ: 平均 GSI は 7.67 であり ($n=24$)、活性は卵巣において 0.90 ± 0.59 pmol/mg protein/h, 脳では 1.61 ± 0.08 pmol/mg protein/h となり、卵巣と脳における活性に有意差は見られなかった。シロウオ 32 尾の平均 GSI は 8.11 であり ($n=32$)、活性は卵巣において 11.37 ± 4.34 pmol/mg protein/h, 脳では 0.37 ± 0.18 pmol/mg protein/h となり、卵巣における活性は脳に比べ有意に高かった ($P < 0.05$)。アゴハゼ: 平均 GSI は 13.41 であり ($n=7$)、活性は卵巣において 13.99 ± 5.70 pmol/mg protein/h, 脳では 8.63 ± 3.35 pmol/mg protein/h となり、卵巣における活性は脳に比べ有意に高かった ($P < 0.05$)。マハゼ: 平均 GSI は 3.35 であり ($n=3$)、活性は卵巣において 5.99 ± 0.44 pmol/mg protein/h, 脳では 4.37 ± 0.11 pmol/mg protein/h となり、卵巣と脳における活性に有意差は見られなかった。

考 察

本研究結果から、従来用いられてきた、多量の卵黄タンパク質を含む魚類卵巣試料調製法と、高速遠心によりできる限り卵黄タンパク質を除いた試料調製法(改良法)とを比較すると、単位タンパク質量あたりの P450arom 活性値は、前者で後者に比べ著しく上昇することが明らかとなった (Fig. 1A, B)。真骨魚類の卵巣において

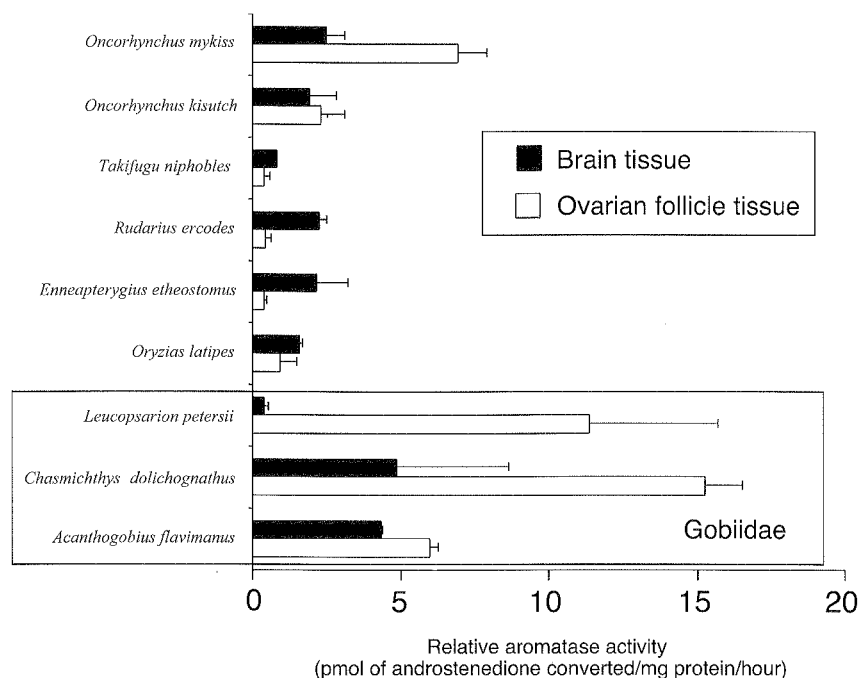


Fig. 2 Comparison of P450arom activity between ovarian follicle and brain tissues of 9 teleost species. P450arom activity was expressed by pmol of androstenedione converted per mg protein of tissue samples per hour. Values obtained by 20 min.-incubation were used for calculation of the enzyme activity in all the samples.

P450arom は卵濾胞組織に局在する⁷⁻⁹⁾ことを考慮すれば、改良法による卵巣試料を用いた P450arom 活性の測定値は、より真の値に近いと言えよう。従って、以後は改良法により、卵巣試料を調製した。また、これにより、脳と卵巣での活性比較、成熟に伴う卵黄タンパクの増加により正確に比較することのできなかった個体間の比較が可能となった。

真骨魚類数種を用いて卵巣と脳の P450arom 活性を比較した結果、サケ科のニジマス、ギンザケ、フグ科のクサフグ、カワハギ科のアミメハギ、ヘビギンボ科のヘビギンボ、メダカ科のメダカ、ハゼ科のシロウオ、アゴハゼ、マハゼにおいて前者は後者に比べ、それぞれ約 2.7 倍、1.2 倍、0.5 倍、0.2 倍、0.2 倍、0.6 倍、30.7 倍、1.6 倍、および 1.3 倍の活性を示し、従来報告されているように^{6,10,11)}脳が卵巣よりもはるかに高い活性を示すことはなかった (Fig. 2)。また、卵巣より脳が高い活性を示した魚種 (アミメハギ、ヘビギンボ、クサフグ、メダカ) では、入手した個体の GSI が高い傾向にあり、GSI がより低い個体を用いて再度比較検討してみる必要がある。

一方、アゴハゼにおいては GSI に関わらず、卵巣、脳ともに全魚種で最大の活性を示した。卵巣の試料調製法が異なるため単純に比較することはできないが、ヨーロッパシーバス *Dicentrarchus labrax* などの卵巣における活性の約 5 倍の高い値を示した。¹⁰⁾ アゴハゼは多回産

卵魚であり、産卵期の卵巣内に発達段階の異なる卵母細胞を持ち、卵黄蓄積と産卵を繰り返す。¹¹⁾ そのため、産卵期を通して高い P450arom 活性を維持する必要があると考えられるが、同じく多回産卵魚であるアミメハギ、¹²⁾ ヘビギンボ、¹³⁾ およびメダカ¹⁴⁾ においては必ずしも高い P450arom 活性を示さないことからやや矛盾する。1 回の産卵数や産卵周期と関連させた更なる検討が必要であろう。

魚類の脳組織における P450arom 活性については、キンギョ¹⁵⁾ やヨーロッパシーバス¹⁰⁾ において卵巣よりも高い活性値が得られている。しかしながら、今回得られた結果では、少なくともハゼ科魚類の卵巣 P450arom 活性は、脳における活性と同等かそれ以上の値を示し、他のカワハギ科、メダカ科、フグ科およびヘビギンボ科魚類とは明らかに異なる結果となった (Fig. 2)。ハゼ科魚類はアゴハゼなどの多回産卵種とシロウオなどの一回産卵種の両方を含み、また、卵巣における高い P450arom 活性などから、これら産卵形態の内分泌的調節機構について調べる上で好適な材料と言えよう。

文 献

- 1) Hinshelwood MM, Corbin CJ, Tsang PCW, Simpson ER. Isolation and characterization of a complementary deoxyribonucleic-acid insert encoding bovine aromatase cytochrome-P450. *Endocrinol.* 1993; **133**: 1971-1977.
- 2) Nakajin S, Shinoda M, Hall PF. Purification to

- homogeneity of aromatase from human-placenta. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 1986; **134**: 704-710.
- 3) Harada N. Novel properties of human placental aromatase as cytochrome-P-450 -purification and characterization of a unique form of aromatase. *J. Biochem.* 1992; **103**: 106-113.
 - 4) 原田信広. P450・アロマターゼ (エストロゲン合成酵素) の構造と機能. 蛋白質 核酸 酵素 1992; **37**: 3051-3059.
 - 5) Callard GV, Drygas M, Gelinis D. Molecular and cellular physiology of aromatase in the brain and retina. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1993; **44**: 541-547.
 - 6) Callard GV, Petro Z, Ryan, KJ. Phylogenetic distribution of aromatase and other androgen-converting enzymes in the central nervous system. *Endocrinol.* 1978; **103**: 2283-2290.
 - 7) Fukada S, Tanaka M, Matsuyama M, Kobayashi D, Nagahama Y. Isolation, characterization and expression of cDNAs encoding the medaka (*Oryzias latipes*) ovarian follicle cytochrome P-450 aromatase. *Mol. Reprod. Dev.* 1996; **45**: 285-290.
 - 8) Kagawa H, Young G, Adachi S, Nagahama Y. Estradiol-17 β produciton in amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*) ovarian follicles: role of the thecal and granulosa cells. *Gen. Comp. Endocrinol.* 1982; **47**: 440-448.
 - 9) Sunobe T, Nakamura M, Kobayashi Y, Kobayashi T, Nagahama, Y. Aromatase immunoreactivity and the role of enzymes in steroid pathways for inducing sex change in the hermaphrodite gobiid fish *Trimma okinawae*. *Comp. Biochem. Physiol. Mol. Integr. Physiol.* 2005; **141**: 54-59.
 - 10) Gonzalez A. and Piferrer F. Characterization of aromatase activity in the sea bass: effects of temperature and different catalytic properties of brain and ovarian homogenates and microsomes. *J. Exp. Zool.* 2002; **293**: 500-510.
 - 11) 金子豊二, 羽生 功, 広瀬慶二. 魚類の生殖リズムに関する研究Ⅶ アゴハゼ *Chasmichthys dolichognathus* の生殖年周期. 日水誌 1984; **50**: 1535-1540.
 - 12) 古川 清. 成熟・産卵リズム (シロギスなど). 「海産魚の成熟・産卵リズム」(廣瀬慶二編) 恒星社厚生閣, 東京. 1991; 65-77.
 - 13) 浜田弘之, 中園明信. ヘビギンポの繁殖生態と雄消化管内に出現する魚卵について. 九州大学農学部学芸雑誌 1989; **43**: 127-134.
 - 14) 岩松鷹司. 生殖. 「メダカ学」, サイエンティスト社, 東京. 1993; 144-184.
 - 15) Pasmanik M. and Callard GVA. High abundance androgen receptor in goldfish brain: characteristics and seasonal changes. *Endocrinol.* 1988; **123**: 1162-1171.