

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25292128

研究課題名(和文) 次世代シーケンサーを用いたサメ類の繁殖生理機構の解明と応用に向けた実践と発信

研究課題名(英文) Studies on reproductive physiology of sharks using next-generation sequencing

研究代表者

香川 浩彦 (KAGAWA, HIROHIKO)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号：60169381

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,500,000円

研究成果の概要(和文)：サメ類の繁殖保護を図るために、これまで未解明であったサメ類の卵子・精子形成の分子制御機構及び性分化機構を明らかにすることを目的として、モデル魚としてトラザメを用いて、研究を行った。まず、次世代シーケンサーを用いて、視床下部や脳下垂体及び卵殻腺において網羅的遺伝子探索を行い、これまで未同定であった性成熟に係わる生殖腺刺激ホルモン放出ホルモンや生殖腺刺激ホルモン及び卵殻の形成に重要なコラーゲンやコラーゲン合成酵素など多数の遺伝子を初めて同定し、その生理機能について検討した。さらに、軟骨魚類の性分化過程を組織学的に明らかにし、それに係わるステロイドホルモンとその代謝酵素を単離同定した。

研究成果の概要(英文)：In order to preserve shark resources, we studied on the molecular endocrine mechanisms of oogenesis and spermatogenesis of sharks, using cloudy catshark as a model fish. We newly identified genes related to sexual maturation and eggshell formation, such as hypothalamus gonadotropin-releasing hormone, pituitary gonadotropins, collagen and collagen-converting enzymes of the oviducal gland. Physiological roles of some genes were clarified. Moreover, the morphological observation revealed the process of gonad sex differentiation and genes of steroid hormone metabolizing enzymes were identified.

研究分野：農学分野

キーワード：サメ類 生殖生理学 次世代シーケンサー 下垂体 生殖線 卵殻腺 性分化

1. 研究開始当初の背景

FAOの統計では、世界のサメ類の漁獲量は、1950年代から増加の一途をたどり、現在ではインドネシアやインド及び台湾を中心として米国を含む先進国を含めて、約75万トンが水揚げされている重要な漁業対象種である。日本でも、大震災で被害を受けた東北を中心として、約2万6千トンの水揚げがあり、アブラツノザメやネズミザメやアオザメなどを中心に、食肉及びフカヒレの材料としてはもちろん、化粧品等の原材料としてのスクワレンや新規がん抑制因子など新規の利用資源として、その漁業価値は無視できない。一方で、メキシコ湾におけるフカヒレ目的のサメの乱獲が原因で資源量が1/8に減少したことをきっかけに、ジンベイザメ、ホホジロザメ、ウバザメなど10種類のサメ類がワシントン条約(CITES)の対象種となり、それらの国際的な取引に制限がかけられるようになった。さらに、FAOの「サメ類の保護と管理のための国際行動計画」が策定され、日本においても水産総合研究センターを中心として、資源保護の機運が高まっている。しかし、資源調査の観点から、サメの成熟過程や成熟年齢や産卵形態については比較的良好に調べられているものの、資源保護のために非常に重要な繁殖生理学的知見は硬骨魚類に比較してほとんど得られていないといっても過言ではない。さらに、サメ類では硬骨魚類には存在しない卵殻腺や子宮や胎盤及びエピゴナル器官などのサメ類独特の器官が存在しており、繁殖におけるそれら器官の生理的な役割は非常に興味深い。しかし、繁殖に係わるホルモンの分子・遺伝子レベルの知見は散見されるものの(ゾウギンザメゲノムプロジェクトで遺伝子情報が提供されているが、不完全で、遺伝子の機能の情報はない)、多くの場合、分子進化に関する知見がほとんどで、機能解析・機能制御機構についての詳細な研究はなされていない。特に、性分化機構や配偶子形成に重要な役割

をする視床下部-脳下垂体-生殖腺系内分泌機構(生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン: GnRHや生殖腺刺激ホルモン: GTH及びステロイドホルモン転換酵素)に関する分子・遺伝子制御情報はほとんどない。さらに、サメ類では、硬骨魚類には存在しない卵殻腺や子宮や胎盤及びエピゴナル器官などのサメ類独特の生殖付属器官の機能の分子制御機構については全く報告がない。

2. 研究の目的

本研究では、サメ類の卵子や精子形成機構及び性分化機構を明らかにすることを目的として、モデル魚としてトラザメを用いて、(1)迅速に効率よく繁殖に係わる遺伝子を単離するために、次世代シーケンサーを用いて、視床下部-脳下垂体及び卵殻腺における網羅的遺伝子探索を行い、(2)得られた遺伝情報を用いて、視床下部や脳下垂体において繁殖に係わる遺伝子の生理機能を解析する。また、(3)サメ類独特の卵殻腺における卵殻の形成に係わる生理機能を分子生物学的手法を用いて明らかにする。さらに、(4)性分化機構の解明のために、生殖腺の性分化過程を明らかにし、性分化に係わるステロイドホルモン代謝酵素の遺伝子の機能解析を行う。

3. 研究の方法

(1)次世代シーケンサーによる視床下部や脳下垂体及び卵殻腺の網羅的遺伝子探索

トラザメの視床下部や脳下垂体及び卵殻腺における遺伝子プロファイルを、Roche社製の機器(GS Junior)を用い、平均シーケンス長を400塩基対、総リード数を15万程度と想定して解析を行った。

(2)視床下部及び脳下垂体の生理機能の解析

次世代シーケンサー解析及び従来の遺伝子情報により視床下部及び脳下垂体に発現する

遺伝子を同定し、その生理機能を明らかにした。

(3) 卵殻腺の生理機能の解析

網羅的遺伝子探索により、卵殻形成に係わる遺伝子を単離し、その生理機能について、q-PCRやin situ hybridization法を用いて解析する。また、ステロイド受容体遺伝子の単離とその機能解析を行った。

(4) 性分化機構の解明

トラザメの生殖腺の性分化過程の観察

卵の発生過程において経時的に生殖腺および生殖腺付属器官の組織学的観察を行い、サメ類の性分化の特性について明らかにした。

トラザメの性分化に係わるステロイド転換酵素cDNAのクローニングと生理機能

従来の遺伝子情報からトラザメの性分化に係わる遺伝子をクローニングし、その生理機能を明らかにした。

4. 研究成果

(1) 次世代シーケンサーによる視床下部や脳下垂体及び卵殻腺の網羅的遺伝子探索

視床下部や脳下垂体における発現遺伝子群を次世代シーケンサーを用いて解析し、生殖に関わる生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH)、バソトシンなどの視床下部内分泌因子や成長ホルモン、生殖腺刺激ホルモン(GTH)、甲状腺刺激ホルモン(TSH)などの脳下垂体ホルモンの遺伝子群を得ることができた。また、サメ類独特の器官である卵殻腺における次世代シーケンサーを用いた遺伝子の網羅的解析の結果、卵殻腺のbaffle zoneにおいて、159,335のシーケンスから、総数1741個のcontig配列得られ、相同検索から954個(約55%)のcontigが機能分子として同定できた。同定できた遺伝子の中には、type I及びtype II keratinやコラーゲン及びコラーゲン形成に関わる酵素などが存在していることが判明した。

(2) 視床下部及び脳下垂体の生理機能の解析

トラザメの下垂体には、前葉と中葉に加え、サメ類独特の下垂体領域として腹葉が認められる。次世代シーケンサーを用いて得られた遺伝子の内、また、2種類のGTH鎖(FSH、LH)をコードする遺伝子の全配列を、PCR法により同定した。得られた2種類のGTH分子の構造を基に、それらを認識する特異的抗血清を作出した。これを用いて、トラザメの糖タンパク質鎖(GPH鎖)、FSH鎖ならびにLH鎖、TSH鎖分子は、下垂体腹葉で産生されていることを免疫組織化学やin situ hybridization法により明らかにした。最後に、トラザメの3種類のGPH(FSH、LH、TSH)遺伝子の発現量を測定する系を確立し、FSH分子が卵黄形成に寄与する可能性、2種のGTH分子が卵殻の形成に寄与している可能性を示した。

(3) 卵殻腺の生理機能の解析

卵殻腺は組織学的染色(HE染色)、組織学的染色(PAS/AB染色)及び卵殻腺内腔に面するヒダの形状により4つの分泌層(club zone, papillary zone, baffle zone, terminal zone)に分けることができた。そのうち、卵殻を形成する主要な組織であるbaffle zoneでは管状の分泌管が複雑に走り、卵殻腺内腔のヒダに開口して、卵殻物質を分泌する様子が観察された。club zone, papillary zone及びterminal zoneでは中性または酸性ムコ多糖類が産生されていたことから、egg jellyや輸卵管を保護する粘液が産生されていると考えられた。次世代シーケンサーを用いて得られたbaffle zoneに発現する遺伝子を解析したところ、collagen 1、prolyl 4-hydroxylase、simple type keratin、simple type keratin、17-hydroxylaseなどの遺伝子が同定できた。そのうちin situ hybridization法やq-PCR法により、卵殻成分として知られるcollagen

1 及びコラーゲン合成酵素、prolyl 4-hydroxylase の発現を解析した結果、baffle zone において collagen 1 遺伝子が発現していることが判明し、baffle zone が卵殻の主要な構成要素である collagen の場であることが分子生物学的に初めて明らかとなった。また、本実験の結果、baffle zone の部位により、コラーゲン 1 遺伝子の発現量に明瞭な差が見られ、この発現量の差が卵殻形成にどのような役割を果たしているのか興味深い。今後はトラザメ卵殻腺におけるコラーゲン及びその他の粘液多糖類の産生過程やそれらの制御機構を明らかにする予定である。

また、性ステロイドホルモンの受容体であるエストロゲン受容体 (ER) 及びアンドロゲン受容体 (AR) を同定し、その遺伝子発現解析を行った結果、成熟及び未成熟個体の生殖輸管において ER 及び AR の発現が認められ、生殖輸管の機能制御にステロイドホルモンが関与している可能性が示唆された。

(4) 性分化機構の解明

トラザメの生殖腺の性分化過程の観察

トラザメの性分化過程を組織学的に観察した結果、産卵後 60-90 日において性分化が開始することが確認された。生殖輸管系は、産卵後 90 日目にはすでに輸卵管が分化しており、膨大した卵殻腺も分化し、産卵後 180 日目には卵殻腺の上皮組織の発達が認められた。また、産卵後 80 日目の胚を生体外に取り出して、エストラジオール添加した培養液で培養したところ、卵殻腺の大きさが増大し、上皮の発達が認められたことから、エストラジオールが卵殻腺の発達に関与していることが明らかとなった。

また、アカエイの発生に伴う生殖腺の分化過程の組織学的観察も含めた実験の結果、生殖腺の原基は体腔上皮由来の皮質と皮質に取り囲まれる髄質の二重構造をとることが明らか

となった。初期の生殖腺分化の二重構造は硬骨魚類とは異なり、両生類以上の高等動物の生殖腺の分化・形成と同じであった。その後、皮質部分が発達すると卵巣へと分化した。一方、皮質部分が次第に髄質部分に入り込んで行くことで精巣分化が進行した。雄では性分化直後くらいに生殖腺付随機関の交接器の分化が進行した。

トラザメの性分化に係わるステロイド転換酵素 cDNA のクローニングと生理機能

トラザメの性ステロイドホルモン合成系の基礎知見を得るために性ステロイド合成に関わる種々のステロイド代謝酵素について、その cDNA クローニングを行い、現在までに StAR、Cyp11a、Cyp17a、Cyp19a1、3b-hsd 等の cDNA を得た。組織特異発現解析から、StAR、3b-hsd の発現は卵巣、精巣、間腎腺に加えて卵殻腺、精嚢部、エピゴナル器官で、Cyp19a1 の発現は卵巣 (直径 1 mm 以下の卵胞、3~5mm 卵胞) でその発現がみられた。Cyp19a1 の発現は精巣 (精母細胞リッチ領域、精子リッチ領域) ではみられなかった。3b-hsd および Cyp19a1 の発現局在について免疫組織化学法による解析を行ったところ、前者は、精巣および、エピゴナル器官の間質部でクラスターを構成している細胞で、後者ではエピゴナル器官の間質のクラスターを構成している細胞でその局在が見られた。また、Cyp11a1 についても同様な解析を精巣およびエピゴナル器官で行ったところ、3b-hsd と同様であった。今後、卵子形成や卵殻腺形成にこれらのステロイド代謝酵素がどのような役割を果たしているのかを明らかにする必要がある。

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 3 件)

Nozu R, Murakumo K, Matsumoto R, Na kamura M (他 2 名). Gonadal morphology, histology, and endocrinological charact

eristics of immature female whale shark, *Rhincodon typus*. Zool Sci. 査読あり. 32,455-458, 2015.

Tomita T, Nakamura M, Sato K, Takaoka H, Toda M, Kawauchi J, Nakaya K. Onset of buccal pumping in catshark embryos: How breathing develops in the egg capsule. PLoS ONE. 査読あり doi:10.1371/journal.pone.0109504 9:1-8. 2014.

内田 勝久, 松本 昌弘, 兵藤 晋, 渡邊 太郎, 香川 浩彦. トラザメにおける視床下部 - 下垂体 - 生殖腺系とその機能遺伝子探索 比較内分泌学 査読無し 40:83-85. 2014.

[学会発表](計 19 件)

Uchida K, Inoue N, Yokoyama Y, Uchida, Y, Hyodo S, and Kagawa, H. Identification of three glycoprotein hormones from the pituitary gland of cloudy catshark, *Scyliorhinus torazame*. The 8th International Symposium on Fish Endocrinology. 2016.7.01. Lindholmen Conference Centre, Sweden.

内田吉亮、横山裕麻、内田勝久、香川浩彦 トラザメの卵殻腺における卵殻形成関連遺伝子の発現とGnRHα投与が卵殻形成に及ぼす影響の解明. 第41回日本比較内分泌学会大会. 2016.12.10. 北里大学相模原キャンパス(神奈川県・相模原市)

野津 了・松本瑠偉・村雲清美・上迫春香・中村 将・植田啓一・佐藤圭一. 飼育環境下における雄ナンヨウマンタの性成熟～行動・外部形態・内分泌学的特性の報告～. 平成 27 年度日本水産学会春季大会 2016. 03.30. 東京海洋大学(東京都・港区)

内田吉亮・松本昌弘・内田勝久・中村将・兵藤晋・古川史也・香川浩彦. Development of ovarian follicles of the cloudy cat shark, *Scyliorhinus torazame*. 平成27年

度第40回日本比較内分泌学会大会 2015.12.12. JMSアムステールプラザ(広島県・広島市)

内田勝久, 井上夏紀, 横山裕麻, 兵藤晋, 渡邊太郎, 香川浩彦. トラザメの下垂体から同定した3種類の糖タンパク質ホルモン遺伝子. 軟骨魚類研究会-Shark in Tree: Phyloinformatic Challenges in Life Science. 2015.06.19. 理研多細胞システム形成研究センター(兵庫県・神戸市)

内田吉亮・内田勝久・松本昌弘・宗石瞬・香川浩彦. トラザメ卵殻腺の形態と機能. 軟骨魚類研究会-Shark in Tree: Phyloinformatic Challenges in Life Science. 2015.06.19. 理研多細胞システム形成研究センター(兵庫県・神戸市)

内田勝久・井上夏紀・兵藤 晋・香川浩彦 トラザメの下垂体における糖タンパク質ホルモン cDNA のクローニングと発現部位の同定. 日本動物学会第 86 回新潟大会. 2015.09.18. 新潟コンベンションセンター(新潟県・新潟市)

Uchida K., Hyodo S., Watanabe T., Kagawa H. Morphological and molecular approaches of pituitary gland in the cloudy catshark, *Scyliorhinus torazame*. 7th Intercongress Symposium of AOSCE. 2014.03.20. The National Taiwan Ocean University 台湾

Matsumoto M., Uchida K., Watanabe T., Hyodo S., Nakamura M., Sato K., Kagawa H. Egg shell formation in the oviducal gland of the cloudy catshark *Scyliorhinus torazame*, Eoasmobranchs 7th Intercongress Symposium of AOSCE 2014.03.20. The National Taiwan Ocean University 台湾

松本昌弘・内田勝久・中村将・佐藤圭一・兵藤晋・渡邊太郎・小林亨・田中宏典・香川浩彦. トラザメの卵殻腺の組織学的構造と機

能. 平成26年度日本水産学会秋季大会
2014.09.20. 九州大学(福岡県・福岡市)
中村將 サメ・エイの生殖. 軟骨魚類の生理学・繁殖学研究者交流座談会. 2014.06.14.
沖縄県立名護青少年の家(沖縄県・名護市)
内田 吉亮・松本 昌弘・内田 勝久・原 彰彦・香川 浩彦 トラザメの卵巣における卵濾胞の発達過程 軟骨魚類の生理学・繁殖学研究者交流座談会. 2014.06.14. 沖縄県立名護青少年の家(沖縄県・名護市)
松本 昌弘・内田 勝久・中村 將・佐藤 圭一・兵藤 晋・渡邊 太郎・小林 亨・香川浩彦 トラザメの生殖輸管、特に卵殻腺について 軟骨魚類の生理学・繁殖学研究者交流座談会 2014.06.14. 沖縄県立名護青少年の家(沖縄県・名護市)
松本昌弘・内田勝久・中村將・佐藤圭一・兵藤晋・小林亨・田中宏典・香川浩彦 トラザメ生殖輸管の組織学的及び組織化学的観察 平成 25 年度日本水産学会秋季大会 2013.09.20. 三重大学(三重県・津市)
内田勝久 最古の脊椎動物の下垂体:その機能と進化を探る. 東京大学大気海洋研究所共同利用研究集会, “海洋生物のさまざまな適応戦略” 2013.06.21. 東京大学大気海洋研究所(千葉県・柏市)
小林 亨 サメのステロイドホルモン合成に関する先行研究. 第38回日本比較内分泌学会大会 サテライトシンポジウム:サメ類の生理学研究の現状と展望. 2013.10.24. 宮崎市民プラザ(宮崎県・宮崎市)
中村將・高岡博子・村雲清美・兵藤晋・佐藤圭一. トラザメの性分化 第38回日本比較内分泌学会大会 サテライトシンポジウム:サメ類の生理学研究の現状と展望. 2013.10.24. 宮崎市民プラザ(宮崎県・宮崎市)
内田勝久・兵藤晋・渡邊太郎・香川浩彦. トラザメにおける視床下部-下垂体-生殖腺系とその機能遺伝子探索. 第38回日本比較内

分泌学会大会 サテライトシンポジウム:サメ類の生理学研究の現状と展望 2013.10.24. 宮崎市民プラザ(宮崎県・宮崎市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

香川 浩彦 (KAGAWA HIROHIKO)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号: 60169381

(2)研究分担者

内田 勝久 (UCHIDA KATSUHISA)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号: 50360508

中村 將 (NAKAMURA MASARU)

一般財団法人沖縄美ら島財団・総合研究センター・動物研究室・参与

研究者番号 10101734

小林 亨 (KOBAYASHI TOHRU)

静岡県立大学・食品栄養科学部・教授

研究者番号: 30221972

(3)連携研究者

兵藤 晋 (HYOUDO SUSUMU)

東京大学・大気海洋研究所・教授

研究者番号: 40222244