

令和元年6月20日現在

機関番号：74408

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14772

研究課題名(和文) 脊索動物ホヤの卵胞成長におけるカテプシンファミリー遺伝子非コードRNAの役割

研究課題名(英文) Functions of antisense RNAs associated with cathepsins in the gonadal follicles of the protochordate, *Ciona intestinalis*

研究代表者

酒井 翼 (Sakai, Tsubasa)

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・研究員

研究者番号：40414122

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：RNAプローブビーズを用いたRNAseq解析において、ホヤ初期卵胞からCi-ctsb, d, h, lのmRNAと相補的な配列を示すasRNAを同定し、mRNAのexonと対応するasRNAや、複数のイントロンを保持したasRNAを同定した。Ci-ctsb及びCi-ctsh mRNAの3'非翻訳領域と相補的に重複する領域を有するasRNAにおいて、それぞれ78、51アミノ酸残基のペプチドがコードされており、これらの特異的抗体を用いた免疫染色でそれぞれ卵黄形成期卵胞のtest細胞で発現することが示され、CTS関連asRNAの非コードRNAとコーディングRNAの両面が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RNAビーズとRNAseqを組み合わせた独創的方法でカタコウレイボヤ(*Ciona intestinalis*)のカテプシン(CTS)ファミリー遺伝子のアンチセンス(as)RNAを同定し、更にCi-ctsb、およびhの3'非翻訳領域と相補的配列を有するasRNAに翻訳領域を見出した。そして、特異的抗体によって卵黄形成期卵胞のtest細胞にこれらの発現が示唆され、asRNAの非コードとコーディングによる卵胞制御の可能性が示されたことは、asRNAの生物学的意義を考える上で極めて大きい。

研究成果の概要(英文)：In RNA-seq analysis using sense RNA probe beads, we identified antisense (as)RNA showing a sequence complementary to the mRNA of Ci-ctsb, d, h and l from early stage follicles of the ascidian, *Ciona intestinalis*. We found 78 and 51-amino acid residue peptides predicted to be encoded in the asRNA of Ci-ctsb and h. The immunostaining with specific antibodies showed that the translation products are expressed in test cells of the follicles of vitellogenic stage.

研究分野：進化生物学

キーワード：進化 RNA 卵胞

1. 研究開始当初の背景

カテプシン(以下 CTS と記す)は主に細胞内小器官リソソームに局在する酸性プロテアーゼで、アスパラギン酸プロテアーゼ 2 種類 (CTS-D、E) の他、CTS-B、L、H などシステインプロテアーゼの 11 種類があり、オートファジーといった生物普遍的現象への関与や、魚類卵における卵黄タンパク前駆体・ピテロジェニンのプロセッシング等が報告されている。CTS ファミリーには単細胞生物から植物、高等動物に至るまで広く保存される CTS-B、L といった分子種がある一方で、脊索動物の出現前後において CTS-L から分岐した CTS-H のように脊索動物門においてのみ見出される種特異的分子種が存在するが、CTS 分子種と生物進化の関係は明確にはされていない。申請者らはこれまでの研究で、脊索動物モデルの一つ、尾索動物カタユレイボヤ (以後ホヤ) を用いて、脊椎動物では未解明となっているゴナドトロピン非依存期の卵胞成長制御に CTS-D の活性化が必須であること発見した。これを受けて、ホヤ卵巣における CTS ファミリーの遺伝子発現を 2 重 *in situ* hybridization (ISH) によって解析した所、卵黄形成期卵胞の test 細胞 (脊椎動物の顆粒膜細胞に相当すると考えられる) 特異的に CTS-B、D、H、L 遺伝子の mRNA と、その相補的な塩基配列を持つアンチセンス (as) RNA が共発現していることを見出した。卵胞成長ステージ特異的な発現から、これら asRNA の非コード RNA として転写もしくは翻訳の制御による卵胞機能への関与が示唆されたが、これまでに CTS 遺伝子の asRNA による卵胞制御はいかなる生物種においても報告が無く、そのためホヤ卵胞における CTS ファミリー asRNA の存在および機能は未知であった。

2. 研究の目的

上記の背景、そして、尾索動物という脊椎動物に最も近い脊索動物というホヤの進化系統樹上の位置から、本研究ではカタユレイボヤ卵胞で発現する CTS ファミリー遺伝子関連 asRNA を同定し、その機能を解明することで、脊索動物門に通底すると考えられる CTS 関連 asRNA による卵胞成長制御機構を明らかにする端緒を開くことを目的とした。

3. 研究の方法

そこで本研究計画では、ホヤの卵黄形成期卵胞で発現する CTS 関連 asRNA を同定するために、*Ci-ctsb*, *d*, *h*, *l* 遺伝子について、それぞれ約 400bp からなる 3 領域のビオチン標識化 sense RNA probe を *in vitro* 合成し、積層ふるいでワンステップ分別した成長ステージ毎のホヤ卵胞 total RNA からこれらの sense probe と結合する asRNA をアビジンプーにより回収した。そして、回収した RNA からストランド方向を特定可能なイルミナ社の TruSeq Stranded RNA kit を用いて cDNA を合成し、HiSeq による RNAseq で *Ci-ctsb*, *d*, *h*, *l* sense RNA と特異的に結合した asRNA の塩基配列を決定した。更に、バリエーション等、詳細な塩基配列解析が必要とされる部位については、TA クローニング法により卵胞から asRNA をクローニングし、高精度に塩基配列の解読を行った。

4. 研究成果

上記方法による sense RNA ビーズを用いた RNAseq 解析において、oligo-dT プローブを用いては検出されなかった *Ci-ctsb*, *d*, *h*, *l* の翻訳領域、及び非翻訳領域と相補的な配列を示す asRNA を見出した。この結果に基づいて *Ci-ctsb*, *d*, *h*, *l* asRNA の 1-1.5kbp 長の部分配列をホヤ初期卵胞からクローニングし、配列解析を行った所、*Ci-ctsb*, *d*, *h*, *l* mRNA の exon と対応する asRNA や、複数のイントロンを保持した asRNA を同定した。

さらに、*Ci-ctsb* 及び *Ci-ctsh* mRNA の 3' 非翻訳領域と相補的に重複する領域を有する asRNA において、それぞれ Vacuolar-type H⁺ ATPase Subunit に相同性を示す 78 アミノ酸残基のペプチド、そして機能未知の 51 アミノ酸残基のペプチドのコードが予測された。そこで、これらの翻訳が予測されるアミノ酸配列の中から 20 残基を特異的に認識する抗体を作製した。これらの特異的抗体を用いた免疫染色でそれぞれの翻訳産物が、卵黄形成期卵胞の test 細胞と卵胞膜、そして test 細胞で発現することが示され、*Ci-ctsb* や *Ci-ctsh* 非翻訳領域の asRNA にペプチドがコーディングされており、カタユレイボヤの卵黄形成期卵胞で何らかの機能を発揮することが示唆された。

以上の結果は、CTS 関連 asRNA は、非コード RNA として転写・翻訳の制御のみならず、asRNA 由来ペプチドによって卵胞機能を制御する可能性を示し、CTS 関連 asRNA と卵胞成長の新たな関係を提示する成果を得ることができた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

1. Invertebrate Gonadotropin-Releasing Hormone-Related Peptides and Their Receptors: An Update. Sakai T, Shiraishi A, Kawada T, Matsubara S, Aoyama M, Satake H. *Front Endocrinol.* 2017 8:217. doi: 10.3389/fendo.2017.00217

[学会発表] (計 8 件)

1. 脊索動物ホヤの初期卵胞におけるカテプシン遺伝子の多様な RNA 発現

○酒井 翼、松原 伸、白石 慧、川田剛士、高橋俊雄、佐竹 炎
日本比較内分泌学会若手企画シンポジウム (仙台)
2018. 11. 9

2. 尾索動物ホヤの初期卵胞におけるカテプシン H 非翻訳領域のアンチセンス RNA 発現

○酒井 翼、松原 伸、白石 慧、川田剛士、高橋俊雄、佐竹 炎
第 41 回日本分子生物学年会 (横浜)
2018. 11. 28

3. ホヤの初期卵胞におけるカテプシン H 非翻訳領域のアンチセンス RNA 発現

○酒井 翼、松原 伸、白石 慧、川田剛士、高橋俊雄、佐竹 炎
日本動物学会第 89 回大会 (札幌)
2018. 9. 13

4. ホヤ卵胞成長におけるカテプシンファミリー遺伝子関連非コード RNA 発現

○酒井 翼、松原 伸、白石 慧、川田剛士、高橋俊雄、佐竹 炎
第 8 回ペプチド・ホルモン研究会 (長浜)
2017. 12. 16

5. ホヤ卵胞におけるカテプシンファミリー遺伝子関連 mRNA とアンチセンス RNA 発現

○酒井 翼、佐竹 炎

第 40 回日本分子生物学会年会 (2017 年度生命科学系学会合同年次大会) (神戸)

2017. 12. 6

6. ホヤ初期卵胞のカテプシンファミリー遺伝子関連 RNA 発現解析

○酒井 翼、白石 慧、佐竹 炎

日本動物学会第 88 回大会 (富山)

2017. 9. 21

7. 脊索動物ホヤの卵黄形成期卵胞で発現する cathepsin 関連 antisense RNA の同定

○酒井 翼、佐竹 炎

第 39 回日本分子生物学会年会 (横浜)

2016. 11. 30

8. ホヤ卵胞で発現する cathepsin 遺伝子関連 antisense RNA の同定

○酒井 翼、佐竹 炎

日本動物学会 第 87 回 (沖縄)

2016. 11. 17

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等 : 無し

6. 研究組織

(1) 研究分担者 : 該当者無し

研究分担者氏名 :

ローマ字氏名 :

所属研究機関名 :

部局名 :

職名 :

研究者番号 (8 桁) :

(2)研究協力者：該当無し

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。