

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570072

研究課題名(和文) ナマコ類の卵成熟誘起機構の解明

研究課題名(英文) The mechanism of oocyte maturation in sea cucumber.

研究代表者

吉国 通庸 (Yoshikuni, Michiyasu)

九州大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：50210662

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：棘皮動物ナマコ類のホルモンによる産卵の制御機構を解析した。卵巣内の濾胞組織を刺激して2次ホルモンを分泌させ、最終的に卵を受精可能に変化させ排卵させる神経ホルモンをニセクロナマコから精製し、その構造を明らかにした。多くのナマコ類に共通するホルモンである可能性を想定している。また、卵黄タンパク質がカプセル化され、体腔液を介して輸送される新たな卵黄輸送機構を見いだした。さらに、卵母細胞の卵成熟の有無に拘わらず、排卵のみを誘導するペプチド成分が存在することを見いだした。

研究成果の概要(英文)：The nerve tissue of sea cucumber contains a neuropeptide which stimulates ovarian follicle cells to secrete a second hormone in inducing oocyte maturation and ovulation. The neuropeptide was purified from *Holothuria leucospilota* and identified its peptide sequence. The homologous peptides were also found in genomic data of *Apostichopus japonicus* and *Holothuria scabra*. These peptides may play as the common hormone in various sea cucumbers. Coelomic fluid of *Apostichopus japonicus* contains a lot of small vesicles which are collected after ultracentrifugation. Analysis by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis revealed that these vesicles contain the major yolk protein. These vesicles may be involved in the transport system of the yolk protein in sea cucumber. The nerve tissue of *Apostichopus japonicus* may contain an activity which induces ovulation of fully grown oocytes without oocyte maturation.

研究分野：比較内分泌

キーワード：卵成熟 濾胞細胞 神経ホルモン ニセクロナマコ マナマコ 排卵 卵黄タンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

動物の配偶子成熟は、中枢神経系に始まり、生殖腺を経て、最終的には配偶子に直接作用する過程に至るまで、一連の複数のホルモン刺激により制御されていると考えられる。これらのホルモンは、種により若干の構造差を伴いつつも、近縁種間では概ね共通に作用すると予想されている。先行研究で、マナマコの卵成熟誘起活性を持つ神経ペプチドを高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により精製した時、異なる3つの活性画分が検出され、最も生物活性量の多い画分の主成分がクビフリンであった。しかし、クビフリンはマナマコ以外の種には全く作用を示さない極めて種得異性の高い卵成熟誘起ペプチドであった。

クビフリンは、卵母細胞やそれを包む濾胞細胞層には作用せず、卵巣中に存在する卵母細胞にのみ卵成熟を誘起する。また、クビフリン刺激により卵成熟・排卵が誘起された卵巣培養液中に、濾胞層に包まれた卵母細胞 (濾胞付き卵母細胞) を浸すと卵成熟が誘起される。このことから、クビフリンの作用は、卵巣内の未知の組織を刺激して、濾胞細胞を刺激して卵成熟を開始させる未知の2次成分を放出させると考えられる。この2次成分は、生殖制御におけるホルモンカスケードにおいて、濾胞細胞を刺激するという点で、同じ棘皮動物であるヒトデ類で我々が明らかにしたインスリン様神経ペプチドや脊椎動物の生殖腺刺激ホルモン (ゴナドトロピン) に相当するものと考えられる。

さらに、生殖腺刺激ホルモンで刺激された濾胞細胞は3次成分を分泌し、卵母細胞にはこの3次成分が直接作用することが知られている。このホルモンは卵成熟誘起ホルモンと呼ばれ、これまでにヒトデ類の1-メチルアデニンと、魚類の17 $\alpha$ .20 $\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one 及び17 $\alpha$ .20 $\beta$ , 21-trihydroxy-4-pregnen-3-one のみが解明されている。

ナマコ類では、これら2次成分、3次成分のいずれも解明されていない。これらの成分を明らかにすることで、ナマコ類に普遍的な生殖制御機構を議論する為の重要な知見が得られると共に、棘皮動物から脊椎動物に至る後口動物での生殖制御機構の進化を考察することが可能となる。

マナマコやウニ類の卵黄タンパク質は、主要卵黄タンパク質 (Major Yolk Protein; MYP) と呼ばれており、興味深いことにウニ類では精巣中の主要タンパク質も MYP であることが知られている。ウニ・ナマコ類では、生殖腺に陥入する主要な脈管系はないと思われ、MYP の合成・輸送・蓄積に関する知見は少ない。

## 2. 研究の目的

### (1) 卵成熟誘起2次成分の探索

クビフリン刺激により卵成熟・排卵が誘起された卵巣培養液中には、理論的には未知の

卵巣組織により分泌され濾胞細胞を刺激する2次成分と、濾胞細胞から分泌され卵母細胞を刺激する3次成分が含まれていると予想される。しかし、実際には、卵巣培養液中に濾胞のない裸の卵を入れても多くの場合で卵成熟は起こらず、3次成分の検出は困難である。本研究では、マナマコの濾胞付き卵母細胞を用いて (濾胞細胞を標的とする) 2次成分の解明に主眼を置いた。

### (2) Holothuria 属ナマコからの産卵誘発ホルモンの探索

一般的に、多くのホルモンにおいて、それぞれ近縁種にも作用すると考えられるが、クビフリンはマナマコ以外には全く作用を示さない。クビフリン精製時に、クビフリン以外にさらに2つの卵成熟誘起活性画分が検出されていたことから、それらの中に近縁種にも作用し得る様な、所謂ゴナドトロピン様のホルモンが含まれている可能性が考えられる。

本研究では、ナマコ類の神経組織に含まれ、クビフリンとは異なり広くナマコ類の産卵誘発に関与するゴナドトロピン様の神経ペプチドの解明を目指す。精製の出発材料となる神経組織を採取するためのマナマコの大量入手が困難であることから、沖縄近海に生息する熱帯性の Holothuria 属ナマコを用いて同ホルモンの解明を目指す。

### (3) マナマコ MYP の輸送機構の解析

ウニ・ナマコ類では、消化管と生殖腺を直接に繋ぐ循環器系の発達は見られない。合成された MYP は体液液中に分泌され、生殖腺により吸収・蓄積されることで卵の肥大成長が進むと考えられている。本研究では、改めて、マナマコの卵黄形成過程での MYP の体内分布を調べ、卵成長の MYP の関係を解析する。

## 3. 研究の方法

### (1) 卵成熟誘起2次成分の探索

摘出したマナマコ卵巣を人工海水中で切開し、卵巣内部に充填されていた濾胞付き卵母細胞を人工海水中に振り出し回収することが出来る。こうして調製した濾胞付き卵母細胞を用いて、卵巣培養液中の卵成熟誘起活性を持つ2次成分の HPLC による精製を行った。

しかし、精製試料中に含まれるクビフリンが HPLC 精製に影響を与えた事から、2次成分を生成させる為にクビフリンを用いない卵成熟誘起法を工夫した。十分に卵黄形成を遂げたマナマコ卵巣を人工海水中に取り出し、卵巣組織に過度の切断刺激を加えることで、クビフリンを投与しなくてもある程度の頻度で卵成熟が誘起されることが分かった。クビフリンの作用点は、卵巣内の隔壁状組織であると考えているが、切断刺激は結果的にこうした組織を刺激することに繋がっている。

と思われる。

## (2) Holothuria 属ナマコからの産卵誘発ホルモンの探索

新規にナマコ類の産卵誘発ホルモンの精製を進めるために、マナマコよりも安価で大量入手が容易で、実験に使用可能な産卵期が比較的長い特徴を持つ熱帯性ナマコ類を用いることとした。これらは、沖縄県内の漁業者より購入した。

本課題の研究期間の1-2年目は、ハネジナマコ (*Holothuria scabra*) を用いたが、入手量が不安定となったので、2-3年目ではニセクロナマコ (*Holothuria leucospilota*) を用いた。

活性成分の抽出・精製は、基本的にクビフリン等の精製に用いた方法に準じて行った。

## (3) マナマコ MYP の輸送機構の解析

卵黄形成期の初期から終期および卵成熟期に採捕したマナマコを用いて、卵巣を含む種々の体内組織試料を採取し、SDS電気泳動により MYP の動態を解析した。分離された MYP の特定は、電気泳動後にタンパク質バンドを抽出し、トリプシン消化後の生成ペプチド断片群の質量分析による内部アミノ酸配列解析によるにより決定した。

対象とした組織は、体壁、卵巣、消化管、血管叢、縦走筋、体腔細胞、体腔液である。

## 4. 研究成果

### (1) 卵成熟誘起 2 次成分の探索

3年に渡って卵巣培養液中から HPLC による 2 次成分の精製を複数回試みたが、いずれも、3段階目の HPLC 以降、回収された活性量の不足により、それ以上の精製を進めることが不可能であった。最大時で、約 100 匹分の卵巣培養液を用いたが不十分で、精製を完遂するためには、少なくとも数百匹分の卵巣を用いる必要があると思われる。

生物検定が可能な産卵期の長さが短く、材料個体の入手性が容易ではないことを考慮すれば、2 次成分の精製を成功させるためには、より安価で大量に入手可能な別種のナマコを用いて精製を進める必要があると考えられる。

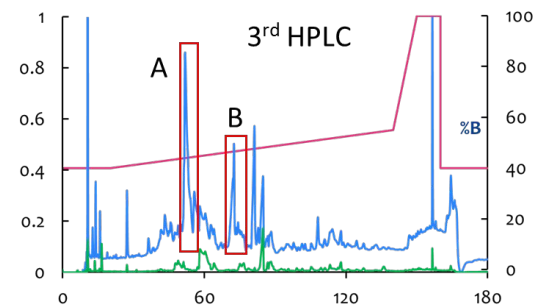
また、2 次成分の精製過程で、卵巣培養液中に排卵のみを誘起する活性が検出された。十分に成長した卵巣を用いた場合、排卵誘導率は極めて高率で、排卵された卵はいずれも卵核胞を保持していた。排卵卵のその後の培養においても、卵核胞崩壊は観察されなかったことから、排卵時に卵母細胞は卵成熟刺激を受けていないと考えられる。未成熟卵の排卵のみを誘起する活性が、どのような生理局面でどのように制御されるのか、極めて興味深い現象である。最終精製画分中の主成分ペプチドを化学合成し、その生物活性を詳しく検定中である。

## (2) Holothuria 属ナマコからの産卵誘発ホルモンの探索

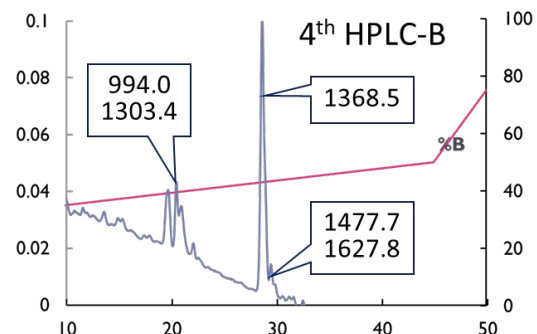
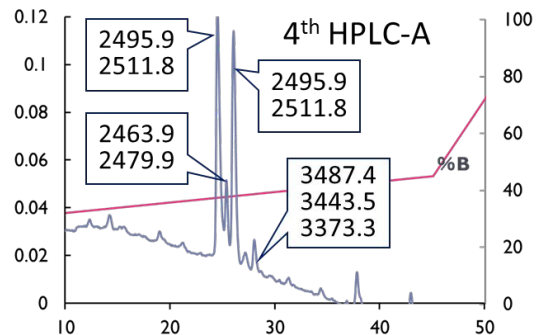
### ハネジナマコの産卵誘発ホルモンの探索

沖縄県漁業者より購入したハネジナマコ及び琉球大学瀬底臨海実験施設にて入手したニセクロナマコを用いた予備実験から、それらの周口神経組織抽出液に互いに作用する産卵誘発活性が含まれることが見いだされた。

漁業者から継続的に購入可能なハネジナマコを材料として、この産卵誘発活性成分の精製を実施した。抽出・精製法は、マナマコのクビフリンの抽出と精製に用いた手法を、ほぼ変更無しで転用した。約 100 匹分のハネジナマコ周口神経組織を精製材料とした。



3段階の HPLC を経て、上図の A, B の二つの活性画分を得た。両画分をそれぞれ 4 段階目の HPLC に掛け、下の 2 図に示す分離が得られた。各画分の質量分析により下 2 図の図中に示した分子量成分を検出したが、精製標品の不足により、それらの構造解析を完了することは出来なかった。これらの分子量成分の中に、ハネジナマコの産卵誘発ホルモンが含まれている可能性があると思われる。



この後、ハネジナマコの入手が困難となり、材料の増量による再精製実験は実施できなかった。

## ニセクロナマコの産卵誘発ホルモンの探索

ハネジナマコ試料の精製実験から目的成分の精製の目途が得られたが、材料入手の問題から、対象種をより大量の入手が容易なニセクロナマコに変更した。

ニセクロナマコ約150匹分の周口神経組織を用いて産卵誘発活性成分の精製を実施した。抽出・精製法は、マナマコ・ハネジナマコに用いた方法に準拠した。

最終的に、産卵誘発活性成分をほぼ単一の成分に精製し、その全アミノ酸配列構造の解明に成功した。また、既に明らかにされていたマナマコ、ハネジナマコのゲノム配列中から、相同するアミノ酸配列を見いだした。現在、それらの塩基配列情報を元に、ニセクロナマコホルモン遺伝子のクローニング中である。これら3種のナマコから得られたホルモン遺伝子は、ある特定の遺伝子グループに属するものであることが明らかとなった。現在、ニセクロナマコのペプチドの化学合成を行っている。合成標品が得られた後は、生物活性の検定を実施する予定である。

ニセクロナマコの産卵誘発活性成分の精製のクロマトグラム及び、明らかとなったペプチド配列等は、知的財産としての権利化を予定しているので、本報告では明示しない。

### (3) マナマコ MYP の輸送機構の解析

電気泳動解析により、雌マナマコにおける MYP の主な存在部位は、卵巣、体壁および体腔液 10,000xg 上清画分であった。体腔液中には少なくとも数種類の体腔細胞が存在するが、低速遠心条件で回収されるそれらのいずれの細胞画分にも MYP は含まれていなかった。10,000xg の高速遠心条件で、細胞性沈殿物を除いた遠心上清に MYP は回収された。この上清をさらに 100,000xg, 1 hr の超遠心分離を行うと、MYP は沈殿画分に回収され、超遠心上清画分には MYP は殆ど検出されなかった。同沈殿画分には、直径 1 $\mu$ m 以下の微小な小胞が回収されていた。沈殿物には DAPI 染色による蛍光は観察されないことから、DNA を含む小型の細胞様のものではない。これらのことから、マナマコの MYP は小胞に含まれた形で体腔液中に存在すると考えられる。MYP の輸送機構及び卵巣による吸収機構を全く新たな視点で捉え直す必要が示された。

また、興味深いことに、体壁部の電気泳動では、その可溶性タンパク質中で最も主要なものは MYP であった。コラーゲンのような難溶性構造タンパク質を除くと、最も主要なタンパク質が MYP であるということから、卵内の卵黄として補給される MYP の主要な貯蔵器官としての体壁の役割が考えられる。今後、卵巣の発達と MYP の輸送・貯蔵機構についてさらに詳しく解析する予定である。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)  
南洋一、吉国通庸、沖縄県塩谷漁港周辺のハネジナマコの生殖周期、水産増殖、査読有、62、2014.

〔学会発表〕(計 1 件)  
Yoichi Minami, Michiyasu Yoshikuni, Egg spawning activity of edible, tropical sea cucumber, *Holothuria scabra*, in Okinawa., 水産増殖学会日韓合同シンポジウム、2014, Nagasaki.

〔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：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.agr.kyushu-u.ac.jp/lab/jikkensho/home.html>

## 6 . 研究組織

(1)研究代表者  
吉国 通庸 (YOSHIKUNI, Michiyasu)  
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  
無し  
研究者番号：

(3)連携研究者  
無し  
研究者番号：