

平成30年 5月29日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07576

研究課題名(和文) 甲殻類の成熟を制御する内分泌系：卵巢由来タンパク質ホルモン群の包括的解析

研究課題名(英文) The endocrine system controlling crustacean reproduction: roles of ovarian hormonal factors

研究代表者

筒井 直昭 (Naoaki, Tsutsui)

岡山大学・理学部・助教

研究者番号：00643785

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：甲殻類の生殖機能は、内分泌中枢の一つである眼柄内のX器官/サイナス腺で作られる卵黄形成抑制ホルモンにより制御されている。一方で、末梢組織に発現するタンパク質/ペプチド性ホルモンの関与についてはこれまでのところほとんど知られていない。本研究課題において、クルマエビ卵巢に発現するホルモン様因子に着目し、その発現や機能等を解析した結果、卵巢型甲殻類雌性ホルモンやニューローパーシン様ペプチドが生殖過程の制御に関わっていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Crustacean reproduction is principally regulated by vitellogenesis-inhibiting hormone from the X-organ/sinus gland neurosecretory system in the eyestalks. On the other hand, the roles of peptide/protein hormones that expressed in peripheral tissues are still unclear. In this study, we focused on hormonal factors of which transcripts were found by the transcriptome analysis of kuruma prawn ovary. Gene expression analysis, histological analysis, and functional analysis using recombinant protein suggested that a few arthropod hormone homologs may be involved in the regulation of reproductive process in the kuruma prawn.

研究分野：農学・水圏応用科学

キーワード：甲殻類 生殖 卵黄形成 ホルモン 増養殖

1. 研究開始当初の背景

甲殻類では、内分泌制御の中枢である眼柄内の X 器官/サイナス腺で産生・分泌される因子が卵黄形成を制御していると考えられてきた。研究代表者は、エビ類を対象としてこの機構の研究を進めてきた。これまでに、クルマエビの卵黄に蓄積される主要なタンパク質 (ピテロジェニン) の遺伝子をクローニングし、その発現が肝臓と卵巣にみられることを示してきた。また、培養した卵巣片においてピテロジェニン遺伝子の発現を抑制する活性、つまり卵黄形成抑制活性を、X 器官/サイナス腺に含まれる複数の甲殻類血糖上昇ホルモン (CHH) 族ペプチドが有していることを明らかにした。

この卵黄形成抑制活性を詳細に検討するために、クルマエビ卵巣の発現遺伝子の網羅的解析を行ったところ、ホルモン様因子をコードする遺伝子が複数見つかった。脊椎動物では、生殖腺が産生するアクチビンやインヒピンといったタンパク質ホルモンについて、生殖腺の機能調節を含む多彩な作用が明らかにされている。一方で、甲殻類におけるそれらはほとんど知られていない状況であった。

2. 研究の目的

本研究課題では、上述した卵巣で発現するホルモン様因子について解析し、これまで未解明であった末梢組織からの成熟制御ネットワークに関する知見を得て、甲殻類の生殖制御機構の全容解明につなげることを目的とした。

3. 研究の方法

クルマエビ卵巣で発現する遺伝子の網羅的解析によって発現が確認された卵巣型甲殻類雌性ホルモン (Maj-CFSH-ov)、新規 CHH 族ペプチド (Maj-pCHH-B)、パーシコンおよびサブユニット (Maj-BursA、Maj-BursB)、ニューロパーシン様ペプチド (Maj-NPLP) について、遺伝子発現解析、組み換えタンパク質作製、組織化学的解析、機能解析等を行い、成熟制御への関与を調べた。また、網羅的解析で得られた配列を用いたホルモン様因子の探索を引き続き行った。

4. 研究成果

(1) 組織特異的発現解析

上述した5つの因子について、各組織における遺伝子発現量を定量的 PCR 法により調べた。Maj-CFSH-ov は卵巣で、Maj-pCHH-B は各神経節と腸で、Maj-BursA および Maj-BursB は胸部神経節と卵巣で、Maj-NPLP は心臓と胸部神経節で、それぞれ高い発現を示した。Maj-CFSH-ov 以外の4因子は卵巣特異的発現を示さず、神経系で主に発現していたが、生殖腺のみの発現量を比較した場合、いずれも卵巣で高い傾向にあった。

(2) 眼柄の卵黄形成抑制因子による発現制御の有無

背景で述べたように、眼柄の X 器官/サイナス腺で作られる複数の CHH 族は、卵巣での卵黄タンパク質発現を抑制する。5種類のホルモン様因子の発現が CHH 族によって制御を受けるかどうかについて、卵黄形成抑制活性を示す CHH 族の一分子種 (Pej-SGP-1) を用いて卵巣培養系において検討した。その結果、Maj-BursA、Maj-BursB、Maj-CFSH-ov については、Pej-SGP-1 添加による発現量の変化は観察されなかった。Maj-pCHH-B の発現量は有意に減少した。Maj-NPLP の発現量にも減少傾向がみられたが、その差は有意ではなかった。Pej-SGP-1 の作用を確認するコントロールとして用いたピテロジェニン遺伝子は、発現量が有意に減少していた。

(3) 組み換えタンパク質の作製

Maj-CFSH-ov、Maj-pCHH-B、Maj-NPLP について、大腸菌発現系を用いた組換えタンパク質の作製を試みた。いずれのタンパク質も3対以上の分子内ジスルフィド結合を含むと予想されるため、可溶化を促進する Nus-tag との融合タンパク質として発現させた。融合タンパク質を発現させた大腸菌の破碎、可溶性画分に含まれるタンパク質の回収、Nus-tag の酵素的切断、高速液体クロマトグラフィーによる精製を経て、組換えタンパク質を得た。質量分析の結果から、作製した組換えタンパク質は、Maj-CFSH-ov で4対、Maj-pCHH-B で3対、Maj-NPLP で6対の分子内ジスルフィド結合を形成していると示唆され、生理活性を有していることが期待された。

また、比較的高い生産が見られた Maj-NPLP の発現系を用いて約 1.5 mg の組換え体を作製し、抗体作製に用いた。Maj-CFSH-ov については、最終的に得られる量が少なかったため、組換え体を抗原とする抗体の作製を諦め、合成ペプチドを抗原とするそれを作製した。

(4) 卵巣のピテロジェニン遺伝子発現に対する組み換えタンパク質の影響

大腸菌を用いて作製した Maj-CFSH-ov、Maj-pCHH-B、Maj-NPLP が、卵巣におけるピテロジェニン発現に影響を与えるかどうかについて、卵巣の培養系を用いて調べた。その結果、Maj-CFSH-ov と Maj-pCHH-B による影響はみられなかった。一方で、Maj-NPLP にはピテロジェニン発現を増加させる活性が観察された。加えて、ショウジョウバエのニューロパーシン受容体のホモログが、クルマエビ卵巣のトランスクリプトームに含まれることも分かった。

(5) Maj-CFSH-ov の発現解析

定量的 PCR 法により、Maj-CFSH-ov の発現は未成熟期より卵黄形成期で高い傾向にあることが示された。Maj-CFSH-ov タンパク質

も同様の変動を示すことがウェスタンブロットティングにより確認された。免疫組織化学染色と *in situ* ハイブリダイゼーションから、Maj-CFSH-ov の発現は、卵黄形成期の卵巣の大部分を占める発達中の卵母細胞ではなく、その周辺に存在する未発達の卵母細胞群で起こっていると考えられた。

(6) その他のホルモン様因子の探索

これまでの網羅的解析で得られたデータについて再解析を行ない、色素拡散ホルモン、羽化ホルモン、SEFL アミドペプチド、インスリン様ペプチドの一部をコードする配列が新たに見出された。このうちインスリン様ペプチドについては、主要な発現組織が卵巣であることが分かった。

(7) CHH の構造と機能

本研究課題で用いている CHH の一分子種、Pej-SGP-1 の前駆体について、構造活性相関に関する基盤的情報を得る目的で X 線結晶構造解析を行った。その結果、Pej-SGP-1 の N 末端側 2/3 の領域は、3 つの ヘリックスと 3 対のジスルフィド結合から構成される特徴的なフォールドを形成する一方、C 末端側 2/3 の領域はフレキシブルな構造であることが明らかとなった。

以上の研究から、クルマエビの卵巣で発現するホルモン様因子のうち、Maj-CFSH-ov は卵黄形成以外の生殖過程に関わると考えられた。Maj-NPLP はピテロジェニン発現を増加させる、すなわち卵黄形成の促進に関わることが示唆された。引き続き、末梢組織で発現するホルモン様因子の解析を行うことにより、甲殻類の生殖制御機構の解明や、それを基にした新たな催熟技術の開発につながると考えられる。

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 4 件)

Tsutsui N, Kotaka S, Ohira T, Sakamoto T (2018). Characterization of distinct ovarian isoform of crustacean female sex hormone in the kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus*. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 217, 7-16. 査読有.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2017.12.009>

Bae S-H, Okutsu T, Tsutsui N, Kang BJ, Chen H-Y, Wilder MN (2017).

Involvement of second messengers in the signaling pathway of vitellogenesis-inhibiting hormone and their effects on vitellogenin mRNA

expression in the whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 246, 301-308. 査読有.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcen.2017.01.006>

Tsutsui N, Sakamoto T, Arisaka F, Tanokura M, Nagasawa H, Nagata K (2016). Crystal structure of a crustacean hyperglycemic hormone (CHH) precursor suggests structural variety in the C-terminal regions of CHH superfamily members. *FEBS J.* 283, 4325-4339. 査読有.
doi:10.1111/febs.13926

Ushimi H, Miyatake Y, Tsutsui N, Sakamoto T, Nakata K (2015). Artificial burrow sizes used for capturing the North American invasive crayfish *Procambarus clarkii*. *Ecology and Civil Engineering* 18, 79-86. 査読有.
<https://doi.org/10.3825/ece.18.79>

[学会発表](計 13 件)

筒井直昭, 坂本竜哉. クルマエビの卵巣で発現するペプチドホルモン様因子. 第 42 回日本比較内分泌学会大会, 2017 年 11 月 18 日, 奈良女子大学 (奈良県奈良市).

甲高彩華, 筒井直昭, 大平剛. クルマエビの甲殻類雌性ホルモンの周年変動. 第 42 回日本比較内分泌学会大会, 2017 年 11 月 18 日, 奈良女子大学 (奈良県奈良市).

Tsutsui N, Kotaka S, Ohira T, Kobayashi Y, Sakamoto T. The search for hormone-like transcripts expressed in the prawn ovary using next generation sequencing. 14th International Congress on Invertebrate Reproduction and Development. August 2017, Napoli/Firenze (Italy).

Hanazuka M, Tsutsui N, Ohira T. Isolation and cDNA cloning of molt-inhibiting hormone (MIH) from the southern rough shrimp *Trachysalambria curvirostris*. The Crustacean Society Mid-Year Meeting, June 2017, Barcelona (Spain).

甲高彩華, 筒井直昭, 大平剛. 2 種類のクルマエビ甲殻類雌性ホルモンの産生細胞の局在解析. 第 19 回マリンバイオテクノロジー学会大会, 2017 年 6 月 3

日，東北大学（宮城県仙台市）。

花塚真史，筒井直昭，大平剛．サルエ
ビ脱皮抑制ホルモンの精製、構造決定お
よび cDNA クローニング．第 19 回マリ
ンバイオテクノロジー学会大会，2017
年 6 月 3 日，東北大学（宮城県仙台市）。

Kotaka S, Tsutsui N, Ohira T.
Localization of two crustacean female
sex hormones in the kuruma prawn
Marsupenaeus japonicus. The 28th
Conference of European Comparative
Endocrinologists, August 2016, Leuven
(Belgium).

他 6 件

〔図書〕(計 1 件)

Tsutsui N (2015). Ion Transport
Peptide. In Handbook of Hormones (Eds
Takei Y, Ando H, Tsutsui K), Elsevier,
Netherlands, 405-406. (ISBN:
9780128010280)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

筒井 直昭 (TSUTSUI NAOAKI)
岡山大学・理学部附属臨海実験所・助教
研究者番号：00643785

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

奥村 卓二 (OKUMURA TAKUJI)
国立研究開発法人水産研究・教育機構・増
養殖研究所・主幹研究員
研究者番号：30372030

(4)研究協力者

なし