

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20570057

研究課題名（和文） 棘皮動物マナマコ神経ペプチドの網羅的解析と神経機能分化の探索

研究課題名（英文） A study of neuronal differentiation of sea cucumber by the comprehensive analysis of neuropeptides.

研究代表者

吉国 通庸 (YOSHIKUNI MICHIIYASU)

九州大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号：50210662

研究成果の概要（和文）：200字

マナマコ周口神経を含む口器部分の EST 解析と神経抽出物の質量分析を実施したが、神経組織に特有な mRNA・ペプチドの検出数が少なく、組織純度が低すぎる事が判明した。高純度の神経組織を調製するために、新規に有機溶媒置換凍結乾燥法を開発した。これにより、神経ペプチドと通常の転写因子遺伝子の発現比 (peptide mRNA/EF1 α mRNA) から、従来法に比べ神経組織純度が数十倍に向上した。マナマコ神経系から生殖腺刺激ペプチドクビフリンを発見した。

研究成果の概要（英文）：

EST analysis and mass spectrometry revealed the low quality of neural tissues prepared by a conventional method. A complete dehydration could suppress the degradations of RNAs and peptides during microdissection. The ratio of a neural peptide mRNA and EF1 α mRNA was improved over several dozen folds. A new peptide, Cubifirn, was identified as a potent neural factor to induce oocyte maturation and spawning.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：形態・構造

キーワード：比較内分泌

1. 研究開始当初の背景

無脊椎動物では内分泌器官の発達が悪く、

生体制御の多くを神経伝達・神経分泌に依っている。我々は無脊椎動物の中で、神経系による生殖現象の制御作用の研究が最も進んでいるイトマキヒトデから、放射神経から分泌される生殖腺刺激ホルモンの精製に成功した。またその過程で、神経系に極めて多くのペプチドが存在することを見出した。ヒトデ以外の棘皮動物への研究の展開を意図し、既にマナマコ神経の EST 解析を開始していた。EST データの集積が進めば、その塩基配列情報を利用しつつ網羅的な神経ペプチドの同定が可能となると予想された。

2. 研究の目的

マナマコの周口神経は、口器を環状に取り囲み、放射神経はその周口神経から分枝して尾部に向けて走行する。こうした形態学的構造から、周口神経は5本の放射神経を統合的に束ねる機能を持つと予想される。本研究では、EST 解析と peptidome 解析の手法を用い、両神経系で実際に発現分泌される機能ペプチドの種類・発現量の違いを解析することで、これら両神経系の機能分化を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) 研究代表者が、マナマコの周口神経および放射神経試料の作成を行い、発現ペプチドの解析試料とすると共に、連携研究者に提供して EST 解析の試料とする。
- (2) 連携研究者により二つの神経系の EST 解析を実施すると共に、質量分析参照用データベースとして研究代表者に提供する。
- (3) マナマコ神経系から抽出したペプチド画分を液体クロマトグラフ質量分析計を行い、網羅的 MS/MS 解析を実施する。MS/MS 解析による de novo アミノ酸配列解析には、提供された EST データの塩基配列情報を参照する。
- (4) 両神経系で同定された mRNA・ペプチド種の比較解析に依り、両神経系の機能分担を明らかにする。

4. 研究成果

- (1) 当初解析を開始した EST データ中には神経に特徴的な遺伝子の頻度が極めて低く、また、peptidome 解析での EST データへのヒット率が予想より著しく低いことから、EST データの質が悪いと判断した。
- (2) 解析に供する神経組織の純度を上げるために、新規に“有機溶媒置換凍結乾燥法”を開発した。通常の凍結乾燥法よりも早い段階で脱水置換することで、凍結乾燥中の RNA の分解が抑えられた。同方法の有効性は、マナマコ神経より新規に見出した神経ペプチドの mRNA と一般的なハウスキーピング遺伝子の一つである EF1 α の mRNA の相対比が

数十倍に向上することで確認した。新規開発した本法は、様々な難抽出性組織の調製に利用可能な有用な技術である。

現在、本方法により抽出した周口神経・放射神経組織から、改めて mRNA・ペプチドを抽出し、解析を再開している。

(3) マナマコ神経系から、卵巢組織に作用して、極めて強力な卵成熟誘起活性を示す神経ペプチド NGIWyamide を精製・同定した。精巣に対しては強い収縮作用を示し、精子の放出を促進した。

個体への投与では、雌雄に作用して、特徴的な配偶子放出行動を誘発する作用を持つことが分かった。ナマコ類で初めて発見された産卵誘発ホルモンとして、“クビフリン (cubifrin)”と命名した。

卵巢中での作用部位は未知の組織であり、そこからさらに2次因子の分泌を促すと考えられる。この2次因子が卵母細胞を取り巻く濾胞細胞層に作用して卵成熟を誘起していると考えている。

クビフリンは、その作用機序から、無脊椎動物で初めての生殖腺刺激ホルモン又はその放出ホルモンであると考えられる。

クビフリンおよびそれを用いたマナマコの産卵誘発技術について特許出願をした。

(4) 抗クビフリンポリクローナル抗体を作成して、周口神経、放射神経でのクビフリンの局在を免疫組織化学的に調べた。クビフリンは、どちらの神経系にも発現していた。又、卵巢上皮組織および卵母細胞表層にも検出されたが、これらの組織での機能は不明である。

(5) クビフリンの構造活性相関解析を実施し、[Phe³]-cubifrin が天然型 cubifrin の100倍以上の生理活性を持つ super hormone であることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計7件)

1. Fujiwara A, Yamano K, Ohno K & Yoshikuni M., Spawning induced by cubifrin in the Japanese common sea cucumber, *Apostichopus japonicus.*, Fisheries. Science., 査読有, **76**, 795-801, 2010.
2. Fujiwara A, Unuma T, Ohno K & Yamano K., Molecular characterization of the major yolk protein of the Japanese common sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) and its expression profile during ovarian development., Comparative Biochemistry and Physiology., Part A., 査読有, **155**, 34-40, 2010.
3. Mita M, Yoshikuni M., Ohno K., Shibata Y, Paul-Prasanth B, Pitchayawasin S, Isoe M & Nagahama Y., A relaxin-like peptide purified from radial nerves induces oocyte

maturation and ovulation in the starfish, *Asterina pectinifera*., Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 査読有, **106**, 9507-9512, 2009.

4. Kato S, Tsurumaru S, Taga M, Yamane T, Shibata Y, Ohno K, Fujiwara A, Yamano K & Yoshikuni M., Neuronal peptides induce oocyte maturation and gamete spawning of sea cucumber, *Apostichopus japonicus*., Developmental Biology., 査読有, **326**, 169-176, 2009.

〔学会発表〕(計 27 件)

1. 吉国通庸, Comprehensive analysis of neuropeptides in marine invertebrates., 第 2 回 JAMBIO フォーラム, 2011.1.21, 静岡.
2. 吉国通庸, 棘皮動物における卵成熟のホルモン制御, 第 35 回日本比較内分泌学会シンポジウム「無脊椎動物における性と生殖の制御」, 2010.11.18, 静岡.
3. 吉国通庸, 海産無脊椎動物神経ペプチドの網羅的解析の試み, 第 81 回日本動物学会, 2010.9.23., 東京.
4. 山野恵祐, クビフリンを用いた in vitro 卵成熟誘起によるマナマコ採卵技術の開発-II, 平成 22 年度日本水産学会秋季大会, 2010.9.22.
5. 吉国通庸, The role of neuropeptides in inducing gamete spawning of echinoderm., 第 11 回国際精子学シンポジウム, 2010.6.24, 沖縄.
6. 山野恵祐, ナマコの卵成熟と産卵, 日本農芸化学会 2010 年度大会, 2010.3.27., 東京.
7. 吉国通庸, 棘皮動物の生殖を司る神経ペプチド, 第 34 回日本比較内分泌学会シンポジウム「新たな生物材料や分子が導く一般解と特殊解」, 2009.10.22, 神戸.
8. 山野恵祐, クビフリンを用いた in vitro 卵成熟誘起によるマナマコ採卵技術の開発, 平成 21 年度日本水産学会秋季大会, 2009.9.29.
9. 吉国通庸, マナマコクビフリンの作用機構の解析: クビフリンアナログの作用, 第 80 回日本動物学会, 2009.9.17., 静岡.
10. 吉国通庸, Spawning behavior of Japanese sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) induced by a neuropeptide, Cubifrin., 第 16 回国際比較内分泌学会議, 2009.6.24, HongKong.
11. 鶴丸早織, Proteome analysis of buccal ring nerve and radial nerve of Japanese common sea cucumber, *Apostichopus japonicus*., 16 回国際比較内分泌学会議, 2009.6.22, HongKong.

12. 加藤 慎一, Identification of neural peptides inducing oocyte maturation of Japanese common sea cucumber, *Apostichopus japonicus*. 16 回国際比較内分泌学会議, 2009.6.22, HongKong.
13. 山野恵祐, In vitro oocyte maturation induced by a neuropeptide in the Japanese common sea cucumber and its application to aquaculture. 16 回国際比較内分泌学会議, 2009.6.22, HongKong.
14. 吉国通庸, マナマコの放卵・放精を誘起する神経ペプチドの同定, 平成 21 年度日本水産学会春季大会, 2009.3.27.
15. 山野恵祐, 卵成熟誘起能をもつマナマコ神経ペプチドの作用経路, 平成 21 年度日本水産学会春季大会, 2009.3.27.
16. 吉国通庸, マナマコの卵成熟を誘起する神経ペプチドの同定, 第 33 回日本比較内分泌学会, 2008.12.5, 広島.
17. 吉国通庸, マナマコ卵成熟を誘起する生理活性物質の単離と同定, 第 79 回日本動物学会, 2008.9.5, 福岡.

〔図書〕(計 2 件)

1. 吉国通庸, 成山堂, 第 3 章 成熟・産卵, 「ナマコ—その生物・産業・文化」(高橋明義編), in press, 2011.
2. 吉国通庸, APC出版, 第1章 海洋生物のホルモン, 「天然物化学—海洋生物編」, pp. 3-21, 2008.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称: マナマコの放卵・放精誘起剤、およびそれを用いたナマコの生産方法
発明者: 吉国通庸、大野薫、山野恵祐、淡路雅彦、松本才絵、藤原篤志
権利者:
種類: 九州大学、自然科学研究機構、水産総合研究センター
番号: 特願 2008-216517 号
出願年月日: 平成 20 年 8 月 26 日
国内外の別: 国内

〔その他〕

○報道関連情報

1. NHK TV, おはようニッポン(全国版), 2008.11.22.
2. NHK TV, NHK ニュース(全国版), 2008.11.22.
3. NHK ラジオ放送第 1 (全国版), 2008.11.22.
4. 読売新聞掲載(九州版朝刊), 2009.1.16.
5. 水産新聞掲載(全国版), 2009.1.1.
6. サンケイ新聞掲載(全国版朝刊),

2008.11.23.

7. 北海新聞掲載（朝刊），2008.11.23.
8. 朝日新聞掲載（全国版朝刊），2008.11.22.
9. 日本経済新聞掲載（全国版朝刊），2008.11.22.
10. 西日本新聞掲載（朝刊），2008.11.22.
11. 中日新聞掲載（朝刊），2008.11.22.
12. 他、新聞各社のHP掲載多数.

○アウトリーチ活動情報

1. 対馬市ナマコチャレンジ協議会で講演・技術相談，対馬市，2010.11.26.
2. 沖縄県水産海洋研究センター・沖縄県栽培漁業センターで技術相談・講演，沖縄県糸満市・本部町，2010.5.20.
3. 長崎県栽培漁業公社，福岡県豊前海研究所，大分県浅海研究所，佐賀県玄海水産振興センター，三重県水産研究所，岩手県水産技術センター等で技術相談・指導，2009.2～2009.4.
4. マナマコ採卵技術講習会の開催（九州大学農学研究院・生研センター共催），対象：全国のマナマコ種苗生産関係者，九州大学，2008.12.19.

○ホームページ情報

http://bbs1.agr.kyushu-u.ac.jp/asweb/jikke_nsho/home.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉国 通庸 (YOSHIKUNI MICHIIYASU)
九州大学・大学院農学研究院・教授
研究者番号：50210662

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

大野 薫 (OHNO KAORU)
自然科学研究機構・基礎生物学研究所・教
研究者番号：10260035