

# 魚類促性腺激素重組蛋白質介紹

劉恩良、陳玉萍、何源興

水產試驗所東部海洋生物研究中心

脊椎動物的生殖過程，與腦下垂體前葉所分泌的激素諸如 FSH (濾泡刺激素)、LH (黃體成長激素)、GH (生長素)、ACTH (促腎上腺皮質素) 及 TSH (甲狀腺刺激素) 等息息相關。其中，LH 及 FSH 直接控制性腺發育以及功能調節，而其分泌受到下視丘分泌的神經內分泌因子以及外圍組織如性腺產生的內分泌激素和腦下垂體本身的分泌因子所影響。對養殖業而言，魚類的繁殖可以藉由調整和控制其性腺與腦下垂體前葉分泌的激素等方式來提升效率。魚類會製造兩種和其他脊椎動物的 FSH 及 LH 相似的促性腺激素 (GtHs)。傳統上，魚類促性腺激素是從其腦下垂體組織中的萃取物純化而得，因為需要大量的腦下垂體材料，相當耗費時間且價格昂貴 (Kamei et al., 2003)。

近 20 年，魚種 GtHs 次單位元 (subunit) (如圖) 的分子序列陸續被選殖出來，透過異源系統的 cDNAs 表現，來重組生產魚類促性腺激素 GtHs (rFSH 及 rLH) 成為可能。一般硬骨魚類具有 GtH I 與 GtH II，分別由  $\alpha$  與  $\beta$  次單元所組成；在兩類型 GtHs 中的  $\alpha$  次單元是相同的，而  $\beta$  次單元則有不同且與激素的專一性有關。重組 GtHs 與天然純化的激素相比，具有不必以魚類作為原料，而且

可以不斷生產的優勢。此外，特定 GtHs 次單位元的重組產物，可以確保沒有與其他相似糖蛋白交叉污染的問題。重組 GtHs 或其他人工蛋白可多方面應用，例如其結構以及生化特性的基礎研究、作為免疫反應中的抗體、施用在體內的目標組織，以及醫學治療上的應用等 (Muasher et al., 2006)。已經有相當多的蛋白質表達系統用來製造魚類的重組蛋白，從原核微生物如大腸桿菌到真核微生物如酵母菌，或是哺乳動物和植物細胞。在選擇表達系統時主要是依據所製造蛋白的特性、產量和進一步純化所需要的條件而定。另外，當重組蛋白需要不斷製造時，所需要的費用也必納入考量。重組蛋白技術其中一個應用，就是產生免疫所需特定抗體時的抗原。像 GtHs 中，只有針對  $\beta$  次單元產生的抗體是必需的，因為針對共通  $\alpha$  次單位元並不會產生特定的抗血清 (Sethuraman et al., 2006)。

製造重組  $\beta$  次單位元時也必須考慮到其在細胞內的滯留的問題。在自然環境之下，GtH $\alpha$  及  $\beta$  次單元在內質網中被組合，並以二聚體的形式被釋放出來。相較於游離的  $\alpha$  次單元和人類絨毛膜促性腺激素 hCG  $\beta$  次單元可以在異源系統中有效的分泌產生，當 FSH $\beta$

及 LH $\beta$  次單元游離時，會被保留在內質網中，並且在與  $\alpha$  次單元行雙聚體化過程後才會被分泌。因此，需要更進一步純化  $\beta$  次單元，而在眾多測試過的表達系統中，例如中國倉鼠卵巢細胞 (CHO) 以及昆蟲細胞， $\beta$  次單元都是被保留在細胞內的。最近，吳郭魚 GtH 利用酵母 (*Pichia pastoris*) (Kasuto et al., 2005) 及日本鰻 GtH 在 *Drosophila* S2 細胞 (Kazeto et al., 2008) 的實例中，均能有效率的表達及製造 FSH $\beta$  及 LH $\beta$  次單元，顯示這些蛋白質表達系統適合製造單一次單元。吳郭魚重組次單元生產的可行性，使免疫檢測方法得以建立，打破了先前鮭魚的限制，成為第一種能夠同時量測兩種 GtHs 的鱸形目魚種 (Aizen et al., 2007)。在生產具完整功能性重組 GtHs 時，重組蛋白必須能正確的折疊、組合及糖基化。目前魚類的重組 GtHs 可在多種真核生物系統進行生產，包含利用桿狀病毒作為基底培養系統的昆蟲細胞 (Cui et al., 2007)、家蠶的幼蟲 (Ko et al., 2007)、哺乳類細胞株 CHO-K1 (Vischer et al., 2003)、土壤變形蟲 (*Dicytostelium discoideum*) (Aizen et al., 2007)、酵母 (*Pichia pastoris*) 以及基因轉殖虹鱒的魚卵 (Morita et al., 2004)，都已經成功產生重組 GtHs，但有各自的優勢與劣勢。如 CHO 或昆蟲細胞等的體外培養費用相當昂貴，即使 CHO 細胞已經被大量使用在哺乳類重組蛋白的製造上。經由桿狀病毒感染的昆蟲細胞，則能夠分泌較高產量的魚類 GtHs。至於土壤變形蟲、家蠶幼蟲及魚卵，因為不需要特別的培養基，則不像上述兩種方式那麼昂貴。此外，即使酵母系統無法像桿狀病毒系統提供高產量，

但培養與擴增均相對簡單。

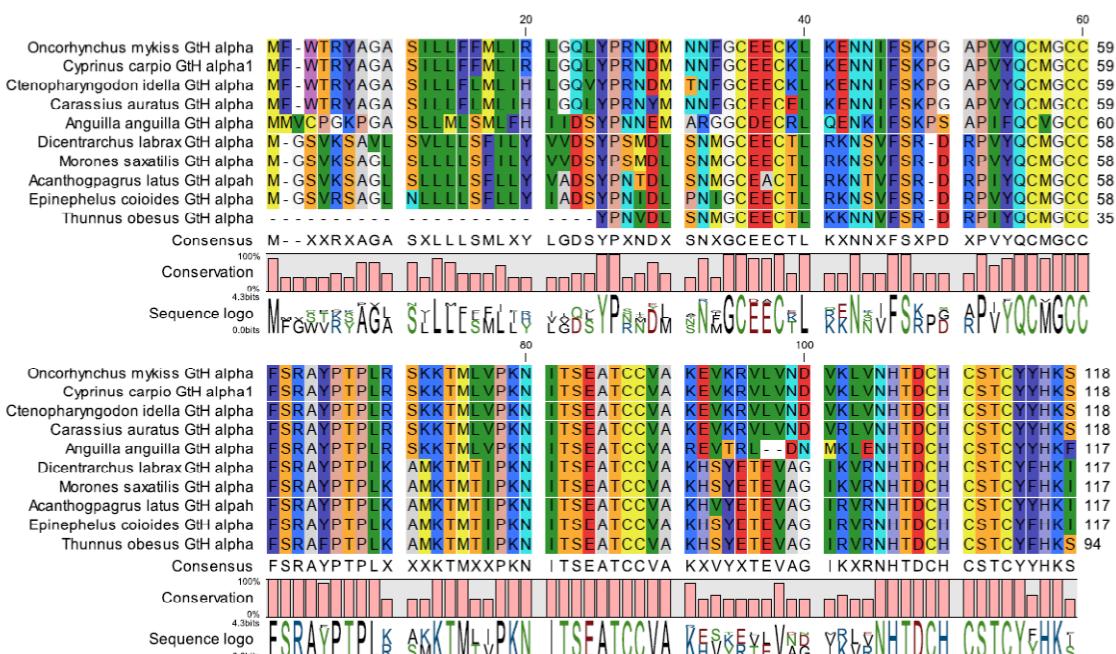
對於製造整個二聚體而言，兩個次單元的 cDNAs 的編碼已利用許多不同的方法被一起表達出來，可各用一個含次單元 cDNAs 的表達質體生產 2 個次單元或是在同一個表達質體用不同的啟動子生產 2 個次單元 (Kobayashi et al., 2006)。根據哺乳類成功產生 GtHs 的策略，另一個方法是在同一個重組 GtHs 中含有 2 個次單元蛋白的片段。在單鍊 GtHs 中的次單元，通常由不同的胺基酸片段所連接，諸如組胺酸標籤，合成 DNAs 編碼組成的胺基酸或是絨毛膜促性腺激素羧基端的肽 (C' terminal peptide) 組成的隔板構造 (spacer)。這些隔板使得次單位能夠正確的折疊，並與激素的活性有關。一般而言，除了需要外在誘導的系統如 *P. pastoris* (Kasuto et al., 2005) 及 *Drosophila* S2 (Kazeto et al., 2008) 細胞株外，針對不同細胞系統的組合型啟動子也廣泛被使用。

重組 GtHs 的糖基化程度在有些報告中已經被分析完成，顯示製造出來的蛋白質是具有 N-糖基化，而寡糖組成則因表達系統而異。魚類重組 GtHs 的製造自 1991 年發展以來 (Huang et al., 1991)，大多用以探討 GtHs 對性腺類固醇生成的影響。人工激素被用於激活異源細胞株中的異源受體。這些研究在測試激素/受器體的特異性，以及重組激素引發受器激活的能力。其他體外研究則用於檢測卵巢中雌二醇及/或睪固酮的製造能力，或是培養的睪丸組織中，11-酮睪固酮和/或睪固酮的產生製造，分析在性腺組織當中重組激素的類固醇含量。一般而言，重組 FSH (rFSH) 以及重組 LH (rLH) 都能夠刺激類固

醇的合成，只是擁有不同效力。經由注射重組激素 GtHs 到魚體內，可評估它們對於性腺發育，和性類固醇製造的效用。鯽魚 (*Carassius auratus*) 和細鱗鮭 (*Brachymystax lenok*) 的 rFSH 和 rLH 都會刺激金魚產生精液 (Ko et al., 2007; Kobayashi et al., 2006)，而日本鰻的 rFSH 則能促使未成熟鰻魚的雄性生殖腺發育和精子生成。鯽魚的 rLH 而非 rFSH 會促使高體鱂鮫 (*Rhodeus ocellatus*) 排卵；而注射細鱗鮭的 FSH 後則會使未成熟虹鱒的卵巢重量及濾泡直徑增加，但 rLH 則

無此效果。在日本鰻中，rFSH 和 rLH 都會刺激卵黃的生成，在經 36 天的體外組織培養實驗中，鰻魚 rFSH 可促使精原細胞增生並發育成精子 (Kamei et al., 2006; Ohta et al., 2007)。

目前醫學上經常使用重組 GtHs 控制生殖過程，但仍不常用於水產經濟動物。若能藉由設計特定的療程，來解決新興養殖魚種的生殖障礙，今後魚類的重組 GtHs 在水產養殖上廣泛應用是可預期的。



魚類促性腺激素 GtH $\alpha$  胜肽序列同源關係比對 (勝肽序列來源：NCBI protein sequence database)