

令和元年6月18日現在

機関番号：74408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07430

研究課題名(和文) ホヤから発見した新規ペプチド、Ci-YFV/Lの生物学的役割の解明

研究課題名(英文) Elucidation of biological roles of novel neuropeptides, Ci-YFV/L, identified in the ascidian, *Ciona intestinalis*

研究代表者

佐竹 炎 (Satake, Honoo)

公益財団法人サントリー生命科学財団・生物有機科学研究所・統合生体分子機能研究部・主幹研究員

研究者番号：20280688

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：Ci-YFV-1, 2, 3, および、Ci-YFLは、ホヤで初めて発見されたペプチドであるが、その生物学的役割は不明である。本研究では、機械学習法によるペプチド受容体相互作用予測、並びに、分子生物学的手法を用いることで、Ci-YFV-1, と-3受容体を決定した。さらに、それらが神経複合体と出水口に共通して発現していることに加え、前者は内柱に、後者は入水口に多く発現していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果により、これまで全く不明だったホヤ特異的な神経ペプチドやペプチドホルモンの生物学的な役割を解明することや、神経系や内分泌系がどのように進化・多様化してきたかをという、生物の本質的な問いに答える研究に展開できることが期待できます。さらに、本研究で開発した機械学習システムを活用することで、ヒトをはじめとする生物に存在する神経ペプチドやペプチドホルモンの受容体を高い確率で、そして、短時間で予測することが可能となり、これまで知られていなかったペプチド受容体の相互作用の法則を解明し、その成果を創薬に応用できます。

研究成果の概要(英文)：Ci-YFV-1, 2, 3, and Ci-YFL are novel *Ciona*-specific neuropeptides. Their cognate receptors and biological roles remained to be elucidated. In this study, we develop an original machine learning system to predict specific interaction between neuropeptides and receptors, and evaluated the predicted results. The cell-based functional assays led to the elucidation of specific receptors for Ci-YFV-1 receptor and Ci-YFV-3 receptors were found to be expressed in the central nervous system and atrial siphon. Furthermore, the former was also expressed specifically in the endostyle, whereas specific expression of the latter was detected in the oral siphon.

研究分野：分子生物学、内分泌学、進化生物学

キーワード：カタユウレイボヤ 神経ペプチド 受容体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

### 【研究の学術的背景】

卵胞成熟は、有性生殖性の生物が種を存続するため、および、生じた変異を次世代へ受け継がせることで、最終的に亜種や新種の生誕、すなわち、生物多様性を形成する上で決定的なステップである。脊椎動物では、「視床下部-下垂体-生殖腺軸」、すなわち、「HPG axis」という卵胞成熟制御機構が広く研究されている。反面、HPG axis が制御しない原始、一次、二次、前卵状卵胞といった初期の成熟制御機構はほとんど不明である。尾索動物の一種、カタコウレイボヤ(以下、ホヤ)は、脊椎動物と共通の祖先から誕生し、脊椎動物と最後に分岐した無脊椎動物であることから、脊椎動物の卵胞成熟機構のプロトタイプを有していると考えられる。近年まで、ホヤの卵胞成熟機構は全くわかっていなかったが、申請者は脊椎動物の神経ペプチドの一種、タキキニンのホヤ同族体、Ci-TK が卵黄形成期後期の卵胞の test 細胞(脊椎動物の顆粒膜細胞に相当)に作用し、卵黄タンパクのプロセッシングを担うプロテアーゼ群を活性化して、その成熟を特異的に促進することを初めて発見し、また、この機構が、これまで不明だった哺乳類の HPG axis 非依存段階である二次卵胞の成長に必須であることを突き止めた(投稿論文準備中)。さらに、ニューロテンシンやコレシストキニンといった他の神経ペプチドのホヤ同族体が制御する卵胞成長機構も明らかにしつつある(投稿論文準備中)。これらの成果と、ホヤは開放血管系であり下垂体ホルモンや HPG axis がそもそも存在しないことから、ホヤから哺乳類まで保存されている機構は神経ペプチドによる HPG axis 非依存段階の卵胞成熟機構であるという、脊索動物門の生命の存続と生殖機能の進化・多様化の本質的な普遍性を立証しつつある。さらに、申請者は、peptidomics 解析でホヤの脳にタキキニン、ニューロテンシン、コレシストキニンなどの脊椎動物の神経ペプチド同族体に加え、いくつかの新規ペプチドを検出している。その中の一つ、Ci-YFV/L は、C 末に Tyr-Phe-Val または-Leu を共有し、一つの前駆体から Ci-YFV-1, 2, 3 と Ci-YFL が生じること、および、Ci-YFV/L 遺伝子は多くの神経細胞のほか、卵巣でも発現していることを明らかにしている。これらの結果は、Ci-YFL/V がホヤの神経ペプチドや卵巣因子として機能していることを示唆している。

## 2. 研究の目的

脊椎動物と最も近縁な無脊椎動物であるホヤは、脊椎動物の卵胞成熟制御機構のプロトタイプとホヤ特異的な機構の双方を有していると考えられる。したがって、ホヤの卵胞成熟機構の解明は、脊索動物全体の卵胞成熟制御機構がいかに進化・多様化したかという内分泌学、生殖生物学、進化生物学上の本質的な問題の解決へのブレイクスルーとなる。近年の申請者の研究により、ホヤ卵胞成長が複数の神経ペプチドによって直接制御されるという全く新しい機構が解明されつつあり、少なくともその一部は、長年未解明だった哺乳類の「視床下部-下垂体-生殖腺軸(HPG axis)」非依存段階の卵胞成熟機構で保存されていることが示された。本研究では、申請者らが全生物を通じて初めてホヤから発見したペプチド、Ci-YFL/V が制御する卵胞成熟機構を体系的に解明し、脊索動物の HPG axis 非依存段階の卵胞成熟機構の多様化を明らかにする道を拓く。

## 3. 研究の方法

### (1) Ci-YFV/L ファミリーホヤ卵胞におけるペプチド受容体の決定

Ci-YFV/L ファミリー受容体候補遺伝子を各培養細胞に発現させ、Ci-YFV-1, -2, -3, および、Ci-YFL 投与下で cAMP 生成促進・抑制や細胞内カルシウム動員を指標にして、受容体を同定する。この段階で、受容体の各ペプチドに対する選択性や活性の強さを決定する。Ci-YFV/L ファミリーペプチドは全て 50 mg 程度合成しており、全ての実験に必要な量を確保している。Ci-YFV/L ファミリー受容体候補遺伝子の選抜には、当研究所で開発した機械学習法に基づくペプチド-受容体ペア *in silico* 予測システムを活用して候補を絞り、従来の「逆薬理学的」手法に基づく受容体の決定よりはるかに効率的に実施する。発現させる培養細胞には HEK293 といった哺乳類由来の培養細胞数種と、Sf9 細胞のような昆虫由来の培養細胞に並行して使用することで、各細胞に特異的に生じ得る発現不調を可能な限り低減する。cAMP や細胞内カルシウムの検出・定量には多検体蛍光光度計、Flex Station II を用いて、実験を最大限に効率化する。

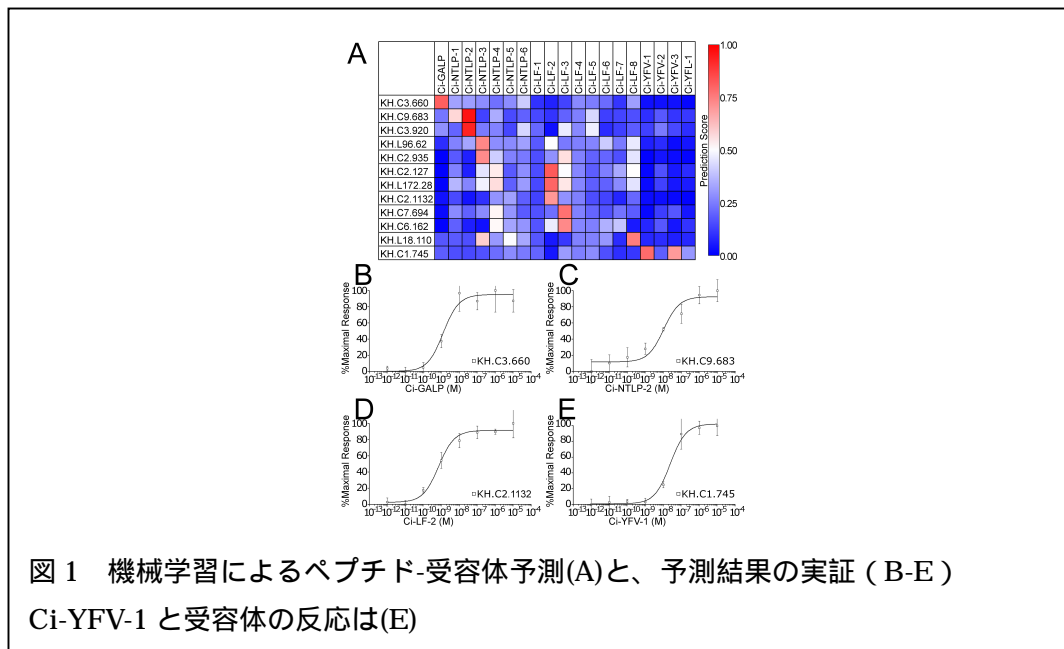
### (2) 同受容体の発現部位の特定

(1)で同定した受容体遺伝子についてリアルタイム PCR を行い、発現部位を特定する。

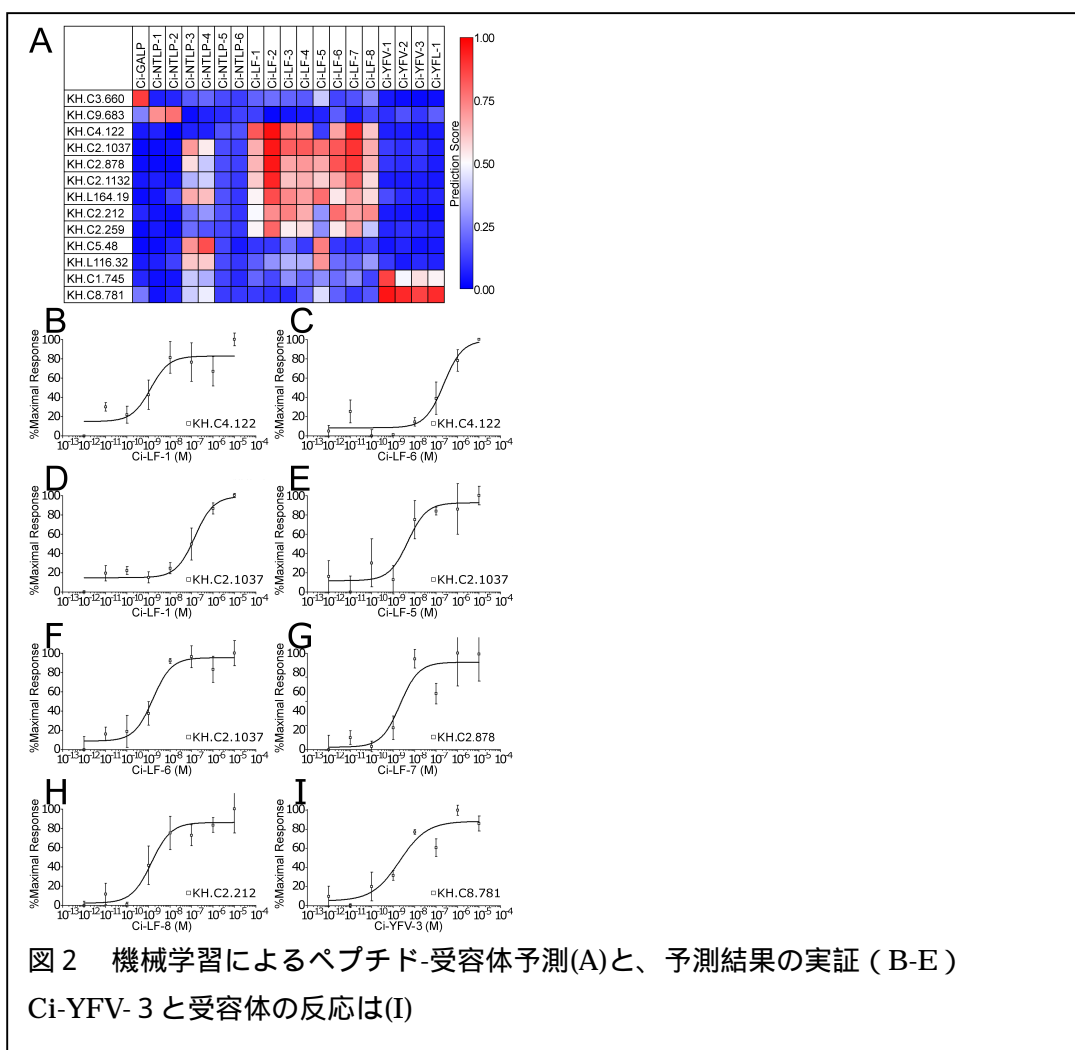
## 4. 研究成果

(1) ペプチドと GPCR を記述子化し、既知のペプチドと GPCR のペア(1352 ペア)を機械学習システムである SVM に入力した。次に、Ci-YFV/L ファミリーを含むホヤ特異的なペプチド(19 種類)と全 GPCR (160 種類)について、相互作用予測を行った。その結果、19 個のペプチド受容体のペアを予測できた。そのうち、相互作用する確率が 70% を超えるものについて、受

容体を Sf9 細胞に発現させ、予測結果に従い、リガンド候補であるペプチドを投与して、細胞内カルシウム動員を指標に反応性を評価した。その結果、Ci-YFV-1 をはじめとする 4 種類のペプチドの受容体を決定できた ( 図 1 )



これらの結果を SVM にフィードバックして、再度予測を行った。



その結果、Ci-YFV-3 を含み、新たに 8 個の新規ペプチド 受容体ペアを決定できた( 図 2 )。以上より、Ci-YFV-1 と-3 の受容体を決定することができた。

(2) 上述したように、機械学習によるペプチド 受容体予測とその実証により同定した受容体について、各組織における受容体の発現をリアルタイム PCR で確認した( 図 3 )。

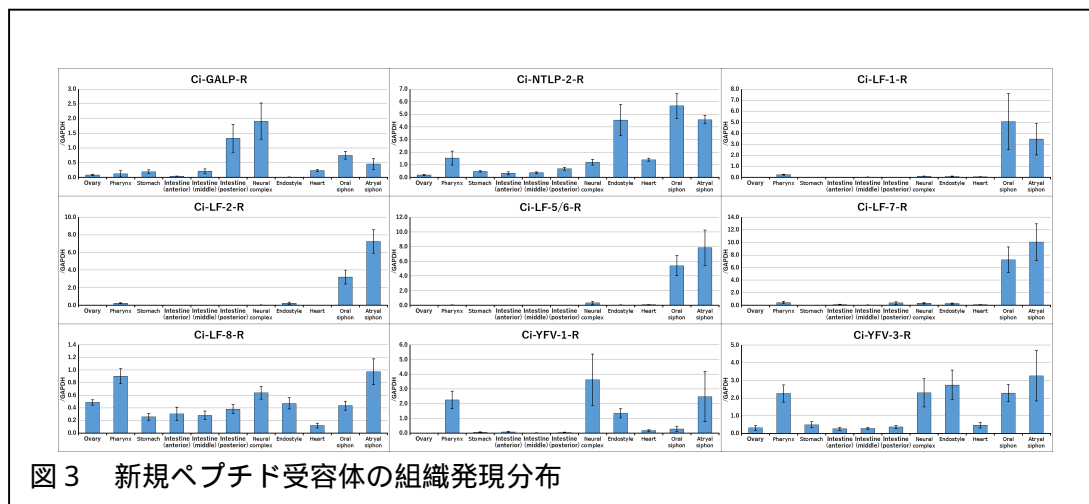


図 3 新規ペプチド受容体の組織発現分布

これらの結果から、Ci-YFV-1 は神経複合体や入水口、卵巣に発現していることが明らかになった。

## 5 . 主な発表論文等

[ 雑誌論文 ] ( 計 7 件 )

1. Shiraishi A, Okuda T, Miyasaka N, Osugi T, Okuno Y, Inoue J, **Satake H.** (2019) “Repertoires of G protein-coupled receptors for *Ciona*-specific neuropeptides.” *Proc Natl Acad Sci U S A.* **116(16)**, 7847-7856.
2. Satoh T, Iitsuka T, Shiraishi A, Hozumi A, **Satake H.**, Sasakura Y. (2018) “piRNA-like small RNAs are responsible for the maternal-specific knockdown in the ascidian *Ciona intestinalis* Type A.” *Sci Rep.* **8(1)**, 5869.
3. Kurihara M, Otsuka K, Matsubara S, Shiraishi A, **Satake H.**, Kimura AP. (2017) “A Testis-Specific Long Non-Coding RNA, lncRNA-Tcam1, Regulates Immune-Related Genes in Mouse Male Germ Cells.” *Front Endocrinol.* **8**, 299.
4. Matsubara S, Shiraishi A, Sakai T, Okuda T, **Satake H.** (2017) “Heterodimerization of the prostaglandin E2 receptor EP2 and the calcitonin receptor CTR.” *PLOS One.* **12(11)**, e0187711.
5. Osugi T, Sasakura Y, **Satake H.** (2017) “The nervous system of the adult ascidian *Ciona intestinalis* Type A (*Ciona robusta*): Insights from transgenic animal models.” *PLOS One.* **12(6)**, e0180227.
6. Kawada T, Shiraishi A, Aoyama M., **Satake H.** (2017). “Transcriptomes of the premature and mature ovaries of an ascidian, *Ciona intestinalis*.” *Front. Endocrinol.* **8**, 88.

7. Sekiguchi T, Shiraishi A, **Satake H**, Kuwasako K, Takahashi H, Sato M, Urata M, Wada S, Endo M, Ikari T, Hattori A, Srivastav AK, Suzuki N. (2017) “Calcitonin-typical suppression of osteoclastic activity by amphioxus calcitonin superfamily peptides and insights into the evolutionary conservation and diversity of their structures.” *Gen. Comp. Endocrinol.* **246**, 294-300

〔学会発表〕(計 1 件)

1. Satake H. (Invited lecture, State-of-Art) PEPTIDERGIC REGULATION OF FOLLICLE MATURATION AND OVULATION IN A PROTOCHORDATE, *CIONA INTESTINALIS*. 18th International Congress of Comparative Endocrinology (ICCE18), Lake Louise (Canada), Jun. 4-9, 2017.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：白石慧、大杉知裕

ローマ字氏名：Akira Shiraishi, Tomohiro Osugi

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。