

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25850143

研究課題名(和文) 甲殻類の卵巣発達の内分泌制御機構：仲介～標的因子の網羅的解析

研究課題名(英文) Endocrine regulation of crustacean vitellogenesis: transcriptome and proteome analyses of the ovary

研究代表者

筒井 直昭 (Tsutsui, Naoaki)

岡山大学・理学部・助教

研究者番号：00643785

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：甲殻類の生殖機能は、眼柄内のX器官/サイナス腺から分泌される主要なペプチドホルモン群に属する卵黄形成抑制ホルモンにより統御されている。このホルモンの卵巣における作用機構を明らかにするため、クルマエビ卵巣の発現遺伝子とタンパク質の網羅的解析を行った。成熟の制御に関わると推定される複数のホルモン様因子が卵巣に発現していることを見出したほか、生殖細胞の雌化、形成、維持などに関連する因子をタンパク質レベルで同定した。

研究成果の概要(英文)：Crustacean vitellogenesis is regulated by vitellogenesis-inhibiting hormone (VIH) from the X-organ/sinus gland neurosecretory system in the eyestalks. To investigate the mode of action of VIH in the ovary, transcriptome and proteome analyses were performed. Transcriptome analyses revealed that several hormonal factors presumed to be involved in the regulation of vitellogenesis or development of secondary sex characteristics, suggesting that peripheral tissues contribute to the regulation of ovarian development. In addition, sex-lethal, piwi, and pumilio, which were involved in the regulation of the renewal and differentiation of germline stem cell in *Drosophila*, were identified by proteome analyses.

研究分野：農学

キーワード：甲殻類 生理学 卵黄形成 ホルモン

1. 研究開始当初の背景

(1) 甲殻類では、複眼を支える眼柄という部分を切除することによって卵巣の発達が促されることから、眼柄内にある内分泌制御の中核であるX器官/サイナス腺から分泌される因子による成熟抑制機構の存在が古くから示唆されていた。その後1990年代になって、この因子はペプチドホルモンであるということが明らかとなった。

(2) 研究代表者はこれまでに、クルマエビの卵巣に蓄積される主要なタンパク質（ピテロジェニン）の遺伝子をクローニングし、その発現が肝臓と卵巣にみられることを示した。また、X器官/サイナス腺に含まれる複数のペプチドに、培養した卵巣片でのピテロジェニン遺伝子発現を抑制する活性、すなわち卵巣形成抑制活性が認められることを明らかにした。

他の甲殻類でも似たような活性を示す分子、もしくはそのホルモンの遺伝子発現を減少させることでピテロジェニンの遺伝子発現が増加する分子が卵巣形成抑制ホルモンとして報告されている。これらはすべて甲殻類血糖上昇ホルモンのファミリーに属している。

(3)このように、幾つかの甲殻類において卵巣形成抑制ホルモンが明らかにされているものの、ホルモンの受容からピテロジェニン遺伝子の発現制御までの経路や、同遺伝子の発現抑制以外の卵巣における作用は不明である。エビ養殖量は世界的に増加を続けており、その多くはクルマエビの近縁種である。養殖の拡大に伴って、産卵可能な親エビの確保が難しくなりつつある状況を鑑みると、クルマエビをモデルとして成熟制御機構を明らかにし、それに基づいた人為催熟法を開発することが必要と考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、甲殻類において内分泌制御の中核をなすX器官/サイナス腺から分泌される卵巣形成抑制ホルモンが、卵巣においてピテロジェニン発現を抑制するに至る機構を探ることを目的とした。具体的には、クルマエビ卵巣の培養系を用い、ホルモンの作用によって1) 発現量が変化する遺伝子、2) 存在量に変化するタンパク質・ペプチドなど、についてそれぞれ網羅的に解析し、両者の解析結果を基にホルモンの作用により卵巣内でどのような変化がもたらされているかを把握することで、卵巣形成抑制ホルモンの作用機構の推定を試みた。

3. 研究の方法

(1) 卵巣で発現する遺伝子の網羅的解析

クルマエビの卵巣形成抑制ホルモンの1つであるSGP-1を含む培地（実験群）、およびホルモン不含の培地（対照群）、それぞれにお

いて培養した卵巣片からRNAの調製、ライブラリーの作製を行い、MiseqによってRNAシーケンシングを行った。実験群と対照群の配列データを用いてコンティグを新規アセンブルし、発現遺伝子をデータベース化した後、相同性の解析などを行った。また、実験群と対照群のリード数を基に発現量を解析した。

(2) 卵巣に含まれるタンパク質の網羅的解析

卵巣から30%アセトニトリルを用いてタンパク質を抽出し、逆相高速液体クロマトグラフィーを用いて分画した。各分画に含まれるタンパク質をトリプシン消化によって断片化した後、高速液体クロマトグラフ質量分析装置に供した。上述の(1)で構築した卵巣発現遺伝子のデータベースを基にタンパク質の同定を行った。

4. 研究成果

(1) クルマエビの卵巣で発現している遺伝子の網羅的解析

RNAシーケンシング解析で得られた配列の新規アセンブルにより、N50長が1,130 bの63,699コンティグが構築された。総塩基配列は41.5 Mbであった。

(2) 卵巣で発現しているホルモン様遺伝子

卵巣において4種類のホルモン様因子が発現している事が見出された。

甲殻類雌性ホルモン

アオガニで近年発見されたホルモンである。X器官/サイナス腺で発現し、雌の第二次性徴を制御している。対してクルマエビの甲殻類雌性ホルモン様遺伝子の発現は生殖腺に限定されていた。発現量は卵巣で高く、精巣ではごく低かったことから、クルマエビでも雌性ホルモンとして雌性形質発現や卵巣発達などの制御に関わる可能性が考えられる。卵巣形成抑制ホルモンの作用により発現が上昇する傾向がみられた。

ニューロパーシン

昆虫の脳で産生されるホルモンで、体液調節、血糖調節、卵成熟制御など多様な生理活性を示す。ごく最近になってヨシエビの卵成熟の抑制に関わるという報告がなされたことから、近縁であるクルマエビでも同様の作用を持つと推測されるが、卵巣形成抑制ホルモンによって発現は減少する傾向にあった。

甲殻類血糖上昇ホルモンファミリー

本研究の対象である卵巣形成抑制ホルモンなどを含むペプチドファミリーである。今回新たに発見された分子種は、卵巣以外に脳や胸部神経節でも発現が確認された。また、卵巣形成抑制ホルモンにより発現が減少する傾向がみられた。加えて、同ファミリーにおいて保存されている6つのシステイン残基のうち、3番目と4番目の間が1残基長いというこれまでに報告されていない構造上の特徴を有していた。

パーシコン

昆虫や甲殻類の中樞神経系に存在するホルモンで、アクチビンやインヒピンと同じく形質転換増殖因子-スーパーファミリーに属し、 β のヘテロ2量体からなる。クルマエビの卵巢では両サブユニットの遺伝子発現が確認され、 β については卵黄形成抑制ホルモンによる顕著な発現変動は認められず、 α は減少傾向にあった。

以上のホルモン様分子は、これまで主に中枢からの情報伝達に関わるとして報告されてきた。卵巢のどの部位でこれらが産生されているか今のところは不明であるが、解析した発現遺伝子中には、一般的に分泌顆粒にみられることの多いペプチジルグリシン-アミド化酵素も含まれていたことから、ホルモン分泌に関与する細胞群が存在していると推定される。脊椎動物では、生殖腺が産生する複数のタンパク質ホルモンについて、生殖腺の機能調節を含む多彩な作用が明らかにされているが、無脊椎動物におけるそれらについてはほとんど知見が得られていなかった。クルマエビの卵巢で発現するホルモン様分子の機能を明らかにするとともに、卵黄形成抑制ホルモンとの関連を調べることにより、末梢組織の寄与を組み入れた甲殻類の新たな成熟制御ネットワークの解明につながる事が期待される。

(3) その他の特徴的な発現遺伝子

卵黄形成抑制ホルモンを含む甲殻類血糖上昇ホルモンファミリーの受容体と考えられているGタンパク質共役受容体、および膜型グアニル酸シクラーゼについては、それぞれ2種類と1種類含まれていた。Gタンパク質サブユニットのうちGsは実験群で減少傾向を示し、Go、Gi、Gqは顕著な変化を示さなかった。

卵黄形成抑制ホルモンの作用によりピテロジェニン遺伝子自体は大きく減少していたことに加え、ピテロジェニンのプロセシングに関わるズブチシリン様プロテアーゼの発現も減少傾向にあった。その他にプロスタグランジン合成に関わる酵素群として、ホスホリパーゼA2、シクロオキシゲナーゼ、プロスタグランジンEおよびF合成酵素が発現していた。これらのうちシクロオキシゲナーゼについては、実験群で発現が上昇する傾向がみられた。エクジステロイド受容体やレチノイドX受容体、ファルネシル酸O-メチルトランスフェラーゼなどについては顕著な変化はなく、トロンボスポンジン、膜型プロゲステロン受容体などは減少傾向に、グルタチオンペルオキシダーゼ、シトクロムP450 (CYP4V18)、ガレクチン、キチナーゼなどは増加傾向にあった。

全体としては、63,699個のコンティグのうち7,834個が実験群で高い発現を、8,466個で高い発現 (10倍以上の差) を示すことが分かった。一方、遺伝子の相同性解析におい

ては4割程度のコンティグが既知の遺伝子との有意な相同性を示さず、機能の推定ができなかった。これらの配列データの活用法については今後さらに検討していく必要がある。

(4) 卵巢タンパク質の網羅的解析

高速液体クロマトグラフ質量分析装置によって、卵巢に含まれるタンパク質のうち約150種類を同定した。リボソームタンパク質、RNA結合タンパク質、転写開始因子4E・4H・5A、伸長因子1-、C-Myc結合タンパク質など、約半数は遺伝子の転写や翻訳過程に関わるものであった。また1/4は、ATP合成酵素共役因子、トランスアルドラーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、スペルミジン合成酵素、グルタチオンS-転移酵素、ロイコトリエンA-4加水分解酵素などの代謝に関わるものであった。その他に特徴的なものとして、ショウジョウバエにおいて生殖細胞の雌化に関わるsex-lethal、生殖細胞の形成や維持に必須とされるpumilioとpiwi、幹細胞の増殖や維持を制御するmusashiなどをタンパク質レベルで同定することができた。

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)

[雑誌論文](計6件)

B. J. Kang, T. Okutsu, N. Tsutsui, J. Shinji, S.-H. Bae, M. N. Wilder (2014). Dynamics of Vitellogenin and Vitellogenesis-Inhibiting Hormone Levels in Adult and Subadult Whiteleg Shrimp, *Litopenaeus vannamei*: Relation to Molting and Eystalk Ablation. Biol. reprod. 90: 12, 1-10. 査読有.
DOI 10.1095/biolreprod.113.112243

N. Tsutsui, T. Ohira, T. Okutsu, J. Shinji, S.-H. Bae, B. J. Kang, M. N. Wilder, (2013). Molecular cloning of a cDNA encoding vitellogenesis-inhibiting hormone in the whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* and preparation of its recombinant peptide using an *E. coli* expression system. Fish. Sci. 79: 357-365. 査読有.
DOI 10.1007/s12562-013-0603-z

H. Katayama, N. Kubota, H. Hojo, A. Okada, S. Kotaka, N. Tsutsui, T. Ohira (2014). Direct evidence for the function of crustacean insulin-like androgenic gland factor (IAG): Total chemical synthesis of IAG. Bioorg. Med. Chem. 22: 5783-5789. 査読有.
DOI: 10.1016/j.bmc.2014.09.031

筒井 直昭 (2014). クルマエビのビテロジェニン遺伝子発現に対する眼柄内ペプチドの影響. 日本水産学会誌 80, 531. 査読無.

https://www.jstage.jst.go.jp/A_PRedirectJournalInit/-char/ja/?sryCd=suisan&noVol=80&noIssue=4&kijiCd=80_h25-75&screenID=AF06S010

M. Fukushima, S. Kotaka, N. Tsutsui, K. Asahina, S. Izumi, T. Ohira (2015). Isolation of crustacean hyperglycemic hormone-family peptides with vitellogenesis-inhibiting activity from the shiba shrimp *Metapenaeus joyneri*. Fish. Sci. 81: 65-72. 査読有.

DOI: 10.1007/s12562-014-0834-7

W. Thongda, J. S. Chung, N. Tsutsui, N. Zmora, A. Katenta (2015). Seasonal variations in reproductive activity of the blue crab, *Callinectes sapidus*: Vitellogenin expression and levels of vitellogenin in the hemolymph during ovarian development. Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol. 179: 35-43. 査読有.

DOI: 10.1016/j.cbpa.2014.08.019

〔学会発表〕(計6件)

筒井 直昭, 小林 靖尚, 泉川 晃一, 坂本 竜哉. 卵黄形成抑制ホルモンの作用機序解明に向けたクルマエビ卵巣の遺伝子の網羅的解析. 平成26年度日本水産学会秋季大会. 2014年9月20日. 九州大学 (福岡県福岡市).

T. Ohira, A. Okada, S. Kotaka, N. Tsutsui, N. Kubota, H. Katayama. An *in vitro* bioassay for an androgenic gland hormone activity using the ovarian culture of the kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus*. 第39回日本比較内分泌学会大会. 2014年11月8日. 岡崎コンファレンスセンター (愛知県岡崎市).

甲高 彩華, 筒井 直昭, 大平 剛. クルマエビの卵巣で発現する甲殻類雌性ホルモン (CFSH) のcDNAクローニング. 平成27年度日本水産学会春季大会. 2015年3月30日. 東京海洋大学 (東京都港区).

6. 研究組織

(1)研究代表者

筒井 直昭 (TSUTSUI NAOAKI)

岡山大学・理学部附属臨海実験所・助教

研究者番号: 00643785

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし