

令和 4 年 8 月 30 日現在

機関番号：74408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06752

研究課題名(和文) ホヤの新規神経ペプチド、Ci-LF8による卵胞成長制御機構の解明

研究課題名(英文) Biological roles of Ci-LF8, a novel Ciona-specific neuropeptide, on the regulation of ovarian follicle development

研究代表者

佐竹 炎 (Honoo, Satake)

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：これまでに、研究代表者らは、脊索動物の一種、カタユレイボヤから種特異的ペプチド、CiLF8を発見している。また、同ペプチドの特異的受容体である、CiLF8-Rを決定している。しかし、CiLF8の生理機能は不明である。本研究では、CiLF8-Rがホヤの未卵黄形成期の卵細胞に発現していること、同卵細胞にCiLF8を加えると、多くの非コードRNAの発現が変動することを見出した。したがって、CiLF8は未卵黄形成期の卵細胞の成長に関与していると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、カタユレイボヤの種特異的なペプチドであるCi-LF8の卵胞における生理機能を明らかにすることで、これまで不明だったカタユレイボヤの卵胞の成長成熟機構の一端を解き明かすものである。脊索動物門における卵胞の成長制御機構の共通性と多様性、すなわち、進化の過程を分子レベルで解明していく突破口となる。今後は、他のペプチドの作用と統合することで、ホヤの卵胞成長成熟機構の全容の解明を明らかにしていく。

研究成果の概要(英文)：Previously, we identified a novel Ciona-specific neuropeptide, CiLF-8, and its cognate receptor, CiLF8-R. However, its biological role remains to be elucidated. In this study, we revealed that CiLF8-R is localized to pre-vitellogenic oocytes. Moreover, RNA-seq for CiLF8-treated and untreated oocytes demonstrated that CiLF8 regulated a variety of non-coding RNAs. These results suggest that CiLF8 is involved in the growth of pre-vitellogenic oocytes.

研究分野：内分泌学、比較内分泌学、進化生物学

キーワード：ペプチド GPCR カタユレイボヤ 卵胞 成長

1. 研究開始当初の背景

卵胞の成長・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 (HPG axis) による卵胞成熟制御機構が広く研究されている。一方、脊椎動物の姉妹群である尾索動物の一種、カタウレイボヤ (以下、ホヤ) をはじめとする無脊椎動物は、HPG axis、下垂体ホルモン、循環器系を獲得しておらず、卵巣は中枢神経の支配を直接受けていることから、神経ペプチドが主に卵胞の成長や成熟を担っていると考えられる。事実、申請者らの研究により、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 stage-II (卵黄形成期) 後期卵胞の成長を促進することが明らかになった。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も突き止めた (投稿論文準備中)。さらに、ホヤのバソプレッシン同族体が卵成熟や排卵誘導に必須であることも明らかにした (投稿論文準備中)。しかし、ホヤ卵胞にはまだ多くの受容体が確認されているので、ホヤ卵胞成長成熟機構には、さらに多数の因子が重要な役割を果たしていると考えられる。

Peptide	Peptide Sequence
Ci-LF1	FQSLF
Ci-LF2	YPGFQGLF
Ci-LF3	HNPPLPDLF
Ci-LF4	YNSMGLF
Ci-LF5	SPGMLGLF
Ci-LF6	SDARLQGLF
Ci-LF7	YPNFQGLF
Ci-LF8	GNLHSLF

Ci-LF は、申請者らによるホヤ中枢神経の peptidomics 解析で同定した、C 末に Leu-Phe を共通配列として有する新規ペプチドである。これらは 8 種存在し (表 1)、全て一つの前駆体から生成される。また、ごく最近、申請者らは各 Ci-LF の特異的受容体も決定している。その中の一つ、Ci-LF8 の受容体は、他の Ci-LF 受容体や別の神経ペプチド受容体 Ci-YFL/V 受容体 (YFV1-R, YFV3-R) などと異なり、卵巣で強く発現していることを RNA-seq 解析で突き止めた。これらの結果は、Ci-LF8 がホヤ卵胞成長の制御に重要な役割を果たしていることを示唆している。

2. 研究の目的

以上の学術的背景から、申請者は、内分泌学的手法、分子生物学的手法、トランスクリプトーム比較解析を駆使して、Ci-LF8 受容体の卵巣内における局在の決定、Ci-LF8 受容体のゲノム編集体の作製、ホヤ卵胞で各ペプチドが制御する遺伝子群の同定とその局在の決定、各ペプチドの上記遺伝子群発現制御を介した卵胞への作用の形態学的評価を行い、得られる結果を統合して、Ci-LF8 が制御する卵胞成熟機構を体系的に解明することを目的とした。

3. 研究の方法

ホヤ卵胞における Ci-LF8 受容体の局在の決定

Ci-LF8 受容体の卵巣切片や申請者らが開発した手法で各成長段階に分画したホールマウントの卵胞 (図 2) における発現分布を *in situ* hybridization で決定する。*in situ* hybridization を行った切片やホールマウント卵胞観察には共焦点蛍光レーザー顕微鏡や実体蛍光顕微鏡を用いた。

TALEN 法によるホヤ Ci-LF8 受容体ゲノム編集体の作製

笹倉らが開発したホヤの TALEN 法 (Sasakura et al. *Methods Mol Biol.* **1630**, 235-245, 2017) を用いて、Ci-LF8 受容体を不活性化したゲノム編集体を作製する。得られたゲノム編集体の遺伝子発現プロファイリングを RNA-Seq で確認し、成長や組織の形態、特に、卵巣や卵胞の形態を野生型と詳細に比較検討する。この実験は、2020 年度にわたって実施する。

Ci-LF8 が制御する遺伝子とその機能の同定

で決定した受容体を発現している段階の卵胞を摘出し、Ci-LF8 で処理後、次世代シーケンサーを利用したトランスクリプトーム (RNA-seq) 比較解析を行い、さらに得られた解析結果をリアルタイム PCR で検証して Ci-LF8 で発現が制御される遺伝子を検出した。RNA-Seq に Hi-Seq 1500 (ハイスループットは 300 Gb) による解析を行った。さらに、遺伝子変動を経時的に追跡し時間的な発現プロファイルも決定する。変動遺伝子が多数検出された場合、発現変動が大きいものや、他のホヤ神経ペプチド受容体遺伝子を優先して研究を行い、ペプチドによる卵胞成長制御ネットワークの解明の効率化を図った。また、ここで特定された遺伝子についても *in situ* hybridization を行う。

4. 研究成果

Ci-LF8 受容体遺伝子に対して、卵胞で *in situ* hybridization を行った。その結果、同遺伝子は卵胞の中で、未卵黄形成期 (stage I) の卵細胞に多く発現していることが示された。

Ci-LF8 投与により変動する遺伝子の検出

Ci-LF8 で処理した卵巣から Stage-I の卵胞を分画して、RNA-seq により、非処理のものと同遺伝子発現を解析した。その結果、多くの短い非コード RNA の発現の変動が見られた。また、細胞増殖や分化に関与すると言われているキナーゼや脂質代謝酵素の発現が上昇することが GO 解析により判明した。また、リアルタイム PCR によりこれらの遺伝子の詳しいアノテーションを実施中である (図 1)。

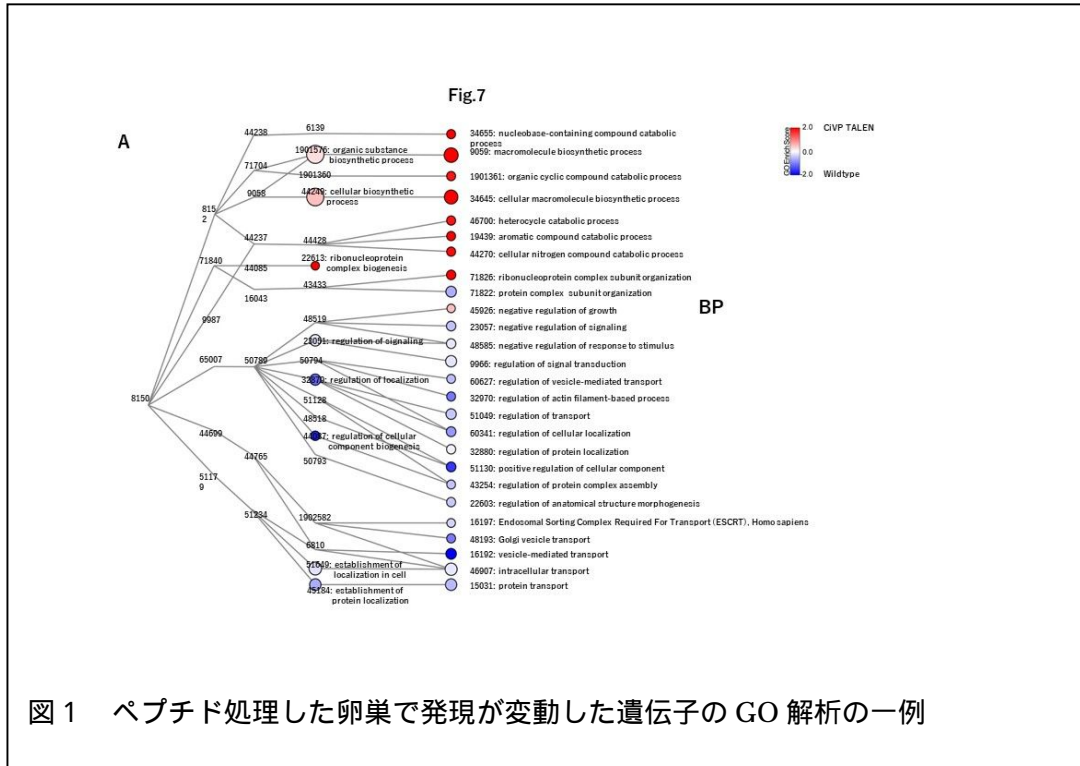


図 1 ペプチド処理した卵巣で発現が変動した遺伝子の GO 解析の一例

また、これらの遺伝子と Ci-LF8 受容体との共存性も現在確認中である。今後は、Ci-LF8 投与によりどのような形態が変化をするか、もしくは、アポトーシスや分化マーカーが変動するかを調べ、ホヤの卵胞成長成熟機構 (図 2) にどのように関わっているかを明らかにする。

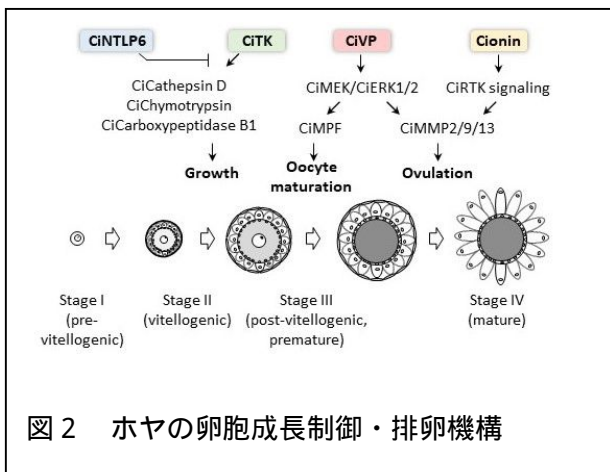


図 2 ホヤの卵胞成長制御・排卵機構

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計17件（うち査読付論文 17件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 11件）

1. 著者名 Matsuo Ryota, Kobayashi Suguru, Furuta Arisa, Osugi Tomohiro, Takahashi Toshio, Satake Honoo, Matsuo Yuko	4. 巻 206
2. 論文標題 Distribution and physiological effect of enterin neuropeptides in the olfactory centers of the terrestrial slug <i>Limax</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Comparative Physiology A	6. 最初と最後の頁 401 ~ 418
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00359-020-01400-2	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 Osugi Tomohiro, Sasakura Yasunori, Satake Honoo	4. 巻 10
2. 論文標題 The ventral peptidergic system of the adult ascidian <i>Ciona robusta</i> (<i>Ciona intestinalis</i> Type A) insights from a transgenic animal model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1892
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-58884-w	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 Hozumi Akiko, Matsunobu Shohei, Mita Kaoru, Treen Nicholas, Sugihara Takaho, Horie Takeo, Sakuma Tetsushi, Yamamoto Takashi, Shiraishi Akira, Hamada Mayuko, Satoh Noriyuki, Sakurai Keisuke, Satake Honoo, Sasakura Yasunori	4. 巻 30
2. 論文標題 GABA-Induced GnRH Release Triggers Chordate Metamorphosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 1555 ~ 1561.e4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cub.2020.02.003	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 Bandara Thusitha A.M.K., Otsuka Kai, Matsubara Shin, Shiraishi Akira, Satake Honoo, Kimura Atsushi P.	4. 巻 534
2. 論文標題 A dual enhancer-silencer element, DES-K16, in mouse spermatocyte-derived GC-2spd(ts) cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1007 ~ 1012
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.10.049	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 Sakai Tsubasa, Yamamoto Tatsuya, Matsubara Shin, Kawada Tsuyoshi, Satake Honoo	4. 巻 21
2. 論文標題 Invertebrate Gonadotropin-Releasing Hormone Receptor Signaling and Its Relevant Biological Actions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 8544 ~ 8544
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21228544	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 Mita Masatoshi, Matsubara Shin, Osugi Tomohiro, Shiraishi Akira, Wada Azumi, Satake Honoo	4. 巻 15
2. 論文標題 A novel G protein-coupled receptor for starfish gonadotropic hormone, relaxin-like gonad-stimulating peptide	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0242877
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0242877	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 Mita Masatoshi, Osugi Tomohiro, Matsubara Shin, Kawada Tsuyoshi, Satake Honoo, Katayama Hidekazu	4. 巻 88
2. 論文標題 A relaxin like gonad stimulating peptide identified from the starfish <i>Astropecten scoparius</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 34 ~ 42
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mrd.23444	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 Matsubara Shin, Shiraishi Akira, Osugi Tomohiro, Kawada Tsuyoshi, Satake Honoo	4. 巻 10
2. 論文標題 Fractionation of Ovarian Follicles and in vitro Oocyte Maturation and Ovulation Assay of <i>Ciona intestinalis</i> Type A	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BIO-PROTOCOL	6. 最初と最後の頁 e3577
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21769/BioProtoc.3577	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 Shiraishi Akira, Okuda Toshimi, Miyasaka Natsuko, Osugi Tomohiro, Okuno Yasushi, Inoue Jun, Satake Honoo	4. 巻 116
2. 論文標題 Repertoires of G protein-coupled receptors for Ciona-specific neuropeptides	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 7847 ~ 7856
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1816640116	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 Nagasawa Kazue, Matsubara Shin, Satake Honoo, Osada Makoto	4. 巻 282
2. 論文標題 Functional characterization of an invertebrate gonadotropin-releasing hormone receptor in the Yesso scallop Mizuhopecten yessoensis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 General and Comparative Endocrinology	6. 最初と最後の頁 113201 ~ 113201
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ygcen.2019.06.005	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 Tera Masayuki, Koyama Tomotsugu, Murata Jun, Furukawa Ayako, Mori Shoko, Azuma Toshiaki, Watanabe Takehiro, Hori Katsuhito, Okazawa Atsushi, Kabe Yasuaki, Suematsu Makoto, Satake Honoo, Ono Eiichiro, Horikawa Manabu	4. 巻 9
2. 論文標題 Identification of a binding protein for sesamin and characterization of its roles in plant growth	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8631
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-45003-7	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 Aoyama Masato, Shiraishi Akira, Matsubara Shin, Horie Kaoru, Osugi Tomohiro, Kawada Tsuyoshi, Yasuda Keiko, Satake Honoo	4. 巻 10
2. 論文標題 Identification of a New Theca/Interstitial Cell-Specific Gene and Its Biological Role in Growth of Mouse Ovarian Follicles at the Gonadotropin-Independent Stage	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Endocrinology	6. 最初と最後の頁 553
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fendo.2019.00553	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 Matsubara Shin, Shiraishi Akira, Osugi Tomohiro, Kawada Tsuyoshi, Satake Honoo	4. 巻 8
2. 論文標題 The regulation of oocyte maturation and ovulation in the closest sister group of vertebrates	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e49062
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.49062	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 Satake Honoo, Larhammar Dan, Elphick Maurice R.	4. 巻 10
2. 論文標題 Editorial: Endocrine and Neuroendocrine Systems of Invertebrate Deuterostomes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Endocrinology	6. 最初と最後の頁 755
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fendo.2019.00755	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 Yamashiro Takanori, Shiraishi Akira, Satake Honoo, Nakayama Koji	4. 巻 9
2. 論文標題 Draft genome of Tanacetum cinerariifolium, the natural source of mosquito coil	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 18249
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-54815-6	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 Nassel Dick R., Zandawala Meet, Kawada Tsuyoshi, Satake Honoo	4. 巻 13
2. 論文標題 Tachykinins: Neuropeptides That Are Ancient, Diverse, Widespread and Functionally Pleiotropic	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1262
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnins.2019.01262	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 Mita Masatoshi, Osugi Tomohiro, Takahashi Toshio, Watanabe Takehiro, Satake Honoo	4. 巻 290
2. 論文標題 Mechanism of gamete shedding in starfish: Involvement of acetylcholine in extracellular Ca ²⁺ -dependent contraction of gonadal walls	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 General and Comparative Endocrinology	6. 最初と最後の頁 113401 ~ 113401
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ygcen.2020.113401	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------