

# クルマエビにおける卵形成機構の解明 — 卵黄タンパク質合成の調節メカニズム —

会田勝美\*

## Hormonal control of vitellogenin synthesis in the kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus*

Katsumi AIDA\*

---

**Abstract** To develop new technologies for hormonal manipulation of shrimp reproduction, progress in the understanding of shrimp endocrinology is essential. In this study, complete cDNA sequence of vitellogenin (VTG, precursor of major yolk protein) of the kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus* was determined, and quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) method for VTG mRNA was developed. VTG mRNA levels in the ovaries and hepatopancreas were high during the ovarian development, indicating that both organs actively produce VTG. For screening hormonal activity, an *in vitro* assay method was developed by determining the effects of hormones on VTG mRNA in the incubated ovarian fragment and inhibitory effect of the sinus-gland peptide (SGP 3) was found. The developed *in vitro* hormone assay method with the RT-PCR are useful for screening shrimp hormones, and the inhibitory activity of SGP 3 can be utilized for hormonal manipulation of shrimp reproduction.

**Key words:** kuruma prawn, vitellogenin, sinus gland, ovary, hepatopancreas

---

クルマエビは水産重要種であり、天然資源の維持と向上のために以前から種苗生産と放流が行われている。放流用の種苗生産では、産卵直前まで成熟した天然の雌エビを漁獲して採卵に用いている。防疫および遺伝的かく乱防止のため、親エビには放流予定地の地先で漁獲される成熟雌エビを用いることが望ましいが、天候や海況などの影響で地先の漁獲が減少したり、エビの成熟状態が悪かったりすると計画通りに種苗を生産できなくなるといった問題が生じている。こうした問題を回避するために、飼育したエビを成熟させて親エビとして利用したり、漁獲した雌エビの産卵率を高めたりする技術開発が求められている。しかし、まだ人為的な催熟技術は確立されていない。

催熟技術の開発には、まず卵形成過程とその調節機構を明らかにすることが重要である。これまでの研究では卵形成過程は主に組織学的に調べられており、卵黄タンパク質が卵母細胞に蓄積されて卵巣が発達し、卵黄蓄積終了後、表層胞が形成されて産卵に至ることがわかっている。一方、卵形成を調節する機構として、雌エビの眼柄を切除すると成熟が進むことから、眼柄内の神経節に存在するX器官/サイナス腺系が卵黄形成抑制ホルモンを合成・分泌していると考えられている。クルマエビのサイナス腺から複数のペプチドホルモンが精製され、その一部が卵巣のタンパク合成を抑制する活性を持つことが明らかになっている。しかし、卵形成過程での遺伝子発現の変化はまだ明らかになっ

---

2005年11月15日受理 (Received: November 15, 2005)

\* 東京大学大学院農学生命科学研究科 〒113-8657 東京都文京区弥生1-1-1 (Department of Aquatic Bioscience, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, 1-1-1, Yayoi, Bunkyo, Tokyo 113-8657, Japan)

ておらず、また、サイナス腺ペプチドのタンパク質合成抑制活性も、卵黄タンパク質に特異的かどうか十分に確認されていない。

そこで本研究では、卵形成過程の中で卵黄タンパク質合成に注目し、卵黄タンパク前駆物質（ビテロジェニン）のcDNA塩基配列を使ってビテロジェニン mRNA量を測定する方法を開発し、卵形成過程とビテロジェニン合成活性との関連を明らかにした。次に、ビテロジェニンの合成器官である卵巣を培養し、ビテロジェニンmRNA量を指標としてホルモン活性を検定する方法を開発し、ビテロジェニン合成抑制活性をもつペプチドを見いだした。

### 肝膵臓のビテロジェニン

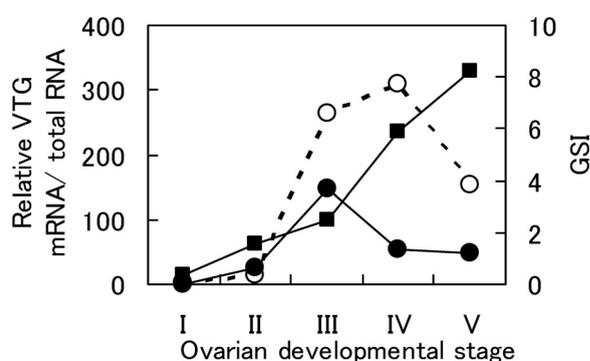
我々はこれまでにクルマエビの卵巣で発現しているビテロジェニンのcDNA全塩基配列の構造を決め、クルマエビではビテロジェニンmRNAが卵巣の濾胞細胞と肝膵臓で発現していることを見いだしている (Tsutsui *et al.*, 2002; Jasmani *et al.*, 2002)。本研究では、卵巣と肝膵臓で発現しているビテロジェニンが同一のものであるかどうか確認するために、肝膵臓で発現しているビテロジェニンのcDNA全配列を明らかにした (Tsutsui *et al.*, 2005b)。卵巣と肝膵臓で発現しているビテロジェニンの演繹アミノ酸配列を比較すると99.1%が同一であった。cDNA作製に用いた個体が違うため、0.9%の差は個体差による違いの可能性が高いと考えられ、同一個体では卵巣と肝膵臓で発現しているビテロジェニン遺伝子は同じであると推測される。

### 卵形成とビテロジェニン合成活性

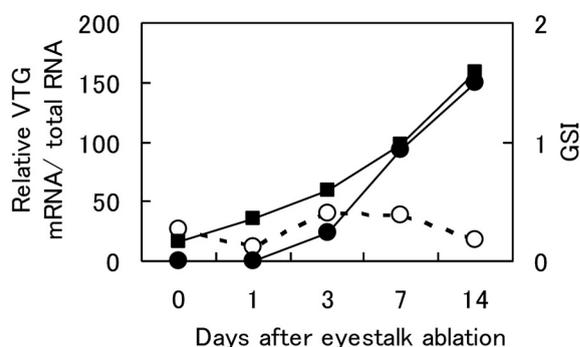
他のエビ・カニ類では肝膵臓がビテロジェニンを合成しているのに対して、クルマエビ類では卵巣と肝膵臓がビテロジェニンを合成している (Wilder *et al.*, 2002)。卵巣と肝膵臓で合成されるビテロジェニンは同一のものと考えられるが、合成器官が二つあるということは、クルマエビでは卵巣発達において卵巣と肝膵臓が異なる役割を果たしている可能性が考えられる。卵巣と肝膵臓のビテロジェニン合成に対する役割を明らかにするために、ビテロジェニンmRNAの測定法 (リアルタイムPCR法) を作製した後、卵形成過程におけるビテロジェニンmRNA量の変化を調べた (Tsutsui *et al.*, 2002, 2005b; Kim *et al.*, 2005)。

百島栽培センターの素ぼり池で自然成熟した雌エビでは、卵形成の進行にともない生殖腺指数 (GSI) は8

近くまで上昇した (Fig. 1)。ビテロジェニン mRNA相対値は、肝膵臓では卵形成過程後半で高い傾向を示したが、卵巣では前半に高い傾向を示した (Fig. 1)。また、未熟エビの眼柄を切除して成熟を誘発すると切除後14日でGSIは1.6近くまで上昇した (Fig. 2)。ビテロジェニンmRNA相対値は、卵巣ではGSIの上昇にともない増加したが、肝膵臓では明瞭な変化が見られなかった (Fig. 2)。ビテロジェニンmRNA相対値の変化が肝膵臓と卵巣で異なったことから、両器官は異なる調節を受け、卵形成前半では卵巣のビテロジェニン合成が重要だが後半では肝膵臓が重要になることが示唆された。



**Fig. 1.** Changes in gonadosomatic index (GSI, closed square) and relative vitellogenin (VTG) mRNA amounts in hepatopancreas (open circle) and ovary (closed circle) during ovarian development in female *Marsupenaeus japonicus*. I, previtellogenic ovarian stage; II, endogenous vitellogenic ovarian stage; III, early exogenous vitellogenic ovarian stage; IV, V, late exogenous vitellogenic ovarian stage.



**Fig. 2.** Changes in gonadosomatic index (GSI, closed square) and relative vitellogenin (VTG) mRNA amounts in hepatopancreas (open circle) and ovary (closed circle) after eyestalk ablation in female *Marsupenaeus japonicus*.

ホルモン活性検定法

おわりに

未熟な雌エビから卵巣を切り出して細片にし、medium 199改良培地（塩類を調整して浸透圧を血液に合わせた）で24時間培養したところ、卵巣片中のグルタルアルデヒド三リン酸脱水素酵素（ハウスキーピングジーンのひとつ）のmRNA量は変化しなかったが、ビテロジェニンmRNA量は増加した（Tsutsui *et al.*, 2005a）。培養下では卵黄形成抑制ホルモンの作用がないため、ビテロジェニンmRNA量が増加したと考えられた。この培養法を利用して培養液に物質を添加することで、ビテロジェニンmRNA量に対する生理活性検定をすることが可能になった。

本研究により、卵黄形成抑制活性をもつホルモンがひとつ明らかになった。成熟促進に応用するためには、この抑制ホルモンの合成・分泌または作用を抑える技術開発が必要となる。本研究で開発した生理活性検定法は今後のホルモン探索に役立つ。また、卵巣と肝臓のビテロジェニン合成に対する役割の違いが明らかになった。その調節の違いを明らかにするとともに、催熟技術開発に利用する必要がある。

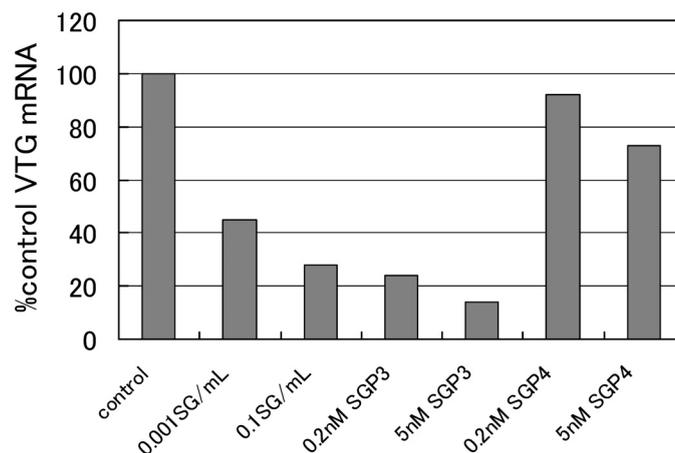
ビテロジェニン合成調節ホルモン活性

本研究課題では卵黄タンパク合成について研究を進めたが、我々はクルマエビの卵形成の大きな特徴である表層胞の構成成分についても研究を進めている（Kim *et al.*, 2004, 2005）。表層胞を構成するタンパク質の遺伝子発現パターンやその合成調節機構はビテロジェニンと異なっており、表層胞形成について今後研究を進めることも、卵形成機構を理解する上で重要である。

これまでにクルマエビのサイナス腺から7種類のペプチド（SGP1-7）が精製・同定されている。これらはいずれもアミノ酸配列から甲殻類血糖上昇ホルモン/脱皮抑制ホルモンファミリーに属することがわかっている。本研究ではこれらのうち、SGP3とSGP4のビテロジェニン合成に対する生理活性を卵巣片培養片を利用して検定した（Fig. 3, Tsutsui *et al.*, 2005a）。サイナス腺ペプチドのひとつSGP3はサイナス腺抽出物と同様にビテロジェニン合成を抑制したが、SGP4は明瞭な影響を示さなかった。SGP3がサイナス腺に含まれる抑制活性物質のひとつと考えられた。

文 献

Jasmani S., Kawazoe I., Tsutsui N., Ohira, T., Aida K., and Wilder M. N., 2002: Identification of vitellogenin synthetic site in the kuruma prawn *Penaeus japonicus*. *Fisheries Sci.*, **68**, Supplement I, 975-976.  
 Kim Y. K., Kawazoe I., Tsutsui N., Jasmani S., Wilder M. N., and Aida K., 2004: Isolation and



**Fig. 3.** Effects of sinus gland extract (SG) and sinus gland peptides (SGP3, SGP4) on vitellogenin (VTG) mRNA levels in incubated ovarian fragments. Paired ovarian fragments were taken from immature female prawn, and one fragment was incubated in medium (control) for 20 h, while the other fragment was incubated in medium containing a test substance (test) for 20 h. After incubation, VTG mRNA levels in the incubated fragment were determined, and data were expressed as ratio of test and control.

- cDNA cloning of ovarian cortical rod protein in kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus* (Crustacea: Decapoda: Penaeidae). *Zool. Sci.*, **21**, 1109-1119.
- Kim Y. K., Tsutsui N., Kawazoe I., Okumura T., Kaneko, T., and Aida K., 2005: Localization and developmental expression of mRNA for cortical rod protein (CRP) and vitellogenin (Vg) in kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus*. *Zool. Sci.*, **22**, 675-680.
- Tsutsui N., Katayama H., Ohira T., Nagasawa H., Wilder M. N., and Aida K., 2005a: The effects of crustacean hyperglycemic hormone-family peptides on vitellogenin gene expression in the kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicus*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **144**, 232-239.
- Tsutsui N., Kawazoe I., Ohira T., Jasmani S., Yang W. J., Wilder M. N., and Aida K., 2002: Vitellogenin of the kuruma prawn: the deduced primary structure and gene expression. *Fisheries Sci.*, **68**, Supplement I, 973-974.
- Tsutsui N., Kim Y. K., Jasmani S., Ohira T., Wilder M. N., and Aida K., 2005b: The dynamics of vitellogenin gene expression differs between intact and eyestalk ablated kuruma prawn *Penaeus (Marsupenaeus) japonicus*. *Fisheries Sci.*, **71**, 249-256.
- Wilder M. N., Subramoniam T., and Aida K., 2002: Yolk proteins of Crustacea. In "Reproductive Biology of Invertebrates" (ed. By Raikhel A. S. and Sappington T. W.), Vol XIIA, Science Publishers, Enfield, pp.131-174.