

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26840073

研究課題名(和文) 光刺激によるクラゲ卵成熟誘起神経ペプチドの合成・蓄積・放出動態の解明

研究課題名(英文) Jellyfish oocyte maturation and spawning triggered by light-cued released of neuropeptides

研究代表者

竹田 典代 (Takeda, Noriyo)

東北大学・生命科学研究科・助教(研究特任)

研究者番号：40433742

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：刺胞動物ヒドロ虫綱のClytiaクラゲは光状態の変化(暗状態から明状態)に応じて毎日、卵成熟を開始し放卵に至る。本研究では、Clytiaクラゲ卵成熟誘起ホルモン(神経ペプチド)の放出・蓄積機構を明らかにする。

(1)クラゲ卵巣において神経ペプチド前駆体遺伝子から、神経ペプチドが作られること、(2)卵成熟開始前の卵巣では、卵成熟誘起ペプチドが卵巣上皮細胞に網目状に(散在神経様)に張り巡らされていること、(3)光刺激を与えると、卵成熟時にペプチド神経から放出される事が明らかになった。さらに、放卵した後の卵巣の神経ペプチドの蓄積のタイミングが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Marine hydrozoan jellyfish, *Clytia hemisphaerica*, induces oocyte maturation and spawning daily in response to changes in light condition (from dark to light). In this study, we found several features of neuropeptides as potential maturation-inducing hormones. Neuropeptides are derived from precursor genes in *Clytia* ovary. The mesh-like networks of neuropeptide-positive neurons appear in ovarian ectodermal epithelium before the initiation of oocyte maturation. The neuropeptides are released from them in response to light stimulus. Finally, we obtained the time course and timing of accumulation of neuropeptides after the previous spawning.

研究分野：生殖生物学

キーワード：卵成熟 放卵 神経ペプチド ホルモン クラゲ 刺胞動物

1. 研究開始当初の背景

(1) クラゲは進化過程において早期に他の3胚葉性の高等動物と分岐した、原始的な動物である。一般に、クラゲの放卵・放精は、明暗周期に伴う光刺激により引き起こされる。メスでは、光刺激により卵巣内の卵母細胞が卵成熟(減数分裂)を開始し、卵成熟を終えてから放出されてくる。一方、オスでは、光刺激により精巣内の精子が運動性を得て放出されてくる。このように、放卵・放精刺激は明らかになっているが、クラゲの放卵・放精の制御に焦点をあてた研究はほとんど行われておらず、この下流のシグナル伝達経路はほとんど明らかになっていなかった。

(2) 私たちの研究室では、いくつかのクラゲのライフサイクルを研究室で完全に制御することにより、性成熟した個体を一年を通して毎日実験に用いることができる体制を整えてきた。一方で、クラゲがどのようにして毎日の放卵を可能にしているのか、この基本的な疑問にはまだ答えられていない。近年、私たちはその端緒となるクラゲの卵成熟誘起物質が特定の神経ペプチドである事を見いだした。そのため、神経ペプチドを作り出す、前駆体遺伝子解析および、神経ペプチドに対する特異的な抗体を得る事が出来たため、この神経ペプチドの動態を明らかにする本研究課題を着想した。

2. 研究の目的

(1) 光刺激から開始するクラゲ卵成熟機構の全容を明らかにすることを最終目的としている。本研究課題ではまず、神経ペプチド前駆体遺伝子の解析を行う。

(2) 卵成熟を誘起する神経ペプチドの蓄積・合成がいつどこで起こっているかを特定する。

(3) 再度蓄積された神経ペプチドが、前回の放卵後いつから光刺激に応じるようになるのかを明らかにする。これにより、光刺激で神経

細胞から放出されるクラゲ卵成熟誘起ホルモン放出メカニズムを提示する。

3. 研究の方法

(1) クラゲESTデータベースを用いて Blast検索により、ペプチド前駆体遺伝子を探索する。また、卵巣を卵巣外胚葉、卵巣内胚葉、卵母細胞に分け、トランスクリプトーム解析を行い、発現部位を特定する。さらに、ペプチド前駆体遺伝子の *in situ* 解析およびqPCR解析を行う事で、発現部位および発現量の特定を行う。

(2) クラゲ卵成熟誘起ペプチドに対する抗体を作成する。作成した抗体は精製し、抗原となるペプチドとのみ結合することをELISA法で確認する。免疫組織化学法を用いて、クラゲ卵成熟誘起ペプチドの発現部位を特定する。放出・蓄積のタイミングに関しては、光刺激から一定の時間経過したクラゲ卵巣を固定し、免疫組織化学法を用いてシグナルの有無、強弱を計測する。

(3) クラゲは毎日(24時間おきに)放卵を起こすが、放卵後の卵巣がいつから放卵が可能になるか、放卵から一定時間経過したクラゲ卵巣に光刺激を与え放卵の有無から確認する。また、放卵可能になったタイミングには卵成熟誘起神経ペプチドが蓄積されていることを確認する。

4. 研究成果

(1) クラゲESTデータベースからペプチド前駆体遺伝子を探索したところ、予想ペプチド前駆体遺伝子は10個存在することが明らかになった。このうち、2個のペプチド前駆体遺伝子から作り出されると予想されるクラゲ卵成熟誘起効果を持つことが分かった。さらに、卵巣外胚葉、卵巣内胚葉、卵母細胞のトランスクリプトーム解析から、クラゲ卵成熟誘起ペプチド前駆体遺伝子は卵巣外胚葉に発現している事が分かった。また、*in situ* 解析の結

果からもこの遺伝子が卵巣外胚葉上皮組織中に発現していることを明らかにした。

(2) 免疫組織化学法により、クラゲ卵成熟を誘起ペプチドは、神経ペプチドである事が明らかとなった。卵巣に光刺激を与えると、放出されることを免疫組織化学および生理実験により確認した。また、放卵後6時間経過した卵巣では、神経ペプチドが一部合成・蓄積されており、12時間後には放卵直前と変わらない程度まで、合成・蓄積が行われている事が明らかになった。

(3) 放卵後に蓄積された神経ペプチドが、前回の放卵から18時間後に放出可能になることが明らかになった。一方で、それ以前(放卵後2時間から18時間の間)で、いつから神経ペプチドの放出が可能なのかという点については疑問が残った。

以上の結果から、クラゲの卵成熟誘起物質である神経ペプチドは、光刺激により卵成熟開始時に放出され卵成熟誘起ホルモンとして機能し、次の放卵までに再び比較的早期に蓄積される事が分かった。動物の卵成熟誘起ホルモンとして神経伝達物質を使っている動物は、現段階ではクラゲだけである。これは、動物の進化の過程において初めて神経系を獲得したクラゲが卵成熟過程に神経を利用しはじめた事を示唆しており、動物の卵成熟開始機構の「原型」および「進化」を理解する上で大きな意義をもつと考えられる。

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 3 件)

Deguchi R, Takeda N, Stricker SA., Calcium signals and oocyte maturation in marine invertebrates. *Int J Dev Biol.* 59(7-9), 271-80, 2015
doi:10.1387/ijdb.150239ss. 査読有り

Takahashi T, Takeda N., Insight into the molecular and functional diversity of Cnidarian neuropeptides. *Int J Mol Sci.* 6(2), 2610-2625, 2015

doi:10.3390/ijms16022610. 査読有り

Arakawa M, Takeda N, Tachibana K, Deguchi R., Polyspermy block in jellyfish eggs: Collaborative controls by Ca(2+) and MAPK. *Dev Biol.* 392(1), 80-92, 2014
doi:10.1016/j.ydbio.2014.04.020.
査読有り

〔学会発表〕(計 7 件)

竹田典代, 光に制御されるクラゲの卵成熟および放卵開始機構, 第40回日本比較内分分泌学会第37回日本比較生理生化学会合同大会 2015年12月11-13日, 「広島アステールプラザ(広島県・広島市)」招待講演

竹田典代, 出口竜作, クラゲ卵成熟誘起ホルモン, 日本動物学会第86回大会, 2015年9月17-19日, 「朱鷺メッセ(新潟県・新潟市)」

山川奈帆美, 星尚仁, 石森彩希, 竹田典代, 出口竜作, 東北地方に生息するエダアシクラゲの放卵・放精の光条件, 日本動物学会平成27年度東北支部大会, 2015年8月8-9日, 「東北大学農学部雨宮キャンパス」宮城県・仙台市

Takeda N, Komatsu A, Deguchi R., Neuropeptide regulates initiation of oocyte maturation and sperm release in the hydrozoan jellyfish *Cladonema pacificum*, Oocyte Maturation and Fertilization IV, 2015年6月15-18日, 「浅虫海洋生物学教育研究センター(青森県・青森市)」招待講演

Arakawa M, Takeda N, Tachibana K, Deguchi R., Establishment of the sperm-egg fusion site during oocyte maturation in the jellyfish *Cytaeis uchidae*, Oocyte Maturation and Fertilization IV, 2015年6月15-18日, 「浅虫海洋生物学教育研究センター(青森県・青森市)」招待講演

小松飛鳥，出口竜作，経塚啓一郎，竹田典代，エダアシクラゲ放精誘起物質の作用機構，日本動物学会第 85 回大会，2014 年 9 月 11-13 日「東北大学川内北キャンパス（宮城県・仙台市）」

荒川美緒、竹田典代、出口竜作、立花和則，MAP キナーゼによるタマクラゲ卵の精子受容の制御，日本動物学会第 85 回大会，2014 年 9 月 11-13 日，「東北大学川内北キャンパス、（宮城県・仙台市）」

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.biology.tohoku.ac.jp/lab-www/asamushi/profile/pg281.html>

6．研究組織

(1)研究代表者

竹田 典代 (Takeda Noriyo)

東北大学・大学院生命科学研究科・助教(研究特任)

研究者番号：40433742