

令和 6 年 5 月 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05778

研究課題名(和文) 低コストウニ用配合飼料の開発を目指した核内受容体COUP-TFのリガンドの特定

研究課題名(英文) Identification of the ligand of the nuclear receptor COUP-TF for the development of low-cost compound feed for sea urchins

研究代表者

浦 和寛 (Ura, Kazuhiro)

北海道大学・水産科学研究院・准教授

研究者番号：90360940

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：キタムラサキウニCOUP-TFの発現ベクターを動物細胞に導入しレポーターアッセイ系を構築した。ウニ生殖巣中の総脂質をシリカゲルクロマトグラフィーにより4つに分画した。4つのフラクションの内、Fraction 2がCOUP-TFの活性を高めた。さらに、Fraction2にはレチノイン酸が含まれていないことが明らかになった。このことから、ウニ生殖巣の総脂質中にはレチノイン酸以外のCOUP-TFのリガンドが存在する可能性が示された。さらに生体でMYP遺伝子を誘導できるか生殖巣器官培養系を用いたがMYP遺伝子の誘導はできなかった。今後Fraction2をさらに分画し添加実験する必要性が残された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題では、脊椎動物から無脊椎動物まで有している核内受容体COUP-TFのリガンドを明らかにすることである。リガンドが不明なCOUP-TFのリガンドを明らかにすることは、学術的にインパクトは高い。また、リガンドを含む天然素材を用いてウニ用配合飼料の設計に応用することは、ウニ養殖技術開発に貢献する。

研究成果の概要(英文)：An expression vector of *Mesocentrotus nudus* COUP-TF was introduced into animal cells to construct a reporter assay system. It was clarified that the total lipid in the sea urchin gonad increases the activity of COUP-TF in a concentration-dependent manner. In addition, the total lipid was fractionated into four by silica gel chromatography (Fraction 1-4). In the four fractions, Fraction 2 increased the activity of COUP-TF. Furthermore, it was revealed that Fraction 2 does not contain retinoic acid. This indicates that COUP-TF ligands other than retinoic acid may be present in the total lipids of the sea urchin gonads. Furthermore, we used a gonad organ culture system to induce if the MYP gene could be induced in vivo, but the MYP gene could not be induced. There remains a need to further fractionate Fraction2 and conduct addition experiments in the future.

研究分野：海産無脊椎動物生理学

キーワード：ウニ 生殖巣 核内受容体 COUP-TF リガンド レポーターアッセイ

1. 研究開始当初の背景

現在、北海道沿岸ではウニ増殖事業が展開されているが、経済的に効率の良い養殖技術の展開も必要である。ウニの種苗生産技術は確立されているものの、ウニの可食部である生殖巣を商品レベルにす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配合飼料の開発が盛んに行われており、それら配合飼料が魚類養殖の成功を支えてきた。近年、北海道のみならず日本各地で海藻群落が消失する「磯焼け」海域が拡大しており、商品価値のないウニが大量に生息している。これら磯焼けウニを商品にする養殖技術開発が盛んに行われているが、いまだ事業性のある養殖技術開発は確立されていない。ウニ養殖において生殖巣を色・大きさ・味において商品レベルにまでする優れた配合飼料が求められているが現存しない。その大きな理由として、ウニ類生殖巣肥大機構に関する研究が極めて限られている現状を挙げることができる。ウニ類の雌雄生殖巣の肥大時には、主要卵黄タンパク質(Major Yolk Protein: MYP) や糖、脂質などが蓄積させることが知られている。ウニ類の生殖巣は、配偶子形成器官であると同時に脊椎動物の肝臓のような栄養蓄積器官でもある。脊椎動物の肝臓におけるタンパク質、糖、脂質などは様々な核内受容体によってそれらの合成が制御されている。アメリカムラサキウニにおいて、2006年に全ゲノム解読が終了し、ウニゲノム上に33種類の核内受容体遺伝子がコードされていることが明らかにされている。申請者は、これまでにウニ生殖巣の肥大に伴い発現する22種類の核内受容体を同定している。脊椎動物の肝臓においてタンパク質、糖、脂質の合成制御に深く関与する核内受容体は、リガンドが不明な COUP-TF であることが知られており、申請者は、ウニ生殖巣においても COUP-TF が肥大時に最も発現量が増加することを確認している。さらに、この COUP-TF が MYP プロモーター領域に結合し MYP の発現を制御している可能性もゲルシフトアッセイ解析により示している。一般的に核内受容体は、リガンドと呼ばれる化学成分が核内受容体に結合することで遺伝子発現を調節し生理現象を制御している。しかし、この COUP-TF のリガンドは脊椎動物も含め不明である。魚類においては、核内受容体の一つエストロゲン受容体のリガンドである女性ステロイドホルモン (E2) を餌に混合し仔魚期に投与することで全メス化に成功している。このように核内受容体を活性化することにより生理現象を制御することが可能である。そのため COUP-TF を活性化させることができれば、ウニ雌雄生殖巣の肥大に伴う栄養成分の合成・蓄積を促進できると推察される。

2. 研究の目的

本研究の最終目標は、国内外で実現できていない低コストウニ用配合飼料の開発を目指している。この最終目標を実現するために、本研究では、ウニ生殖巣の肥大に伴う栄養の合成・蓄積に最も関与している核内受容体 COUP-TF のリガンドを特定することを第一目的とする。魚類においては、核内受容体の一つエストロゲン受容体のリガンドである女性ステロイドホルモン (E2) を餌に混合し仔魚期に投与することで全メス化に成功している。このように核内受容体を活性化することにより生理現象を制御することが可能である。核内受容体 COUP-TF は、無脊椎動物から脊椎動物において存在し、タンパク質・糖・脂質類の合成を制御しているが、未だ生体内のリガンドは不明である。ウニをモデルとし、無脊椎動物から脊椎動物までの COUP-TF の生体内リガンドを明らかにする。さらに、これまで開発されているウニ用配合飼料は、魚類用配合飼料を参考に栄養要求性だけを基に設計されており、低コストで色・大きさ・味の点で商品レベルのウニ生殖巣の作出は実現できていない。申請者は、ウニ生殖巣の肥大時にタンパク質、糖、脂質類の合成・蓄積が核内受容体の制御により成されている科学的根拠を基にして、本研究で明らかにする COUP-TF のリガンドを含む低コスト天然素材を用いウニ用配合飼料を設計に応用することを目的とする。

3. 研究の方法

MYP プロモーター領域 DNA と蛍光タンパク質 (ルシフェラーゼ) を組み込んだプラスミドベクター (pGL4.10) およびキタムラサキウニ COUP-TF の発現ベクター (pcDNA3.1) を動物細胞 (COS9 あるいは HepG2) に導入し共発現させるデュアルルシフェラーゼレポーターアッセイ系を構築する。このレポーターアッセイ系を用いて、リガンドの探索を行う。核内受容体のリガンドは脂溶性であることから、まず、ウニ生殖巣から総脂質を抽出し、抽出物を用いて活性度合いを評価する。活性が認められたら、シリカゲルクロマトグラフィーにより分画し、各分画をレポーターアッセイ系で活性を評価し活性の高い分画を得る。コントロールとして、これまでマウス COUP-TF を活性化させると報告されているレチノイン酸を用いて活性度合いを評価する。さらに絞り込みを行ったリガンドがウニ MYP を合成するか確認するために、ウニ生殖巣栄養細胞の培養系を確立し添加実験を行う。細胞培養系の確立が困難な場合、器官培養系を確立し用いる。

4. 研究成果

ウニ生殖巣から総脂質を抽出し、ウニ生殖巣総脂質をシリカゲルクロマトグラフィーにより4つの分画に分けた (Fraction1-4)。各フラクション (15mg/ml) をレポーターアッセイ系で活性を

評価した結果、これまでとは異なり、Fraction2 で他の分画に比べ最も高い活性が認められた。また、Fraction2 の活性度合いは、15mg/ml のレチノイン酸添加群と同等の活性が認められた。Fracation2 を薄層クロマトグラフィーで解析した結果、これまでの結果と同様に Fracation2 はレチノイン酸を含まないことが明らかになった。これらのことから、レチノイン酸以外が COUP-TF のリガンドである可能性が示された。ウニ生殖巣の栄養細胞培養系の確立を目指したが、確立できなかった。そこで器官培養系を用いて上記で活性が認められた Fracation2 を培養液中に添加し MYP 遺伝子が発現するか確認した結果、MYP 遺伝子の発現量の増加は認められなかった。MYP 遺伝子が誘導できなかった原因として、培養期間の時間の影響や栄養細胞の分離方法の再検討が必要と考えられた。もしくは、Fracation2 をさらに分画し、その分画物を添加する必要があると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------