HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	シロサケ(Oncorhynchus keta)成長ホルモンの精製
Author(s)	深田, 陽久; FUKADA, Haruhisa; 玄, 浩一郎 他
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 47(2-3), 31-39
Issue Date	1996-12
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/24156
Type	departmental bulletin paper
File Information	47(2_3)_P31-39.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

北 大 水 産 彙 報
47(2/3), 31-39. 1996.

シロサケ (*Oncorhynchus keta*) 成長ホルモンの精製

深田　陽久[1)]・玄　浩一郎[2,3)]・平松　尚志[2)]
浦　　和寛[2)]・原　　彰彦[4)]

Simple Purification of Growth Hormone from Chum Salmon (*Oncorhynchus keta*)

Haruhisa FUKADA[1)], Koichiro GEN[2),3)], Naoshi HIRAMATSU[2)], Kazuhiro URA[2)] and Akihiko HARA[4)]

Abstract

Growth hormone (GH) was purified from the pituitary glands of chum salmon (*Oncorhynchus keta*) by salting-out, ion exchange chromatography and gel filtration. The pituitaries were homogenized with phosphate buffered saline (pH. 7.0) by using a glass homogenizer and then centrifuged at 15,000 rpm for 60 min. The supernatant was precipitated by addition of ammonium sulfate at 35% saturation. After centrifugation at 10,000 rpm for 30 min, the precipitate was applied to an anion exchange chromatography column (DE-52), and eluted by stepwise method with 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) containing NaCl at 0, 50 and 500 mM. The fractions eluted with the buffer containing 50 mM NaCl were pooled and concentrated, and then subjected to gel filtration on Superose 12 column equilibrated with the Tris-HCl buffer containing 2% NaCl and 0.1% NaN_3. Only one symmetrical peak was obtained by gel filtration. When the peak fraction was applied to SDS-PAGE, a single band of 22.5 kDa which was reacted with rabbit anti-recombinant chum salmon GH (a-rsGH) on Western blotting was obtained. Therefore, it was identified as a chum salmon GH. Intraperitoneal injection of the purified sGH resulted in a increase of body weight, when tested in a bioassay using juvenile masu salmon (*Oncorhynchus masou*).

key words: Growth hormone, *Oncorhynchus keta*, Purification

緒　　言

成長ホルモン (GH) は下垂体の前葉主部 (proximal pars distalis) で産生分泌されるペプチドホルモンであり，魚類を含む脊椎動物の成長を促進する。サケ科魚類では，成長促進作用の他に

1) 北海道大学水産学部附属北洋研究施設海洋生態学部門
(Laboratory of Marine Biology, Research Insititute of North Pacific Ocean, Faculty of Fisheries, Hokkaido University)
2) 北海道大学水産学部水産増殖学科淡水増殖学講座
(Laboratory of Fresh-Water Fish-Culture, Department of Biology, Faculty of Fisheries, Hokkaido University)
3) 現所属：養殖研究所繁殖生理部
(Fish Reproductive Division, National Research Institute of Aquaculture)
4) 北海道大学水産学部附属七飯養魚実習施設
(Nanae Fish Culture Experiment Station, Faculty of Fisheries, Hokkaido University)

降海活動時における海水適応能の向上を促すとされている (Komourdjian et al., 1976; Clarke et al., 1977; Miwa and Inui, 1985)。さらに，近年では成熟への関与も示唆されている (Danzmann et al., 1990; Van der Kraak et al., 1990)。

魚類 GH は，ティラピア *Tilapia mosambica* (Farmer et al., 1976) で初めて精製され，以来数多く報告されている。これまで，カツオ *Katsuwonus pelamis* (Noso et al., 1988)，マグロ *Thunnus albacares* (Kariya et al., 1989)，タラ *Gadus morhua* (Wever et al., 1989)，ブリ *Seriola quineqeradiata* (Kawazoe et al., 1988)，コイ *Cyprinus carpio* (Cook et al., 1983)，ウナギ，*Anguilla japonica* (Kishida et al., 1987)，およびチョウザメ *Acipenser guldenstadti* (Farmer et al., 1981) で GH 精製が報告されていている。サケ科魚類ではマスノスケ *Oncorhynchus tshawytscha* (Le Bail et al., 1989) およびシロサケ *Oncorhynchus keta* (Wagner et al., 1985; Kawauchi et al., 1986) で GH 精製が報告されている。

サケ科魚類における GH の様々な生理機能を解明するうえで，GH をより温和な条件で精製分離する必要がある。しかしながら，これまで下垂体からの GH 精製は，主にアセトン抽出物を最終的に逆相カラムを用いて分離する方法が用いられてきた。また精製に至るまでいくつかの複雑なステップがあり，費やす時間が長かった。そこで，シロサケ GH を硫安塩析，イオン交換クロマトグラフィーおよびゲル濾過の 3 つのステップにより，温和な条件下で簡便に短時間で精製する方法を確立したので報告する。

材 料 と 方 法

供 試 魚

シロサケ下垂体は，1992 年 10 月に水産庁さけ・ますふ化場八雲支場において捕獲された成熟個体より得，精製するまで−30°C で保存した。

抗 血 清

リコンビナントサケ GH(rsGH) に対する家兎抗血清は，Hara (1976) の方法に従って作製した。1 mg/ml の濃度に調整した rsGH 溶液 1 ml を等量の Freund's complete adjuvant (nacalai) と混合し，エマルジョンを作製した。エマルジョン 0.5 ml を家兎後背部に 1 週間隔で 4 回免疫した。抗体価をチェックした後，2 回の追加免疫を行った。採血は常法により行い，血清を得た。

電気泳動法および免疫学的手法

均一スラブゲル (12.5%) および濃度勾配スラブゲル (5-22.5%) を用いたトリス緩衝液系での，SDS (sodium dodecyle sulfate) ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE 法) は，Laemmli (1970) の方法に従った。試料の処理は Hara and Hirai (1978) に準じた。即ち，試料の還元は 2-mercaptoethanol (2-ME) 濃度を 1% になるように添加した後，100°C で 2 分間処理した。泳動は 24 mA 定電流で約 5 時間行った。染色には 40% エタノール，10% 酢酸の混合溶液に溶解した 0.1% Coomassie brilliant blue R-250 溶液を用い，脱色は 20% エタノール，5% 酢酸，2.5% グリセロールの混合液で行った。分子量マーカー (Pharmacia) は，α-lactalbumin (14.4 kDa), trypsin inhibitor (20.1 kDa), carbonic anhydrase (30 kDa), ovalbumin (43 kDa), albumin (67 kDa), および phosphorylase b (94 kDa) を用いた。

Western blotting は Towbin et al. (1979) の方法に準じた。緩衝液には陰極側 (25 mM トリス，40 mM 6-アミノ-n-カプロン酸，20% メタノール，pH 9.4)，陽極側 No. 1 (300 mM トリス，20% メタノール，pH 10.4)，陽極側 No. 2 (25 mM トリス，20% メタノール，pH 9.9) を用い，平板型転

写装置（日本エイドー社）により 25 V 定電圧で 15 分間転写を行った。転写後のニトロセルロース膜は非特異的な反応を防ぐため，5% スキムミルク/500 mM NaCl を含む 20 mM トリス-塩酸緩衝液（TBS, pH 7.5）中で 30 分間ブロッキングを行った後，一次抗体である a-rsGH をブロッキング溶液に対し 1 : 2500 の希釈率で添加し，室温で 1 時間反応させた。その後 0.05% Tween-20 を含む TBS (T-TBS) および TBS で各 2 回ずつ 5 分間洗浄し，余剰の一次抗体を除去した。次いで二次抗体（ペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG ヤギ血清）(Bio-Rad) を TBS 中に 1 : 2,000 の希釈率で添加し，室温で 1 時間反応した。上記と同様に洗浄を行い，その後発色溶液[15 mg 4-クロロ-1-ナフトール (Bio-Rad), 20 ml TBS/5 ml メタノール，15 μl 過酸化水素水] に浸し，発色させた。

シロサケ GH の精製

シロサケ下垂体抽出液は，0.3% triton X-100 と 150 mM NaCl を含む 10 mM リン酸緩衝液 (PBS, pH 7.0) 中でガラスホモジナイザーを用い氷冷下で抽出操作を行うことにより得た。抽出物を 15,000 rpm にて 60 分間遠心後，上清に 35% 飽和濃度となるように硫酸アンモニウム粉末を加えて 4°C で一昼夜撹拌した。得られた沈殿を同飽和溶液により 2 回洗浄してから，20 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) で溶解，透析を行った。十分に透析を行った後，同緩衝液にて平衡化した DEAE セルロース (DE-52, Whatman) カラムに添加した。溶出は上記緩衝液および NaCl 濃度を 50 mM, 500 mM に調整した上記緩衝液によるステップワイズ法にて溶出を行った。流速は 120 ml/h とした。50 mM NaCl 溶出分画を濃縮し，2% NaCl, 0.1% NaN_3 を含む 20 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) にて平衡化した Superose 12 カラム (FPLC system, Pharmacia) に供した。溶出は流速 0.5 ml/min で行った。

生物学的活性

精製 GH の生物学的活性を確認するために用いた 0 年魚サクラマス（平均体重 19.4±1.1 g）は，北海道大学水産学部附属七飯養魚実習施設で累代飼育されている個体を使用した。コントロール群は，0.9% NaCl を腹腔内に投与した。GH 投与群は精製 GH を 1 μg/g 体重の濃度で一日おきに計 6 回腹腔内投与し，最終投与 2 日後に体重測定を行った。

結　　果

下垂体抽出液の硫安塩析

初めに硫安塩析における GH の分画条件に関して検討した。35% および 50% 飽和濃度の硫酸アンモニウムにて，シロサケ下垂体抽出液を塩析した。遠心分離後の沈殿分画を PBS で溶解し，上清分画とともに SDS-PAGE に供した像を Fig. 1 に示す。GH の検出は a-rsGH を用いた Western blotting により行った。35% 飽和硫安濃度でほとんどの GH は沈殿分画に含まれていた。一方，50% 飽和硫安濃度でも，沈殿分画に大部分の GH が認められた。

下垂体抽出液のイオン交換クロマトグラフィー

次に DE-52 における GH の分画下の条件を検討した。下垂体抽出液を 20 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) により平衡化した DE-52 セルロースカラムに供した。NaCl 濃度 50 mM, 100 mM, 150 mM, 300 mM, 500 mM を含む 20 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) によりステップワイズ法で溶出を行った。各溶出分画を SDS-PAGE により解析した。各分画の SDS-PAGE 像を Fig. 2 に示す。50 mM NaCl を含む 20 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) にて溶出を行った分画で GH の溶出が認められた。GH は SDS-PAGE 上で 100 mM NaCl 溶出分画まで確認できたが，それ以降の溶出分画

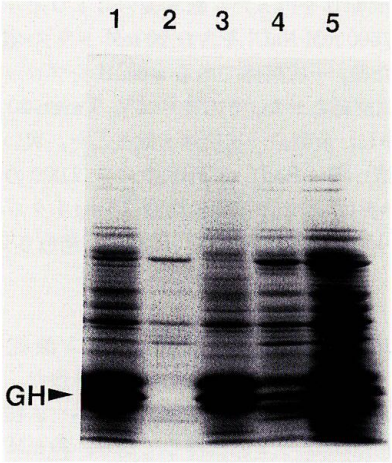

Fig. 1. 5-22.5% SDS-PAGE of fractions after salting out with ammonium sulfate. 1: precipitate of 35% ammonium sulfate saturation. 2: supernatant of 35% ammonium sulfate saturation. 3: precipitate of 50% ammonium sulfate saturation. 4: supernatant of 50% ammonium sulfate saturation. 5: pituitary extracts.

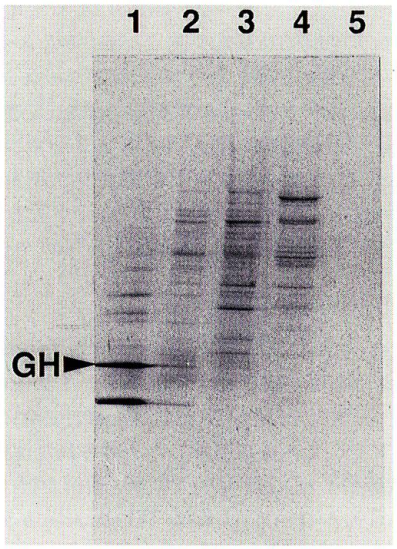

Fig. 2. 5-22.5% SDS-PAGE of fractions after ion exchange chromatography on DE-52 at differnt NaCl molarities. 1: 50 mM, 2: 100 mM, 3: 150 mM, 4: 300 mM, 5: 500 mM

では GH のバンドが認められなかった。

GH の精製

下垂体抽出液の 35% 飽和硫安沈殿分画を DE-52 セルロースカラムに供した。溶出パターンを Fig. 3 に示す。20 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) にて溶出した非吸着分画を pass through 分画, 50 mM, 500 mM NaCl を含む同緩衝液にて溶出した分画をそれぞれ 50 mM 溶出分画および 500 mM 溶出分画とした。それぞれの分画を SDS-PAGE に供した (Fig. 4)。すべての溶出分画に GH が存在していたが, 50 mM 溶出分画には GH のバンドのみが見られた。Fig. 3 のシャドー部分を濃縮し, 2% NaCl, 0.1% NaN_3 を含む 20 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) で平衡化した Superose 12 ゲル濾過カラムに供した結果, シンメトリーなピークが得られた (Fig. 5)。ピーク部を SDS-PAGE および a-rsGH を用いた Western blotting に供した図を Fig. 6 に示す。SDS-PAGE で 23 kDa に一本のバンドが観察され, そのバンドが Western blotting で反応したことからシロサケ下垂体から GH が電気泳動的に高純度で精製されたことが示された。精製 GH は還元下では 23 kDa を示し, 非還元下では 22.5 kDa であった (Fig. 7)。

生物学的活性

精製 GH の活性は 0 年魚サクラマスに腹腔内投与を行い確認した。体重の増加を Table 1 に示す。体重の増加は, GH 投与群が高値を示し, コントロール群と比較し差異が観察された。

考　　察

これまで多くの硬骨魚類で GH の精製に関して報告されているが, 下垂体からの抽出法に違い

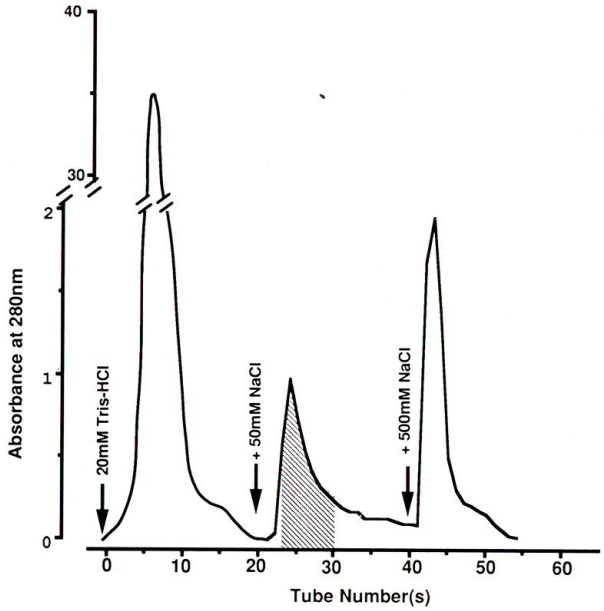

Fig. 3. Ion exchange chromatography of the pituitary extracts at 35% saturated with ammonium sulfate.

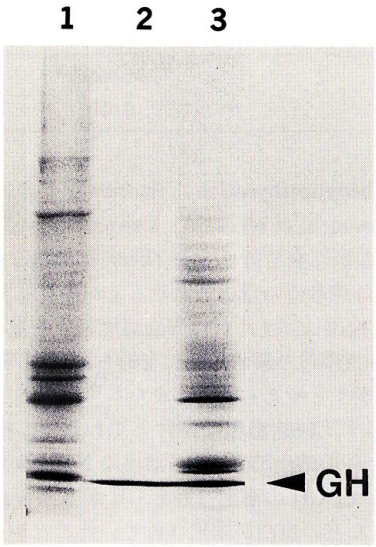

Fig. 4. 5-22.5% SDS-PAGE of fractions eluted on DE-52 column by stepwise method. 1 : Pass through fraction, 2 : 50 mM NaCl fraction, 3 : 500 mM NaCl fraction. Samples were reduced by 2-mercaptoethanol.

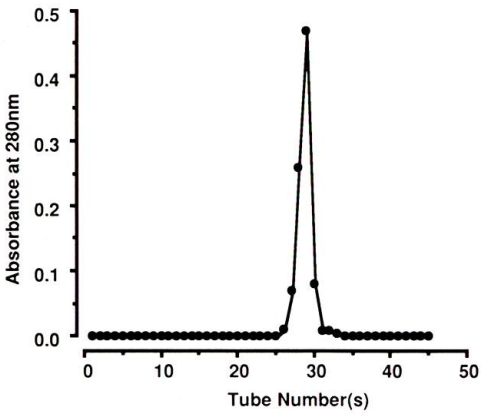

Fig. 5. Gel filtraction of 50 mM NaCl on Superose 12. The 50 mM NaCl fraction is the same represented in Fig. 4.

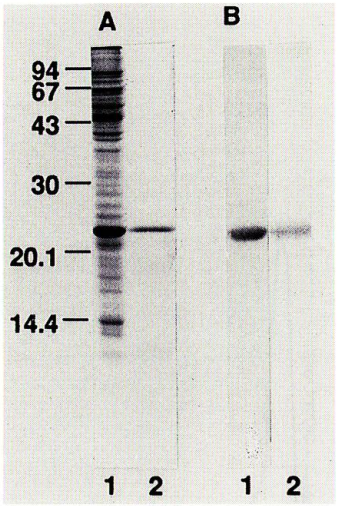

Fig. 6. 12.5% SDS-PAGE (A) and its Western blotting using a-GH (B) of purified GH. Lane 1 is pitutary extracts. Lane 2 is purified GH. Samples were reduced by 2-mercaptoethanol.

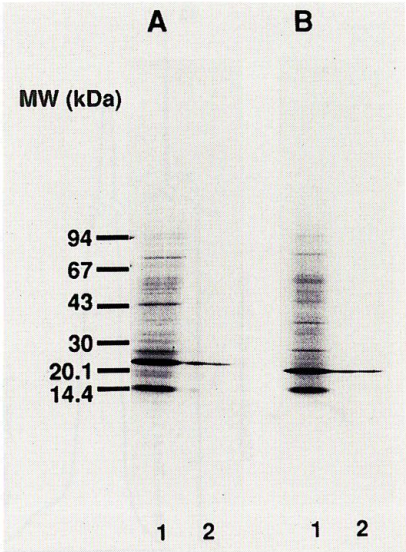

Fig. 7. 5-22.5% SDS-PAGE of purified GH treated with (A) or without (B) 2-mercaptoethanol. Lane 1 is pitutary extracts. Lane 2 is purified GH.

Table 1. Effect of sGH on the growth of juvenile masu salmon

Treatment	Gained Weight(g)	±SE
GH (1.0 μg/ml)	11.635	2.365
Saline control	2.281	0.356

が見られる。即ち，下垂体からの抽出はアセトンに phenylmethysulfonyl fluoride などのプロテアーゼインヒビターを加えた有機溶媒で行う方法 (Kawauchi et al., 1986 ; Kawazoe et al., 1988 ; Noso et al., 1988 ; Kariya et al., 1989) の他に塩基性の緩衝液で行う方法 (Farmer et al., 1976 ; Wagner et al., 1985 ; Wever et al., 1989) がある。GH は疎水性の蛋白であることが知られている (Kawauchi et al., 1986)。そこで抽出率を高めるために抽出は非イオン性界面活性剤である triton X-100 を 0.3% 含む PBS で行った。triton X-100 は疎水性部位と親水性部位を持ち，GH の疎水性部分は triton X-100 の疎水性部分で覆われ，親水性を増すと考えられる。また本実験の抽出法は有機溶媒を用いた抽出法より蛋白の変性や失活を招かず比較的温和な条件と思われる。様々な NaCl 濃度の緩衝液での陰イオン交換クロマトグラフィーの溶出結果より，溶出の NaCl 濃度を以下の様にした。非吸着分画は NaCl を含まない緩衝液にて，GH の溶出は最も GH が多く含まれた NaCl 濃度 50 mM で行い，回収は 500 mM NaCl でほとんどの蛋白が溶出されていたことから 500 mM NaCl とした。

これまで報告されている抽出後の操作は大きく 3 つに分けられる。1) 等電点沈殿等の pH 処理による下垂体抽出液の沈殿をゲル濾過に供した後に，Con A カラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーを行う。ゲル濾過によるリクロマトの後，陰イオン交換クロマトグラフィーを

行い，再々度ゲル濾過を行う方法 (Wagner et al., 1985)，2) pH 処理による下垂体抽出液の沈殿をゲル濾過後，逆相カラムに供す方法 (Kawauchi et al., 1986 ; Wever et al., 1989) および 3) pH 処理による下垂体抽出液の沈殿をゲル濾過，陰イオン交換クロマトグラフィー，逆相カラムに供する方法 (Noso et al., 1988 ; Kariya et al., 1989) である。

今回，シロサケ GH の精製は硫安塩析，イオン交換クロマトグラフィーおよびゲル濾過の 3 つのステップで行った。他の精製法に比較し，ステップが少ないため精製に費やす時間も短く (2 日間)，蛋白の活性を失わずにすむと思われる。逆相カラムを用いる精製法は高純度で精製品を得ることができるので精製蛋白のアミノ酸解析を目的とする時には必須な操作である。しかしながら，溶出を有機溶媒であるアセトニトリルで行うので精製品を *in vivo* の投与試験等に用いる場合は変性，失活が起きている可能性が危惧される。本研究において精製した GH は，生物学的活性を確認した結果，活性を有し体重の増加が認められた。以上のように GH の精製は多々報告があるが，目的に適した精製法を用いることが重要と考えられる。

本研究で精製した GH は SDS-PAGE において 22.5 kDa であった。精製 GH の分子量はこれまで精製された魚類および他のサケ科魚類とほぼ一致していた (Table 2)。また，GH の分子量は SDS-PAGE に供する際の還元処理により差異が認められた (Fig. 6)。即ちその分子量は還元下では 23 kDa であり非還元下では 22.5 kDa であった。GH の分子構造には大ループと小ループの二つのループが存在し，ループ末端は S-S 結合で結ばれている (Wever et al., 1989)。非還元下ではこの結合が維持されているため還元下の分子量より小さい値を示すと理解される。一方，シロサケの GH には分子量が同一であり等電点が 5.6 と 6.0 と異なる 2 つのアイソフォーム (GH1 および GH2) の存在が報告されている (Wagner et al., 1985 ; Kawauchi et al., 1986)。精製 GH を

Table 2. Molecular Weights of Teleost GH

	MW	Reference
Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*)	23,000	Le Baiq et al., 1989
Chum salmon (*Oncorhynchus keta*)	18,400	Komourdjian and Idler, 1979
	23,500	Wagner et al., 1985
	23,000	Kawauchi et al., 1986
	22,500	Fukada et al. (present study)
Tilapia (*Tilapia mosambica*)	22,200	Farmer et al., 1976
Sturgeon (*Acipenser guldenstadti*)	23,500	Farmer et al., 1981
Japanese eel (*Anguilla japonica*)	23,000	Kishida et al., 1987
Yellowtail (*Seriola quineqeradiata*)	22,000	Kawazoe et al., 1988
Cod (*Gadus morhua*)	20,000 and 22,000	Wever et al., 1989
Tuna (*Thunnus albacares*)	21,000	Kariya et al., 1989
Bonito (*Katsuwonus pelamis*)	21,000	Noso et al., 1988

Mono-Q カラム (FPLC system, Pharmacia) を用いてイオン交換クロマトグラフィーを行った時, GH の溶出に GH1 と GH2 と考えられる 2 つのピークが認められた。GH1 と GH2 はアミノ酸組成において若干の差異があるが, *in vivo* での投与実験でともに成長促進効果を有することが確認されており (Wagner et al., 1985), 投与実験に使用する際は共存しても問題がないと思われる。

以上, 本実験はシロサケ下垂体から, 温和な条件下における簡易で迅速な方法により GH を精製した。精製 GH は活性を有することが確認されたことから, GH が関わる様々な生理現象の解析の一つの手段として, *in vivo* の投与実験に用いることが可能であることが示された。

謝　　辞

本研究を行うにあたりシロサケ下垂体をご提供してくださった北海道大学水産学部淡水増殖学講座に深く感謝いたします。また, 英文の御校閲をいただいたアラスカ大学フェアバンクス校 William W. Smoker 教授に深く謝意を表す。

文　　献

Clarke, W.C., Farmer, S.W., and Hartwell, K.U. (1977) Effects of teleost pituitary growth hormone on growth of *Tilapia mosambica* and on growth and seawater adaptation of sockeye salmon. (*Oncorhynchus nerka*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, **33**, 174-178.

Cook, A.F., Wilson, S.W., and Peter, R.E. (1983). Developmental and validation of a carp growth hormone radioimmunoassay. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **50**, 335-347.

Danzmann, G.R., Van der Kraak, J.G., Chen, T.T., and Powers, A.D. (1990). Metabolic effects of bovine growth hormone and genetically engineered rainbow trout growth hormone in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) reared at a high temperature. *Can. J. Exp. Zool.*, **256**, 347-350.

Farmer, S.W., Papkoff, H., Hayashida, T., Bewley, T.A., Bern, H.A. and Li, C.H. (1976). Purification and properties of teleost growth hormone. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **30**, 91-100.

Farmer, S.W., H., Hayashida, Papkoff, H., and Polenov, L. (1981). Characteristics of growth hormone isolated from sturgeon (*Acipenser gludenstadti*) pituitaries. *Endocrinology*, **108**, 377-381.

Hara, A. (1976). Iron-binding acitivity of female-specific serum proteins of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and chum salmon (*Oncorhynchus keta*). *Biochem. Biophys. Acta.*, **427**, 549-557.

Hara, A. and Hirai, H. (1978). Comparative studies on immunochemical properties of female-specific serum protein and egg yolk proteins in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comp. Biochem. Physiol.*, **48(B)**, 389-399.

Kariya, Y., Sato, N., Kawazoe I., Kimura, S., Miyazaki, N., Nonaka, M., and Kawauchi H. (1989). Isolation and characterization of growth hormone from a marine fish, tuna (*Thunnus albacares*). *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 1679-1687.

Kawauchi, H., Moriyama, S., Yasuda, A., Yamaguchi, K., Shirahata, K., Kubota, J., and Hirano, T. (1986). Isolation and characterization of chum salmon growth hormone. *Arch. Biochem. Biophys.*, **244**, 542-552.

Kawazoe, I., Noso, T., Kuriyama, S., Akasaka, A., and Kawauchi, H. (1988). Isolation and characterization of growth hormone from yellowtail *Seriola quineqeradiata*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **54**, 393-399.

Kishida, M., Hirano, T., Kubota, J., Hasegawa, S., Kawauchi, H, Yamaguchi, K., and Shirahata, K. (1987). Isolation of two forms of growth hormone secreted from eel pituitaries *in vitro*. *Gen. Comp. Biochem.*, **65**, 478-488.

Komourdjian, M.P., Saunders, R.L., and Fenwick, J.C. (1976). The effect of porcine somatotropin on growth, and survival in seawater of Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr. *Can. J. Zool.*, **54**, 531-535.

Komourdjian, M.P. and Idler, D.R. (1979). Chum salmon pituitary fractions : somatotrophic activity and cytoimmunofluorescence studies. *Gen. Comp. Biochem.*, **37**, 343-349.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.

Le Bail, P., Boulard, G., and Zygmunt, M. (1989). Purification of chinook salmon (*Oncorhynchus tschawytscha*) GH for receptor study. *Fish Physiol. Biochem.*, **7**, 243-251.

Miwa, S. and Inui, Y. (1985). Effect of L-thyroxine and ovine growth hormone on smoltification of amago salmon. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **58**, 436-442.

Noso, T., Yasuda, A., Kawazoe, J., Takehara, H., Takahashi, A., Sasaki, K., and Kawauchi, H. (1988). Isolation and characterization of growth hormone from a marine fish bonito (*Katsuwonus pelamis*). *Int. J. Pept. Protein Res.*, **32**, 579-589.

Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : Procedure and some applications. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **76**, 4350-4354.

Van der Kraak, J.G., Rosenbkum, P.M., and Peter, P.E. (1990). Growth hormone-dependent potentiation of gonadotropin-stimulated steroid production by ovarian follicles of the gold fish. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **79**, 233-239.

Wagner, G.F., Fargher, R.C., Brown, J.C., and McKeown B.A. (1985). Further characterization of growth hormone from the chum salmon (*Oncorhynchus keta*). *Gen. Comp. Endcrinol.*, **60**, 27-34.

Wever, M.R., Walther, B.T., and Kawauchi, H. (1989). Isolation and characterization of growth hormone from Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, **73**, 260-269.