

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K05819

研究課題名（和文）甲殻類の生殖制御と栄養～インスリンシグナル経路からの新規アプローチ～

研究課題名（英文）Crustacean insulin-like peptides and their relationship to reproduction and nutrition

研究代表者

筒井 直昭（Tsutsui, Naoaki）

三重大学・生物資源学研究科・准教授

研究者番号：00643785

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では、クルマエビを対象にしたトランスクリプトーム解析により、ILP-1、ILP-2、ゴナデュリン（GON）というインスリン様ペプチドを見出した。成体を用いた解析では、ILP1は卵巣、ILP2は精巣、GONは輸精管というように、生殖腺において遺伝子発現の性的二型や部位特異的発現がみられた。一方、ポストラーバ変態後74日までは、遺伝子発現における明確な雌雄差は確認できなかった。ILP1と2は、卵巣や肝臓での卵黄タンパク質の発現に影響を及ぼさなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

インスリンファミリーは多機能なペプチドであり、特に脱皮動物のグループではエネルギーと生殖とをリンクする制御系を構成していると考えられる。本研究では、クルマエビで見つかった3種類の新規インスリン様ペプチドが、雌雄の生殖腺で特徴的な発現様式を示すことを示した。生殖や栄養状態の制御に関わる直接的な知見は得られなかったものの、血中グルコース濃度との関連など、今後栄養と生殖との関係をより深く理解するための基礎的知見を集積することができた。

研究成果の概要（英文）：In this study, three novel insulin-like peptides [ILP-1, ILP-2, and gonadulin (GON)] were found by transcriptome analysis in the kuruma prawn. Tissue-specific expression analyses on adults revealed sexual dimorphism and site-specific expression of these genes in the gonads: ILP1 in the ovary, ILP2 in the testis, and GON in the vas deferens. In contrast, no clear sex differences in gene expression were identified at least until 74 days after post-larval metamorphosis. Synthesized ILP1 and ILP2 had no effect on vitellogenin gene expression in the incubated ovary or hepatopancreas fragments.

研究分野：内分泌

キーワード：インスリン様ペプチド クルマエビ 生殖 栄養

1．研究開始当初の背景

インスリン様ペプチドは様々な動物種に存在するホルモンファミリーである。哺乳類をはじめとする脊椎動物における代表的なものとして、糖、脂肪酸、アミノ酸などの同化代謝に関わるインスリンや、細胞や組織の成長調節のほか様々な生理作用を持つインスリン様成長因子が知られている。前口動物に属する線虫では、インスリン様ペプチドが代謝、成長、生殖の制御に関わることが示されている。こうした作用は昆虫でも同様であり、インスリン様ペプチドが栄養状態とリンクして様々な生物機能を調節すると推定されている。また、一般的に一つの種が複数のサブタイプを有する点も昆虫のインスリン様ペプチドの特長である。

昆虫と同じ節足動物門に属する甲殻類では、本ファミリーに属するホルモンとして、インスリン様造雄腺因子（造雄腺ホルモン）が知られている。これは雄性生殖腺の付属器官である造雄腺で産生、分泌されるもので、甲殻類の雄性ホルモンと考えられており、性分化や性転換との関連から長い間研究対象とされてきた。一方で、これ以外のインスリン様ペプチドについては注目されてこなかった。研究代表者は、発現遺伝子の網羅的解析から、インスリン様造雄腺因子以外にも複数のインスリン様ペプチドがクルマエビに存在し、その発現が生殖腺に特徴的であるという予備的結果を得ていた。

2．研究の目的

以上の背景を基に、本研究では水産重要種であるクルマエビを対象とし、新規インスリン様ペプチドの特性評価、および生殖や栄養との関連の解明を試み、インスリン様ペプチドによるシグナル経路が栄養状況と生殖機能とを媒介調節する可能性や、インスリン様ペプチドを用いた生殖腺発達の誘導技術の可能性を検討した。

3．研究の方法

（１）インスリン様ペプチドの構造と発現解析

卵巣および肝臓を対象とした発現遺伝子の網羅的解析により、インスリン様ペプチドの遺伝子断片が得られているので、その情報を基に cDNA クローニングを行い、コード領域の配列情報を取得することにより全一次構造を明らかにする。

成体の雌雄 3 個体から脳、眼柄、胸部神経節、心臓、筋肉、腸管、肝臓、生殖腺を摘出し、抽出した total RNA を用いて cDNA を合成したのち、リアルタイム PCR によって遺伝子発現量を解析し、各ペプチドの組織特異的発現パターンを明らかにする。雄については、別の 3 個体から精巣、輸精管、貯精嚢を摘出し、同様に解析を行う。

（２）生殖腺の発達とインスリン様ペプチド遺伝子の発現との関係

漁獲された雌個体を生殖腺重量比（GSI）に基づき前卵黄形成期と卵黄形成期に分け、（１）と同様に卵巣での発現解析を行う。また、養殖された未熟な雌個体をそのまま飼育する未熟群と、眼柄を切除後に飼育することで卵巣発達を誘導した人為催熟群でも同様に比較し、卵巣発達とインスリン様ペプチドの発現との関連を調べる。この未熟群と人為催熟群の比較は雄でも同様に行う。雄の場合は精巣や造雄腺の発達と、生殖腺各部位におけるインスリン様ペプチド発現との関連を調べる。

（３）ポストラバ変態後のインスリン様ペプチド遺伝子の発現変動

三重県栽培漁業センターから分与していただいたポストラバ変態後 7～74 日齢の個体を用いて遺伝子発現の解析を行い、インスリン様ペプチドの発現の性的二型性が生じる時期を明らかにし、機能を推測する材料とする。

（４）組織培養系を用いた機能解析

化学合成されたインスリン様ペプチドを 0、0.1、1 μ M 含む培地で卵巣を 20 時間、肝臓を 6 時間培養し、各種遺伝子の発現量を解析することでペプチドの作用を調べる。

（５）生体を用いた機能解析

飼育実験により、5 日間の飢餓が雌のインスリン様ペプチドの発現に与える影響を調べる。また、雄へのペプチドの投与実験により、インスリン様ペプチドが血糖調節活性を有するかどうかを検討する。

4．研究成果

（１）インスリン様ペプチドの構造と発現解析

卵巣および肝臓における発現遺伝子の網羅的解析と追加の遺伝子クローニングにより、3 種類のインスリン様ペプチド、即ち Maj-ILP1、Maj-ILP2、Maj-gonadulin（Maj-GON）をコードする遺伝子を見出した。インスリン様造雄腺因子（Maj-IAG）やヒトのインスリンも含めた比

較に示した通り（図1）、4種のインスリン様ペプチドは、立体構造の維持に必要なシステイン残基の相対的位置が保存されている以外、一次構造の相同性はお互いに低かった。現在のところ、節足動物のインスリン様ペプチドは、インスリン様、リラキシン様、IAG様、GON様の4グループに分けられる。クルマエビではリラキシン様の分子が見つからず、インスリン様が2種類存在すること（Maj-ILP1とMaj-ILP2）が分かった。

遺伝子発現について、Maj-ILP1の発現は雌の生殖腺で、Maj-ILP2の発現は雌雄の脳神経節と雄の生殖腺で、Maj-GONの発現は雄の生殖腺でそれぞれ高い値を示した。雄の生殖腺を精巣、輸精管、貯精囊（造雄腺を含む）に分割して詳細な解析を行った結果、Maj-ILP2は精巣で、Maj-GONは輸精管で、Maj-IAGは既報の通り造雄腺で、それぞれ高い発現が確認された（図2）。以上から、クルマエビでは少なくとも4種のインスリン様ペプチドが存在し、生殖腺に限ればMaj-ILP1が雌に特徴的、Maj-ILP2、Maj-GON、Maj-IAGは雄に特異的、かつ部位特異的であることから、いずれも何らかの性特異的な機能に関与するシグナルを担っている可能性が考えられた。

B鎖およびプロセッシングシグナル

Maj-ILP-1	GRRDLVGQV	CG-NQLVELLSLI	CRGRYSP	RERR
Maj-ILP-2	WMTDLDAKPEPQRRL	CG-WRLANKLNSV	CKGVYNKPGPMSNSLY	RHR
Maj-ILP-3	GGRPSLYKRGQLVHVCT	TPRDVKMMARFV	CSLHR	RSVR
Maj-IAG	YNVSGIPVDFD	CG--DIGDTMSLI	CKTFPTARPY	SRVSR
ヒトインスリン	FVNQHLL	CG-SHLVEALYLV	CGERGFFYTP	KTRR

A鎖

Maj-ILP-1	GFTIVDE	CCRLKA---	CKLDELLAY	CG
Maj-ILP-2	GLSAE	CCR-KA---	CSVSELVDY	CY
Maj-ILP-3	DKEVVRAVGLT	CIADVRR	CC---	NGCLPEDFYGACR
Maj-IAG	SYNVHDE	CCNHVSQRM	CVAAEEILEY	CQDPVP
ヒトインスリン	GIVEQ	CC	T-----	SLYQLENYCN

図1 インスリン様ペプチドの一次構造の比較

システイン残基を黒の背景で、B鎖とCペプチドと間の予想プロセッシング配列を黒枠で示す。

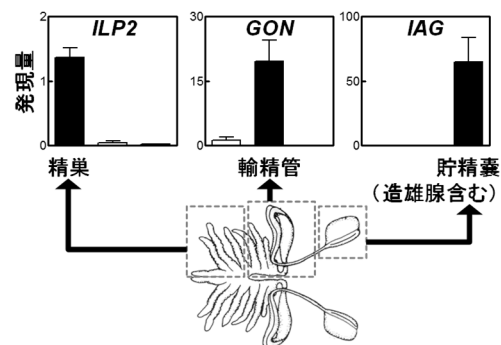


図2 雄性生殖腺におけるインスリン様ペプチドの部位特異的発現

(2) 生殖腺の発達とインスリン様ペプチド遺伝子の発現との関係

雌の生殖腺の発達とMaj-ILP1発現量について検討した。前卵黄形成期と卵黄形成期の漁獲個体の比較では、後者でGSIや卵黄タンパク質前駆体遺伝子(Maj-Vg1)の発現量が顕著に高かった。Maj-ILP1発現量については、卵黄形成期で低い傾向がみられたものの、両者に有意な差は認められなかった。未熟群と人為催熟群とを用いて検討した場合も同様で、Maj-ILP1発現量はGSIやMaj-Vg1発現量と関連しなかった。

雄についても、未熟群と人為催熟群との間でMaj-ILP2、Maj-GON、Maj-IAGの発現を比較した。眼柄切除により、造雄腺の肥大傾向とMaj-IAGの有意な発現上昇、さらには精巣の肥大傾向が確認された。一方で精巣におけるMaj-ILP2の発現、輸精管におけるMaj-GONの発現は誘導されなかった。

(3) ポストラーバ変態後のインスリン様ペプチド遺伝子の発現変動

ポストラーバ変態後7、18、24、30、46、54、60、67、および74日齢の個体を用いてMaj-ILP1、Maj-ILP2、Maj-GON、Maj-IAGの発現解析を行った。各日齢で4~8個体の結果を平均すると、Maj-ILP1の発現量は期間を通して低値を保ち、顕著な変動はみられなかった。Maj-ILP2、Maj-GON、Maj-IAGの発現量は、24から30日齢にかけて一時的に上昇し、その後は減少した。ただしそれらの発現量は個体差が非常に大きかった。また、成体でみられるような発現差の出現と維持は観察されなかった。個体の大きさの関係から、生殖腺に相当する部分だけをRNAの抽出材料にできなかった点や、ポストラーバ期では成体のように遺伝子発現が生殖腺に限定されない可能性などに留意する必要があるが、インスリン様ペプチドの遺伝子発現の性的二型性は、生殖腺の性分化が起こる前、あるいは分化の初期に生じるわけではなく、分化がある程度進んで以降に生じると推察された。今後はこの結果を踏まえて、74日齢より後の時期で、生殖腺の発達とインスリン様ペプチド遺伝子発現の性差構築との関連を検討する必要がある。

(4) 組織培養系を用いた機能解析

Maj-ILP1とMaj-ILP2のペプチドを用い、培養卵巣片に及ぼす影響を調べた。卵巣発達の指標であるMaj-Vg1の発現量は変化しなかった。ある種の昆虫では、インスリンシグナルとステロイド合成との関連が示唆されていることから、発現遺伝子の網羅的解析により卵巣での発現が確認されたステロイド合成関連酵素（脊椎動物のステロイド合成や代謝に関わるhydroxysteroid dehydrogenase様タンパク質2種、昆虫のエクジステロイド生合成に関連するCyp302）の発現についても検討したが、いずれも発現量の変化は確認できなかった。哺乳類に

においてインスリンシグナルの下流に位置し、脂肪酸やトリグリセリドの合成を支配する転写因子である sterol regulatory element-binding protein のホモログ2種類についても調べたが、Maj-ILP1 や Maj-ILP2 の添加による発現量の変動はみられなかった。

培養肝臓片における *Maj-Vg1* および *Maj-Vg2* (肝臓に特異的に発現する卵黄タンパク質前駆体遺伝子) の発現に対するペプチドの作用も検討したが、こちらも有意な変化は観察されなかった。

(5) 生体を用いた機能解析

雌個体を5日間、給餌飼育または絶食飼育した後に *Maj-ILP1* の発現量に差があるかを検討したが、両者に有意な差は確認されなかった。

雄個体を用い、Maj-ILP2 の血糖調節作用を検討した。注射によるペプチド投与の直前(0分とする)と、ペプチド投与90分後に同一個体から血リンバを採取し、グルコース濃度の比較を行った。生理食塩水投与群では90分後に有意にグルコース濃度が低下した一方、Maj-ILP2 投与群では有意な低下が認められなかった(図3)。このことから、Maj-ILP2 は血糖調節に関連する可能性が考えられるものの、それは主要な機能ではないと推察された。

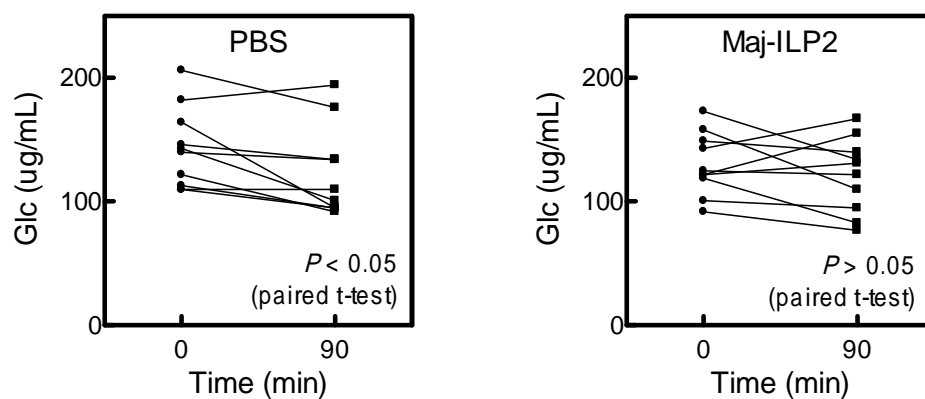


図3 雄個体を用いた Maj-ILP2 の血糖値に関するアッセイの結果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tsutsui Naoaki, Yamane Fumihito, Kakinuma Makoto, Yoshimatsu Takao	4. 巻 88
2. 論文標題 Multiple insulin-like peptides in the gonads of the kuruma prawn <i>Marsupenaeus japonicus</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Fisheries Science	6. 最初と最後の頁 387-396
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12562-022-01596-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamane Fumihito, Suitoh Katsuyoshi, Okumura Takuji, Toyota Kenji, Tsutsui Naoaki, Ohira Tsuyoshi	4. 巻 88
2. 論文標題 Annual reproductive cycle of the greasyback shrimp <i>Metapenaeus ensis</i> in Ise Bay, Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Fisheries Science	6. 最初と最後の頁 63-73
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12562-021-01569-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Manuel Albert. V., Phan Thi Cam Tu, Yamamoto Satoshi, Tsutsui Naoaki, Yoshimatsu Takao	4. 巻 52
2. 論文標題 Effect of simulated sudden thunderstorm flood on the early stage development of Japanese flounder <i>Paralichthys olivaceus</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Aquaculture Research	6. 最初と最後の頁 6464-6471
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/are.15514	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Tsutsui Naoaki, Kobayashi Yasuhisa, Izumikawa Kouichi, Sakamoto Tatsuya	4. 巻 11
2. 論文標題 Transcriptomic Analysis of the Kuruma Prawn <i>Marsupenaeus japonicus</i> Reveals Possible Peripheral Regulation of the Ovary	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Endocrinology	6. 最初と最後の頁 541
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fendo.2020.00541	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 古川雄裕、奥村卓二、山根史裕、筒井直昭
2. 発表標題 眼柄切除が小型雄クルマエビのインスリン様造雄腺因子の産生亢進を通じて精子形成を促進する可能性
3. 学会等名 令和4年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 古川雄裕、奥村卓二、山根史裕、筒井直昭
2. 発表標題 眼柄切除が雄クルマエビの生殖内分泌軸へ及ぼす影響
3. 学会等名 第45回日本比較内分泌学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 筒井直昭
2. 発表標題 クルマエビ <i>Marsupenaeus japonicus</i> におけるインスリン様ペプチド遺伝子の探索と発現解析
3. 学会等名 令和3年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Naoaki Tsutsui, Tatsuya Sakamoto
2. 発表標題 A transcriptomic search for genes encoding putative hormones expressed in the prawn ovary
3. 学会等名 The 12th International Marine Biotechnology Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1．発表者名 筒井直昭・吉松隆夫・水藤勝喜・坂本竜哉
2．発表標題 クルマエビの肝臓で発現する新規ピテロジェニン様遺伝子
3．学会等名 平成31年度日本水産学会春季大会
4．発表年 2019年

1．発表者名 筒井直昭
2．発表標題 クルマエビに見出された2種のインスリン様ペプチド
3．学会等名 第43回日本比較内分泌学会
4．発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6．研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	片山 秀和 (Katayama Hidekazu) (30580857)		
研究協力者	奥村 卓二 (Okumura Takuji) (30372030)		

7．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------