

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 10 月 20 日現在

機関番号：74408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440161

研究課題名(和文)カタユウレイボヤにおける脳腸ペプチド群による卵胞成熟制御機構の解明

研究課題名(英文)Regulation of folliculogenesis by brain/gut peptides in *Ciona intestinalis*

研究代表者

佐竹 炎 (Satake, Honoo)

公益財団法人サントリー生命科学財団・その他部局等・主幹研究員

研究者番号：20280688

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究により、ホヤで発見した脳腸ペプチド、Ci-GALPの受容体を決定し、また、Ci-GALP、cionin、GnRHの各ペプチドの受容体の卵胞における局在を決定した。また、各ペプチドで処理した卵胞を、次世代シーケンサーを用いたRNA-SeqとリアルタイムPCRで解析して、各ペプチドが制御する遺伝子を特定した。さらに、各ペプチドで制御される遺伝子産物の阻害剤を投与したところ、卵胞の成長が阻害されることを確認できた。以上の結果から、Ci-GALP、cionin、GnRHが制御する卵胞成長機構の基本骨格が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we identified a receptor for Ci-GALP, which is an *Ciona intestinalis* ortholog of vertebrate galanin/GALP. We also localized the mRNA of receptors for Ci-GALP, cionin, and GnRH, respectively. RNA-Seq followed by real-time PCR for the *Ciona* follicles treated with each peptide revealed the gene expression profile. Moreover, the inhibitors of the regulated gene product suppress follicle growth in a ligand-specific manner. Taken together, these results substantiated the essential molecular mechanisms of *Ciona* follicle growth regulated by brain/gut peptides. These are the first reports on the biological roles of these brain/gut peptide in the ovary in an organism.

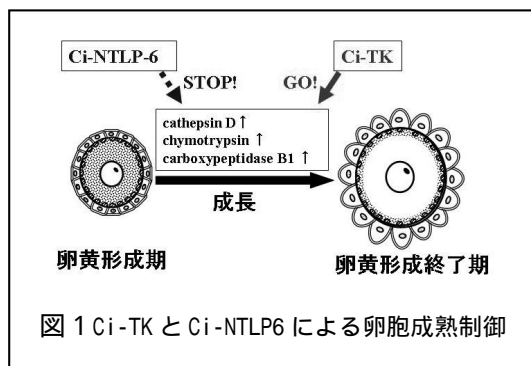
研究分野：内分泌、進化生物学

キーワード：ペプチド カタユウレイボヤ 卵胞成長

### 1. 研究開始当初の背景

卵胞の正常な成熟は、有性生殖性の生物が種を存続するための決定的なステップであるため、その全容の解明は内分泌学、生殖内分泌学、進化生物学における最も重要な課題の一つである。脊椎動物の卵胞成熟過程では、視床下部から生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH)が下垂体に作用して生殖腺刺激ホルモンが卵巣内の胞状卵胞以降の卵胞を成熟させて排卵を促進し、さらに、性ステロイドホルモンによるフィードバックを受けるといった「視床下部-下垂体-生殖腺」、すなわち、「HPG axis」という内分泌系制御機構が確立されている。反面、生殖腺刺激ホルモンに応答しない原始、一次、二次、前胞状卵胞といった初期の成熟制御機構はほとんど不明である。尾索動物の一種、カタコウレイボヤ(以下ホヤ)は、脊椎動物と共通の祖先から誕生し、脊椎動物と最後に分岐した無脊椎動物であることから、脊椎動物の卵胞成熟機構のプロトタイプを有していると考えられる。しかし、生命の存続の機構と脊索動物門の生殖機能の進化・多様化という点で極めて本質的な問題であるにもかかわらず、ホヤの卵胞成熟機構は全くわかっていなかった。

ここ数年で、申請者は peptidomics 的手法などでホヤの中樞神経から約40種のペプチドを同定した。この中には、タキキニン、ガラニン、ニューロテンシン、ニューロペプチドY、コレシストキニンなどの脊椎動物の脳腸ペプチド同族体が存在している一方、生殖腺刺激ホルモンのような下垂体ホルモン同族体は存在しないことも同時に明らかにした。また、同定したホヤのペプチドの受容体が卵巣に発現していることも明らかにした。さらに、脊椎動物の脳腸ペプチド、タキキニンのホヤ同族体、Ci-TK が卵黄形成後期の卵胞の test 細胞(脊椎動物の顆粒膜細胞に相当)に作用し、卵黄タンパクのプロセッシングを担う cathepsin D などのプロテアーゼを活性化して、その成熟を特異的に促進すること、並びに、別の脳腸ペプチド、ニューロテンシンのホヤ同族体、Ci-NTLP6 がこの機構を抑制すること(図1)を発見した。



これらは、全生物を通じてタキキニンやニューロテンシンといった脳腸ペプチドが卵胞の成熟を制御する機構の存在を示した初めての例証である。また、ホヤは開放血管系

であり、視床下部や下垂体、並びに生殖刺激ホルモンのような下垂体ホルモン同族体をもたないことから、ホヤでは、HPG axis ではなく脳腸ペプチド群により卵胞成熟が直接制御されており、このような卵胞成熟制御機構は脊索動物門で普遍的に保存されているのではないかと考えるに至った。

### 2. 研究の目的

以上の背景から、申請者は、ホヤから哺乳類で保存されており、かつ、その受容体の卵巣における発現が RT-PCR レベルで確認できている(研究業績 1-10,13-17,19-21, 23-25、および投稿論文準備中)コレシストキニン、ガラニン、ニューロペプチドYのホヤ同族体である cionin, Ci-GALP, Ci-NPY を対象とし、内分泌学的手法、分子生物学的手法、質量分析法、次世代シーケンサーを用いた RNA-Seq によるトランスクリプトーム比較解析を駆使して、

- (1) 受容体局在に基づく上記ペプチドが作用するホヤ卵胞の成熟段階と標的部位の特定
- (2) ホヤ卵胞で各ペプチドが制御する遺伝子群の同定とその局在の決定
- (3) 各ペプチドにより分泌される二次的伝達物質の同定
- (4) 各ペプチドの卵胞への作用の形態学的評価

を行い、上記の脳腸ペプチドが制御するホヤ卵胞成熟機構を体系的に解明することを構想した。

### 3. 研究の方法

ホヤで発見した脊椎動物の脳腸ペプチド同族体である cionin, Ci-GALP、および Ci-NPY 受容体の局在を決定、および、これらのアゴニストやアンタゴニスト存在下、ホヤ卵細胞で変動する遺伝子発現を次世代シーケンサーによる RNA-Seq 法を利用したトランスクリプトームとリアルタイム PCR で特定、並びに、同条件で分泌される二次的伝達物質を質量分析で同定する。さらに、同ペプチドのアゴニストやアンタゴニスト存在下で生じる卵細胞の形態変化を決定する。これらの結果を統合することにより、cionin, Ci-GALP、および Ci-NPY が制御する卵胞成熟機構が分子レベルで解明される。以上の研究成果から、脳腸ペプチドによるホヤ卵胞成熟機構を体系的に立証し、脊椎動物が閉鎖血管系や下垂体を獲得して HPG axis を確立する以前から存在する卵胞成熟機構の原点を明らかにする。

### 4. 研究成果

#### (1) Ci-GALP 受容体の同定

これまでの研究で、申請者らは、ホヤにガラニン様ペプチド、Ci-GALP を発見し、その遺伝子をクローニングしている(Kawada et al 2011)が、その受容体は不明だった。そ

ここで、機械学習法によって既知のリガンドと受容体ペアから新規ペプチドの受容体を予測して、ホヤの卵巣からその cDNA をクローニングした(図2)。

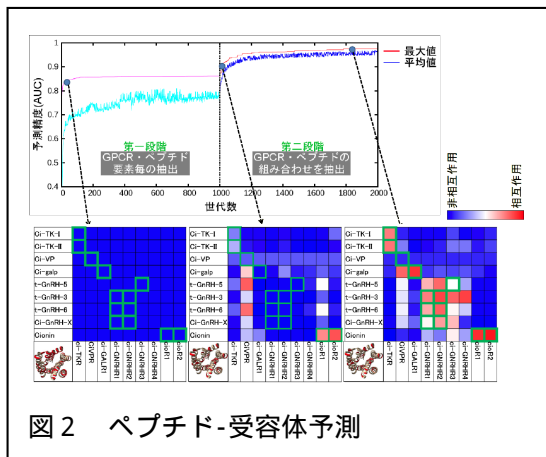


図2 ペプチド-受容体予測

さらに、この受容体 cDNA を HEK293 細胞にトランスフェクション後、細胞内カルシウム動員を計測した。その結果、図3に示すように、Ci-GALP が濃度依存的に反応する受容体を特定できた。

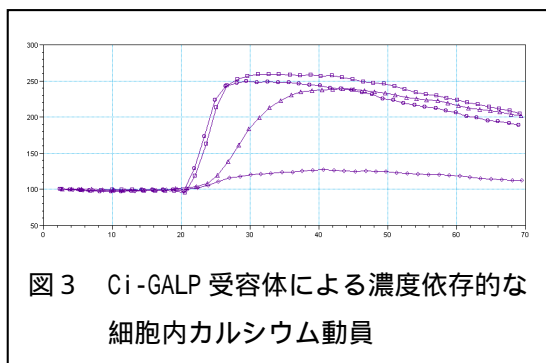


図3 Ci-GALP 受容体による濃度依存的な細胞内カルシウム動員

## (2) 各受容体の発現分布

*in situ* hybridization により、cionin、Ci-GAL、GnRH 受容体の卵巣内における局在を調べた。その結果、cionin 受容体は stage III 前半の濾胞細胞に(図4)、Ci-GALP 細胞と GnRH 受容体は、Stage II から III にかけて



図4 cionin 受容体の局在

の卵胞内の Test 細胞に局在することが明らかになった。

## (3) 各ペプチドが発現を制御する遺伝子群の特定

各受容体を発現している成長段階のホヤ卵胞を取り出し、それぞれのペプチドで処理した後に RNA を抽出し、次世代シーケンサー (Illumina Hi-Seq 1500) による RNA-Seq を行い(図5)、各々のペプチドが制御する遺伝

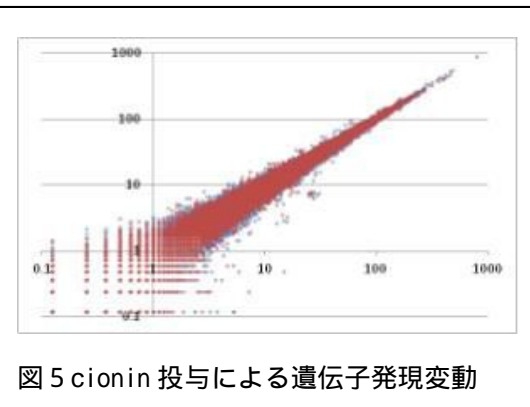


図5 cionin 投与による遺伝子発現変動

子を網羅的に解析し、さらに、その結果をリアルタイム PCR で検証した。その結果、cionin 処理では Wnt 系シグナルカスケードの構成因子の発現がいくつか上昇することが明らかになった。また、GnRH や Ci-GALP では、キナーゼ群やプロテアーゼ群の遺伝子が上昇することがわかった。

## (4) 上記遺伝子産物抑制の影の評価

各ペプチドで発現が制御される遺伝子の産物の卵胞成長に対する効果を評価したところ、プロテアーゼ阻害により、卵胞の成長が阻止されることがわかった。これらの結果から、cionin、GnRH、Ci-GALP のホヤ卵胞成長における機能の基本スキームが明らかになった。これは、全生物を通じて初めての上記ペプチドの卵巣における生物学的役割を明らかにしたものである。現在、さらに詳細なシグナル伝達経路の特定、ならびに、哺乳類において同機構が保存されているかについて焦点を絞り、研究を続行中である。

## 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 11 件)

1. Sekiguchi T, Kuwasako K, Ogasawara M, Takahashi H, Matsubara S, Osugi T, Muramatsu I, Sasayama Y, Suzuki N, Satake H. (2016) "Evidence for conservation of the calcitonin superfamily and activity-regulating mechanisms in the basal chordate *Branchiostoma floridae*: insight into the molecular and functional

- evolution in chordates.” *J. Biol. Chem.* **291(5)**, 2345-2356. 査読あり doi: 10.1074/jbc.M115.664003.
2. Murata J, Matsumoto E, Morimoto K, Koyama T, **Satake H.** (2015) “Generation of Triple-Transgenic *Forsythia* Cell Cultures as a Platform for the Efficient, Stable, and Sustainable Production of Lignans.” *PLoS One.* **10(12)**, e0144519. 査読あり
  3. Matsubara, S., Kawada, T., Sakai, T., Aoyama, M., Osugi, T., Shiraishi, A., **Satake, H.** (2016) “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.* **227**, 101-8. 査読あり
  4. Osugi, T., Son, Y.L., Ubuka, T., **Satake, H.**, Tsutsui, K. (2016) “RFamide peptides in agnathans and basal chordates.” *Gen. Comp. Endocrinol.* **227**, 94-100 査読あり
  5. **Satake, H.**, Koyama, T., Bahabadi, S.E., Matsumoto, E., Ono, E., Murata, J. (2015) “Essences in metabolic engineering of lignan biosynthesis.” *Metabolites.* **5**, 270-290. 査読あり
  6. Nagasawa, K., Osugi, T., Suzuki, I., Itoh, N., Takahashi, K.G., **Satake, H.**, Osada, M. (2015) “Characterization of GnRH-like peptides from the nerve ganglia of Yesso scallop, *Patinopecten yessoensis*.” *Peptides* **71**, 202-210. 査読あり
  7. Natsume, S., Takagi, H., Shiraishi, A., Murata, J., Toyonaga, H., Patzak, J., Takagi, M., Yaegashi, H., Uemura, A., Mitsuoka, C., Yoshida, K., Krofta, K., **Satake, H.**, Terauchi, R., Ono, E. (2015) “The Draft Genome of Hop (*Humulus lupulus*), an Essence for Brewing.” *Plant Cell Physiol.* **56(3)**, 428-441. 査読あり
  8. Okazawa, A., Kusunose, T., Ono, E., Kim, H.-J., **Satake, H.**, Shimizu, B., Mizutani, M., Seki, H., Muranaka, T. (2014) “Glucosyltransferase activity of Arabidopsis UGT71C1 towards pinoresinol and lariciresinol.” *Plant Biotechnol.* **31(5)**, 561-566. 査読あり
  9. Bahabadi, S.E., Sharifi, M., Chashmi, N.A. Murata, J. **Satake, H.** (2014) “Significant enhancement of lignans accumulation in hairy root cultures of *Linum album* using biotic elicitors” *Acta Physiol. Plant.* **36(12)**, 3325–3331 査読あり
  10. Kamiya, C., Ohta, N., Ogura, Y., Yoshida, K., Horie, T., Kusakabe, T.G., **Satake, H.**, Sasakura, Y. (2014) “Nonreproductive role of gonadotropin-releasing hormone in the control of ascidian metamorphosis.” *Dev. Dyn.* **243(12)**, 1524-1535. 査読あり
  11. Kurihara, M., Shiraishi, A., **Satake, H.**, Kimura A.P. (2014) “A conserved noncoding sequence can function as a spermatocyte-specific enhancer and a bidirectional promoter for a ubiquitously expressed gene and a testis-specific long noncoding RNA.” *J. Mol. Biol.* **426(17)**, 3069-3093. 査読あり
- 〔学会発表〕(計 3 件)
1. 第 86 回日本動物学会 2015. 9.17-19 (新潟)  
カタコウレイボヤを起点とした脊索動物門に共通する卵胞制御機構の新展開  
佐竹 (シンポジウム「動物の変態・成熟の分子基盤」依頼講演)
  2. 日本動物学会第 85 回大会 9.11-13 (仙台)  
脊索動物門で保存されている新規卵胞制御機構の共通性と多様性の解明 (依頼講演)  
佐竹<sup>†</sup>
  3. 17<sup>th</sup> International Congress of Comparative Endocrinology 7/15-19 (Barcelona)  
Differential regulation of GnRH signalling cascades via heterodimerization among multiple GnRH receptor paralogues in the ascidian, *Ciona intestinalis*.  
Satake<sup>†</sup> (Selected Talk)\_
- 〔その他〕  
ホームページ : [www: sunbor.or.jp](http://www.sunbor.or.jp)
6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
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・主幹研究員  
研究者番号 : 20280688

(2)研究分担者  
なし

(3) 連携研究者  
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・主席研究員  
研究者番号：90300821