

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20380115

研究課題名(和文) 重要水産無脊椎動物からのゴナドトロピン放出ホルモンの同定とその機能解明

研究課題名(英文) Gonadotropin-releasing hormone in important marine invertebrates

研究代表者

天野 勝文 (AMANO MASAFUMI)

北里大学・海洋生命科学部・教授

研究者番号：10296428

研究成果の概要(和文)：脊椎動物の生殖において重要な役割をもつゴナドトロピン放出ホルモン(GnRH)の無脊椎動物における分布と機能について調べた。ホルモンの存在部位を明らかにできる組織化学的研究で、ウスヒラムシ(扁形動物門渦虫綱)、アオゴカイ(環形動物門多毛綱)、アメリカカブトエビ(節足動物門鰓脚綱)、ニホンコツブムシ(節足動物門軟甲綱)、ヒザラガイ(軟体動物門多板綱)、アサリ、ヤマトシジミ(軟体動物門二枚貝綱)など広範な動物門の神経節においてGnRHが検出された。さらに、生化学的な解析においてもクルマエビ、エゾアワビ(軟体動物門腹足綱)やヒザラガイなどでGnRHが検出された。以上の結果は、GnRHが水産無脊椎動物に広く分布することを示す。

研究成果の概要(英文)：The distribution and function of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in important marine invertebrates were examined by immunohistochemistry and by reverse-phase high performance liquid chromatography (rpHPLC) combined with time-resolved fluoroimmunoassay (TR-FIA) analysis. GnRH-immunoreactive cell bodies and fibers were detected in various species such as flatworm, clam worm, *Triops longicaudatus*, chiton and corbicula by immunohistochemistry. GnRH was also detected by HPLC combined with TR-FIA in the kuruma prawn, Pacific abalone, and chiton. These results indicate that GnRH distributes throughout wide range of invertebrates.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	9,400,000	2,820,000	12,220,000
2009年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2010年度	2,600,000	780,000	3,380,000
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：水族生理学

科研費の分科・細目：水産学一般

キーワード：水産無脊椎動物, ゴナドトロピン放出ホルモン, 免疫組織化学, 時間分解蛍光免疫測定法, HPLC

1. 研究開始当初の背景

動物は自然環境に適応しながら効率的に生殖を行って種を保存する。ゴナドトロピン放出ホルモン(GnRH)は哺乳類の生殖を最上位で制御するホルモンとして1970年代初めに発見された。GnRHはアミノ酸10個の神経ペプチドである。GnRHは脳の視床下部に存在する細胞体で合成され、脳下垂体に達してゴナドトロピン(GTH)放出を促進し、生殖腺の発達を進める。その後、比較生物学的観点から脊椎動物のGnRHについて精力的に研究が行われた。まず、アミノ酸配列が一部異なるGnRH分子がニワトリ、カエル、サケ、メダカ、サメ、ヤツメウナギなどから次々と発見された。さらに、同一動物種の脳内に2あるいは3種類のGnRH分子種が存在すること、一部のGnRHは神経線維を視床下部-脳下垂体系ではなく脳全体に広範囲に投射することもわかった。このように、脊椎動物ではGnRHは動物種を超えて広く存在することが明らかとなった。さらに、従来知られていたGTH放出を促進するGnRHの他に、脳内で神経修飾物質として機能するGnRHも存在することがわかった。

無脊椎動物は種としては地球上の生物の約96%を占める大きな生物群である。無脊椎動物においても原索動物門のホヤと軟体動物門のタコから、脊椎動物のGnRHと構造の類似する新規のGnRHが同定された。さらに無脊椎動物の数動物門においてGnRHの存在が免疫組織染色などで推定されている。これらのことから、「GnRHの起源は非常に古く、海綿動物など原始的な多細胞生物が進化したときに獲得され、その後の進化の過程で機能分化してきた」と考えられる。このようなGnRH分子進化の仮説を検証するためには、無脊椎動物のGnRHについて系統的かつ網羅的に検証する必要があるとの着想を得た。

2. 研究の目的

重要水産無脊椎動物におけるGnRHの系統の網羅的解析を免疫組織化学を用いて行う。さらに重要水産無脊椎動物のGnRH分子種の同定とその生理機能の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) 水産無脊椎動物におけるGnRHの系統の網羅的解析

三陸沿岸で水産無脊椎動物を入手した。サンプルを固定後、パラプラスチックに包埋し、ミクロトームで薄切切片を作製した。そして免疫組織染色法でGnRHを組織学的に検出した。1次抗体には、脊椎動物の既知のGnRHの共通アミノ酸部分を認識する抗GnRHマウスモ

ノクローナル抗体(LRH13)を主に用い、さらに脊椎動物に広範囲に存在するニワトリII型GnRH(cGnRH-II)抗体、およびタコ型GnRH(octGnRH)抗体も併用した。

(2) 重要水産無脊椎動物におけるGnRH分子種の同定とその生理機能の解明

免疫組織化学でGnRH免疫陽性反応が観察されたクルマエビ、エゾアワビ、ヒザラガイ、ヤリイカおよびマダコの中樞神経系を多数採取し、そこからGnRHをアセトン抽出した。GnRH標準品を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)に付して溶出時間を確認した。次にサンプル抽出物をHPLCに付し、フラクション中のGnRH量を時間分解蛍光免疫測定(TR-FIA)法で測定した。そしてGnRH標準品の溶出時間と照合してGnRH分子種を推定した。

クルマエビの中樞神経系には、ヤツメウナギII型GnRH(lamprey GnRH-II)様ペプチドが存在することが示唆されたため、クルマエビ卵巣に対するGnRHの生理作用を*in vitro*で調べた。未熟個体の卵巣を摘出して細片(数mg)にし、GnRH含有培養液とともに20°Cで24時間インキュベートした。インキュベート後の卵巣片中のピテロジェニン(Vg)mRNAをone step RT-PCRで測定した。

タコ型GnRH(octGnRH)の機能を解明する基礎として、octGnRHの時間分解蛍光免疫測定法を確立した。マイクロプレートに第2抗体で固相化し、BSAでブロッキングした。これに抗octGnRH抗体、標準試料または未知試料、およびビオチン標識octGnRHを添加して競合反応させた。さらにユーロピウム(Eu)標識ストレプトアビジンを添加し、最後に増強試薬を加えてEuを遊離させて蛍光強度を測定した。

4. 研究成果

(1) 水産無脊椎動物におけるGnRHの系統の網羅的解析

ウスヒラムシ(扁形動物門渦虫綱)の脳神経節、およびアオゴカイ(環形動物門多毛綱)の脳神経節と咽頭下神経節において、octGnRH免疫陽性細胞体と繊維が検出された。アメリカカブトエビ(節足動物門鰓脚綱)の脳神経節と胸部神経節においてcGnRH-II免疫陽性細胞体と繊維が検出された。さらに、ニホンコツブムシ(節足動物門軟甲綱)においてcGnRH-II免疫陽性反応が検出された。ヒザラガイ(軟体動物門多板綱)の脳口球神経環、歯舌下神経節、足神経幹、側神経幹、足神経横連合においてcGnRH-IIおよびGnRH免疫陽性細胞体と繊維が検出された。ヤマトシジミ(軟体動物二枚貝綱)の脳神経節、足神経節および内臓神経節においてもcGnRH-II

免疫陽性反応が検出されたが、生殖腺には免疫陽性反応は検出されなかった。

マダコ（軟体動物門頭足綱）の脳およびアサリ（軟体動物門二枚貝綱）の脳神経節において、cGnRH-IIとoctGnRH免疫陽性反応を二重免疫組織化学で染め分けることができたことから、両種には複数のGnRH様ペプチドが存在することが示唆された。

（2）重要水産無脊椎動物におけるGnRH分子種の同定とその生理機能の解明

HPLCと時間分解蛍光免疫測定法を併用した実験によって、クルマエビ（節足動物門）の脳と眼柄、エゾアワビ（軟体動物門腹足綱）の脳神経節、およびヤマトシジミの神経節にlamprey GnRH-II様ペプチドが存在することが示唆された。ヒザラガイの頭部には、lamprey GnRH-II様ペプチドおよび未知のGnRH様ペプチドが存在することが示唆された。同様の方法により、ヤリイカとマダコの脳には、octGnRH様ペプチドの他にホヤI型GnRH(tGnRH-I)様ペプチドも存在することが示唆された。

クルマエビ卵巣に対するGnRHの効果調べた結果、octGnRH、lamprey GnRH-II、cGnRH-IIは効果がなく、哺乳類型GnRH(mGnRH)は発現を抑制、アメフラシ型GnRH(apGnRH)は発現を促進するという予備的データが得られた。

octGnRH濃度0.31ng/mlから40ng/mlの間で標準曲線が得られた。アッセイ内・アッセイ間変動係数および最小検出量はそれぞれ6.8%(n=10)および2.7%(n=5)、4.9pg/mlであった。ヤリイカ、ケンサキイカおよびミズダコの脳抽出物の競合曲線は標準曲線と平行になった。以上より、本測定系が頭足類のoctGnRHの測定に有効であることが示唆された。

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5件）

① Amano M, Yokoyama T, Amiya N, Hotta M, Takakusaki Y, Kado R, Oka Y. (2010). Biochemical and immunohistochemical analyses of GnRH-like peptides in the nerve ganglion of the chiton, *Acanthopleura japonica*. *Zoological Science* 27, 924-930. (査読あり)

② Amano M, Moriyama S, Okubo K, Amiya N, Takahashi A, Oka Y. (2010). Biochemical and immunohistochemical analyses of a GnRH-like peptide in the neural ganglia of the Pacific abalone *Haliotis discus hannai* (Gastropoda). *Zoological Science* 27,

656-661. (査読あり)

③ Amano M. (2010). Reproductive biology of salmoniform and pleuronectiform fishes with special reference to gonadotropin-releasing hormone (GnRH). *Aqua-BioScience Monographs* 3, 39-72. (査読あり)

④ Amano M, Okumura T, Okubo K, Amiya N, Takahashi A, Oka Y. (2009). Biochemical analysis and immunohistochemical examination of a GnRH-like immunoreactive peptide in the central nervous system of a decapod crustacean the kuruma prawn (*Marsupenaeus japonicus*). *Zoological Science* 26, 840-845. (査読あり)

⑤ Amano M, Pham KX, Amiya N, Yamanome T, Yamamori K. (2008). Changes in brain seabream GnRH mRNA and pituitary seabream GnRH peptide levels during ovarian maturation in female barfin flounder. *General and Comparative Endocrinology* 158, 168-172. (査読あり)

〔学会発表〕（計3件）

① 阿見彌典子・横山雄彦・鍵谷照紀・高草木葉子・沼口志希・天野勝文。ヤマトシジミにおけるGnRH様ペプチドのHPLCおよび免疫組織化学による検出，日本水産学会，2011年3月30日，東京海洋大学。

② 天野勝文・横山雄彦・堀田峰加・高草木葉子・阿見彌典子・加戸隆介・岡良隆。多板綱ヒザラガイにおけるGnRH様ペプチドのHPLCおよび免疫組織化学による検出，日本水産学会，2010年9月22日，京都大学。

③ 天野勝文・奥村卓二・大久保範聡・阿見彌典子・高橋明義・岡良隆。クルマエビにおけるGnRH様ペプチドのHPLCおよび免疫組織化学による検出，日本水産学会，2010年3月29日，日本大学。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

天野 勝文 (AMANO MASAFUMI)
北里大学・海洋生命科学部・教授
研究者番号：10296428

(2) 研究分担者

高橋 明義 (TAKAHASHI AKIYOSHI)
北里大学・海洋生命科学部・教授
研究者番号：10183849

加戸 隆介 (KADO RYUSUKE)

北里大学・海洋生命科学部・教授
研究者番号：40161137

奥村 卓二 (OKUMURA TAKUJI)
独立行政法人水産総合研究センター・その他
他部局等・チーム長
研究者番号：30372030

(3)連携研究者

なし