

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25年6月11日現在

機関番号：82708
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22580216
 研究課題名（和文） 卵形成を制御しているクルマエビ卵黄形成抑制ホルモンの作用機構の解明
 研究課題名（英文） Regulatory mechanism of vitellogenesis-inhibiting hormone in the kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus*
 研究代表者
 奥村 卓二（OKUMURA TAKUJI）
 独立行政法人水産総合研究センター・増養殖研究所・主幹研究員
 研究者番号：30372030

研究成果の概要（和文）：甲殻類では、眼柄内の神経節が卵黄形成抑制ホルモンを分泌して成熟を調節している。その作用機構を明らかにするため、クルマエビを使って研究を実施した。未熟な雌エビでは血液中のホルモン量が常に高く、成熟を抑制していた。血中量が低下して成熟抑制が解除されると成熟が始まると考えられた。また、雌エビの眼柄を除去して人為的にホルモンを無くすと、卵巣内で様々な遺伝子の発現量が変化した。ホルモン血中量の低下により、卵巣内で様々な変化が生じて成熟が始まると考えられた。

研究成果の概要（英文）：In crustaceans, ovarian development is under the inhibitory regulation of vitellogenesis-inhibiting hormone (VIH) secreted from a neuroendocrine system in the eyestalks. In this study, its regulatory mechanism was investigated in the kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus*. In immature shrimp, hemolymph VIH levels were constantly low. This result suggests that VIH inhibits ovarian development during the immature stage and that a decline of its levels is a trigger of the initiation of ovarian development. Furthermore, after eyestalk ablation, expression levels of several genes were found to change in the ovaries. This result suggests that various genes are involved in the initiation of ovarian development.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：生理、増養殖、甲殻類、内分泌

1. 研究開始当初の背景

(1) 甲殻類では、眼柄を切除すると成熟が進むことから、眼柄内の神経分泌細胞群（X 器官-サイナス腺系）から成熟を抑制するホルモンが分泌されると考えられてきた。そのホルモンはペプチドとして単離・同定され、卵黄形成抑制ホルモンと名付けられた。

(2) 卵黄形成抑制ホルモンを注射すると卵巣発達が阻害されることから、このホルモンは卵巣発達を抑制して調節する作用を持つことが明らかにされた。また、卵黄タンパク前駆物質の合成部位である卵巣を組織培養し、卵黄形成抑制ホルモンを培養液に添加すると、卵巣片内の卵黄タンパク前駆物質の mRNA 量が減少した。このことから、このホルモンが卵黄タンパク前駆物質の合成を直接調節していることが明らかにされた。

(3) しかし、卵黄形成抑制ホルモンの作用については次のようにまだ不明な点が多い。

(4) 生体内でのホルモンの作用を理解するためには、ホルモン血中量の変動を明らかにすることが不可欠だが、これまでアメリカンロブスターでしか調べられていなかった。

(5) また、ホルモン作用を明らかにするためにはホルモンを生体内から除去して影響を調べる必要がある。しかし、合成阻害法として有効な RNA 干渉技術は、まだクルマエビの卵黄形成抑制ホルモンに対して用いられていなかった。

(6) 未熟な雌エビから眼柄を除去すると卵巣が発達して産卵にいたる。そのため、卵黄形成抑制ホルモンは卵形成過程の全般に働くと考えられる。しかし、その作用として明らかになっているのは、卵巣の濾胞細胞における卵黄タンパク前駆物質遺伝子の発現抑制だけであり、それ以外に作用する遺伝子はわかっていなかった。

(7) 世界のエビ養殖はめざましい発展をとり、年に 340 万トン以上（1.3 兆円以上）生産されている。養殖では、稚エビを養成池に入れて育てて大きくし、出荷する。池に入れる稚エビは、雌親エビから眼柄を除去することで成熟を促進して産卵させ、得た受精卵から生産している。しかし、養殖の拡大に伴って親エビの確保が難しくなり、より効率的な人為催熟技術の開発が求められている。

2. 研究の目的

(1) 本研究課題の目的は、不明な点が多い卵

黄形成抑制ホルモンの作用機構を明らかにすることである。

そのため、日本でエビ養殖の最重要種であるクルマエビを使って、卵黄形成抑制ホルモンの血中量の変動を明らかにするとともに、ホルモン遺伝子の発現抑制の影響を調べる。また、卵黄形成抑制ホルモンの除去により、発現量が変動する遺伝子を調べる。

(2) 卵黄形成抑制ホルモンの作用機構に対する理解を深めることで、人為催熟技術の高度化に役立てる。

3. 研究の方法

(1) 血中ホルモン量の測定

クルマエビでは卵黄形成抑制ホルモン活性を持つサイナス腺ペプチド（SGP）が 6 種類知られている。その内の 2 種類（SGP1 と SGP7）に対する抗体を使って時間分解蛍光免疫測定法を開発し、血中量を測定した。

血液サンプルからアセトニトリルでホルモン分画を抽出した後、減圧乾固して緩衝液に溶解し、測定に供した。測定は、96 穴ウェルに固相化した抗 SGP1 または SGP7-IgG とユウロピウムで標識した抗 SGP1 または SGP7-IgG でホルモン分子を挟み込むサンドイッチ法で行った。

(2) ホルモン合成抑制

ホルモンを生体内から除去するために、RNA 干渉技術を利用してホルモン遺伝子の発現抑制を試みた。まず、クルマエビの卵黄形成抑制ホルモン遺伝子（SGP7）の cDNA に相同な二本鎖 RNA を合成した。これを稚エビに注射し、二週間後に眼柄内の神経節を摘出し、SCP7 の遺伝子発現量を逆転写反応リアルタイム PCR で測定した。

次に、亜成体の雌エビに SGP7 遺伝子の二本鎖 RNA を注射し、卵巣発達に対する影響を調べた。

(3) ホルモンが作用する遺伝子の同定

未熟な雌クルマエビから両眼柄を切除し、切除から 6、12、24、48、96 時間後に解剖して卵巣片をとり、卵巣における遺伝子発現の変化を調べた。発現解析の対象遺伝子として、データベースに登録されている、代謝関連酵素やシグナル伝達系などの 15 種類の遺伝子を選び、それぞれの遺伝子の塩基配列から PCR 用のプライマーを設計した。サンプルの卵巣組織片から RNA を抽出し、逆転写反応後にリアルタイム PCR を行って発現量を測定した。

4. 研究成果

(1) 血中ホルモン量の測定

様々な卵巣発達段階の雌エビから採血し、SGP1 と SGP7 の血中量を測定して個体ごとに相関を調べたところ、正の相関があることがわかった。両ペプチドは眼柄内の同じ神経細胞から合成・分泌されている可能性があり、その分泌も同じように調節されていることが示唆された。また、SGP7 は眼柄神経節内で最も存在量が多い卵黄形成抑制ホルモン活性を持つペプチドであり、血中量も SGP1 より高かった。おそらく SGP7 が主要な卵黄形成抑制ホルモンとして働いているのであろう。

次に、未熟雌エビの血中ホルモン量を6時間毎に測定したところ、SGP1, 7ともに6時間毎の血中量に有意差はなく、日内変動は見られなかった。未熟エビでは常に卵黄形成抑制ホルモンが分泌され、高い血中量が維持されることで成熟を抑制していると考えられた。

我々はこれまでに、未熟な雌クルマエビの両眼柄を切除して体内から卵黄形成抑制ホルモンを除去すると12時間後には卵黄タンパク前駆物質遺伝子の発現量が有意に増加すること、そして未熟なクルマエビに比べて卵黄形成を始めたクルマエビでは血中の卵黄形成抑制ホルモン量が減少していることを見いだしている。

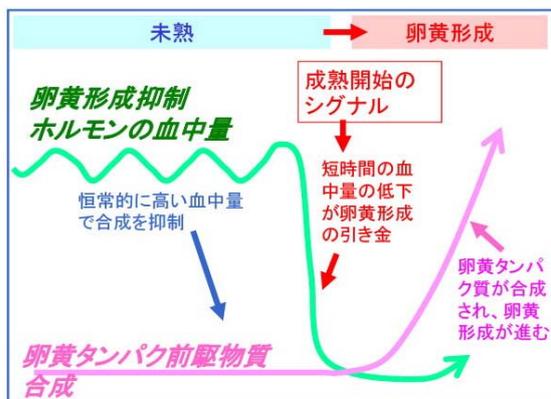


図1. クルマエビにおける卵黄形成調節の模式図

これらの結果を元に卵黄形成調節機構を模式図にまとめた(図1)。未熟な時期は卵黄形成抑制ホルモンが分泌され続け、血中量が高く保たれている。その結果、卵黄タンパク前駆物質の合成が抑制されている。水温や日長などの成熟開始シグナルを受け取ると、卵黄形成抑制ホルモンの血中量が低下する。そして、抑制作用が解除され、卵黄タンパク前駆物質の合成が盛んになって卵黄形成が進む。眼柄を除去すると半日で卵黄タンパク前駆物質の mRNA 量が増加することから、卵黄形成抑制ホルモンの血中量が低下するとす

ぐに成熟が開始すると思われる。

また、クルマエビには6種類の卵黄形成抑制ホルモン活性を持つペプチドが確認されているが、複数のペプチドが成熟調節に関与していると考えられる。

以上の結果は、クルマエビにおける卵黄形成抑制ホルモンの作用機構の理解を深めるのに役立つ。

(2) ホルモン合成抑制

卵黄形成抑制ホルモンに相同な二本鎖 RNA を稚エビに投与したところ、2週間後でも卵黄形成抑制ホルモンの遺伝子発現を抑制していることがわかった。クルマエビの卵黄形成抑制ホルモンでも RNA 干渉による発現抑制が可能であることがわかった。

次に、未熟な雌エビに二本鎖 RNA を投与して卵巣発達に対する影響を調べた。注射から58日後でも卵巣は未熟なままで、生理食塩水を注射した対照区と差がなかった。RNA 干渉により合成が抑制されれば、眼柄除去と同じ様に、卵黄形成抑制ホルモンの血中量が低下して卵巣発達が進むと期待されたが、結果は異なった。稚エビでの予備実験と同様の量、二本鎖 RNA を注射したが、親エビと稚エビでは RNA 干渉の条件が異なり、合成抑制効果が不十分であった可能性が考えられた。

表1. 眼柄切除後の遺伝子発現量の変化

発現量が増加した遺伝子

シトクロム c オキシダーゼ
カテプシン C

発現量が減少した遺伝子

分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ (MAPK)
グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ
フルクトース-1, 6-ビスホスファターゼ
伸長因子 1 アルファ
サイクリン B

発現量が変わらなかった遺伝子

グアニンヌクレオチド結合タンパク質 (Gs)
グアニンヌクレオチド結合タンパク質 (Gi)
レチノイド X 受容体
エクジソン受容体
グリコーゲンシンターゼ
グリコーゲンホスホリラーゼ
ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ
卵巣リポタンパク質受容体

(3) ホルモンが作用する遺伝子の同定

15種類の遺伝子について、眼柄除去後の卵巣内での発現量の変化を表1にまとめた。発現量が増加した遺伝子が2種類、減少した遺伝子が5種類、変化しなかった遺伝子が8種類であった。

チトクロームCオキシダーゼはミトコンドリア膜の電子伝達系の最終段階の酵素である。眼柄除去により卵巣で卵黄形成が始まると、卵母細胞内のミトコンドリアが増加する。それにともない、チトクロームCオキシダーゼの遺伝子発現量も増加したと考えられた。その他の遺伝子の変化については、現時点では十分な説明ができず、さらなる研究が必要である。

卵黄蓄積が始まる際には、卵黄形成抑制ホルモンによる成熟抑制作用が解除されてピテロジェニン合成など様々な変化が生じる。今回の実験により、眼柄除去後に卵巣で代謝関連酵素遺伝子とシグナル伝達関連遺伝子の一部の発現量に変化することがわかった。これらの遺伝子は、卵黄形成抑制ホルモンの血中量低下により、一次的または二次的な作用を受けて発現量に変化したと考えられる。複雑な卵黄蓄積の調節機構の一部を明らかにすることができた。

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)

[学会発表] (計2件)

- ① 大平剛、クルマエビ卵黄形成抑制ホルモンのRNA干渉による遺伝子ノックダウン、平成24年度日本水産学会秋季大会、2012年9月16日、水産大学校
- ② 奥村卓二、両眼柄除去と片眼柄除去がクルマエビの卵巣発達と産卵に及ぼす影響、平成24年度日本水産学会秋季大会、2012年9月16日、水産大学校

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥村 卓二 (OKUMURA TAKUJI)

独立行政法人水産総合研究センター・増養殖研究所・主幹研究員

研究者番号：30372030

(2) 研究分担者

大平 剛 (OHIRA TSUYOSHI)

神奈川大学・理学部・准教授

研究者番号：10361809

(3) 連携研究者

()

研究者番号：