

|         |                          |         |          |
|---------|--------------------------|---------|----------|
| 氏 名(本籍) | た<br>田                   | なべ<br>辺 | とおる<br>徹 |
| 学位の種類   | 博 士 ( 農 学 )              |         |          |
| 学位記番号   | 農 博 第 8 4 2 号            |         |          |
| 学位授与年月日 | 平 成 18 年 3 月 24 日        |         |          |
| 学位授与の要件 | 学位規則第 4 条第 1 項該当         |         |          |
| 研究科専攻   | 農学研究科資源生物科学専攻<br>(博士課程)  |         |          |
| 学位論文題目  | 海産二枚貝における産卵の誘起と抑制調節の分子機構 |         |          |
| 論文審査委員  | (主 査)                    | 教 授     | 木 島 明 博  |
|         | (副 査)                    | 教 授     | 室 賀 清 邦  |
|         |                          | 教 授     | 佐 藤 英 明  |
|         |                          | 助教授     | 尾 定 誠    |

# 論文内容要旨

## 序論

海産二枚貝であるホタテガイは重要な産業対象種であり、将来的には、安定した採苗や優良形質獲得や系統管理に、同調的な産卵放精誘導技術の確立が不可欠と考えられる。このためには同種の完全人為制御下での再生産システムの構築が重要である。しかし、海産二枚貝の生殖生理学的知見は、陸上の家畜動物や魚類などの脊椎動物に比べて乏しいのが現状である。

海産二枚貝であるホタテガイの産卵に至る過程は、まず卵成熟、さらに卵放出であり、これらはセロトニン(5-HT)により卵膜上で薬理的 5-HT<sub>1/2</sub> の混合タイプと同定されている受容体を介して誘起される。海産二枚貝ではその刺激により細胞内外の Ca<sup>2+</sup> の動員が起こり、最終的に卵成熟が起こる。しかし、卵は 5-HT 受容体を備えた状態で、第一減数分裂前期で一ヶ月以上も卵巣内で留まっていることや、5-HT 投与による産卵誘発の効果にも個体差が見られることから、5-HT だけではなく何らかの調節機能が存在していることが考えられる。一方、卵成熟を誘起する 5-HT に関しても、受容体の構造が明らかになっていないため、細胞内情報伝達系との関わりを検討できていない。本研究では、海産二枚貝であるホタテガイの産卵がどのような因子によって調節されているのかを明らかにすることを目的に、5-HT と関連するホタテガイの産卵調節因子の検索を行うとともに、その作用機序を検討した。また未だ構造が明らかになっていない産卵に関わる 5-HT 受容体の構造を明らかにすることとともにこの発現解析を行った。

## 第 1 章・ホタテガイ頭部・足部神経節における新規産卵抑制調節因子の存在

配偶子形成を中枢神経が調節しているとのいくつかの報告から、ホタテガイの産卵も中枢神経の制御を受けていると考え、ホタテガイ卵巣組織片や、他種の海産二枚貝の遊離卵を用いた *in vitro* assay でホタテガイ頭部・足部神経節(CPG)抽出物が 5-HT による卵成熟と卵放出にどのような影響を与えているかについて検討した。

その結果、ホタテガイ雌雄の CPG に、5-HT による卵放出を抑制する熱に弱いタンパク質性の因子が含まれることが明らかになった(Fig. 1)。このタンパク質性の抑制因子は同じイタヤガイ科のアカザラガイでも 5-HT による卵放出を抑制した。この抑制因子の活性は血リンパ上清中にも見られた(Fig. 2)。この抑制因子は 5-HT による卵成熟を抑制することにより卵放出を抑制的に調節している、いわば OMAF (Oocyte Maturation Arresting Factor)と呼ぶべき因子であった(Fig. 3A)。従来 5-HT による卵放出を抑制する因子として知られている PGF<sub>2α</sub> は 5-HT による卵成熟ではなく、生殖輸管からの卵放出を抑制することによって機能していることが明らかになった(Fig. 3B)。すなわち 5-HT による卵成熟とその後起こる卵放出は、OMAF と PGF<sub>2α</sub> によってそれぞれ抑制的に調節を受けていることが明らかになった。OMAF はウバガイ、アサリ、マガキの 5-HT による卵成熟も抑制したため、海産二枚貝に普遍的に OMAF の機能が保存されている可能性が示唆された(Fig. 4)。

## 第 2 章 Oocyte Maturation Arresting Factor (OMAF) の作用機序

本章では、ホタテガイで見出された OMAF の卵成熟の抑制における作用機序を明らかにすることを目的として、卵の OMAF 受容機構の有無、OMAF と Ca<sup>2+</sup> との関係について検討した。

卵は OMAF に対して受容機構を有しており(Fig. 5)、OMAF の 5-HT による卵成熟誘起に対する抑制効果は、5-HT の補足や、卵膜表面の 5-HT 受容体での 5-HT との競合によってもたらせるものではなく、卵膜表面の OMAF に対する受容機構を介して起こることが明らかになった(Fig. 6)。OMAF の機能は、5-HT によって誘起される Ca<sup>2+</sup> チャンネルを介した細胞外 Ca<sup>2+</sup> の取り込みを、OMAF に特異的な受容機構を介して、もしくは直接 Ca<sup>2+</sup> チャンネルに働きかけて阻害することによって、卵成熟を抑制することにある

と示唆された(Fig. 6,7)。

### 第3章・OMAF分子の同定

第1章と第2章で検討を行ってきた OMAF 分子の同定をすることを目的に, CPG 抽出物と血リンパ上清を出発物質に, ゲルろ過, 陰イオン交換の各クロマトグラフィーで活性画分を分離し, SDS-PAGE で分子質量を特定した後, トリプシンで消化, 逆相 HPLC で分離した画分のアミノ酸シーケンスを行い, 既知のタンパク質との比較を試みた。

OMAF は 52 kD の分子質量を持つ単量体のタンパク質で(Fig. 8), トリプシン処理で得られた内部アミノ酸配列は, 既知のタンパク質に相同性を示さなかった(Fig. 9)。さらに, これまで哺乳類で報告されている OMI やアメリカウバガイで報告されている *Spisula factor* などとは異なる物質であることがわかった。したがって OMAF は, これまで同定されていない新規の卵成熟抑制因子であることが示唆された。

### 第4章・産卵に関わる 5-HT 受容体のクローニングと発現解析

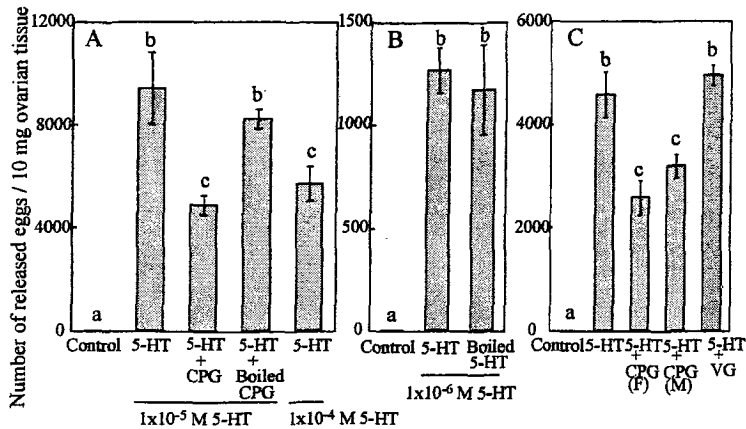
海産二枚貝の産卵に関わる 5-HT 受容体はこれまでクローニングされておらず, そのため 5-HT による卵成熟誘起における卵内情報伝達系を明らかにすることは困難である。したがって本章ではホタテガイの産卵に関わる 5-HT 受容体の構造と機能解析を目的として, ホタテガイ卵巣組織全 RNA から RT-PCR, 3'-5'RACE を用いて 5-HTpy のクローニングを行い, *in situ* ハイブリダイゼーションと半定量 RT-PCR による発現解析を行った。

ホタテガイ卵巣から 454 アミノ酸残基をコードする, 1818 bp の cDNA からなる, 5-HTpy をクローニングした(Fig. 10)。5-HTpy は既知の 5-HT 受容体と高い相同性を示した。とりわけ Gi 結合型の 5-HT<sub>1</sub> やアメリカメフラシの 5-HT<sub>1ap</sub> と高い相同性を示し, 構造的に 5-HT<sub>1</sub> サブファミリーに分類された(Fig. 11)。5-HTpy mRNA は E<sub>2</sub> によって発現が誘導され(Fig. 12), 精細胞, 卵母細胞, 生殖輸管上皮組織で発現していることが示された(Fig. 13)。構造解析の結果と発現解析の結果から卵成熟や産卵に関与している 5-HT 受容体であることが示唆された。

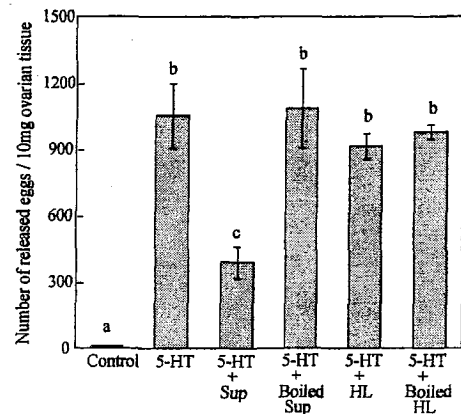
### 総合考察(Fig. 14)

- 1) ホタテガイ頭部・足部神経節に 5-HT による産卵に対して抑制的に働く, タンパク質性で, しかも, 種々の海産二枚貝に普遍的に機能する産卵抑制調節因子が存在した。この産卵抑制調節因子は血リンパを介して卵巣に伝えられ, 卵膜にある受容機構を介して, 5-HT による卵成熟を抑制する, OMAF として機能していることが明らかになった。
- 2) OMAF は 5-HT による細胞外 Ca<sup>2+</sup>の取り込みを抑制することによって, 卵成熟を抑制していることがわかった。
- 3) この抑制因子は 52 kDa の分子質量を持ち, 既知のタンパク質には該当しない新規の抑制因子である可能性が示唆された。
- 4) ホタテガイ卵巣からクローニングされた 5-HTpy は生殖細胞に発現しており, E<sub>2</sub> によって発現が誘導されたことから, 従来報告のある卵成熟を誘起する 5-HT のシグナルを卵内に伝達する 5-HT 受容体であることが示唆された。

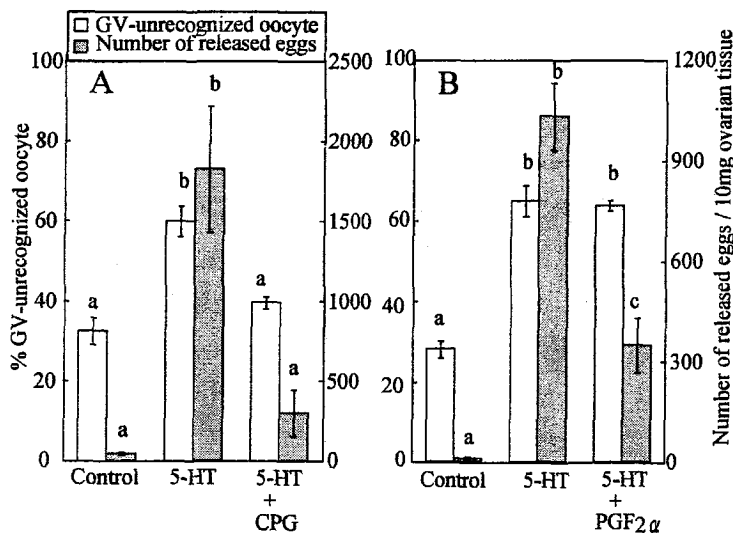
ホタテガイの産卵は, 5-HT によって引き起こされるが, E<sub>2</sub> によって遺伝子の発現が誘導される 5-HTpy を持つ卵母細胞と生殖輸管上皮細胞を, OMAF による卵成熟の抑制と, PGF<sub>2α</sub> による生殖輸管からの卵放出の抑制という別々の因子によってそれぞれ抑制的に調節されていると考えられた。



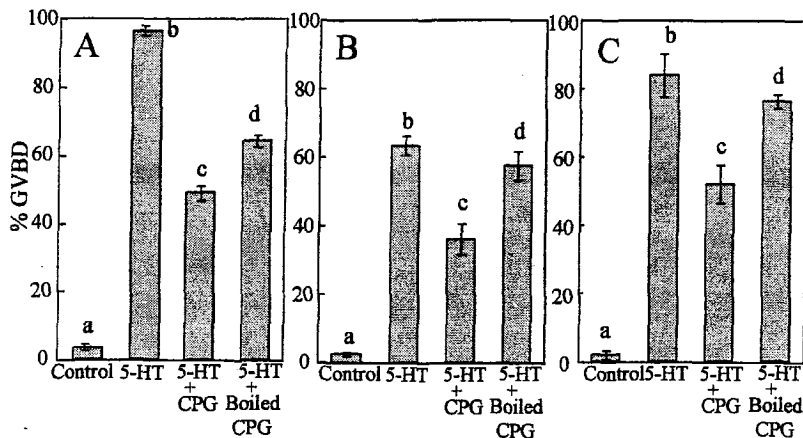
**Fig. 1** Inhibitory effect of the extract from central nervous system on serotonin (5-HT)-induced egg release from ovarian tissues of *Patinopecten yessoensis*. The ovarian tissues were incubated in  $1 \times 10^{-5}$  M or  $1 \times 10^{-4}$  M 5-HT with cerebral and pedal ganglion (CPG) extract or boiled CPG extract (A).  $1 \times 10^{-6}$  M 5-HT and a boiled 5-HT were applied (B). CPG extract from female and male and visceral ganglion (VG) extract from female were applied with  $1 \times 10^{-6}$  M 5-HT (C). Values with different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ). Each value shows the mean  $\pm$  SE ( $n = 4$ ).



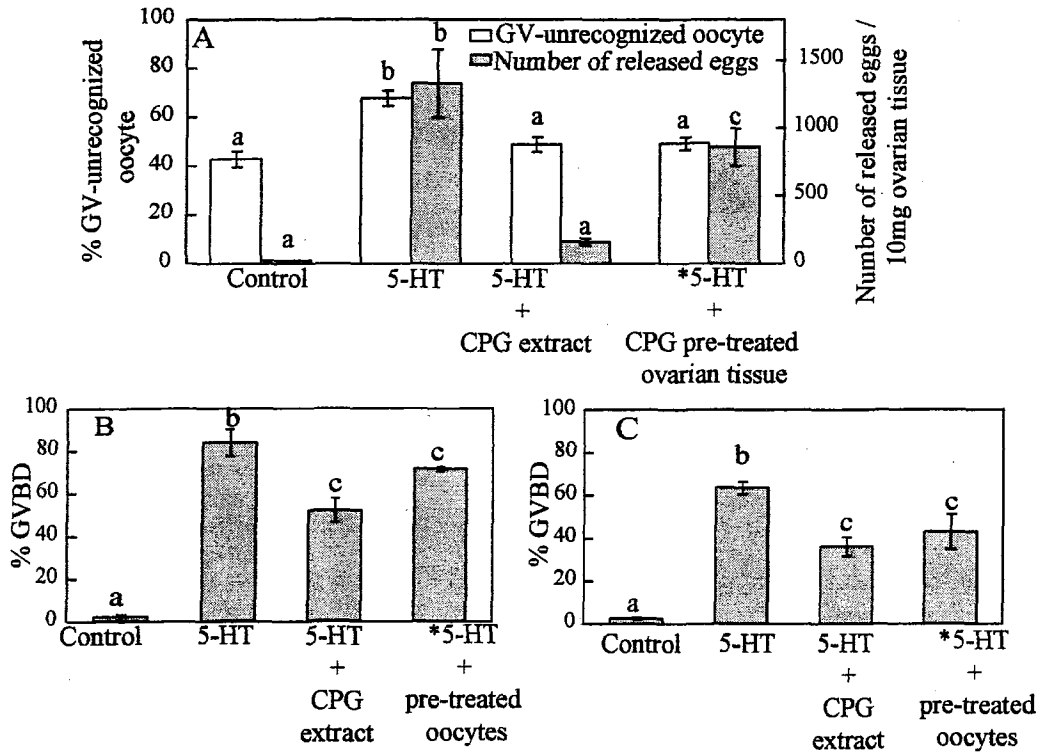
**Fig. 2** Inhibitory effect of hemolymph on 5-HT-induced egg release from ovarian tissue of *P. yessoensis*. Supernatant of hemolymph (Sup) and hemocyte lysate (HL) from the equivalent volume to 0.15 ml of hemolymph fractionated with ammonium sulfate at 80% saturation were applied to the ovarian tissue with  $1 \times 10^{-5}$  M 5-HT. Values with different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ). Each value indicates the mean  $\pm$  SE ( $n = 4$ ).



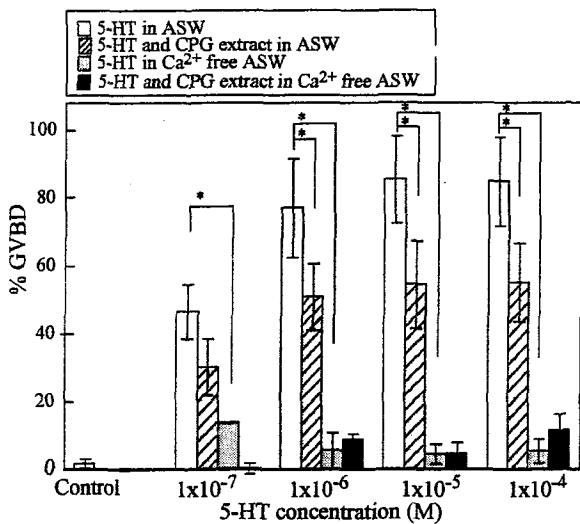
**Fig. 3** Effects of CPG extract and PGF<sub>2α</sub> on 5-HT-induced oocyte maturation and egg release of *P. yessoensis*.  $1 \times 10^{-5}$  M 5-HT was applied to the ovarian pieces with CPG extract (A) or  $1 \times 10^{-6}$  M PGF<sub>2α</sub> (B). Values with different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ). Each value indicates the mean  $\pm$  SE ( $n = 4$ ).



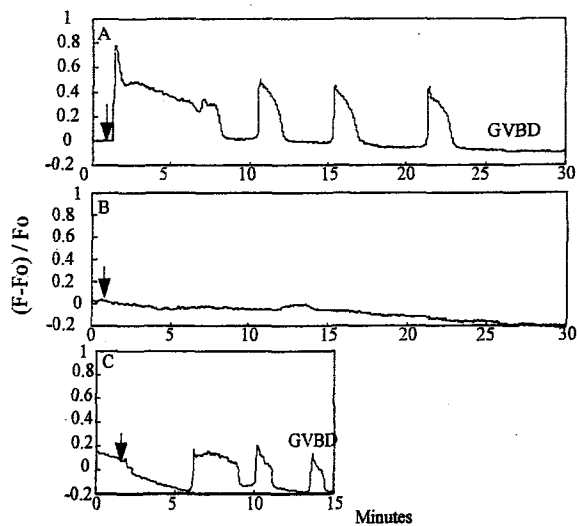
**Fig. 4** Inhibitory effect of CPG extract on 5-HT ( $1 \times 10^{-6}$  M)-induced oocyte maturation of the isolated oocytes of *Crassostrea gigas* (A), *Spisula sachalinensis* (B) and *Ruditapes philippinarum* (C). Values with different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ). Each value indicates the mean  $\pm$  SE ( $n = 4$ ).



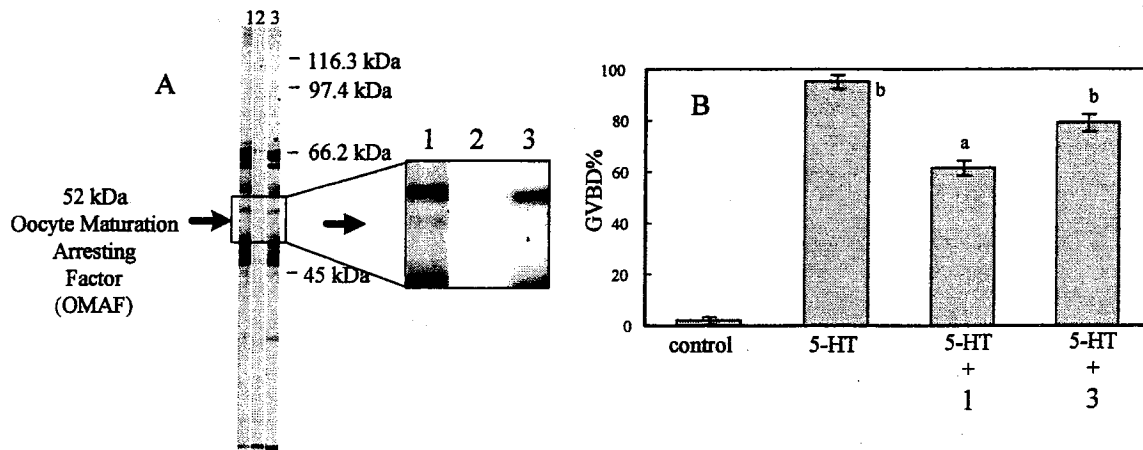
**Fig.5** Effect of pretreatment with CPG extract on 5-HT-induced oocyte maturation and egg release.  $1 \times 10^{-5}$  or  $10^{-6}$  M 5-HT was applied to the ovarian tissue of *P. yessoensis* (A) and the isolated oocytes of *S. sachalinensis* (B) and *R. philippinarum* (C) together with CPG extract or \*after pretreatment with CPG extract. The pretreatment was performed by preincubation with CPG extract followed by rinsing with ASW. Values with different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ). Each value indicates the mean  $\pm$  SE ( $n = 4$ ).



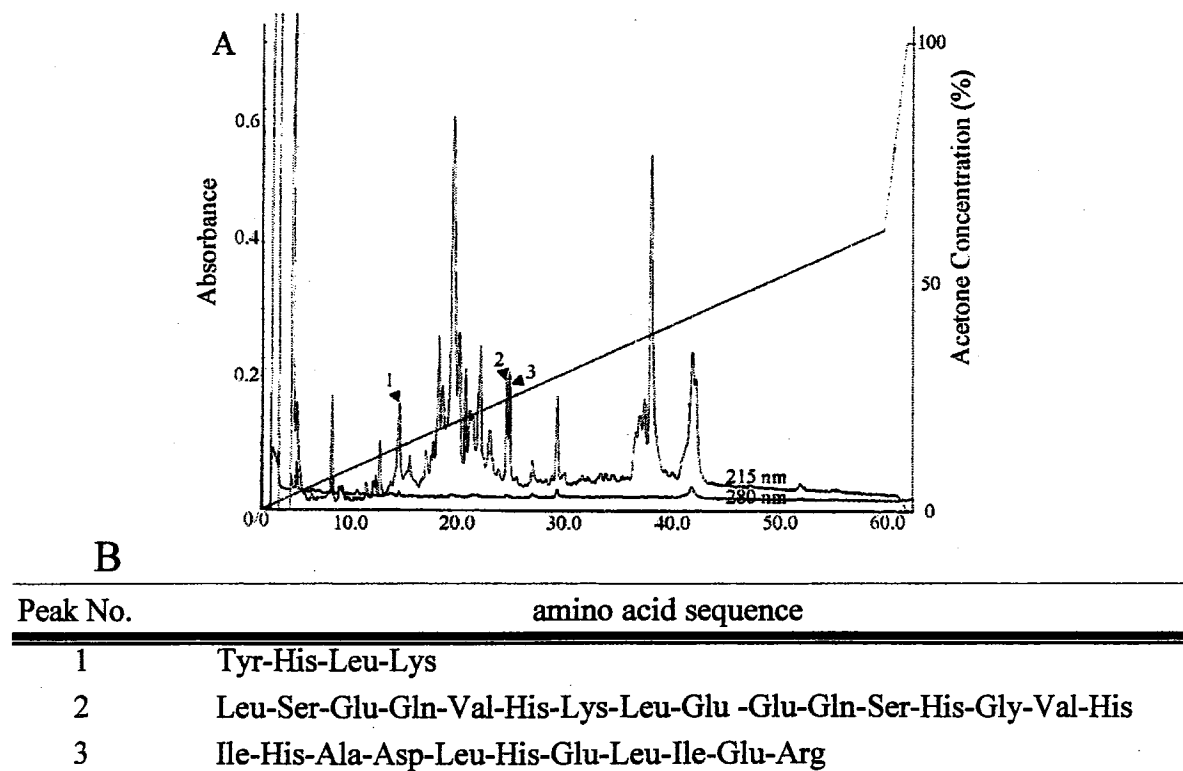
**Fig. 6** Effect of CPG extract on 5-HT-induced oocyte maturation of *R. philippinarum* oocyte under the presence or absence of extracellular  $Ca^{2+}$ . GVBD was frequently induced by 5-HT except for the incubation with  $1 \times 10^{-7}$  M 5-HT and CPG extract in  $Ca^{2+}$  free ASW. \*Significantly different in the pair ( $p < 0.05$ ). Each value shows the mean  $\pm$  SE ( $n = 4$ ).



**Fig. 7** Changes in  $[Ca^{2+}]_i$  in *R. philippinarum* oocytes treated with 5-HT (A) or with 5-HT and CPG extract (B, C). Calcium green-injected oocytes were incubated with  $5 \times 10^{-6}$  M 5-HT. GVBD occurred in A and C, but not in B. The black arrows indicate the time of 5-HT application.



**Fig. 8** 10% SDS-PAGE of the fraction containing OMAF obtained by Poros HQ chromatography (A), and effect of the fraction on 5-HT-induced GVBD of *R. philippinarum* oocyte (B). (A) 1: fraction containing OMAF. 2: supernatant obtained by rinsing *R. philippinarum* oocytes with ASW. 3: fraction containing OMAF after absorbed with *R. philippinarum* oocytes. (B) *R. philippinarum* oocytes were incubated with  $1 \times 10^{-6}$  M 5-HT alone and fraction containing OMAF or the fraction after absorbed with the oocytes. Significantly different from between a and b ( $p < 0.01$ ). Each value shows + SE ( $n = 2$ ).



**Fig. 9** Reversed-phase chromatography of the OMAF digested with trypsin (A), and amino acid sequences (B). Peptides were eluted with linear gradient 0% to 60% of acetone in 0.1% TFA. Amino acid sequence of peaks 1, 2, and 3 were determined.

1 CGGTGCTGATGTCATTCOCCTGCAGGCCTAGAAGGAAGCGAGCTCAAAACATTTGACAATTGGAAGTCACTGCAAAAATCTTTAGGGACTAATTTATCCCATTTT  
 ACCCCACAAAATAGGTTAAGGTATCGAATCTCTCTGTAAGAGTGAACACTATGCAGGTGTAGTACCCGTTCTAATATACGGAAACAAAATCACTGTTAACTGCCACAGTCGCCAACGTTAAC

1 ATGCTTATAATGGGTCTCATGCAACAAAATGGGGCGAAGCGGTCCATCCTGGACTGTTCAACAGCGACACATACCTCCAGTGCACATG 322  
 M L I M G L M Q Q N G A N A S I L G L F N S D T Y S S V T L

31 TCTACGGTCTCTACCCAGAACGAGACTACGGCGTCTTCAGTGTTAATCTACAACATAACAATCCGCTAGGTGGCACCAATGGTACAACC 412  
 S T V S T O N E T T A S S V F N S T T Y N P L G G T N G T T  
 ▲ ▲ ▲ ▲ ▲ ▲ ▲ ▲ ▲

61 GGATTCACAGGTTTCGGCCCTCAGATTAGGAGTTTGAACAACCTCTATTATTCTGGGGCTCATGATTCTCGCCACCATC 502  
 G F Q G F G P Q I R S L E H L I T T S I I L G L M I L A T I  
 TM I

91 ATCCGTAACGGTGTGTAATCCGGCCACCATCCCTGGAGAAAAATCTTCATAATGTTGCCAACTATTCATCTCTATCGCTCGCCGTGGCC 592  
 I G N V F V I A A T I L E K N L H N V A N Y L I L S L A V A  
 TM II

121 GACCTGATRGTCGCCACCCTCGTCATGCCATCAGTGTGGTGAACGAAATCAGTACTGTGTGGTCCCTTAGGCCGGAAATTTGTGATAG 682  
 D L M V A T L V M P I S V V N E I S T V W F L R P E I G D M

151 TGGATATCGTTGACGGTCTATGTTGCACCTGCTTCATACATGCACTGGTGGCCATCTCCGTAGACCGTTACTGGCCCGTTAOCACAACT 772  
 W I S F D V L G G T A S I L H L V A I S V D R Y W A V T N I  
 TM III

181 GACTACGTCAGAAATAGGAGCGCGAAGCAGATACTTTCCATGATCGCGCTGTCCTGGATGGTGGTATGCTGATTTTCAATCCCAACCTTC 862  
 D Y V R N R S A K Q I L S N I A L S N M V G M C I S I P P L  
 ▲ ▲ ▲ ▲ ▲  
 TM IV

211 TTTGGATGGAAGGAGCGCGAAGCAGTCCCGTCTGACGGGACAGTGTCTCATTAGCCAGGACATGGCTACACTGTCTTTTCCACATTT 952  
 F G W K E P A N S P V L T G T C L I S O D I G Y T V F S T F  
 TM V

241 GGTGCTTCTATCTTCCACTCTCATTATGATGATCATTATGCTAAAATATTCGAAGTCGGCCGACGACGAATTCGGAGGAAAAATTT 1042  
 G A F Y V P T L I N M I I Y A K I F Q V A R R R I R R K N F

271 CATAAAAAAGTTTGAAAAAAGCTGAGGCGAAAAATCAAAATCGGATCACTCATCAAGAGCAAGTGTCTTTAATTCGCCAAAAAGCAAT 1132  
 H K K S L K K A E A K I K S D H S S K S K L L F N S P K S N  
 ▲ ▲ ▲ ▲ ▲ ▲ ▲ ▲ ▲

301 GGTCAACACAGCGCTGATAATACGGAGATAACTGTGAACGAAACATCTGCAACGGTAATGAAAATTACAATGATAAGAATGAAAATCA 1222  
 G H N S A D N T E I T V N E T S C N G N E N Y N D K N E N S  
 ▲ ▲ ▲ ▲ ▲

331 AAAGTAGACACGAATGGATTGATGACGCAAAAACTGCAATGATCCGAAAGCAGTAAACAAAGAGCAGGACAAAGCAAGAAAAA 1312  
 K V D T N G F D D A K T A M I P K A V N K E Q D K A K K Q K

361 GAAAAGTTAGAGATGAAAAGAGAACGGAAAGCTGTAGAACGCTAGGCATCATTACGGGGGATTCATTATTTCCTGGTTGGCAATTTTC 1402  
 E K L E M K R E R K A A R T L G I I T G A F I C W L P F F  
 TM VI

391 ATCATTGCTCTCACTGCTCCCTGGTGGCAAGGCGCTGAAGAGATTCCCGAGGAACTTATAAGTTTGTACTTTGGCTCGGATATGCC 1492  
 I I A L I T A P L V G K A A E E I P E E L I S F V L W L G Y A  
 TM VII

421 AACAGTTGTTGAAACCGGATACCTTTATAACAATATTCAGCCCGGATTCGTAATGCCTTCCAGAAAATCTGTTCGGAAAATACTCAAAA 1582  
 N S L L N P I L Y T I F S P D F R N A F Q K I L F G K Y S K

441 AAATATCGGAGATGA 1597  
 K Y R R \* 454

AAATTTCCAAACGGGAAAGCATCATTATCGTCAATGCTGTTCACTGAAAGCATGATGGCAITTAATAACTGTGTCGAGCTGACCTTAAGTTAAGTGTITGGTCGGATTATCGAGAGTCTGGAACATGGATG  
 CGTTTTCGGTTAAGTACTGGTTCAAAGTGTATGTGATATGAGTAATATAAGATACGACATATGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1818

Fig. 10 Nucleotide and deduced amino acid sequence of the putative 5-HT receptor of *P. yessoensis*, 5-HTpy(AB2209935). Putative transmembrane regions are boxed and numbered TM I-TM VII. Potential sites for N-linked glycosylation are indicated by circles. Serines and threonines that are within a putative sequence for phosphorylation are indicated by triangles.

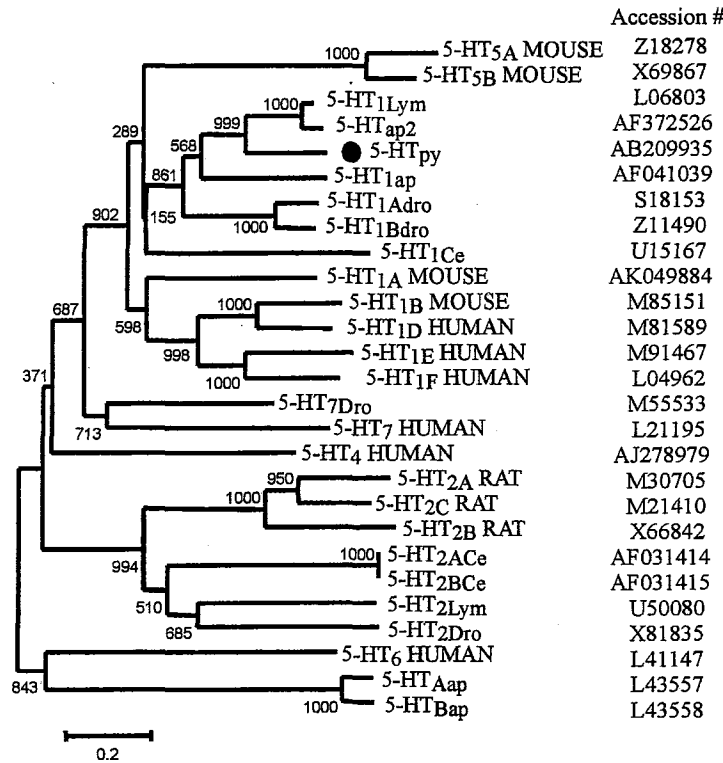


Fig. 11 Phylogenetic analysis of 5-HT receptors including 5-HT<sub>py</sub>. Amino acid sequences of 5-HT receptors were retrieved GeneBank database. Their amino acid sequence were aligned with the corresponding amino acid sequence of 5-HT<sub>py</sub>, using the ClustalW DDBJ version. Phylogenetic tree was written by tree explorer. Each number by the brachs indicates bootstrap value. Accession number were indicated. Receptoers' name are referenced Receptor sequences used are from the human, rat, mouse, *Drosophila melanogaster* (Dro), *Lymnaea stangnalis*(Lym), *Aplysia californica* (Ap or ap), and *Caenohabditis elegans* (Ce). The corresponding accession no. is indicated next to each sequence.

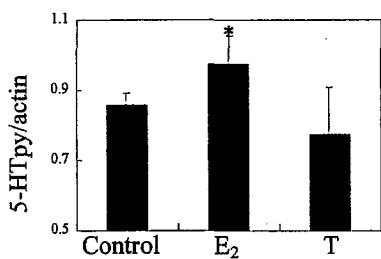


Fig. 12 Effect of steroids on 5-HT<sub>py</sub> mRNA synthesis in the ovary of scallop. E<sub>2</sub>: estradiol-17 $\beta$ , T: testosterone. \*Significantly different from control(p < 0.05). Each value indicates the mean + SE (n = 4).

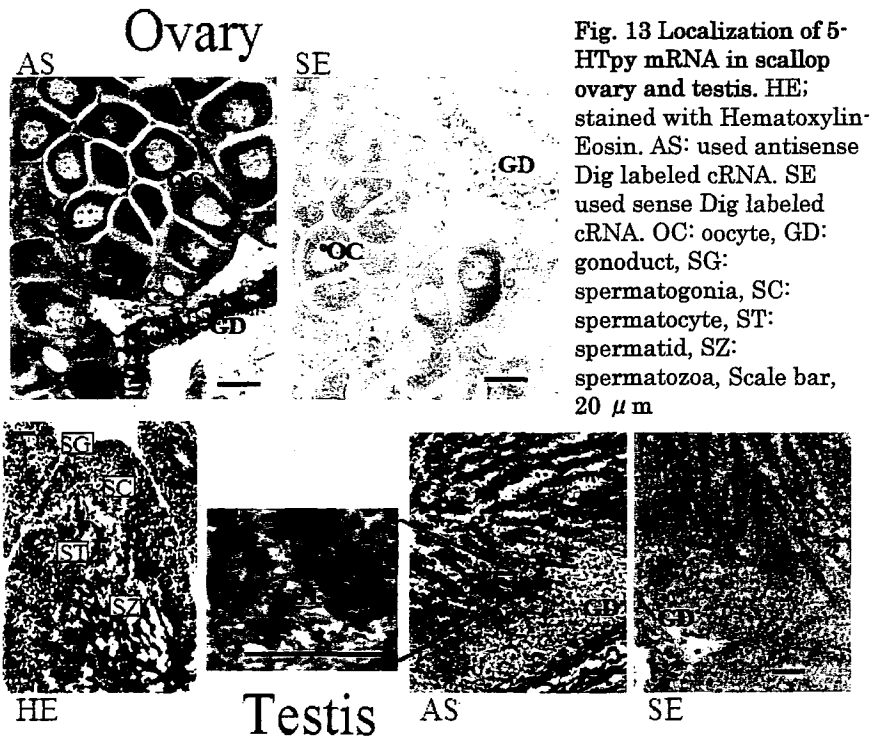


Fig. 13 Localization of 5-HT<sub>py</sub> mRNA in scallop ovary and testis. HE: stained with Hematoxylin-Eosin. AS: used antisense Dig labeled cRNA. SE used sense Dig labeled cRNA. OC: oocyte, GD: gonoduct, SG: spermatogonia, SC: spermatocyte, ST: spermatid, SZ: spermatozoa, Scale bar, 20  $\mu$ m



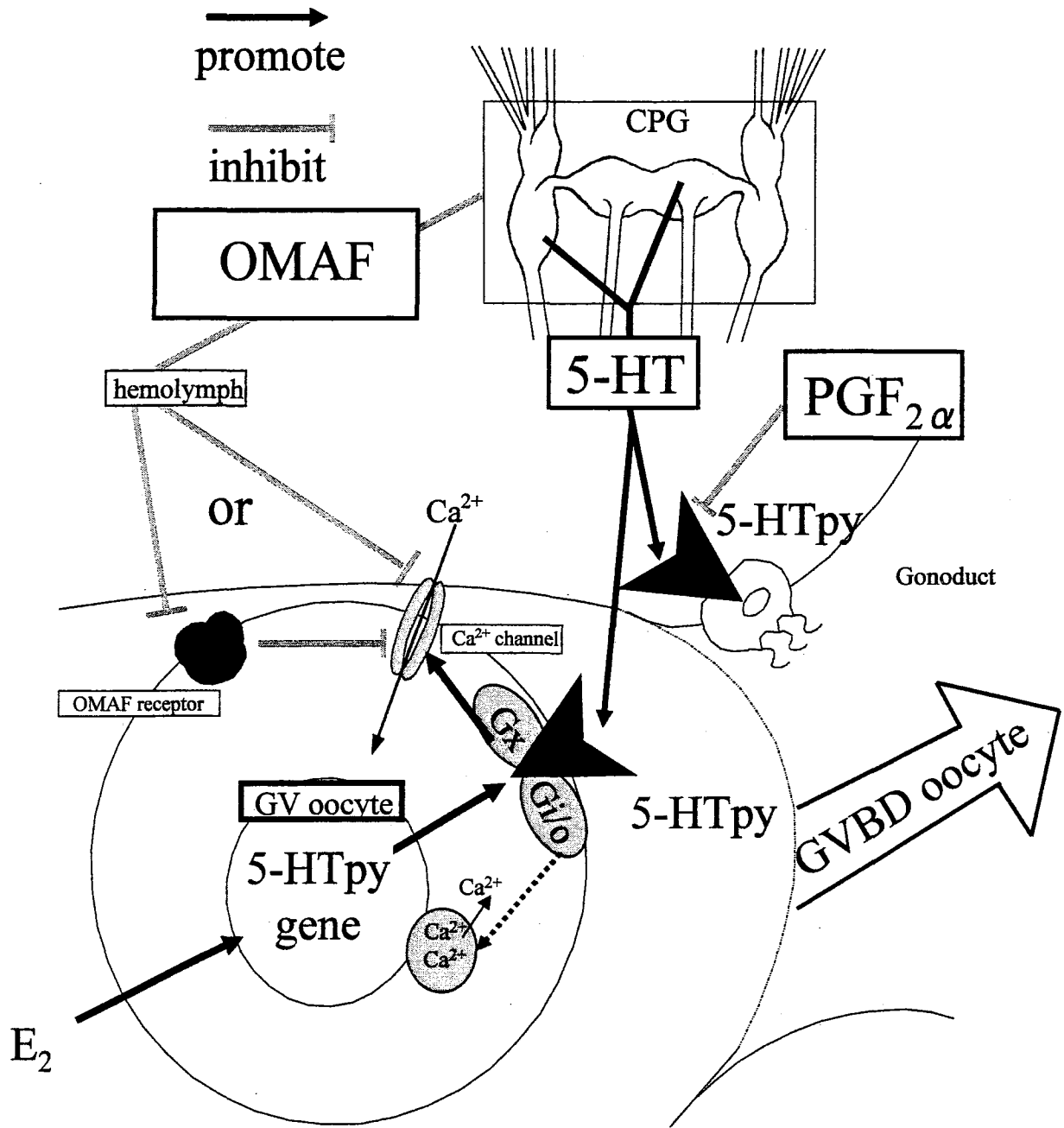


Fig. 14 Schematic depiction of extracellular transduction for oocyte maturation and egg release in the scallop, *P. yessoensis*. 5-HT: inducer of spawning. PGF<sub>2α</sub>: inhibitor of 5-HT induced egg release. OMAF: Oocyte maturation Arresting Factor.

## 論文審査結果要旨

海産二枚貝の産卵は温度、物理・化学的な刺激などによって誘発され、これら刺激が人為的な採卵や採精に利用されている。しかし、その成否には個体差が大きく影響し、安定した種苗生産に結びつかないのが現状である。この現状を解決するためにも産卵の内分泌調節機構の解明は重要な課題である。神経伝達物質であるセロトニン（5-HT）が海産二枚貝の内因性の産卵の引き金物質であることは知られているが、完全な産卵を誘起できていない。そこには、5-HTによる産卵誘発に対する調節機構の存在が以前から指摘されている。本研究は、ホタテガイ *Patinopecten yessoensis* における5-HTによる産卵誘発と関連する中枢神経由来の神経因子の検索とその作用機構を明らかにし、産卵に関わる5-HT受容体の構造と機能解析から海産二枚貝の卵成熟・卵放出の内分泌調節機構の解明を行ったものである。

1) ホタテガイの頭部・足部神経節に5-HTによる産卵誘発を抑制する蛋白質性の物質の存在を証明し、血リンパで運ばれて5-HTによる卵成熟を阻害するこの物質は、Oocyte Maturation Arresting Factor (OMAF) と名付けられた。これに続く5-HTによる成熟卵の生殖輸管内の輸送（卵放出）の誘起がプロスタグランジン F2a (PGF2a) によって抑制されることを示した。また、海産二枚貝に普遍的にOMAFの機能が保存されていることをも示し、海産二枚貝の卵成熟と卵放出からなる産卵が5-HT, OMAF, PGF2aによる内分泌支配を受けていることを明らかにした。

2) OMAFのシグナルは、卵膜上にあると示唆されたそれに対する受容機構を介して卵内に伝えられ、5-HTによるカルシウムチャンネルを介した細胞外カルシウムの卵内への流入を抑制することによって、5-HTによる卵成熟誘起を抑えていることを明らかにした。

3) OMAF分子は分子質量52kDaの単量体の蛋白質であり、内部アミノ酸配列の解析から新規の分子であることが示唆された。OMAFの起源や分子サイズの相違、また配列解析の結果未同定分子であることから、OMAFが新規の卵成熟抑制分子であることを明らかにした。

4) 卵成熟と卵放出を誘起する5-HTシグナルを細胞内に伝達するホタテガイ卵巣の5-HT受容体が、454アミノ酸残基からなり、G蛋白共役型の5-HT<sub>1</sub>サブファミリーに分類されることを明らかにした。5-HT受容体遺伝子は卵母細胞、生殖輸管内皮の繊毛細胞、精細胞で発現し、エストロジオール-17βによって発現が誘導されることから、卵成熟と卵・精子放出に関わる受容体であることを明らかにした。

本論文は、海産二枚貝の産卵調節に関わる新規の分子の発見と産卵調節全体の内分泌支配を明らかにしたものである。これは、水産増養殖対象種の二枚貝のこれからの産卵・種苗生産技術の開発に大きく貢献するものであり、卵成熟の細胞生物学に新たな研究展開を提示する先駆的な研究でもあることから、海洋生物科学において高く評価される。よってこれを博士（農学）の学位を授与するに値するものと判定した。