

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26660167

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)Studies to find a mechanism of gonadal growth stimulation in sea urchin

研究代表者

都木 靖彰 (Takagi, Yasuaki)

北海道大学・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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ウニ生殖巣の肥大化メカニズムを研究するツールとして、生殖巣器官培養系を確立し、これを用いて生殖巣の肥大に重要な主要卵黄タンパク質(MYP)の合成を誘起する因子を探索した。仮説としてウニ体腔液中の因子と核内受容体に結合する脂質を設定し、ウニ生殖巣が肥大した時期の体腔液および肥大したウニ生殖巣から抽出した総脂質を添加して生殖巣を培養し、MYP mRNA量を定量PCRにより測定したが、どちらも優位な変動は認められなかった。本研究期間において、ウニ生殖巣中のMYP mRNAの発現を誘起する因子の決定はできなかった。今後、MYPの合成に関与する核内受容体を特定しそのリガンドを添加する実験が必要である。

研究成果の概要(英文)：We developed organ culture system using the sea urchin gonads for analysis of endocrine system during the gonadal growth. To date, it is well known that growth of gonad by synthesis and stored of MYP. The aim of this present study is identification of hormonal chemicals to induce the gonadal growth in sea urchin. We performed organ culture using the sea urchin gonads in the coelomic fluids of sea urchin, we measured MYP mRNA levels in the gonads by qPCR after incubation for 3days. The levels of MYP mRNA were no changing after incubation. It is suggested that MYP synthesis by nuclear receptor in gonads. Moreover, we extracted total lipids fraction from the gonads of sea urchin, and then gonads were incubated in the medium containing total lipids. However, MYP mRNA was no induced in this experiment. In the present study, we can't identify the gonadal stimulation hormone in sea urchin. In future, we will try the comparison of coelomic fluids compounds during gonadal growth.

研究分野：水産生物生理学

キーワード：ウニ 生殖巣 生殖腺刺激ホルモン 脂質代謝 器官培養 MYP ステロイド合成 ペプチド

1. 研究開始当初の背景

一般に魚類等の卵生動物の主要卵黄タンパク質はビテロジェニン、ビテロジェニン様タンパク質であることが知られている。一方、海産無脊椎動物の内、ウニ、ナマコなど棘皮動物では主要卵黄タンパク質(Major Yolk Protein: MYP)は、ビテロジェンとはアミノ酸の相同性の異なる、トランスフェリン様タンパク質である。この MYP はウニの雌雄生殖巣中に最も多量に含まれている。また、この MYP の合成・蓄積によりウニ雌雄生殖巣の肥大が起こる。雌では、生殖巣中で合成・蓄積された MYP の一部が発達中の卵母細胞に取り込まれ卵成長が起こる。一方、雄では生殖巣中に蓄積された MYP は精子形成に伴い栄養源として利用され消失する。一般に魚類では、ビテロジェニンは生殖腺刺激ホルモンが卵巣に作用し、エストロゲン(雌性ステロイドホルモン)を合成し、血中を通り肝臓に作用しエストロゲン受容体を介して肝臓においてビテロジェニンが合成される。合成されたビテロジェニンは血中を介して発達中の卵母細胞に取り込まれ蓄積される。ウニにおいて、主要卵黄タンパク質の合成機構は不明であり、魚類のように生殖腺刺激ホルモンの作用により一連の主要卵黄タンパク質が合成され、卵に蓄積されているのかも明らかにされていない。ウニの MYP の合成はこれまでに核内受容体を介して合成されている可能性が示唆されてきた。我々は、この MYP の合成に関与する核内受容体の候補を次世代シーケンス解析および発現解析により 6 種類の核内受容体を候補とした。これらの核内受容体は、コレステロール代謝物、脂肪酸、レチノール代謝物をリガンドとする核内受容体であることが判明した。そこで、MYP の合成に必要な核内受容体の発現誘導およびそれらのリガンドを合成・代謝誘導する、誘起ホルモン、すなわち生殖腺刺激ホルモンが存在することが推察された。魚類において生殖腺刺激ホルモンは脳下垂体から分泌されることが知られている。しかし、ウニ類など棘皮動物では、脳下垂体が存在しない。他の無脊椎動物では、主に神経から、分泌される成分がホルモンとして機能していることが古くから知られている。ウニ類においても神経から分泌される成分が生殖巣に作用し、ウニ生殖巣の肥大・卵成長に関する MYP が合成誘導されていると考えた。この生殖腺刺激ホルモンの存在を確認し、同定することにより海産無脊椎動物の生殖腺刺激ホルモンの存在が明らかになれば、ウニの生殖巣の肥大を促進する飼育環境、人工餌料の開発に繋がる。

2. 研究の目的

本研究課題では、ウニ生殖巣の肥大を誘起するホルモン、生殖腺刺激ホルモンが存在するのかを明らかにすること。ウニ生殖巣の肥大および卵成長に深く関与する MYP の合成

機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

生殖巣が未熟で小さいキタムラサキウニを採取し実験に使用した。生殖腺刺激ホルモンの探索のため、上記生殖巣を用いた生体外器官培養系の確立を行った。生殖の生体外培養系を確立後、ウニ体腔液を用いて、培養液に添加し、MYP の mRNA の発現量変化を定量系 PCR 法(qPCR)により定量した。MYP の発現調節を行っている核内受容体の特定のため、ウニ生殖巣中で発現している MYP 遺伝子のプロモーター領域のクローニングを行った。クローニングには、キタムラサキウニ精子を採取し、定法に従ってゲノム DNA を抽出した。抽出したゲノム DNA を鋳型にゲノムウォーキング法を用いて、MYP プロモーター領域のクローニングを行った。クローニングした DNA 配列からデータベースを用いて、結合する核内受容体の推測を行った。次に、MYP プロモーター領域に結合する可能性がある核内受容体(COUP-TF)の qPCR 測定系を確立し、確立した mRNA 測定系を用いて、ウニ生殖巣の各成熟段階に伴い発現変動を解析し COUP-TF と MYPmRNA の発現変動に相関があるか確認した。また、COUP-TF の特異抗体を作製した。MYP プロモーター領域の COUP-TF の結合配列のオリゴプローブを作製し、COUP-TF に対する特異抗体、ウニ生殖巣中の核内タンパク質抽出物を用いてゲルシフトアッセイ法により COUP-TF が MYP プロモーター領域に結合するか確認した。ゲルシフトアッセイ法により COUP-TF が MYP プロモーター領域に結合する可能性が認められたため、ウニ生殖巣から総脂質を抽出し、上記の確立したウニ生殖巣器官培養系を用いて、培養液に総脂質画分を添加し、MYPmRNA および COUP-TFmRNA 発現量の変化を qPCR 法により解析した。

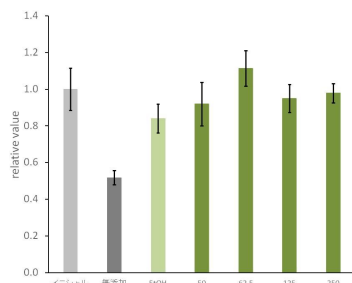
4. 研究成果

キタムラサキウニ生殖巣の器官培養系(3日間)の確立を行った。ウニ生殖巣を約 2mm 各片に裁断し、生殖巣片を培養液に浸漬した埋没法を用いて生体外器官培養系の確立を行った。経時的に(0, 1, 2, 3日後)の生殖巣から総 RNA を抽出し cDNA を合成後、内部標準遺伝子である b-actin, GAPDH を用いて qPCR 法により、各 mRNA の発現量変化を調べた結果、1 日後に発現量が低下したが、その後発現量に変化は認められなかった。このことから、3 日間の短期生体外器官培養系が確立できたと判断した。確立したウニ生殖巣の生体外器官培養系を用いて、キタムラサキウニ体腔液を用いて、培養液として体腔液中で生殖巣を 3 日間培養し、MYPmRNA の発現量の変化を解析した結果、発現量変化は認められなかった。

次に、MYP の発現調節機構を解明するために、ウニ生殖巣で発現している MYP 遺伝子のプロモーター領域のクローニングを行った。

キタムラサキウニ精子由来のゲノム DNA を用いて MYP プロモーター領域のクローニングを行った結果、約 1kbp のプロモーター領域 DNA をクローニングした。得られた配列をデータベースを用いて、結合する核内受容体を検索した結果、COUP-TF 結合配列が認められた。これまでに、我々はキタムラサキウニ COUP-TF の全長 cDNA のクローニングを終了している。そこで、COUP-TF cDNA を用いて、大腸菌発現系を用いて COUP-TF のリコンビナントタンパク質を合成した。合成したリコンビナントタンパク質を精製し、家兎に免疫注射しキタムラサキウニ COUP-TF に対する特異抗体を作製した。作製した特異抗体の特異性は、キタムラサキウニ生殖巣から核内タンパク質を抽出しウェスタンブロット解析により行った。また、COUP-TF mRNA の発現定量系 (qPCR) の確立を行い、キタムラサキウニ生殖巣の各成熟段階に伴う、COUP-TF mRNA, MYP mRNA の発現量変化を調べ、両発現量変化に相関が認められるか調べた結果、強い正の相関が認められた。そこで、COUP-TF が MYP プロモーター領域に結合するかゲルシフトアッセイ解析により調べた。上記作製した COUP-TF に対する特異抗体、キタムラサキウニ生殖巣から核内タンパク質抽出物を用いて、COUP-TF 結合配列をプローブとし、ゲルシフトアッセイ解析を行った結果、結合配列に核内タンパク質が結合したと思われるシフトバンドが認められた。さらに COUP-TF 特異抗体を用いた場合、スーパーシフトバンドが認められた。このことから、MYP mRNA の発現調節には COUP-TF が関与していることが強く示唆された。

これまでに、脊椎動物において COUP-TF のリガンドはレチノール代謝物である可能性が示されている。また、我々は、キタムラサキウニに魚肉を給餌すると生殖巣が肥大すると共に生殖巣中の MYP 量が増加することを確認している。そこで、MYP の発現にはウニ生殖巣中の脂溶性成分が関与していると推測し、生殖巣から、定法に従って、総脂質画分を抽出した。この画分にはレチノール代謝物、脂肪酸等が含まれている。この総脂質画分を用いて、上記で確立した生殖巣生体外器官培養系を用いて、培養液に総脂質画分を種々の濃度で添加し、経時的に MYP mRNA の発現量変化を解析した。その結果、3 日後に発現量が増加する傾向は見られたが有意な発現量変化は認められなかった (図 1)。



(図 1)

キタムラサキウニ体腔液を用いて、生殖巣を培養し、COUP-TF の mRNA の発現量変化を解析したが、COUP-TF mRNA の発現量に変化は認められなかった。

最後に、他の無脊椎動物では神経ペプチドが配偶子形成に関与していることが報告されている。そこで、ゲノム解読が終了しているアメリカムラサキウニゲノム上にインスリン受容体が存在するか解析を行った結果、1 種類のインスリン受容体がコードされていることが明らかになった。そこで、これまでに構築しているキタムラサキウニ生殖巣の EST ライブラリーを用いて、インスリン受容体のホモログを検索した結果、ウニ生殖巣にインスリン受容体が発現していることが明らかになった。そこで、EST ライブラリーからキタムラサキウニインスリン受容体 mRNA の発現定量解析法を確立し、生殖巣の肥大に伴いインスリン受容体 mRNA の発現量が増加するか調べた結果、肥大時にインスリン受容体 mRNA の発現量が増加することを確認した。このことから、ウニ生殖巣の肥大誘起ホルモン (生殖腺刺激ホルモン) はインスリン様物質である可能性が示された。本研究期間内ではウニ生殖腺刺激ホルモンの同定には至らなかった。しかし、ウニ生殖巣の肥大時にインスリン受容体発現量が増加したことから、今後、この受容体に結合する成分 (ペプチドホルモン) を生体内で探索する必要性が課題として残された。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

1. 津江志緒利・佐藤卓史・長谷美佳・西宮攻・浦和寛・都木靖彰「ウニ生殖巣の肥大に関する研究 3: キタムラサキウニ MYP プロモーター領域のクローニング」平成 28 年度日本水産学会秋季大会, 近畿大学奈良キャンパス (奈良県, 奈良市), 2016 年 9 月 10 日

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

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

東藤 孝 (TODO, Takashi)

北海道大学・大学院水産科学研究院・准教授
研究者番号：60303111

(4) 研究協力者

()