

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：74408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440172

研究課題名(和文)カタユウレイボヤ卵巣形成における神経葉ホルモン同族体の機能解明

研究課題名(英文)Functional analyses of a neurohypophysial hormone for ovarian development using an 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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：カタユウレイボヤの神経葉ホルモン同族体であるホヤバソプレシンの遺伝子を破損したノックアウトホヤを確立し、その卵巣の観察から卵細胞の成長にホヤバソプレシンが関与することが示唆された。また同ノックアウトホヤは野生型ホヤと比べて小さく、体の成長そのものにもホヤバソプレシンが関与することが示唆された。さらにカタユウレイボヤの卵巣形成機構を解明するにあたり、若年期のホヤの卵巣に対する網羅的遺伝子発現解析を行い、若年期ホヤ卵巣の分子基盤を構築した。若年期のホヤの卵巣では核酸やアミノ酸の代謝や合成に関与する遺伝子群が多く発現していることが示された。

研究成果の概要(英文)：Oxytocin and vasopressin are known as neurohypophysial hormones. *Ciona vasopressin (Ci-VP)* is an oxytocin/vasopressin superfamily peptide identified from an ascidian, *Ciona intestinalis*. We generated and established *Ci-VP* gene knockout ascidians, and observed their ovaries. The observation showed that premature oocytes are more in ovaries of the knockout ascidians than wild ascidians, leading to the presumption that *Ci-VP* is involved in oocyte growth. Moreover, the knockout ascidians are smaller than wild ascidians, suggesting that *Ci-VP* plays an important role for body growth. Furthermore, to elucidate ovarian development of *C. intestinalis*, we performed transcriptome analysis for young ascidian ovaries. The transcriptome analysis showed that genes for metabolism and synthesis of nucleic acids and amino acids are more expressed in young ascidian ovaries.

研究分野：比較内分泌学

キーワード：オキシトシン バソプレシン カタユウレイボヤ

1. 研究開始当初の背景

(1) 卵巣形態形成とペプチド

卵巣の形態形成過程には、細胞分化や細胞移動、細胞増殖、アポトーシスが複雑に絡み合っており、その分子機構は体系的には理解されていない。特に哺乳類の卵巣形態形成の過程は複雑であるため、その解明はなかなか進展していない。ペプチドは生理活性物質として、様々な生理作用を誘起することが知られており、卵巣でも重要な役割を果たしている可能性が極めて高い。

(2) 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、遺伝子破壊も可能である。カタユレイボヤは発生学のみならず、生理学的見地からもモデル生物として期待されている。

(3) 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(神経葉ホルモン)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と相溶性の高いペプチドは無脊椎動物にも広く存在している。哺乳類では発現量は低いながらOT/VPの受容体が卵巣に発現している。

(4) ホヤのバソプレシン様ペプチド

我々は、OT/VPと配列相溶性のあるペプチド(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受容体と配列相溶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のアミノ酸配列相溶性や前駆体の構造、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。

(5) 若年期ホヤにおけるCi-VP遺伝子の発現

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10cm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。我々はCi-VP遺伝子のプロモーター領域の下流に蛍光タンパク質遺伝子をつなげた遺伝子を導入したトランスジェニックホヤを作製し、その観察を行ったところ、若年期のホヤの卵巣においてCi-VP遺伝子が発現することを明らかにした。

2. 研究の目的

組織形態学的観察により、卵巣形成における組織構築の過程が明らかにされている。一方で、その組織構築を司る分子機構は体系的には明らかにされていない。申請者は、脊椎動物の前身である原索動物のカタユレイボヤにおいて、OT/VPファミリーペプチドの遺伝子が若年期の卵巣に多く発現していることを明らかにした。本結果は、同ペプチドが卵巣の形態形成に関与することを示唆しており、申請者はこのカタユレイボヤのOT/VPファミリーペプチドのホヤ卵巣での機能を明らかにすることで、ペプチド性因子を基軸とした新規卵巣形態形成分子機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) 若年期ホヤ卵巣を用いた遺伝子発現局在解析

トランスジェニックホヤの蛍光観察により、卵巣形成が開始されるのと同時期にCi-VPプロモーター由来の蛍光シグナルが卵巣に検出されることを確認していた。より詳細な細胞レベルでのCi-VPの局在位置を確認するために、野生型カタユレイボヤの若年期卵巣の切片に対してin situ hybridization実験を行った。

(2) 若年期ホヤ卵巣へのCi-VP投与による遺伝子発現変動解析

複数の受精後2ヶ月のカタユレイボヤから卵巣を摘出し、それぞれカタユレイボヤを実体顕微鏡下で二分割する。これらの組織片をCi-VP投与区とCi-VP非投与区に分け、2時間および16時間培養した後に両投与区の組織片からRNAを抽出し、それらに対して次世代シーケンサーを用いたRNA-Seq測定を行った。得られた両投与区の組織片の遺伝子発現情報を比較することで、Ci-VP投与により発現量が変動した遺伝子を特定することを試みた。

(3) Ci-VP遺伝子破壊ホヤの作製と解析

我々はTALEN法を用いてCi-VP遺伝子を破壊したホヤの作製を試みた。すなわちCi-VPをコードする遺伝子配列を特異的に認識して切断するタンパク質を合成するプラスミドを作製し、それを卵に導入することでCi-VP遺伝子のホヤを作製した。このホヤの系統を樹立し、交配を繰り返すことにより、二倍体の双方のCi-VP遺伝子の破壊したホモ変異体を得られた。そのCi-VP遺伝子破壊ホ

ヤに対して、その成育や卵巣についての観察を行った。

(4) 若年期ホヤ卵巣の遺伝子発現解析

カタユレイボヤの卵巣形成機構を解明するにあたり、若年期ホヤ卵巣の分子基盤の情報が必要不可欠であると考え、若年期ホヤ卵巣の網羅的遺伝子発現解析を行った。若年期のホヤから卵巣を摘出して total RNA を精製した。さらに TruSeq Standard RNA Sample Prep kit を用いて卵巣 mRNA 由来の 蛍光 cDNA を合成し、次世代シーケンサーで同 cDNA を測定した。そこから得られた若年期卵巣の発現遺伝子データを元に、Gene Ontology 解析や定量 PCR 解析を行った。

4. 研究成果

(1) 若年期ホヤ卵巣を用いた遺伝子発現局在解析

野生型カタユレイボヤの若年期卵巣の切片に対して in situ hybridization 実験を行った結果、卵黄形成期の卵細胞内に存在するテスト細胞と各卵細胞の間隙に存在する間質様細胞に Ci-VP 遺伝子が発現していることを明らかにした(図1)。本結果から卵巣におけるホヤバソプレシンの機能は少なくとも2通り以上あることが推定された。

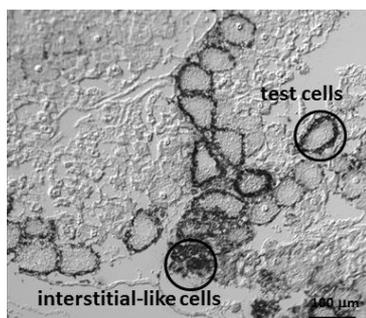


図1 若年期ホヤ卵巣における Ci-VP 遺伝子の局在

(2) 若年期ホヤ卵巣への Ci-VP 投与による遺伝子発現変動解析

若年期のホヤ卵巣に Ci-VP を投与し、発現に変動のある遺伝子を RNA-Seq および in silico 解析を行い、その再現性を確かめる定量 PCR 実験を試みたが、有意に発現差のある遺伝子の特定にはいたらなかった。卵巣の内在性 Ci-VP が働いているため、投与した Ci-VP による効果との差が表れなかった可能性が高い。本来ならばアンタゴニストを投与する実験が有効なのだが、Ci-VP-R のアンタゴニストは発見されておらず、哺乳類の OT アンタゴニストや VP アンタゴニストに Ci-VP-R の阻害活性があるかを調べたが、Ci-VP-R のアンタゴニスト活性はなかった。

(3) Ci-VP 遺伝子破壊ホヤの作製と解析

Ci-VP 遺伝子のヘテロ変異体同士を掛け合わせて、同遺伝子のホモ変異体を作製した。

変態が終了した直後の幼若体のゲノム配列を調べたところ、ホモ変異体がほぼ予測どおりの確率で存在したことから、同遺伝子が発生や変態に対して致命的な影響がないことが確認された。さらにホモ変異体はヘテロ変異体や野生型と比べて体が小さく、Ci-VP は体の成長そのものに影響を及ぼすことが示唆された。卵巣においても、同組織内に含まれる卵細胞の成長が遅い、もしくは停止している状態が観察され、卵細胞の成長にも関わっていることが示唆された。

(4) 若年期ホヤ卵巣の遺伝子発現解析

若年期ホヤ卵巣と成熟期ホヤ卵巣(図2)のトランスクリプトームデータを比較する GO 解析を行ったところ、核酸やアミノ酸の代謝や合成に關与する遺伝子群が若年期ホヤ卵巣で多く発現することが明らかになった。

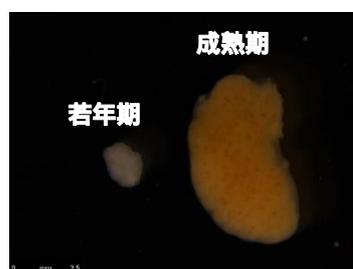
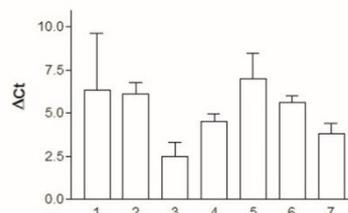


図2 若年期および成熟期の卵巣

また核の構成成分や遺伝子結合タンパク質、リボソーム構成因子といったタンパク質をコードする遺伝子群も若年期ホヤ卵巣で多く発現していた。以上の結果から、若年期ホヤ卵巣では卵巣成熟化のためのコンポーネントの産生や貯蔵を積極的に行っていることが推測された。また、発現量が多く、かつ若年期卵巣と成熟期卵巣で発現に差がある遺伝子の探索の結果、glutathione S-transferase, pyridoxine 5'-phosphate oxidase, alpha tublin, aquaporin などの遺伝子が若年期卵巣に多く発現していることが示された(図3)。



homologous genes	ΔCT
1. glutathione S-transferase	6.32 ± 3.30
2. pyridoxine 5'-phosphate oxidase	6.11 ± 0.68
3. Tetratricopeptide TPR-1	2.46 ± 0.84
4. actin3	4.54 ± 2.36
5. alpha tublin	7.02 ± 1.45
6. fibroleukin	5.60 ± 0.40
7. aquaporin	3.80 ± 0.61

図3 若年期ホヤ卵巣で成熟期ホヤ卵巣と比べて多く発現している遺伝子(定量PCR)

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)

Tsuyoshi Kawada, Akira Shiraishi, Masato Aoyama, Honoo Satake

“Transcriptomes of the Premature and Mature Ovaries of an ascidian, *Ciona intestinalis*” Front Endocrinol. 査読あり 8: 88 (2017) doi: 10.3389/fendo.2017.0088

Shin Matsubara, Tsuyoshi Kawada, Tsubasa Sakai, Masato Aoyama, Honoo Satake

“The significance of *Ciona intestinalis* as a stem organism in integrative studies of functional evolution of the chordate endocrine, neuroendocrine, and nervous systems.” Gen Comp Endocrinol. 査読あり 227: 101-108 (2016) doi: 10.1016/j.ygcen.2015.05.010.

〔学会発表〕(計4件)

川田剛士

“Comparison of expressional genes between mature and immature ovaries in ascidians, *Ciona intestinalis*” the 87th meeting of Zoological society of Japan. 11.17-19 2016 (Okinawa Convention Center)

川田剛士

“Transcriptome analysis for the ovary of an ascidian, *Ciona intestinalis*” 第40回日本比較内分泌学会大会 日本比較生理生化学学会第37回大会 合同大会 12.11-13 2015 (JMS アステールプラザ)

川田剛士

“Expressional analyses of *Ciona* oxytocin / vasopressin family peptide gene using a genetically modified ascidian” 第38回日本分子生物学会年会 第88回日本生化学会大会 合同大会 12.01-04 2015 (神戸ポートアイランド)

川田剛士

「成長途上のカタユレイボヤ卵巣におけるホヤバソプレシン遺伝子の発現解析」第85回日本動物学会年会 9.11-13 2014(東北大学)

〔図書〕(計1件)

Tsuyoshi Kawada

Academic Press, Handbook of hormones, (2016) 12p

〔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

(4) 研究協力者

笹倉 靖徳 (SASAKURA YASUNORI)

筑波大学・下田臨海実験センター・教授