

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：74408

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570100

研究課題名(和文)トランスジェニックホヤを用いた神経葉ホルモンの卵巣における新規機能解明

研究課題名(英文)Functional analysis of a neurohypophysial hormone using transgenic ascidian 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・その他部局等・研究員

研究者番号：90300821

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：ホヤバソプレシン遺伝子のプロモーター下流に蛍光タンパク質遺伝子を導入したトランスジェニック体を確立し、その蛍光観察から成長途上ホヤの卵巣内でホヤバソプレシン遺伝子が発現することが示唆された。さらに成長途上の野生型ホヤを用いて遺伝子発現解析を行ったところ、ホヤバソプレシン遺伝子が成長途上のホヤ卵巣内の間質細胞らしき微小細胞に発現することが示唆された。また、成長途上のホヤ卵巣へのホヤバソプレシン投与により、発現変動する遺伝子を探索したところ、細胞増殖に関与する一部の遺伝子の発現量増加が認められた。以上より、成長途上のホヤ卵巣内で産生されるホヤバソプレシンが卵巣の形態形成に関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Ci-VP is an oxytocin/vasopressin superfamily peptide identified from an ascidian, *Ciona intestinalis*. We generated a transgenic ascidian that contains Ci-VP promoter region conjugated with a fluorescence protein gene. The Ci-VP promoter-regulated fluorescence protein was detected in the ovary of the young transgenic ascidian. Indeed, Ci-VP mRNA was also detected in the ovary of wild young ascidians, and several small cells in the ovary contain Ci-VP mRNA. Moreover, administration of Ci-VP to the ovary of young ascidians induced expression of several genes promoting cell proliferation. These results suggest that Ci-VP serves as not only a neuropeptide but also an ovarian factor involved in the development or maturation of the ovary.

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：オキシトシン バソプレシン

1. 研究開始当初の背景

(1) カタユレイボヤ

カタユレイボヤは原索動物の一種であり、脊椎動物と同じ脊索動物門に属している。その系統分類学的位置づけから、カタユレイボヤは脊椎動物の祖先的形質を有すると考えられており、発生学や進化生物学の分野で活用されてきた。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ていた。

(2) オキシトシン・バソプレシン

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の保存性は高く、脊椎動物の進化の初期段階における VP 祖先遺伝子の遺伝子重複により、OT 遺伝子が誕生したと考えられている。この OT/VP と相同性の高いペプチドは無脊椎動物にも広く存在している。

(3) ホヤのバソプレシン様ペプチド

我々は、OT/VP と配列相同性のあるペプチド(Ci-VP)をカタユレイボヤ脳神経節の抽出物から発見した。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)をデータベース検索により発見した。Ci-VP や Ci-VP-R のアミノ酸配列相同性や前駆体の構造、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明らかにしていた。

(4) トランスジェニックホヤ

カタユレイボヤでは、トランスジェニック体の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を検出が可能なので、蛍光タンパク質をリアルタイムに観察できる。

2. 研究の目的

Ci-VP の卵巣における新規機能解明

Ci-VP の遺伝子発現状況を、カタユレイボヤのトランスジェニック体を用いて解析し、本ペプチドの卵巣形態形成への関与を明らかにする。さらに、ホヤの卵巣・卵細胞への Ci-VP 投与による遺伝子発現変動解析を通じて、当ペプチドが卵巣・卵細胞で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する。

3. 研究の方法

(1) トランスジェニックホヤの観察

これまでの研究により、Ci-VP 遺伝子のプロモーターの下流に蛍光タンパク質遺伝子を組み込んだトランスジェニック作製用ベクタープラスミドを作製しており、それをカタユレイボヤに導入することで、Ci-VP 遺伝子を発現する組織で蛍光を発するトランスジェニック体を作製していた。本トランスジェニック体を育成し、実体顕微鏡下で蛍光を観察することにより、Ci-VP 遺伝子の発現している組織の局在を確認した。

(2) 野生型ホヤの卵巣を用いた 遺伝子発現解析

トランスジェニックホヤを観察することで得られた Ci-VP 遺伝子の発現情報が野生型ホヤでも同等であることを検証するために、野生型ホヤから摘出した卵巣由来の RNA を調製し、そこから逆転写した cDNA を鋳型にした RT-PCR を行うことで、Ci-VP 遺伝子の発現を確認した。さらに野生型ホヤ卵巣の in situ hybridization を実行し、Ci-VP 遺伝子の発現する細胞の特定を行った。

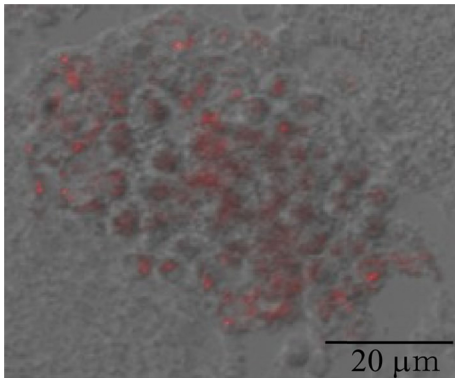
(3) 遺伝子発現変動解析

成長途上にあるカタユレイボヤの卵巣を摘出し、半分に切断した。片方を 1 μM の Ci-VP が混入している海水に、もう片方をペプチドが加えられていない海水に浸し、18 で 1 晩静置した。各卵巣断片から精製した mRNA を鋳型にして二本鎖 cDNA を合成し、アダプター付加した後、PCR により増幅した。品質チェックおよび濃度調製を行った本 cDNA を次世代シーケンサーで測定することで、遺伝子発現の差異を網羅的に解析した。さらに、本発現変動解析の再現性を調べるために定量 PCR による確認を行った。

4. 研究成果

(1) 成長過程の卵巣における Ci-VP 遺伝子の発現特定

カタユレイボヤ成体の卵巣では、Ci-VP 遺伝子がほとんど発現しないことが RT-PCR で示されていた。一方、Ci-VP の遺伝子発現に応じて擬似的に蛍光を発するトランスジェニックホヤを観察することにより、成長途上におけるカタユレイボヤの卵巣で Ci-VP 遺伝子が発現することが示唆された。実際、野生型のカタユレイボヤにおいても、トランスジェニックホヤと同様に成長途上の卵巣で Ci-VP 遺伝子が発現することが RT-PCR 実験により確認された。さらに in situ hybridization 実験により、同卵巣内の小型細胞に Ci-VP 遺伝子が発現することが示された。これらの細胞の大きさおよび幾何学的配置から同細胞は間質細胞であることが想定された。



(2) Ci-VP の卵巣投与による遺伝子発現変動解析

この成長途上のカタユレイボヤ卵巣においてホヤバソプレシンが発現誘導する遺伝子を特定するために、次世代シーケンサーを用いた遺伝子発現変動解析を行った。その結果、細胞増殖に關与する一部の遺伝子の発現量がホヤバソプレシン投与により上昇することが確認された。Ci-VP 遺伝子の発現解析結果と本結果を合わせると、成長期のホヤ卵巣内に存在する間質細胞において産生されるホヤバソプレシンが卵巣の形態形成に關与することが示唆される。

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 8 件)

Satake, H., Matsubara, S., Aoyama, M., Kawada, T., Sakai, T.

“GPCR Heterodimerization in the Reproductive System: Functional Regulation and Implication for Biodiversity.” *Front Endocrinol.* **4**, 100. (2013) doi: 10.3389/fendo.2013.00100.

Satake, H., Aoyama, M., Sekiguchi, T., Kawada, T.

“Insight into molecular and functional diversity of tachykinins and their receptors.” *Prot. Pept. Lett.* **20**, 615-627. (2013) doi: 10.2174/0929866511320060002

Sakai T., Aoyama M., Kawada, T., Kusakabe, T., Tsuda, M., Satake, H.

“Evidence for differential regulation of GnRH signaling via heterodimerization among GnRH receptor paralogs in the protochordate, *Ciona intestinalis*” *Endocrinology.* **153**, 1841-1849. (2012) doi: 10.1210/en.2011-1668

Aoyama, M., Kawada, T., Satake, H.

“Localization and enzymatic activity

profiles of the proteases responsible for tachykinin-directed oocyte growth in the protochordate, *Ciona intestinalis*.” *Peptides.* **34**, 186-192. (2012) doi: 10.1016/j.peptides.2011.07.019

Satake, H., Sekiguchi, T., Sakai, T., Aoyama, M., Kawada, T.

“Endocrinology and neuroendocrinology of protochordates: evolutionary views and potentials as new model organisms.” *Recent Res. Devel. Endocrinol.* **5**, 1-19. (2012)

川田 剛士 「オキシトシン/バソプレシンファミリーペプチドの起源を探る 無脊椎動物のオキシトシン/バソプレシンファミリーペプチド 最近の研究の進展から」日本比較内分泌学会誌 **38**, 115-121 (2012)

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) doi: 10.1210/en.2010-1348

Hamada, M., Shimozone, 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) doi: 10.1016/j.ydbio.2011.01.006.

[学会発表](計 6 件)

川田 剛士

「トランスジェニック体を用いたカタユレイボヤのオキシトシン/バソプレシン遺伝子の発現解析」日本動物学会第84回大会(ホヤ関連集会)9.26-28 2013(岡山大学)

Tsuyoshi Kawada

“The vasopressin/oxytocin family peptide and its receptor in the ascidian, *Ciona intestinalis*: Sequence, localization, and possible biological functions” 17th International Congress of Comparative Endocrinology 7.15-19 2013 (University of Barcelona)

川田 剛士

「カタユレイボヤバソプレシンのトランスジェニック体を用いた発現解析」第37回日本比較内分泌学会大会 11.29-12.01 2012 (福井大学)

川田 剛士

「ホヤニューロテンシンが調節する卵細胞成長制御」日本動物学会第83回大会 9.13-15 2012 (大阪大学)

川田 剛士

「オキシトシン / バソプレシンファミリーペプチドの起源を探る 無脊椎動物のオキシトシン / バソプレシンファミリーペプチド研究の最近の進展から」第36回日本比較内分泌学会大会 11.23-26 2011 (都道府県会館)

川田 剛士

「カタユレイボヤ神経ペプチドのペプチドミクス解析」日本動物学会第82回大会 9.21-23 2011 (旭川市大雪クリスタルホール)

〔図書〕(計 2 件)

Kawada, T., Aoyama, M., Sakai, T., Satake, H.

Nova Science Publishers Inc., NY, USA.
“Structure, function, and evolutionary aspects of invertebrate GnRHs and their receptors.” *In: Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH): Production, Structure and Functions.* (2013) 1-15.

Satake, H., Kawada, T., Aoyama, M., Sekiguchi, T., Sakai, T.

IN-TECH, Vienna, Austria. “Ascidians: new model organisms for reproductive endocrinology” *In: Endocrinology Book 2,* (2011) 313-336.

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔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

佐竹 炎 (SATAKE HONOO)
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・研究部長
研究者番号：20280688