

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 20 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23658152

研究課題名(和文)ウニに生殖腺刺激ホルモンはあるのか？

研究課題名(英文)Is there gonadal stimulation hormone in sea urchins?

研究代表者

都木 靖彰(Takagi, Yasuaki)

北海道大学・大学院水産科学研究院・教授

研究者番号：10212002

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：これまで、ウニの生殖巣の発達につれて生殖巣で合成・蓄積されるタンパク質(主要卵黄タンパク質 Major Yolk Protein :MYP)の遺伝子構造・発現部位が明らかにされていたが、生殖巣の発達を統御機構に関しては不明なまま残されていた。本研究では、MYPおよびGAPDH mRNA発現定量系の確立をおこなうとともに、MYPの合成を誘起する生殖腺刺激ホルモンの探索を行うための生殖巣器官培養の確立を試み、短期間の器官培養系を確立した。これにより、今後 MYP mRNA 発現量を指標に生殖の内分泌統御に関する研究が可能になる。

研究成果の概要(英文)：Sea urchin gonadal growth is characterized by intragonadal nutrient storage and the use of the stored nutrient for gametogenesis. Before gametogenesis initiation, gonads increase in size by accumulating nutrients such as proteins, lipids and carbohydrates in nutritive phagocytes that fill the gonadal lumina of both sexes. The major protein is termed major yolk glycoprotein or major yolk protein (MYP), which is a glycoprotein having molecular weight of 160-180 kDa, and has significant roles in gametogenesis. However, we have no information about gonadal development mechanisms, as well as the regulation mechanism on the synthesis of MYP in gonads. Therefore, to understand the mechanisms of gonadal development, we developed quantitative PCR system of MYP mRNA expression as well as an organ culture systems using sea urchin gonads. These techniques will enable a endocrinological research on gonadal developments in the sea urchin.

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：ウニ 生殖巣 生殖腺刺激ホルモン 器官培養

## 1. 研究開始当初の背景

現在、北海道沿岸ではウニの増殖事業が展開されているが、沿岸漁業の衰退を防ぐためには、経済的に効率の良い養殖技術の展開も必要である。経済的に価値の高いウニは養殖事業の最適種の一つであるが、ウニの種苗生産技術はほぼ確立しているものの、種苗を出荷サイズまで育てる養殖技術はいまだに産業レベルに達していない。魚類養殖では効率的に成長を促すための人工飼料の開発が盛んに行われており、それら人工飼料が魚類養殖の成功を支えてきた。ウニ養殖においても成長を促進させる優れた人工飼料の開発や、それを用いた高度で効率的な養殖技術の開発、さらには優良品種の育種などが必要になるが、水産無脊椎動物におけるそのような試みは立ち遅れている。その大きな理由として、水産増養殖の対象となる無脊椎動物の成長や成熟を制御する内分泌機構に関する研究がほとんどおこなわれておらず、研究対象となっている種も極めて限られている現状を挙げることができる。たとえば、比較的研究が進展しているウニ類においては、食品として利用される雌雄生殖巣が肥大するにつれて生殖巣で合成・蓄積される蛋白質（主要卵黄蛋白質 Major Yolk Protein :MYP）の遺伝子構造・発現部位が明らかにされた（アカウニ：Unuma et al. 2001:Zool Sci；エゾバフンウニ：Ura et al. DDBJ:AB199785）。この MYP は、雌では卵形成に伴い卵に移行し蓄積され、雄では、精子形成に必要な栄養源として利用される配偶子形成に重要な蛋白質である。しかし、この蛋白質の合成を統御する内分泌機構、すなわち、雌雄生殖巣の肥大化を制御しているメカニズムに関する基本的な生理学的情報はまったく不足している現状にある。

## 2. 研究の目的

海産無脊椎動物であるウニをモデル生物

とし、棘皮動物に脊椎動物と同様に生殖腺刺激ホルモンが存在するか否かを明らかにし、海産無脊椎動物の内分泌機構の解明に必要な基礎データを得る。成果は、ウニ類の中間育成技術の確立や、高機能人工飼料の開発ならびに新たな養殖技術開発に向けた基礎的情報として利用可能であり、本研究の意義は大きい。ウニ生殖巣は大きく体細胞（栄養細胞）と生殖細胞から形成されている。生殖巣の発達段階として、（１）回復期、（２）栄養細胞の肥大期、（３）生殖細胞成長期、（４）産卵期と大別される。この内、（１）～（３）にかけて栄養細胞で MYP が徐々に合成され蓄積されることが明らかとなっている。本研究課題において、まず、器官培養系の確立を目指す、常に実験ができることがキーポイントとなる。ウニは絶食状態にさらすと、生殖巣に蓄積されている栄養成分（グリコーゲン、蛋白質、脂質など）を生命維持に必要であるため代謝し、生殖巣がひも状（回復期）になる。我々は、すでに、ウニを約 1 ヶ月絶食状態にさらすと生殖巣がひも状（回復期）になることを確認している。そのため、いつでも器官培養系に適した生殖巣を常に供給できると考えている。

次に、MYP 合成誘起ホルモンの探索であるが、一般に脊椎動物では、生殖腺刺激ホルモンは脳下垂体から分泌される蛋白質ホルモンである。しかし、ウニにおいて脳下垂体は存在しないため合成部位は不明である。そこで、古典的ではあるが、ウニにおいて主要な器官である、神経、消化管、生殖巣を粉砕し抽出物を得る。また、体腔液を採取する。これらを確認した器官培養液に添加し MYP を発現させる分画を探索する。この際に、どのような物質が MYP 合成を誘導するか否かを確認するため、それぞれの抽出物あるいは体腔液を加熱し蛋白質を変性させたものも培養液に添加し MYP の発現を誘導するか否かを確認する。これらの研究結果から得られ

たデータをもとに、MYP 発現誘導する物質が存在する分画を確認し、そこから種々のクロマトグラフィーを用いて分離・精製を行い、得られた精製物を同定することを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) 実験にはキタムラサキウニを用いる。

(2) これまでにクローニングを終えたエゾバフンウニ MYPcDNA および GAPDH cDNA の配列をもとに、特異プライマーを作製した。次に、キタムラサキウニ生殖巣から RNA を抽出し、ゲノム DNA を消化した後に、cDNA ラブラリーを作製した。この cDNA ライブラリーを鋳型にし、RT-PCR 法により MYP および GAPDH cDNA の部分クローニングを行い、塩基配列を決定した。決定した塩基配列をデータベースにより相同性検索を行った。この MYP および GAPDH を挿入したプラスミドを精製し、リアルタイム PCR を用いた mRNA 微量発現定量系を確立する。

(3) キタムラサキウニ生殖巣を用いてニワトコを用いた浮上器官培養系の確立を行う。培養は 5 日間と 7 日間に設定し、定期的に生殖巣のサンプリングを行い、Total-RNA を抽出し、cDNA ライブラリーを作製し、(2) で確立した、MYP および GAPDH の mRNA 発現量を定量した。

(4) 消化管、神経、生殖巣といった、ウニにおける主要な器官をもちいて器官抽出物を得る。また、体腔液(ウニ殻内部を満たす液：脊椎動物の血液に相当する)を採取し、1) で確立した器官培養系の培養液中に添加し MYP の発現動態を分子レベルで確認する。

### 4. 研究成果

(1) キタムラサキウニ MYP および GAPDH mRNA 発現定量系の確立を行った。MYP および GAPDHcDNA の部分クローニングをキタムラサ

キウニ生殖巣から抽出した Total RNA を用いて cDNA ライブラリーを作製した後に RT-PCR 法によりクローニングし、塩基配列の決定を行った。その結果、GAPDH(130bp)、MYP(197bp) の cDNA 断片を得た後に塩基配列を決定しデータベースを用いて相同性検索を行った結果、各 cDNA 断片はキタムラサキウニの GAPDH および MYP をコードしていた。この cDNA 断片が挿入されたプラスミドを精製し、プラスミド DNA を用いて標準曲線を作製した。作製した標準曲線は  $10^2$ - $10^8$  コピーの間で測定できる MYP および GAPDH mRNA 発現量定量系が確立できた。

(2) キタムラサキウニ生殖巣を用いた生体外器官培養系の確立を行った。培養液には L-15 培地中にてニワトコを用いた浮上培養系を使用した。15℃、湿度 100% の条件下で培養を行った。培養は、5 および 7 日間の培養を行い、1 日おきに生殖巣をサンプリングし、Total RNA を抽出した後 cDNA を作製し、GAPDH および MYP mRNA の発現量の推移を調べた結果、1 日目に両遺伝子の発現量は低下するが、その後、一定の発現量を示した。GAPDH は細胞の生存に深く関与するタンパク質であることから、この GAPDH mRNA の発現量が一定であったことから、生殖巣は器官として培養中に生存していたと判断した。以上の結果からキタムラサキウニ生殖巣の生体外器官培養系が確立できたと判断した。

(3) 確立した生殖巣生体外器官培養系を用いて L-15 培地、体腔液中、リンゲル液にて 7 日間の培養を行った。培養液には L-15 培地中にてニワトコを用いた浮上培養系を使用した。15℃、湿度 100% の条件下で培養を行った。その結果、GAPDH mRNA の発現量は 1 日目に低下したが、その後は一定の発現量を維持していた。また、MYP mRNA の発現量も 1 日目に低下したが、その後は一定の発現量を示し、顕著な増大は認められなかった。MYP mRNA の発現量を GAPDH mRNA の発現量で補

正し、培養期間での発現量変化を算出したが、MYP mRNA の発現量に有意な差は認められなかった。このことから、MYP 誘導因子が体腔液中に存在するか否かについては結論が出せなかった。しかし、リングル液で培養した生殖巣の MYP mRNA の発現量は高い値を示したことから、体腔液中には生殖巣の生存を維持する成分が含まれることが示された。今後は、使用する生殖巣の生理学的条件を検討すること、また、MYP の他に生物指標が必要であることが示された。そこで、最終年度に以下の実験を行った。ウニの主要卵黄タンパク質 (MYP) は雌雄生殖巣の栄養細胞において合成されている。雌においては、卵黄タンパク質として成熟に伴い卵内に移行し、雄においては、成熟に伴い配偶子形成の栄養源として利用されると考えられている。これまでに、MYP 遺伝子上流域に核内受容体応答配列が存在しステロイドホルモンを介して合成されている可能性が示唆されているが、このタンパク質の合成機構は未だ明らかにされていない。そこで、申請者らはウニ生殖巣における MYP の合成機構の解明の一端として、網羅的遺伝子発現解析によりステロイドホルモンおよび核内受容体を介した合成機構が存在するのか探索を次世代シーケンス解析により行った。次世代シーケンス解析の結果、ウニ生殖巣において、MYP mRNA、STAR-like mRNA、15 種類の核内受容体 mRNA および 24 種類の CYP mRNA が発現していることが確認された。以上のことから、ウニ生殖巣においてステロイドホルモンが合成されていること、また、MYP は核内受容体を介して合成されている可能性が示唆された。これらの補完的実験により、生体外器官培養系により使用する生物指標は MYP のみならず、ステロイド合成・代謝に関与するタンパク群や、核内受容体 mRNA の発現量の変化が生物指標になる可能性が示された。今後は、これら生殖巣で発現している各種タンパク群の

mRNA の発現を誘起する因子が体腔液中に存在するか否かを確認する予定である。

## 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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等 特になし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

都木 靖彰 (TAKAGI Yasuaki)  
北海道大学・大学院水産科学院・教授  
研究者番号：10212002

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

浦 和寛 (URA Kazuhiro)  
北海道大学・大学院水産科学院・助教  
研究者番号：90360940

### (3) 連携研究者

東藤 孝 (TODO Takashi)  
北海道大学・大学院水産科学院・准教授  
研究者番号：60303111