

令和元年6月9日現在

機関番号：32689

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07417

研究課題名(和文) ヒトデの生殖腺刺激ホルモン(リラキシン様ペプチド)の作用機構に関する研究

研究課題名(英文) Regulatory mechanism of starfish gonadotropin (relaxin-like gonad-stimulating peptide)

研究代表者

三田 雅敏(Mita, Masatoshi)

早稲田大学・理工学術院・その他(招聘研究員)

研究者番号：50190674

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：イトマキヒトデのリラキシン様生殖腺刺激ペプチド(RGP)のポリクローナル抗体を作製し、RGPの定量方法(RIA法、ELISA法)を開発した。その結果、RGPは放射神経および周口神経に多く存在すること、年間を通して、RGP量はほぼ一定であることを明らかにした。また免疫組織化学法による観察から、RGPは放射神経や周口神経だけでなく、辺縁神経および末端触手周辺の上皮に分布していることが新たに明らかになった。一方、眼点にはRGPは検出されなかった。また3種類のRGPについて、互いのA鎖とB鎖を入れ換えたキメラ誘導体を用いた実験から、RGPのB鎖が受容体との結合に重要であることを突き止めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生殖腺刺激ホルモンは動物における生殖腺の発達・成熟制御に重要な働きを持つ。ヒトデのリラキシン様生殖腺刺激ペプチド(RGP)は、無脊椎動物では世界で最初に同定された生殖腺刺激ホルモンでヒトの妊娠期の女性ホルモンとして知られるリラキシンとよく似た2本鎖ペプチドである。本研究の成果は、ヒトデの生殖研究分野に新たな研究基盤を確立したばかりでなく、無脊椎動物と脊椎動物にまたがるリラキシン様ペプチドとその受容体の分子共進化を知る切っ掛けとなった。

研究成果の概要(英文)：A relaxin-like gonad-stimulating peptide (RGP) of starfish is the first identified invertebrate gonadotropin for final gamete maturation. An antiserum against *Patira pectinifera* RGP (PpeRGP) was produced by immunizing rabbits. The antiserum was used for the development of a specific and sensitive RIA and ELISA for the measurement of RGP. RGP was present in the radial nerve cords and circumoral nerve rings of *P. pectinifera* throughout the year and its quantity is mostly the same irrespective of the breeding season. Immunohistochemical observations employing the PpeRGP antibody showed that there was lots of staining in the radial nerve cords and marginal nerves. In contrast, there did not appear to be any staining in the optic cushion. Because there are three orthologs of RGP, RGP derivatives with exchanged each A- and B-chain were synthesized chemically to analyze the interaction of RGP with its receptor. The result suggests that B-chain of RGP is involved in binding to its receptor.

研究分野：生殖生物学

キーワード：生殖腺刺激ホルモン 比較内分泌学 リラキシン様ペプチド G-タンパク質共役受容体 生殖生物学
ヒトデ

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトデをモデルとした生殖制御機構の研究は、1-メチルアデニン(1-MeAde)が他の動物に先駆け卵成熟誘起ホルモンとして故金谷晴夫博士により同定されて以来、多細胞動物における配偶子成熟機構を明らかにするための優れた実験モデルとして、国内外で広く行われてきた。一方、ヒトデの生殖腺刺激ホルモンは、1-MeAde 発見以前、1959年にその存在が確認されていたにもかかわらず、正確な化学構造は不明であった。2009年、研究代表者は基礎生物学研究所と名古屋大学大学院との共同研究により、イトマキヒトデの放射神経から生殖腺刺激ホルモンの精製に成功し、化学構造を同定した。ヒトデの生殖腺刺激ホルモンはインスリンスーパーファミリーに属し、特にリラキシンとよく似た2本鎖ペプチドから構成されていた。このことから、ヒトデの生殖腺刺激ホルモンの名称としてリラキシン様生殖腺刺激ペプチド (relaxin-like gonad-stimulating peptide, RGP)を提案した。さらに、10種類以上のヒトデのRGPを分析したところ、少なくとも3種類のRGPオーソログが見つかった。これにより、ヒトデの生殖制御機構について、種特異性を含め、生殖腺刺激ホルモンの視点から解析することが可能となった。

2. 研究の目的

本研究課題の目的は、無脊椎動物の生殖制御機構を分子レベルで解明することである。ヒトデのRGPは、無脊椎動物で最初に化学構造が同定された生殖腺刺激ホルモンである。RGPは放射神経に存在し、分泌後、卵母細胞を取り囲む卵濾胞細胞に作用し、1-MeAdeの生産を誘起する。しかし、放射神経におけるRGPの局在や含有量、またRGP受容体や受容体との相互作用について、これまで詳細な研究は為されていなかった。そこで、まずRGPの局在および輸送経路を明らかにし、さらにRGP受容体および受容体との相互作用の解析をおこなう。これにより、無脊椎動物の生殖研究分野に新たな研究基盤を確立する。

3. 研究の方法

(1) RGPの局在および輸送経路

イトマキヒトデ RGP (PpeRGP)の定量および検出するために、PpeRGP に対するポリクローナル抗体を作製した。但し、RGPのような低分子は抗体産生のための抗原にはなりにくいことから、PpeRGP A鎖のN末端側にPEGを導入した誘導体を作製し、キャリアタンパクであるkeyhole limpet hemocyanin (KLH)と結合させ、抗原とした。得られたPpeRGP抗体を用いて、PpeRGPの定量方法(RIA法およびELISA法)を開発した。これらの定量方法を使ってイトマキヒトデの各器官に含まれるPpeRGP量を測定した。また繁殖期と非繁殖期の個体について、放射神経に含まれるPpeRGP量を比較した。さらにPpeRGP抗体を利用して免疫組織化学法を行い、放射神経および関連組織におけるPpeRGPの局在および輸送経路を解析した。

(2) RGP受容体および受容体との相互作用

イトマキヒトデの卵濾胞細胞からトランスクリプトームを作製し、脊椎動物のリラキシンファミリーペプチド(RXFP)受容体のcDNAシーケンスを参考にして、PpeRGP受容体遺伝子を検索した。予想されるcDNAをクローニングした後、COS-7あるいはHEK293培養細胞系で強制発現させ、RGP受容体であることを確かめるためPpeRGPとの結合能やアデニル酸シクラーゼ活性を測定した。また、RGPとその受容体との相互作用を調べるために、3種類のRGP(イトマキヒトデタイプ、PpeRGP; マヒトタイプ、AamRGP; エゾヒトタイプ、AjaRGP)について、互いのA鎖とB鎖を入れ換えたキメラ誘導体を合成し、イトマキヒトデ卵巣に対する放卵活性を比較した。

4. 研究成果

3年の研究期間内で、ほぼ期待通り研究が進展し、新たに重要な知見が得られた。これらの成果は、12報の雑誌論文として発表し、23報の学会発表を行った。

(1) RGPの局在および輸送経路

PpeRGPの抗原用ペプチドとして、スルファニル-PEG誘導体を合成した(Katayama & Mita, 2016)。これにKLHを結合させ、ウサギに免疫したところ、PpeRGPに対して極めて特異性の高いポリクローナル抗体を得ることができた(Katayama & Mita, 2016)。作製したPpeRGP抗体を用いて、ラジオイムノアッセイ(RIA)法(Yamamoto et al., 2017)および酵素免疫測定(ELISA)法(Mita & Katayama, 2018)によるPpeRGPの定量方法を開発した。これら定量法により、RGP量を測定したところ、RGPはイトマキヒトデの主に放射神経と周口神経に存在することが確認できた。また、放射神経中に含まれるRGP量は繁殖期、非繁殖期に関わらず、年間を通じてほぼ一定であった(図1)。

In situ hybridizationによってRGP mRNAの分布を調べたところ、放射神経、周口神経、管足および体

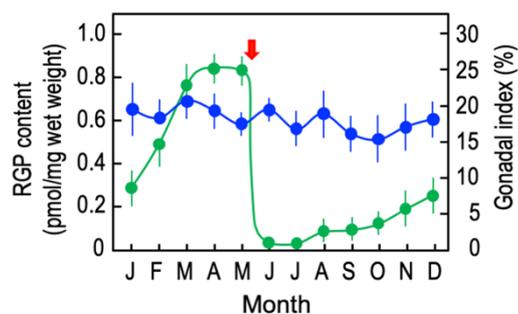


図1 イトマキヒトデ放射神経中に含まれるRGP量(●)と生殖指数(●)の経年変化。バーの長さは標準誤差。矢印は放卵の時期を示す。(n = 6) (Mita 2019より改変)

腔壁内側の上皮にシグナルが確認された。特に放射神経では、管足側周辺にシグナルが検出され、体腔側には検出されなかったことから、RGP産生細胞は放射神経の管足側周辺に局在していると考えられる(Ming et al., 2017)。一方、免疫組織化学法による観察では、RGPは放射神経や周口神経だけでなく、辺縁神経および末端触手周辺の上皮に分布していた。しかし、眼点には存在していなかった。興味深いことに、RGPは放射神経の管足側周辺ではなく、神経内部に観察された。このことから、放射神経の管足側周辺に存在するRGP産生細胞で合成されたRGPは神経内部に移動し、貯蔵されると考えられる(論文準備中)。おそらく、放卵・放精の直前になって、RGPは放射神経から血洞系に分泌され、生殖巣に到達するものと思われる。一方、イトマキヒトデの生殖腺刺激ホルモン遊離ホルモン(GnRH)を化学合成し、放射神経に与えてみたが、RGPの分泌は見られなかった(Mita, 2016)。RGPの分泌機構は未だ不明である。

(2) RGP受容体および受容体との相互作用

RGP受容体は卵濾胞細胞で発現していることが予想されたことから、イトマキヒトデ卵濾胞細胞のmRNAからtranscriptomeを作成し、RXFP受容体と相同性の高いRNA配列を検索した。その結果、RGP受容体候補として、RXFP2と相同性の高い2種類のRNA配列が見付かったので、cDNA cloningを行い、coding DNAシーケンスを確定した。予想されるタンパク質は両者とも7回膜貫通型のGタンパク共役型受容体であった。そこで、次にC末側にV5タグとHisタグを付与した発現ベクターを作成し、HEK293MSR細胞に強制発現を行ったところ、細胞膜上にRGP受容体候補が発現していることが確認できた。しかし、RGPを加えても細胞内サイクリックAMPの変化は殆ど見られなかった。従って、RGP受容体候補と予想した2種類の遺伝子について、RGP受容体である確証は得られていない。

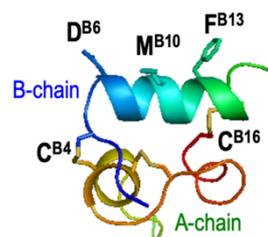


図 2 受容体タンパクとの結合が予想されるイトマキヒトデ RGP のアミノ酸残基。(Mita et al., 2019 より改変)

次に、RGPとその受容体との相互作用を調べるため、3種類のRGP (PpeRGP, AamRGP, AjaRGP)のA鎖とB鎖を入れ換えたキメラRGPを含め、9種類のRGPを合成し、イトマキヒトデ卵巣に対する放卵誘起活性を調べた。その結果、A鎖がイトマキヒトデタイプのRGP (PpeRGP)においてのみ、放卵活性が認められた (Mita et al., 2019)。一方、リラキシンではB鎖に「バイディングカセット」と呼ばれる共通のアミノ酸配列 (RxxxRxxI/V)があり、受容体との結合に重要であることが知られている。しかし、ヒトデのRGP B鎖にはリラキシン特有の「バイディングカセット」は存在しない。一方、リラキシンの「バイディングカセット」に相当するRGP B鎖のアミノ酸残基は6番目のアスパラギン酸、10番目のメチオニン、13番目のフェニルアラニンであった。これらアミノ酸の側鎖はいずれもヘリックスの外側を向いていることから、これらアミノ酸残基が受容体との結合に関与している可能性は高い(図2)。また、B鎖について、3種類のRGPで比較するとA鎖よりも共通するアミノ酸の割合が高い(Mita and Katayama, 2016)。それに対して、AamRGPおよびAjaRGPのA鎖のアミノ酸配列はPpeRGPのA鎖と比べて相同性が低い。このことから、AamRGPおよびAjaRGPのA鎖は、B鎖が受容体と結合する際に立体障害をもたらす、妨害している可能性があると考えられる。

5. 主な発表論文等 (研究代表者には下線)

[雑誌論文] (計 12 件)

- ① Masatoshi Mita, (2019) Starfish gonadotropic hormone: from gamete-shedding substance to relaxin-like gonad-stimulating peptide. *Frontiers in Endocrinology* (査読有) 10: 182. DOI: 10.3389/fendo.2019.00182
- ② Masatoshi Mita, Keitaro Nakamura, Kazuyoshi Tsutsui, Hidekazu Katayama, (2019) Interaction of starfish gonadotropin with its receptor: Effect of chimeric relaxin-like gonad-stimulating peptides. *General and Comparative Endocrinology* (査読有) 276: 30-36. DOI: 10.1016/j.ygcen.2019.02.019
- ③ Meaghan K. Smith, Utpal Bose, Masatoshi Mita, Michael R. Hall, Abigail Elizur, Cherie A. Motti, Scott F. Cummins, (2018) Differences in small molecule neurotransmitter profiles from the Crown-of-Thorns Seastar radial nerve reveal revealed between sexes and following food-deprivation. *Frontiers in Endocrinology* (査読有) 9: 551. DOI: 10.3389/fendo.2018.00551
- ④ Masatoshi Mita, Hidekazu Katayama, (2018) Enzyme-linked immunosorbent assay of relaxin-like gonad-stimulating peptide in the starfish *Patiria (Asterina) pectinifera*. *General and Comparative Endocrinology* (査読有) 258: 157-162. DOI: 10.1016/j.ygcen.2017.08.027

- ⑤ Ming Lin, **Masatoshi Mita**, Michaela Egertová, Cleidiane G. Zampronio, Alexandra M. Jones, Maurice R. Elphick, (2017) Cellular localization of relaxin-like gonad-stimulating peptide expression in *Asterias rubens*: new insights into neurohormonal control of spawning in starfish. *Journal of Comparative Neurology* (査読有) 525: 1599-1617. DOI: 10.1002/cne.24141
- ⑥ Kazutoshi Yamamoto, Masato Kiyomoto, Hidekazu Katayama, **Masatoshi Mita**, (2017) Radioimmunoassay of relaxin-like gonad-stimulating peptide in the starfish *Patiria* (= *Asterina*) *pectinifera*. *General and Comparative Endocrinology* (査読有) 243: 84-88. DOI: 10.1016/j.ygcen.2016.11.007
- ⑦ **三田雅敏** (2017) ヒトデの卵成熟を利用した減数分裂の観察 東京学芸大学紀要 自然科学系 69: 91-97 ISSN 1880-4330
- ⑧ **Masatoshi Mita**, (2016) Inhibitory mechanism of L-glutamic acid on spawning of the starfish *Patiria* (*Asterina*) *pectinifera*. *Molecular Reproduction and Development* (査読有) 84(3): 246-256. DOI: 10.1002/mrd.22769
- ⑨ Hidekazu Katayama, **Masatoshi Mita**, (2016) A sulfanyl-PEG derivative of relaxin-like peptide utilizable for the conjugation with KLH and the antibody production. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* (査読有) 24(16): 3596-3602. DOI: 10.1016/j.bmc.2016.05.068
- ⑩ **Masatoshi Mita**, (2016) Starfish gonadotropic hormone: Relaxin-like gonad-stimulating peptides. *General and Comparative Endocrinology* (査読有) 230-231: 166-169. DOI: 10.1016/j.ygcen.2016.04.016
- ⑪ **Masatoshi Mita**, Ryosuke Murata, Masaru Nakamura, (2016) Seasonal changes in gonads of the crown-of-thorns starfish, *Acanthaster planci*. *Bulletin of Tokyo Gakugei University, Division of Natural Sciences*, 68: 65-72. ISSN1880-4330
- ⑫ **Masatoshi Mita**, Hidekazu Katayama, (2016) A relaxin-like gonad-stimulating peptide from the starfish *Aphelasterias japonica*. *General and Comparative Endocrinology* (査読有) 229: 56-61. DOI: 10.1016/j.ygcen.2016.02.025

[学会発表] (計 23 件)

- ① **三田雅敏**, 中村啓太郎, 筒井和義, 片山秀和, リラキシン様生殖腺刺激ペプチドキメラ誘導体による受容体との相互作用の解析, 日本動物学第 89 回大会, 東京大学 (東京), 2018 年 12 月 9 日
- ② 榮雄大, 及川彰, 杉浦悠毅, **三田雅敏**, 西村俊哉, 田中実, 代謝変化によるメダカ性分化制御機構, 第 41 回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜 (横浜), 2018 年 11 月 29 日
- ③ 片山秀和, 水野涼, **三田雅敏**, マヒトデ由来リラキシン様ペプチドに対する抗体作製に向けた誘導体の合成研究, 第 43 回日本比較内分泌学会大会およびシンポジウム, 東北大学 青葉山コモンズ (仙台), 2018 年 11 月 10 日
- ④ 原口省吾, 長濱嘉孝, **三田雅敏**, リラキシン様生殖腺刺激ペプチド (RGP) の受容体の同定, 第 43 回日本比較内分泌学会大会およびシンポジウム, 東北大学 青葉山コモンズ (仙台), 2018 年 11 月 10 日
- ⑤ **三田雅敏**, 三浦智恵美, 筒井和義, 片山秀和, オニヒトデのリラキシン様生殖腺刺激ペプチドの発現と分布, 第 43 回日本比較内分泌学会大会およびシンポジウム, 東北大学 青葉山コモンズ (仙台), 2018 年 11 月 10 日
- ⑥ **三田雅敏**, 中村啓太郎, 片山秀和, リラキシン様生殖腺刺激ペプチドのキメラ誘導体と受容体との相互作用について, 第 91 回日本生化学会大会, 国立京都国際会館 (京都), 2018 年 9 月 25 日
- ⑦ **Masatoshi Mita**, Shogo Haraguchi, Keitaro Nakamura, Hidekazu Katayama, Interaction of starfish gonadotropin with its receptor: Effect of chimera relaxin-like gonad-stimulating peptides. 29th Conference of European Comparative Endocrinologists, University of Glasgow, Glasgow (United Kingdom), 2018 年 8 月 20 日
- ⑧ **Masatoshi Mita**, Keitaro Nakamura, Hidekazu Katayama, Effect of chimera relaxin-like gonad-stimulating peptides on spawning in ovaries of starfish *Patiria pectinifera*. 8th Intercongress Symposium of the Asia and Oceania Society for Comparative Endocrinology, The University of

Sydney, Sydney (Australia), 2018 年 7 月 10 日

- ⑨ 片山秀和, 中村啓太郎, 三田雅敏, ヒトデのリラキシン様生殖腺刺激ペプチドの構造活性相関に向けた類縁体合成, 日本農芸化学会 2018 年度大会, 名城大学 (名古屋), 2018 年 3 月 16 日
- ⑩ Masatoshi Mita, Hidekazu Katayama, Enzyme-linked immunosorbent assay of relaxin-like gonad-stimulating peptide in the starfish *Patiria (Asterina) pectinifera*. Consortium of Biological Sciences 2017 (ConBio2017), 神戸ポートアイランド (神戸), 2017 年 12 月 8 日
- ⑪ 榮 雄大, 及川 彰, 杉浦悠毅, 三田雅敏, 田中 実, 栄養源飢餓によるメダカの性転換と代謝変化, 2017 年度生命科学系学会合同年次大会, 神戸ポートアイランド (神戸), 2017 年 12 月 6 日
- ⑫ 三田雅敏, 生殖巣刺激物質(GSS)からリラキシン様生殖腺刺激ペプチド(RGP)へ: ヒトデの生殖腺刺激ホルモン, 日本動物学会第 88 回大会, シンポジウム「ヒトデの生殖生物学 – 1-メチルアデニンの発見から半世紀」, 富山県民会館 (富山), 2017 年 9 月 22 日
- ⑬ 三田雅敏, 片山秀和, ELISA 法によるヒトデ生殖腺刺激ホルモン(リラキシン様生殖腺刺激ペプチド, RGP)の定量, 日本動物学会第 88 回大会, 富山県民会館 (富山), 2017 年 9 月 21 日
- ⑭ Masatoshi Mita, Hormonal action of relaxin-like gonad-stimulating peptide: regulatory mechanism of starfish oocyte maturation and ovulation. 18th International Congress of Comparative Endocrinology, Symposium 6 “Invertebrate sex steroids and peptides”, Lake Louise (Canada), 2017 年 6 月 5 日
- ⑮ Cleidiane Zampronio, Ming Lin, Masatoshi Mita, Michaela Egertová, Alexandra M Jones, Maurice R Elphick, Starfish relaxin-type dimeric peptide cross-linked by disulphide bridges analysed by High Collision Energy (HCD) fragmentation and Stavrox software. 65th Conference on MASS Spectrometry and Allied Topics (ASMS 2017), Indiana Convention Center, Indianapolis (USA), 2017 年 6 月 5 日
- ⑯ Masatoshi Mita, Inhibitory mechanism of L-glutamic acid on spawning of the starfish *Patiria (= Asterina) pectinifera*. 第 41 回日本比較内分泌学会大会, 北里大学相模原キャンパス (神奈川), 2016 年 12 月 10 日
- ⑰ Ming Lin, Masatoshi Mita, Michaela Egertová, Maurice R. Elphick, Cellular localization of relaxin-like gonad-stimulating peptide expression in *Asterias rubens*: new insights into hormonal control of spawning in starfish. The 22nd International Conference of Zoology • The 87th meeting of the Zoological Society of Japan, Okinawa Institute of Science and Technology Graduate University (OIST)/Okinawa Convention Center (OCC), Okinawa (Japan), 2016 年 11 月 17 日
- ⑱ Kazutoshi Yamamoto, Masato Kiyomoto, Hidekazu Katayama, Masatoshi Mita, Radioimmunoassay of relaxin-like gonad-stimulating peptide in the starfish *Patiria (= Asterina) pectinifera*. The 22nd International Conference of Zoology • The 87th meeting of the Zoological Society of Japan, Okinawa Institute of Science and Technology Graduate University (OIST)/Okinawa Convention Center (OCC), Okinawa (Japan), 2016 年 11 月 17 日
- ⑲ Hidekazu Katayama, Masatoshi Mita, Chemical synthesis of sulfanyl-PEG derivative of the echinodermatous relaxin-like peptide useful for antibody production. The 53rd Japanese Peptide Symposium, Kyoto (Japan), 2016 年 10 月 26~28 日
- ⑳ Masatoshi Mita, Species specificity of relaxin-like gonad-stimulating peptides in starfish. 28th Conference of European Comparative Endocrinologists, Symposium 2 “Evolution and Physiology of Neuropeptide”, Leuven (Belgium), 2016 年 8 月 22 日
- ㉑ Ming Lin, Masatoshi Mita, Michaela Egertová, Maurice R. Elphick, Identification, bioactivity and cellular localization of relaxin-like gonad-stimulating peptide in the starfish *Asterias rubens*. 28th Conference of European Comparative Endocrinologists, Leuven (Belgium), 2016 年 8 月 22 日
- ㉒ Masatoshi Mita, Starfish gonadotropic hormone: Relaxin-like gonad-stimulating peptide. The 8th Congress of Asia and Oceania Society for Comparative Endocrinology, Symposium 2 “Evolution and Physiology of Neuropeptides”, Korean University College of Medicine, Seoul (Korea), 2016 年 6 月 22 日
- ㉓ Masatoshi Mita, Hidekazu Katayama, A relaxin-like gonad-stimulating peptide from the starfish *Aphelasterias japonica*. The 8th Congress of Asia and Oceania Society for Comparative

〔図書〕(計 2 件)

- ① **Masatoshi Mita**, (2018) Oogenesis & Ovulation: Oogenesis, final oocyte maturation & ovulation, Echinoderms, In “The Encyclopedia of Reproduction 2nd Edition. Vol. 6. Comparative Reproduction.” (Editor, Michael K. Skinner), pp. 246-250. Elsevier, USA, Book ISBN:978-0-12-811899-3, eBook ISBN:978-0-12-815145-7
- ② **三田雅敏** (2018) ヒトデの生殖生物学 — 生殖巣刺激物質(GSS)からリラキシン様生殖腺刺激ペプチド(RGP)へ, In 比較内分泌学, vol. 44, pp. 76-77. ISSN 1882-6636

〔その他〕

ホームページ等

<https://loop.frontiersin.org/people/653000/bio>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名:三田雅敏

ローマ字氏名:Masatoshi Mita

所属研究機関名:早稲田大学

部局名:理工学術院

職名:その他(招聘研究員)

研究者番号(8桁):50190674

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。