

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：74408

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16182

研究課題名（和文）新規卵巢由来ペプチドホルモンの同定とその生物学的役割の解明

研究課題名（英文）Identification of ovarian peptide hormones and their biological function in *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） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：脊椎動物においては、卵巢はそれ自身が内分泌器官として卵胞成長を制御することがわかっているが、脊索動物に最も近縁な無脊椎動物であるカタユレイボヤにおいては卵巢自身の内分泌機構は未解明であった。本研究成果によって、ホヤの卵巢は組織特異的なペプチドホルモン様遺伝子を発現している事が明らかになった。また、質量分析計によってペプチドを同定することに成功し、卵巢特異的な機能を持つ事が強く示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脊椎動物とは異なり、ほとんどの無脊椎動物は開放血管系で循環器系が未発達であることから、卵巢を含む末梢器官は中枢神経系からの軸索投射によって直接制御されると考えられてきた。本研究の成果によって、無脊椎動物であるホヤの卵巢はペプチドホルモンを合成・分泌し、中枢神経系による制御系に加えて卵巢自身による内分泌制御系が存在することが強く示唆された。本研究により、内分泌器官としての卵巢の機能および進化の道筋を解明する上で重要な知見を得ることができた。

研究成果の概要（英文）：In vertebrates, the ovary plays pivotal roles in oocyte growth as an endocrine organ. On the other hand, in *Ciona intestinalis* type A, the closest living invertebrates to vertebrates, the endocrine roles of the ovary remained to be elucidated. In this study, we identified the ovary-specific peptide hormone-like gene. We also identified deduced amino acid sequence from the *Ciona* ovary by a series of peptide extraction and purification followed by mass spectrometry analyses. These results suggest possible endocrine roles of the ascidian ovary for oocyte growth.

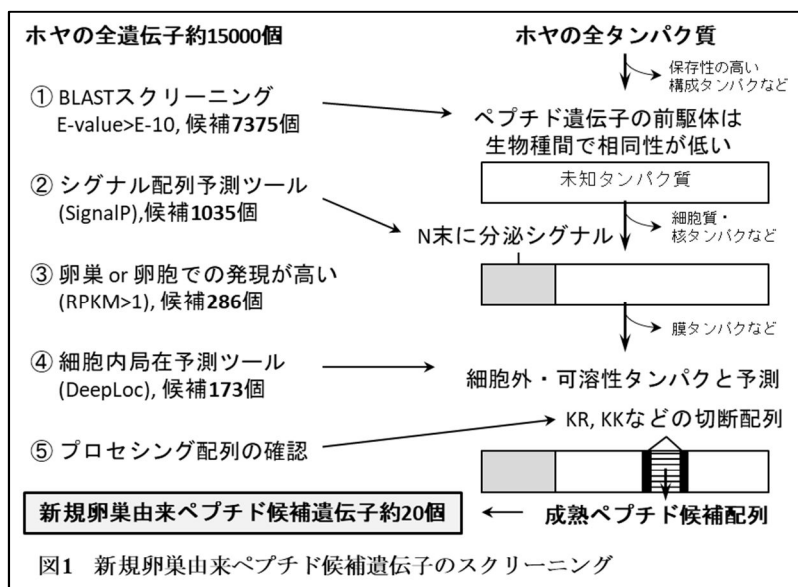
研究分野：比較内分泌学、生殖内分泌学

キーワード：カタユレイボヤ 卵巢 卵成熟 排卵 神経ペプチド ペプチドホルモン

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の卵胞成長は、中枢神経（視床下部と下垂体）と卵巣による内分泌制御機構が広く知られるのに対し [Rechards and Pangas, 2010, J. Clin. Invest.], ホヤには下垂体に相当する器官が無いため、中枢神経からのペプチドホルモン（ペプチド）によって直接卵胞成長が制御されると考えられている。研究代表者はこれまでに、ホヤの中枢神経で同定されている脊椎動物型のペプチドのうち [Kawada et al., 2011, Endocrinology], バソプレシン様ペプチドが卵成熟と排卵を促進させる機構を解明し、これが脊索動物の起源的な機構である可能性を示した [Matsubara et al., 2019, eLife]。また、興味深いことに中枢神経に発現するペプチドのうち、2つが卵巣でも発現していることを発見した。そこで「ホヤ卵巣は内分泌器官として機能する」という新たな視点で、ホヤ卵巣の RNA-seq データから新規卵巣ペプチド遺伝子の候補を探索したところ、図1に示す、5つの基準を満たす約20個の新規卵巣ペプチド遺伝子候補を同定した(図1)。加えて、多数のリガンド未知の受容体候補遺伝子が卵巣で高発現していることも発見した。このことは、ホヤ卵巣はペプチドを産生し、パラクラインもしくはオートクラインに卵胞成長を制御することを強く示唆している。しかし、ペプチド遺伝子が本当に成熟したペプチドとして卵巣に存在するのか、受容体遺伝子や卵胞成長における機能などは不明である。



### 2. 研究の目的

本研究の目的は、「ホヤの新規卵巣由来ペプチドとその受容体を同定し、卵胞成長に対する役割を明らかにすること」であり、以下の3点の解決に取り組んだ。

- 新規卵巣由来ペプチドの検出
- 受容体遺伝子の同定と発現パターン解析
- 卵胞成長における機能解析

### 3. 研究の方法

の新規卵巣ペプチドの検出には、伝統的なメタノール酢酸抽出と各種カラムを用いて精製を行い、微量サンプル用液体クロマトグラフィー (nanoLC) に接続した高分解能精密質量 Orbitrap 質量分析計で分析した。

の受容体遺伝子の同定には機械学習を用いたペプチド-GPCR の相互作用予測器 PD-incorporated-SVM [Shiraishi et al., 2019, PNAS] を用いて受容体候補を予測し、細胞ベースのアッセイ系で相互作用を検証した。発現パターンの解析には、成体ホヤの各組織を用いて RNA-seq を行った。

の卵胞成長における機能解析には、単離した卵胞に対して新規卵巣ペプチド候補を処理し、RNA-seq 解析を行うことで遺伝子発現変動を解析した。

### 4. 研究成果

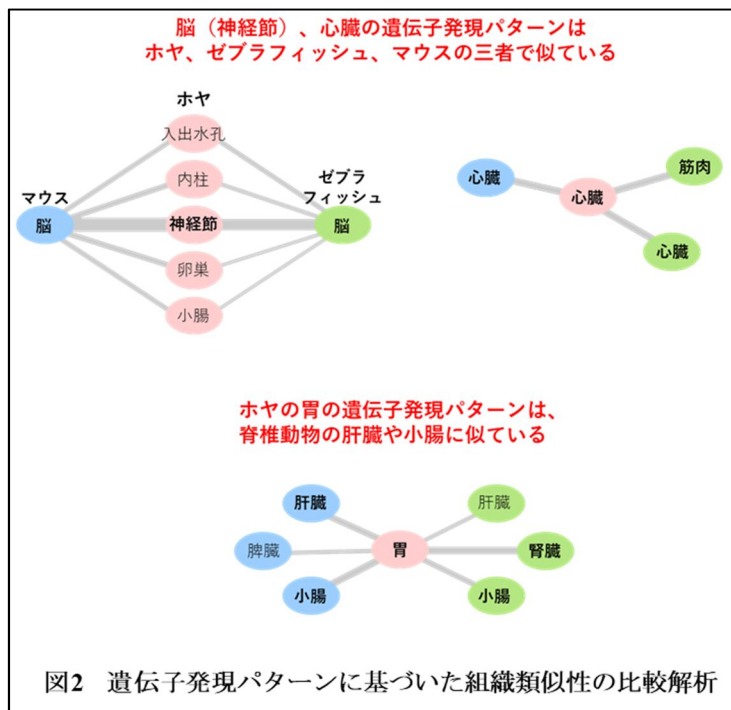
#### 新規卵巣由来ペプチドの検出

まず抽出したホヤの卵巣を液体窒素内ですり潰し、メタノール酢酸によって卵巣ペプチドを抽出した。次に、Sep-Pak によって粗精製後、ゲルろ過カラムによるサイズ分画を行った。その後、イオン交換カラムによる精製を行い、nanoLC-Orbitrap MS によって、RNA-seq によって存在が予測されたペプチドを含む約20種類の卵巣ペプチド候補を検出することができた。

#### 受容体遺伝子の同定と発現パターン解析

で検出した新規卵巣ペプチドの候補配列と、ホヤの GPCR 配列をクエリに、ペプチド—GPCR の相互作用予測器 PD-incorporated-SVM を用いて受容体の候補遺伝子を予測した。得られた 15 の候補遺伝子を培養細胞に発現させ、リガンドとの相互作用を細胞内カルシウムの動員で検証したところ、受容体の可能性が高い 4 つの GPCR を絞り込むことに成功した。

遺伝子発現パターン解析については、成体ホヤの 8 組織 11 サンプルを用いて RNA-seq 解析を行った。その結果、で同定した新規卵巣ペプチド候補の少なくとも 1 つは卵巣特異的に発現していることおよび 4 つの受容体遺伝子候補の組織発現分布を決定できた。さらに、組織特異的に発現する遺伝子を詳細に解析し、ゼブラフィッシュとマウスのホモログの組織発現分布を比較解析することで、遺伝子発現パターンの類似性に基づく各組織の進化的洞察を得た (図 2)。



#### 卵巣成長における機能解析

単離したホヤの卵巣に対して、で検出したペプチドを処理して 24 時間後のサンプルを用いて RNA-seq を行い、ペプチドによって発現が制御される遺伝子の候補を得た。多くは機能未知の遺伝子であり、卵巣ペプチドのホヤ特異的な機能の存在が示唆された。

これらの成果から、ホヤの卵巣には組織特異的に発現するペプチドが存在し、パラクライン・オートクラインに卵巣成長を制御することが強く示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Matsubara Shin, Shiraishi Akira, Osugi Tomohiro, Kawada Tsuyoshi, Satake Honoo	4. 巻 10
2. 論文標題 Fractionation of Ovarian Follicles and in vitro Oocyte Maturation and Ovulation Assay of Ciona intestinalis Type A	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BIO-PROTOCOL	6. 最初と最後の頁 e3577
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21769/BioProtoc.3577	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Mita Masatoshi, Osugi Tomohiro, Matsubara Shin, Kawada Tsuyoshi, Satake Honoo, Katayama Hidekazu	4. 巻 88
2. 論文標題 A relaxin like gonad stimulating peptide identified from the starfish Astropecten scoparius	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 34～42
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/mrd.23444	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Mita Masatoshi, Matsubara Shin, Osugi Tomohiro, Shiraishi Akira, Wada Azumi, Satake Honoo	4. 巻 15
2. 論文標題 A novel G protein-coupled receptor for starfish gonadotropic hormone, relaxin-like gonad-stimulating peptide	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0242877
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0242877	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Sakai Tsubasa, Yamamoto Tatsuya, Matsubara Shin, Kawada Tsuyoshi, Satake Honoo	4. 巻 21
2. 論文標題 Invertebrate Gonadotropin-Releasing Hormone Receptor Signaling and Its Relevant Biological Actions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 8544～8544
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21228544	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Bandara Thusitha A.M.K., Otsuka Kai, Matsubara Shin, Shiraishi Akira, Satake Honoo, Kimura Atsushi P.	4. 巻 534
2. 論文標題 A dual enhancer-silencer element, DES-K16, in mouse spermatocyte-derived GC-2spd(ts) cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1007 ~ 1012
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.10.049	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 MAYAMA Shota, HAMAZAKI Nobuhiko, MARUYAMA Yuki, MATSUBARA Shin, KIMURA Atsushi P.	4. 巻 66
2. 論文標題 Transcriptional activation of the mouse <i>Scd2</i> gene by interdependent enhancers and long noncoding RNAs in ovarian granulosa cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 435 ~ 444
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1262/jrd.2019-161	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Satake Honoo, Matsubara Shin, Shiraishi Akira, Yamamoto Tatsuya, Osugi Tomohiro, Sakai Tsubasa, Kawada Tsuyoshi	4. 巻 68
2. 論文標題 Neuropeptides, Peptide Hormones, and Their Receptors of a Tunicate, <i>Ciona intestinalis</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Results and Problems in Cell Differentiation	6. 最初と最後の頁 107 ~ 125
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-3-030-23459-1_5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsubara Shin, Shiraishi Akira, Osugi Tomohiro, Kawada Tsuyoshi, Satake Honoo	4. 巻 8
2. 論文標題 The regulation of oocyte maturation and ovulation in the closest sister group of vertebrates	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.49062	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Aoyama Masato, Shiraishi Akira, Matsubara Shin, Horie Kaoru, Osugi Tomohiro, Kawada Tsuyoshi, Yasuda Keiko, Satake Honoo	4. 巻 10
2. 論文標題 Identification of a New Theca/Interstitial Cell-Specific Gene and Its Biological Role in Growth of Mouse Ovarian Follicles at the Gonadotropin-Independent Stage	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Endocrinology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fendo.2019.00553	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nagasawa Kazue, Matsubara Shin, Satake Honoo, Osada Makoto	4. 巻 282
2. 論文標題 Functional characterization of an invertebrate gonadotropin-releasing hormone receptor in the Yesso scallop <i>Mizuhopecten yessoensis</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 General and Comparative Endocrinology	6. 最初と最後の頁 113201 ~ 113201
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ygcen.2019.06.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Satake Honoo, Matsubara Shin, Shiraishi Akira, Yamamoto Tatsuya, Osugi Tomohiro, Sakai Tsubasa, Kawada Tsuyoshi	4. 巻 377
2. 論文標題 Peptide receptors and immune-related proteins expressed in the digestive system of a urochordate, <i>Ciona intestinalis</i> .	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell and Tissue Research	6. 最初と最後の頁 293 ~ 308
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00441-019-03024-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsubara Shin, Osugi Tomohiro, Shiraishi Akira, Wada Azumi, Satake Honoo	4. 巻 16
2. 論文標題 Comparative analysis of transcriptomic profiles among ascidians, zebrafish, and mice: Insights from tissue-specific gene expression	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0254308
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0254308	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kawada Tsuyoshi, Osugi Tomohiro, Matsubara Shin, Sakai Tsubasa, Shiraishi Akira, Yamamoto Tatsuya, Satake Honoo	4. 巻 13
2. 論文標題 Omics Studies for the Identification of Ascidian Peptides, Cognate Receptors, and Their Relevant Roles in Ovarian Follicular Development	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Endocrinology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fendo.2022.858885	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 松原 伸、白石 慧、大杉 知裕、川田 剛士、佐竹 炎
2. 発表標題 カタユウレイボヤにおける新規卵巣ペプチドの検出
3. 学会等名 日本動物学会 第90回大阪大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松原 伸、白石 慧、大杉 知裕、川田 剛士、佐竹 炎
2. 発表標題 バソプレシン様ペプチドによるホヤの卵成熟・排卵制御機構の解明
3. 学会等名 日本分子生物学会 第42回福岡大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松原 伸、大杉 知裕、白石 慧、和田 明澄、佐竹 炎
2. 発表標題 ホヤの組織特異的遺伝子に着目した比較解析と進化的洞察
3. 学会等名 日本動物学会 第92回オンライン米子大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松原 伸、白石 慧、大杉 知裕、川田 剛士、和田 明澄、佐竹 炎
2. 発表標題 新規卵巣ペプチドの検出と受容体遺伝子の探索
3. 学会等名 日本比較内分泌学会 第45回オンライン能登大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究成果は所属機関のホームページで公開している。  
<https://www.sunbor.or.jp/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	佐竹 炎  (SATAKE Honoo)		
研究協力者	白石 慧  (SHIRAISHI Akira)		
研究協力者	大杉 知裕  (OSUGI Tomohiro)		



6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	川田 剛士  (KAWADA Tsuyoshi)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関