

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22570061

研究課題名（和文）ヌタウナギ類における生殖腺の機能分化と内分泌系による制御機構の理解

研究課題名（英文）Gonadal functions and their hormonal controls in hagfish

研究代表者

内田 勝久（UCHIDA KATSUHISA）

宮崎大学・農学部・准教授

研究者番号：50360508

研究成果の概要（和文）：ヌタウナギの生殖腺の機能を理解するために、様々な生殖段階にある個体の血中性ステロイドホルモン量を測定した。その結果、血液中のエストラジール 17 β (E2) は、雌雄ともに生殖腺の発達段階に伴い上昇し、E2 が生殖腺や配偶子の分化過程に関与していることが示唆された。また、性ステロイド合成の律速酵素として知られるコレステロール側鎖切酵素 (CYP11A) を同定した。CYP11A は、精巣ではライディッヒ細胞に、卵巣では濾胞組織に局在し、その遺伝子発現量は、成熟の進行に伴い上昇することが示唆された。これらの結果は、原始的な脊椎動物・ヌタウナギ類の生殖腺においても、哺乳類を含む他の脊椎動物と類似した性ステロイド合成系が存在することを示している。

研究成果の概要（英文）：To clarify the gonadal functions of most primitive vertebrates, hagfish, we measured plasma concentrations of sex steroid, estradiol, with respect to gonadal development. In both sexes, plasma E2 showed a significant correlation with gonadal development, suggesting that estradiol is involved in the regulation of functional differentiation of gonads. We also isolated the cDNA sequence encoding cholesterol side-chain cleavage enzyme (CYP11A), which involves in the first reaction in the process of steroidogenesis. The enzyme was localized on the Leydig cells and follicle cells in testis and ovary, respectively. The CYP11A transcripts increased significantly in accordance with the developmental condition of gonads. Our findings suggest hagfish might possess similar process of sex steroidogenesis, as proposed in jawed vertebrates.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・形態・構造

キーワード：比較内分泌学、生理学、繁殖、進化、ホルモン

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物は、今からおよそ 5 億年前に出現し、様々な環境に適応して生息域を広げ、進化を遂げてきた。脊椎動物の適応放散の背景には、神経系や内分泌系といった情報伝達系の進化とその機能の多様化が深く関わっている。下垂体は、脊椎動物に特有の内分泌器官であり、生殖活動に必須のホルモンとされる生殖腺刺激ホルモン(GTH)を産生・分泌している。一方、脊椎動物の進化の最初期に出現した、顎を持たない無顎類・ヌタウナギにおいては、これまで下垂体ホルモンの単離や機能解析は全くなされておらず、この動物の生殖現象と内分泌機構を結び付ける知見は極めて乏しかった。

研究代表者らは、新潟県産のクロヌタウナギ(*Paramyxine atami*)の下垂体から世界ではじめて GTH 分子を単離し、ヌタウナギ類においても GTH が生殖内分泌現象の中核的な内分泌因子であることを示してきた。さらに、組換え型 GTH を大量に構築し、組換えホルモンをヌタウナギ類の生殖内分泌現象の理解や、人為催熟技術の確立に繋がたいと考えている。

一方、顎口魚類においては、下垂体から分泌された GTH は、その受容体を介して生殖腺に作用し、様々な性ステロイドの合成を促すことで、配偶子の形成・成熟を伴った一連の生殖腺機能の発現に寄与している。しかし、ヌタウナギ類においては、この様な生殖腺の機能分化とホルモンによる制御機構については未だに理解されていない。従って、ヌタウナギ類において、GTH 分子を基盤として、生殖腺の機能分化と内分泌系による制御機構を捉え、この動物群における生殖内分泌現象を総括的に理解することは、必要不可欠であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、ヌタウナギ類における GTH の単離と組換え型 GTH の作出を足がかりとし、(1). 生殖腺や配偶子の分化過程と血中性ステロイドの分泌プロファイルを明らかにする。(2). 性ステロイドの受容体、性ステロイド合成に関わる酵素群や卵・精子形成に関連した因子など、生殖腺機能の分化指標となるマーカー分子を網羅的に同定し、それらの発現動態を捉え、生殖腺機能の発現プロセスを理解する。(3). 生殖現象に関連するホルモン分子が配偶子の形成や機能マーカー分子にどのような作用を持つのかを、器官や個体レベルで理解する。(4). 生殖腺の機能分化と内分泌系による制御機構を十分に理解し、GTH をはじめとしたホルモン分子を人為催熟技術へ応用することを目的としている。

3. 研究の方法

(1). 生殖腺の発達段階に応じた血中性ステロイドの分泌プロファイルの理解

顎口魚類の性ステロイド測定系として用いられている時間分解蛍光免疫測定法(TR-FIA)を改変し、クロヌタウナギの血液中の 4 種の性ステロイド(estradiol-17 β , progesterone, testosterone, 11-ketotestosterone)の測定系を確立し、様々な成熟段階を示す個体の血中性ステロイドの動態を捉え、ヌタウナギ類における配偶子形成と性ステロイドの関連性を明らかにする。

(2). 生殖腺の機能分化を指標とするマーカー分子の単離

顎口魚類では、性ステロイドの合成系に関連したステロイド側鎖変換酵素群や性ステロイド受容体、卵や精子の形成に関連する機能タンパクなど、生殖腺や配偶子の機能分化を指標とする分

子種が単離され、それらの分子種の発現動態や、GTH や性ステロイドとの機能的連関について理解されている。ヌタウナギ類においても、成熟した精巣から cDNA ライブラリーを構築し、発現遺伝子群の網羅的シーケンス解析を行い、生殖腺で機能するマーカー分子を探索する。これと並行して、ヌタウナギの GTH をコードする遺伝子配列を基に、遺伝子工学的手法により、生理活性を示す組換え型 GTH を構築し、その特性を生化学・生理学的な見地から明らかにする。

(3). 生殖腺機能の分化指標となる分子種の発現動態と機能解析

生殖腺発現遺伝子群の網羅的探索により同定されたマーカー分子の発現動態や機能を知るため、生殖腺や配偶子の分化過程に応じた遺伝子発現量を Real-time PCR 法により定量する。同時に、*in situ* hybridization 法により生殖腺における発現部位と発現動態を組織学的に解析する。これらの成果を、研究(1)から得られた知見と融合し、単離された分子種が、配偶子の形成過程のどの段階で機能発現するのかを捉え、下垂体 GTH や性ステロイドホルモンと生殖腺機能分子との機能的な連関を明らかにする。

(4). 器官培養実験による生殖腺の機能分化と内分泌系による制御機構の理解

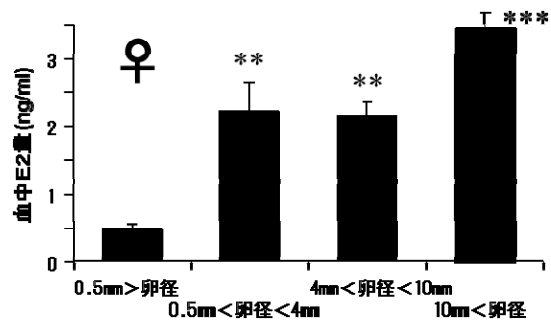
配偶子形成の盛期や最終成熟期の個体において、下垂体 GTH や性ステロイドが生殖腺機能マーカーに対し、どのような効果を及ぼすのかを明らかにし、人為催熟技術の確立に向けた礎とする。具体的には、組換え GTH を生殖腺の器官培養実験系に供し、機能マーカー分子の発現変動を Real-time PCR 法により定量する。

4. 研究成果

(1). ヌタウナギの血中性ステロイドホルモン量の分泌動態

脊椎動物の主要な性ステロイドホルモンである、エストラジール 17 β (E2)、プロジェステロン (P)、テストステロン (T) について、クロヌタウナ

ギの成熟個体から集めた血清を時間分解蛍光免疫測定法 (TR-FIA) に供し、標準曲線の作成と希釈サンプルとの平行性検定を行った。その結果、いずれの性ステロイドホルモンについても、標準曲線との有意な平行性が認められ、ホルモン測定系が確立された。次に、様々な成熟段階を示す個体から採血し、血中性ステロイド量を測定した。その結果、E2 のみが雌雄ともに生殖腺の発達段階に伴い血中量が上昇した (下図は雌の血中 E2 量の結果を示す)。一方、T は E2 に比べて血中濃度が 1/10 程度であり、T と P に関しては生殖腺の発達と有意な相関が認められなかった。以上の結果から、ヌタウナギ類の血液中には、少なくとも E2、T、P が存在し、E2 が生殖腺や配偶子の分化過程に関与する内分泌因子のひとつであることが示唆された。



(2). 生殖腺で発現する遺伝子群の網羅的探索

成熟した雄から精巣を採取し、精巣 cDNA ライブラリーを構築し、発現分子の網羅的遺伝子探索を行った。総数 5136 クローンのシーケンス解析を行い、ホモロジー検索を行った結果、生殖腺機能に関連する分子として 11 種が認められた。その中には、ステロイドホルモンの材料であるコレステロールからプレグネノロンへの変換酵素として知られ、ステロイド合成の律速酵素として知られるコレステロール側鎖切酵素 (CYP11A) が含まれていたことから、以後は CYP11A に着目し、以下の解析を進めた。

(3). CYP11A のクローニングとその発現動態

PCR 法を用いて、ヌタウナギ *CYP11A* の全長

構造のうち、5'末端部の一部を除く大部分の配列をシーケンス解析できた。また、*CYP11A* の発現動態を生殖腺の発達と関連づけて解析した結果、生殖腺における *CYP11A* の mRNA 量は、精巣では GSI 値が高くなるに連れて上昇すること、雌では卵径が 10 mm 以上の成熟進行個体で急激に発現量が増加することが示唆された。また、免疫組織化学的手法ならびに *in situ hybridization* 法により、ステロイド合成酵素の産生部位が、精巣ではライディッヒ細胞に、卵巣では濾胞組織に確認された。これらの結果は、原始的な脊椎動物・ヌタウナギ類の生殖腺が、哺乳類を含めた脊索動物に類似した性ステロイドホルモン合成系をもつことを示唆している。

(4). 生殖腺の機能とその内分泌系による制御

ヌタウナギの下垂体で産生される GTH の組換え型ホルモンを構築した。発現タンパクは、分子量約 40 KDa であり、還元処理を施すと、分子量約 25 KDa と 22 KDa を示した。さらに、これら 2 種類のタンパク質は、抗ヌタウナギ GTH α 鎖抗体と β 鎖抗体にそれぞれ陽性反応を示した。以上の結果は、作出した組換えタンパクが 2 量体構造をとり、下垂体に存在する天然型 GTH に極めて類似した構造であることを示している。

次に、組換え型 GTH を、精巣組織片を用いた器官培養実験に供した。その結果、組換え型 GTH が、培養液中への E2 と T の分泌を促進するとともに、*CYP11A* 遺伝子の発現量も促進することが明らかとなった。このことは、ヌタウナギの下垂体 GTH が、直接的に生殖腺機能を発現させる内分泌因子であり、顎口類と同様、原始的な脊椎動物・無顎類においても、下垂体-生殖腺機能軸が成立していることを示唆している。

ヌタウナギ類の繁殖様式はほとんど理解されておらず、初期胚を恒常的に得ることも極めて困難な状況である。上記の成果を総括的に判断し、GTH や性ステロイドを個体への投与実験に

応用し、今後、ヌタウナギ類における人為催熟系の確立に繋がたいと考えている。

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 10 件)

- ① Nozaki, M., Uchida, K., Honda K., Shimotani T., Nishiyama M. (2013). Effects of estradiol or testosterone treatment on expression of gonadotropin subunit mRNAs and proteins in the pituitary of juvenile brown hagfish, *Paramyxine atami*. *Gen.Comp.Endocrinol.*, in press. 査読有
- ② Uchida K., Moriyama S., Sower S.A., Nozaki M. (2013). Glycoprotein hormone in the pituitary of hagfish and its evolutionary implications. *Fish Physiol. Biochem.*, 39:75-83. DOI: 10.1007/s10695-012-9657-6, 査読有
- ③ Pierce A.L., Breves J.P., Moriyama S., Uchida K., Grau E.G. (2012). Regulation of growth hormone (GH) receptor (GHR1 and GHR2) mRNA level by GH and metabolic hormones in primary cultured tilapia hepatocytes. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 179: 22-29. DOI: 10.1016/j.ygcen, 査読有
- ④ Iwata M., Kinoshita K., Moriyama S., (他 6 名) (2012). Chum salmon fry grow faster in seawater, exhibit greater activity of the GH/IGF axis, higher Na⁺, K⁺-ATPase activity, and greater gill chloride cell development. *Aquaculture*, 362-363: 101-108. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2010.10.035, 査読有
- ⑤ Kanemaru T., Nakamura M., Murata R., Kuroki K., Horie H., Uchida K., Senthilkumaran B., Kagawa H. (2012). Induction of sexual maturation of the female honeycomb grouper, *Epinephelus merra*, in

- the non-breeding season by modulating environmental factors with GnRH analogue implantation. *Aquaculture*, 358-359: 85-91. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2012.06.026, 査読有
- ⑥ Nagashima H., Kuraku S., Uchida K., Kawashima-Ohya Y., Narita Y., Kuratani S. (2012). Body plan of turtles: an anatomical, developmental and evolutionary perspective. *Anat. Sci. Internat.* 87: 1-13. DOI: 10.1007/s12565-011-0121-y, 査読有
- ⑦ Osugi T., Uchida K., Nozaki M., Tsutsui K. (2011). Characterization of novel RFamide peptides in the central nervous system of the brown hagfish: isolation, localization, and functional analysis. *Endocrinology* 152:4252-4264. DOI: 10.1210/en.2011-1375, 査読有
- ⑧ 内田勝久 (2011). 最も原始的な脊椎動物・スタウナギの下垂体から単離された生殖腺刺激ホルモンとその進化的起源. *比較内分泌学*. 37 (140) 32-36. https://www.jstage.jst.go.jp/article/nl2008jsce/37/140/37_140_32/_pdf 査読無
- ⑨ Pierce A.L., Breves J.P., Moriyama S., Hirano T., Grau E.G. (2011). Differential regulation of Igf1 and Igf2 mRNA levels in tilapia hepatocytes: effects of insulin and cortisol on GH sensitivity. *J. Endocrinol.* 211: 201-210. DOI: 10.1530/JOE-10-0456, 査読有
- ⑩ Uchida K., Moriyama S., Chiba H., Shimotani T., Honda K., Miki M., Takahashi A., Sower S.A., Nozaki M. (2010). Evolutionary origin of a functional gonadotropin in the pituitary of the most primitive vertebrate, hagfish. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 107: 15832-15837. DOI: 10.1073/pnas.1002208107. 査読有
- ① 西山真樹、内田勝久、下谷豊和、野崎眞澄. クロスタウナギにおけるコレステロール側鎖切断酵素のクローニングと発現解析. 日本動物学会第 83 回大会. 2012 年 9 月 13 日～15 日, 大阪大学豊中キャンパス, 大阪.
- ② 天野春菜、森山俊介、Yusoff N.B., 宇野誠一、小山次朗. エストロジェン様物質の経口投与によるマコガレイ血中ビテロジェニンの動態. 平成 25 年度日本水産学会春季大会, 2013 年 3 月 26 日 (火)～30 日 (土), 東京海洋大学品川キャンパス, 東京.
- ③ Nishiyama M., Uchida K., Moriyama S., Chiba H., Awata S., Nozaki M. Study on sex steroid hormones in the hagfish-Their serum concentrations and sex steroid biosynthetic enzymes. 7th Asia and Oceania Society for Comparative Endocrinology Congress, March 3-7, 2012, Kuala Lumpur, Malaysia
- ④ Nozaki M., Shimotani, T., Nishiyama, M., Uchida K. Evolutionary origin of a functional gonadotropin in the pituitary of the most primitive vertebrate, hagfish. 7th Asia and Oceania Society for Comparative Endocrinology Congress, March 3-7, 2012, Kuala Lumpur, Malaysia
- ⑤ 西山真樹、内田勝久、森山俊介、千葉洋明、下谷豊和、野崎眞澄. クロスタウナギにおける性ステロイド合成酵素の探索. 日本動物学会第 82 回大会. 2011 年 9 月 21～23 日, 北海道旭川市
- ⑥ Uchida K., Moriyama S., Sower S. A., Nozaki M. Evolutionary origin of a functional gonadotropin in the pituitary of the most primitive vertebrate, hagfish. 9th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish (招待講演), August

9-14, 2011, Cochin, India

- ⑦ 内田勝久、森山俊介、野崎眞澄 (他 3 名) .
原始脊椎動物・ヌタウナギ類の糖タンパク質ホルモンとその進化. 日本比較内分泌学会第 35 回静岡大会. 平成 22 年 11 月 19 日, 静岡グランシップ, 静岡
- ⑧ 西山真樹、内田勝久、森山俊介、野崎眞澄 (他 2 名) . クロヌタウナギの生殖腺における性ステロイド産生能の探索. 日本比較内分泌学会第 35 回静岡大会. 2010 年 11 月 19 日, 静岡グランシップ, 静岡
- ⑨ 内田勝久、亀井宏康、森山俊介、野崎眞澄 (他 2 名) . クロヌタウナギの下垂体から精製した糖タンパク質ホルモンの生理活性. 日本動物学会第 81 回東京大会, 2010 年 9 月 23 日, 東京大学教養部, 東京
- ⑩ 野崎眞澄、本田香織、三木誠、下谷豊和、内田勝久. ヌタウナギ下垂体の GTH 細胞に対するエストロゲンとテストステロン投与の影響. 2010 年 9 月 23 日, 東京大学教養部, 東京

[図書] (計 1 件)

- ① Takahashi H., Kudose H., Takagi C., Moriyama S., Sakamoto T (2013). *In Vitro* Effects of the Prolactin, Growth Hormone and Somatolactin on Cell Turnover in Fish Esophagus: Possible Mode of Opposite Osmoregulatory Actions of Prolactin and Growth Hormone. Prolactin (Nagy G.M., Toth B.E., eds), *In Tech*, p.21-34. DOI: 10.5772/2950

[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 : 新潟大学ホームページ

http://www.niigata-u.ac.jp/research/10_research_010/hagfish.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内田 勝久 (UCHIDA KATHUHISA)

宮崎大学・農学部・准教授

研究者番号 : 50360508

(2) 研究分担者

森山 俊介 (MORIYAMA SHUNSUKE)

北里大学・水産学部・教授

研究者番号 : 50222352

(3) 連携研究者

野崎 眞澄 (NOZAKI MASUMI)

新潟大学・自然科学系・教授

研究者番号 : 70136232