

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 11日現在

機関番号：32702

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23780204

研究課題名（和文）エビ類のサイナス腺に存在する成熟促進ホルモンの単離

研究課題名（英文）Isolation of vitellogenesis-stimulating hormone from the sinus glands of *Maruspenaeus japonicus* and *Palaemon paucidens*

研究代表者

大平 剛 (OHIRA TSUYOSHI)

神奈川大学・理学部・准教授

研究者番号：10361809

研究成果の概要（和文）：海棲のクルマエビと淡水棲のスジエビを実験材料に用いて、それらのサイナス腺から成熟促進ホルモンの精製を試みた。クルマエビにおいては成熟期にサイナス腺中の含量が増加する成熟促進ホルモン候補分子を単離することができた。一方、スジエビからは成熟促進ホルモンは単離できなかったが、成熟制御因子である卵黄形成抑制ホルモンと思われる分子を単離することができた。今後、両分子の生物活性を明らかにしていく予定である。

研究成果の概要（英文）： In this study, Isolation of vitellogenesis-stimulating hormone (VSH) from the sinus glands of *Maruspenaeus japonicus* and *Palaemon paucidens* was conducted. In *M. japonicus*, a candidate molecule for VSH, which specifically increases in the sinus gland during vitellogenic stage, was purified. In *P. paucidens*, VSH has not yet been isolated, but vitellogenesis-inhibiting hormone (VIH) was successfully purified. In the near future, biological activities of the both stimulating and inhibiting hormones will be elucidated.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：成熟促進ホルモン、卵成熟、クルマエビ、スジエビ、十脚目、甲殻類

1. 研究開始当初の背景

甲殻類の成熟を制御する因子については、その存在が古くから指摘されていた。甲殻類の複眼は頭部から突出した形態を持つものが一般的であり、その複眼を支える部分は眼柄と呼ばれている。この眼柄を切除すると、成熟が促進されることから、眼柄内にはこれを抑制的に制御する因子が含まれているものと考えられてきた。その後の研究で、甲殻類の成熟は眼柄内のX器官・サイナス腺系で合成・分泌される卵黄形成抑制ホルモンにより制御されていることが明らかとなった。その後、日本の研究グループはクルマエビ科のクルマエビ、バナメイ、

ヨシエビから次々と卵黄形成抑制ホルモンを精製・単離し、構造決定をした一方、成熟を促進する因子が脳や胸部神経節などの中枢神経系に存在することが1970年代に示唆された。その後、数多くの研究者がそれら中枢神経系から成熟促進因子の精製・単離を試みたものの、成功には至らなかった。その様な状況の中、2007年にヨシエビのサイナス腺中に成熟を促進する活性をもつ神経ホルモンが存在することが報告された。2009年にはアオガニでも同様の報告があったことから、サイナス腺中の成熟促進ホルモンは広く甲殻類に存在しているものと考えられた。この様な背景を受けて、本課

題「エビ類のサイナス腺に存在する成熟促進ホルモンの単離」を計画した。

2. 研究の目的

本研究では海棲のクルマエビと淡水棲のスジエビを実験材料に用いて、それらのサイナス腺から成熟促進ホルモンを精製し、その一次構造を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) エビ類の成熟促進ホルモン候補分子の単離

未成熟なクルマエビのサイナス腺と、成熟したクルマエビのサイナス腺をそれぞれ顕微鏡下で摘出し、それらに含まれる神経ホルモンを有機溶媒で抽出した。そして、未成熟エビ由来の抽出物と成熟エビ由来の抽出物をそれぞれ逆相のHPLCで分離し、成熟エビの抽出物でのみ観察されるピーク産物と、成熟エビで量が増えるピーク産物を回収した。

スジエビは既知の成熟制御因子と相同性を有するサイナス腺ペプチドを逆相のHPLCを用いて精製した。

(2) エビ類の成熟促進ホルモン活性の測定

成熟したクルマエビのサイナス腺抽出物を未成熟または成熟したクルマエビの卵巣培養系に加え、培養後に卵巣でのピテロジェニン遺伝子の発現量が増加しているかどうかを調べた。スジエビの場合は、未成熟なエビの筋肉中に成熟制御因子の候補分子を注射し、数日間飼育した後にピテロジェニン遺伝子の発現量が増加しているかどうかを調べた。

(3) エビ類の成熟促進ホルモンの構造決定

活性が観察された分子のN末端アミノ酸配列を解析し、部分アミノ酸配列を決定した。

(4) クルマエビの組換え脱皮抑制ホルモンと組換え脱皮抑制ホルモン様分子の作製

これら2種類の分子をコードするcDNAを発現ベクターに組み込み、これら発現コンストラクトを用いて大腸菌を形質転換させた。そして、組換え脱皮抑制ホルモンと組換え脱皮抑制ホルモン様分子の発現を誘導し、発現させた組換え分子を逆相のHPLCを用いて精製した。

4. 研究成果

未成熟な養殖クルマエビと天然で成熟したクルマエビのサイナス腺をそれぞれ顕微鏡下で摘出し、それらに含まれる神経ホルモンを、有機溶媒を用いて抽出した。そして、未成熟養殖エビ由来の抽出物と天然成熟エビ由来の抽出物を、それぞれ逆相のHPLCを用いて分離し、天然成熟エビの抽出物でのみ

観察されるピーク産物(成熟促進ホルモン候補分子)を回収した。ピーク産物をさらに逆相のHPLCを用いて分離し、成熟期に貯蔵量が増える分子を精製した。精製産物を未成熟なクルマエビの卵巣培養系に添加し、培養後、卵巣中の卵黄タンパク質前駆物質(ピテロジェニン)の遺伝子発現量をリアルタイムPCRで定量した。しかし、このピーク産物にはピテロジェニン遺伝子の発現を促進する活性(成熟促進活性)は観察されなかった。これは、未成熟な卵巣には成熟促進ホルモンに対する感受性がない可能性が考えられた。そこで、天然で成熟したクルマエビの卵巣培養系に精製産物を添加してみた。しかし、精製産物には成熟促進活性は観察されなかった。今後、*in vivo*の注射実験により、精製産物の成熟促進活性を調べてみる予定である。

スジエビのサイナス腺から主要なホルモン分子を精製し、N末端アミノ酸配列を決定した。その結果、それら主要な分子は他種十脚目甲殻類の卵黄形成抑制ホルモンと相同性を示した。現在、それら分子の生物活性を注射実験により調べている。

クルマエビ科のヨシエビでは脱皮抑制ホルモン様分子に成熟促進活性があることが報告されている。そこで、クルマエビの脱皮抑制ホルモンと脱皮抑制ホルモン様分子に成熟促進活性があるかどうかを確かめるために、それら2種類の分子の組換え体を大腸菌で発現させた。これら組換え体を未成熟なクルマエビの卵巣培養系に添加したが、これらの分子には成熟促進活性は観察されなかった。ヨシエビでは*in vivo*の投与実験により成熟促進活性を調べていることから、クルマエビでも同様の方法で脱皮抑制ホルモンと脱皮抑制ホルモン様分子の成熟促進活性を調べる予定である。

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1件)

N. Tsutsui, A. Nagakura, C. Nagai, T. Ohira, H. Nagasawa, The effects of sinus gland peptides in *ex vivo* vitellogenin gene expression in the ovaries of the kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicus*, Fisheries Science, 査読有、79巻、2013、33-38
DOI: 10.1007/s12562-012-0566-5

[学会発表] (計1件)

福島翠、星野遼、朝比奈潔、水藤勝喜、大平剛「クルマエビの成熟制御因子の探索」平成24年度日本水産学会秋季大会、平成24年09月16日、下関水産大学校

〔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・准教授
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