

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14806

研究課題名(和文) 漂泳性ヒトデ幼生における摂餌・栄養代謝の特性に関する生理化学的研究

研究課題名(英文) Physiological, chemical, and molecular characteristics of feeding, nutrition, and growth of planktonic starfish larvae.

研究代表者

池上 晋 (IKEGAMI, Susumu)

慶應義塾大学・自然科学研究教育センター(日吉)・訪問教授

研究者番号：80011980

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：棘皮動物イトマキヒトデの受精卵は胚を経てビピンナリア幼生となる。幼生は珪藻などを摂餌して成長し、ブラキオラリア幼生に移行する。イトマキヒトデ胚の細胞核にはトランスグルタミナーゼが存在する。このタンパク質の生成をそのmRNA と結合するモルフォリノアンチセンスオリゴの注入によって阻止すると、胚は正常にビピンナリアとなるが、ブラキオラリア幼生にはならない。13C標識珪藻を給餌すると、幼生の主要タンパク質 -アクチンに13Cが取り込まれるがその割合は正常幼生に比べて低い。ヒトデに特徴的に存在し、ヒストンを2量化する本核タンパク質の働きが幼生の摂餌・栄養代謝にとって重要であると結論される。

研究成果の概要(英文)：Following fertilization, the starfish, *Asterina pectinifera*, embryo develops to the blastula and then undergoes gastrulation to form a gut and create a feeding bipinnaria larva. The larva then takes on a more elaborate form called a brachioraria larva. The study was focused on the effect of loss of nuclear transglutaminase, a protein that is phylogenetically unique in the starfish embryo on feeding and the incorporation of 13C-labeled diatom into -actin, by microinjecting the morpholino antisense oligonucleotide to block the formation of nuclear transglutaminase. The injected embryo developed normally through the embryonic and bipinnaria stages but the incorporation rate was low and larva was unable to reach the normal brachioraria stage. This result suggests that nuclear transglutaminase, which catalyzes the formation of histone dimers in nuclei of embryo and larva, is involved in feeding and nutrition in the starfish larva.

研究分野：水圏生命科学

キーワード：ヒトデ 幼生 トランスグルタミナーゼ ヒストン修飾 珪藻

1. 研究開始当初の背景

(1) 海産無脊椎動物の 99% が漂泳性幼生を産生する。幼生は海中の微小生物を摂餌し、体内に取り込んで消化・吸収する。本研究では各種の無脊椎動物幼生の餌料として汎用されている珪藻の藻体炭素成分の大半を ^{13}C 標識し、棘皮動物イトマキヒトデの幼生に給餌した。体成分の ^{13}C 量を測定することによって、発生しつつある幼生がどのような速度で摂餌した珪藻に由来する栄養素を幼生体の主要タンパク質に同化するかを的確に測定し得る技術を確立した。この方法は異なった発生過程を辿る他の幼生にも活用することができる汎用性の高い測定法であると確信する。

(2) イトマキヒトデは浮遊幼生期に珪藻などを摂餌して成長し、変態・着底した後、稚ヒトデとなる。これまで、研究代表者らはイトマキヒトデ胚の細胞核にヒトデ固有のクロマチン会合性タンパク質、核型トランスグルタミナーゼ (Nuclear transglutaminase, nTG と略称) が出現することを明らかにし、このタンパク質の cDNA 配列を決定した。したがって、nTG mRNA と結合して翻訳を阻害する nTG モルフォリノアンチセンスオリゴ (MO) を作製することが可能となった。nTG MO を注入した卵を媒精し、得られた胚を発生させたところ正常に発生し、ピピンナリア幼生となって形態上、正常な神経系を構築し、消化器官を完成した。しかし、nTG MO のミスセンス変異体 nTG CMO を卵内注入して受精・発生した幼生がブラキオラリア幼生へと移行したのに対し、nTG 欠失幼生はピピンナリア幼生にとどまるか、ブラキオラリア幼生に移行してもブラキオラリア腕の発達不全や体サイズの増加量不足などの異常が生じ、発生が停止した。このことから、nTG 欠失による発生停止は摂餌・

消化吸收、栄養代謝の不全によってもたらされた可能性が高いと考えられた。

(3) ピピンナリア幼生に細胞核に nTG が存在することから、クロマチン・コアの 2 種のヒストンペプチド鎖間に架橋が生ずる可能性を検討した。生殖細胞とは異なり、体細胞ヒストンの修飾は転写の制御を通じてエピジェネティクスの役割を担うもので、その有無は後期発生に大きな影響を与えられらる。

2. 研究の目的

(1) ^{13}C 標識 *C. calcitrans* を給餌したピピンナリア幼生を飼育し、一定期間経過した後、幼生体内のタンパク質を分離し、ゲル内消化して得られたペプチドを nanoLC-MS/MS 分析することによって、タンパク質中の $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ の存在比を求め、幼生の摂餌から消化吸收、タンパク質同化に至る代謝速度をモニターする技術の確立を目指した。

(2) ^{13}C 標識 *C. calcitrans* を給餌した nTG 欠失幼生を飼育し、発生進行停止前に代謝速度をモニターし、発生停止が栄養不全に起因する可能性を検討した。

(3) ピピンナリア幼生の発生過程で nTG がどのように細胞内局在を変化させるかを免疫組織化学的、生化学的に追跡した。

(4) ピピンナリア幼生の発生過程でヒストンの 2 量体が形成される可能性を検討した。

3. 研究の方法

(1) ^{13}C 標識および非標識珪藻の培養： ^{13}C 標識 *C. calcitrans* は濾過滅菌した自然海水 1L 中 NaNO_3 70 mg, KH_2PO_4 4.5 mg, Fe-EDTA 3.8 mg, クレワット 32 (ナガセケムテックス株) 5 mg, $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 30 mg, ビオチン 1 μg , チアミン 100 μg , ビタミン B_{12} 12 μg , トリス 300 mg を加え混和し、塩酸で pH を中和した後、加圧滅菌した。この培地(簡易培地) 200 ml に最終濃度が 4 mM となるように

^{13}C - NaHCO_3 (98 atom % ^{13}C) を加え、500 ml 容 Roux ボトルに入れ、 2.0×10^6 個の細胞を接種し、密栓し、12L-12D の光照射条件下で 20、10 日間、振盪培養した。一方、非標識 *C. calcitrans* は簡易培地 100 ml を 555 ml 容ポリエチレンテレフタレート製ボトルに入れ、 2.0×10^6 個の細胞を接種し、密栓し、同上条件で培養した。また、幼生の成長と成分変化を解析するための幼生飼育の餌料珪藻はマリンテック (株) 製、あるいは給餌前に種培養を常法によって適宜増殖し、使用した。

(2) 発生実験

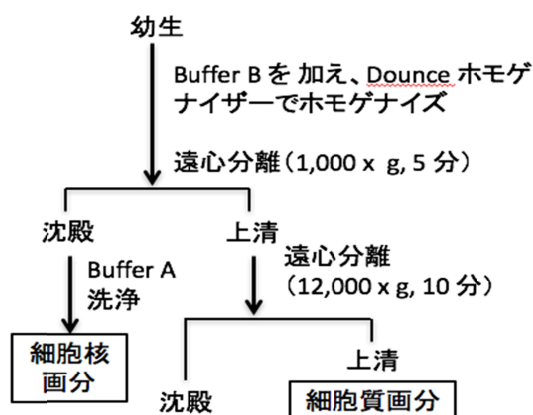
胚・幼生発生実験は 20 °C で人工海水 (Marine Art SF-1) または濾過滅菌した自然海水を用いて行った。ポリスチレン容器に $5 \times 10^7 \sim 1.0 \times 10^8$ 個の珪藻細胞を加えた 50 ml の海水中、幼生 50 個体を加えて振盪した。卵母細胞に nTG MO あるいは nTG CMO を 1 個あたり 2 ng ずつ注入した。これらを成熟させ、媒精した。受精後 2 日目の幼生に、珪藻を給餌し、発生を継続した。1 日給餌した後に過剰の珪藻や排泄物を除去し、1 日間、無給餌条件で幼生を飼育して 4 日幼生を得た。また、受精後 2 日目の幼生に珪藻を投与して、3 日後に残存する珪藻と排泄物を除去し、1 日間、無給餌条件で幼生を飼育した後、洗浄して 6 日幼生を得た。

(3) 珪藻および幼生の成分分析

2-Mercaptoethanol と SDS を含有する緩衝液に ^{13}C 標識および非標識 *C. calcitrans* を加えて煮沸溶解し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動して EzStain Aqua で染色した。最も強く染色バンドを切り出した。ゲル片を Trypsin で消化し、得られた断片ペプチドをナノ・キャピラリー・マイクロフロー液体クロマトグラフィー (nanoLC) で分離・濃縮しながら質量分析計で検出した。得られた MS/MS データをデータベース (mascot) 検索することによってタンパク質を同定した。幼生の細胞画分は図 1 の方法で行い、細胞核画分と細胞質画分を得た。ヒストンは S. Sidoli et al. の手法に基づいて抽出した。

nTG の検出は、ゲル電気泳動後、PVDF 膜に転写し、抗 nTG ポリクローナル抗体 (家兔)、つづいて西洋ワサビ結合抗家兔 IgG(H+L) 抗体 (ヤギ) を反応させ、EzWestBlue で発色させた。ヒストン H4 修飾体の検出は抗ヒトヒストン H4 モノクローナル抗体 (マウス) を用い、西洋ワサビ

図 1 . 細胞画分



Buffer A: 0.25 M ショ糖 - 40 mM NaCl - 5 mM MgCl_2 - 50 mM Tris-HCl (pH 7.5)
Buffer B: Buffer A - 1% Triton X-100

結合抗マウス IgG(H+L) 抗体 (ヤギ) を反応させ、発色させた。 ^{13}C 標識と非標識 *C. calcitrans* をビビンアリア幼生に給餌し、一定の期間飼育した後、ゲル電気泳動で質量 43 kDa の α -Actin のバンドを切り出した。これを Trypsin を用いてゲル内消化し、ペプチド断片を nanoLC-MS/MS によって解析した。

(4) 幼生を短時間 4 % Paraformaldehyde で固定後、冷アセトン処理を経て、0.05% Triton X-100 含有生理食塩水で洗浄し、抗 nTG ポリクローナル抗体 (家兔)、二次抗体として Alexa Fluor 488 標識抗家兔 IgG 抗体 (ヤギ) を用い、これに Propidium iodide を加えて ホールマウント免疫組織化学染色を施した。染色試料は共焦点レーザー顕微鏡下で観察した。

4 . 研究成果

(1) 珪藻由来栄養素の代謝速度: ^{13}C 標識および非標識 *C. calcitrans* をゲル電気泳動して最も強く染色された見かけの質量 53 kDa のバンドを切り出してゲル内 Trypsin 消化し、得られたペプチド断片を nanoLC-MS/MS によって解析した結果、これは Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/ oxygenase large subunit であり、非標識細胞由来の断片の一つ、モノアイソトピックピーク $[\text{M}+\text{H}]^+$ 616.376 が ^{13}C 標識細胞由来の断片では最高強度ピーク m/z 635.442 として現れた。また、 ^{13}C がペプチド分子内の C に入った割合は 50% ~ 85% であり、そのペプチドの存在率は 95% 以上であった。

^{13}C 標識と非標識 *C. calcitrans* を 1 日間給餌して発生させた 4 日幼生と、3 日間給餌して発生させた 6 日幼生の α -Actin 由来ペプチド断片を nanoLC-MS/MS によって解析した。 ^{13}C 含有ペプチドと ^{13}C 不含ペプチドの量比が

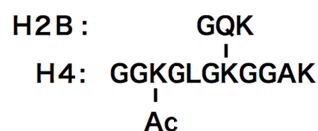
ら珪藻由来栄養素の代謝速度をモニターした結果、正常な MO 非注入対照幼生では 4 日幼生の -Actin は ¹³C 標識率が 2% であり、この細胞活動にとって必須のタンパク質はこの時期ではまだ卵に依存しているが、6 日幼生では 21% を占めるようになった。この時期の nTG CMO 幼生では 14% であったが nTG MO 幼生では 7% であった。これらの結果から、中期ピピンナリア期では nTG が摂餌・栄養を支える機能分子として発生進行に寄与することが確認された。

(2) nTG の細胞質移行：1 レーンあたり幼生 20-27 個体相当分を 7.5% SDS-ポリアクリアミドゲルで泳動し、分離されたペプチドを PVDF 膜に転写した。nTG ポリクローナル抗体を用いて Western blotting を行ったところ、胚では質量 85 kDa の nTG が細胞核に選択的に存在したが、幼生では 3 日幼生以後、細胞質にも検出され、12 日幼生では細胞質と細胞核ではほぼ同量の存在比となった。また、抗 nTG 抗体を用いて免疫組織化学染色を施した結果、6 日幼生では上皮の細胞では大部分の細胞核に nTG のシグナルが存在したが繊毛帯の細胞核ではその染色シグナルが認められなかった。この結果は、発生進行につれて nTG が次第に細胞質に移行する電気泳動の結果と合致する。

(3) 幼生におけるヒストン 2 量体の存在：1 レーンあたり 10 個体相当分の 6 日幼生と 12 日幼生を 12.5% ポリアクリアミドゲル上で泳動した。ヒストン H4 の配列は進化の過程で変化しないので、抗ヒストン H4 モノクローナル抗体 (マウス) を用いて Western blotting を行った。ヒトデの単量体ヒストン H4 に加えて 2 量体領域に強いシグナルが認められた。つぎに、8 日幼生 (7,500 個体分) のヒストン抽出物 3.2 μg BSA 等量を還元剤含有 SDS 中で加熱溶解し、15% ポリアクリアミドゲルで電気泳動した。EzStain Aqua で染色される質量 25-28 kDa のバンドを切り出し、Trypsin でゲル内消化し、nanoLC-MS/MS 分析した。その結果、ヒストン H4 と H2B が架橋したこれまで知られていない架橋構造の存在が図 2 の構造を含めていくつか明らかになった。

本研究で初めて真核生物の生きた体細

図 2. Histone H4 と H2B の架橋構造



胞にヒストン 2 量体が存在することが明

らかになった。このヒストン修飾は遺伝子配列の変化を伴わない情報発現であるエピジェネティクスの一機構であり、クロマチン構造変換を通じて発生・分化を変化させる可能性があり、細胞生物学、発生生物学における重要な発見であると確信する。

謝辞：ゲル内消化、NanoLC-MS/MS および配列解析は共同研究者広島大学大学院先端物質科学研究科中堅三弥子博士によって行われた。

< 引用文献 >

H. Sugino et al. (2002) Eur. J. Biochem, 269, 1957.

S. Sidoli et al. (2016) J. Vis. Exp., 111, 54112.

5. 主な発表論文等 (研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

池上 晋, 金子 洋之. イトマキヒトデ胚発生における核型トランスグルタミナーゼの生化学的研究. 日本動物学会大会第 88 回大会. 2017 年. 富山市.

池上 晋, 濱中 玄, 清本 正人, 亀村和生, 金子 洋之. イトマキヒトデ後期発生と核型トランスグルタミナーゼの関わり. 日本動物学会大会第 86 回大会. 2015 年. 新潟市.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池上 晋 (IKEGAMI, Susumu)

慶應義塾大学・

自然科学研究教育センター・訪問教授

研究者番号：80011980

(2) 研究分担者

金子 洋之 (KANEKO, Hiroyuki)

慶應義塾大学・文学部・教授

研究者番号：20169577