

機関番号：32702
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21780186
 研究課題名（和文）甲殻類の性分化を制御するヘテロ 2 本鎖糖ペプチド（造雄腺ホルモン）の作製と機能解析
 研究課題名（英文）Preparation of an active recombinant peptide of crustacean androgenic gland hormone, a heterodimeric glycopeptide.
 研究代表者
 大平 剛（OHIRA TSUYOSHI）
 神奈川大学・理学部・助教
 研究者番号：10361809

研究成果の概要（和文）：甲殻類の造雄腺ホルモン（AGH）前駆体は N 末端側から B 鎖、C ペプチド、A 鎖からなり、A 鎖に糖鎖が付加されるとともに、C ペプチドが除去されて成熟型となる。最初に、大腸菌発現系を用いて発現させた組換えオカダンゴムシ AGH 前駆体から C ペプチドを除去する技術を確立した。そして、バキュロウイルス発現系を用いて、糖鎖を有する組換えオカダンゴムシ AGH 前駆体と組換えオニテナガエビ AGH 様分子前駆体を発現させた。

研究成果の概要（英文）：The sex differentiation in crustaceans is known to be controlled by a peptide hormone called androgenic gland hormone (AGH). The primary structure of the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare* AGH (Arv-AGH) was finally determined to be a heterodimeric glycoprotein. An N-linked glycan moiety in the mature Arv-AGH was found to be essential for biological activity. Therefore, in this study, a recombinant AGH with a glycan moiety was produced using a baculovirus expression system. Insect Sf9 cells were infected with a recombinant baculovirus expression vector containing an Arv-AGH cDNA insert and subsequently recombinant Arv-AGH was expressed. In Western blot analysis using an anti-Arv-AGH antibody, immunoreactive band of a glycosylated recombinant Arv-AGH was detected.

Finally, a cDNA encoding AGH-like peptide (Mar-IAG) was cloned from the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* and subsequently a recombinant Mar-IAG with a glycan moiety was expressed by the same methods as recombinant Arv-AGH.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,200,000 円	660,000 円	2,860,000 円
2010 年度	1,300,000 円	390,000 円	1,690,000 円
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000 円	1,050,000 円	4,550,000 円

研究分野：魚介類生理学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：造雄腺ホルモン、オカダンゴムシ、オニテナガエビ、十脚目、等脚目、甲殻類、性転換、性分化

1. 研究開始当初の背景

甲殻類の性分化は同じ節足動物に属する

昆虫とは大きく異なり、内分泌的な制御下にある。甲殻類においては、造雄腺と呼ばれる

器官が雄にのみ発達し、ここから AGH が分泌され、これが雄への分化を促すとともに、その後の雄の性特徴を発達させる。甲殻類の AGH に関する生化学・分子生物学的研究は、日本の研究グループが等脚目のオカダンゴムシを実験材料に用いて精力的に展開してきた。日本の研究グループは、オカダンゴムシの若い雌を雄性化させる活性を指標にして、オカダンゴムシ 12,000 匹分の造雄腺からわずか 24 ng の活性画分を精製することに成功した。そして、精製産物の部分アミノ酸配列の決定および cDNA クローニングにより、オカダンゴムシの AGH は糖鎖を有するヘテロ 2 本鎖ペプチドであることを世界で初めて明らかにした。オカダンゴムシの AGH は脊椎動物のインスリンと同様に N 末端側からシグナルペプチド、B 鎖、C ペプチド、A 鎖からなる前駆体として合成される。日本の研究グループは、A 鎖に N-結合型糖鎖が付加すること、および、プロ AGH (B 鎖+C ペプチド+A 鎖) から C ペプチドが除去されることで活性を持つようになることを、昆虫細胞で発現させた組換え体を用いて明らかにした。しかし、この実験では C ペプチドを完全に除去することができず、組換え体の活性は天然 AGH と比べて 1/10 しかなかった。天然 AGH は造雄腺中に極々微量しか存在しないことから、天然物と同程度の活性をもつ組換え AGH の作製は、今後 AGH の機能を明らかにしていくうえで急務の課題となっている。

日本の研究グループは、エビやカニなどの AGH の構造を明らかにすることを最終目標として、オカダンゴムシ以外の AGH のアミノ酸配列データの蓄積を進めた。そして、5 種類の陸生等脚類から AGH をコードする cDNA を PCR で増幅した。しかし、それら 5 種類の陸生等脚類は互いに近縁種であるにもかかわらず予想以上にアミノ酸配列の相性は低く、等脚類以外への同手法の応用は難しいことが判明した。海外の研究グループも十脚目の AGH を探索してきたが、前述の理由から長年成功には至らなかった。しかし、2007 年にミナミザリガニ科に属する *Cherax quadricarinatus* の造雄腺の EST 解析を行い、造雄腺で特異的に発現する IAG の存在を報告した。IAG の生物活性はこの分野の最もホット話題であるが、IAG はオカダンゴムシ AGH と同様に糖鎖を有するヘテロ 2 本鎖ペプチドであることから、上述したように組換え体の作製が非常に難しく、進展の見込みは立っていない。このような背景を受けて、本課題「甲殻類の性分化を制御するヘテロ 2 本鎖糖ペプチド (造雄腺ホルモン) の作製と機能解析」を計画した。

2. 研究の目的

近年発見された IAG は十脚目 AGH の最有力候補であるが、IAG の生物活性は未だ調べられていない。そこで、本研究では IAG が甲殻類十脚目の真の AGH であるかどうかを明らかにすることを目的として以下の実験を試みた。まず、*C. quadricarinatus* と同じ抱卵卵目に属する淡水エビで、養殖対象種として世界的に重要なオニテナガエビの IAG をコードする cDNA をクローニングした。次に、天然物の生物活性などの知見が蓄積しているオカダンゴムシ AGH をモデル分子として、ヘテロ 2 本鎖糖ペプチドの作成法を確立した。そして、その方法を応用して組換えオニテナガエビ IAG を作製し、それを若い雌に投与して雄への性転換を誘導できるかどうかを最終的な目的とした。

3. 研究の方法

(1) AGH 前駆体からの C ペプチド除去法の最適化

オカダンゴムシの組換え AGH 前駆体を大腸菌で発現させ、蛋白質巻き戻し反応により天然型のジスルフィド結合様式をもつ組換え体を作製した。そして、この組換え AGH 前駆体から C ペプチドを除去するために、メタロエンドペプチダーゼ (Lys-N) を用いた部分消化を行った。酵素消化による C ペプチド除去の成否は、MALDI-TOF-MS を用いた質量分析とアミノ酸シーケンサーを用いた N 末端アミノ酸配列解析により調べた。

(2) 糖鎖を有する組換えオカダンゴムシ AGH 前駆体の作製

オカダンゴムシ AGH cDNA をポリヘドリンプロモーターの下流に組み込んだ組換えバキュロウイルス DNA を作製した。組換えバキュロウイルス DNA をリポフェクション法により昆虫培養細胞 sf9 へ導入し、組換えオカダンゴムシ AGH 前駆体を発現させた。組換え体の発現は抗オカダンゴムシ AGH 抗体を用いたウエスタンブロッティングで確認した。

(3) オニテナガエビの IAG をコードする cDNA のクローニング

ミナミザリガニ科の *C. quadricarinatus* で同定されている IAG のアミノ酸配列をもとに縮重プライマーを作製し、それを用いた RT-PCR によりオニテナガエビの IAG をコードする cDNA 断片を増幅した。次いで、3'RACE および 5'RACE により、オニテナガエビの IAG の全長 cDNA の塩基配列を決定した。そして、オニテナガエビ IAG の造雄腺特異的な発現を RT-PCR により確認した。

(4) 糖鎖を有するオニテナガエビ IAG 前駆体の作製

(3)で単離したオニテナガエビ IAG cDNA を組み込んだバキュロウイルス DNA を作製し、(2)と同様の方法で組換えオニテナガエビ IAG 前駆体を発現させた。組換え体の発現は抗オニテナガエビ IAG 抗体を用いたウエスタンブロッティングで確認した。

4. 研究成果

(1)AGH 前駆体からの C ペプチド除去法の最適化

大腸菌で発現させたオカダンゴムシの組換え AGH 前駆体を、低濃度 (0.25 ng/μl) のメタロエンドペプチダーゼで 8 時間消化したところ、C ペプチドの両端をほぼ完全に切断できた。消化産物を逆相の HPLC に供したところ、B 鎖と A 鎖からなるヘテロ 2 本鎖ペプチドが簡便に精製された。

(2)糖鎖を有する組換えオカダンゴムシ AGH 前駆体の作製

組換え AGH 前駆体をバキュロウイルス・昆虫細胞発現系を用いて発現させた。細胞溶解液を SDS-PAGE で分離し、抗オカダンゴムシ AGH 抗体を一次抗体に用いたウエスタンブロットを行った結果、17.5 kDa と 22 kDa の位置に 2 本の免疫陽性のバンドが観察され、17.5 kDa のバンドは糖鎖が付加していないもの、22 kDa のバンドは糖鎖が付加したものと考えられた。次いで、組換え AGH 前駆体を逆相 HPLC で精製し、同様にウエスタンブロットに供した。その結果、二つのピーク画分に、共に免疫陽性の 2 本のバンドが確認された。二つのピークにまたがって免疫陽性の反応が観察されたのは糖鎖のパターンが異なっているためと推測された。

(3)オニテナガエビの IAG をコードする cDNA のクローニング

オニテナガエビの IAG の cDNA は、N 末端側から 27 残基のシグナルペプチド、40 残基の B 鎖、塩基性アミノ酸 2 残基からなるプロセシング配列、60 残基の C ペプチド、塩基性アミノ酸 2 残基からなるプロセシング配列、42 残基の A 鎖からなる 173 残基の前駆体をコードしていた。構成されていた。A 鎖にはアスパラギン結合型糖鎖の付加配列 (Asn-Ala-Ser) が一カ所存在した。オニテナガエビと *C. quadricarinatus* の IAG のアミノ酸配列を比較したところ、相同性はシグナルペプチドが 32%、B 鎖が 21%、C ペプチドが 23%、A 鎖が 30% と非常に低かった。しかし、インシュリンスーパーファミリーに共通して見られる 6 個のシステイン残基の位置は保存されていた。組織別の遺伝子発現解析の結果、オニテナガエビ IAG は造雄腺で特異的に発現していた。

(4)糖鎖を有するオニテナガエビ IAG 前駆体の作製

(2)の方法を参考にして、オニテナガエビの IAG 前駆体をバキュロウイルス・昆虫細胞発現系を用いて発現させた。オニテナガエビの IAG に対する抗体を用いてウエスタンブロットを行った結果、組換えバキュロウイルスを感染させた細胞では免疫陽性のバンドが検出されたが、ウイルスを感染させていない細胞ではバンドは観察されなかった。また、検出された免疫陽性のバンドの位置は、組換え IAG 前駆体の予想される分子量よりも大きかった。これらの結果より、期待通りの糖鎖を有する組換え IAG 前駆体が発現していると考えられた。

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 3 件)

- ① K. Banzai, S. Izumi, T. Ohira, Molecular cloning and expression analysis of cDNAs encoding insulin-like androgenic gland factor from three palaemonid species, *Macrobrachium lar*, *Palaemon paucidens* and *P. pacificus*, *Jpn. Agric. Res. Q.*, 査読有、印刷中
- ② K. Banzai, N. Ishizaka, K. Asahina, K. Suitoh, S. Izumi, T. Ohira, Molecular cloning of a cDNA encoding insulin-like androgenic gland factor from the kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus* and analysis of its expression, *Fish. Sci.*, 査読有、Vol. 77, 2011, 329-335
- ③ 泉進、齊藤裕、長澤寛道、長谷川由利子、大平剛、発生に伴うオカダンゴムシ造雄腺ホルモン (AGH) の発現動態の解析, *Sci. J. Kanagawa Univ.*, 査読無、Vol. 21, 2010, 57-60

[学会発表] (計 6 件)

- ① 大平剛、甲殻類における性分化のホルモン制御、日本比較内分泌学会第 35 回大会シンポジウム、2011 年 11 月 19 日、静岡グラシッパ
- ② 坂西綱太、クルマエビの造雄腺ホルモン様分子をコードする cDNA のクローニング、平成 22 年度日本水産学会秋季大会、2010 年 9 月 24 日、京都大学吉田キャンパス
- ③ 鶴岡慎哉、成長に伴うオニテナガエビ造雄腺の組織像の変化、平成 22 年度日本水産学会秋季大会、2010 年 9 月 23 日、京都大学吉田キャンパス
- ④ 鶴岡慎哉、オニテナガエビの造雄腺ホルモン様分子に対するポリクローナル抗体の作製、平成 22 年度日本水産学会春季大会、

2010年3月27日、日本大学生物資源科学部

- ⑤ 坂西綱太、バキュロウイルス発現系を用いた組換えオニテナガエビ造雄腺ホルモン様分子の作製、平成22年度日本水産学会春季大会、2010年3月27日、日本大学生物資源科学部
- ⑥ 大平剛、甲殻類の性分化を制御するヘテロ2本鎖ペプチド(造雄腺ホルモン)の作製、日本動物学会第80回大会、2009年9月17日、静岡グランシップ

[図書] (計0件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計0件)
- 取得状況 (計0件)

[その他]

- なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大平 剛 (OHIRA TSUYOSHI)
神奈川大学・理学部・助教
研究者番号：10361809

(2) 研究分担者

- 該当者なし

(3) 連携研究者

- 該当者なし