

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：82708

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05741

研究課題名(和文) マイワシの卵形成を制御する分子・生理機構の基盤構築と再生産研究への展開

研究課題名(英文) Studies on the physiological and molecular mechanisms of ovarian development in Japanese sardine

研究代表者

入路 光雄 (Nyuji, Mitsuo)

国立研究開発法人水産研究・教育機構・水産技術研究所(長崎)・主任研究員

研究者番号：50732426

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：資源水準に応じて変化するマイワシ個体群の再生産能力の変化は、種独自の繁殖生理機構に起因しているのではないかと考え、卵形成を制御する分子・生理機構の基盤構築を目指した。本研究では、生殖内分泌軸の下流で卵形成に主要な役割を持つエストラジオール-17 (E2)の合成に着目して解析を行った。その結果、マイワシ卵巣では、アンドロステンジオン(AD)からテストステロン(T)を介してE2が合成されることや、マイワシが持つ8タイプの17-水酸基脱水素酵素(Hsd17b)のうち、Hsd17b12aがADからTへの酵素活性を有し、E2合成に働くことが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

資源分野では、主要水産資源の資源変動と生物特性の関係を解明するための生態研究が進行している。本研究課題から、分子・生理学的解釈が加われば、再生産過程や資源管理方策の研究開発に対して、新しい方向性が提案できると期待できる。また、マイワシが属するニシン目は、水産資源として世界的に利用価値が高い。欧米では、タイセイヨウニシンでゲノムが解読されるなど、DNA情報を基盤とする研究が進んでいるが、繁殖生理に関する詳細な研究はない。本研究の成果は、国際的に注目度の高いニシン目魚類において、繁殖生理機構に関する有益な情報として位置づけられるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Analyses of the physiological and molecular mechanisms of ovarian development are needed to better understand the variation in the Japanese sardine's reproductive potential. In the present work, we focused on the ovarian estradiol-17 (E2) synthesis. The results of in vitro bioassays using sardine ovaries indicated that E2 is synthesized from pregnenolone via androstenedione (AD) and testosterone (T). Previously, we succeeded in identifying eight types of 17-hydroxysteroid dehydrogenases (Hsd17bs) by RNA sequencing in the sardine. In the present work, we characterized their gene expression and tested their catalytic activities. Then, we conclude that Hsd17b12a plays a major role in E2 synthesis in sardine ovary by catalyzing the conversion of AD to T.

研究分野：魚類繁殖生理学

キーワード：マイワシ 卵形成 Hsd17b E2 卵巣 ステロイドホルモン

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

水産資源は再生産する資源であり、親が子を産み(成熟・産卵)、子が成長して新たな親として加入することで資源が持続される。再生産過程の理解は、水産資源を持続可能な形で管理する上で不可欠である(国連 SDGs14: 海の豊かさを守ろう)。

太平洋のマイワシは、数十年周期で大規模な資源変動を繰り返すとともに、成熟・産卵などの生物特性も大きく変化する。1990年代の資源減少期では、1980年代の高水準期と比べて、初回成熟年齢の低下、1回当たりの産卵数の増加、卵の栄養蓄積量の増加などが観察されている(図1; 文献)。このような生物特性の変化は、一般には、密度効果に伴う「補償的応答」と考えられている。すなわち、資源減少によって1個体当たりの餌量が増加することにより、成長の促進や栄養状態(肥満度)の改善を伴って、成熟の早期化や産卵投資の増大が起こる。しかし、マイワシでは、例えば高水準期では体長18cm、3歳で成熟を開始していたが、低水準期では体長15cm、1歳でほぼ全ての個体が成熟していたことが示されている。このような現象を、補償的応答だけで結論付けるのは妥当であろうか?マイワシにとって、個体の栄養状態の変化は生殖内分泌機構にどのような影響をもたらして成熟や卵生産を制御しているのだろうか?これらの問いに答えることは、マイワシの再生産過程の理解を深化させることだけに留まらず、より適切な資源管理を実施するために不可欠な親魚群の再生産能力の評価法や加入量の予測技術の高度化にも貢献する。しかし、マイワシでは生態学的視点に基づいた再生産特性の研究が多数を占めるのに対して、生殖内分泌機構にまで踏み込んで、分子・生理機構の解明を目的とする研究はこれまでほとんどなかった。

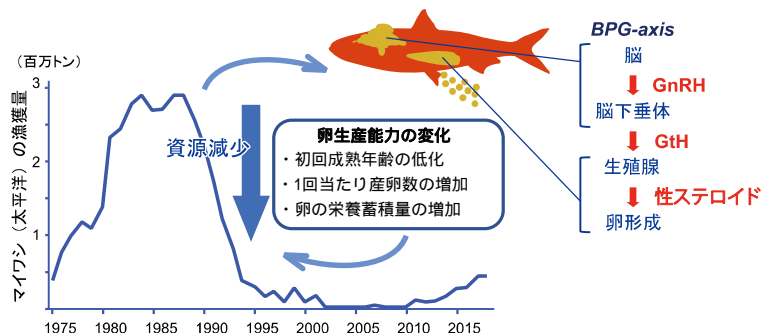


図1. マイワシの資源変動と卵生産能力の変化

私たちは、マイワシの再生産能力の理解には分子・生理機構の情報整備が不可欠であると考え、マイワシの生殖内分泌軸(脳-脳下垂体-生殖腺を主軸とする内分泌系 = BPG-axis; 図1)に発現する遺伝子の塩基配列情報を網羅的に取得した(文献)。さらに、BPG-axisの下流に当たる卵巣で働く性ステロイドホルモン合成に着目して、各合成酵素の遺伝子発現量と、血中のホルモン量を解析した。その結果、他魚種とは異なる2つの「問い」が見出された。

1) マイワシのエストロゲン(エストラジオール-17β、E2)合成経路

卵巣では、卵母細胞の周囲を取り囲む濾胞細胞層で性ステロイドホルモンのE2が合成される(図2)。E2は、肝臓に作用して卵黄前駆タンパク質の合成を促進する。コレステロールからE2への合成経路は魚種ごとに異なる。例えば、マサバではアンドロステンジオン(AD)からテストステロン(T)を介するが、マダイではADからエストロン(E1)を介する。そのため、卵巣発達に伴って血中のTまたはE1量も増加すると考えられるが、マイワシでは、TやE1量いずれの変化も認められなかった。マイワシの卵巣では、AD、T、E2またはAD、E1、E2の、どちらの経路を通るのだろうか。

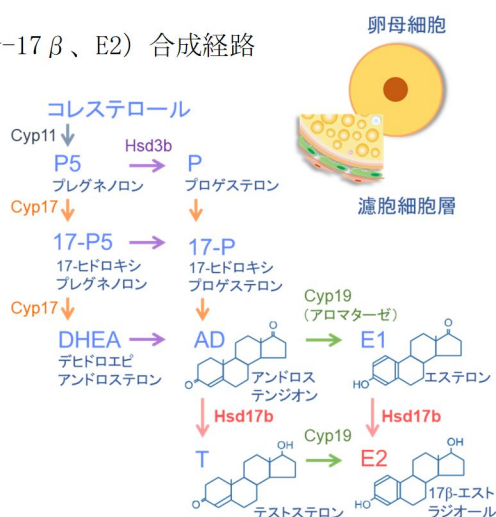


図2. 卵巣の濾胞細胞におけるE2合成経路

2) マイワシのE2合成に作用する17-水酸基脱水素酵素(Hsd17b)

E2合成は、種々の合成酵素の活性化によって引き起こされる(図2)。マイワシの卵巣においても、合成酵素をコードする一連の遺伝子(cyp11a1, cyp17a1, cyp19a1a)の発現量が、卵黄形成に伴って増加した。一方、脊椎動物では15タイプのHsd17bが見つかっており、哺乳類

では一般的にHsd17b1がエストロゲン合成を担うとされる。しかし、マイワシ卵巣ではHsd17b1の遺伝子発現は認められなかった。代わりに、他の8タイプの遺伝子(*hsd17b3*、*hsd17b4*、*hsd17b7*、*hsd17b8*、*hsd17b10*、*hsd17b12a*、*hsd17b12b*、*hsd17b14*)が見つかったが、ウナギの精子形成過程でアンドロゲン合成に機能する*hsd17b12a*がマイワシの卵巣で高発現を示すなど、Hsd17bの各タイプの機能には魚種ごとの特異性があると考えられた。マイワシの卵巣でE2合成に働くHsd17bはどのタイプなのだろうか。

2. 研究の目的

私たちは、これまでに培った小型浮魚類の飼育技術を用いて、様々な環境条件下(餌、水温、密度など)における再生産特性の応答を、内分泌学的に明らかにすることを目標としている。本研究では、直近の研究(文献)で見出された課題を踏まえて、マイワシの卵形成を調節するE2合成機構の全容を明らかにすることを目的とした。具体的には、(1)マイワシ卵巣におけるE2合成経路を調べて、(2)E2合成に作用するHsd17bを同定した。

さらに、肥満度に応じて変化するE2合成関連因子を探索することで、マイワシの再生産能力の理解に不可欠な「資源水準に伴う個体の栄養状態の変化が成熟や卵生産に及ぼす影響」の評価に向けた基礎研究へと展開させることを目指した。そのために、網羅的遺伝子解析により、肥満度に応じて変化するE2合成関連因子を探索した。

3. 研究の方法

(1) E2合成経路

卵巣25mgの培養液に、プレグネロン(P5)またはADを100ng/mlで加えて培養後(6~24時間)、各ステロイドホルモン量(AD、T、E1、E2)を測定した。

(2) E2合成に作用するHsd17bの同定

i) 8タイプの*hsd17b*のクローニング

マイワシの持つ8タイプ全ての*hsd17b*をクローニングして、cDNA全長配列を決定した。

ii) 各組織、卵巣発達に伴う発現量の解析

qRT-PCR解析により、卵巣で発現し、卵黄形成に伴う発現増加を示すHsd17bを選出した。

iii) *in vitro*での基質特異性の解析

哺乳類細胞(HEH293T)に、ii)で選出したタイプの組換え体を発現させた。ADまたはE1を添加して、培養後にTあるいはE2を測定した。これにより、選出したHsd17bの基質特異性(AD→TまたはE1→E2の変換)を調べた。

iv) 生殖腺刺激ホルモン(GtH)による発現制御

脳下垂体で合成される糖タンパク質のGtHは、生殖腺に直接作用して、ステロイドホルモンの合成を調節する。そこで、GtHが含まれるマイワシの下垂体抽出物を、卵巣の培養液に添加して、卵巣の*hsd17b*量がGtHによる発現制御を受けるかどうかを確認した。

(3) 肥満度に応じて変化するE2合成関連因子の探索

飼育下で、餌条件を変えてメスのマイワシを養成した。卵黄形成中の12月に、異なる餌条件(高給餌、低給餌)で養成した個体をそれぞれ取り上げて、生殖腺および肝臓を採取した。各組織よりRNAを抽出後、RNA-seqにより、2つの群間で発現量の異なる遺伝子を探索した。

4. 研究成果

(1) E2合成経路

卵黄形成中期の卵巣(最大卵径: 440-450 μm)では、培養液中のAD濃度は、P5添加の6時間後に高く、その後低下した。T濃度は、ADおよびP5添加の6時間後に高く、いずれもその後低下した。E2濃度は、ADおよびP5添加の6時間後に高く、添加後48時間まで増加した。卵黄形成後期の卵巣(最大卵径: 550-650 μm)においても、中期の卵巣と同様の結果が得られたが、E2濃度はいずれの時間においてもコントロールと差があまりなかった。E1は検出されなかった。以上より、マイワシのE2は、P5からADに変換され、AD→T→E2の経路で合成されることが明らかになった。

(2) E2合成に作用するHsd17bの同定

i) 8タイプの*hsd17b*のクローニング

8タイプのHsd17b遺伝子(*hsd17b3*、*hsd17b4*、*hsd17b7*、*hsd17b8*、*hsd17b10*、*hsd17b12a*、*hsd17b12b*、*hsd17b14*)をクローニングして、CDS全長の塩基配列を決定した。いずれの配列も、タイセイヨウニシンと高い相同性を示した。

ii) 各組織、卵巣発達に伴う発現量の解析

産卵期に採集した雌雄各3個体について、11個の組織(脳下垂体、脳、肝臓、腸、皮、鰓、心臓、脾臓、脂肪組織、生殖腺)における、8タイプのHsd17b遺伝子の発現量を定量して比較した。その結果、*hsd17b3*、*hsd17b4*、*hsd17b12a*、*hsd17b12b*の4遺伝子について、卵巣で他の組織や精巣と比べて高い発現が見られた。

さらに、異なる発達段階の卵巣(未熟期[IM]、卵黄胞期[CA]、卵黄形成期[VTG])につ

いて、8タイプのHsd17b遺伝子の発現量を定量して比較した。その結果、*hsd17b3*、*hsd17b4*は発達に伴って発現が増加した(図3)。また、*hsd17b12a*、*hsd17b12b*は、未熟期から卵黄胞期にかけて発現が増加し、卵黄形成期まで高い発現を維持した。

以上から、卵巣で発現が高く、卵巣発達に伴って発現が増加し、かつ他の脊椎動物でステロイド合成に関与することが分かっている、Hsd17b3、Hsd17b12a、Hsd17b12bをマイワシの卵巣でE2合成に働くタイプの候補として選定した。

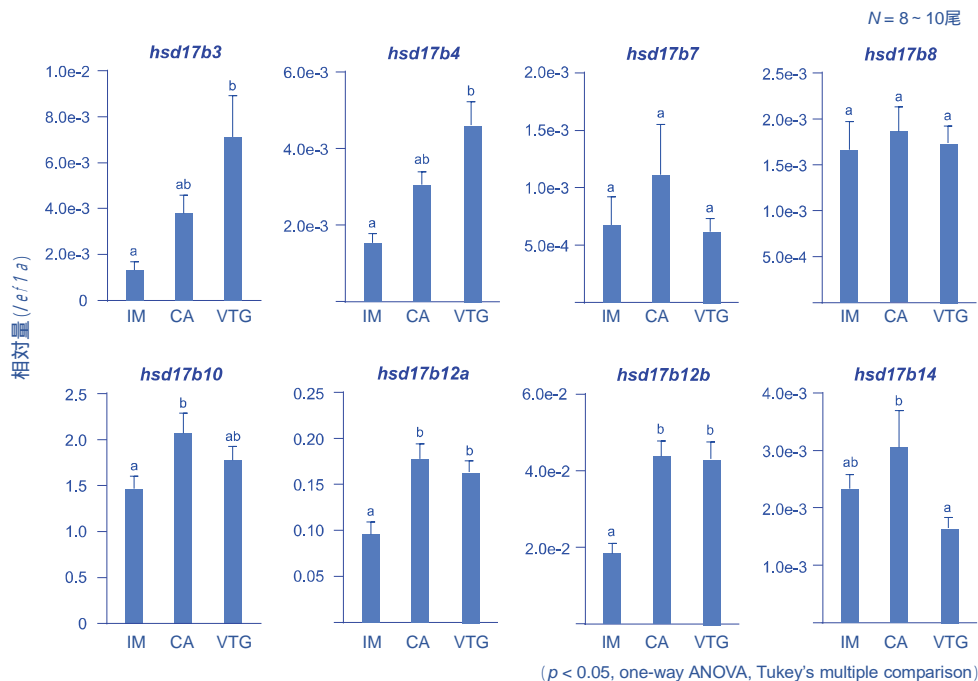


図3. 卵巣発達に伴う各Hsd17b遺伝子の発現変化

iii) *in vitro*での基質特異性の解析

Hsd17b12aとHsd17b12bは、いずれもAD→T、E1→E2を変換する酵素活性を示した(図4)。Hsd17b3は、どちらの活性も示さなかった。

iv) 生殖腺刺激ホルモン(GtH)による発現制御

培養により、*hsd17b12a*、*hsd17b12b*、*hsd17b3*のいずれの遺伝子も発現量は増加しなかった。一方、アロマトラーゼをコードする*cyp19a1a*の遺伝子は増加した。

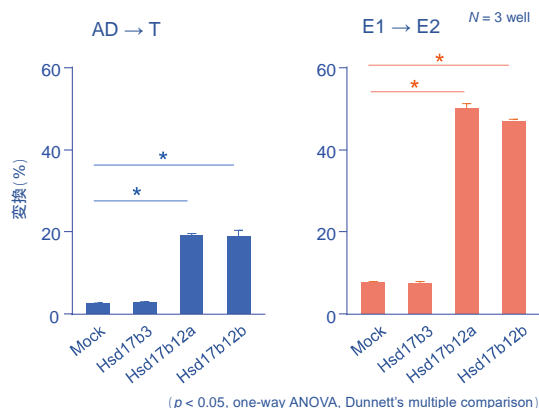


図4. マイワシHsd17bの酵素活性

以上、一連の解析により、マイワシの卵巣においてADをTに変換することでE2合成に作用するHsd17b17は、Hsd17b12aとHsd17b12bであることが示された。特に、*hsd17b12a*量は*hsd17b12b*量の3~7倍と高かったことから、主にHsd17b12aがE2合成に働くと考えられた。

(3) 肥満度に応じて変化するE2合成関連因子の探索

肥満度は、高給餌の魚で平均1.54、低給餌の魚で平均1.09であり、有意差があった(unpaired t-test, p < 0.05)。一方、生殖腺熟度指数GSIには、差はなかった。両者の比較により、卵巣においては30個、肝臓においては78個の、発現に差のある遺伝子が見つかった。それらのうち、ステロイド合成や卵黄タンパク質合成に関与する遺伝子は認められなかった。このことから、肥満状態は、内分泌軸におけるより高次の因子、または生殖腺軸以外の組織に働くことで、卵形成に影響している可能性が示唆された。

<引用文献>

森本晴之 (2010) 日本産マイワシにおける繁殖特性の時空間変化とその個体群動態への影響. 水産海洋研究 74(特集号):35-45.

Nyuji M, Hongo Y, Yoneda M, Nakamura M (2020) Transcriptome characterization of BPG axis and expression profiles of ovarian steroidogenesis-related genes in the Japanese sardine. BMC Genomics 21: 668 (1-19).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nyuji Mitsuo, Hongo Yuki, Kazeto Yukinori, Yoneda Michio	4. 巻 347
2. 論文標題 Characterization of eight types of 17 α -hydroxysteroid dehydrogenases from the Japanese sardine <i>Sardinops melanostictus</i> : The probable role of type 12a in ovarian estradiol synthesis	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 General and Comparative Endocrinology	6. 最初と最後の頁 114423 ~ 114423
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ygcen.2023.114423	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nyuji Mitsuo, Takasuka Akinori, Okada Makoto	4. 巻 187
2. 論文標題 Variation in reproductive parameters of round herring in the Pacific coastal waters of Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Sea Research	6. 最初と最後の頁 102247 ~ 102247
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.seares.2022.102247	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔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 入路光雄・米田道夫・風藤行紀・本郷悠貴
2. 発表標題 マイワシの卵形成においてE2合成に作用する17 α -HSDの同定
3. 学会等名 令和5年度日本水産学会大会春季大会
4. 発表年 2023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	本郷 悠貴 (Hongo Yuki) (20737316)	国立研究開発法人水産研究・教育機構・水産資源研究所(横浜)・主任研究員 (82708)	
研究分担者	米田 道夫 (Yoneda Michio) (30450787)	国立研究開発法人水産研究・教育機構・水産技術研究所(廿日市)・主任研究員 (82708)	
研究分担者	風藤 行紀 (Kazeto Yukinori) (60399996)	国立研究開発法人水産研究・教育機構・水産技術研究所(南勢)・部長 (82708)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関