

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 12 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25660159

研究課題名(和文)ウニにステロイドホルモン合成・代謝機構はあるのか？

研究課題名(英文)Sea urchin has steroid hormone metabolism？

研究代表者

浦 和寛(Ura, Kazuhiro)

北海道大学・水産科学研究科(研究院)・助教

研究者番号：90360940

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ウニの生殖巣肥大にステロイドホルモンが関与しているか解明するために、生殖巣が小さいキタムラサキウニに給餌し生殖巣を人為的に肥大させた。給餌開始前後のウニから生殖巣を摘出し、次世代シーケンス解析によりトランスクリプトーム解析を行い、22種類の核内受容体および21種類のP450を同定した。脊椎動物に見られるステロイドホルモンをリガンドとする核内受容体は認められなかった。一方、脊椎動物においてステロイドホルモンの合成に必須のP450と相同性を持つP450遺伝子は認められなかった。さらに、生殖巣ではEcR/FXRが認められたことからウニ特有のステロイドホルモンを合成・代謝している可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：It is still unclear that the endocrine system such as synthesize and/or embolism of steroid hormones during the period of gonadal growth in sea urchin. This study aimed to identify genes involved in gonadal growth and to investigate gene expression in the period of gonadal growth in sea urchin. RNA-seq analysis using next-generation sequencer was carried out on growing gonads of the Northern sea urchin, *Mesocentrotus nudus*. BLASTn analysis identified 22 transcripts potentially involved endocrine factors such as nuclear receptor (NR) and 21 transcripts of P450 in the growing gonad. However, the homologous genes as ER, AR, P450sc, P450c17, P450arom were not observed in sea urchin. In these analysis, it is suggested that sea urchin has no sex steroid hormones as same as vertebrate. These results suggested that sea urchin synthesized steroid hormones as same as other insects.

研究分野：海産無脊椎動物生理学

キーワード：ウニ 海産無脊椎動物 内分泌 ステロイド 核内受容体 P450 次世代シーケンス 生殖巣

1. 研究開始当初の背景

一般に魚類など卵生動物では、主要卵黄タンパク質はビトロゲニンである。海産無脊椎動物であるウニにおいては、主要卵黄タンパク質 (Major Yolk Protein: MYP) は魚類では LLTPファミリーに属するタンパク質であるが、ウニではトランスフェリンファミリーに属するタンパク質である。ウニにおいては、この MYP が卵形成前に生殖巣で合成・蓄積され卵形成に伴い卵に移行すると考えられている。魚類雌において、主要卵黄タンパク質であるビトロゲニンは生殖巣で合成される性ステロイドホルモンであるエストロゲンが合成され、肝臓に働きかけ核内受容体であるエストロゲン受容体を介して肝臓中で合成され血中に分泌され卵へと移行し取り込まれる。また、魚類雄においては精巣で合成される性ステロイドホルモンが核内受容体であるアンドロゲン受容体を介して精子形成を促進することが知られている。これら、生殖巣で合成されるエストロゲンやアンドロゲンは、生殖巣においてコレステロールから薬物代謝酵素である P450 によって合成・代謝されることは知られている。ウニにおいても生殖巣中で卵形成、精子形成が進行する。しかし、ウニにおいては MYP の合成(生殖巣の肥大)を含め、卵形成、精子形成に脊椎動物と同様な性ステロイドホルモンおよび核内受容体が関与しているのかは詳細に研究されていない。これまでの報告として、ウニ生殖巣中においてエストロゲンやアンドロゲンが検出されているが、これらの性ステロイドホルモンが卵形成、精子形成に伴い正の相関で生殖巣中の量が増えるという報告は無く、むしろ正の相関を持たないという報告がなされている。また、魚類の性ステロイドホルモンを未熟期のウニに経口投与したところ、卵形成、精子形成が進行しないという報告もされている。このようにウニに脊椎動物と同様な性ステロイドホルモンの合成・代謝機構が存在するのことは未だ明らかにされていないと同時にウニ生殖巣でどのような核内受容体が発現し生理学的作用を担っているのか明らかにされていない。また、主要卵黄タンパク質の合成が魚類と同様にステロイドホルモンにより核内受容体を介して合成誘導されているのかも明らかにされていない。

2. 研究の目的

そこで、本研究課題では、ウニ生殖巣でステロイドホルモンの合成代謝機構が存在するか明らかにすること。および、ウニの生殖巣肥大に伴い合成・蓄積される MYP、脂質、糖の合成にステロイドホルモンおよび核内受容体が関与しているか解明することを目的とした。さらに、ウニ生殖巣で脊椎動物と同様な性ステロイドをリガンドとする核内受容体が発現し機能しているのかを明らか

にすることを目的とした。

3. 研究の方法

生殖巣が未熟で小さいキタムラサキウニにコンブを5カ月間給餌し生殖巣を人為的に肥大させた。肥大前後の生殖巣中の MYP 量を MYP に対する特異抗体を用いてマンシーニ法で定量した。また、キタムラサキウニ MYPcDNA を定法によりクローニングし全長配列を決定した。決定した MYPcDNA の配列を基に MYPmRNA 発現量を定量 PCR (qPCR) を確立し qPCR 法により給餌前後の生殖巣中の MYPmRNA の発現量を定量比較した。給餌前後の生殖巣中に含まれる、グリコーゲン量および総脂質量を定法により定量し比較した。ウニ生殖巣中でステロイドホルモン合成・代謝機構すなわち脊椎動物と同様な P450 遺伝子群が存在するか、どのような核内受容体がウニ生殖巣で発現しているのか、さらに MYP の合成にどのような核内受容体が関与しているのか明らかにするため、給餌開始前後のウニから生殖巣を摘出し、mRNA を定法に従って精製し、次世代シーケンス解析を行い、ウニ生殖巣に発現している核内受容体およびステロイドホルモン合成・代謝に必須の P450 (CYP) についてトランスクリプトーム解析およびアミノ酸の相同性検索を行った。次世代シーケンス解析により得られた核内受容体の塩基配列を基に特異プライマーを設計し、定量 PCR (qPCR) を確立し定法に従って mRNA 発現量を定量し給餌前後の生殖巣中の発現量を比較した。

4. 研究成果

肥大前後の生殖巣中の MYP 量をマンシーニ法で定量し、MYPmRNA 発現量を定量 PCR (qPCR) により定量した結果、タンパク質および遺伝子レベルで給餌前に比べ肥大後の生殖巣中では肥大前に比べ有意にタンパク、遺伝子レベルで増加していた。給餌開始前後のウニから生殖巣を摘出し、mRNA を定法に従って精製し、次世代シーケンス解析を行い、ウニ生殖巣に発現している核内受容体およびステロイドホルモン合成・代謝に必須の P450 (CYP) についてトランスクリプトーム解析を行った。トランスクリプトーム解析の結果、ウニ生殖巣で発現している 22 種類の核内受容体および 21 種類の P450 を同定した。核内受容体については、そのアミノ酸相同性検索の結果、ウニ生殖巣中には脊椎動物に見られる性ステロイドホルモンをリガンドとする核内受容体 (エストロゲン受容体、アンドロゲン受容体) の発現は認められなかった。しかし、エストロゲン関連核内受容体である ERR の発現が認められた。また、同定した 21 種類の核内受容体に対する定量 PCR 系を確立し、給餌前後の生殖巣中における各核内受容体の発現量を定量し比較した。その結果、21 種類の核内受容体の内、8 種類の核内受容体 (COUP-TF, LXR, EcR/FXR, BAR, PPAR, RXR,

SpSHR2, NR5A2) の発現量が肥大前の生殖巣に比べ肥大後の生殖巣中で有意に増加していた。他の 13 種類の核内受容体の mRNA 発現量に有意な差は認められなかった。一方、ステロイドホルモン合成・代謝機構に関しては、一般に魚類などの脊椎動物においてコレステロールから性ステロイドホルモンを合成する際に P450scc, P450c17, P450arom の合成・代謝酵素が必要不可欠であることが知られている。本研究においてのトランスクリプトーム解析の結果、これら 3 種類の P450 の相同性遺伝子の発現は認められなかった。このことから、ウニ生殖巣中には脊椎動物に確認されている性ステロイドホルモン(エストロゲン、アンドロゲン)は合成されていないことが強く示唆された。興味深いことに、脊椎動物では、脳においてコレステロールが P450 によって代謝されていることが知られている。ウニ生殖巣中では、この脊椎動物の脳でコレステロールを代謝する P450 と相同性を持つ P450 が発現していた。また、同定した P450 のアミノ酸配列の相同性検索を行った結果、脊椎動物では脂肪酸、レチノール、ステロイド代謝に関与する P450 群と相同性を示した。本研究では、これらウニ生殖巣中で発現が認められた P450 遺伝子群の発現変動解析には至らなかった。今後、発現が認められた P450 遺伝子群の定量系を確立し詳細に調べる必要性が残された。これらの核内受容体および P450 のトランスクリプトーム解析の結果から、ウニにおいては脊椎動物で認められている性ステロイドホルモン(エストロゲン、アンドロゲン)を合成しておらず、またこれらをリガンドとする核内受容体がウニ生殖巣では発現していないことが明らかになり、これまで報告されているウニ生殖巣でエストロゲン、アンドロゲンが機能しているという報告には一致しなかった。一般に魚類において主要卵黄タンパク質であるビトロゲニンの合成にはエストロゲンおよびエストロゲン受容体が関与しているが、ウニにおいては生殖巣中でエストロゲンは合成されておらず、またエストロゲン受容体も存在しないことから、主要卵黄タンパク質の合成にこれらのステロイドホルモンおよび核内受容体が関与していないことも明らかになった。ウニ主要卵黄タンパク質の合成には魚類とは異なる発現制御機構が存在するものと推測された。ウニ生殖巣の発達ステージごとの各ステージから RNA を抽出し cDNA を合成し、MYP および 21 種類の核内受容体について qPCR 法を用いて mRNA 発現量を定量した。また、MYPmRNA の発現変動と正の相関の発現量を示す核内受容体の特定を行った。その結果、4 種類の核内受容体 (COUP-TF, HNF4, BAR, EcR/FXR) の発現量と MYPmRNA 発現量の間に正の相関関係があることが判明した。この解析の結果から、これら 4 種類の核内受容体が MYPmRNA の発現を制御している可能性が示された。ウニ生殖巣の肥大に伴い、生殖巣

中の細胞(栄養細胞)の数や大きさが増加し、脂質量、糖類の量が増加することも他のウニ類で報告されている。本研究において人為的に肥大させた生殖巣中の総脂質およびグリコーゲン量を定量した結果、両者とも給餌後に有意に増加していた。

以上のことから、ウニ生殖巣の肥大に伴う細胞分化・増殖、脂質合成、糖合成および MYP 合成に、上記核内受容体および P450 によって合成・代謝された化学成分(リガンド)が関与していることが示された。さらに、ウニ生殖巣では EcR/FXR が認められ、この核内受容体は昆虫ステロイドあるいはコレステロール代謝物をリガンドとすることから、脊椎動物とは異なりウニ生殖巣では、ウニ特有のステロイドホルモンを合成・代謝している可能性が示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 6 件)

1. 佐藤卓史・西宮攻・萩原聖士・井尻成保・足立伸次・浦和寛・都木靖彰 「未熟ウニ生殖巣の肥大に伴う核内受容体の発現変化」平成 27 年度日本水産学会春季大会, 東京海洋大学品川キャンパス(東京都, 港区), 2016 年 3 月 27 日
2. 佐藤瑞葉・津江志緒莉・佐藤卓史・東典子・浦和寛・都木靖彰 「ウニ生殖巣の肥大に関与する分子に関する研究-1 キタムラサキウニにおける RAR-like の発現解析」平成 26 年度日本水産学会春季大会, 東京海洋大学品川キャンパス(東京都, 港区), 2015 年 3 月 29 日
3. 津江志緒莉・佐藤卓史・佐藤瑞葉・澤田恵梨子・東典子・浦和寛・都木靖彰 「ウニ生殖巣の肥大に関与する分子に関する研究-2 キタムラサキウニにおける COUP-TF-like 遺伝子の発現解析」平成 26 年度日本水産学会春季大会, 東京海洋大学品川キャンパス(東京都, 港区), 2015 年 3 月 29 日
4. 佐藤卓史・相澤俊介・王 姮・萩原聖士・東典子・井尻成保・浦和寛・都木靖彰 「ウニ生殖巣の肥大に関与する核内受容体の発現解析」平成 26 年度日本水産学会秋季大会, 九州大学箱崎キャンパス(福岡県, 福岡市), 2014 年 9 月 20 日
5. 長谷美佳・佐藤卓史・相澤俊介・王 姮・東典子・浦和寛・都木靖彰 「キタムラサキウニ生殖巣栄養細胞における主要卵黄タンパク質(MYP)の cDNA クローニングおよび発現解析」平成 26 年度日本水産学会秋季大会, 九州大学箱崎キャンパス(福岡県, 福岡市), 2014 年 9 月 20 日

6. 浦和寛・佐藤卓史・Heng Wang・萩原聖士・東典子・井尻成保・足立伸次・都木靖彰 「ウニ生殖巣における主要卵黄タンパク質の発現機構解析」平成26年度日本水産学会春季大会，北海道大学函館キャンパス（北海道，函館市），2014年3月30日

〔図書〕（計 0件）

〔産業財産権〕

出願状況（計 0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浦和寛 (URA, Kazuhiro)

北海道大学・大学院水産科学研究院・助教

研究者番号：90360940

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

都木靖彰 (TAKAGI, Yasuaki)

北海道大学・大学院水産科学研究院・教授

研究者番号：10212002

井尻成保 (IJIRI, Shigeho)

北海道大学・大学院水産科学研究院・准教授

研究者番号：90425421