

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 25 日現在

機関番号：32702

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450294

研究課題名(和文) クルマエビの生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH)の同定と機能解析

研究課題名(英文) gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in the kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus*

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：クルマエビの生殖腺刺激ホルモン(GnRH)を探索するために、次世代シーケンサーを用いたRNA-seq解析を行った。相同性検索の結果、解析したデータの中にはアメリカザリガニGnRHと相同性を有するコンティグは存在しなかった。しかし、GnRHスーパーファミリーのメンバーであるコラゾニン、赤色素凝集ホルモン(RPCH)、脂質動員ホルモン・コラゾニン関連ペプチド(ACP)の配列が存在した。それら3種類のペプチドを化学合成し、クルマエビに投与したところ、11個体中の2個体で成熟した卵母細胞が観察された。この結果より、コラゾニン、RPCH、ACPのいずれかがクルマエビのGnRHではないかと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) is known to regulate and maintain reproductive functions. Recently, new GnRH has been purified from the American crayfish *Procambarus clarkii* and its primary structure has been determined. This was the first GnRH from crustacean species. In order to find out the kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus* GnRH, we conducted RNA-seq analysis in this study. Although a homology search using the amino acid sequence of *P. clarkii* GnRH as a query was conducted, any homologs were not identified in the contigs. On the other hand, three molecules which are members of GnRH superfamily were found out. The three molecules were adipokinetic hormone (AKH)/red pigment concentrating hormone (RPCH), corazonin (Crz), and AKH/corazonin-related peptides (ACP). The three peptides were chemically synthesized and injected into female shrimps. As a result, vitellogenic oocytes were observed in two out of 11 shrimps. Therefore, any of the three peptides may be *M. japonicus* GnRH.

研究分野：甲殻類生理学

キーワード：生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン GnRH クルマエビ

1. 研究開始当初の背景

生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH)は脊椎動物の性成熟を制御するペプチドホルモンである。GnRHは生殖を最上位で制御するホルモンとして1970年代初めにブタとヒツジから単離され、一次構造が決定された。その後、鳥類、両生類、魚類から次々とGnRH分子が同定された。この様に、脊椎動物には動物種を越えてGnRHが広く存在することが明らかとなった。一方、無脊椎動物では、原索動物門のホヤ、軟体動物門のタコ、アメフラシ、カサガイ、棘皮動物門のウニ、環形動物門のイトゴカイ、ヒルにGnRH様のペプチドが存在することが明らかにされている。興味深いことに、タコとアメフラシのGnRHは生殖を制御しているという実験結果が得られている。

永らく、節足動物門に属する甲殻類からGnRH様のペプチドは同定されてこなかった。しかし、GnRH様のペプチドが存在する可能性を示す報告例が幾つかある。ウシエビでは脳や胸部神経節などの中枢神経系と卵巣に、脊椎動物のGnRH抗体と免疫陽性反応する細胞が存在する。クルマエビでは脳の前方には、ニワトリII型GnRH抗体と免疫陽性反応する細胞が存在する。また、HPLCと時間分解蛍光免疫測定法を併用した実験によって、クルマエビの脳抽出物中にヤツメウナギII型GnRH様のペプチドが存在することが示唆された。さらに、ウシエビの雌に脊椎動物のGnRHを投与すると、成熟が促進された。これらの結果より、エビ類にもGnRHは存在し、さらに脊椎動物のGnRHのような成熟促進活性がある可能性が高いと考えられた。このような背景の中、2014年にアメリカザリガニの卵巣からGnRHが初めて精製・単離され、一次構造が決定された。そして、推定されていたとおり、アメリカザリガニGnRHは卵成熟を促進させる活性を有していた。

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。これまでに、クルマエビから、成熟を抑制的に制御している卵黄形成抑制ホルモンが精製・単離されている。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年代に示唆されたが、未だ単離には至っていない。このような状況の中、Amanoらはクルマエビの脳にGnRH様のペプチドが存在することを示した。これまでの筆者の経験を活かせば、クルマエビGnRHを同定するだけでなく、生物活性も明らかにできると考え、本研究を計画した。

2. 研究の目的

脊椎動物の生殖において重要な生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH)は、無脊椎動物にも広く存在することが明らかとなりつつある。そして、それら無脊椎動物の

GnRHは成熟を促進させる活性を持つ。クルマエビには、ニワトリII型GnRHに対する抗体と免疫陽性反応する分子が脳と眼柄に存在することが示されている。本研究では、生化学及び分子生物学的な手法を駆使してクルマエビGnRHの一次構造を明らかにすること、クルマエビGnRHに成熟促進活性があるかどうかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1)クルマエビGnRHの一次構造の決定
クルマエビの脳900個をアセトン:1N HCl(100:3)中でホモジナイズし、ドライアイスで冷却しながら3時間攪拌した。その後、遠心分離により上清と沈殿に分けた。沈殿にアセトン:0.01N HCl(80:20)を加えて攪拌し、遠心分離した。得られた2回分の上清を合わせ、石油エーテルを加えて攪拌して上層を除いた後、下層に再び石油エーテルを加えた。この操作を5回繰り返して残った下層を脳抽出物とした。逆相カートリッジを用いて粗精製した後、精製産物をナノフロー型の逆相HPLCを用いて分画し、40秒毎に溶出産物をサンプルプレートにスポットした。このサンプルを全てMALDI-TOF型質量分析装置で測定し、GnRHと考えられたイオンのみをイオンゲートで選択した。ゲートを通過したプリカーサーイオンをPSDとCIDの2種類の方法で断片化させ、それにより生じたフラグメントイオンのマススペクトルを測定した。

(2)クルマエビGnRH遺伝子の網羅的探索

2016年4月に愛知県の一色漁港で水揚げされた天然の雌クルマエビ20尾から脳と卵巣を摘出し、RNA later中で保存した。卵巣の一部はブアン固定液で固定をした。固定した卵巣はパラフィンに包埋し、連続切片を作製した後、ヘマトキシリン・エオシン染色に供した。その結果をもとに、成熟段階の異なる8尾のクルマエビを選別した。脳と卵巣からのtotal RNAの抽出は、RNeasy Lipid Tissue Mini Kitを使用した。脳と卵巣のtotal RNAの濃度はナノドロップ(Thermo Fisher Scientific)を用いて測定した。抽出した脳と卵巣のtotal RNAが分解していないことを、2100パイオアナライザー(アジレント・テクノロジー)を用いたキャピラリー電気泳動およびアガロース電気泳動で確認した。各サンプルのライブラリーを調製した後、イルミナ社のNextSeqシステムを用いて75bpのシングルエンド法で1000万リードずつ解析し、得られた塩基配列をアセンブルしてコンティグを作製した。そして、重複を除いたコンティグの塩基配列を遺伝子解析ソフトに取り込み、相同性検索(tBlastX解析)を行った。

(3)GnRHスーパーファミリーに属するペプチドの化学合成と投与実験

Fmoc (Fluorenyl-MethOxy-Carbonyl) 基を保護基に用いたペプチド固相合成法を用いて、コラゾニン (Crz)、赤色色素凝集ホルモン (RPCH)、脂質動員ホルモン・コラゾニン関連ペプチド (ACP) を化学合成した。それら 3 種類のペプチドをそれぞれ 100 ng/g 体重となるように混合し、平均体重 29.4 g の未成熟な雌クルマエビに投与した。14 日間飼育した後、投与したクルマエビから卵巣を摘出し、ブアン固定液で固定をした。固定した卵巣は、(2) と同様にヘマトキシリン・エオシン染色に供した。

4. 研究成果

(1) クルマエビ GnRH の一次構造の決定

ナノフロー型の逆相 HPLC で 26 分に溶出されたピークに、既知のアメリカザリガニ GnRH の分子量に近い (1200~1400) イオンピークが見られた (図 1)。質量電荷比 (m/z) が 1369.68 のピークをプリカーサーイオンとして選択し、CID 法で断片化したフラグメントイオンを測定した。その結果、複数のアミノ酸由来のインモニウムイオンが検出され、それらの中に無脊椎動物の GnRH に特徴的に保存されているトリプトファン由来のインモニウムイオンが含まれていた。次いで、PSD 法で断片化したフラグメントイオンを測定した結果、アミノ酸 6 残基分の情報が得られた (FSEGWF)。このアミノ酸配列と、既知の GnRH で保存されているアミノ酸配列、検出されたインモニウムイオンの情報を組み合わせて推測した結果、クルマエビ GnRH のアミノ酸配列は pQRPHFSEGWF-NH₂ または pQPRHFSEGWF-NH₂ であると考えられた。

次に、クルマエビ GnRH の局在を明らかにすることを目的として、クルマエビの脳、胸部神経節、卵巣を出発材料として、同様の解析を行った。その結果、クルマエビ GnRH は脳および胸部神経節には存在した。一方、卵巣にはクルマエビ GnRH は存在しなかった。アメリカザリガニ GnRH は卵巣から精製されていることから、種によって GnRH の産生部位が異なると考えられた。

(2) クルマエビ GnRH 遺伝子の網羅的探索

成熟段階の異なる 8 尾のクルマエビから脳と卵巣を摘出し、RNA-seq 解析を行った。そして、(1) で決定した 2 種類のクルマエビ GnRH のアミノ酸配列をクエリーとして Blast 解析を行った結果、それら 2 種類のクルマエビ GnRH と同一のアミノ酸配列を持つコンティグは存在しなかった。これは、MALDI-TOF を用いた MS/MS 解析によるアミノ酸配列決定の精度が低いと考えられた。また、アメリカザリガニ GnRH のアミノ酸配列をクエリーに用いて同源性検索を行った結果、今回解析したデータの中にはアメリカザリガニ GnRH と同源性を有するコンティグは存在しなかった。しかし、RNA-Seq データ中には、GnRH スーパーファミリーのメンバーである Crz、

RPCH、ACP の配列が存在した。

3) GnRH スーパーファミリーに属するペプチドの化学合成と投与実験

Crz、RPCH、ACP を化学合成し、それらをクルマエビに投与した。投与 14 日後の卵巣の組織切片を作製し、組織像を観察したところ、11 個体中の 2 個体で成熟した卵母細胞が観察された。この結果より、Crz、RPCH、ACP のいずれかがクルマエビの GnRH ではないかと考えられた。

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 0 件)

[学会発表](計 6 件)

小暮純也、片山秀和、大平剛「Biological activity of a crayfish gonadotropin-releasing hormone on in vivo bioassay using heterologous species, the freshwater shrimp *Palaemon paucidens*」第 87 回日本動物学会、2016 年 11 月 17 日~18 日、沖縄コンベンションセンター

小暮純也、片山秀和、大平剛「Chemical synthesis and biological activity of crayfish gonadotropin-releasing hormone (pcGnRH) analogs」28th Conference of European Comparative Endocrinologists、2016 年 8 月 24 日、University of Leuven

小暮純也、片山秀和、大平剛「アメリカザリガニ生殖腺刺激ホルモン放出ホルモンの生物活性の測定」第 18 回マリンバイオテクノロジー学会、2016 年 5 月 28 日、北海道大学

渡邊正弥、山根史裕、伊藤依那、小暮純也、水藤勝喜、大平剛「ホルモン投与したクルマエビの成熟卵巣の形態について」平成 27 年度日本水産学会春季大会、2016 年 3 月 27 日、東京海洋大学

小暮純也、片山秀和、大平剛「Chemical synthesis and biological activity of crayfish gonadotropin-releasing hormone (pcGnRH) analogs」第 40 回日本比較内分泌学会大会、2015 年 12 月 12 日、アステールプラザ

渡邊正弥、山根史裕、細谷悠貴、水藤勝喜、大平剛「生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) 投与によるクルマエビの人為催熟」平成 26 年度日本水産学会春季大会、2015 年 3 月 30 日、東京海洋大学

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

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

(4) 研究協力者

該当者なし