

令和元年6月18日現在

機関番号：74408

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18581

研究課題名(和文) MAPKシグナリングを起点とした原索動物の排卵メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of MAPK-based ovulation mechanism of *Ciona intestinalis*

研究代表者

松原 伸 (MATSUBARA, Shin)

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：70710747

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：卵成熟・排卵を含む卵胞成長機構の進化・多様化は、生物種の存続と拡大という点において重要な問題である。カタユウレイボヤは脊椎動物と同じ脊索動物に分類されるため、脊索動物の起源的な卵成熟・排卵制御機構を持つと考えられている。しかし、ホヤの卵成熟・排卵を制御する内在の因子は永らく不明のままであった。本研究では神経ペプチドとMAPKシグナリングがホヤの卵成熟と排卵を制御する分子メカニズムを明らかにした。本研究の成果は脊索動物における卵成熟・排卵制御機構の普遍性および、ホヤと脊椎動物における機構の進化・多様化の解明に繋がるものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵成熟や排卵時における卵への変異は生物個体にとって致命的なだけでなく、その蓄積は最終的に亜種や新種の出現に繋がることから、卵成熟・排卵制御機構の普遍性と進化の本質は『生物多様性』の仕組みの一つである。本研究の成果であるカタユウレイボヤの卵成熟・排卵制御機構は、脊椎動物にホヤを加えた脊索動物全体で保存された機構や、ホヤと脊椎動物のそれぞれで起こった進化・多様化の解明に繋がるものである。

研究成果の概要(英文)：Ascidians, invertebrate chordates and the closest living relatives of vertebrates, are thought to have conserved prototypic systems that regulate oocyte maturation and ovulation during the evolutionary process. However, neither the regulatory endogenous factors nor the relevant molecular mechanisms underlying oocyte maturation or ovulation have been elucidated. In this study, we substantiated the central roles of a neuropeptide and MAPK signaling in oocyte maturation and ovulation in the urochordate, *Ciona intestinalis*. In light of the critical phylogenetic position of *Ciona*, the present study paves the way for investigation of the evolutionary process of the peptidergic regulation of oocyte maturation and ovulation in chordates.

研究分野：比較内分泌学

キーワード：カタユウレイボヤ 卵成熟 排卵 神経ペプチド MAPK シグナリング

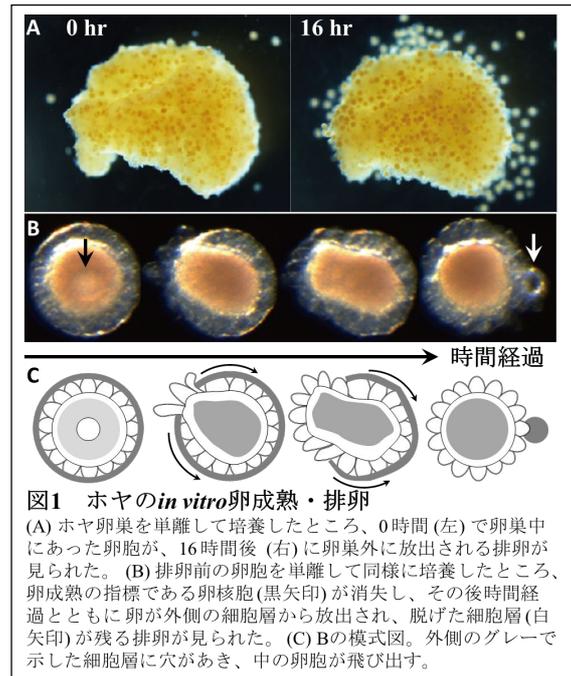
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の卵成熟・排卵は「視床下部 - 脳下垂体 - 生殖腺」いわゆる「HPG axis」によって制御されており、脊椎動物の普遍的な機構として現在も詳細に解析が行われている。一方で HPG axis が存在しない無脊椎動物では、昆虫類や棘皮動物などを用いて研究が行われており、排卵を制御するシグナリング系やホルモンなどが明らかになっている。しかしながら、これらの無脊椎動物と脊椎動物は系統分類学的な距離が遠く、HPG axis の獲得によって脊椎動物の卵成熟・排卵の分子メカニズムがどのように進化・多様化してきたかは未解明である。

研究代表者は研究開始当初、原索動物であるカタコウレイボヤ (ホヤ) の排卵を、*in vitro* で評価出来る実験系を世界で初めて構築した。すなわち、ホヤの卵巣を *in vitro* で培養すると、卵巣内で成熟した多数の卵胞が卵巣外に放出された (図 1A)。さらに卵巣から単離した排卵前の卵胞でも同様に、卵胞を囲む外側の細胞層が脱げる排卵現象が確認できた (図 1B, C)。ホヤには HPG axis による排卵制御機構は存在しないため、脊椎動物が HPG axis を獲得する以前の、起源的な排卵機構が存在すると考えられるが、ホヤ排卵の分子メカニズムは未解明であった。

そこで研究代表者はホヤ排卵の分子メカニズムの解明を目的とし、様々な成長段階のホヤ卵胞を用いて RNA-seq 解析を行った。その結果排卵前のホヤ卵胞でプロスタグランジン合成遺伝子等の、脊椎動物で排卵への関与が既知の遺伝子発現が上昇していた。さらに、脊椎動物では排卵への関与の報告例がほとんどない MAP キナーゼ (MAPK) 遺伝子群や神経ペプチド遺伝子群の発現変動が確認された。また、脊椎動物で報告されているものとは異なるプロテアーゼ遺伝子群の発現上昇も認められた。これら因子の阻害剤を上記ホヤ卵胞の *in vitro* 排卵評価系に添加すると排卵が有意に阻害されることから、これらの遺伝子がホヤの排卵に関わることがわかった。したがって MAPK 遺伝子群とプロテアーゼ遺伝子群に着目してホヤ排卵メカニズムを解明することで、脊椎動物の垣根 (HPG axis) を越えてホヤでも保存されている機構と、脊椎動物でも未知の排卵の分子メカニズムの両方を解明できると考えるに至った。そこで本研究では研究開始当初、MAPK シグナリングを起点としたプロテアーゼ遺伝子群によるホヤ排卵メカニズムの解明を目的としたが、その後、MAPK シグナリングを制御するのは神経ペプチドである可能性が示唆されたため、2017 年度からは特別研究員 (PD) としての研究課題「脊索動物の卵成熟・排卵機構の起源は、神経ペプチドによる制御か？」(17J10624)と連携し、神経ペプチドおよび MAPK シグナリングによるホヤ卵成熟・排卵制御機構の解明を目的とした。



2. 研究の目的

本研究の目的は、以下の3点を解決することで、『神経ペプチドおよび MAPK シグナリングによるホヤの卵成熟・排卵制御ネットワーク』を解明することである。

ホヤの卵成熟・排卵を制御する神経ペプチドの同定

神経ペプチド、MAPK シグナリング→卵成熟因子カスケードの決定

排卵実行酵素の同定および神経ペプチド、MAPK シグナリング→排卵酵素カスケードの決定

3. 研究の方法

上記 *in vitro* 卵成熟・排卵評価系 (図 1) に神経ペプチドや各種阻害剤などを加えて培養し、ホヤの卵成熟・排卵に対する作用を明らかにし、分子生物学的手法や生化学的手法を用いてこれらの分子メカニズムを検証した。

4. 研究成果

ホヤの卵成熟・排卵を制御する神経ペプチドの同定

まず全ての成長段階で分画したホヤの卵胞を用いた RNA-seq 解析で、卵成熟・排卵に向けて MAPK シグナリングの ERK 発現が上昇したため、この MEK/ERK 阻害剤処理によってホヤの

卵成熟・排卵に対する影響を調べたところ、卵成熟・排卵の両方が阻害されることがわかった。次に MEK/ERK 阻害によって卵成熟・排卵を阻害した卵胞を用いて RNA-seq 解析を行い、神経ペプチドの受容体遺伝子の発現が変動する事を見出した。そこで次にそれらの神経ペプチドを、卵成熟・排卵前のホヤ卵胞に添加・培養し、24 時間後にその作用を調べたところ、4 つのペプチドはホヤの排卵のみを促進させ、1 つのペプチドは卵成熟と排卵の双方を促進させることが明らかになった。したがって、卵成熟と排卵の両方を促進させるペプチドに注目し、詳細な解析を行うことにした。脊椎動物において、この神経ペプチドは MAPK シグナリングを制御する報告があったため、神経ペプチド処理後 0 分から 60 分までの各点で卵胞を回収し、リン酸化 ERK に対する抗体を用いて免疫染色を行った。その結果、神経ペプチド処理後 5-10 分で ERK リン酸化レベルが有意に上昇することがわかり、神経ペプチドが MAPK シグナリングを介してホヤの卵成熟・排卵を制御することが証明された。

神経ペプチド、MAPK シグナリング→卵成熟因子カスケードの決定

多くの脊椎動物と無脊椎動物において、卵成熟の引き金を引く因子は MPF (Maturation Promoting Factor) であることがわかっている。したがって、神経ペプチドによるホヤ MPF の直接的な活性化の検出を試みたが、実験に十分なタンパク質量が得られなかったため、阻害剤を用いた実験に切り替えた。ホヤ内在の MPF 活性を *in vitro* で抑制する阻害剤を、成熟直前のホヤ卵胞に添加したところ、ホヤの卵成熟は有意に抑制されることがわかった。また、神経ペプチドと阻害剤との同時処理によって、ペプチドによる卵成熟誘導効果が打ち消されることも明らかにした。さらに、ペプチドによって成熟を誘導した卵を用いて人工授精実験を行うと、ペプチド未処理群に比べて未成熟卵の割合が減少し、幼生まで発生が進行した胚の割合が有意に増加した。この結果により、神経ペプチドによって卵は確かに成熟し、受精能を獲得していることが示され、「神経ペプチド→MEK/ERK→MPF→卵成熟」の制御カスケードが明らかになった (図 2)。

排卵実行酵素の同定および神経ペプチド、MAPK シグナリング→排卵酵素カスケードの決定

一部の脊椎動物において、排卵を実行する酵素はマトリクスメタロプロテアーゼ (MMP) であることがわかっている。そこで、MEK/ERK 阻害によって排卵が抑制された卵胞を用いて、ホヤの存在する 6 種類の MMP 遺伝子の発現を RNA-seq 解析と qRT-PCR 解析で調べたところ、1 つの MMP 遺伝子の発現のみが未処理群に比べて減少していることがわかった。興味深いことにこの MMP 遺伝子の発現は、神経ペプチド処理によって排卵を促進させた卵胞において 4 倍程度発現が上昇していた。そこで、この MMP の組換えタンパク質の活性を *in vitro* で抑制させる阻害剤を排卵前のホヤ卵胞に添加したところ、未処理群に比べて排卵率が有意に減少することがわかった。また、神経ペプチドと阻害剤との同時処理によって、ペプチドによる排卵誘導効果が打ち消されることも明らかにした。さらに *in situ* hybridization によってペプチドの受容体遺伝子、ホヤ ERK 遺伝子は卵母細胞に存在する事および、免疫染色によって MMP 遺伝子は卵母細胞と排卵時に破裂する濾胞細胞に局在することを突き止めた。加えて蛍光標識コラーゲンをを用いた *in situ* zymography によって、基質の切断がその濾胞細胞で起こることも明らかにした。以上の結果により、「神経ペプチド→MEK/ERK→MMP→コラーゲン分解→排卵」の制御カスケードが明らかになった (図 2)。

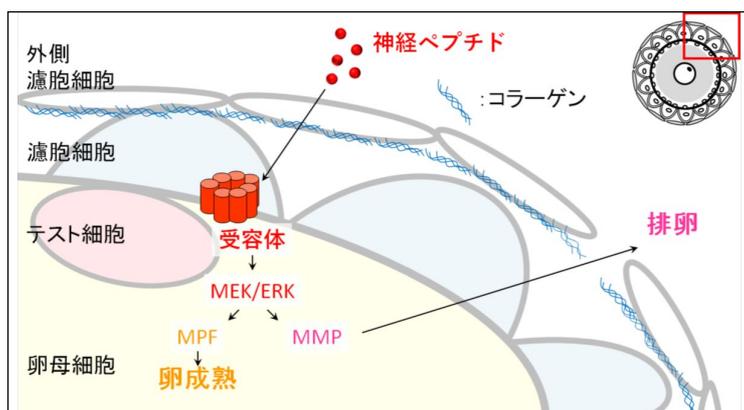


図2 ホヤの卵成熟・排卵制御モデル

神経ペプチドは卵母細胞に発現する受容体に結合してMEK/ERKを活性化する。その後、MPFの活性化を介して卵成熟を促進するとともに、MMPの発現を誘導し、外側濾胞細胞のコラーゲンを分解することによって排卵を促進する。

本研究は、永らく不明だったホヤの卵成熟および排卵の制御因子を同定し、その制御メカニズムを解明したものであり、脊椎動物にホヤを含めた脊索動物における卵成熟・排卵制御機構の普遍性およびホヤと脊椎動物における機構の進化・多様化の解明に繋がる研究である。以上の成果を全てまとめて論文を執筆し、現在は学術誌に投稿中である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

Matsubara S, Shiraiishi A, Sakai T, Okuda T, Satake H. Heterodimerization of the prostaglandin E2 receptor EP2 and the calcitonin receptor CTR. PLoS One, 2017, 12:e0187711. (査読有)

Kurihara M, Otsuka K, **Matsubara S**, Shiraishi A, Satake H, Kimura AP. A Testis-Specific Long Non-Coding RNA, lncRNA-Tcam1, Regulates Immune-Related Genes in Mouse Male Germ Cells. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2017, 8:299. (査読有)

Kimura AP, Yoneda R, Kurihara M, Mayama S, **Matsubara S**. A Long Noncoding RNA, lncRNA-Amhr2, Plays a Role in Amhr2 Gene Activation in Mouse Ovarian Granulosa Cells. *Endocrinology*. 2017, 158:4105-4121. (査読有)

Sakai T, Shiraishi A, Kawada T, **Matsubara S**, Aoyama M, Satake H. Invertebrate Gonadotropin-Releasing Hormone-Related Peptides and Their Receptors: An Update. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2017, 8:217. (査読有)

Kase Y, Ikari T, Sekiguchi T, Sato M, Ogiso S, Kawada T, **Matsubara S**, et al., Sardine procalcitonin amino-terminal cleavage peptide has a different action from calcitonin and promotes osteoblastic activity in the scales of goldfish. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2017, 211:77-83. (査読有)

Maruyama Y, **Matsubara S**, Kimura AP. Mouse prolyl oligopeptidase plays a role in trophoblast stem cell differentiation into trophoblast giant cell and spongiotrophoblast. *Placenta*. 2017, 53:8-15. (査読有)

〔学会発表〕(計5件)

松原 伸、白石 慧、大杉 知裕、川田 剛士、佐竹 炎「バソプレシン様ペプチドによるホヤの卵成熟・排卵制御機構」2018年 日本動物学会 第89回札幌大会

松原 伸、白石 慧、酒井 翼、奥田 利美、佐竹 炎「顆粒膜細胞における新規 GPCR ヘテロダイマー-EP2-CTR の検出とその機能変換」2017年 日本動物学会 第88回富山大会

松原 伸、白石 慧、佐竹 炎「脊索動物の起源的生物、ホヤの排卵制御機構の解明」2017年 日本比較内分泌学会 第42回奈良大会

松原 伸「脊索動物の起源的排卵機構と GnRH の役割の解明」2016年 日本比較内分泌学会 第41回神奈川大会 大会実行委員会主催シンポジウム「ゴナドトロピン分泌調節から離れて見る GnRH」

Matsubara S, Shiraishi A, Satake H. “MAPK signaling regulates oocyte maturation and ovulation of *Ciona intestinalis*” The 8th Congress of the Asia and Oceania Society for Comparative Endocrinology (AOSCE), Seoul, Korea

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.sunbor.or.jp/>

6. 研究組織

(1)研究協力者

研究協力者氏名：佐竹 炎

ローマ字氏名：SATAKE, Honoo

研究協力者氏名：白石 慧

ローマ字氏名：SHIRAISHI, Akira

研究協力者氏名：大杉 知裕

ローマ字氏名：OSUGI, Tomohiro

研究協力者氏名：川田 剛士

ローマ字氏名：KAWADA, Tsuyoshi

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。