

機関番号：74408
研究種目：基盤研究(C)
研究期間：平成20年度～平成22年度
課題番号：20570077
研究課題名(和文) タキキニンによるプロテアーゼ活性化を介した卵細胞成長機構の解明
研究課題名(英文) Investigation of a tachykininergic proteases-associated oocyte growth
研究代表者 佐竹 炎 (SATAKE HONOO)
公益法人サントリー生命科学財団 生物有機科学研究所・分子生物学研究部
主幹研究員
研究者番号：20280688

研究成果の概要(和文)：

脊椎動物の祖先的性質を有するカタユレイボヤにおいて、神経ペプチドの一種、タキキニンがカテプシン D、カルボキシペプチダーゼ B1、キモトリプシンといったプロテアーゼの活性化を誘導して卵黄形成期の卵細胞の成長を促進する機構を明らかにした。また、この機構がニューロテンシンという別の神経ペプチドで抑制されることも判明した。さらに、この機構が哺乳類にも基本的に保存されていることも突き止めた。

研究成果の概要(英文)：

We have substantiated that a neuropeptide, tachykinin, up-regulates growth of vitellogenic oocytes via the activation of proteases such as cathepsin D, carboxypeptidase, and chymotrypsin. Moreover, this novel oocyte growth pathway has been shown to be suppressed by another neuropeptide, neurotensin. We have also revealed that the protease-associated oocyte growth is essentially conserved in mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
20年度	1,600,000	480,000	2,080,000
21年度	1,100,000	330,000	1,430,000
22年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・動物生理、行動

キーワード：タキキニン、カタユレイボヤ、卵細胞、プロテアーゼ、哺乳類、成長機構、卵巣

1. 研究開始当初の背景

タキキニンは脊椎動物に存在する神経ペプチドファミリーであり、Substance P (SP)、Neurokinin A (NKA)、Neurokinin B (NKB)、Hemokinin/Endokininの4種類のペプチドが現在までに同定されている。これらのタキキニンは、3種類の受容体に選択的に結合す

ることにより、痛覚伝達、炎症反応、血管拡張などの多様な生理作用を発揮することが知られている。また、ここ数年でタキキニン受容体遺伝子が卵巣に発現していることが確認され、タキキニンが卵細胞の発生や成長を制御している可能性が示されてい

る。しかし、卵巣内でのタキキニン受容体の発現分布は報告されておらず、卵巣や卵細胞に対するタキキニンの生理作用も確定されていないため、卵巣内でのタキキニンの生物学的役割は全く未解明の状態である。その理由として、哺乳類の性周期の影響、タキキニン受容体の発現量が低いまたは変動が激しいこと、さらに、哺乳類の卵巣中の未成熟卵細胞が成長する割合が低く、かつ、成長可能なものとそうでないものを区別する手段がないため、卵細胞の成長に対するタキキニンを検出する種々の生理作用解析を行うことが極めて困難であることが挙げられる。申請者は、脊椎動物の祖先的性質を有する原索動物の代表的な種であるカタユレイボヤ、*Ciona intestinalis* からホヤタキキニン (Ci-TK) とその受容体 (Ci-TK-R) を単離し、Ci-TK と Ci-TK-R が分子構造と機能の両面で脊椎動物のタキキニンとタキキニン受容体の性質を保存していること、すなわち、脊椎動物のタキキニンとその受容体のプロトタイプであることを突き止めた。Ci-TK-R がカタユレイボヤの卵巣内の卵黄形成期 (Stage II) の卵細胞周辺に存在する test cell に特異的に発現していること、DNA マイクロアレイとリアルタイム PCR 法により、Ci-TK を投与するとカテプシン D、カルボキシペプチダーゼ B1、キモトリプシンといったプロテアーゼ遺伝子の発現と、これらのプロテアーゼ活性が上昇することを検出した。さらに、Ci-TK-R を特異的に発現している卵黄形成期 (Stage II) の卵細胞を Ci-TK で処理すると後卵黄形成期 (Stage III) への成長を誘導すること、並びに、この Ci-TK による卵細胞成長誘導作用は、上述のプロテアーゼに対する阻害剤存在下で完全に阻害されることを見出した。以上の結果から、タキキニンの卵巣における作用の一つは、卵黄形成期の卵細胞中の test cell に作用し、プロテアーゼ遺伝子発現と酵素性を上昇することにより卵黄形成期の卵細胞の成長を促進することであると結論した。これは、全生物を通じて初めてのタキキニンの卵細胞における生理作用機構の初めての知見である。また、ホヤは系統分類上、脊椎動物の起源的生物であることを考慮すると、Ci-TK によるプロテアーゼ活性化を介した卵細胞成長機構は、

哺乳類をはじめとする脊椎動物でも保存されていることが期待された。さらに、タキキニン以外のペプチドもこの卵細胞成長機構に関与していることも考えられる。

2. 研究の目的

以上の背景から、

- (1) Ci-TK により遺伝子発現と活性が上昇するプロテアーゼの作用部位を決定
- (2) 各プロテアーゼの卵細胞内における挙動を解明
- (3) 哺乳類の卵細胞で同様のタキキニン制御による成長促進機構の有無の検討を行い、脊索動物全体で保存されているタキキニン駆動性のプロテアーゼ活性化を介する卵細胞成長のメカニズムを明らかにすることを構想した。

3. 研究の方法

- (1) 各プロテアーゼ mRNA に対して *in situ* hybridization を、および、各プロテアーゼに対する抗体を作製して免疫染色を、ホヤとマウス卵巣切片や卵黄形成期の卵細胞全体で行う。
- (2) Ci-TK で 16 時間処理するとカテプシン D、カルボキシペプチダーゼ B1、およびキモトリプシンの遺伝子発現が上昇することを申請者らは明らかにしているが、これらのプロテアーゼの遺伝子発現が最大に達するのが 16 時間後なのかそれ以前なのかといった発現解析は行っていない。そこで、ホヤ卵巣に Ci-TK を投与後の各プロテアーゼ遺伝子の時間的な発現プロファイルを酵素活性とリアルタイム PCR で解析する。
- (3) 哺乳類の一次卵胞や二次卵胞に発現している受容体に対応するタキキニンやアゴニストを、アンタゴニストの存在下・非存在下で投与し、プロテアーゼ遺伝子の変動をリアルタイム PCR で検出し、3 種のタキキニン受容体の中でプロテアーゼ遺伝子発現制御や卵細胞成長に関与しているものを決定する。

4. 研究成果

(1) プロテアーゼやタキキニン受容体の局在

① ホヤ卵巣におけるカテプシン D、カルボキシペプチダーゼ B1、キモトリプシンの局在

それまでのホヤタキキニン Ci-TK とその受容体 Ci-TK-R を対象とした研究により、Ci-TK は卵黄形成期卵細胞の test cell に作用してプロテアーゼの遺伝子発現および酵素活性を上昇させ、卵細胞成長を誘導するというタキキニンの新たな生理作用を解明した。そこで、この作用が一次的なものか二次的のものかを調べるため、ホヤ卵黄形成期卵細胞にお

けるカテプシンD、カルボキシペプチダーゼ B1、キモトリプシンの各プロテアーゼの局在を免疫染色と *in situ* hybridization を行った。この結果、カテプシンDはCi-TK-Rと同様に卵黄形成期の卵細胞の test cell に、他の2つのプロテアーゼは濾胞細胞に局在することが判明した (図1)。

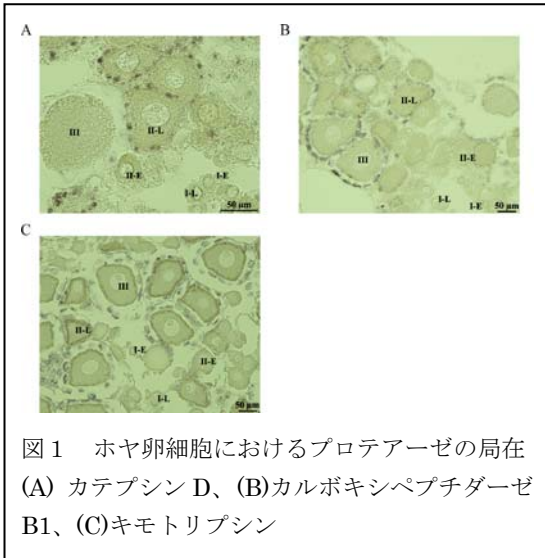


図1 ホヤ卵細胞におけるプロテアーゼの局在 (A) カテプシンD、(B)カルボキシペプチダーゼ B1、(C)キモトリプシン

この結果、カテプシンDは test cell で Ci-TK により直接活性化されるのに対し、残りの2つのプロテアーゼは濾胞細胞で2次的に活性化されることが示唆された。

②マウス卵巣におけるタキキニン受容体の局在

哺乳類の3種のタキキニン SP, NKA, NKB とこれらの選択的受容体である NK1, BK2, NK3 に対する免疫染色を8週齢マウスの卵巣に行ったところ、全てのタキキニンおよびそれらの受容体が一次卵胞と二次卵胞の顆粒膜細胞と莢膜細胞に特異的に存在していることを突き止めた。この結果は、ホヤ卵細胞に存在する test cell と哺乳類卵細胞に存在する顆粒膜細胞や莢膜細胞の機能的相同性が初めて示唆されたものであると同時に、我々がホヤを用いて明らかにしたタキキニンによるプロテアーゼを介した卵細胞成長機構が、哺乳類でも基本的に保存されている可能性が極めて高いことを示している。

③マウス卵巣におけるプロテアーゼの局在

同様に、マウス卵巣におけるカテプシンD、カルボキシペプチダーゼ B1、キモトリプシンの各プロテアーゼに対して免疫染色を行ったところ、カテプシンDは二次卵胞の顆粒膜細胞や莢膜細胞に、残りの2種は濾胞細胞に局在することが明らかになった。したがって、哺乳類卵巣におけるタキキニン卵細胞成長機構が保存されている期待が一層高まった。

(2) ホヤ卵細胞におけるプロテアーゼ活性化の時間的制御

これまでの研究で、ホヤ卵黄形成期卵細胞を16時間 Ci-TK で処理すると各プロテアーゼ活性が上昇することを解明していたが、その活性動態は調べられていなかった。そこで、ホヤ卵巣を Ci-TK で処理後3、6、9、16時間における各プロテアーゼ活性を測定し、活性動態を追跡した。その結果、カテプシンDのプロテアーゼ活性は Ci-TK を卵巣に投与してから3時間後に活性が発現して6時間で最大になるのに対し、他のプロテアーゼは6時間後に活性が発現して急速に上昇することを解明した (図2)。

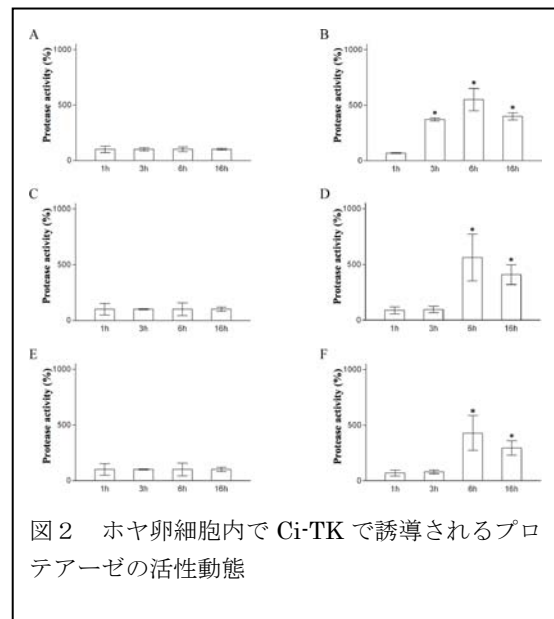


図2 ホヤ卵細胞内で Ci-TK で誘導されるプロテアーゼの活性動態

この結果と、前述のプロテアーゼ遺伝子の組織発現分布の結果 (図1) から、カテプシンDは Ci-TK により直接活性化されるのに対し、カルボキシペプチダーゼ B1 とキモトリプシンは2次的に活性化されるという機構が強く支持される (図3)。

(3) ニューロテンシンによるタキキニン誘導性卵細胞成長の抑制

ホヤ神経ペプチドのペプチドミクス研究の過程で、我々はニューロテンシンのホヤ同族体 Ci-NLTP6 を同定し、このペプチドがホヤ卵巣で発現していることを突き止めた。さらに、Ci-NLTP6 を卵巣に投与してマイクロアレイ解析を実施したところ、驚いたことに、Ci-NLTP6 は、Ci-TK が活性化するペプチド、すなわち、カテプシンD、カルボキシペプチダーゼ B1、キモトリプシンの遺伝子発現を抑制することが明らかになった。さらに、Ci-NLTP6 と Ci-TK でホヤ卵黄形成期の卵細胞を処理すると、Ci-TK による卵黄形成期の卵細胞の成長

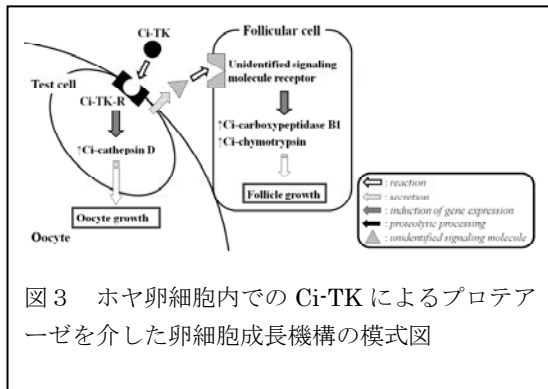


図3 ホヤ卵細胞内での Ci-TK によるプロテアーゼを介した卵細胞成長機構の模式図

が完全に抑制することが判明した。これらの結果から、カテプシンD、カルボキシペプチダーゼ B1、キモトリプシンによる卵細胞成長機構は、Ci-TK により正に、Ci-NTP6 により負に調節されることが決定された。これらの成果は、タキキニンやニューロテンシンが卵細胞成長に関与することを示した初めての例であり、これら神経ペプチドの新たな生物学的役割を決定したことは大変意義が大きい。

(4) マウス二次卵胞成長におけるタキキニンの作用

ここまで述べたホヤ卵細胞を対象にしたタキキニンの卵細胞成長誘導作用とその機構、および、マウス二次卵胞の顆粒膜細胞や莢膜細胞における NK1、NK2、NK3 の局在と各プロテアーゼのマウス二次卵胞の顆粒膜細胞や莢膜細胞における局在の結果から、哺乳類でもタキキニンは二次卵胞成長を誘導していることが予想された。そこで、NK1、NK2、NK3 アンタゴニストを一次卵胞や二次卵胞に投与したところ、顆粒膜細胞の増殖が著しく抑制されることを明らかにした (図 4)。

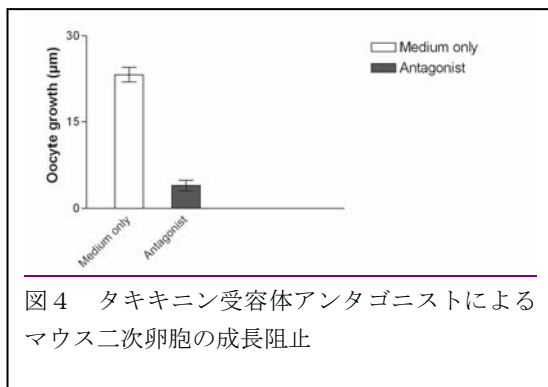


図4 タキキニン受容体アンタゴニストによるマウス二次卵胞の成長阻止

また、その抑制効果は、各タキキニン受容体アンタゴニストで同等であり、NK1、NK2、NK3 の各アンタゴニストで処理すると、濾胞と卵細胞ともほぼ完全に成長が阻止されることがわかった。このことから、哺乳類では、タキキニンは顆粒膜細胞の活性化を通じて

二次卵胞の成長を促進していることが明らかになった。以上の結果から、哺乳類でもタキキニンによるプロテアーゼ活性化を通じた初期卵細胞成長機構が保存されていることが示唆された。このことは、これまで全く不明だった生殖腺刺激ホルモンで制御されない初期卵細胞の成長制御因子の初めての同定であるという点で、内分泌学や生殖生物学において極めて重要な新発見であるといえる。したがって、この成果は、初期卵細胞成長の改善という視点に基づく、これまでにない不妊症や卵巣障害の改善に道を拓くと考えられる。さらに、哺乳類を直接対象にした研究では長年明らかにできなかった機構を、ホヤをモデル生物として明らかにできたことから、内分泌学や生殖生物学におけるホヤのモデル生物としての有用性が本研究により証明されたと考えられる。現在、マウス二次卵胞成長においてタキキニンにより制御されるプロテアーゼ種の同定とそのメカニズムに取り組んでいる。

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 15 件)

1. Kawada, T., Ogasawara, M., Sekiguchi, T., Aoyama, M., Hotta, K., Oka, K., Satake, H. (2011) "Peptidomic analysis of the central nervous system of the protochordate, *Ciona intestinalis*: homologs and prototypes of vertebrate peptides and novel peptides." *Endocrinology* 152(6), 2416-2427. 査読有
2. Hamada, M., Shimozono, N., Ohta, N., Satou, Y., Horie, T., Kawada, T., Satake, H., Sasakura, Y., Satoh, N. (2011) "Expression of neuropeptide- and hormone-encoding genes in the *Ciona intestinalis* larval brain." *Dev. Biol.* 352(2), 202-214. 査読有
3. Yamanaka, N., Roller, L., Žitňan, D., Satake, H., Mizoguchi, A., Kataoka, H., Tanaka, Y. (2011) "*Bombyx* orcokininins are brain-gut peptides involved in the neuronal regulation of ecdysteroidogenesis." *J. Comp. Neurol.* 519(2), 238-246. 査読有
4. Sakai, T., Aoyama, M., Kusakabe, T., Tsuda, M., Satake, H. (2010) "Functional diversity of signaling pathways through G protein-coupled

- receptor heterodimerization with a species-specific orphan receptor subtype.” *Mol. Biol. Evol.* 27(5), 1097-1106. 査読有
5. Hozumi, A., Kawai, N., Yoshida, R., Ogura, Y., Ohta, N., Satake, H., Satoh, N., Sasakura, Y. (2010) “Efficient transposition of a single Minos transposon copy in the genome of the ascidian *Ciona intestinalis* with a transgenic line expressing transposase in eggs.” *Dev. Dyn.* 239(4), 1076-1088. 査読有
 6. Roller, L., Zitňanová, I., Dai, L., Simo, L., Park, Y., Satake, H., Tanaka, Y., Adams, M.E., Zitňan, D. (2010) “Ecdysis triggering hormone signaling in arthropods.” *Peptides* 31(3), 429-441. 査読有
 7. Satake, H., Sasaki, N. (2010) “Comparative view on Toll-like receptors of lower animals.” *Zool. Sci.* 27(2) 154-161. 査読有
 8. Kawada, T., Sekiguchi, T., Sakai, T., Aoyama, M., Satake, H. (2010) “Neuropeptides, hormone peptides, and their receptors in *Ciona intestinalis*: an update.” *Zool. Sci.* 27(2) 134-153. 査読有
 9. Kawada, T., Aoyama, M., Okada, I., Sakai, T., Sekiguchi, T., Ogasawara, M., Satake, H. (2009) “A novel inhibitory gonadotropin-releasing hormone-related neuropeptide in the ascidian, *Ciona intestinalis*” *Peptides* 30(12) , 2200-2205. 査読有
 10. Sasaki, N., Ogasawara, M., Sekiguchi, T., Kusumoto, S., Satake, H. (2009) “Toll-like receptors of the ascidian, *Ciona intestinalis*: prototypes with hybrid functionalities of vertebrate Toll-like receptors.” *J. Biol. Chem.* 284(40), 27336-27343. 査読有
 11. Sekiguchi, T., Suzuki, N., Fujiwara, N., Aoyama, M., Kawada, M., Sugase, K., Murata, Y., Sasayama, Y., Ogasawara, M., Satake, H. (2009) Calcitonin in a protochordate, *Ciona intestinalis*: the prototype of the vertebrate Calcitonin/Calcitonin gene related peptide family. *FEBS J.* 276(16), 4437-4447. 査読有
 12. Okamoto, N., Yamanaka, N., Satake, H., Saegusa, H., Kataoka, H. Mizoguchi, A. (2009) “An ecdysteroid-inducible IGF-like peptide regulates adult development of the silkworm *Bombyx mori*” *FEBS J.* 276(5), 1221-1232. 査読有
 13. Kawada, T., Sekiguchi, T., Itoh, Y., Ogasawara, M., Satake, H. (2008) “Characterization of a novel vasopressin/oxytocin superfamily peptide and its receptor from an ascidian, *Ciona intestinalis*” *Peptides* 29(10), 1672-1678. 査読有
 14. Aoyama, M., Kawada, T., Fujie, M., Hotta, K., Sakai, T., Sekiguchi, T., Oka, K., Satoh, N., Satake, H. (2008) “A novel biological role of tachykinins as an upregulator of oocyte growth: identification of an evolutionary origin of tachykinergic functions in the ovary of the ascidian, *Ciona intestinalis*” *Endocrinology* 149(9), 4346-4356. 査読有
 15. Satake, H., Sakai, T. (2008) “Recent advances and perceptions in studies of heterodimerization between G protein-coupled receptors.” *Protein Pept. Lett.* 15(3), 300-308. 査読有
- [学会発表] (計 7 件)
1. 酒井、青山、日下部、津田、佐竹 「ホヤGnRH受容体ヘテロダイマー形成によるシグナル伝達調節の多様性」 日本動物学会第 81 回大会 2010. 9. 23 (東京)
 2. 青山、川田、佐竹 「卵巣においてタキキニンによって制御されるカテプシン D の局在」 日本動物学会第 81 回大会 2010. 9. 23 (東京)
 3. 青山、川田、佐竹 「哺乳類卵巣組織におけるタキキニンの生物学的役割について」 第 34 回日本比較内分化学会大会・日本比較生理生化学会第 31 回大会合同大会 2009. 10. 22 (大阪)
 4. 川田、伊藤、佐竹 「カタユウレイボヤ脳

- 神経節に実在するペプチドの神経ペプチドの網羅的解析」第34回日本比較内分泌学会大会・日本比較生理生化学会第31回大会合同大会 2009.10.22 (大阪)
5. 青山、川田、佐竹「哺乳類卵巣組織におけるタキキニンの生物学的役割について」日本動物学会第80回年会 2009.9.19 (静岡)
 6. 川田、青山、関口、小笠原、濱田、佐藤、佐竹「カタユレイボヤのニューロテンシン様ペプチドの機能解析」日本動物学会第80回年会 2009.9.19 (静岡)
 7. 佐竹、青山、川田、関口、酒井、伊丹、安田「タキキニンファミリーに見られる分子と機能の進化」第35回日本比較内分泌学会大会 2009.11.18 (静岡)

[図書] (計2件)

1. Nonaka, M., Satake, H. (2010) "Urochordate immunity." in *Invertebrate immunity* (Kenneth Söderhäll ed.), Landes Bioscience., Austin, TX, pp.302-310.
2. Kawada, T., Sekiguchi, T., Sugase, K., Satake, H. (2009) Evolutionary aspects of molecular forms and biological functions of oxytocin family peptides in *Handbook of Oxytocin Research: Synthesis, Storage and Release, Actions, and Drug Forms.* (Jastrow H. and Feuerbach D. eds.), Nova Science Publishers, Inc., Hauppauge, NY, pp.59-85.

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

www.sunbor.or.jp

6. 研究組織

(1) 研究代表者 佐竹 炎
(SATAKE HONOO)

研究者番号: 20280688

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし