

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年4月26日現在

機関番号：12604

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21570063

研究課題名（和文）新規に同定したヒトデ生殖巣刺激ホルモンによる卵成熟誘起機構の研究

研究課題名（英文）Study of mechanism in starfish oocyte maturation induced by a novel identified gonad-stimulating hormone

研究代表者

三田 雅敏 (MITA MASATOSHI)

東京学芸大学・教育学部・教授

研究者番号：50190674

研究成果の概要（和文）：本研究の成果として、ヒトデの生殖巣刺激ホルモン（GSS）は、放射神経の管足側周辺の支持細胞で合成され、その分泌には、細胞内  $Ca^{2+}$  が関与していることが明らかになった。さらに、GSS は卵黄形成期の卵濾胞細胞に対して 1-メチルアデニン(1-MeAde)生産を誘起しないことを見出し、これは GSS 受容体に関連する促進系 G-protein の欠損によるものであることを明らかにした。卵成熟期にかけ、濾胞細胞の GSS に対するシグナル情報伝達系が完成するものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：According to *in situ* hybridization, gonad-stimulating hormone (GSS) newly identified in starfish was synthesized in supporting cells in the peripheral area of radial nerves proximal to the tube feet. Its secretion was induced by increase in levels of intracellular  $Ca^{2+}$ . This study also showed that GSS failed to induce 1-methyladenine (1-MeAde) and cAMP production by follicle cells obtained from ovaries in growing stage (stage IV), though GSS acted on 1-MeAde production mediated through the production of cAMP by follicle cells in fully grown stage (stage V). Since  $Gs\alpha$  was not detected immunologically in follicle cell membranes of stage IV, the failure of GSS to produce 1-MeAde is possible to be because of a lack of Gs-proteins in follicle cells at stage IV.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・形態・構造

キーワード：生殖巣刺激ホルモン、リラキシン、シグナル情報伝達機構、卵成熟、ヒトデ、

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトデをモデルとした卵成熟誘起機構の研究は、1-メチルアデニン(1-MeAde)が他の動物に先駆け卵成熟誘起ホルモンとして故金谷晴夫

博士により同定されて以来、多細胞動物における配偶子成熟機構を明らかにするための優れた実験モデルとして、国内外で広く行われてきた。一方、生殖巣刺激ホルモン(GSS)については、

その存在が 1-MeAde 以前の 1959 年に確認されていたにもかかわらず、正確な化学構造は明らかにされていなかった。発見から約 50 年経った今、申請者は長濱嘉孝博士・吉国道庸博士(当時、基礎生物学研究所)と磯部 稔博士(当時、名古屋大学大学院)等との共同研究により、イトマキヒトデ放射神経から GSS の精製に成功し、A 鎖、B 鎖からなる 2 量体ペプチドであることを解明した。これにより、ヒトデの GSS をモデルとして、無脊椎動物では初めて生殖腺刺激ホルモンの視点から卵の最終成熟制御機構を解明できる、との着想に至った。

## 2. 研究の目的

卵成熟は、未成熟な卵がホルモンの刺激を受けて減数分裂を再開し、受精可能になる過程である。ヒトデは無脊椎動物の中で、唯一卵成熟誘起機構の研究が進んだモデル生物である。しかし、これまで卵成熟の最初の引き金となる GSS の実体が不明であったため、ヒトデの卵成熟誘起機構の研究において大きな支障となっていた。

申請者は最近、イトマキヒトデの放射神経から GSS を精製し、その化学構造を決定することに成功した。本研究は、ヒトデをモデルに卵の最終成熟制御機構を解明することを目的とし、具体的に、GSS の合成・分泌・作用機構について研究をおこない、生殖生物学の研究基盤を確立する。

## 3. 研究の方法

### (1) ヒトデ生殖巣刺激ホルモン(GSS)の合成

*In situ hybridization* と免疫組織学的手法を用いて、放射神経に存在する GSS 産生細胞を特定する。具体的に、GSS に対する特異的プローブを作成し、放射神経の切片に対して *in situ hybridization* を行い、GSS の mRNA を発現している細胞の特定をおこなった。また、GSS の A 鎖および B 鎖に対するポリクローナル抗体を作成し、免疫組織学的手法からも GSS 産生細胞の特定を試みた。

### (2) ヒトデ生殖巣刺激ホルモン(GSS)の分泌

GSS 分泌に対する細胞内  $Ca^{2+}$  の影響および神経伝達物質等による GSS 分泌誘起作用を解析する。細胞内  $Ca^{2+}$  の上昇はカルシウムイオノフォアであるイオノマイシンを用い、神経伝達物質には、セロトニン、メチオニン、アセチルコリンを用いた。操作は、単離したイトマキヒトデの放射神経をイオノマイシ

ンあるいは上記神経伝達物質を含むメディアウム中でインキュベートした後、分泌された GSS について、合成 GSS を標準物質として、放卵によるバイオアッセイにより定量した。

### (3) ヒトデ生殖巣刺激ホルモン(GSS)の作用機構

作用機構として、GSS の卵濾胞細胞に対する影響について、特にシグナル情報伝達系(受容体/G-protein/アデニル酸シクラーゼ系)に注目した。具体的に、卵濾胞細胞による 1-MeAde 生産は、GSS に刺激があれば、いつでも誘起されるのかどうか、明らかにするために、卵黄形成期と繁殖期の卵濾胞細胞を調整した。GSS 受容体の性質については、125 ヨード化 GSS を作成し、非標識 GSS との競合実験を行った後、スクヤチャード解析により求めた。各 G-protein のサブユニットについては、濾胞細胞の膜画分を SDS-PAGE し、ブロッティング後、市販の G-protein 特異的抗体を用いて検出した。また、アデニル酸シクラーゼ活性は ATP を基質として、GSS の存在下または非存在下でインキュベートした後、生産された cyclicAMP 濃度を市販の EIA kit により定量し、活性を求めた。

## 4. 研究成果

3 年の研究期間内で、ほぼ期待通り研究が進展し、新たな重要な知見が得られた。これらの成果は、7 報の雑誌論文として発表し、20 報の学会発表を行った。

### (1) ヒトデ生殖巣刺激ホルモン(GSS)の合成

*In situ hybridization* の結果、GSS はイトマキヒトデ放射神経において、管足側に近い表面の支持細胞でポジティブなシグナルが観察される(図1)、この支持細胞で GSS は産生されている可能性を強く示唆した。

一方、GSS の A 鎖および B 鎖に対するポリクローナル抗体を作成したが、これら抗体は GSS 分子を認識できなかった。そのため、免疫組織学的に GSS 産生細胞を特定することはできなかった。今後、GSS 分子を認識する特異的抗体を作成し、再検討する必要がある。

しかし、A 鎖抗体および B 鎖抗体が GSS を認識できなかったことから、A 鎖・B 鎖間にジスルフィド結合を形成することで、GSS 分子は特徴的な立体構造を形成することが予想され、この二量体構造が受容体との結合に重要である可能性がある。

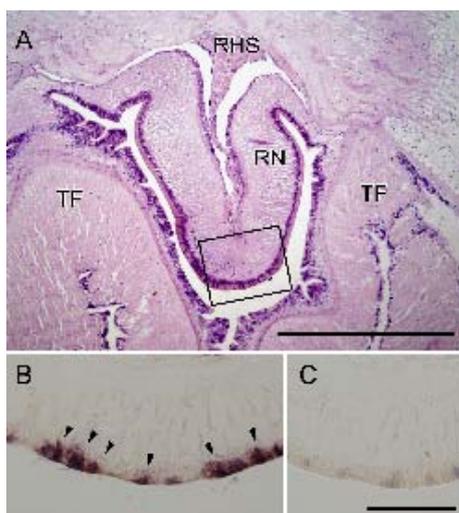


図1. *In situ* hybridizationによるヒトデ放射神経におけるGSS mRNAの分布。A. HE染色、B. アンチセンスプローブによる染色、C. センスプローブによる染色。TF: 管足、RHS: 放射血洞、RN: 放射神経。バーは100  $\mu$ m。

## (2) ヒトデ生殖巣刺激ホルモン(GSS)の分泌

イトマキヒトデの放射神経をイオノマイシンで処理したところ、メEDIUM中にGSSが検出された。このことから、GSSの分泌に細胞内カルシウムが関与していることが強く示唆された。一方、放射神経をセロトニン、メチオニン、アセチルコリンで処理してもGSSの分泌は認められなかった。従って、細胞内Ca<sup>2+</sup>レベルを上昇させ、GSS分泌を促すリガンドについては、未だ不明であり、今後の課題である。

## (3) ヒトデ生殖巣刺激ホルモン(GSS)の作用機構

GSSの作用機構として、卵黄形成期(ステージIV)と卵成熟期(ステージV)の卵巣から調整した卵濾胞細胞にGSSを作用させたところ、ステージIVの濾胞細胞では、GSSによる1-MeAde生産が見られなかった。今回の研究の成果として、ステージIVの濾胞細胞には、促進系G-protein(Gs)の $\alpha$ サブユニットが存在しないことが明らかになった(図2)。一方、ステージVの濾胞細胞と同様にステージIVの濾胞細胞にもGSS受容体やアデニル酸シクラーゼ活性、また抑制系G-protein(Gi $\alpha$ )およびG $\beta$ は確認されたことから、ステージIVからステージVにかけて、G $\alpha$ が合成され、

GSSに対する情報伝達系が完成し、1-MeAde生産が可能になると思われる。

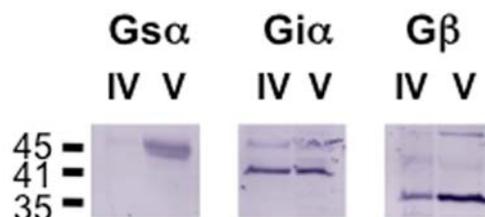


図2. ヒトデ卵濾胞細胞のG-protein抗体による免疫プロテイング。ステージIVとVの濾胞細胞膜をSDS-PAGEし、プロテイング後、G $\alpha$ 、Gi $\alpha$ 、G $\beta$ 抗体により免疫染色を行った。

## 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7件)

- ① Masatoshi Mita, Kazuyoshi Yamamoto, Masaru Nakamura, Yuki Takeshige, Miho Watanabe, and Yoshitaka Nagahama, 2012, Participation of Gs-proteins in the action of relaxin-like gonad-stimulating substance (GSS) for 1-methyladenine production in starfish ovarian follicle cells, *Gen. Comp. Endocrinol.*, 査読有, Vol176, P432-437
- ② Masatoshi Mita, Kazutoshi Yamamoto, and Yoshitaka Nagahama, 2011, Interaction of relaxin-like gonad-stimulating substance with ovarian follicle cells of the starfish *Asterina pectinifera*, *Zool. Sci.*, 査読有, Vol28, P764-769
- ③ Masatoshi Mita, Kazutoshi Yamamoto, Masaru Nakamura, and Yoshitaka Nagahama, 2011, Hormonal action of relaxin-like gonad-stimulating substance (GSS) on starfish ovaries in growing and fully grown states, *Gen. Comp. Endocrinol.*, 査読有, Vol172, P85-89
- ④ Andre P. Seal, Masatoshi Mita, Tetsuya Hirano, and Gordon E. Grau, 2011, Involvement of the cAMP messenger system and extracellular Ca<sup>2+</sup> during hyposmotically-induced prolactin release in the Mozambique tilapia, *Gen. Comp. Endocrinol.*, 査読有, Vol170, P401-407
- ⑤ 三田雅敏, 2010, ヒトデのリラキシン様生殖巣刺激ホルモン、gonad-stimulating substance (GSS) による卵成熟誘起作用、

比較内分泌学、査読有、Vol26、PP127-133

⑥ **Masatoshi Mita**, Michiyasu Yoshikuni, Kaoru Ohno, Yasushi Shibata, Bindhu Paul-Prasanth, Suthasinee Pitchayawasin, Minoru Isobe, and Yoshitaka Nagahama, 2009, A relaxin-like peptide purified from radial nerves induces oocyte maturation and ovulation in the starfish, *Asterina pectinifera*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 査読有, Vol106, P9507-9512

⑦ **Masatoshi Mita**, Chika Ito, Eri Kubota, Yoshitaka Nagahama, and Yasushi Shibata, 2009, Expression and distribution of gonad-stimulating substance in various organs of the starfish *Asterina pectinifera*. Ann. N. Y. Acad. Sci., 査読有, Vol1163, P472-474

[学会発表] (計20件)

① **Masatoshi Mita**, Hormonal action of relaxin-like gonad-stimulating substance (GSS) for 1-methyladenine production in starfish ovarian follicle cells, The 7<sup>th</sup> Asia and Oceania Society for Comparative Endocrinology Congress, 2012年3月5日, Sunway Resort Hotel & Spa (Kuala Lumpur, Malaysia)

② **三田雅敏**, オニヒトデの生殖巣刺激ホルモン(GSS)、シンポジウム：沖縄における水棲動物生殖の基礎と応用、2011年12月10日、海洋博覧会記念公園管理財団総合研究センター (沖縄県)

③ 渡辺美秀、山本和俊、**三田雅敏**、ヒトデ卵濾胞細胞の  $Ca^{2+}$  欠如海水処理に伴う生殖巣刺激ホルモン(GSS)に対する応答の消失、第36回日本比較内分泌学会大会、2011年11月23日、都道府県会館 (東京都)

④ 竹重友貴、山本和俊、**三田雅敏**、イトマキヒトデ卵濾胞細胞の生殖巣刺激ホルモン(GSS)に対するシグナル情報伝達系について、第36回日本比較内分泌学会大会、2011年11月23日、都道府県会館 (東京都)

⑤ 市丸修子、原口省吾、**三田雅敏**、筒井和義、無脊椎動物の脳におけるニューロステロイド合成：棘皮動物ヒトデの解析、第36回日本比較内分泌学会大会、2011年11月23日、都道府県会館 (東京都)

⑥ 川島真波、大前貴俊、平井俊朗、**三田雅敏**、3種類のヒトデにおけるリラキシン様生殖巣刺激ホルモン分子(GSS)の比較、第82

回日本動物学会、2011年9月21日、旭川市大雪アリーナ (北海道)

⑦ **三田雅敏**、山本和俊、中村 将、長濱嘉孝、卵黄形成期のイトマキヒトデ卵巣の組織学的観察およびリラキシン様生殖巣刺激ホルモン(GSS)の作用機構、第82回日本動物学会、2011年9月22日、旭川市大雪アリーナ (北海道)

⑧ **Masatoshi Mita**, Kazutoshi Yamamoto, Masaru Nakamura, and Yoshitaka Nagahama, Participation of Gs-proteins in the action of relaxin-like gonad-stimulating substance (GSS) for 1-methyladenine production in starfish ovarian follicle cells, The Inaugural Meeting of the North American Society for Comparative Endocrinology, 2011年7月16日, University of Michigan (Ann Arbor, MI, USA)

⑨ **三田雅敏**、竹重友貴、渡辺美秀、山本和俊、中村 将、長濱嘉孝、卵黄形成期のイトマキヒトデ卵濾胞細胞に対するリラキシン様生殖巣刺激ホルモン (GSS) の作用、第35回日本比較内分泌学会大会、2010年11月19日、静岡グランシップ (静岡県)

⑩ **三田雅敏**、山本和俊、竹重友貴、渡辺美秀、長濱嘉孝、イトマキヒトデのリラキシン様ペプチド、生殖巣刺激ホルモンと卵濾胞細胞との相互作用、第81回日本動物学会、2009年9月25日、東京大学教養学部 (東京都)

⑪ **Masatoshi Mita**, Kazutoshi Yamamoto, and Yoshitaka Nagahama, Hormonal action of a relaxin-like gonad-stimulating substance (GSS) in starfish, *Asterina pectinifera*. 25th Conference of the European Comparative Endocrinologist, 2010年9月5日, University of Pécs (Pécs, Hungary)

⑫ **三田雅敏**、竹重友貴、渡辺美秀、山本和俊、長濱嘉孝、ヒトデをモデルにした卵成熟誘起機構：新規に同定されたリラキシン様生殖巣刺激ホルモン、第22回高遠・分子生物学シンポジウム「生体制御の仕組み-限界への挑戦」、2010年8月19日、高遠さくらホテル (長野県)

⑬ **三田雅敏**、無脊椎動物の生殖巣刺激ホルモンとして初めて同定されたヒトデ生殖巣刺激ホルモン(GSS)はリラキシン様ペプチドだった、利尻島シンポジウム：海洋生物研究の現状と将来展望、2010年6月20日、利尻島開発総合センター (北海道)

⑭ **三田雅敏**、造礁サンゴのバンドルの浮遊性

とワックスエステルについて、研究会：サンゴ礁生態系の生殖・再生基盤の確立、2010年2月10日、琉球大学熱帯生物圏研究センター瀬底実験施設（沖縄県）

- ⑮ **Masatoshi Mita**, Kazutoshi Yamamoto, Kaoru Ohno, and Yoshitaka Nagahama, Synthesis and hormonal action of a relaxin-like gonad-stimulating substance (GSS) in starfish (*Asterina pectinifera*), 6th Intercongress Symposium of the Asia and Oceania Society for Comparative Endocrinology, 2010年1月19日, Massey University (Palmerston North, New Zealand)
- ⑯ **三田雅敏**、中村 將、山本和俊、大野 薫、柴田安司、長濱嘉孝、イトマキヒトデのリラキシン様生殖腺刺激ホルモン(GSS)の作用機構、第34回日本比較内分泌学会・第31回日本比較生理生化学会合同大会、2009年10月23日、千里ライフサイエンスセンター（大阪府）
- ⑰ 吉国通庸、**三田雅敏**、大野 薫、山野恵祐、棘皮動物の生殖を司る神経ペプチド、第34回日本比較内分泌学会・第31回日本比較生理生化学会合同大会、2009年10月22日、千里ライフサイエンスセンター（大阪府）
- ⑱ **三田雅敏**、山本和俊、柴田安司、大野 薫、長濱嘉孝、イトマキヒトデ放射神経由来のリラキシン様ペプチド、生殖巣刺激ホルモン(GSS)の作用機構、第80回日本動物学会、2009年9月19日、静岡グランシップ（静岡県）
- ⑲ **Masatoshi Mita**, Michiyasu Yoshikuni, and Yoshitaka Nagahama, A relaxin-like peptide purified from radial nerves induces oocyte maturation and ovulation in the starfish, *Asterina pectinifera*. 16th International Congress of Comparative Endocrinology, 2009年6月25日, The University of Hong Kong (Hong Kong S,A,R., China)
- ⑳ Andre P. Seale, **Masatoshi Mita**, Tetsuya Hirano, and Gordon E. Grau, Involvement of the cAMP messenger system in tilapia prolactin cell signal transduction during freshwater adaptation, 16th International Congress of Comparative Endocrinology, 2009年6月23日, The University of Hong Kong (Hong Kong S,A,R., China)

〔図書〕（計1件）

**三田雅敏** (2010) 「生物学辞典」(石川 統、黒岩常祥、塩見正衛、松本忠夫、守 隆夫、八杉貞雄、山本正幸 編集)、東京化学同人

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.u-gakugei.ac.jp/~bio-mita/>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

三田 雅敏 (MITA MASATOSHI)  
東京学芸大学・教育学部・教授  
研究者番号：50190674

##### (2) 研究分担者

（無し）

##### (3) 連携研究者

（無し）