

クルマエビ卵巣のビテロジェニン遺伝子発現調節に働く細胞内シグナル伝達系の解明

奥村卓二*

Intracellular signaling pathways for vitellogenin synthesis in the ovary of the kuruma prawn, *Penaeus (Marsupenaeus) japonicus*

Takuji OKUMURA

Abstract In penaeid shrimp species, vitellogenin (Vg) synthesis in the ovary is under the inhibitory regulation of vitellogenesis-inhibiting hormone (VIH) secreted from a neuroendocrine system, the X-organ/sinus gland complex in the eyestalks. In this manuscript, I review my work on intracellular signaling pathways for vitellogenin synthesis in the ovary of the kuruma prawn, *Penaeus (Marsupenaeus) japonicus*. The effects of pharmacological agents on Vg mRNA levels in incubated shrimp ovarian fragments indicate that cyclic nucleotides, Ca^{2+} , and protein kinase C are involved in the signaling pathways for vitellogenin synthesis in the ovary. Furthermore, previtellogenic ovaries showed larger inhibitory effects of pharmacological agents than vitellogenic ovaries. This result suggests that the responsiveness of signaling pathways for vitellogenin synthesis changes during ovarian development.

Key words : hormone, Kuruma prawn, signaling, vitellogenin

クルマエビなど甲殻類の種苗生産は、天然の成熟した親を漁獲して採卵したり、抱卵している親を漁獲してふ化幼生を得たりしている場合がほとんどである。そのため、漁獲の状況により、必要な時期に充分量の卵を確保できないことが問題になっている。この問題を解決するために、人為的に催熟して産卵させる技術開発が求められている。しかし、現時点で実用化されているのは眼柄除去による成熟・産卵促進だけであり、魚類で行われているようなホルモンを利用した成熟・産卵の促進技術はまだ実用化されていない。人為催熟にホルモンを利用するためには、まず成熟・産卵の調節機構を明らかにする必要がある。そこで、本プロジェクトに参加して2年間（平成18～19年度）課題を担当し、クルマエビを使って卵黄タンパク質前駆体（ビテロジェニン, vitellogenin）の合成調節機構を調べた。本稿でその概要を紹介する（詳細は Okumura 2006 を参照）。

クルマエビでも他の卵生動物と同様に、受精後の

胚発生時に必要な栄養を卵内に蓄える。卵内に蓄積される主要な栄養物質は卵黄タンパク質（ビテリン, vitellin）である。ビテリンは脂質や糖を含む大きなタンパク質（クルマエビでは分子量 530 kDa, Kawazoe *et al.*, 2000）である。ビテリンの蓄積過程では、まず前駆体であるビテロジェニンとして卵巣と肝臓で合成された後、血リンパを介して卵母細胞に運ばれ、取り込まれたビテロジェニン分子が卵母細胞内で酵素分解をうけてビテリンが作られる。

甲殻類の眼柄を切除すると卵黄形成が進むことから、眼柄内の神経節にある内分泌器官（X器官-サイナス腺系）がホルモン（卵黄形成抑制ホルモン, vitellogenesis-inhibiting hormone, VIH）を分泌して卵黄形成を調節していると考えられている。クルマエビでも未熟エビから眼柄切除によりX器官-サイナス腺系を除去するとビテロジェニンの合成が誘導される（Tsutsui *et al.*, 2005a; Okumura *et al.*, 2006; Okumura 2007）。クルマエビのサイナス腺には7種類の血糖

上昇ホルモン族ペプチドが存在し (Yang *et al.*, 1997; Nagasawa *et al.*, 1999), その中にはビテロジェニン合成を抑制するペプチド (卵黄形成抑制ホルモン) が含まれている (Tsutsui *et al.*, 2005b)。

一般にペプチドホルモンは, 標的器官の細胞膜上の受容体に結合し, 二次メッセンジャーなどの細胞内シグナル伝達系を介して作用する。甲殻類でも, 血糖上昇ホルモン族ペプチドのひとつである脱皮抑制ホルモンで細胞内シグナル伝達系が調べられ, 環状ヌクレオチドを二次メッセンジャーとしてタンパク質リン酸化酵素の活性化を介して作用していることが明らかにされている (Spaziani *et al.*, 1999)。さらに甲殻類の脱皮調節機構が調べられた結果, 脱皮抑制ホルモンの血中量の変動だけでなく, 標的器官 (Y 器官) の側でもホルモン受動態の結合能と細胞内シグナル伝達系の感受性が変動してホルモンに対する反応性が変化し, 脱皮周期が調節されていることが明らかになった (Chung and Webster, 2003)。卵黄形成抑制ホルモンも血糖上昇ホルモン族ペプチドに属するため, 同様に血中ホルモン量の変動だけでなく, 標的器官の側でもホルモンに対する反応性が変化してビテロジェニン合成が調節されている可能性がある。本研究では, 卵巣のビテロジェニン合成調節に働く細胞内シグナル伝達系の感受性の変動と卵黄形成抑制ホルモン受容体候補について調べ, クルマエビのビテロジェニン合成調節機構の一端を明らかにした。

ビテロジェニン合成に働く細胞内シグナル伝達系の感受性変動

クルマエビの培養卵巣片内のビテロジェニン遺伝子発現を測定してホルモンの作用を調べる方法が確立されている (Tsutsui *et al.*, 2005b)。この方法を使い, 細胞内シグナル伝達系に作用する薬剤を培養液に加えてビテロジェニン遺伝子発現の変化を調べた。その結果, 環状ヌクレオチドであるサイクリック AMP (cAMP) とサイクリック GMP (cGMP) 及びカルシウムイオンが二次メッセンジャーとして関与すること, さらにプロテインキナーゼ C によるタンパク質リン酸化が関与することを明らかにした (Fig. 1, Okumura 2006; 奥村 印刷中)。この研究は別のプロジェクト研究で行ったものであるが, 本プロジェクト研究でさらに研究を進展させ, 細胞内シグナル伝達系を未熟エビと成熟エビとで比較した。

クルマエビ卵巣小片の培養液にサイナス腺の粗抽出物を加えて 24 時間インキュベートした後, 卵巣片内のビテロジェニン mRNA 量を測定した。サイナス腺

の粗抽出物には卵黄形成抑制ホルモンが含まれているため, 培養液に添加するとビテロジェニン mRNA 量を減少させる効果を持つことが知られている (Tsutsui *et al.*, 2005b)。未熟な雌エビからとりだした卵巣 (前卵黄形成期, previtellogenic stage) では, サイナス腺抽出物の影響でビテロジェニン mRNA 量が 22% まで減少したが, 眼柄を切除して卵黄形成を誘発した雌エビからとりだした卵巣 (卵黄形成期, vitellogenic stage) では, サイナス腺抽出物添加による減少が 62% にとどまった (Fig. 2a, Okumura 2006)。この結果は, 卵巣の卵黄形成抑制ホルモンに対する反応性が成熟状態によって変化することを示す。未熟な時期は卵黄形成抑制ホルモンによってビテロジェニン合成が抑制されているためホルモンに対する感受性が高いが, 卵黄形成が始まるとホルモンによる抑制が必要でなくなるため感受性が低くなると考えられる。

続いて, 細胞内の環状ヌクレオチドを増加させる薬剤 3 種類 (cGMP の作動薬であるジブチル cGMP, cAMP の合成酵素を活性化する forskolin, cAMP と cGMP の分解を抑える IBMX) を添加してビテロジェニン遺伝子発現に対する影響を調べた。その結果, 卵黄形成を始めた卵巣では発現抑制効果が弱くなるのがわかった (Fig. 2b-d)。環状ヌクレオチドは二次メッセンジャーとしてタンパク質リン酸化酵素 (プロテインキナーゼ A 及び G) の活性化を介してビテロジェニン遺伝子発現抑制に働いていると考えられているが (Fig. 1), こうしたシグナル伝達系の感受性も卵巣の成熟状態によって変化すると考えられる。

一方, 二次メッセンジャーである細胞内カルシウムイオンを増加させる薬剤 (calcium ionophore) とプロテインキナーゼ C 活性を高める薬剤 (phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA) を添加した場合のビテロジェニン遺伝子発現に対する影響は, 未熟な卵巣でも成熟を始めた卵巣でも発現抑制効果に大きな違いが見られなかった (Fig. 3)。カルシウムイオンとプロテインキナーゼ C もビテロジェニン遺伝子発現調節の細胞内シグナル伝達系に関与しているが (Fig. 1), これらの伝達経路の感受性は卵巣の成熟状態で大きく変化しないと考えられる。

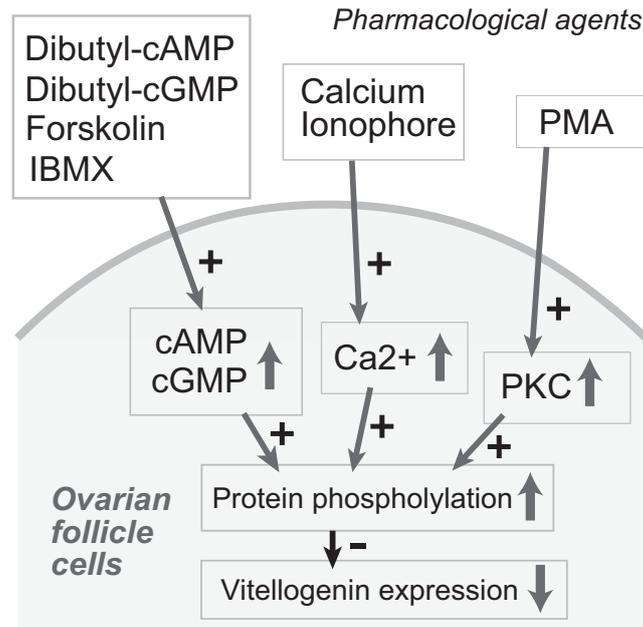


Fig. 1. Suppression of vitellogenin expression in ovarian follicle cells by pharmacological agents, dibutyl-cAMP (dibutyryl-adenosine 3',5' -cyclic monophosphate sodium salt, analog of cAMP), dibutyl-cGMP (dibutyryl-guanosine 3',5' -cyclic monophosphate sodium salt, analog of cGMP), forskolin (activator of adenylate cyclase), IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthine, non-specific inhibitor of cAMP and cGMP phosphodiesterases), calcium ionophore (A23187), and PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate, activator of protein kinase C). "+" and "-" indicate stimulatory effects and inhibitory effects, respectively. PKC: protein kinase C. (From Okumura in press)

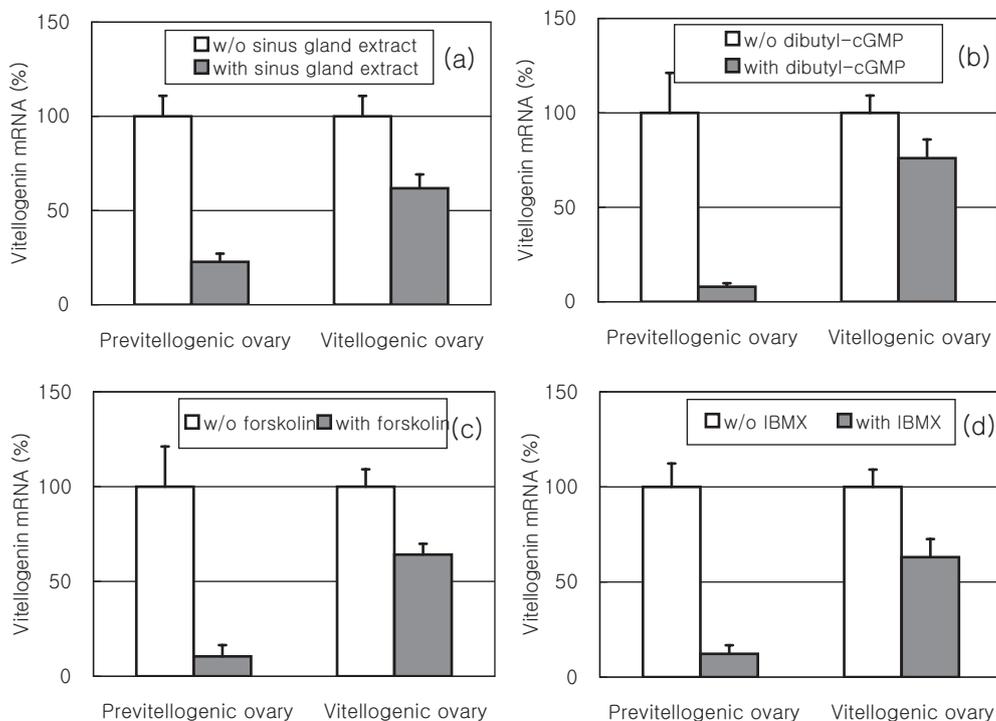


Fig. 2. Effects of (a) sinus gland extract (0.001 gland/mL), (b) dibutyl-cGMP (1 mM) (c) forskolin (0.1 mM), and (d) IBMX (1 mM) on vitellogenin mRNA levels in previtellogenic and vitellogenic ovarian fragments in 24 h incubations. Bars indicate the mean and SD of four samples.

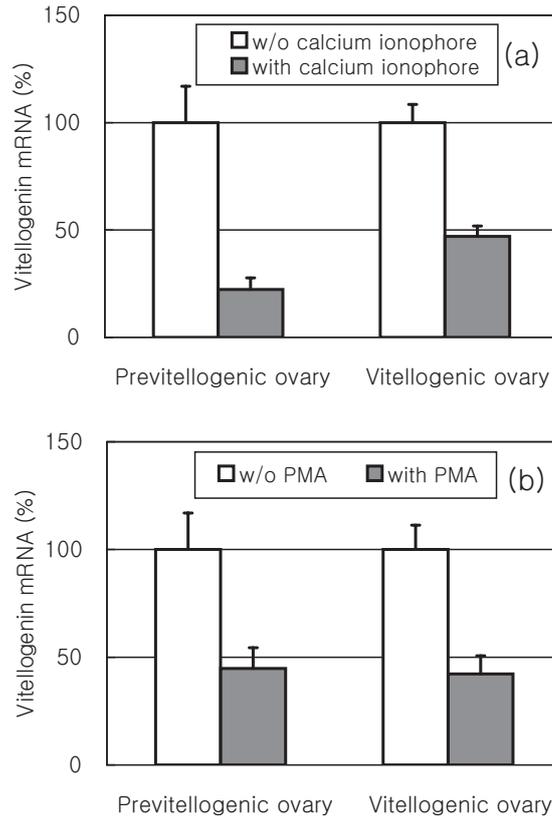


Fig. 3. Effects of (a) calcium ionophore (A23187, 0.001 mM) and (b) PMA (0.01 mM) on vitellogenin mRNA levels in previtellogenic and vitellogenic ovarian fragments in 24 h incubations. Bars indicate the mean and SD of four samples.

卵黄形成抑制ホルモンの受容体候補

一般にペプチドホルモンの作用の調節は、血中レベルの変動だけでなく受容体レベルの変動でも行われていることがある。甲殻類では、血糖上昇ホルモン族ペプチドのひとつである脱皮抑制ホルモンの受容体結合能が調べられている (Chung and Webster, 2003; Asazuma *et al.*, 2005)。ホルモン受容体の変動を詳しく調べるためには受容体タンパク質の精製や受容体遺伝子のクローニングが必要だが、まだ成功していない。しかし、ホルモンの作用に cGMP が関与していることから、グアニル酸シクラーゼ (guanylyl cyclase) がホルモン受容体の候補のひとつと考えられるようになった (Zheng *et al.*, 2006)。全く新規にホルモン受容体をクローニングすることは非常に困難で多くの労力と費用が必要になるが、グアニル酸シクラーゼなら甲殻類を含む多くの動物種でクローニングされており、その遺伝子配列情報を利用できるため、本研究課題でもクルマエビのグアニル酸シクラーゼをクローニングすることが可能と判断して取り組んだ。

グアニル酸シクラーゼは膜一回貫通型の膜タンパク

質であり、リガンド結合部位、細胞膜貫通部位、キナーゼ部位、及びシクラーゼ部位のドメインを持つ 1000 ~ 1500 残基のタンパク質である。主なものとしてナトリウム利尿ペプチドホルモンの受容体がある。全体の構造の中でシクラーゼドメインの配列がよく保存されているため、この部位を利用して degenerate PCR をおこなった。その結果、目的のサイズに近い 240bp のバンドがクルマエビ卵巣 cDNA から得られた。今後、この部分配列をもとに cDNA 全長をクローニングし、発現部位や発現変動などの解析を行う予定である。

まとめ：ビテロジェニン合成調節機構

卵巣濾胞細胞におけるビテロジェニン遺伝子発現調節に働くシグナル伝達系を Figs. 4,5 にまとめた。卵黄形成抑制ホルモンの刺激は二次メッセンジャーである環状ヌクレオチドの増加を引き起こし、cAMP と cGMP 依存性のプロテインキナーゼ (PKA と PKG) の活性化を経てビテロジェニン遺伝子の発現を抑制する (Fig. 4)。このシグナル伝達系のホルモン刺激に対する感受性は卵巣の成熟状態によって変化すると考え

られる。さらに、カルシウムイオンとプロテインキナーゼCを介したシグナル伝達系も働いている (Fig. 5)。このシグナル伝達系は卵巣の成熟状態によって大きく変化しないようである。本研究により、卵巣濾胞細胞におけるビテロジェニン遺伝子発現調節に働くシグナル伝達系がより明らかになるとともに、シグナル伝達系の感受性の変化がビテロジェニン合成調節に関与していることが示された。現時点では、Figs. 4,5 に示したシグナル伝達系が卵黄形成抑制ホルモンの作用を伝える際に働くと仮定しているが、まだそれを直接証明する証拠は得られていない。現在、卵黄形成抑制ホルモンとシグナル伝達系の阻害剤を同時に卵巣片培養液に入れ、卵黄形成抑制ホルモンの作用を阻害する阻害剤を探索している。この研究が進むことで、卵黄形成抑制ホルモンのシグナル伝達系がより明確になる。

また、卵黄形成抑制ホルモンの受容体候補としてグアニル酸シクラーゼのクローニングを試みた。現時点では部分配列を決めようとする段階までできているが、全長の塩基配列を決めるのは今後の課題となっている。ペプチドホルモンの作用機構を解明するためには、受容体の解析が欠かせない。甲殻類の卵黄形成抑制ホルモンでも受容体の研究が進むことが期待される。

本研究では、卵巣のビテロジェニン合成が卵黄形成抑制ホルモンによって調節されていることを前提にして研究を進めた。これまでの研究により、甲殻類のビテロジェニン合成は抑制的に調節されていると考えら

れているが、昆虫や脊椎動物では主に促進的に調節されている。甲殻類だけが違うので、本当に促進ホルモンはないのか、という疑問がわいてくる。脊椎動物と同様にステロイドホルモンがビテロジェニン合成を促進するという報告もあるが、甲殻類の血中にはステロイドホルモンは微量しか検出されず、成熟状態と血中ステロイド量の関連を調べた限りでは実際に働いていないようである (Okumura and Sakiyama, 2004)。しかし、未知のホルモンが促進的に働いている可能性もあり、卵黄形成抑制ホルモンだけにとらわれず、新しいホルモンを探索する研究も今後必要だろう。

本研究は甲殻類の人為催熟技術の開発を目指して進められた。現段階で得られた研究成果では、眼柄切除による成熟促進に代わる新しい人為催熟技術を開発できるようになるまでまだ遠い。しかし、成熟調節機構の詳細が明らかになれば、ホルモンや薬剤の投与及びホルモンなどの遺伝子調節などによって人為的に成熟・産卵させて種苗を得る技術が開発されることが期待できる。クルマエビの種苗生産現場では、天然の成熟した親エビの漁獲状況によって種苗の生産時期や生産量が影響されている。効果的で簡便な人為催熟技術が開発されれば、現段階では未利用の未熟なエビを使って採卵し、種苗生産ができるようになる。そうなれば親エビ入手に悩まされることがなくなる。安定した種苗生産のために、今後も基礎研究を進めていく必要がある。

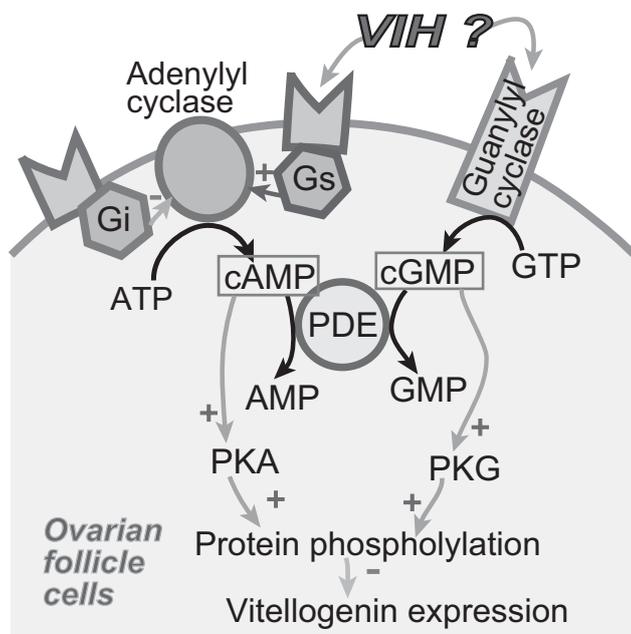


Fig. 4. Schematic diagram of signaling pathways for vitellogenin gene expression via cyclic nucleotides in the ovary. G, G protein; PDE, phosphodiesterase; PKA, protein kinase A; PKG, protein kinase G, VIH, vitellogenesis-inhibiting hormone. “+” and “-” indicate stimulatory effects and inhibitory effects, respectively.

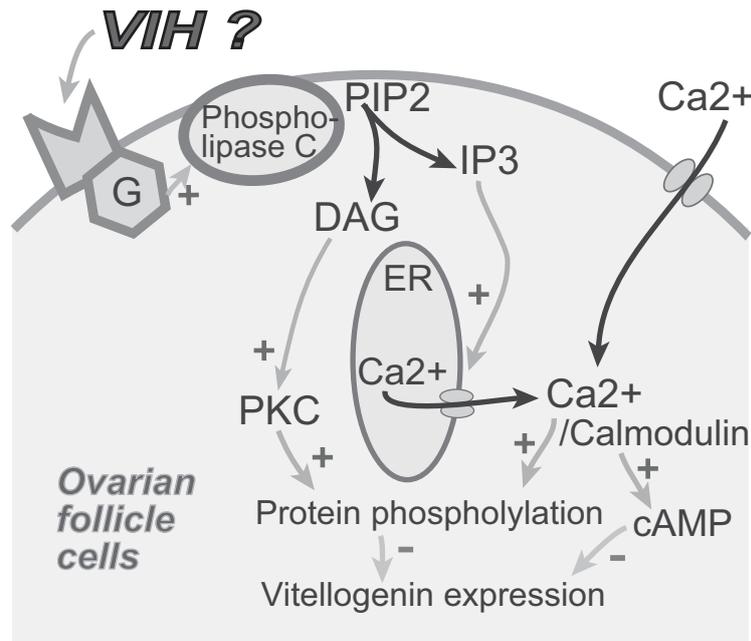


Fig. 5. Schematic diagram of signaling pathways for vitellogenin gene expression via calcium ion and protein kinase C (PKC) in the ovary. DAG, diacylglycerol; G, G protein; IP3, inositol 1,4,5-triphosphate; PIP2, phosphatidylinositol bisphosphate; VIH, vitellogenesis-inhibiting hormone. “+” and “-” indicate stimulatory effects and inhibitory effects, respectively.

文 献

- Asazuma, H., Nagata, S., Katayama, H., Ohira, T., Nagasawa, H., 2005: Characterization of a molt-inhibiting hormone (MIH) receptor in the Y-organ of the kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicus*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **1040**, 215-218.
- Chung, J.S., Webster, S.G., 2003: Molt cycle-related changes in biological activity of molt-inhibiting hormone (MIH) and crustacean hyperglycaemic hormone (CHH) in the crab, *Carcinus maenas*. *Eur. J. Biochem.*, **270**, 3280-3288.
- Kawazoe, I., Jasmani, S., Shih, T.W., Suzuki, Y., Aida, K., 2000: Purification and characterization of vitellin from the ovary of kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Fisheries Sci.*, **66**, 390-396.
- Nagasawa, H., Yang, W.J., Aida, K., Sonobe, H., 1999: Chemical and biological characterization of neuropeptides in the sinus glands of the kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. in “Peptide Science – Present and Future” (ed. by Shimonishi, Y.), Kluwer Academic Publishers, London, pp. 453-454.
- Okumura, T., 2006: Effects of cyclic nucleotides, calcium ionophore, and phorbol ester on vitellogenin mRNA levels in incubated ovarian fragments of the kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **148**, 245-251.
- Okumura, T., 2007: Effects of bilateral and unilateral eyestalk ablation on vitellogenin synthesis in immature female kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicus*. *Zool. Sci.*, **24**, 233-240.
- 奥村卓二, 印刷中: クルマエビの卵黄タンパク質の調節機構とホルモンを利用した人為催熟技術の展望. 水研センター研報.
- Okumura, T., Kim, Y.K., Kawazoe, I., Yamano, K., Tsutsui, N., Aida, K., 2006: Expression of vitellogenin and cortical rod proteins during induced ovarian development by eyestalk ablation in the kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicus*. *Comp. Biochem. Physiol. A*, **143**, 246-253.
- Okumura, T., Sakiyama, K., 2004: Hemolymph levels of vertebrate-type steroid hormones in female kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus* (Crustacea: Decapoda: Penaeidae) during natural reproductive cycle and induced ovarian development by eyestalk ablation. *Fisheries Sci.*, **70**, 372-380.
- Spaziani, E., Mattson, M.P., Wang, W.L., McDougall, H.E., 1999: Signaling pathways for ecdysteroid hormone synthesis in crustacean Y-organs. *Am. Zool.*, **39**, 496-512.

- Tsutsui, N., Kim, Y.K., Jasmani, S., Ohira, T., Wilder, M.N., Aida, K., 2005a: The dynamics of vitellogenin gene expression differs between intact and eyestalk ablated kuruma prawn *Penaeus (Marsupenaeus) japonicus*. *Fisheries Sci.*, **71**, 249–256.
- Tsutsui, N., Katayama, H., Ohira, T., Nagasawa, H., Wilder, M.N., Aida, K., 2005b: The effects of crustacean hyperglycemic hormone-family peptides on vitellogenin gene expression in the kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicus*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **144**, 232–239.
- Yang, W.J., Aida, K., Nagasawa, H., 1997: Amino acid sequences and activities of multiple hyperglycemic hormones from the kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Peptides*, **148**, 479–485.
- Zheng, J., Lee, C.Y., Watson, R.D., 2006: Molecular cloning of a putative receptor guanylyl cyclase from Y-organs of the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **146**, 329–336.