

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 23 日現在

機関番号：82708

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450311

研究課題名(和文)雄の性分化と性成熟に働くクルマエビ造雄腺の作用機構の解明

研究課題名(英文) Mode of action of androgenic gland on male reproduction in *Marsupenaeus japonicus*

研究代表者

奥村 卓二 (OKUMURA, Takuji)

国立研究開発法人水産総合研究センター・増養殖研究所・主幹研究員

研究者番号：30372030

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：クルマエビにおいて、雄の性分化と性成熟に関与すると考えられている造雄腺ホルモンの作用機構を調べた。造雄腺ホルモン遺伝子の発現量は成熟が進むにつれて増加し、造雄腺ホルモンが精子形成に関与していることが示唆された。雄エビから両眼柄を除去すると、造雄腺細胞の肥大と精巣重量の増加が見られたことから、造雄腺は眼柄神経節から分泌される因子により抑制的に調節されていると考えられた。精巣で発現している遺伝子を解析した結果、両眼柄除去により肥大化した精巣で発現が増加する遺伝子が見つかった。これらの遺伝子は造雄腺ホルモンの作用によって発現が変化したと考えられた。

研究成果の概要(英文)：We investigated roles of androgenic gland hormone on male reproduction in kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus*. The gene expression levels of androgenic gland hormone increased in accordance with the growth of male prawn. Bilateral removal of eyestalks from male prawn induced hypertrophy of androgenic gland cells and increase of testis weight. These results indicate that androgenic gland is under inhibitory control of eyestalk factor and stimulates testis development. Gene expression analysis revealed that expression levels of some genes increased in the hypertrophied testis of eyestalk-removed male prawns. This result suggests that the acceleration of androgenic gland hormone secretion by eyestalk removal stimulates expression of these genes.

研究分野：甲殻類生理学

キーワード：内分泌 性分化 精子形成

1. 研究開始当初の背景

甲殻類では遺伝的に性が決まり、造雄腺が分泌する造雄腺ホルモンの作用により雄へと性分化する。造雄腺が甲殻類の性分化に重要な役割を果たしていることを最初に発見したのはフランスと日本の研究グループで、1950年代にオオハマトビムシ(端脚類)とオカダンゴムシ(等脚類)を用いた研究が報告された。

その後、エビ・カニなどの十脚類でも、輸精管の末端部に造雄腺が存在することが組織学的に明らかにされた。さらに、性分化だけでなく、雄の精子形成、交尾活性などにも関与していることが明らかにされた。

造雄腺ホルモンの精製と構造決定は、日本とフランスの研究グループがオカダンゴムシを使って激しい競争をした後、1999年に両グループから別々に報告され、オカダンゴムシの造雄腺ホルモンが糖鎖を持つ二本鎖ペプチド(73アミノ残基)であることが明らかになった。

一方、エビ・カニ類の造雄腺ホルモンの同定は遅れ、2007年に初めてザリガニから造雄腺ホルモンをコードするcDNAが単離され、その後複数の種類から同様に単離された。

このように、甲殻類の造雄腺は50年以上前に発見されたが、遺伝子解析などホルモン構造を利用した研究は始まったばかりであった。

2. 研究の目的

造雄腺ホルモン研究の現状は、やっと塩基配列がわかったにすぎず、その作用機構はほとんどわかっていない。近年は分子生物学的解析手法の発展がめざましく、それらを利用すれば作用機構の解明が一気に進む可能性がある。造雄腺ホルモンの作用機構は性統御技術に応用できるため、世界的に発展するエビ養殖に利用しようと国際的な研究競争が激しくなっている。

本研究課題では、こうした背景のもとに、これまでの知見を利用して分子生物学的手

法を駆使し、クルマエビ造雄腺ホルモンの作用機構を明らかにすることを目的とする。造雄腺ホルモンの作用機構を明らかにできれば性統御技術の確立が可能になり、養殖に有利な性を選んで育成することでエビ養殖の発展に貢献できる。

3. 研究の方法

(1) **造雄腺ホルモンの合成部位の特定**:すでに報告されているクルマエビの造雄腺ホルモンcDNA塩基配列を利用してプローブを作成した。クルマエビ輸精管をDavidson液で固定後にパラフィン包埋し、切片を作成した。その切片を、プローブを用いてin situ hybridization法によりを染色し、造雄腺ホルモン遺伝子が発現している部位を特定した。

(2) **造雄腺ホルモン発現量の定量**:造雄腺ホルモンcDNAの塩基配列を利用して定量リアルタイムPCR用のプライマーを作った。成長過程の異なる雄クルマエビから造雄腺を含む造雄腺末端部をとり、RNAを抽出して逆転写反応をした。得られたcDNAを使って定量PCRをしてホルモン発現量を定量し、比較した。

(3) **眼柄除去**:雄クルマエビから両眼柄を除去し、飼育を続けた。対照区は眼柄除去をせずに飼育した。サンプリング時に解剖して精巣重量を測定した。また、造雄腺を含む輸精管末端部をDavidson液で固定し、パラフィン包埋して組織観察をした。

(4) **造雄腺除去**:雄クルマエビから造雄腺を除去して飼育を続けた。対照区には偽手術を施した。サンプリング時に、解剖して精巣重量を測定した。

(5) **精巣内発現遺伝子解析**:両眼柄を除去して精巣が肥大化した雄クルマエビと、正常な雄クルマエビから精巣をとり、RNAを抽出して逆転写反応をし、cDNAを得た。次世代シーケンサーによりcDNAの配列を解析し、発現遺伝子を網羅的に解析するとともに、リ

ード数から発現量を比較した。

4. 研究成果

(1) **造雄腺ホルモンの合成部位の特定**：雄クルマエビの輸精管末端部（図1）から組織切片を作成し（図2）、クルマエビ造雄腺ホルモンの mRNA が存在する部位を調べた。その結果、輸精管末端の先端部に造雄腺ホルモン mRNA に対するシグナルが得られた。その部位に造雄腺が存在し、造雄腺ホルモンを合成していることが明らかになった。



図1.クルマエビ輸精管。末端部に造雄腺がある。



図2.造雄腺組織像。囲まれた部位が造雄腺。

(2) **造雄腺ホルモン発現と雄の成熟**：成熟状態が異なる雄クルマエビから造雄腺を含む輸精管末端部を摘出し、造雄腺ホルモン遺伝子の発現量を測定した。その結果、成熟状態が進むにつれ、造雄腺ホルモン発現量が増加することが明らかになった。この結果は、造雄腺ホルモンが雄の成熟・精子形成に関与することを示唆する。

(3) **眼柄因子の影響**：造雄腺を介した精巣発達の調節機構を明らかにするため、雄クルマエビから両眼柄を除去して影響を調べた。両眼柄の除去により、造雄腺細胞の肥大と細胞数の増加が見られた。また、精巣重量が増加した。これらの結果から、眼柄を除去したことで造雄腺を抑制するホルモンが眼柄神経節から分泌されなくなり、抑制がなくなったことで造雄腺の活性が高まったと考えられた。さらに、造雄腺の活性が高まって造雄腺ホルモン血中量が増加したことで、精巣が発達したと考えられた。

(4) **造雄腺除去の影響**：造雄腺の精巣に対する作用を明らかにするために、雄クルマエビから造雄腺を除去して影響を調べた。有意差はなかったが、造雄腺除去区の精巣重量が対照区より小さくなる傾向があった。造雄腺が精巣発達に関与していることが示唆された。

(5) **精巣内発現遺伝子の変化**：造雄腺ホルモンの作用により、精巣内で発現が変化する遺伝子を同定するために、両眼柄切除により造雄腺活性が亢進して肥大化した精巣と正常の精巣を使って発現解析をし、両者の発現遺伝子を比較した。その結果、肥大化した精巣において発現量が有意に変化している遺伝子が多数見つかった。両眼柄除去により、造雄腺の機能が亢進するため、分泌量が高まった造雄腺ホルモンの作用で遺伝子発現が変化したと考えられた。これらの遺伝子は造雄腺ホルモンの作用マーカーとして利用できる可能性がある。

クルマエビ類の造雄腺ホルモンの作用は不明な点が多かったが、本研究により、造雄腺の存在部位が明らかにされ、造雄腺ホルモンが精巣発達に関与すること、眼柄因子により抑制的に調節されていることが明らかになった。

また、造雄腺ホルモンの作用により発現が変動する遺伝子候補が得られた。これらの遺伝子は造雄腺ホルモンの作用マーカーとして利用できる可能性があり、造雄腺ホルモンの作用の研究を大きく進めることにつながる。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計2件)

奥村卓二、クルマエビ造雄腺は眼柄因子に抑制的に調節され精子形成に働いている、平成27年度日本水産学会秋季大会、2015年9月24日、東北大学(宮城県・仙台市)

奥村卓二、クルマエビの繁殖生理、平成28年度日本水産学会水産増殖懇話会第1回講演会「クルマエビ増養殖の現状について考える」、2016年3月26日、東京海洋大(東京都・港区)

〔図書〕(計1件)

奥村卓二・水藤勝喜 編、「クルマエビ類の成熟・産卵と採卵技術」、愛知県水産業振興基金、2014、145

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥村 卓二 (OKUMURA, Takuji)

国立研究開発法人 水産総合研究センター・増養殖研究所・主幹研究員

研究者番号：30372030

(2) 研究分担者

大平 剛 (OOHIRA, Tsuyoshi)

神奈川大学・理学部・准教授

研究者番号：10361809