

平成23年 6月15日現在

機関番号：74408

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21770082

研究課題名(和文) カタユウレイボヤのオキシトシン・バソプレシン様ペプチドの動態解析

研究課題名(英文) The molecular dynamics study of an oxytocin/vasopressin superfamily peptide in the ascidian, *Ciona intestinalis*.

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研究財団・生物有機科学研究所・研究員

研究者番号：90300821

研究成果の概要(和文)：外皮が半透明であるホヤに蛍光タンパク質遺伝子を繋げたホヤバソプレシン遺伝子を導入し、この蛍光タンパク質を検出する方法を用いることでホヤバソプレシンの遺伝子発現や動態について解明しようと試みた。当期間の研究により、上記の遺伝子を安定的に導入したホヤの作製に成功し、その蛍光観察の結果から、ホヤバソプレシン遺伝子が脳神経節から末梢器官へ向けて伸びる神経線維で発現すること、一定間隔おきに強い蛍光発色を示す末梢神経細胞が全身に存在することを確認した。

研究成果の概要(英文)：Ci-VP is an oxytocin/vasopressin like peptide identified from an ascidian, *Ciona intestinalis*. We have established a transgenic line of the ascidian that expresses a fluorescent protein with Ci-VP gene promoter region. The imaging analysis with the fluorescent protein demonstrated that Ci-VP gene is transcribed not only in the brain ganglion but also in the nerve fibers and peripheral neural cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：神経生物、オキシトシン、バソプレシン

1. 研究開始当初の背景

(1) カタユウレイボヤ

カタユウレイボヤが属する原索動物は系統分類学的に脊椎動物の祖先的形質を有すると考えられ、発生学や進化生物学の分野で活用

されてきた。原索動物の神経系や内分泌系の分野に関してはほとんど研究が為されていなかったが、脊椎動物の神経系や内分泌系においても脊椎動物の原型的要素を有していると考えられる。

(2) オキシトシン・バソプレシン・ニューロフィジン

オキシトシン(OT)とバソプレシン(VP)は9残基のアミノ酸から構成される哺乳類の脳下垂体後葉ホルモンであり、様々な生理作用を引き起こす多機能な生理活性ペプチドである。この二つのホルモンペプチドのアミノ酸配列は保存性が高く、かつペプチドの前駆体構造でも高い相同性が示されている。OTやVPの前駆体には、これらのペプチドだけでなくニューロフィジン(NP)というタンパク質もコードされている。NPはOTやVPと結合して細胞内輸送を補助する役割を担い、細胞内においてNPはOTやVPと挙動が一致する。

(3) ホヤのバソプレシン様ペプチド

カタユレイボヤからOT/VPと配列相同性のあるペプチド(Ci-VP)を発見した。同様にOT/VP受容体と配列相同性の高いタンパク質(Ci-VP-R)も発見した。ペプチドや受容体のアミノ酸配列相同性やペプチドをコードする前駆体の構造、ペプチド前駆体遺伝子のイントロン挿入位置の共通性、シグナル伝達反応様式の共通性から、Ci-VPおよびCi-VP-Rが脊椎動物のOT/VPおよびそれらの受容体と起源を同じくすることを我々は明らかにしていた。そしてCi-VP前駆体にはNPと相同性をもつ配列も存在した。

(4) ホヤの特徴・利点

カタユレイボヤでは、トランスジェニック体作製法がすでに確立されている。カタユレイボヤの体長は成体で15 cm程度であり、外皮が半透明であることから、個体を生存させたまま蛍光タンパク質の検出が可能なので、標的分子をリアルタイムに観察できる。

2. 研究の目的

(1) OT/VP様ペプチドの新規生理機能探索

カタユレイボヤにおけるOT/VP様ペプチド(Ci-VP)が引き起こす生理作用、その作用が引き起こされる時期や生理条件、ペプチドを起点とした分子ネットワークを解明し、OT/VP様ペプチドの新規生理機能を探索する。

(2) OT/VP様ペプチドの機能進化の解明

OT/VP様ペプチドの起源、進化初期におけるOT/VP様ペプチドの始原的役割を、Ci-VP解析により明らかにし、原索動物から下等脊椎動物、哺乳類へと複雑化していったOT/VP様ペプチドの機能進化の過程における重要な知識基盤を構築する。

3. 研究の方法

(1) ホヤニューロフィジン(Ci-NP)の解析

蛍光タンパク質と融合させたCi-NPの挙動を擬似的に追跡することで、Ci-VPの動態を解析する計画を考えた。この計画にあたり、蛍光タンパク質融合Ci-NPが正常に発現していることを確認する必要がある。そこで、Ci-VP/NP遺伝子のC末端に蛍光タンパク質遺伝子を繋げた遺伝子を培養細胞発現用ベクターに挿入し、このプラスミドを形質転換したNeuro2A細胞を蛍光顕微鏡下で観察することで、蛍光タンパク質融合Ci-NPが正常に発現するかについて確認した。

(2) トランスジェニックホヤの作製

これまでの研究成果より、Ci-VPをコードする翻訳領域の遺伝子配列およびプロモーターが含まれると推察される上流領域の配列が決定されている。このプロモーター配列を蛍光タンパク質遺伝子上流に組み込むことでプロモーター活性/遺伝子発現を蛍光検出により観測できる。このCi-VP/NP遺伝子上流領域から翻訳領域にかけての遺伝子をホヤのゲノムを鋳型にしてPCRで増幅し、C末に蛍光タンパク質がコードされているトランスジェニック用ベクターに挿入した。同様に上流領域のみPCRで増幅した遺伝子を上記ベクターに挿入したプラスミドも合わせて作製した。これら2つのプラスミドをそれぞれカタユレイボヤの卵に電気穿孔で導入し、成長過程において良質なホヤ個体の選択・育成を行った。

(3) トランスジェニックホヤの観察

Ci-VP/NP遺伝子上流配列に蛍光タンパク質遺伝子を融合させた遺伝子を導入したトランスジェニックホヤを実体蛍光顕微鏡下で観察し、この遺伝子が発現している細胞の局在を確認した。

4. 研究成果

(1) 細胞内輸送経路におけるホヤニューロフィジンの存在証明

Neuro2A細胞内の蛍光タンパク質融合Ci-NPの蛍光を顕微鏡下で確認したところ、この融合タンパク質遺伝子の発現に問題のないことが示された。さらに、この融合タンパク質由来の蛍光が斑点状に検出されたことから、この融合タンパク質が小胞輸送経路に正常に組み込まれていることが明らかになった。

(2) トランスジェニックホヤの作製

研究の方法(2)に述べた2種類の遺伝子のホヤへの導入に取り組み、双方においてトランスジェニック体を作製することに成功した。特に上流領域を直接蛍光タンパク質遺伝子に繋げた遺伝子を導入したホヤについては系統樹立に成功し、次世代への安定的な遺伝子の継承を可能にした。

(3) Ci-VP 遺伝子の発現細胞の解明

トランスジェニックホヤの観察により、脳神経節および脳神経節から放射状に伸びる多くの神経繊維でCi-VP 遺伝子の発現が示唆された(図1)。さらに一定間隔おきに強い蛍光発色を示す末梢神経細胞が全身に存在することを確認した。これらの神経線維は入水口や消化管などの末梢器官に向かって伸びており、Ci-VP 受容体も様々な末梢器官で発現していることから、脳神経節からのCi-VP 放出により多くの末梢作用が引き起こされることが推測される。すなわち脳神経節・神経線維・末梢神経細胞のネットワークを介して、Ci-VP は様々な生理作用を引き起こすと考えられる。

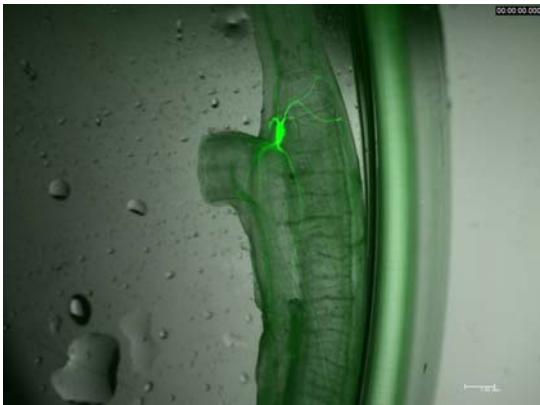


図1 Ci-VP 遺伝子トランスジェニックホヤ

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5件)

- (1) Kawada T., Ogasawara M., Sekiguchi T., Aoyama M., Hotta K., Oka K., Satake H.
“Peptidomic Analysis of the Central Nervous System of the Protochordate, *Ciona intestinalis*: Homologs and Prototypes of Vertebrate Peptides and Novel Peptides.”
Endocrinology **152**: 2416-2427 (2011)
査読有り
- (2) Hamada M., Shimosono N., Ohta N., Satou Y., Horie T., Kawada T., Satake H., Sasakura Y., Satoh N.
“Expression of neuropeptide- and hormone-encoding genes in the *Ciona intestinalis* larval brain.”
Dev Biol. **352**:202-214. (2011)

査読有り

- (3) Kawada T., Sekiguchi T., Sakai T., Aoyama M., Satake H.
“Neuropeptides, hormone peptides, and their receptors in *Ciona intestinalis*: an update.”
Zoolog Sci. **27**: 134-153. (2010)
査読有り
 - (4) Kawada T., Aoyama M., Okada I., Sakai T., Sekiguchi T., Ogasawara M., Satake H.
“A Novel Inhibitory Gonadotropin-releasing Hormone-Related Neuropeptide in the Ascidian, *Ciona intestinalis*”
Peptides **30**: 2200-2205. (2009)
査読有り
 - (5) Sekiguchi T., Suzuki N., Fujiwara N., Aoyama M., Kawada T., Sugase K., Murata Y., Sasayama Y., Ogasawara M., Satake H.
“Calcitonin in a Protochordate, *Ciona intestinalis* -- the Prototype of the Vertebrate Calcitonin / Calcitonin Gene-related Peptide Superfamily”
FEBS J. **276**: 4437-4447. (2009)
査読有り
- [学会発表] (計4件)
- (1) 川田 剛士 「カタユウレイボヤのオキシトシン・バソプレシン様ペプチドの同定および遺伝子発現解析」
日本動物学会第81回大会 9.23-25, 2010 (東京)
 - (2) 川田 剛士 「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 10.22-24, 2009 (大阪)
 - (3) 川田 剛士 「カタユウ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回大会 9.17-20, 2009 (静岡)
 - (4) Kawada T. “Characterization of a novel oxytocin / vasopressin superfamily peptide and its receptor from an ascidian, *Ciona intestinalis*”
16th International Congress of

Comparative Endocrinology 6.22-26,
2009 (Hong Kong, China)

〔図書〕(計1件)

Kawada T., Sekiguchi T., Sugase K., Kanda
A., and Satake H.
Nova Science Publishers, Inc., NY, USA.
(eds. Hugo Jastrow and Deniela Feuerbach)
“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.* (2009) pp 59-86

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.sunbor.or.jp/egs/news/index.html>

6. 研究組織

(1) 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・研究員

研究者番号：90300821

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：