

令和 4 年 5 月 12 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06740

研究課題名（和文）ホヤ血球による金属運搬と被囊接着機構に関する形態学および機能解析

研究課題名（英文）Morphological and functional analysis of metal transport by blood cells and tunic adhesion mechanism in ascidians

研究代表者

植木 龍也 (Ueki, Tatsuya)

広島大学・統合生命科学研究科（理）・准教授

研究者番号：10274705

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：海産無脊椎動物ホヤ類は海水中で基質に強固に接着するという性質と、血球中に高濃度の金属イオンを蓄積する性質をもつ。血球に蓄積された金属の役割はまったく不明であったが、申請者らは最近の知見にもとづき、ホヤ血球が被囊の接着面まで金属を運搬し、かつ、金属結合タンパク質が接着に寄与するのではないかとこの学術的な問いを設定した。本研究では2019年から2021年までの3年間の研究期間で、ホヤ被囊の形成・接着過程における血球移動経路の解明とCa²⁺イメージング、二価金属輸送タンパク質および接着タンパク質の*in vitro*機能解析、それら遺伝子の*in vivo*機能破壊解析を実施した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

(1)ホヤによる高度なV濃縮は、約100年前に発見されて以来、生物学と化学の学際領域の研究テーマとして注目されてきた。本研究は蓄積されたバナジウムの役割の解明にせまるものである。(2)イガイとフジツボの接着機構は金属タンパク質および修飾アミノ酸の関与が示唆されており、本研究の成果と結びつく。(3)ホヤ血球が金属運搬の役割をもつことは、既に知られている免疫や酸素運搬に加えて動物の血球の新たな役割を提示することになり、ホヤ以外の動物にも学術的に波及すると期待される。(4)本研究の成果は金属によって制御される高機能な新規接着物質の開発に波及すると期待される。

研究成果の概要（英文）：Marine invertebrate ascidians have the property of firmly adhering to the substrate in seawater and the property of accumulating high concentrations of metal ions in blood cells. The function of the metal accumulated in the blood cells was not well unknown. Based on recent findings, we set academic questions that "the sea squirt blood cells carry the metal to the adhesive surface of the tunic" and that "the metal-binding protein contributes to the adhesion". Within a three-year study period 2019 to 2021, we carried out elucidation of blood cell migration pathway and Ca²⁺ imaging in the process of formation and adhesion of tunic, *in vitro* functional analysis of divalent metal ion transporters and adhesive proteins, and *in vivo* functional analysis on these genes.

研究分野：分子生理学

キーワード：ホヤ 金属イオン タンパク質 血球 接着

1. 研究開始当初の背景

海産無脊椎動物ホヤ類は、セルロースを主成分とする被囊(ひのう)と呼ばれる構造で体全体を覆っている。被囊は体の外にある部分で、節足動物のクチクラにも似ているが、大きな違いがある。それは被囊の中に生きた細胞が散在し、被囊と体腔の間を血球が行き来することである。すなわちホヤの被囊は動的平衡状態の生きた組織である。被囊の役割は、外骨格として体を支え防御することと、水中の岩などの基質に接着することの二つである。申請者らは約20年にわたってホヤの血球における金属バナジウム(V)の濃縮機構を研究してきたが、ここ数年、被囊の接着メカニズムにも興味を持ち、並行して研究を進めている。

血球に蓄積された金属バナジウムの役割はまったく不明であったが、最近、申請者らは(1)ホヤ血球のトランスクリプトーム解析において刺激応答性 Ca^{2+} チャネルが高頻度に検出されること、(2) Ca^{2+} 流入によって血球中に蓄積された金属が放出されること、(3)基質と接着する部位はV濃度が高いことを見出した。さらに、被囊の接着部位の形態および元素分析の結果から、(4)バナジウム濃縮細胞は被囊接着面に到達していること、(5)接着部位には金属イオンが高度に蓄積することを見出した。さらに最近の研究で、(6)接着部位のプロテオーム解析において、特異的に検出される金属タンパク質を見出した。

2. 研究の目的

以上の知見から、本研究ではホヤ血球が被囊の接着面まで金属を運搬しかつ金属結合タンパク質が接着に寄与するのではないかととの学術的な問いを設定した。

ホヤにおける接着と Ca^{2+} シグナリングおよび金属結合タンパク質を結びつけた研究はこれまでになく、まったく新しい発想であり学術的独自性は高い。形態学、生理学、生化学、さらには生物無機化学にまたがる学際的で意欲的な研究で、独創性が高い。

3. 研究の方法

本研究では3年間の研究期間で、以下の5項目を実施した。主な研究材料としては、代表的なバナジウム濃縮種であるスジキレボヤを用いた。V輸送および接着関連タンパク質として血球から同定した二価金属輸送体 Ferroportin と被囊接着部位で同定した von Willebrand factor type-A (vWFA)遺伝子を主な研究対象とした。

(1)ホヤ被囊の形成・接着過程における血球の観察

スジキレボヤの血球および鰓と被囊から取り出した血球様細胞に対して2,2'-bipyridine 飽和溶液を適量添加し、光学顕微鏡による観察を行った。1~10 μ Mの濃度で蛍光色素を添加し、20 でインキュベートした。1時間後に蛍光顕微鏡による観察を行った。

(2)ホヤ被囊の形成過程における血球の Ca^{2+} イメージング

スジキレボヤの血球および鰓と被囊から取り出した血球様細胞に対して1~10 μ Mの濃度で蛍光色素を添加し、20 でインキュベートした。1時間後に蛍光顕微鏡による観察を行った。

(3)遺伝子・タンパク質の発現部位の解析

スジキレボヤの各組織・器官および接着部位からRNAを抽出しdTプライマーを用いて逆転写を行った。特異的プライマーを用いてPCRを行い、アガロースゲル電気泳動によって定量した。PCRサイクル数は遺伝子毎に最適化した。

スジキレボヤの各組織・器官および接着部位からタンパク質を抽出した。各タンパク質の部分アミノ酸配列を合成してウサギに免疫し、抗血清を得た。IgG画分を精製し、常法に従って免疫染色およびウェスタンブロットを行った。

(4)接着タンパク質候補分子の *in vitro* 機能解析

大腸菌発現系を用いて各遺伝子の組換えタンパク質を作成し、金属固定化アフィニティカラム法によって金属結合能を調べた。ガラスおよび各種プラスチック片を用いて組換えタンパク質の接着力の検定を行った。

(5)遺伝子機能阻害による *in vivo* 機能解析

各遺伝子に対するshRNAベクターを設計し、ベクター構築を行った。アクチンおよびEF-1 α プロモーター支配下でのGFP発現と、U6プロモーター支配下でのshRNA発現を行う設計にした。ホヤ受精卵および血球へのエレクトロポレーション、蛍光顕微鏡およびRT-PCRによる発現の確認を行った。(3)の抗体を用いた接着阻害実験を行った。

4. 研究成果

(1) ホヤ被囊の形成・接着過程における血球の観察

スジキレボヤ被囊の形成・接着過程において血球様の細胞は観察されたが、2,2'-bipyridine 染色性は非常に弱く V 含有細胞の移動の可視化は困難であった。2,2'-bipyridine の細胞透過性を増すために Influx pinocytic cell loading kit を使用したところ鰻の血球様細胞は染色性が向上したが被囊の形成・接着過程における細胞の染色性は大きく変わらなかった。

Fe²⁺プローブ FerroOrange および Zn²⁺プローブ FluoZin-3-AM による V³⁺の検出を試みたところ、FluoZin-3-AM によって血球の一部が染まった。しかしながら退色が激しく、血球の追跡は困難であった。感度向上と退色防止の技術的解決が必要である。

(2) ホヤ被囊の形成過程における血球の Ca²⁺イメージング

細胞透過性 Ca²⁺プローブ CalciumGreen および Fluo8-AM を用いてスジキレボヤ血球および被囊形成・接着過程における血球様の細胞の観察を行った。蛍光顕微鏡で観察した限りでは有意な染色は認められなかった。カルシウムイオノフォア処理および pH 調整も試みたが有意な変化は認められなかった。

(3) 遺伝子・タンパク質の発現部位の解析

Ferroportin 遺伝子の転写産物は血球でのみ発現が検出された(図1)。vWFA 遺伝子の転写産物は血球と筋肉で発現が検出され、被囊では接着部位および接着突起において検出された(図2)。ユニバーサル遺伝子コントロールのβ-actin はすべての組織で、血球特異的コントロールの Vanabin2 遺伝子は血球のみで発現が認められた。

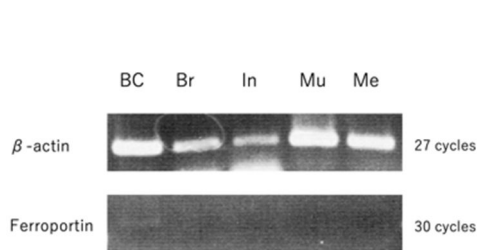


図1. スジキレボヤ成体におけるFerroportin遺伝子発現部位のRT-PCR解析結果

BC: 血球、Br: 鰓、In: 腸、Mu: 筋膜体、Me: 間充織

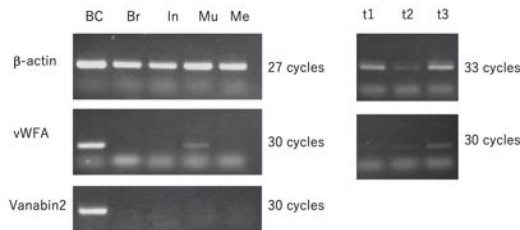


図2. スジキレボヤ成体および接着部位におけるvWFA遺伝子発現部位のRT-PCR解析結果

BC: 血球、Br: 鰓、In: 腸、Mu: 筋膜体、Me: 間充織
t1: 被囊非付着部位、t2: 接着突起、t3: 接着部位

スジキレボヤ血球に対する免疫染色の結果、Ferroportin タンパク質はシグネットリング細胞およびコンパートメント細胞、ジャイアント細胞において検出された。vWFA タンパク質はコンパートメント細胞において強く検出された(図3)。

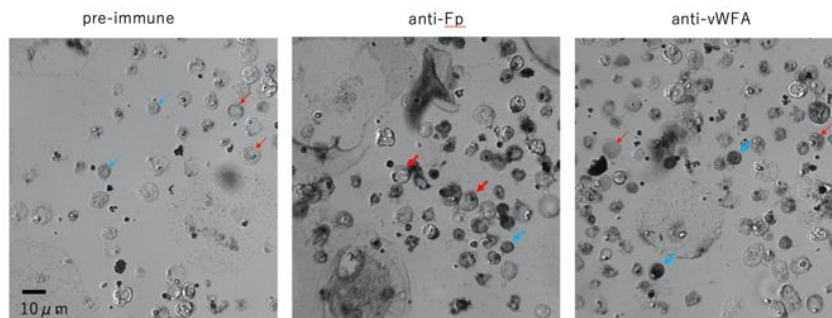


図3. スジキレボヤ血球におけるFerroportinおよびvWFAタンパク質の免疫染色結果

赤矢印: シグネットリング細胞 (バナジウム濃縮細胞)、青矢印: コンパートメント細胞

スジキレボヤ接着部位に対する免疫染色の結果、vWFA タンパク質は被囊外側の分泌物において強く検出された(図4)。このタンパク質が接着に寄与している可能性が示唆された。

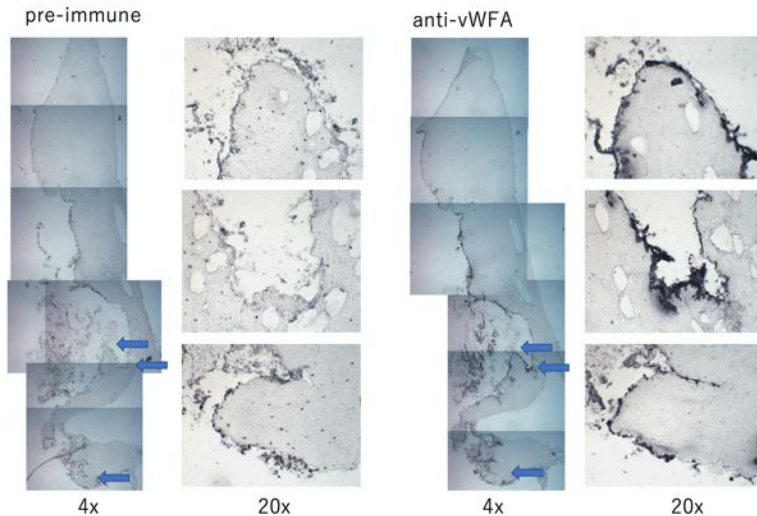


図4. スジキレボヤ接着部位におけるvWFAタンパク質の免疫染色結果
青矢印の部位をそれぞれの右に拡大

(4)接着タンパク質候補分子の *in vitro* 機能解析

組換え vWFA タンパク質を用いた金属結合アッセイの結果、 Zn^{2+} と強く、 VO^{2+} と弱く結合した(図5)。ガラスおよび各種プラスチック片に対する接着アッセイにおいては、金属添加の有無によらず有意な接着能は認められなかった。機能発現には vWFA 単独ではなく相互作用タンパク質の寄与が必要である可能性が考えられた。

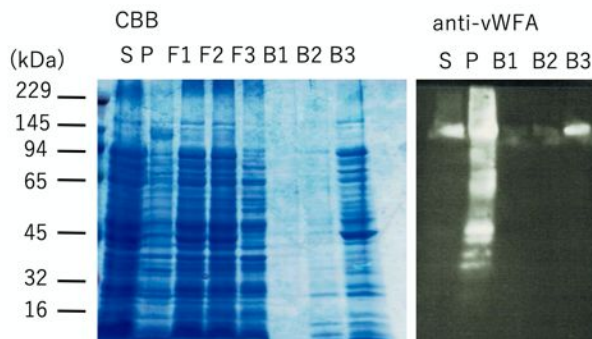


図5. 大腸菌で発現したvWFAタンパク質の可溶化と金属結合能

S: 2% Tween20 可溶性画分、F:非結合画分、B:結合画分

1: コントロール、2: VO^{2+} 、3: Zn^{2+}

(5)遺伝子機能阻害による *in vivo* 機能解析

vWFA 遺伝子の機能阻害実験では、とくに顕著な表現型は認められなかった。コンストラクトの設計変更や遺伝子導入手法の改良が必要である。特異的抗体を用いた接着阻害実験においては有意な影響は認められなかった。

(6)ミズクラゲおよび両生類の接着機構に関する結果

比較対象としてミズクラゲのポリプに特徴的なタンパク質の LC-MS 解析を行い、接着タンパク質候補分子を同定した。RT-PCR および特異的抗体による発現部位の解析を進めている(投稿準備中)。両生類の皮膚から分泌される接着物質について論文発表を行った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Sekiguchi Takeshi, Ishii Takashi, Kobayashi Hideki, Furuno Nobuaki	4. 巻 547
2. 論文標題 WDR35 is involved in subcellular localization of acetylated tubulin in 293T cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 169 ~ 175
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.01.092	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 Nakajima Keisuke, Shimamura Masaki, Furuno Nobuaki	4. 巻 250
2. 論文標題 Generation of no-yellow-pigment <i>Xenopus tropicalis</i> by <i>slc2a7</i> gene knockout	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Developmental Dynamics	6. 最初と最後の頁 1420 ~ 1431
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/dvdy.334	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 Sekiguchi Takeshi, Ishii Takashi, Kamada Yoshiaki, Funakoshi Minoru, Kobayashi Hideki, Furuno Nobuaki	4. 巻 598
2. 論文標題 Involvement of Gtr1p in the oxidative stress response in yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 107 ~ 112
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.02.016	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 Kakehashi, Ryosuke, Hemmi Keitaro, Landman, Willem, Furuno, Nobuaki, Preez, Lous Du, Minter, Leslie and Kurabayashi Atsushi	4. 巻 58
2. 論文標題 Better than mere attraction - adhesive properties of the skin secretion in the common rain frog, <i>Breviceps adspresus</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Salamandra, German Journal of Herpetology	6. 最初と最後の頁 43-51
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 該当する

1. 著者名 S. Nagorny, M. Ferrante, M. Laubenstein, S. Nisi, T. Ueki.	4. 巻 225
2. 論文標題 Characterization of vanadium of biological origin for possible applications in physics experiments.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Environmental Radioactivity	6. 最初と最後の頁 106426
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jenvrad.2020.106426	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 A. Arimoto, T. Hikosaka-Katayama, A. Hikosaka, K. Tagawa, T. Inoue, T. Ueki, M. Yoshida, M. Kanda, E. Shoguchi, K. Hisata, N. Satoh.	4. 巻 8
2. 論文標題 Symbiotic bacteria associated with ascidian vanadium accumulation identified by 16S rRNA amplicon sequencing.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Gigascience	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5524/100564	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 -

1. 著者名 T. Ueki, A. Arimoto, K. Tagawa, N. Satoh.	4. 巻 36
2. 論文標題 Xenacoelomorph-specific Hox peptides: Insights into the phylogeny of acoels, nemertodermatids, and xenoturbellids.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Zoological Science	6. 最初と最後の頁 395-404
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2108/zs190045	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 -

1. 著者名 T. Ueki, Tri K. A.	4. 巻 2120
2. 論文標題 Mechanism of vanadium accumulation and possible function of vanadium in underwater adhesion in ascidians.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 AIP Conference Proceedings	6. 最初と最後の頁 20001
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1063/1.5115602	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16件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 植木龍也
2. 発表標題 スジキレボヤの接着部位に局在するvWFAタンパク質の発現と金属結合能
3. 学会等名 日本動物学会第90回大阪大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤井しゃら、佐藤卓至、黒川量雄、白江麻貴、植木龍也、トリ・クストノ・アジ、稲葉諒多、佐藤明子
2. 発表標題 多様な生物種におけるゴルジ体とREの関係性
3. 学会等名 日本動物学会第90回大阪大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 関口猛、古野伸明、小林英紀
2. 発表標題 Ragファミリータンパク質とWDR35との相互作用
3. 学会等名 第9回TOR研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 関口猛、古野伸明、石井建士、小林英紀
2. 発表標題 Ragファミリータンパク質とWDR35/IFT121との相互作用
3. 学会等名 第42回分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 系統の離れたカエル亜目 2 種における指第一関節に見られる挿入骨格要素の発生過程
2. 発表標題 中西健介、長谷川真、竹尾紘一、古野申明、田澤一朗
3. 学会等名 第91回日本動物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉村雅子、田澤一朗、古野 申明
2. 発表標題 イペリアトゲイモリにおける仙腸関節形成メカニズムの研究
3. 学会等名 令和3年度公益社団法人日本動物学会 中国四国支部広島県例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藪本壮太、中島圭介、古野申明
2. 発表標題 ネットアイツメガエルにおける olfm4 遺伝子のK0による機能解析
3. 学会等名 令和3年度日本動物学会中国四国支部広島県例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 植木龍也
2. 発表標題 深層学習によるホヤ類被囊外部形態の画像認識サーバーの構築
3. 学会等名 日本動物学会第91回オンライン大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 植木龍也
2. 発表標題 スジキレボヤvWFAタンパク質の接着部位への局在と接着能力
3. 学会等名 2021年度中国四国地区生物系三学会合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 仁ノ内唯、森下文浩、今村拓也、植木龍也
2. 発表標題 スジキレボヤの鰓におけるバナジウムの取り込みと共生細菌の関係
3. 学会等名 2021年度中国四国動物生理シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 植木 龍也、Tri Kustono Adi、森下 文浩、今村 拓也
2. 発表標題 スジキレボヤVanabinXのバナジウム還元促進活性
3. 学会等名 令和3年度日本動物学会中国四国支部広島県例会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 T. Ueki, Tir K. A., Romaidi	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Bentham Books	5. 総ページ数 281
3. 書名 Monitoring Artificial Materials and Microbes in Marine Ecosystems: Interactions and Assessment Methods" edited by Toshiyuki Takahashi	

〔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 分 担 者	古野 伸明 (Furuno Nobuaki) (80219120)	広島大学・両生類研究センター・准教授 (15401)	

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			
イタリア	国立物理核研究所			
インドネシア	国立イスラム大学マラーン校			