

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23380109

研究課題名(和文) 主要海産二枚貝の人工種苗生産高度化に向けた生殖機能の神経内分泌制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of mechanism of neuroendocrine control in reproduction for advancement of artificial seed production of commercial bivalve mollusks

研究代表者

尾定 誠 (Makoto, Osada)

東北大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：30177208

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,600,000円、(間接経費) 4,380,000円

研究成果の概要(和文)：ホタテガイとマガキの中枢神経系から同定された生殖腺刺激ホルモン放出ホルモンペプチドは、エストロゲン合成の促進調節を介したホタテガイの精原細胞増殖促進機能を示した。

ヨーロッパイガイ、ムラサキイガイ、ホタテガイで決定された2タイプのエストロゲン受容体(ER)は卵巣と精巣で発現し、レポーターアッセイによってpyERは転写因子として、pyERRは構成的な活性化因子として働くことが示唆された。

セロトニンによる卵成熟と精子運動活性化を卵成熟休止因子(OMAF)は細胞外からのカルシウム流入抑制によって阻害し、抗体による生体内OMAFの機能解除によって、セロトニンによる産卵誘発効果が強く増強された。

研究成果の概要(英文)：We cloned the cDNA transcripts of prepro Gonadotropin Releasing Hormones (GnRH)-like peptides from the central nervous system of scallop(pyGnRH) and oyster (cgGnRH). The putative pyGnRH peptide stimulated the proliferation of spermatogonia, which was mediated through the induction of estrogen synthesis by pyGnRH.

We successfully cloned two novel forms of estrogen receptor from two kinds of mussels and Japanese scallop. These receptors were classified each into an estrogen receptor (ER) and estrogen-related receptor (ERR) and were expressed in both ovary and testis. The flounder ER α -mediated gene assay suggested that pyER behaves as a transcription factor to estrogen while pyERR is a constitutive activator.

Serotonin (5-HT)-induced oocyte maturation and sperm motility is inhibited by oocyte maturation arresting factor (OMAF) due to interference of extracellular Ca $^{2+}$ influx. The release from suppressive OMAF due to absorption with antibody against OMAF amplified the 5-HT-induced spawning.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学一般

キーワード：二枚貝 神経内分泌 エストロゲンシグナリング 配偶子形成 産卵

1. 研究開始当初の背景

海産二枚貝の増養殖において、近年、不用意な移植や環境変化などによって、ウミグモやサキグロタマツメタガイなどがアサリなど海産二枚貝の資源量の激減を引き起こし甚大な漁業被害をもたらしている。さらに、パーキンサス原虫による感染拡大の危険性もはらんでおり、将来にわたる持続的な海産二枚貝の増養殖が危ぶまれている現状にある。海産二枚貝の資源量の回復と安定した生産を実現するためにも、安全な漁場環境の保全と同時に、安全かつ安定した種苗の供給が不可欠である。それを可能にする海産二枚貝の種苗生産技術の開発が急務であるにもかかわらず、人工種苗生産技術開発が立ち遅れている。広く二枚貝類に適用でき、しかも再現性のある確実な人工種苗生産を実現させるためにも、未だ未解明な海産二枚貝の生殖内分泌調節機構を明らかにし、その基盤を整えることが喫緊の課題である。

配偶子形成については、軟体動物における GnRH ペプチド構造の特徴づけとステロイド合成を含めた中枢神経の生殖生理機能の解明と生殖関連遺伝子のエストロゲンによる発現調節とエストロゲン受容体 (ER) アイソフォームの機能関連の解明が急がれ、さらに、産卵については、抑制調節因子である卵成熟休止因子 (OMAF) と誘起因子であるセロトニン (5-HT) の機能を明らかにすることが、確実な人工産卵と高度な人工種苗生産を実現する重要な課題である。

2. 研究の目的

本研究は研究期間内に以下の目標を立てて実施した。

(1) 主要な海産二枚貝の配偶子形成を上位で支配する GnRH の分子種を同定し、それを既知のものと比較整理し、その特徴と配偶子形成における働きを明らかにする。

(2) エストロゲン生合成調節と GnRH との関係、配偶子形成を軸に明らかにし、海産二枚貝におけるステロイドホルモン生合成系の上位支配の存在を中枢神経系に着目して検討する。

(3) 主要な海産二枚貝における 2 タイプのエストロゲン受容体の存在とその普遍性を明らかにし、配偶子形成を支配するエストロゲンシグナルの受容と伝達における、これらアイソフォームの相互関連を解明する。

(4) 産卵の前提である卵成熟と精子活性化に対する OMAF の抑制機序および、主要海産二枚貝での同定と比較整理によって、この抑制機能を担う領域の特定と構造を解析し、5-HT による産卵誘発を強く増強する OMAF の抑制領域の有効なノックダウン手法を検討する。

これらの成果によって母貝催熟と評価および人工産卵による種苗生産の高度化を目指す。

3. 研究の方法

(1) GnRH の同定と配偶子形成における機能とステロイドホルモン生合成調節

ホタテガイとマダコ GnRH 前駆体 cDNA 配列のペプチド領域に縮重プライマーを設計し、その他の二枚貝の中枢神経の mRNA を鋳型に 3', 5'RACE によって配列を獲得した。獲得した配列の一次構造解析、分子系統樹解析によるペプチド配列の特徴付けと分類および発現解析を行った。in vitro 精巣組織培養における推定ペプチドと種々の拮抗薬の配偶子形成に対する影響と in vivo 投与による生殖巣発達への影響を評価し、GnRH の持つ配偶子形成調節機能の検証とステロイドホルモン生合成との関係を明らかにする。

(2) エストロゲン受容体の同定と機能解析
すでに同定しているヨーロッパイガイの 2 タイプのエストロゲン受容体 (ER) cDNA に加え、マダコ等の軟体動物 ER の DNA 結合領域とリガンド結合領域に縮重プライマーを設計し、その他の二枚貝の体組織の mRNA を鋳型に 3', 5'RACE によって配列を獲得する。獲得した配列の一次構造解析、分子系統樹解析による受容体の特性の推定と分類および発現解析を行う。リガンド結合領域に着目して、ヒラメ ER α のリガンド結合領域にホタテガイで単離同定した pyER と pyERR の同領域を組み込んだキメラベクターとルシフェラーゼ遺伝子上流にヒラメビテロゲニンの応答配列を含むベクターを共トランスフェクションしたメダカ肝細胞を用いたレポーターアッセイを行い、2 タイプの ER の機能評価としてリガンド結合領域に着目してエストロゲンに対する親和性を評価した。

(3) セロトニンと卵成熟休止因子 (OMAF) の機能と産卵誘発

卵と同様にセロトニン (5-HT) によって活性化される精子を解析モデルとして、5-HT による活性化に関わる種々のイオンや pH の条件を解析した。組み換え OMAF タンパクを大腸菌と酵母で作製し、5-HT による精子における細胞内 Ca²⁺動態とそれに及ぼす OMAF の作用機序を運動性評価とカルシウムイメージングによって解析し、精子運動の活性化における細胞内 Ca²⁺の役割を検討した。OMAF の部分抗体を作製し、その特性を評価し、抗体による生体内の OMAF 中和による機能阻害と 5-HT による産卵誘発に対する増強効果を検証した。

4. 研究成果

(1) GnRH の同定と配偶子形成における機能とステロイドホルモン生合成

ホタテガイとマガキの中枢神経系から単離された GnRH 前駆体 cDNA の一次構造が明らかにされた。それぞれの転写産物は pyGnRH (AB486004)、cgGnRH (HQ712119) と名付けられ、それらは神経ホルモン前駆体に共通した N 末端シグナルペプチドと GnRH 関連ペプチド (GAP) をともなう C 末端開裂部位を保有していた。ま

た、軟体動物に共通して N 末端のピログルタミン酸の後に、脊椎動物にはない、2 アミノ酸残基が余分に挿入されていた。これら軟体動物の GnRH は、既知の脊椎動物の 3 タイプの GnRH や無顎類 GnRH と異なる 5 つ目の分類群を構成していることが明らかになった。

推定ペプチド pyGnRH は血球を介して、ホタテガイ精巣培養系で哺乳類 GnRH と同様に、精原細胞増殖を誘導し、この作用にはエストロゲン生合成刺激が介在していることも明らかになった (図 1)。GnRH の先祖分子を保有しているものの、下垂体を持たないほとんどの動物では、GnRH がステロイドホルモン生合成を上位で支配することで生殖が調節されていることが示唆された。実際に徐放性の pyGnRH をホタテガイに投与すると、対照群に比べ精巣発達が著しく促進され、エストロゲン合成を介した精巣の人為成熟の可能性が検証された。

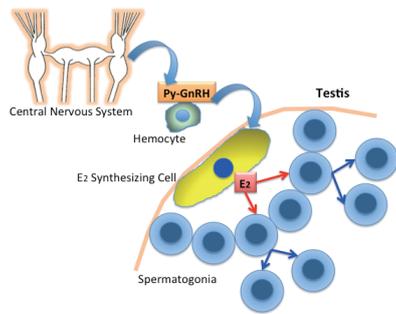


図 1 ホタテガイ GnRH による精原細胞増殖の促進メカニズム

(2) エストロゲン受容体の同定と機能解析

ヨーロッパイガイ、ムラサキイガイおよびホタテガイのエストロゲン受容体 (ER) はアイソフォームを形成しており、それぞれの種は 2 タイプ保有していることが明らかになった。ヨーロッパイガイでは MeER1 (AB257132)、MeER2 (AB257133)、ムラサキイガイでは MgER1 (AB553575)、MgER2 (AB257135)、ホタテガイでは pyER (AB553574)、pyERR (AB809647) が単離され、ER に共通した DNA 結合領域 (C ドメイン)、ヒンジ領域 (D ドメイン)、リガンド結合領域 (E ドメイン) が保存され、特に、DNA 結合領域は他の領域に比べ極めて高い相同性を持っていた。分子系統樹解析によって、Me/MgER2 と pyER は ER に Me/MgER1 と pyERR はエストロゲン関連受容体 (ERR) に分類された。軟体動物の二枚貝類では ER は 2 タイプのアイソフォームを形成している可能性が高いことが示唆された。

これら ER 遺伝子の発現は、生殖巣の精原細胞、卵母細胞と濾胞細胞に局在しており、生殖との関連性が示唆された。ヨーロッパイガイでは MeER2 のみにエストロゲンによる

促進的な自己調節機能が認められ、二枚貝類の少ないリガンド分泌に対する感受性の増強機能が推測された。pyER と pyERR のリガンド結合領域に入れ替えたヒラメ ER α (fER α) のキメラベクターによるメダカ肝細胞のレポーターアッセイによって、pyER が、fER α ほどではないがエストロゲンに対する転写因子、pyERR がリガンドに依存しない構成的な転写因子であることが示唆された (図 2)。

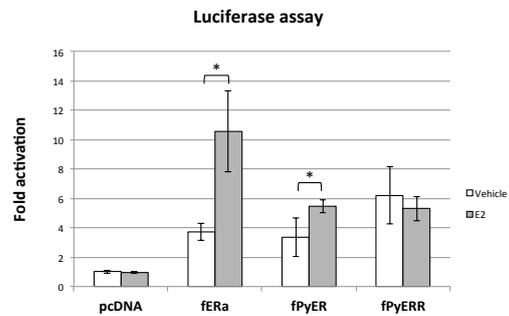


図 2 ホタテガイ pyER と pyERR のリガンド結合領域に対するエストロゲン-17 β (E_2) の親和性

(3) セロトニンと卵成熟休止因子 (OMAF) の機能と産卵誘発

二枚貝類の産卵には、5-HT による卵と精子に局在するセロトニン受容体を介した卵成熟と精子活性化が大前提である。卵成熟と同様に精子活性化においても、5-HT によるカルシウムイオンチャンネルを介した細胞内カルシウムの流入が必須であり、続く細胞内 pH の上昇 (塩基性化)・細胞内カリウム流出によって精子活性化が起こることが明らかになった (図 3)。

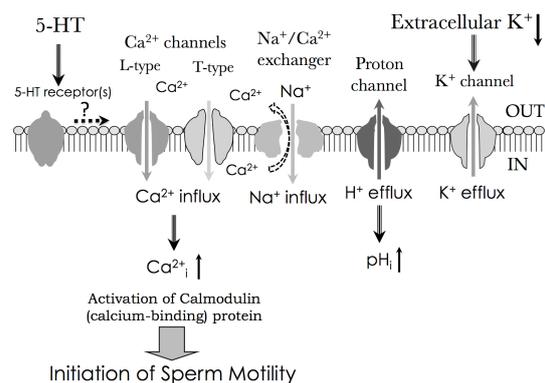


図 3 海産二枚貝のセロトニンによって誘発される細胞内カルシウム流入、細胞内 pH 上昇、細胞内カリウム流出による精子活性化機構

また、この精子活性化は組み換え OMAF によって強く抑制され、5-HT による細胞内カルシウム流入のオシレーション (カルシウム波の繰り返し) を完全に抑えていることを明らかにした。このことは、二枚貝の産卵は、卵成熟と精子活性化に促進的な 5-HT と抑制的

な OMAF による細胞内カルシウム流入の調節の下に成り立っていることを示唆している。すなわち、細胞内カルシウム流入を抑制している OMAF からの解除の下で、5-HT を機能させることによって確実な産卵誘発が期待された。

OMAF の部分アミノ酸からなるペプチドに対する抗体による生体内 OMAF の中和とそれに続く 5-HT 投与による産卵誘発をホタテガイと近縁種のアカザラガイで検証した。5-HT のみの投与区に比べ、著しく放卵・放精を引き起こし、内因性の OMAF による産卵抑制機能を阻止することで 5-HT の産卵誘発機能を増強させることができることを示すことができた (図 4)。

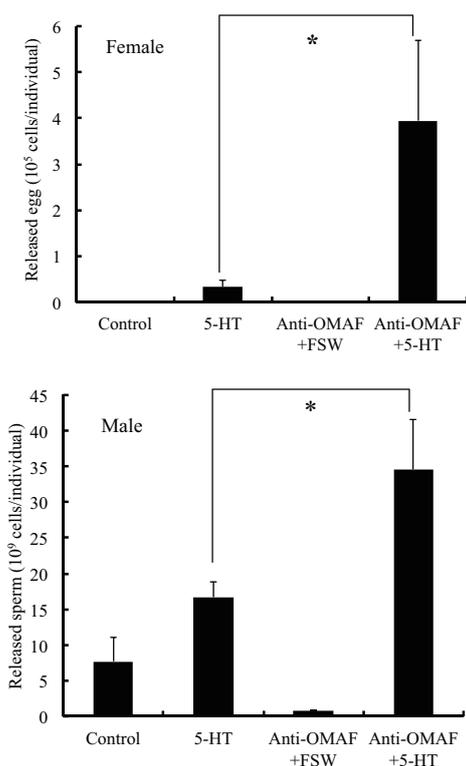


図 4 5-HT in vivo 投与によるアカザラガイの放卵と放精誘起に対する抗 OMAF ペプチド抗体投与の影響
抗体投与によって1個体当たりの5-HTによる放卵と放精数が有意に上昇した。

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 4 件)

- ① Sayyed Mohammad Hadi Alavi, Natsuki Matsumura, Kogiku Shiba, Naoki Itoh, Keisuke G Takahashi, Kazuo Inaba and Makoto Osada, Roles of extracellular ions and pH in 5-HT-induced sperm motility in marine bivalve, *Reproduction*, 査読有

147, 331-345, 2014, DOI: 10.1530/REP-13-0418

- ② Makoto Osada and Nicholas Treen, Molluscan GnRH Associated with Reproduction, *Gen. Comp. Endocrinol.*, 査読有 181, 254-258, 2013, DOI: 10.1016/j.ygcen.2012.09.002
- ③ Yuan Yuan, Toru Tanabe, Fumihito Maekawa, Kazuo Inaba, Yusuke Maeda, Naoki Itoh, Keisuke G. Takahashi and Makoto Osada, Isolation and Functional Characterization for Oocyte Maturation and Sperm Motility of the Oocyte Maturation Arresting Factor from the Japanese Scallop, *Patinopecten yessoensis*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 査読有 179, 350-357, 2012, DOI: 10.1016/j.ygcen.2012.09.006
- ④ Nicholas Treen, Naoki Itoh, Hanae Miura, Ippei Kikuchi, Takenori Ueda, Keisuke G. Takahashi, Takayoshi Ubuka, Kazutoshi Yamamoto, Peter J. Sharp, Kazuyoshi Tsutsui, and Makoto Osada. Mollusc gonadotropin-releasing hormone directly regulates gonadal functions: A primitive endocrine system controlling reproduction. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 査読有 176, 167-172. 2012, DOI: 10.1016/j.ygcen.2012.01.008

[学会発表] (計 15 件)

- ① Sayyed Mohammad Hadi Alavi, Natsuki Matsumura, Kogiku Shiba, Naoki Itoh, Keisuke G. Takahashi, Kazuo Inaba, Makoto Osada, Serotonin induces initiation of sperm motility in marine bivalve mollusks, 日本動物学会第 84 回岡山大会、岡山市、2013 年 9 月 26-28 日
- ② 大越葉月・峰岸有紀・伊藤直樹・高橋計介・尾定誠、ホタテガイ GnRH による生殖細胞発達に関わる遺伝子の網羅的解析の試み、平成 25 年度日本水産学会秋季大会、津市、2013 年 9 月 19-21 日
- ③ 大内仁志・伊藤直樹・高橋計介・尾定誠、ホタテガイ GnRH の性転換と精子形成への関与、平成 25 年度日本水産学会秋季大会、津市、2013 年 9 月 19-21 日
- ④ Yurika Otoki, Emily C. Marquez, Yoko Ohta, Takeshi Kitano, Naoki Itoh, Keisuke G. Takahashi, Makoto Osada, Expression and functional analyses for estrogen receptors of Japanese scallop, *Patinopecten yessoensis*. *International Congress of Comparative Endocrinology (17th ICCE2013)*, Barcelona, Spain, July 15-19, 2013
- ⑤ 乙木百合香、Emily Marquez、太田陽子、北野健、伊藤直樹、高橋計介、尾定誠、ホタテガイにおけるエストロゲン受容体の発現様式と機能、平成 25 年度日本水産学会春季大会、東京都品川区、2013

- 年 3 月 26-30 日
- ⑥ 乙木百合香・Emily Marquez・伊藤直樹・高橋計介・尾定誠、海産二枚貝エストロゲン受容体の機能解析、2012 年度日本動物学会中部支部大会、松本市、2012 年 11 月 17-18 日
- ⑦ S. M. Hadi Alavi, Natsuki Matsumura, Naoki Itoh, Keisuke G. Takahashi and Makoto Osada、Diversity in the Mechanisms of Sperm Activation in Fish and Bivalve、平成 24 年精子研究会、仙台市、2012 年 11 月 10 日 (招待講演)
- ⑧ 乙木百合香、Emily Marquez、伊藤直樹、高橋計介、尾定誠、ホタテガイエストロゲン受容体遺伝子の発現解析、平成 24 年度日本水産学会秋季大会、下関市、2012 年 9 月 14-17 日
- ⑨ S. M. Hadi Alavi, Natsuki Matsumura, Naoki Itoh, Kogiku Shiba, Kazuo Inaba, Makoto Osada, CALCIUM-DEPENDENT SPERM ACTIVATION IN BIVALVE MOLLUSC IS PROHIBITED BY SCALLOP OOCYTE MATURATION ARRESTING FACTOR AND ENHANCED BY SEROTONIN, AQUA 2012, Prague, Czech Republic, Sep 1-5, 2012
- ⑩ Makoto Osada, Molluscan GnRH associated with reproduction. (招待講演) The Seventh Congress of the Asia and Oceania Society for Comparative Endocrinology (AOSCE), Kuala Lumpur, Malaysia, 3 – 7 March 2012
- ⑪ Treen N., Itoh N., Miura H., Kikuchi I., Ueda T., Takahashi K.G., Ubuka T., Yamamoto K., Sharp P.J., Tsutsui K., Osada M., Mollusc gonadotropin-releasing hormone directly regulates gonadal functions: a primitive endocrine system controlling reproduction, The Seventh Congress of the Asia and Oceania Society for Comparative Endocrinology (AOSCE), Kuala Lumpur, Malaysia, 3 – 7 March 2012
- ⑫ Otoki Y., Itoh N., Treen N., Marquez E., Osada M., Primary structural analysis of estrogen receptors in marine bivalves, The Seventh Congress of the Asia and Oceania Society for Comparative Endocrinology (AOSCE), Kuala Lumpur, Malaysia, 3 – 7 March 2012
- ⑬ Nicholas Treen, Naoki Itoh, Hanae Miura, Ipppei Kikuchi, Takenori Ueda, Keisuke G. Takahashi, Takayoshi Ubuka, Kazutoshi Yamamoto, Kazuyoshi Tsutsui, Peter Sharp, Makoto Osada, Bivalve Mollusc Gonadotropin-Releasing Hormone. 第 36 回日本比較内分分泌学会大会、東京都千代田区、2011 年 11 月 22-25 日

- ⑭ 乙木百合香・伊藤直樹・Nicholas Treen・尾定誠、海産二枚貝のエストロゲンレセプター的一次構造、第 36 回日本比較内分分泌学会大会、東京都千代田区、2011 年 11 月 22-25 日
- ⑮ 松村夏希・Hadi Alavi・伊藤直樹・高橋計介・尾定誠・加藤元一・寺井しま・稲葉一男・柴小菊、ホタテガイ由来卵成熟休止因子 OMAF の精子運動抑制調節への Ca²⁺ の関与、平成 24 年度日本水産学会春季大会、東京都品川区、2011 年 3 月 27-30 日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://www.agri.tohoku.ac.jp/zoshoku/seisyoku.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

尾定 誠 (OSADA, Makoto)
東北大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号：30177208

(2) 研究分担者

伊藤 直樹 (ITOH, Naoki)
東北大学・大学院農学研究科・助教
研究者番号：30502736

千葉 洋明 (CHIBA, Hiroaki)
北里大学・水産学部・准教授
研究者番号：50236816

(3) 連携研究者

()

研究者番号：