

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22770209

研究課題名（和文）

ホヤを用いた受精・発生に関わる新規プロテアーゼの探索

研究課題名（英文） Exploring novel proteases involved in the fertilization and developmental mechanisms of ascidian.

研究代表者

山田 力志 (YAMADA LIXY)

名古屋大学・理学研究科・特任助教

研究者番号：10551020

研究成果の概要（和文）：

脊索動物の基本的な体制を保持し、遺伝子重複以前のゲノムを保持するカタユレイボヤにおいて、ゲノム情報を利用したプロテアーゼの網羅的同定、及び手作業での系統樹作製による詳細なアノテーションを行った。その結果、カタユレイボヤには計 506 のプロテアーゼ遺伝子が存在することが明らかとなった。さらには既知の遺伝子発現のデータを利用して、進化を通じて保存性が高く、Testis 特異的な発現がみられるプロテアーゼ遺伝子と、発生のある時期に特異的な発現がみられるプロテアーゼ遺伝子をそれぞれ 8 個抽出し、それら 16 遺伝子の発生過程における発現パターン及び生体組織内での実際の発現パターンを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

The ascidian *Ciona intestinalis* is belong to the phylum chordate and share many fundamental aspects of the chordate body plan with vertebrates. We have revealed 506 protease genes in *Ciona* by the comprehensive annotation and phylogenetic analyzes based on genomic information. Utilizing known microarray and EST data, eight protease genes that show testis-specific expressions and the other eight protease genes which show expressions in the specific stage during development were selected. We have revealed detailed expression patterns of these 16 protease genes in embryos and adult tissues by RT-PCR and whole mount in situ hybridization.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：発生生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：プロテアーゼ・ゲノム・発生・受精・ホヤ・進化

1. 研究開始当初の背景

多細胞動物の発生においては、ただ 1 個の細胞である卵が精子と受精し、卵割を繰り返す事で最終的に、様々な機能を持つ組織細胞へと分化する。この一連のステップに関与する分子及びそのカスケードを明らかにする事こそが発生生物学の最も重要な研究課題である。モデル生物においてゲノム配列が明

らかにされて以降、発生において細胞分化に重要なカスケードが急速に解明されてきた。それは、2002 年にゲノム配列が明らかとなったカタユレイボヤにおいても同様で、申請者も参加したアノテーションプロジェクトにより(分子カスケードの核となりうる 500 以上の転写因子やシグナル分子の同定や発現の記載はすべて終了し、それらの遺伝子

破壊実験により発生過程に重要な分子カスケードが明らかとなってきた。

この受精・発生に関わる分子カスケードの中心は当然のことながらタンパク質が担っているのだが、これらのタンパク質の合成から分解にいたるまでの一連の制御機構については現在研究が精力的に行われている。細胞内でのタンパク質分解系としては、ユビキチン-プロテアソーム系が精力的に研究されてきおり、それ以外のプロテアーゼについても、受精や形態形成に働く因子 (acrosin, Tolloid, furin 等) がいくつか同定されている。しかし、ヒト、マウスのゲノムにコードされている予想プロテアーゼ遺伝子は 500 を超えており、その殆どの遺伝子はまったく手付かずのまま機能が明らかにされていないのが現状である。この原因の一つとしては、数が多い事はもちろんだが、脊椎動物までの二度の遺伝子重複により、機能に冗長性が生まれて機能解析が困難になっている事が予想される。これらの解明には、遺伝子重複を起こす前の脊椎動物での研究が望まれる。

2. 研究の目的

前述の背景を踏まえ、本研究では、脊索動物の基本的な体制を保持し、遺伝子重複以前のゲノムを保持するカタユウレイボヤを利用して、すでに明らかになっているゲノム情報を用いたプロテアーゼの網羅的アノテーション、系統解析及び EST/マイクロアレイ情報を用いた発現解析を行い、次いで、発現解析、機能阻害、受精阻害実験などによる受精・発生における詳細な機能解析を行うことで、受精・発生の際に機能する新規プロテアーゼの同定を目指す。

3. 研究の方法

本研究の主要な研究項目は以下の 4 点である。(1)(2)はゲノム情報を利用した情報生物学的解析であり、それらの情報を元に(3)(4)のウェットな実験を行う事とする。

(1)カタユウレイボヤゲノム情報を用いた、プロテアーゼの網羅的アノテーション。以前に報告されている、ヒトとマウスの約 600 個のプロテアーゼの配列 (参考文献 1) を利用し、カタユウレイボヤのゲノム配列 (KH アセンブル)・遺伝子モデルにたいして、blast 検索を行い、ホモログを取得する。ホヤ特異的プロテアーゼが存在することも考えられるので、プロテアーゼの HMM による検索も併せて行う事とし、もれなくプロテアーゼを収集する。その後、InterPro、Pfam を利用した機能性ドメイン構造の決定、ヒト、マウスとの配列とのアライメント作成及び系統樹の作成を行う。

(2)(1)でアノテーションされた遺伝子すべてに対して、どの発生過程に、もしくは成体のどの組織に発現しているのかを、既存のマイクロアレイ、EST データを用い検討する。具体的には、受精に関与する遺伝子候補として、成体組織において精巣もしくは卵巣に特異的に強く発現している遺伝子を、初期発生に関与している遺伝子候補として、受精卵から尾芽胚の間にどこかの発生ステージで特異的に強く発現を示す遺伝子を選び出す。

(3)(2)の結果、ある発生時期、もしくは組織に特異的に発現していると思われる遺伝子・タンパク質の発現を、whole mount *in situ* hybridization (WMISH)・免疫染色により解明する。

(4)最終的医は (3)で興味深い発現を示した遺伝子の受精・発生における機能解析を行う。発生に関係がありそうな遺伝子に関しては、モルフォリノによる機能阻害、受精に関係しそうな遺伝子に関しては抗体を用いた受精阻害実験などを行い、詳細な機能に迫る。

4. 研究成果

(1) プロテアーゼの網羅的アノテーション ヒト及びマウスプロテアーゼ DB である (MEROPS: <http://merops.sanger.ac.uk/>) からの配列及び、ヒトやマウスでの Puente XS et al. Nat Rev Genet. (2003) の知見を利用し、*Ciona intestinalis* ゲノムへの相同性検索等を行いプロテアーゼ遺伝子の網羅的な抽出を行った。この検索で得られた遺伝子の中には繰り返しモチーフ (SUSHI, EGF, WD40 等) を持つ遺伝子が混ざって得られてしまう事が分かったので、それらを除く作業、及びマニュアルによりグループ毎に系統樹を作製し詳細なアノテーションを行った。系統樹に関しては、随時ナメクジウオゲノムなども用い、進化的に保存性が高いかどうかも検討した。結果、ホヤには Aspartic、Cysteine、Metallo、Serin、Threonine プロテアーゼ それぞれ、11、112、184、181、18 個、計 506 個のプロテアーゼ遺伝子が存在することを明らかにした (Table)。

Table: カタユウレイボヤのプロテアーゼ遺伝子

	Aspartic	Cysteine	Metallo	Serine	Threonine	(total)
Human *	21	143	186	176	27	553
Mouse *	27	153	197	227	24	628
<i>Ciona intestinalis</i>	11	112	184	181	18	506

* Puente XS et al. Nat Rev Genet. (2003) 544-58. より引用。

また、約半数の遺伝子は他生物にもオーソログが存在し進化的に保存されていたが、残りの多くの遺伝子は他生物の遺伝子とのオーソログ関係が不明、もしくは、ホヤで独自に

多様化したような遺伝子であった(Figure)。これらホヤ独自に進化した遺伝子の割合を比較すると、転写因子やシグナル伝達関連因子のアノテーション結果における割合よりも、今回のプロテアーゼ遺伝子における割合は突出しており、この結果はプロテアーゼ遺伝子は種特異的に急速に進化をすることで、様々な種特異的な現象に寄与しているためであると考えられる。

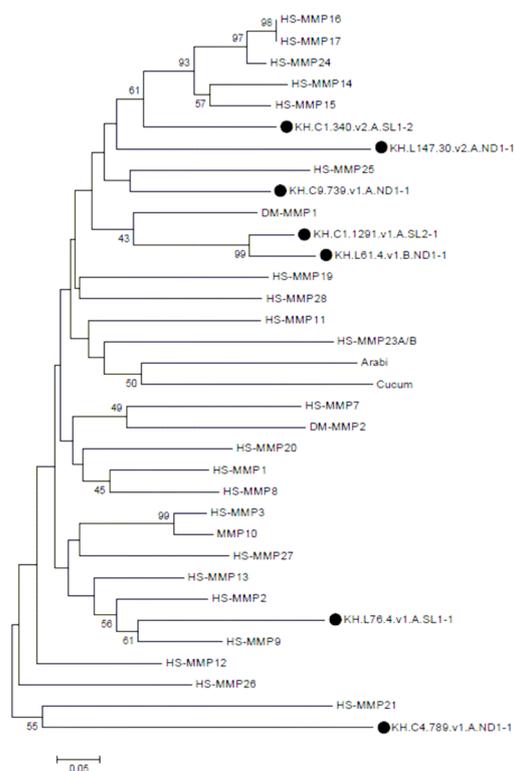


Figure: matrix metalloprotease の系統樹
 HS: *Homo sapiens*, DM: *Drosophila melanogaster* 黒丸: *Ciona intestinalis*

(2) 遺伝子の絞り込み及び発現解析

さらに、EST カウントやマイクロアレイデータなどを用い、それぞれの遺伝子の発現を検討することで、進化間で保存性が高く、Testis に特異的に発現が見られる遺伝子や発生のある時期特異的に発現する遺伝子をそれぞれ 8 個抽出、RT-PCR 及び Whole mount *in situ* hybridization により発生過程における発現及び生体組織内での実際の発現を明らかにした。また、これまでの網羅的研究より明らかとなっているホヤタンパク質の発現情報をデータベース化し、CIPRO(*Ciona intestinalis* protein database)として公開した。

本研究期間内には、これらの遺伝子の詳細な機能は明らかにすることはできなかった。が、今後これらの遺伝子は脊椎動物まで広く保存されている遺伝子であり、将来ホヤでこ

れらの機能を詳細に研究する事により、ホヤのみならず脊椎動物における機能についての有用な知見が得られる事が期待できる。

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 2 件)

①Endo, T., Ueno, K., Yonezawa, K., Mineta, K., Hotta, K., Satou, Y., Yamada, L., 以降 13 名省略, “CIPRO 2.5: *Ciona intestinalis* protein database, a unique integrated repository of large-scale omics data, bioinformatic analyses and curated annotation, with user rating and reviewing functionality.” *Nucleic Acids Res.* 2011, 39, D807-814. 査読有

②Yamaguchi, A., Saito, T., Yamada, L., Taniguchi, H., Harada, Y., and Sawada, H. “Identification and localization of the sperm CRISP family protein CiUrabrin involved in gamete interaction in the ascidian *Ciona intestinalis*” *Molecular Reproduction and Development.* 2011, 78(7), 488-497. 査読有

[学会発表] (計 8 件)

① Toshinori Endo, 「*Ciona intestinalis* protein database CIPRO shows a variety of proteomes for a single species」 the annual CBRC open house workshop (CBRC2010) on Bioinformatics, Tokyo, 2010 年 7 月 29 日

② Toshinori Endo, 「CIPRO 2.5: *Ciona intestinalis* Protein Database, a unique integrated repository of large-scale omics data, bioinformatic analyses, and curated annotation, with ability for user rating and comments」 *Beyond the Genome*, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, U.S.A., 2010 年 10 月 12 日

③ Toshinori Endo, 「CIPRO 2.5: *Ciona intestinalis* Protein integrated database with large-scale omics data, bioinformatic analyses and curated annotation, with ability for user rating and comments」 *Biocuration 2010*, Odaiba, Tokyo, JAPAN, 2010 年 10 月 14 日

④吉沢明康, 「仮想ゲルを用いた LC/MS データの表示とタンパク質修飾の探索プログラム (Western Blot-like Presentation of Gel-enhanced LC/MS Data and Software-based Detection of Protein

Modifications)」BMB2010(第33回日本分子生物学会年会、第83回日本生化学会大会合同大会)、神戸、2010年12月10日

⑤ Lixy Yamada 「Global protein profiling of sperm and egg lipid-raft membrane during fertilization in *Ciona intestinalis*.」, 6th International Tunicate Meeting, McGill University, Montreal, Quebec, Canada. 2011年7月7日

⑥ 山田力志, 「マイナー生物におけるプロテオーム解析の試み」, シンポジウム「プロテオミクスを生命科学に生かす10の方法」, NAIST(生駒市), 2011年11月24日

⑦ 山田力志, 「カタユウレイボヤにおける精子及び卵膜ラフト画分のプロテオーム解析(Global protein profiling of sperm and egg membrane raft fraction during fertilization in *Ciona intestinalis*.)」, 第34回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜、横浜、2011年12月14日

⑧ 山田力志, 「非モデル生物におけるプロテオミクス解析の実践と可能性」, 研究会「モデル生物・非モデル生物のプロテオミクスが拓く生物学」, 自然科学研究機構岡崎コンファレンスセンター、岡崎市、2012年5月14日

[図書] (計1件)

① Sawada, H., Saito, T., Yamaguchi, A., Harda, Y., and Yamada L. “Allorecognition mechanisms in ascidian fertilization: A reproduction strategy shared with flowering plant.”, 「Sperm Cell Research in the 21st Century: Historical Discoveries to New Horizons」, Adthree Publishing Co. (編) Masaaki Morisawa, 2011, in press

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

なし

○取得状況 (計0件)

なし

[その他]

① 研究開発 web

CIPRO (*Ciona intestinalis* protein database): <http://cipro.ibio.jp/current/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 力志 (YAMADA LIXY)

名古屋大学・理学研究科・特任助教

研究者番号: 10551020

(2) 研究分担者
研究分担者なし

(3) 連携研究者
連携研究者なし