

クルマエビの卵の発達過程を探る

— 成熟卵を特徴づける物質の生合成過程の解明 —

山野恵祐*・鶴沼辰哉*

Oocyte development of kuruma prawn: process of biosyntheses of yolk materials

Keisuke YAMANO* and Tatsuya UNUMA*

Abstract A deep understanding of gonadal development and its controlling mechanism is indispensable for establishing the method of inducing maturation. In this study the process of cortical rods formation, which occurs at the final stage of oocyte maturation in penaeid shrimps, was examined. The expression of a gene for a cortical rod protein, the translation into proteins and the assembly of the protein to form cortical rods take place at the different stages of oocyte development. The gene for a certain proteolytic enzyme is stage-specifically expressed in oocytes at the early stage of cortical rod formation.

Key words: kuruma prawn, ovary, yolk protein, thrombospondin, cathepsin

クルマエビは比較的長い繁殖期を有し、国内においては概ね春期から秋期にかけて卵巣の発達した成熟個体が漁獲される。また、クルマエビは同一繁殖期間内に繰り返して産卵する多回産卵型の繁殖様式をもち、そのため発達中の卵巣内には発達段階の異なる卵群が存在する。一方、天然採捕したクルマエビを飼育下に移したとき、水槽内で成熟させたり、成熟状態を維持することは容易ではない。そのため種苗生産に用いる親エビには、漁獲物から産卵直前にまで成熟した雌個体を選別し、速やかに産卵させることで受精卵を得ている。しかしこのような採卵手法では、天然エビの完熟個体の出現や漁獲の状況などによって種苗生産の開始が左右されることから、より安定的に採卵するための技術開発が望まれている。

催熟技術を構築するに当たっては、対象生物の成熟過程やそれをコントロールしている仕組みを理解することは欠かせない。成熟が始まる前の卵巣は非常に小

さく、体重に対する卵巣重量比 (GSI) は1%に満たない。このような卵巣中には多数の卵黄をもたない若い卵母細胞が存在する。成熟が始まると卵内には卵黄が蓄積されはじめ、卵径は急激に増大する。このとき蓄積される卵黄物質のうち最も主要なものはビテリンである。ビテリンはそれ自身が胚発生時の栄養源となるばかりではなく、脂質、カロテノイド、金属などを結合して卵内に持ち込む輸送体としての役割も有している。ビテリンは前駆物質、ピテロジェニン (Vg) として生産されるが、クルマエビのVg遺伝子は甲殻類で最初にクローニングされた (Tsutsui *et al.*, 2000)。クルマエビVg遺伝子の発現部位は卵巣の濾胞細胞と肝臓であることも明らかにされている (Tsutsui *et al.*, 2000)。また、未熟な個体の眼柄を切除するとVg遺伝子の発現が高まることから、Vg遺伝子の発現は眼柄内にあるX器官で作られる眼柄ホルモンによって調節されていると考えられている。卵黄蓄積を完了した卵巣

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

* 養殖研究所 〒516-0193 三重県度会郡南伊勢町中津浜浦422-1 (National Research Institute of Aquaculture, 422-1, Nakatsuhamaura, Minamise, Mie 516-0193, Japan)

のGSIはおよそ10%に達する。クルマエビ類の卵発達に特異的なこととして、卵黄蓄積を終えた卵の表層に表層桿状体が形成される。表層桿状体は、産卵して卵が海水に触れたときに、卵外に放出されて、卵を取り囲むゼリー層を形成する。表層桿状体の主成分はタンパク質であり、複数のタンパク質から構成されているが、そのうちの1成分が同定されている (Khayat *et al.*, 2001)。表層桿状体の形成終了後、卵核胞が崩壊し、排卵、産卵に至るが、このプロセスは短期間のうちに進行し、通常、表層桿状体の形成開始から産卵まで1-2日の内に終える。

このような卵発達過程と現在行われている採卵手法による産卵誘発の正否には重要な関連がみられる。親エビには目視で卵巣の良く発達した個体を選別したものを使用するが、この選別手法でより分けられたエビの中には、表層桿状体を形成している個体と形成していない個体が含まれる。そして表層桿状体形成個体は高率で産卵に至るが、非形成個体では産卵率は低く、しばしば卵巣の退化が起こる (水藤ら, 1996)。従って、表層桿状体の形成機構やこの時期の卵内で起こっていること明らかにすることは効率的な採卵手法を開発するうえで重要な情報を与えると考えられる。

このようなことから本研究では、クルマエビの卵発達の過程のうち、特に産卵間近の表層桿状体形成期を対象として、分子生物学的な手法を用いてその詳細を明らかにすることを目的にした。

表層桿状体形成の過程

表層桿状体は比較的強固な物性をもっており、表層桿状体を形成している卵巣を磨り潰しても表層桿状体は元の形状を保っている。そのため磨り潰した卵から遠心操作により表層桿状体を容易に粗精製できる。このようにして得た表層桿状体のタンパク質構成を、SDSポリアクリルアミド電気泳動法で解析した結果、主要な成分として5成分あり、それらの分子量はおよそ210, 150, 140, 130, 30 kDaであることが分かった (Fig. 1 b) (Yamano *et al.*, 2003)。クルマエビにおいて表層桿状体タンパク質の1成分がperitrophin様物質として同定されているが (Khayat *et al.*, 2001)、分子量から推定すると30 kDa成分がそれに相当すると思われた。

クルマエビ表層桿状体タンパク質を特異的に検出する手法を開発するために、表層桿状体を抗原としてモノクローナル抗体を作製した。ウェスタンブロット (WB) 法で抗体の反応性をみると、多くのロットの抗体 (21/32株) は150, 140, 130 kDaタンパク質を同時

に検出することから、これら3成分は非常に類似した分子であると推測された (Fig. 1 c,d)。このうち4株の抗体は30 kDaタンパク質にも弱い反応性を示し (Fig. 1 c)、30 kDaタンパク質と150-130 kDaタンパク質の間にも類似性があると考えられた (Yamano *et al.*, 2003)。

150-130 kDaタンパク質に対する抗体を用いて卵巣組織を免疫染色すると、表層桿状体のみならず、表層桿状体を形成する前の卵黄蓄積期の卵黄も染め出された (Yamano *et al.*, 2003)。さらにWB法で各卵巣発達段階を調べたところ、成熟開始直後からこのタンパク質が検出された (Fig. 2) (Yamano *et al.*, 2004)。従って、150-130 kDaタンパク質は表層桿状体が形成される時期ではなく、それよりずっと以前の成熟開始時に生産が始まり、卵黄として蓄積されていることが明らかになった。

次いで150 kDaタンパク質の部分アミノ酸配列を決定し、その情報を利用して遺伝子の塩基配列を決定した。遺伝子データベースに登録されている情報との相同性解析から、150 kDaタンパク質は細胞外基質タンパク質として知られるthrombospondin (TSP) であることが判明した。また遺伝子クローニングの過程で、部分的に塩基配列の欠損した2つのサブタイプがあることが分かり、免疫学的な類似性を考え合わせて、これらが140, 130 kDaタンパク質をコードすると結論付けた (Yamano *et al.*, 2004)。またクルマエビTSPのアミノ末端領域はクルマエビperitrophin様タンパク質とも高い類似性を持っていた。クルマエビの表層桿状体は将来卵外に放出されてゼリー層を形成することを考えると、TSPはゼリー層の構造の形成に関わっているのかもしれない。

定量PCR法を用いて成熟の進行に伴う卵巣内でのTSP遺伝子の発現量の変化を調べたところ、興味深いことに、成熟段階による発現量の違いは見出されず、未熟な卵巣においてさえ成熟期と同じようなレベルで検出された。さらに組織学的な手法を用いて卵の発達ステージ毎のTSPメッセンジャーRNAの存在をみると、卵原細胞から卵母細胞に移行直後の極めて未熟な卵母細胞で検出されはじめ (Fig. 3 a)、卵黄蓄積を開始する以前の卵母細胞 (初期周辺仁卵, 周辺仁卵) において強く検出された (Fig. 3 b)。卵黄蓄積が始まると、急激に弱く検出されるようになり、卵黄蓄積が進んだ卵では全く検出されなかった (Fig. 3 c) (Yamano *et al.*, 2004)。

以上のような結果から表層桿状体の形成過程は以下のように取りまとめられる。TSP遺伝子の発現は未熟な卵巣において卵母細胞に移行直後の若い卵母細胞で

起こる。TSP遺伝子の発現は卵黄蓄積開始前の卵細胞内で継続し、メッセンジャーRNAのまま保持されている。成熟が始まると、卵黄蓄積期の初期からTSPタンパク質への翻訳が開始して、TSPタンパク質は卵黄成分として蓄積される。一方そのような卵内でのTSP遺伝子発現は停止する。卵黄蓄積期が終了すると、卵黄として蓄積されたTSPタンパク質を材料にして表層桿状体が形成される。このようにTSP遺伝子の発現、タンパク質への翻訳、表層桿状体構造の形成は明確に異なる成熟段階において起こることが明らかとなった。

おそらく、それぞれのステップへの移行は異なる調節の仕組みのもとにあると考えられる。そのことを調べるために、未熟なクルマエビの眼柄を切除し、TSP遺伝子及びタンパク質の発現量の変化をみた。その結果、TSPタンパク質への翻訳は促進されたものの、TSP遺伝子の発現量に変化はみられなかった。このことからTSPタンパク質への翻訳開始は眼柄ホルモンの支配下にあると想像される。遺伝子発現及び表層桿状体形成の調節機構の解明は今後の残された課題である。

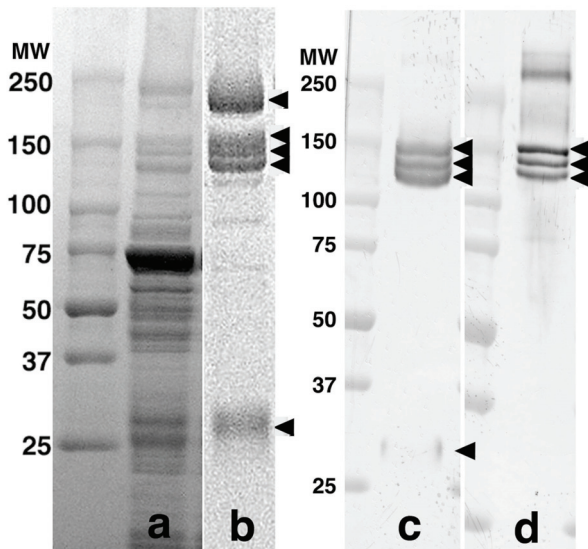


Fig. 1. SDS-PAGE patterns of ovary extract (a) and cortical rod isolate (b), and Western blot analysis of cortical rod proteins by two different lots of monoclonal antibodies (c and d). Arrowheads indicate major components of cortical rod proteins. MW, molecular weight markers. This figure is modified from Yamano *et al.* (2003).

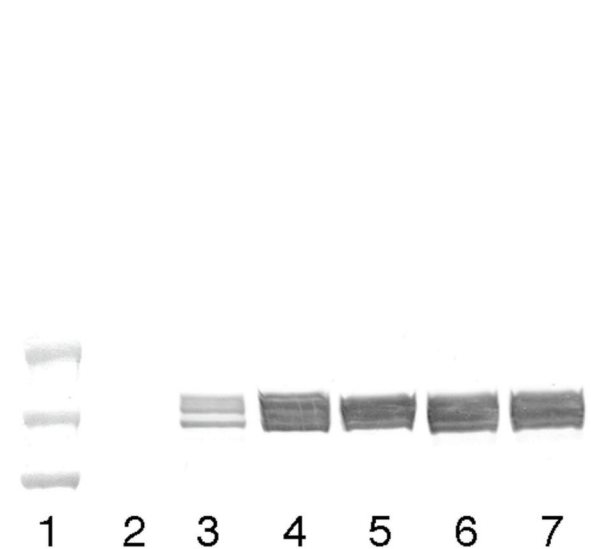


Fig. 2. Western blot analysis of 130-150 KDa proteins at various ovarian stages. 1, molecular weight markers of 250, 150 and 100 KDa from the top; 2, immature stage; 3, oil globule stage; 4 and 5, yolk granule stage; 6 and 7, cortical rod stage. This figure is modified from Yamano *et al.* (2004).

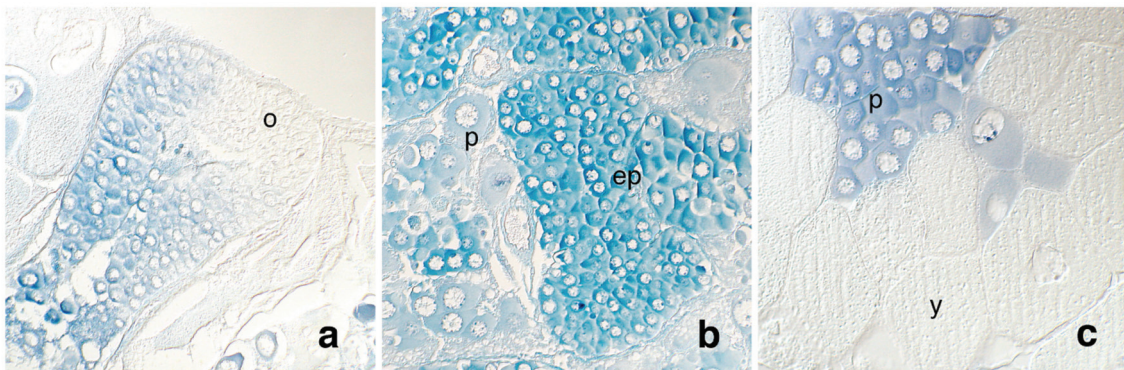


Fig. 3. Expression of thrombospondin gene visualized by in situ hybridization. a, Germinative zone; b, immature ovary; c, oil granule stage; o, oogonia; ep, early perinucleolus stage oocyte; p, perinucleolus stage oocyte; y, yolk granule stage oocyte. This figure is modified from Yamano *et al.* (2004).

最終成熟期に特異的に発現する遺伝子

クルマエビの卵発達の最終段階では、表層桿状体の形成、卵核胞の崩壊、排卵、産卵といった一連の生理現象が連続して起こるが、これらに内在する分子機構は全く分かっていない。そこで、最終成熟期に卵巣内で特異的に発現する遺伝子を探索することを通じて、最終成熟の仕組みについての理解を深めること目指した。

分子生物学的に時期特異的な発現をする遺伝子を選別する手法（cDNAサブトラクション法）を用いて、表層桿状体形成期に発現している遺伝子の割合を高めた遺伝子ライブラリを作製した。次いでドットプロット法及び定量PCR法を用いて成熟に伴う発現パターンを確かめたところ、明瞭な時期特異的な発現を示す遺伝子が1つ単離された。

この遺伝子の全塩基配列を決定した結果、カテプシンCをコードする遺伝子であることが判明した（Qiu and Yamano, 2005）。一般にカテプシンCは細胞内のライソゾームに内在する蛋白分解酵素として知られている。

クルマエビ卵巣におけるカテプシンC遺伝子の発現は卵黄蓄積期には低レベルにあるが、表層桿状体形成の初期（球形の表層桿状体が観察される時期）に急激に亢進した（Fig. 4）。表層桿状体形成中期（桿状の表層桿状体）には発現量はやや低下し、後期（GVBDの起こった卵）にはほとんど表層桿状体を形成する以前のレベルに戻った。表層桿状体の形成過程の時間経過を考えると、この遺伝子の強い発現期間は1日以下と思われる（Qiu and Yamano, 2005）。

次いで、遺伝子塩基配列から演繹されたアミノ酸配列をもとに合成ペプチドを作製し、それを抗原としてカテプシンCに対する特異抗体を得た。それを用いてWB法で卵巣発達段階毎にカテプシンCタンパク質の存在をみたところ、表層桿状体期（初期、中期、後期）にのみ検出された。カテプシンCは前駆体として合成され、プロセッシング（分解）を受けることで活性型になることが知られているが、検出されたのは非活性型のみであった。さらに免疫組織学的な観察から、カテプシンCタンパク質は表層桿状体に局在することが分かった（Fig. 5）（Qiu and Yamano, 2005）。

カテプシンCのクルマエビ卵巣における生合成過程をまとめると、カテプシンC遺伝子は表層桿状体形成の初期から中期にかけて時期特異的に発現し、速やかにタンパク質へと翻訳される。合成されたカテプシンCタンパク質は表層桿状体の構成成分となり、非活性型のまま存在する。

表層桿状体が産卵時に卵外に放出されゼリー層を形成する際、表層桿状体の崩壊とゼリー層への再構築が起こる。この過程には蛋白分解酵素が必要なが報告されていることから、この現象にカテプシンCが関与しているのかもしれない。また、甲殻類の卵形成の最終段階に特異的に発現する遺伝子が初めて単離されたが、この遺伝子発現を促す因子が何であるかについては、生殖生理学的な側面からも催熟技術の開発への応用を考えたときにも興味を持たれる。

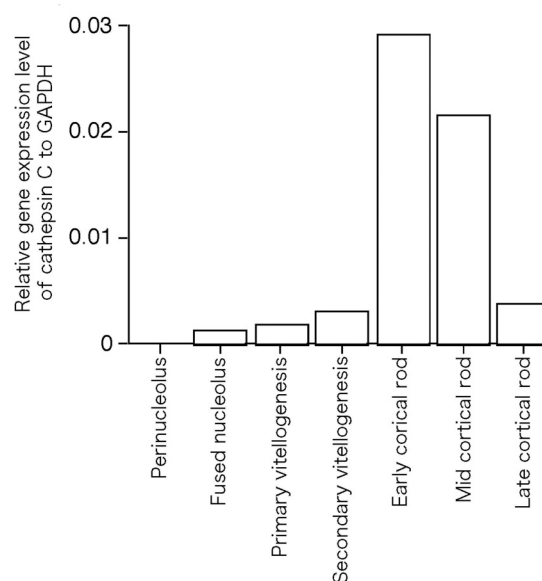


Fig. 4. Expression levels of cathepsin C gene at various ovarian stages. This figure is modified from Qiu and Yamano *et al.* (2004).

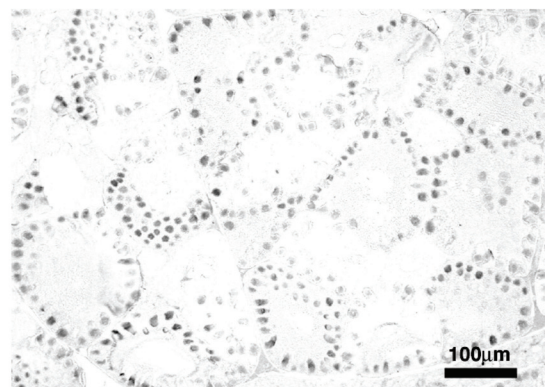


Fig. 5. Immunostaining of cathepsin C in the ovary at the cortical rod stage.

おわりに

以上のようにクルマエビ卵形成の最終期に起こる表層桿状体の形成とカテプシンCの生合成の過程を明らかにした。本研究では、現象面からは詳細に捉えることができたものの、これらの現象を調節している機構の解明には至らなかった。クルマエビの成熟をコントロールすることを目指すうえで、調節機構を明らかにすることが今後の最も重要な鍵となってくる。

文 献

- Khayat M., Babin P.J., Funkenstein B., Sammar M., Nagasawa H., Tietz A., and Lubzens E., 2001: Molecular characterization and high expression during oocyte development of a shrimp ovarian cortical rod protein homologous to insect intestinal peritrophins. *Biol. Reprod.*, **64**, 1090-1099.
- Qiu G.-F., Yamano K., and Unuma T., 2005: Cathepsin C transcripts are differentially expressed in the final stages of oocyte maturation in kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus*. *Comp. Biochem. Physiol. (B)*, **140**, 171-181.
- 水藤勝喜, 荒川哲也, 伊藤英之進, 1996: 生検法 (Biopsy法) による種苗生産用親クルマエビの成熟度観察. 栽培技研, **25**(1), 27-35.
- Tsutsui N., Kawazoe I., Ohira T., Jasmani S., Yang W., Wilder M. N., and Aida K., 2000: Molecular characterization of a cDNA encoding vitellogenin and its expression in the hepatopancreas and ovary during vitellogenesis in the kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Zool. Sci.*, **12**, 651-660.
- Yamano K., Seto H., Qiu G.-F., and Unuma T., 2003: Immunological characterization of cortical rod proteins of kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicus*. *Comp. Biochem. Physiol. (A)*, **136**, 371-377.
- Yamano K., Qiu G.-F., and Unuma T., 2004: Molecular cloning and ovarian expression profiles of thrombospondin, a major component of cortical rods in mature oocytes of penaeid shrimp, *Marsupenaeus japonicus*. *Biol. Reprod.*, **70**, 1670-1678.