

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23570070

研究課題名(和文) ナメクジウオの性ステロイドの構造と機能に関する研究

研究課題名(英文) Studies on structure and function of sex steroids in amphioxus

研究代表者

窪川 かおる (Kubokawa, Kaoru)

東京大学・理学(系)研究科(研究院)・特任教授

研究者番号：30240740

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：性ステロイドは脊椎動物に特有なホルモンで、生殖機能を制御し、体内の神経・内臓の活動のバランスを維持している。その作用機構は複雑な代謝系を介するので新たな機能の発見もあるが不明の部分も多い。そこで本研究は、脊椎動物の祖先型がもつ性ステロイドが脊椎動物の根幹であると考え、脊索動物門頭索動物亜門ナメクジウオの性ステロイド代謝系を調べた。その結果、脊椎動物ではほとんど使われない5-還元ステロイド代謝系が主要であり、神経系でも活発に生合成されていることが明らかになった。以上から、脊椎動物の性ステロイドは脊索をもつ段階で獲得され、多様な代謝系に進化したことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Sex steroids are specific hormones in vertebrates, which control the reproductive function and maintain the balance of the nerve and visceral activities of the body. Their role is manifested through a complex metabolic system of steroidogenesis. Thus, new functions of the sex steroid system are being discovered; however, many other functions remain unknown. In this study, we examined the sex steroid metabolic system of amphioxus. We found a major sex steroid metabolic pathway, 5 α -reduced steroid, which is rarely used in vertebrates. In addition, the sex steroids are actively synthesized in the nerve system. It suggests that sex steroidogenesis of vertebrates is acquired in step with the evolution of a notochord and diverged during the evolution in Chordata.

研究分野：比較内分泌

キーワード：性ステロイド ナメクジウオ 脊索動物 進化 神経索 in situ ハイブリダイゼーション

1. 研究開始当初の背景

(1) 脊索動物門

脊椎動物は脊索動物門に属し、この門には脊椎動物亜門の他に、ホヤ類(尾索動物亜門)とナメクジウオ類(頭索動物亜門)がある。ホヤ類は脊椎動物にもっとも近縁であり、ナメクジウオ類は脊索動物門のなかではもっとも古く分岐した動物である(図1)。

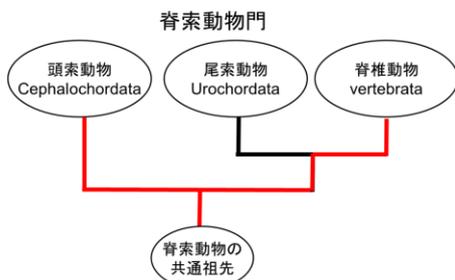


図1 脊索動物の進化の模式図

ホヤ類もナメクジウオ類も背骨はないが、一生のどこかで脊索をもつ時期があり、脊椎動物の祖先の形質を残す動物グループとして注目されてきた。ゲノム解析は、ホヤ類が2002年にユウレイボヤで¹⁾、ナメクジウオ類は2008年にフロリダナメクジウオで^{2,3)}行われた。これらのゲノムをヒトのゲノムと比較したところ、ユウレイボヤはヒトにある遺伝子の多くを喪失したが、ナメクジウオはその遺伝子モデルの90%以上がヒトと相同であった。このことから脊椎動物への進化を考える上でナメクジウオはヒトとの間の共通祖先から分岐した脊椎動物の直接の祖先のモデルと行うことができる(図2)。

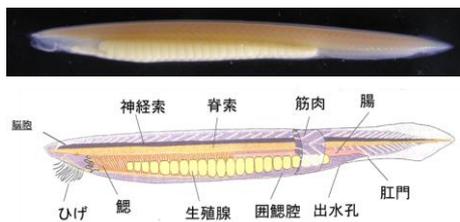


図2 ナメクジウオの外観と体制

(2) 脊椎動物の性ステロイド

本研究は、脊椎動物に特有な内分泌機構が無脊椎動物から脊椎動物に進化する過程に注目する。ホヤ類はゲノム解析からも脊椎動物と共通する遺伝子は少なく、ホヤ独自の内分泌機構が多い。ユウレイボヤは遺伝子工学的技法の開発が進みモデル動物として優れているが、ナメクジウオは野生動物の扱いにくさが残されている。しかし脊椎動物との比較研究では有用な動物である。特に興味深いのは、脊椎動物に特有な内分泌現象である。さらにその中でも生殖や生体調節を司る性ステロイドとその代謝酵素であるシトクロム P450 酵素 (CYP 酵素) の存在は、脊椎動物とナメクジウオとの共通性を象徴するものである。このように脊椎動物の内分泌機

構の解明に対してナメクジウオの貢献は大きい(図1)^{2,3)}。ステロイドは、分子量が小さいので核にある受容体に結合して細胞に直接作用し、微量で活性があり、生理現象の最終段階での効果を持つホルモンとなることが多い重要な物質である。

エストロゲンは性ステロイドのひとつで、エストラジオールが代表的であり雌の生殖に特に関わる。内分泌かく乱化学物質としてもよく知られている。アンドロゲンは雄の生殖に欠かせないホルモンであり、雌雄の性行動にも関与する。これらのステロイドの元となるのはプロゲステロンでこのステロイドから多くの代謝産物が生成され、実際には脊椎動物でも哺乳類や魚類など動物グループによって重要な働きをする代謝産物がいろいろある。性ステロイドの種類とそれらの内分泌作用の研究はヒトで進んでいるが、それでも多くの代謝物に関する解明は不明のままである。

脊椎動物での複雑化したステロイドの作用機構を解明するために、その“根源”を探究することが有効であるが、それにはナメクジウオが進化の過程を残すと考えられ、最適な動物である。

脊椎動物には性ステロイドの他にコルチコステロイド(副腎皮質ホルモン)がある。これらはストレスの指標ともなるステロイドであり医薬品では炎症を抑えるステロイド剤に使われているが、その作用は解明されていない部分が多く残されている。ナメクジウオはこのコルチコステロイドがない^{2,3)}。そこで、ナメクジウオの性ステロイドの研究を進めれば、このコルチコステロイドの祖先型をナメクジウオで発見できる可能性もある。

(3) ナメクジウオの性ステロイド

ナメクジウオは脊椎動物と共通する性ステロイドをもつが、それらの代謝産物の種類、それらの受容体に関しては脊椎動物と異なる。ナメクジウオではテストステロン合成がほとんどないか代謝が速く、エストラジオールよりもエストロンが主たるエストロンである^{4,5,6)}(図3)。

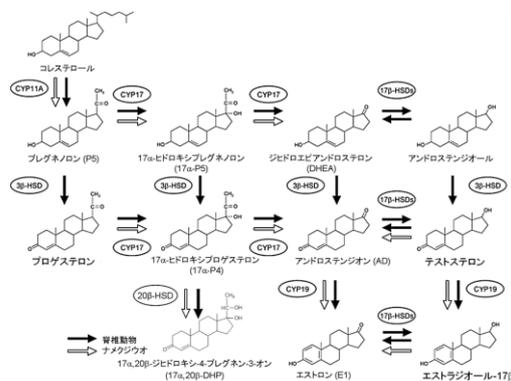


図3 脊椎動物とナメクジウオの性ステロイド代謝系

性ステロイドの受容体は、脊椎動物ではエストロゲン受容体 (ER)、アンドロゲン受容体 (AR)、プロゲステロン受容体 (PR) の3種類があるが、ナメクジウオには ER と性ステロイド受容体 (SR) の2種類しかない。この ER と SR への種々の性ステロイドの結合活性を測定し、複数の性ステロイドが結合に関与して ER には結合しないが、SR に結合する⁸⁾。ER と SR の性質や役割が脊椎動物への進化の過程でどのように変化や保存されてきたのかを解明すれば、脊椎動物の性ステロイド全体の機能の解明につながる。

(4) 無脊椎動物の内分沁

ナメクジウオは脊索動物門に属し脊椎動物に近縁であるが、無脊椎動物である。1988年刊行のホルモハンドブックには約370のいわゆるホルモンと内分沁情報伝達物質が掲載されていたが、2008年のCD版では800を超えた⁹⁾。この増加は遺伝子解析により類似構造のホルモンと受容体の発見が大きい、その多くは無脊椎動物からの発見である。新規内分沁物質が増加し続けても、脊椎動物と無脊椎動物との間に位置するナメクジウオの内分沁物質は、やはり脊椎動物型が多い。

ヒトで重要な働きをする性ステロイドの研究は進んでいるが、そこから漏れた性ステロイドの研究は遅れている。例えば5 α 還元ステロイドは両生類では雄の生殖の最終段階を制御する重要な性ステロイドであるが、ヒトではほぼ合成されないために注目されていなかったが、最近前立腺がんへの関与が報告されている。ナメクジウオはこの5 α 還元ステロイドを利用している⁷⁾。

(5) 今までと今後の研究

日本産ナメクジウオはほぼ40年前には絶滅の危機にあるとされた動物であり、研究を開始するにはナメクジウオの採集がまず課題であった。本研究に取り組むまでに、採集、飼育、繁殖の方法の確立を進め¹⁰⁾、現在は採集して水槽で飼育している。しかし水温22 $^{\circ}$ C以上の暗黒下で産卵するが、人工産卵の確立のための条件設定は未だにできていない。脊椎動物では有効な排卵誘発ホルモンであるhCGの投与や性ステロイドの投与の効果は見られていない。

そこでナメクジウオの産卵誘発のメカニズムは、そのホルモン作用を調べる必要があるが、性ステロイド以外は生殖に関わるホルモンのほとんどをナメクジウオはもっていない。具体的には脳の視床下部と下垂体がナメクジウオにはなく、これらの内分沁組織で合成されるホルモンが存在しない。すなわち、生殖を制御する内分沁機構は脊椎動物と異なり、脊椎動物のように種々の段階を経ることなく、環境刺激が直接生殖腺に至る可能性

も考えられる(図4)。このことから、ナメクジウオ自体のホルモンとその作用の研究が必要であり、性ステロイドがいくつもの作用をもち、生殖を制御していることが示唆される。

ナメクジウオの性ステロイドに関しては研究の端緒であり、本研究をはじめとして、代謝経路の解明、作用の探索、性ステロイド合成の調節機構などの研究を進めることが必要である。

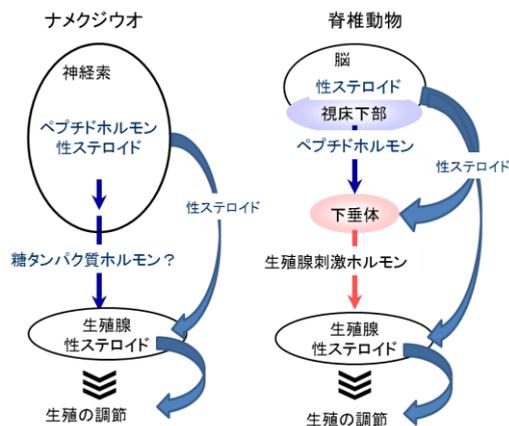


図4 性ステロイドの作用機構の比較

2. 研究の目的

本研究は、脊椎動物の内分沁機構の進化の過程を明らかにすることを目的とする。そのために、ヒトと共通祖先をもつとされるナメクジウオの性ステロイドに着目し、その代謝経路と機能を解析する。具体的には、新規性ステロイドの同定、コレステロールからの性ステロイド代謝経路の完成、受容体分子の作用機構、成熟・性分化への役割、人工産卵法の開発を行う。性ステロイドの進化から、脊椎動物での性ステロイドの作用に関して新しい研究展開への貢献が期待できる。また本研究の結果を脊椎動物と比較し、ナメクジウオでの特徴を明確にした上で、脊椎動物の新たな性ステロイドの意義を考える糸口を示したい。

3. 研究の方法

(1) 材料

愛知県渥美半島の太平洋岸の遠州灘で成体のナメクジウオ *Branchiostoma japonicum* を採集した。愛知県田原市の赤羽根漁港の漁船を傭船し、水深30-40mの砂地を円筒型ドレッジで5分間曳き、砂ごとナメクジウオを採取した。船上でナメクジウオのみを集め、ビニール袋に入れて研究室に持ち帰り、ろ過海水を入れた水槽で飼育した。餌は市販のキートセラスを使った。

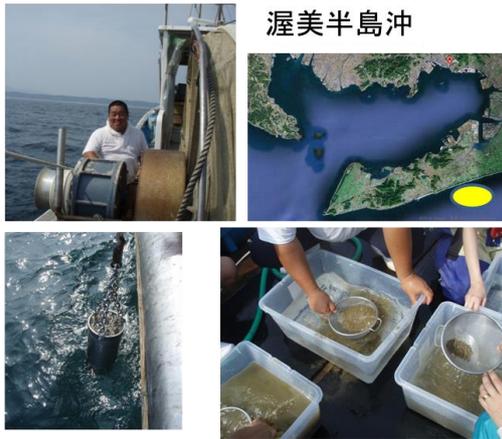


図5 ナメクジウオ採集

(2) 神経索の連続切片の作成

ブアン固定した頭部をパラフィンブロックにし、10 μ mの連続切片にして0.1%トリジンブルーで染色し、神経索マップを作成した。

(3) 遺伝子のクローニング

フロリダナメクジウオ *Branchiostoma floridae* のゲノム遺伝子データで、ナメクジウオの内分泌関連物質を探索し、その配列をもとにして日本産ナメクジウオ *B. japonicum* の性ステロイド代謝酵素、エストロゲン受容体などの目的とする遺伝子をクローニングした。

(4) 遺伝子発現

目的とする遺伝子の発現を凍結切片あるいはホルマウント *in situ* ハイブリダイゼーション法で調べた。

(5) 免疫組織化学

ナメクジウオの性ステロイド代謝酵素と糖タンパク質ホルモンに対する抗体を作成し、パラフィン切片上で免疫組織化学を行った。

4. 研究成果

(1) 神経索の構造と神経細胞の分布

神経索断面のヘマトキシリン・エオシン染色結果は、中心管の周囲に細胞体が集中していることを示す(図6A)。凍結切片(図6B)をDAPIによる核染色(図6Cの青)、Neuro traceによる神経細胞の染色(図6Cの赤)で観察すると中心管周囲とその腹側に神経細胞が集中していた(図6B、C)。

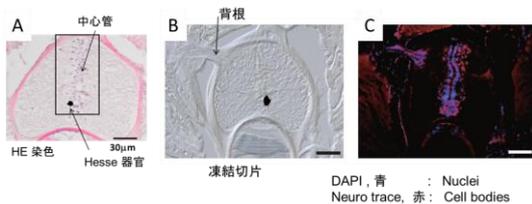


図6 神経索の染色切片

トリジンブルー染色で神経細胞の分布を観察すると、神経索の先端から中心管の周囲に集中し、後方まで同様な分

布を示した(図7)。

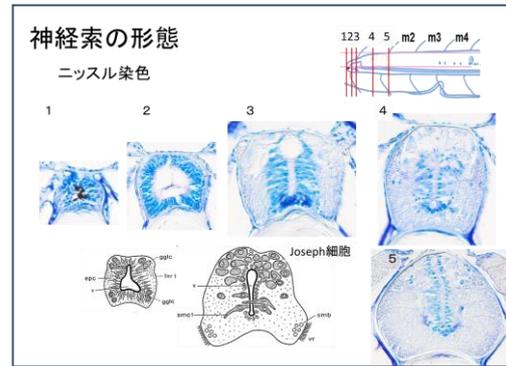


図7 神経索の形態

(2) 神経索における性ステロイド代謝酵素の遺伝子発現細胞の分布

① 5 α 還元ステロイド代謝酵素

1月の非繁殖期と7月の繁殖期の神経索で遺伝子発現を調べた。両方の季節で神経索先端には発現が見られず、咽頭より後方の中心管の腹側の細胞に発現が集中していた。1月はごくわずかな発現しか見られず、7月に発現細胞数が増えていた。このことから繁殖期に活性をもつ重要な酵素である可能性が示唆された。

② アロマターゼ (CYP19)

テストステロンなどのアンドロゲンをエストロジオール17 β 、エストロンなどのエストロゲンに代謝する酵素である。7月の繁殖期のみで調べた。脳胞に強い発現が見られ、後方になるほど発現細胞数が減少した。5 α 還元ステロイド代謝酵素とは対称的であり、役割の違いが明らかになった(図8中)。

③ エストロゲン受容体 (ER)

7月の繁殖期でのみ調べた。脳胞に強く発現し、後方は中心管周囲にわずかな細胞のみに発現がみられた(図8右)。5 α 還元ステロイド代謝酵素とは発現細胞の分布が異なり、アロマターゼとは脳胞での強い発現が一致したが、神経索後方での発現はさらにERの方が減少した。エストロゲンの合成とその受容体への結合が近傍で行われていることが示唆された。

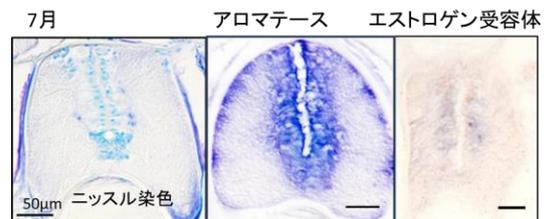


図8 7月の神経索でのアロマターゼ(中)とエストロゲン受容体(右)の遺伝子発現とニッスル染色像(左)。切片は異なる。

(3) 生殖腺における性ステロイド代謝酵素の遺伝子発現細胞の分布と季節変化

① VASA

生殖腺の生殖細胞と体細胞との区別のため、生殖細胞のマーカーである *vasa*

の発現を調べたところ3月の卵巣では若い卵母細胞にみられた(図9)。

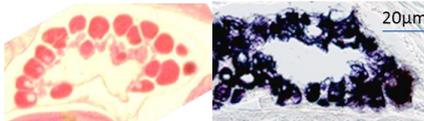


図9 3月の卵巣でのHE染色(左)とvasaの発現(右)

② 卵巣における5 α 還元ステロイド代謝酵素遺伝子の発現

3月の非繁殖期で退縮した卵巣での発現は若い卵母細胞すなわち一次卵母細胞にみられた。8月の繁殖期でも若い卵母細胞に発現がみられた(図10)。

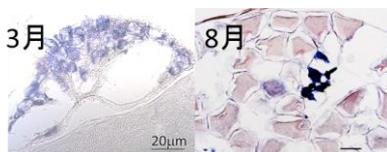


図10 卵巣での5 α 還元ステロイド代謝酵素の遺伝子発現

③ 精巣における5 α 還元ステロイド代謝酵素遺伝子の発現

精子が多いため体細胞と生殖細胞のどちらも見つけることが難しかった。8月の精巣で精巣周縁にわずかに精母細胞とみられる細胞があり、発現がみられた(図11)。

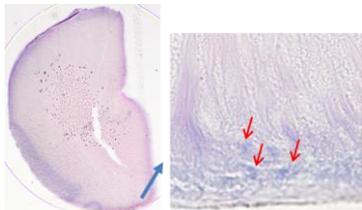


図11 精巣での5 α 還元ステロイド代謝酵素の遺伝子発現

(4) 生殖腺における性ステロイド代謝酵素の局在と役割

① 5 α 還元ステロイド代謝酵素の局在

免疫組織化学の結果は、未成熟卵巣の内側の縁に局在した。成熟卵巣では逆に縁には陽性反応が見られず、外側の上皮細胞に局在した。精巣は未成熟な精巣で周囲に局在する精母細胞や精原細胞に陽性反応が見られた。成熟精子には見つけることが出来なかった。神経索では両側腹側に陽性反応が見られ、中心管周囲の細胞にも検出された。

遺伝子発現の結果と合わせて、未成熟な個体では若い卵母細胞で合成され、成熟すると神経索の咽頭より後方で合成されることがわかった。このことは、5 α 還元ステロイド代謝酵素は、卵胞の発達と成熟に関係し、成熟すると性行動などの神経系での役割をもつ可能性が示唆された。

② アロマテース(CYP19)

卵巣での局在は成熟度にかかわらず外側の上皮細胞に見られた。精巣は未成熟な精巣の縁側の生殖細胞が集中する部分に陽性反応が見られた。神経索では中心管周囲の神経細胞と神経索の両側に陽性反応が見られた。

遺伝子発現の結果と合わせて、アロマテースは精巣の発達と成熟に関わる可能性が示唆された。神経索でも何らかの役割を持つことが明らかとなった。

(5) まとめ

脊椎動物に特有な性ステロイドの進化を考えるために、性ステロイドをもつナメクジウオを材料にして性ステロイド代謝酵素の存在を卵巣と精巣および神経索で明らかにした。

神経索の脳胞ではエストロゲンが合成されて何らかの役割をもつが、5 α 還元ステロイドは脳胞ではなく、咽頭より後方の役割をもつことがわかった。これらの酵素は生殖腺ではその発達と成熟に関与することが示唆され、さらに酵素産生細胞が体細胞ではなく生殖細胞自体であることが示唆された。生殖腺での他の性ステロイドの局在も調べなければならぬが、性ステロイドはナメクジウオでも生殖機能を司り、神経索でも役割を担っていることが示唆された。

(6) 今後の展望

性ステロイド代謝酵素および性ステロイド受容体の種類を増やして遺伝子発現と局在を調べ、その産生細胞の種類を確認することにより、性ステロイドの役割を明らかにする。ナメクジウオの繁殖期と非繁殖期および発生・成長過程での性ステロイドの役割を明らかにし、脊椎動物との比較によりその進化を考えたい。ナメクジウオの性ステロイドは5 α 還元ステロイドが重要である可能性が高く、性ステロイドの利用の進化に関して考察する。

<引用文献>

- ① Dehal, P., Satou Y., et al., (2002) Science, 298: 2157-67.
- ② Putnam, N.H. et al. (2008) Nature, 453: 1064-72.
- ③ Holland LZ, Albalat R, Azumi K, et al (2008) Genome Research 18:1100-11
- ④ Kubokawa, K., Tando Y., Roy, S. (2010) Society for Integrative and Comparative Biology 53-62
- ⑤ Mizuta T, Kubokawa K (2007) Endocrinology 148:3554-3565
- ⑥ Mizuta T, Asahina K, Suzuki M, Kubokawa K (2008) J Exp Zool 309A:83-93
- ⑦ Mizuta T, Kubokawa K (2004) J Exp Mar Biol Ecol 309:239-251
- ⑧ Katsu Y, Kubokawa, K, Urushitani, H, Iguchi T (2010) Endocrinology 151: 639-648

- ⑨日本比較内分泌学会編、ホルモンハンドブック 新訂 eBook 版、南江堂 2008 年
⑩Kubokawa K, Azuma N, Tomiyama M (1998) Zool Sci 15:799-803

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件) 全て査読有

- ①Bao, Y., Kake, T., Hanashima, A., Nomiya, Y., Kubokawa, K., Kimura, S. (2012) Actin capping proteins, CapZ(β -actin) and tropomodulin in amphioxus striated muscle. Gene 510:78-86.
doi:10.1016/j.gene.2012.07.081

- ②Guerardel, Y., Chang, L.Y., Fujita, A., Codeville, B., Kubokawa, K., Kitajima, K. (2012) Sialome analysis of the cephalochordate Branchiostoma belcheri, a key organism for vertebrate Evolution. Glycobiology 22: 479-491.
doi: 10.1093/glycob/cwr155

- ③Yamanaka, T., Maeto, K., Kubokawa, K. (15 名中 14 番) (2012) Shallow submarine hydrothermal activity with significant contribution of magmatic water producing talc chimneys in the Wakamiko Crater of Kagoshima Bay, southern Kyushu, Japan. J. Volcanology Geothermal Res 258:74-84.
doi: 10.1093/glycob/cwr155

- ④Ohtsuka, H., Hanashima, A., Kubokawa, K., Bao, Y., Tando, Y., Kohmaru, J., Nakaya, H., Maruyama, K., Kimura, S. (2011) Amphioxus Connectin Exhibits Merged Structure as Invertebrate Connectin in I-Band Region and Vertebrate Connectin in A-Band Region. J Mol Biol, 409:415-26.
doi:10.1016/j.jmb.2011.04.010

[学会発表] (計 9 件)

- ①小島彩加、窪川かおる 「ナメクジウオの内柱における内分泌物質の局在」日本動物学会関東支部、早稲田大学先端生命医科学センター (東京都・新宿区) 2015 年 3 月 14 日
②小島彩加、窪川かおる 「ナメクジウオ内柱の甲状腺機能と関連遺伝子の局在」日本動物学会、東北大学川内北キャンパス (宮城県・仙台市) 2014 年 9 月 11 日
③小島彩加、加藤明子、窪川かおる 「ナメクジウオにおける脱ヨウ素酵素の局在について」日本動物学会、岡山大学 (岡山県・岡山市) 2013 年 9 月 28 日
④窪川かおる、加藤明子、高橋明義 「ナメクジウオの神経索と生殖腺におけるステロイド代謝酵素の遺伝子発現」日本動物学会、岡

山大学 (岡山県・岡山市) 2013 年 9 月 26 日

- ⑤窪川かおる 「無脊椎動物にみる下垂体ホルモンと受容体の進化」日本下垂体研究会、ホテル千秋閣 (岩手県・花巻市) 2013 年 8 月 9 日 (招待講演)

- ⑥窪川かおる 「境界動物の性ステロイド代謝系とその制御」東京大学大気海洋研究所共同利用シンポジウム、東京大学大気海洋研究所 (千葉県・柏市) 2013 年 6 月 22 日 (招待講演)

- ⑦加藤明子・窪川かおる 「ナメクジウオにおける神経葉ホルモン産生細胞の分布」日本動物学会関東支部、東京工業大学 (東京都・目黒区)、2013 年 3 月 15 日

- ⑧窪川かおる 「学校教育で水産を学ぶ機会について - 総合的水産教育の視点から -」日本水産学会、水産大学校 (山口県・下関市)、2012 年 11 月 9 日

- ⑨窪川かおる 「ナメクジウオの性ステロイド代謝酵素の遺伝子発現部位」日本動物学会、大阪大学 (大阪府・豊中市)、2012 年 9 月 13 日

[図書] (計 3 件)

- ①窪川かおる (翻訳) 「海洋生物学 (Phillip V. Mladenov 著)」丸善出版社、2015、196

- ②窪川かおる (編著) 「海のプロフェッショナル副題」(窪川かおる、女性海洋チーム編) 東海大学出版会、2013、1-10

- ③窪川かおる (共著)、共立出版 「ナメクジウオ」(研究者が教える動物飼育 第 3 巻、針山孝彦、小柳光正、他編) 2012、35-44

[その他]

<http://www.mmbs.s.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

窪川かおる (KUBOKAWA KAORU)
東京大学・理学系研究科・特任教授
研究者番号: 30240740

(2) 連携研究者

安東宏徳 (ANDO Hironori)
新潟大学・佐渡臨海実験所・教授
研究者番号: 60221743

(3) 研究協力者

勝 義直 (KATSU Yoshinao)
加藤 明子 (KATO Akiko)
小島 彩加 (AYAKA KOJIMA)
ロイ ソナリ (Sonali Roy)
浦野明央 (URANO Akihisa)