

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 7 月 6 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07472

研究課題名(和文) サメ類の繁殖内分泌機構の分子基盤の構築と人為産卵促進技術への応用

研究課題名(英文) Construction of molecular basis of reproductive endocrine system of shark and application to artificial spawning technology

研究代表者

内田 勝久 (UCHIDA, Katsuhisa)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号：50360508

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：サメ類の人為産卵促進技術を開発するため、これまで未解明であったサメ類の繁殖内分泌機構の分子基盤の構築や孵化腺の機能の理解を目的に研究を進めた。まず、卵生種トラザメの卵殻腺の4つの分泌層を組織学的に示すとともに、主要な分泌層がコラーゲン合成に寄与することを分子レベルではじめて示した。また、トラザメの脳から3種のGnRH遺伝子と4種類のGnRH受容体遺伝子を同定し、GnRH分子が下垂体FSHの産生を制御する可能性を示唆した。さらに、次世代シーケンス解析により、トラザメの頭頂部にある孵化腺を同定し、その上皮細胞に発現する孵化酵素の遺伝子構造を明らかにしている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果により、サメ類の生殖輸管系と生殖関連ホルモンの機能や胚の孵化に関する仕組みの一端が理解できた。これらの成果は、単に、トラザメの繁殖生理・内分泌機構に関する知見の発信に留まらず、真骨魚類での先行知見との比較や、軟骨魚類から卵生の陸棲脊椎動物へと引き継がれた卵殻形成機構の分子基盤とその進化の理解に繋がり、基礎動物学や繁殖生理学、比較内分泌学分野に新たな知見と学術進展を発信できると考える。また、近い将来、本研究の成果は、トラザメの人為産卵促進技術の開発に繋がると考えられ、世界のサメ繁殖生理学研究を牽引し、サメ資源の保護や増産のための方策を生み出すことが可能と考えている。

研究成果の概要(英文)：To develop the artificial spawning technology for sharks, we aimed to understand the molecular background of the reproductive endocrine system and the functional aspect of eggshell gland hatching glands, which have not been elucidated so far. First, we histologically showed the four functional secretory layers of the eggshell glands of the female cloudy catshark, *Scyliorhinus torazame* and indicated that the major secretory layer contributes to collagen synthesis at the molecular level. Second, we identified three GnRH genes and four GnRH receptor genes from the shark brain, and demonstrated that shark GnRH may regulate the pituitary FSH functions. Thirdly, we have identified the hatching gland in the head of the catshark, and have revealed the molecular structure of hatching enzyme that expressed in epithelial cells of hatching gland for the first time in sharks by next-generation sequence analysis.

研究分野：比較内分泌学

キーワード：板鰓類 繁殖生理学 進化 生殖ホルモン 孵化酵素 卵殻腺

## 1. 研究開始当初の背景

サメ類を含む軟骨魚類は、はじめて顎を獲得した脊椎動物であり、約 4 億年前の古生代デボン紀に大規模な多様化を遂げ、浅海から深海域に至る幅広い海洋環境に適応放散している。サメ類は、軟骨魚類の中でもとりわけ多様でユニークな繁殖様式を獲得している。例えば、サメ類はすべて体内受精を営み、様々な卵殻形状を持つ卵生種や、母体内で卵黄や胎盤に依存して胚を発生させ、胎児を産む胎生種を含む。また、サメ類には卵殻腺や子宮、エピゴナル器官など、硬骨魚類には存在しない独特の生殖器官(以下、生殖輸管系と総称)が存在し、これらの器官の繁殖活動における役割は大変興味深い。

一方、サメ類は、海洋生態系の上位に位置する動物群であり、大型の卵や胎児を少なく産むという繁殖戦略をとるため、一般的な魚類に比べ、混獲や乱獲の影響を受けやすい。実際、FAO の統計では、世界のサメ類の漁獲量は、1950 年代から増加の一途をたどり、その資源量は減少している。この資源量の減少を背景に、FAO は「サメ類の保護と管理のための国際行動計画」を策定し、資源保護の機運が高まっている。サメ類の資源保護を目的として、多くの種の成熟年齢や産卵様式に関する生態学的な調査・研究は進んでいるが、この動物の生殖器官の機能とその制御に寄与するホルモン因子、すなわち、繁殖生理学や繁殖内分泌学の知見は皆無に等しい。

## 2. 研究の目的

本研究では、小型で飼育が容易であり、かつ、約 3 週間で産卵する卵生のトラザメ (*Scyliorhinus torazame*) をモデル魚種とし、この種の繁殖生理現象の理解を目指し、研究を進めた。また、水族館で展示されている大型のジンベイザメを実験対象魚に加えることで、研究進展の効率化を図った。これまで、トラザメの下垂体から 2 種類の生殖腺刺激ホルモン (GTH) [濾胞刺激ホルモン (FSH) と黄体形成ホルモン (LH)] $\beta$  鎖、ならびに、それらの共通サブユニットである GTH $\alpha$  鎖をコードする遺伝子を同定し、これらの遺伝子がサメ類に特有の下垂体領域である腹葉で発現することを示している。一方、卵殻形成に寄与すると考えられる卵殻腺は、組織学的に異なる層から成ることを見出している。しかし、卵殻腺を含む生殖輸管系の機能発現プロセスとそれを制御する生殖内分泌因子の機能的繋がりについては、総括的に理解されていない。本研究では、サメ類の繁殖内分泌機構の分子基盤を構築し、周期的な産卵プロセスの制御に寄与する内分泌因子の同定し、それらの機能を理解することで、人為産卵促進技術の開発に繋げることを目的とした。また、サメ資源の維持においては、胚の発生や孵化イベントを理解することも重要なアプローチである。本研究では、トラザメ胚の孵化腺や孵化酵素の同定を進め、胚の孵化現象を分子形態学的に理解することも目的のひとつとした。本研究では、具体的に、以下の研究を進めた。

- ・トラザメの卵殻腺における機能発現遺伝子の同定と発現部位の理解
- ・トラザメの視床下部 下垂体機能軸の理解
- ・トラザメ GnRH ならびにその受容体遺伝子の同定と機能解析
- ・トラザメ胚の孵化腺の形態学的同定と孵化酵素の同定
- ・ジンベイザメの血中性ステロイドの分泌動態の理解

## 3. 研究の方法

### A. 実験材料の入手、ホルモン投与実験ならびに器官培養実験

トラザメは、韓国・済州島の漁業者に加え、愛知県碧南海浜水族館、東京大学大気海洋研究所より入手した。ジンベイザメについては、沖縄美ら海水族館に展示されている個体より採血し、解析サンプルを得た。成熟した雌トラザメ (12 個体) に GnRH アナログ (GnRHa) を腹腔内投与し (100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  body weight) 投与後 24、48 時間で下垂体腹葉を採取した。また、下垂体腹葉を終濃度 10 nM、100 nM の GnRHa 含むサメ生理食塩水中で 16、24 時間培養した。

### B. 分子生物学的手法による機能タンパク、ホルモン遺伝子の同定

公開されているトラザメのゲノムデータベースを利用し、目的とする分子のアミノ酸配列に相同性の高い配列を探索した。次に、標的遺伝子を PCR 法により増幅し、DNA シーケンス解析により塩基配列を決定し、アミノ酸翻訳領域や非翻訳領域の配列構造を確定した。分子系統樹は、MEGA7.0.26 により作製した。ClustalW によりアライメント解析を行い、Jones-Taylor-Thornton モデルを用いて、近隣結合法により作製した (1000 bootstrap)。

### C. 同定した機能遺伝子の組織発現解析ならびに定量解析

Real-time PCR 法により組織間での発現量の相対定量を行った。解析にあたっては、標的遺伝子ならびに内部標準遺伝子 (18s rRNA) に特異的な測定系を確立した。

### D. トラザメ生体組織の形態学的観察ならびに遺伝子発現部位の組織学的解析

組織標本はブアン氏液または 4% パラホルムアルデヒド溶液で固定し、パラフィン包埋した後、厚さ 4 $\mu\text{m}$  の切片を作製した。卵殻腺や孵化腺の形態観察には、ヘマトキシリン - エオシン染色ならびに PAS (Periodic Acid Schiff) 染色を用いた。また、機能遺伝子の発現部位の同定は、標的遺伝子の cRNA を DIG (Digoxigenin) 標識後、パラフィン切片上での *in situ* hybridization 法により解析した。

### E. トラザメ胚の孵化腺の形態学的観察と孵化酵素分子の同定

卵生の板鰓類の卵は硬い卵殻を有し、胚を覆うコロイド層の融解が起きた後、卵殻の開口部を

塞いでいる固形層が融解することで、卵殻の上部が開く pre-hatch が起こる。本研究では、pre-hatch 前の胚を用いて、電子顕微鏡および PAS 染色による組織学的解析を行うとともに、レーザーマイクロダイセクション法により分泌腺構造を呈する組織を採取し、次世代シーケンスによるトランスクリプトーム解析を行った。

#### F. ジンバイザメからの採血と性ステロイド測定

雌雄のジンバイザメの生殖行動や生殖腺の発達を評価するために、血漿中のエストラジオール-17β (E2)、17α,20β-ジヒドロキシ-4-プレグネン-3-オン (17α-20βP)、テストステロン (T) と 11-ケトテストステロン (11-KT) を、また、ストレスを評価するためにコルチゾルを、それぞれ時間分解蛍光免疫測定により測定した。また、ジンバイザメの血漿に存在するペプチドを LC-MS/MS により分析した。

### 4. 研究成果

#### 1. トラザメの卵殻腺における機能発現遺伝子の同定と発現部位の理解

トラザメの卵殻腺は、組織学および組織化学的に異なる 4 つの分泌層 (Club zone, Papillary zone, Baffle zone, Terminal zone) から構成され、卵殻腺内で最も広い領域を占める Bz が卵殻形成に主要な働きをもつことが組織化学的に示唆された (図 1)。次に、Bz よりトラザメのコラーゲン (col) およびコラーゲンの翻訳後修飾に係わるコラーゲン合成関連酵素をコードする遺伝子構造を同定した。組織特異的発現解析の結果、これら 2 つの遺伝子は、成熟個体の卵殻腺において高い発現を示した。さらに、*in situ* hybridization 法による遺伝子発現部位の同定により、col 遺伝子が卵殻腺の Bz のみに発現し、Bz の上部、中心部、下部において異なる発現強度を示した。これらの結果から、Bz が卵殻腺におけるコラーゲン合

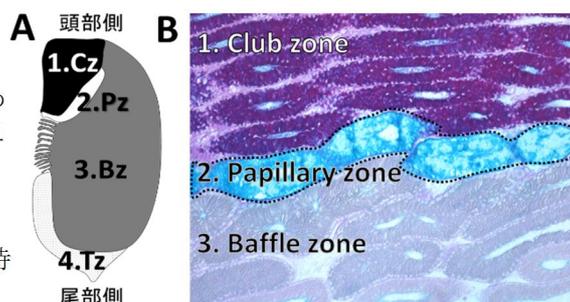


図 1. トラザメの卵殻腺の4つの機能層  
A: 卵殻腺の解剖・組織学的解析による模式図と予想される各層の機能  
1. Club zone (Cz); 卵ゼリー (eggjelly) の産生・分泌  
2. Papillary zone (Pz); eggjelly の産生・分泌  
3. Baffle zone (Bz); 卵殻形成 (卵殻の主成分である Collagen の産生)  
4. Terminal zone (Tz); eggjelly の産生・分泌、精子の貯蔵  
B: 卵殻腺分泌層 (Cz, Pz, Bz 層) の組織化学的解析像 (PAS-AB 染色)

成に重要な役割を担う分泌層であり、この分泌層がさらに機能的に細分化されている可能性が示された。さらに、卵殻腺機能関連分子の制御因子を理解するために、視床下部-下垂体-生殖腺機能軸における上位ホルモンである、生殖腺刺激ホルモン放出ホルモンの合成アナログ (GnRHa) の腹腔内投与実験を行ったが、トラザメの産卵頻度や卵殻腺の形態変化、血中性ステロイドホルモン (estradiol-17β, testosterone, 11-ketotestosterone, progesterone) の分泌量に変動は認められなかった。

#### 2. トラザメの視床下部 下垂体機能軸の理解

雌のトラザメのみを選別し、異なる成熟段階ならびに産卵周期の過程を 4 つに区分した (図 2)。それらの個体における GTH 遺伝子の発現量を解析したところ、卵黄形成初期の個体では、*lh* 発現量は低値であるが、*fsh* 発現量が高く、トラザメの FSH は卵黄形成に寄与する可能性が示された。一方、*lh* 発現量は周期的な産卵サイクルを示す成熟個体で高まること、卵殻形成後で *lh*、*fsh* とともに発現量が増加することから、トラザメ GTH 分子が排卵誘起や産卵の制御に寄与することが示唆された。

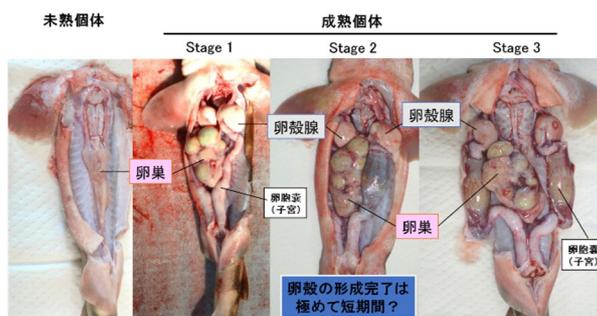


図 2. 雌トラザメの卵巣ならびに生殖輸管系の違いによるステージ分け

ヒト由来の人工ペプチドホルモンである GnRH アナログ (GnRHa) を、トラザメ

の腹腔内に投与した場合、投与後 48 時間で *fsh* のみ発現量が増加した。また、GnRHa を用いた下垂体腹葉の器官培養実験により、GnRHa 10 nM 添加群では *fshβ* 発現量は増加し、薬理的濃度 (100 nM) ではその遺伝子発現を阻害した。このことから、トラザメの脳内にも GnRH 分子が同在し、下垂体 GTH、特に、FSH の産生を制御する機構があると推察できた。

#### 3. トラザメ GnRH ならびにその受容体遺伝子の同定と機能解析

顎口類の脳内には機能の異なる 3 つの GnRH パラログ (GnRH1~3) が存在する。トラザメの脳組織を用いたクローニング解析により、3 種類の GnRH 分子をコードする遺伝子配列が得られ、既知のニワトリ型とツノザメ型に加え、新規タイプの GnRH 分子 (stGnRH) を同定した。分子系統解析により、stGnRH は、既知の顎口類 GnRH パラログのうち GnRH1 に属することが判明した (図 3)。また、ニワトリ型 (gnrh2) は中脳領域で、stGnRH (gnrh1) と

ツノザメ型(*gnrh3*)は嗅球で高い発現が認められた。従って、板鰓類の脳内にも3種類のGnRH分子が存在することがはじめて示され、脊椎動物におけるGnRHは、無顎類から顎口類への進化の過程で、3種のGnRHに分子進化ならびに機能進化が生じたと推察される。

さらに、トラザメの脳から4種類のGnRH-Rを同定した。分子系統解析により、それら4種の受容体は、それぞれ、既存の受容体パラログのうち、Type1a、1b、2a、2bグループに分類された。GnRHの受容体遺伝子の脳内組織発現を調べた結果、*gnhr-1a*のみが下垂体腹葉のFSH産生細胞で発現することが、組織学的に示唆された。以上の結果から、軟骨魚類・トラザメにも脳(GnRH)・下垂体(GTH)機能軸が存在することが示された。

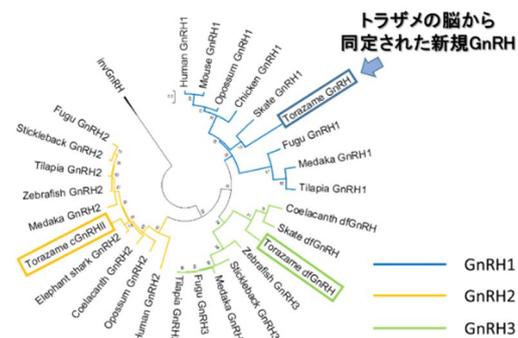


図3. 板鰓類のGnRHの分子系統解析

### トラザメ胚の孵化腺の形態学的同定と孵化酵素分子の同定

Pre-hatch 前の胚における組織学的解析から、頭部の上皮細胞に分泌顆粒を多数有する細胞層があることが判明した。この細胞層の次世代シーケンス解析により、頭部の上皮細胞で高い発現を示す遺伝子を2種類同定できた。胚の頭部および胴部における発現動態を定量PCRにより明らかにした結果、両遺伝子とも頭部に特異的に発現することが示された。発生段階(pre-hatchの前後)の進行に伴う両遺伝子の発現量の変化を解析した結果、両遺伝子ともコロイド層融解前から発現が見られ、pre-hatchを境に発現量が著しく低下した。これらの結果は、組織学的な解析による分泌顆粒の減少時期と一致した。さらに、whole-mount *in situ* hybridizationにより、両遺伝子は頭頂部の分泌顆粒を含む上皮細胞に特異的に発現していた。以上の結果より、板鰓類で初めて孵化腺ならびに孵化酵素である可能性が高い機能分子を2種類同定できた。

### ジンベイザメの血中性ステロイドの分泌動態の理解

雄のジンベイザメにおけるTおよび11-KT濃度は、共に4月よりも10月の方が高い値を示した(表1)。また、E2濃度および17 $\alpha$ -20 $\beta$ P濃度も、4月よりも10月の方が高い値を示した。一方、雌のジンベイザメにおいては、T濃度は4月よりも10月の方が高い値を示したが、11-KTは検出されなかった。一方、E2および17 $\alpha$ -20 $\beta$ P濃度は、4月よりも10月の方が高い値を示した。コルチゾル濃度は、雄では、採取月による違いは認められなかったが、雌では、4月よりも10月の方が高い値を示した。これらの結果は、性ホルモンおよびコルチゾルの濃度は、雌雄ともに、生殖行動や生殖腺の発達に伴って、変化するものと考えられる。

表1. オスとメスのジンベイザメの血漿中の性ホルモンとコルチゾル濃度

採取月	4月		10月	
	オス	メス	オス	メス
T	0.27 ng/ml	0.76 ng/ml	5.23 ng/ml	13.14 ng/ml
11-KT	5.93 ng/ml	N.D	27.74 ng/ml	N.D
E2	8.06 ng/ml	38.85 ng/ml	25.62 ng/ml	87.76 ng/ml
17 $\alpha$ -20 $\beta$ P	0.03 ng/ml	4.52 ng/ml	0.65 ng/ml	0.39 ng/ml
Cortisol	0.05 ng/ml	0.49 ng/ml	0.07 ng/ml	2.43 ng/ml

ジンベイザメの血漿5  $\mu$ lの抽出物をLS-MS/MSNIより分析した結果、213種類のペプチドが、既存のデータベースに登録されているペプチドと相同性を有することがわかった。本研究において、軟骨魚類・板鰓類の成長、代謝、適応や繁殖の調節に関与する生理活性ペプチドは検出されなかったが、生体防御作用を有するヒートショックタンパク質、神経回路の発達に関与するカルモジュリンやニューロカルシンなどを同定した。

サメ資源の増産と維持には、この動物の生殖内分泌機構の理解が必須である。本研究の成果により、サメ類の生殖輸管系と生殖関連ホルモンの機能や胚の孵化に関する仕組みの一端が理解できた。本研究の成果は、近い将来、トラザメの人為産卵促進技術の開発に繋がると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 宮西 弘、石田伶音、工樂樹洋、増田元保、高木 互、兵藤 晋、内田勝久
2. 発表標題 板鰓類トラザメにおける孵化腺および孵化酵素の同定
3. 学会等名 日本動物学会第90回大会（大阪）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 内田勝久、横山裕麻、増田元保、宮西 弘、香川浩彦
2. 発表標題 軟骨魚類・板鰓類にも生殖に寄与する視床下部-下垂体機能軸はあるのか？
3. 学会等名 日本下垂体研究会第34回学術集会（松江）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石田伶音、増田元保、宮西 弘、香川浩彦、内田勝久
2. 発表標題 トラザメ胚のPre-hatchingに伴う頭頂部組織の形態学的変化について
3. 学会等名 第71回日本動物学会九州支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Katsuhisa Uchida, Yuma Yokoyama, Kazuaki Yamaguchi, Shigehiro Kuraku, Hiroshi Miyanishi and Hirohiko Kagawa
2. 発表標題 Molecular and cellular evidences for shark GnRHs and their receptors in the brain
3. 学会等名 Asia and Oceania Society for Comparative Endocrinology Intercongress (AOSCE) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 内田勝久、横山裕麻、山口和晃、工樂樹洋、宮西 弘、香川浩彦
2. 発表標題 板鰓類・トラザメにおける生殖内分泌因子群の同定と機能の探索
3. 学会等名 第89回日本動物学会札幌大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 内田吉亮、横山裕麻、古川史也、宮西弘、香川浩彦、内田勝久
2. 発表標題 トラザメの卵殻腺における機能関連分子の探索
3. 学会等名 日本動物学会第88回富山大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 内田勝久（研究代表者）	4. 発行年 2018年
2. 出版社 丸善出版	5. 総ページ数 800
3. 書名 動物学の百科事典	

〔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
研究 分担者	森山 俊介  (Moriyama Shunsuke)  (50222352)	北里大学・海洋生命科学部・教授   (32607)	