

令和 5 年 5 月 11 日現在

機関番号：74408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06752

研究課題名(和文)カタユウレイボヤ卵巣におけるプロスタグランジンの作用と分子ネットワークの解明

研究課題名(英文)Elucidation of biological effects and molecular network of prostaglandins in the Ciona ovaries

研究代表者

川田 剛士 (Kawada, Tsuyoshi)

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・主席研究員

研究者番号：90300821

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)：カタユウレイボヤから新たにプロスタグランジン受容体を同定し、そのリガンドが PGE2 であること、そのシグナル伝達は Ca<sup>2+</sup> シグナリングと cAMP シグナリングの双方を誘起することを明らかにした。その Ca<sup>2+</sup> シグナリングの阻害剤した成長初期卵胞では、受容体シグナリング、細胞骨格、硫酸化、に関連する遺伝子の発現変動に影響を与えることが示唆された。また、同受容体遺伝子は成長初期卵胞の卵母細胞に発現し、PGE2の合成酵素遺伝子は後卵黄形成期卵胞のテスト細胞に発現す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

哺乳類のプロスタグランジン受容体は複数種存在し、Ca<sup>2+</sup> シグナリングか cAMP シグナリングのどちらか片方を誘起する。本研究では、カタユウレイボヤから同定したプロスタグランジン受容体が Ca<sup>2+</sup> シグナリングと cAMP シグナリングの双方を誘起することを明らかにした。本結果は、原索動物から脊椎動物の進化の過程において、プロスタグランジンが受容体の種類を増やし、その役割の分業化および高度化させたことを示唆するものであり、プロスタグランジンの分子進化と機能進化の解明に寄与するものである。

研究成果の概要(英文)：We identified a novel prostaglandin receptor from an ascidian, *Ciona intestinalis*. We elucidated that PGE2 is interacted with the receptor. The interaction induces both Ca<sup>2+</sup> signaling and cAMP signaling. Pre-vitellogenic and vitellogenic follicles were treated with an antagonist which inhibits Ca<sup>2+</sup> signaling induced by the receptor activation, and transcriptional analysis of the follicles suggested that prostaglandin is related to gene expression of receptor signaling, cytoskeleton, and sulfation. Moreover, we elucidated expression of the receptor gene and PGE2 synthase gene in the ascidian ovary. The receptor gene is expressed in oocyte of pre-vitellogenic and vitellogenic follicles, while PGE synthase is expressed in the test cells of post-vitellogenic follicles.

研究分野：比較内分泌学

キーワード：プロスタグランジン カタユウレイボヤ 卵巣

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

#### (1) プロスタグランジン (PG)

PG は細胞膜から遊離したアラキドン酸から合成されるプロスタノ酸骨格を含む生理活性脂質の一群の総称で、哺乳類の様々な組織や器官に存在し、血圧低下作用や平滑筋収縮作用、痛覚伝達、血小板凝集作用などの生理活性を示す。遊離アラキドン酸にシクロオキシゲナーゼ (COX) が作用すると PG の基幹物質である PGH<sub>2</sub> が合成され、その PGH<sub>2</sub> に組織特異的に発現する各合成酵素が作用することで、PGD<sub>2</sub> や PGE<sub>2</sub>、PGF<sub>2</sub>、PGI<sub>2</sub> といった様々な種類の PG が産生される。哺乳類の排卵では、PGE<sub>2</sub> が卵丘細胞に作用して細胞接着を緩めることで直接的に排卵を促進し、PGF<sub>2</sub> は黄体を退行させて間接的に排卵を誘発する。一方、無脊椎動物では PG 類の存在は示唆されているが、生殖への関与については不明である。

#### (2) カタユレイボヤ

原索動物の 1 種で、脊椎動物と同じ脊索動物門に属し、脊椎動物に最も近い無脊椎動物の 1 つである。ホヤは古くから発生学の分野でモデル生物として用いられており、早い段階でゲノム解読や遺伝子導入技術の確立が為され、遺伝子破壊も可能である。カタユレイボヤはその系統分類学的位置づけから、脊索動物における進化多様化研究の有用な標的として考えられている。

#### (3) カタユレイボヤの PG

過去の研究から、カタユレイボヤの卵巣に PGE<sub>2</sub> と PGF<sub>2</sub> が存在することが示唆されていたが、さらに申請者らは COX や PGE<sub>2</sub> 合成酵素、PGF<sub>2</sub> 合成酵素、PG 受容体とそれぞれ配列相同性の高い遺伝子がカタユレイボヤに存在し、かつ RT-PCR により卵巣で各遺伝子が発現すること、受容体候補が PGE<sub>2</sub> に強く、PGF<sub>2</sub> に弱く応答することも調べている。

### 2. 研究の目的

上記の結果から、PG がカタユレイボヤ卵巣で何らかの生物学的役割を果たしていると推測された。脊椎動物では、HPG 軸 (視床下部/下垂体/生殖腺) の制御の元、PG が排卵を誘発することが知られている。一方で、無脊椎動物の 1 種であるカタユレイボヤでは、HPG 軸が確立していないため、PG は哺乳類とは異なる制御系で機能することが推測される。本研究では HPG 軸の確立していないカタユレイボヤで、卵巣における PG の生物学的役割とその分子機構を解明し、生殖機構の進化や多様化を明らかにするための基盤の構築を目指す。

### 3. 研究の方法

#### (1) PG 受容体のリガンドの選択性およびシグナル伝達経路解析

受容体候補遺伝子に G<sub>16</sub> を融合させたものを培養昆虫細胞に発現させ、PGE<sub>2</sub> および PGF<sub>2</sub> と反応させたところ、PGE<sub>2</sub> と PGF<sub>2</sub> の両方に応答する結果が得られていた。G<sub>16</sub> を融合させた受容体は Ca<sup>2+</sup> 応答と cAMP 応答の両方に対応するので、G<sub>16</sub> を融合させていない PG 受容体を培養昆虫細胞に発現させ、Ca<sup>2+</sup> 応答および cAMP 応答に対応するそれぞれの測定法で受容体の応答を調べた。また、哺乳類の PGE<sub>2</sub> 受容体や PGF<sub>2</sub> 受容体に作用する既知のリガンドから、ホヤ PG 受容体を阻害する物質を探索した。

#### (2) PG 受容体遺伝子および合成酵素遺伝子の発現解析

カタユレイボヤから卵巣を摘出し、4% パラホルムアルデヒドで固定した。続いて 30% ショ糖 PBS 溶液に置換後、包埋剤に封入、凍結した後に組織切片を作製した。ホヤ PG 受容体遺伝子およびホヤ PGE<sub>2</sub> 合成酵素遺伝子に特異的なプローブを設計、合成し、in situ hybridization を行うことで、卵巣内に発現するホヤ PG 受容体遺伝子およびホヤ PGE<sub>2</sub> 合成酵素遺伝子の領域を特定した。

#### (3) リガンド投与した卵胞群に対するトランスクリプトーム解析

カタユレイボヤから卵巣を摘出し、その卵巣から卵胞を回収した。卵胞を網目の大きさの異なる積層網ふるいをういて分画し、PG 受容体遺伝子の発現する前卵黄形成期および卵黄形成期の卵胞群を調整した。これらの卵胞群にリガンドを投与し、室温で 4hr 静置後、卵胞群を回収し、RNA を抽出する。対照区にはリガンドを投与していない卵胞群を用いた。次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトームにより、両卵胞群の遺伝子発現パターンを比較することで、リガンド投与により発現量が変動した遺伝子を探索した。

#### (4) PG 受容体遺伝子破壊ホヤの解析

カタユレイボヤから卵巣を摘出し、コリオンを除去した未受精卵を調整した。PG 受容体遺伝子配列を特異的に認識するガイド RNA と Cas9 ヌクレアーゼを未受精卵にインジェクション後、精子投与により受精させ、PG 受容体遺伝子を破壊したホヤ個体を作製した。

#### 4. 研究成果

##### (1) PG 受容体のリガンドの選択性およびシグナル伝達経路解析

ホヤ PG 受容体を発現させた培養昆虫細胞に PG を投与してシグナル伝達を調べたところ、同受容体は  $\text{Ca}^{2+}$ シグナリングと cAMP シグナリングの両方を活性化させることを明らかにした(図1)。どちらのシグナル伝達でも PGE2 の方が PGF<sub>2</sub> よりも強い活性を示した。哺乳類の PGE2 受容体も PGF<sub>2</sub> に弱い活性を示すものがあることから、ホヤ PG 受容体は哺乳類の PGE2 受容体と起源を同じくするものであることが示唆された。また哺乳類の PG 受容体は  $\text{Ca}^{2+}$  シグナリングか cAMP シグナリングのどちらか片方を誘起するものであり、脊椎動物への進化の過程で複数種の PG 受容体が誕生し、役割の分業化が生じたと予想される。

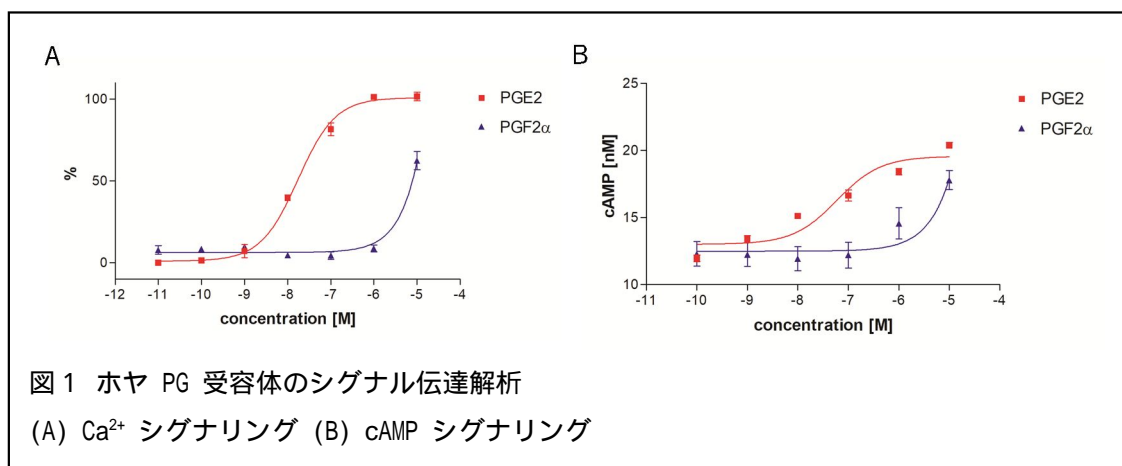


図1 ホヤ PG 受容体のシグナル伝達解析

(A)  $\text{Ca}^{2+}$  シグナリング (B) cAMP シグナリング

さらに、ホヤ PG 受容体を阻害するアンタゴニスト探索を、哺乳類の PG 受容体のリガンド群を用いて行ったところ、ホヤ PG 受容体の  $\text{Ca}^{2+}$  シグナリングを阻害するアンタゴニストを1つ同定した。

##### (2) PG 受容体遺伝子および合成酵素遺伝子の発現解析

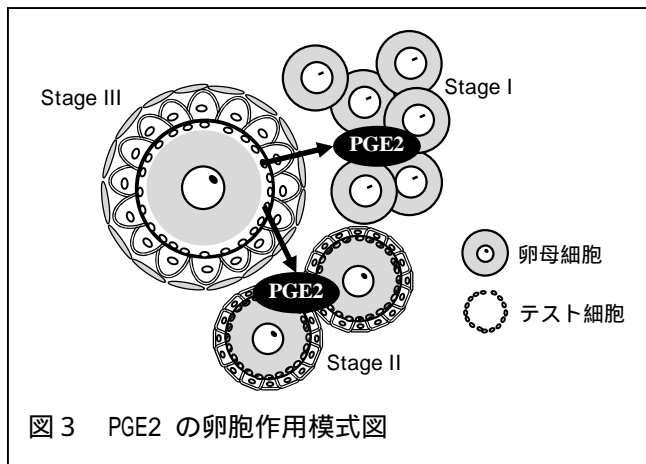
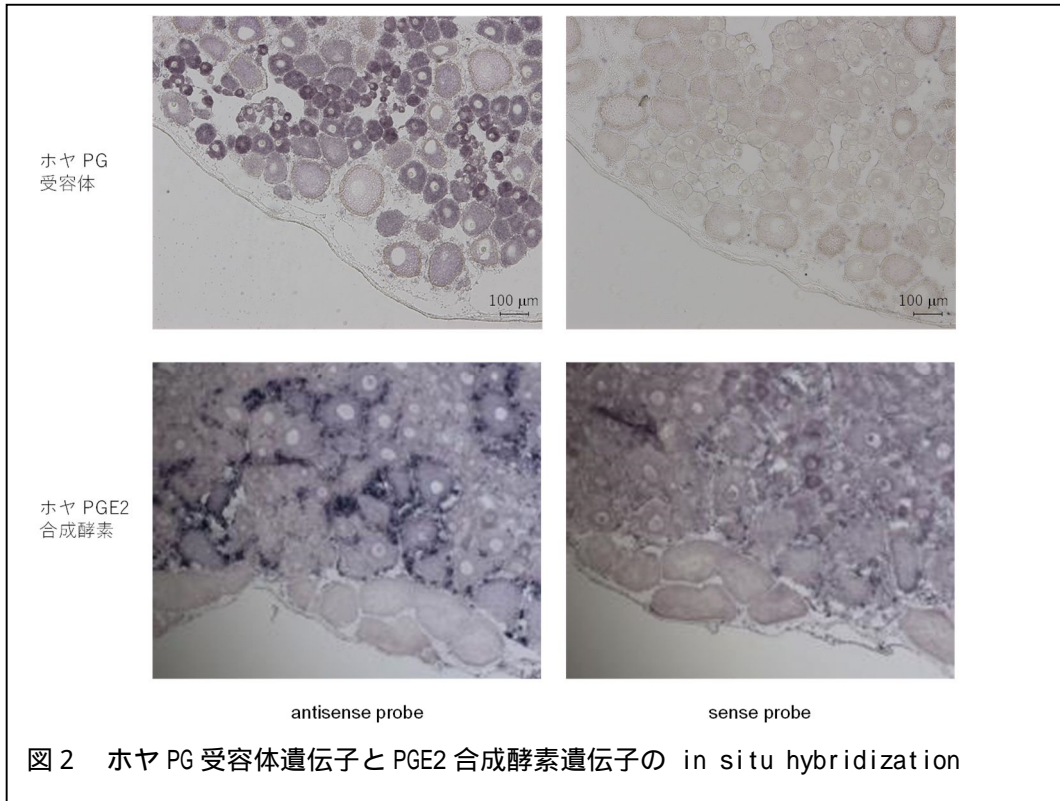
ホヤ卵巣の凍結切片を用いて in situ hybridization を行ったところ、PG 受容体遺伝子が前卵黄形成期(stage I) および卵黄形成期(stage II) の卵母細胞に発現することを明らかにした(図2)。さらに PG 受容体 を活性化させる PGE2 の合成酵素の遺伝子が後卵黄形成期(stage III) のテスト細胞に発現することも見出した(図2)。本結果から、成長の進んだ卵胞から分泌される PG が成長の遅れている卵胞に作用することで卵胞の生理機構を制御することが推測された(図3)。

##### (3) リガンド投与した卵胞群に対するトランスクリプトーム解析

ホヤ PG 受容体遺伝子の発現する stage I - II の卵胞を回収し、 $\text{Ca}^{2+}$  シグナリングを阻害するアンタゴニストを投与して、そこから抽出した RNA のトランスクリプトーム解析を行った。その GO 解析の結果から、同受容体の不活性化により、受容体シグナリング、細胞骨格、硫酸化、に関連する遺伝子の発現変動が示唆された。受容体シグナリングは様々な細胞応答に、細胞骨格は細胞内の物質輸送に關与するものであり、細胞の活性化にホヤ PG 受容体の誘起するシグナル伝達が關与することが示唆された。

##### (4) PG 受容体遺伝子破壊ホヤの解析

CRISPR-Cas9 によるゲノム編集により ホヤ PG 受容体遺伝子を破壊したノックアウトホヤを作製した。ホヤ PG 受容体遺伝子の破壊は、発生から変態の過程で致命的な影響を与えなかった。ノックアウトホヤは現在育成中であり、今後、受精能や卵巣の発育を調査する。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kawada T, Osugi T, Matsubara S, Sakai T, Shiraishi A, Yamamoto T, Satake H.	4. 巻 13
2. 論文標題 Omics Studies for the Identification of Ascidian Peptides, Cognate Receptors, and Their Relevant Roles in Ovarian Follicular Development.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Front Endocrinol	6. 最初と最後の頁 858885
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fendo.2022.858885. eCollection 2022.	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 Tsuyoshi Kawada, Akira Shiraishi, Shin Matsubara, Akiko Hozumi, Takeo Horie, Yasunori Sasakura, Honoo Satake	4. 巻 12
2. 論文標題 Vasopressin Promoter Transgenic and Vasopressin Gene-Edited Ascidian, <i>Ciona intestinalis</i> Type A ( <i>Ciona robusta</i> ): Innervation, Gene Expression Profiles, and Phenotypes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Endocrinology	6. 最初と最後の頁 668564
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fendo.2021.668564.	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 川田、松原、白石、和田、佐竹
2. 発表標題 カタコウレイボヤ卵巣におけるプロスタグランジンの解析
3. 学会等名 第46回日本比較内分泌学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川田、松原、佐竹
2. 発表標題 カタコウレイボヤにおけるプロスタグランジン受容体のシグナル伝達解析
3. 学会等名 第92回日本動物学会米子大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川田、松原、白石、和田、佐竹
2. 発表標題 カタウレイボヤにおけるプロスタグランジン受容体のシグナル伝達
3. 学会等名 第45回日本比較内分泌学会金沢大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Tsuyoshi Kawada	4. 発行年 2021年
2. 出版社 ELSEVIER	5. 総ページ数 18
3. 書名 Handbook of Hormones Comparative Endocrinology for Basic and Clinical Research 2nd edition	

〔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	笹倉 靖徳  (Sasakura Yasunori)  (10400649)	筑波大学・生命環境系・教授    (12102)	

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