

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 25 日現在

機関番号：32702

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07947

研究課題名(和文) 造雄腺ホルモンによる甲殻類の性転換誘導機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of sex reversal by androgenic gland hormone in crustaceans

研究代表者

大平 剛 (Ohira, Tsuyoshi)

神奈川大学・理学部・教授

研究者番号：10361809

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：アメリカザリガニの造雄腺ホルモンをコードするcDNAを単離し、アメリカザリガニ造雄腺ホルモンのアミノ酸配列を明らかにした。次いで、アメリカザリガニ造雄腺ホルモンを化学合成した。そして、合成造雄腺ホルモンを、アメリカザリガニの近縁種で単為生殖する全雌のザリガニ(以下、ファラクス)に週1回の頻度で14回注射した。注射を開始してから20週目に雌性生殖孔が消失し、第1腹肢が雄性化したファラクスが見出された。生殖腺を観察したところ、精巣と輸精管が確認された。その個体の生殖腺を組織形態学的に観察したところ、精原細胞や精子形成が確認された。ホルモン処理による完全な性転換の誘導は、本研究が世界最初の例である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エビやカニなどの十脚類は成長速度や消費者の好みなどの面で雌雄に差があるため、単性養殖技術の確立が求められている。造雄腺ホルモンの作用機構は性統御技術に応用できるため、世界的に発展するエビ養殖に利用しようとする国際的な研究競争が激しくなっている。しかし、これまでに造雄腺ホルモン投与によりエビやカニなどの十脚類を性転換させた例はなかった。そのため、本研究がホルモン処理により性転換を誘導した世界初の報告例であり、他国に先駆けてエビ養殖に性統御技術を導入することが可能になった。本研究の成果は、甲殻類の単性養殖へ向けた応用研究の基礎となることから、その波及効果は非常に大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The cDNA encoding an androgenic gland hormone was cloned from the American crayfish *Procambarus clarkii* and subsequently its amino acid sequence was deduced. Then, the androgenic gland was chemically synthesized. The synthesized androgenic gland hormone was injected at once a week for a total of 14 times into the marbled crayfish *Procambarus fallax f. virginalis* which is a closely related species of *P. clarkii* and all-female population. Twenty weeks after the start of injection, the female gonopore of the injected individual disappeared and the first abdominal limb of the animal became male. This individual had the testis and the vas deferens in the body. The spermatogonia and sperm were observed in the testis by the histochemical staining. This study is the first report of the induction of complete sex reversal by the hormone treatment.

研究分野：魚介類生理学

キーワード：造雄腺ホルモン 甲殻類 アメリカザリガニ 化学合成

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 甲殻類の性分化は雄に特異的な内分泌器官である造雄腺で合成される造雄腺ホルモンにより制御されている。これまでに、研究代表者の属するグループは、甲殻類等脚目に属するオカダンゴムシを実験材料に用いて造雄腺ホルモンの精製、構造解析、cDNA クローニングを進めてきた。そして2002年には、オカダンゴムシ造雄腺ホルモンの組換え体を作製して、それを若い雌のダンゴムシに投与し、雌から雄への性転換を誘導することに成功した。一方、十脚目の造雄腺ホルモンの探索は永らく暗中模索であったが、2007年にザリガニの一種 (*Cherax quadricarinatus*) にダンゴムシの造雄腺ホルモンと類似性を示す分子が存在すると報告された。その配列を参考にして、研究代表者の属するグループは、テナガエビ科のエビ類やクルマエビの造雄腺ホルモンをコードする cDNA を単離してきた。そして、*in vitro* の生物検定系で、雌特異的なタンパク質の発現を抑制するクルマエビ造雄腺ホルモンの化学合成に成功した。しかし、この合成造雄腺ホルモンをクルマエビの稚エビに投与しても、性転換を誘導することには成功しなかった。原因は、性分化前の雌の稚エビのみを選別することができなかったためである。この問題を解決するために、本研究では単為生殖する全雌のザリガニ (以下、ファラクス) *Procambarus fallax f. virginalis* を実験材料に用いて実験を行うことにした。

(2) 前述したように、研究代表者は生物造活を有するクルマエビ造雄腺ホルモンの化学合成には成功したが、性転換の誘導には成功していない。このような状況の中、単為生殖する全雌のファラクスに、近縁種のアメリカザリガニの造雄腺を移植すると雄性化することが報告された。2016年度、研究代表者自身も同様の実験を行い、ファラクスが雄性化することを確認した。これらの結果は、ファラクスにアメリカザリガニ造雄腺ホルモンの感受性があることを示している。本研究では、これまでの研究代表者の経験を活かして活性型のアメリカザリガニ造雄腺ホルモンを化学合成し、それをファラクスに投与することで完全な性転換を誘導することにした。

2. 研究の目的

オカダンゴムシでは性分化前の若い雌に造雄腺ホルモンを投与すると、雌から雄への性転換を誘導できる。一方、エビやカニなどの十脚類では、造雄腺ホルモン投与による性転換の誘導に成功した例はない。そこで本研究では、活性型の造雄腺ホルモンを化学合成すること、化学合成した造雄腺ホルモンを若いファラクスに投与して性転換を誘導することを目的とする。そして最終的に、性転換に関わる分子基盤を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) アメリカザリガニ造雄腺ホルモンをコードする cDNA の単離

アメリカザリガニの造雄腺から total RNA を抽出し、first strand cDNA を合成した。既知の造雄腺ホルモンの配列を参考にしてプライマーを設計し、RT-PCR によりアメリカザリガニ造雄腺ホルモンの cDNA 断片を増幅した。そして、RACE 法により全長のアメリカザリガニ造雄腺ホルモンの cDNA を増幅して、全塩基配列を明らかにした。

(2) アメリカザリガニ造雄腺ホルモンの化学合成

研究代表者は、活性型のクルマエビ造雄腺ホルモンを化学合成した経験を有している。その合成法を利用し、アメリカザリガニ造雄腺ホルモンを化学合成した。

(3) 合成アメリカザリガニ造雄腺ホルモンのファラクスへの投与実験

平均体長が 26 mm のファラクスに、化学合成したアメリカザリガニ造雄腺ホルモンを 1 µg/g 体重となるように投与した。投与に用いた個体数は 27 尾で、週 1 回の頻度で 14 回注射を行なった。対照群には生理食塩水を注射した。注射後のファラクスは個別飼育し、生存数と脱皮の有無を記録した。脱皮した個体は外部形態によって、雄性化の有無を確認した。外部形態が雄性化した個体は解剖して生殖腺の組織形態を観察した。

4. 研究成果

(1) アメリカザリガニ造雄腺ホルモンをコードする cDNA の単離

本研究で単離した cDNA は、25 残基のシグナルペプチド、38 残基の B 鎖、4 残基のプロセシングシグナル、94 残基の C ペプチド、4 残基のプロセシングシグナル、45 残基の A 鎖からなるアメリカザリガニ造雄腺ホルモン前駆体をコードしていた。アメリカザリガニ造雄腺ホルモンはインスリンファミリーのメンバーであり、B 鎖と A 鎖からなる 2 本鎖ペプチドであることが明らかとなった。

(2) アメリカザリガニ造雄腺ホルモンの化学合成

上述した「アメリカザリガニ造雄腺ホルモンをコードする cDNA の単離」により、アメリカザリガニ造雄腺ホルモンは 8 個のシステイン残基を含み、4 対のジスルフィド結合を有すると推定された。アメリカザリガニ造雄腺ホルモンはインスリンファミリーのメンバーであったため、化学合成したアメリカザリガニ造雄腺ホルモンのジスルフィド結合の架橋様式は脊椎動物のインスリンと同じにした。

(3) 合成アメリカザリガニ造雄腺ホルモンのファラクスへの投与実験

化学合成したアメリカザリガニ造雄腺ホルモンをファラクスに注射をした。14 週間にわたり注射実験を実施した結果、20 週目に雌性生殖孔が消失し、第 1 腹肢が雄性化した個体が見出された(図 1)。解剖して生殖腺を観察したところ、アメリカザリガニ造雄腺ホルモン投与群の個体にのみ精巣と輸精管が観察された(図 1)。その個体の生殖腺を組織形態学的に観察したところ、精原細胞や精子形成が確認された(図 1)。このことから、アメリカザリガニ造雄腺ホルモンをファラクスに投与すると外部形態と内部形態が雄性化することが分かった。

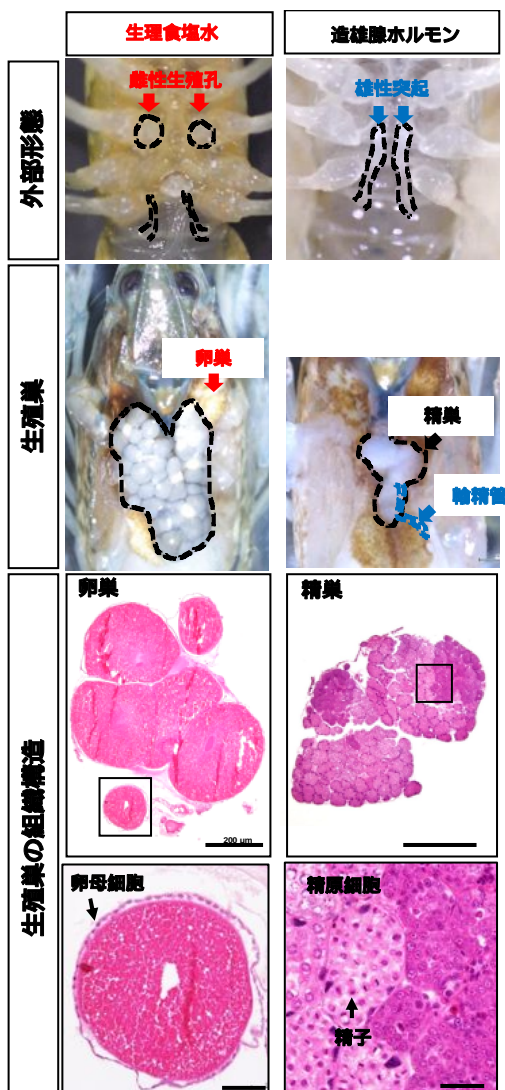


図 1. 生理食塩水を投与した個体とアメリカザリガニ造雄腺ホルモンを投与した個体の外部形態、生殖腺、生殖腺の組織構造

<引用文献>

A. Okuno, Y. Hasegawa, M. Nishiyama, T. Ohira, et al. (2002) Preparation of an active recombinant peptide of crustacean androgenic gland hormone. *Peptides*, 23, 567-572.

R. Manor, et al. (2007) Insulin and gender: an insulin-like gene expressed exclusively in the androgenic gland of the male crayfish. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 150, 326-336.

K. Banzai, S. Izumi, T. Ohira (2012) Molecular cloning and expression analysis of cDNAs encoding insulin-like androgenic gland factor from three palaemonid species, *Macrobrachium lar*, *Palaemon paucidens* and *P. pacificus*. *Jpn. Agric. Res. Q.*, 46, 105-114.

K. Banzai, N. Ishizaka, K. Asahina, K. Suitoh, S. Izumi, T. Ohira (2011) Molecular cloning of a cDNA encoding insulin-like androgenic gland factor from the kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus* and analysis of its expression. *Fish. Sci.*, 77, 329-335.

H. Katayama, N. Kubota, H. Hojo, A. Okada, S. Kotaka, N. Tsutsui, T. Ohira (2014) Direct evidence for the function of crustacean insulin-like androgenic gland factor (IAG): Total chemical synthesis of IAG. *Bioorg. Med. Chem.*, 22, 5783-5789.

M. Kato, et al. (2015) Androgenic gland implantation induces partial masculinization in marmorkrebs *Procambarus fallax f. virginialis*. *Zool. Sci.*, 32, 459-464.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田中陽菜、豊田賢治、片山秀和、大平剛
2. 発表標題 アメリカザリガニのインスリン様造雄腺因子の生理機能解析
3. 学会等名 第44回日本比較内分泌学会大会埼玉大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	馬久地 みゆき (Mekuchi Miyuki) (40594007)	国立研究開発法人水産研究・教育機構・中央水産研究所・主任研究員 (82708)	