

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：82708

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03055

研究課題名（和文）二枚貝におけるレチノイン酸の卵成熟誘起機構の解明

研究課題名（英文）Mechanisms behind retinoic acid-induced oocyte maturation in bivalves

研究代表者

松本 才絵（Matsumoto, Toshie）

国立研究開発法人水産研究・教育機構・水産技術研究所(南勢)・グループ長

研究者番号：80344331

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,000,000円

研究成果の概要（和文）：タイラギにおいては、レチノイン酸が卵成熟を誘起するとともに精子の運動を顕著に活発化する。これらの反応は短時間で認められるため、核内受容体のレチノイン酸受容体ではなく、膜受容体を介した作用機構が存在する可能性が考えられた。本研究は、レチノイン酸が二枚貝の新規卵成熟誘起ホルモンとして作用する機構、特に膜受容体を介して作用している可能性について明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

減少したタイラギ資源の回復のために移植や養殖用に種苗生産が行われている。より安定した種苗生産のためには人工受精法が必要となるが、人工受精をするには卵成熟を誘起することが不可欠である。タイラギでレチノイン酸の卵成熟誘起機構を明らかにすることで、これまで採卵が困難であった二枚貝から人工受精により受精卵を得ることが可能になり、二枚貝の種苗生産や人工受精法の効率化に貢献できると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Retinoic acid (RA) has a strong activity in inducing oocyte maturation and activating sperm motility in pen shells. The finding that these actions of RA occurred very rapidly suggests that they are mediated by membrane receptors rather than nuclear receptors require a relatively long time to show the effects. This study implies the presence of receptors on the oocyte surface of pen shell that mediate the rapid action of RA.

研究分野：水圏生命科学

キーワード：二枚貝 卵成熟 レチノイン酸

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

海産二枚貝タイラギの人工受精法開発のために卵成熟を誘起する物質を探索する過程において、活性型ビタミンAであるレチノイン酸(特に all-trans-Retinoic Acid、at-RA)が0.1~1.0 μ M という生理的濃度で卵成熟を誘起するとともに精子の運動を顕著に活発化することを見出した。マガキやホタテガイ等の研究からセロトニンが二枚貝の卵成熟誘起ホルモンだと考えられてきたが、タイラギの卵成熟誘起にはセロトニンは無効であり、レチノイン酸が卵成熟誘起ホルモンである二枚貝類も存在する可能性が示された。また一般にレチノイン酸は核内受容体を介してその作用を発現する機構が知られているが、タイラギの卵成熟や精子運動の活発化は10~30分程度という短時間で誘起されることから、核内受容体ではなく膜受容体を介した作用機序が示唆された。本研究では、レチノイン酸が二枚貝の新規卵成熟誘起ホルモンとして作用する機構、特に膜受容体を介して作用している可能性について明らかにしようとした。

2. 研究の目的

本研究は、レチノイン酸が二枚貝の卵成熟誘起ホルモンであることの証明を目的とした。そのためにまず、レチノイン酸作用機構の要である受容体の解析を進めた。また、レチノイン酸が卵巣、精巣に存在し、機能していることを明らかにするためにレチノイン酸代謝系を解析した。さらに、他の二枚貝の卵母細胞に対してもレチノイン酸がタイラギ同様の作用を示すか検討した。

3. 研究の方法

(1) 卵成熟誘起作用に関わるレチノイン酸受容体の解析

受容体の特性を解析するために、レチノイン酸の卵成熟誘起、精子運動活性化に関わるシグナル伝達機構を、受容体アゴニスト、アンタゴニストを用いたバイオアッセイで解析した。

さらにレチノイン酸の作用が膜受容体を介している可能性を明らかにするため、卵成熟誘起と精子運動活性化が認められたレチノイン酸受容体のアゴニストを固定化した磁気ビーズを用いて、卵成熟を誘起するか、精子運動を活発化するか調べた。

タイラギ卵原形質膜の at-RA 結合性を確認するために、十分発達した卵巣から採取、凍結しておいた単離卵より粗膜画分を調製した。この画分にトリチウム標識 at-RA との結合性があることを確認し、結合試験のインキュベーション時間、試験に用いる膜画分量を検討した。

(2) レチノイン酸関連遺伝子の発現解析

レチノイン酸が卵成熟誘起ホルモンであれば、卵巣、精巣内でレチノイン酸合成酵素、受容体などの遺伝子が発現している可能性が高い。そこでレチノイン酸の合成に関わる retinaldehyde dehydrogenase (RALDH) やレチノイン酸を不活性型に変換する酵素の一つである cytochrome P450 family 26a (cyp26a)、レチノイン酸受容体のうち all-trans-レチノイン酸の核内受容体である RAR と、9-cis-レチノイン酸の核内受容体である RXR などの cDNA をトランスクリプトーム解析結果を利用して探索した。また、タイラギ卵巣から調製した一本鎖 cDNA を鋳型とし、RALDH に構造の類似するコンティグの情報に基づいて設計したプライマーを用いた RACE 法により、タイラギの RALDH-like cDNA の全塩基配列を決定した。また、その塩基配列に基づいて RNA プローブを作製し、in situ hybridization 法により、成熟期のタイラギ卵巣における RALDH-like mRNA の局在を調べた。

(3) タイラギ以外の二枚貝の卵成熟、精子運動活性化に対するレチノイン酸の作用の解析

タイラギ以外の二枚貝として、タイラギ同様に卵成熟誘起にセロトニンが無効であるムラサキイガイを用いて、レチノイン酸による卵成熟誘起、精子運動活性化がみられるか検討した。単離卵の採取にはタイラギ同様卵巣片をコラゲナーゼ処理した。

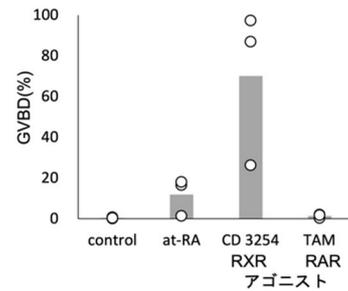


図1 レチノイン酸 (at-RA) と受容体アゴニストによる卵成熟誘起

4. 研究成果

(1) 卵成熟誘起作用に関わるレチノイン酸受容体の解析

受容体の特性を解析するために、at-RA の卵成熟誘起、精子運動活性化に関わるシグナル伝達機構を、レチノイン酸受容体 (RAR、RXR) のアゴニストを用いたバイオアッセイで

解析した。RXR アゴニストは卵成熟誘起に効果が認められた一方、RAR アゴニストには認められなかった(図1)。最も効果の高かった

RXR アゴニスト (CD3254) は精子運動の活性化が認められた。また RAR アンタゴニストは at-RA の卵成熟誘起作用を阻害しないことが分かっていたが、RXR アンタゴニストを用いて解析したところ at-RA の作用を阻害した(図2)。これらの結果から at-RA の卵成熟誘起作用は RXR 様の受容体を介すると考えられた。

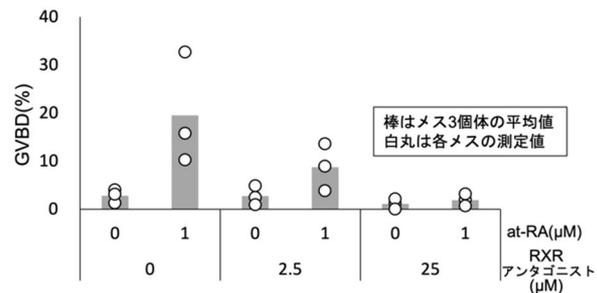


図2 レチノイン酸受容体アンタゴニストのレチノイン酸 (at-RA) による卵成熟誘起阻害

卵成熟誘起と精子運動活性化が認められた CD3254 を固定化したビーズを用いた試験では、卵成熟を誘起すること(図3) さらに精子運動を活発化することを確認した。ビーズは細胞膜を通過することができないので、CD3254 は原形質膜に存在する RXR 様受容体を介しこれらの反応を誘起したと考えられる。

タイラギ卵原形質膜の粗膜画分に at-RA 結合性があるのを確認するために、十分発達した卵巣から単離した卵母細胞を材料として粗膜画分を調製した。Na,K-ATPase 酵素活性を測定し、最も活性の高かった画分を用いてトリチウム標識 at-RA との結合解析を進めた。しかし想定以上に非特異結合を抑制するのが困難で、試験条件によっては非特異結合の値が大きくなり、at-RA との特異結合を確認できなかったとはいえない。現在試験条件を変え特異結合が認められるか検討している。

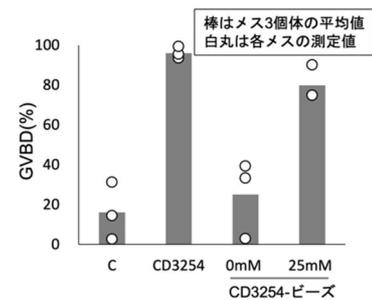


図3 CD3254(RXRアゴニスト)とCD3254固定化ビーズによる卵成熟誘起

(2) レチノイン酸関連遺伝子の発現解析

トランスクリプトーム解析結果からレチノイン酸の代謝関連遺伝子 (RALDH、cyp26a、retinol dehydrogenase) やレチノイン酸受容体 (RAR、RXR) を確認した。またタイラギ卵巣から、他の動物の RALDH1 と RALDH2 にそれぞれ構造の類似する 2 種類の RALDH-like cDNA を同定した。産卵期の卵巣における発現解析の結果、RALDH1-like mRNA は卵巣内の一部の卵母細胞の細胞質に発現していた。生殖腺指数の高い個体ではほとんど発現が認められず、発現が認められる卵母細胞数は卵巣の発達度と関連していると考えられた。

(3) タイラギ以外の二枚貝の卵成熟、精子運動活性化に対するレチノイン酸の作用の解析

ムラサキイガイ卵巣から採取した単離卵に対してレチノイン酸、セロトニンの卵成熟誘起作用を検討したが、タイラギと同様の方法では壊れる卵が多く正確な評価が困難であった。なお、卵巣片に対してはレチノイン酸、セロトニンのいずれも卵成熟誘起活性が認められなかった。ムラサキイガイ精子の運動活性については、レチノイン酸、セロトニン共に運動が活性化される個体と、レチノイン酸のみで活性化される個体が観察された。タイラギでは、コラゲナーゼ処理により単離卵が安定して一定量得られること、精巣から採取した精子はほとんど運動性がみられないことからレチノイン酸の作用を解析できた。タイラギ以外の二枚貝でレチノイン酸の作用を明らかにするには解析方法の再検討が必要と考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Awaji M, Matsumoto T, Funayama, S, Kanazawa T, Kimura S, Sawada S, Yamamoto M, Ojima D, Kanematsu M	4. 巻 553
2. 論文標題 Artificial fertilization method for the production of pen shell <i>Atrina pectinata</i> juveniles in hatcheries	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Aquaculture	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.aquaculture.2022.738101	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松本才絵、船山翔平、淡路雅彦
2. 発表標題 タイラギの人工受精におけるレチノイン酸処理濃度の検討
3. 学会等名 日本水産学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 船山翔平、前田雪、淡路雅彦、松本才絵
2. 発表標題 タイラギのレチノイン酸合成酵素遺伝子の同定と発現解析
3. 学会等名 日本水産学会
4. 発表年 2021年

〔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
研究分担者	鈴木 道生 (Suzuki Michio) (10647655)	東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・准教授 (12601)	

6. 研究組織（つづき）

	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	淡路 雅彦 (Awaji Masahiko) (20371825)	国立研究開発法人水産研究・教育機構・水研機構(南勢)・研究員(再雇用) (82708)	
研究分担者	船山 翔平 (Funayama Shohei) (70866946)	国立研究開発法人水産研究・教育機構・水研機構(南勢)・任期付研究員 (82708)	

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