

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 30 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25840114

研究課題名(和文) 消化管ペプチドの機能進化の研究：ホヤの受容体トランスジェニック個体を用いた解析

研究課題名(英文) Study on functional evolution of the digestive hormone peptide cholecystokinin(CCK)/gastrin: Expression analysis of CCK/gastrin peptide in ascidian *Ciona intestinalis*

研究代表者

関口 俊男 (Toshio, Sekiguchi)

金沢大学・環日本海域環境研究センター・助教

研究者番号：40378568

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：脊椎動物における消化ホルモンCCK/ガストリンのホヤ同族体であるcioninやcionin受容体の発現を幼生から成体まで解析した。cionin受容体遺伝子プロモータ下で蛍光タンパクを発現させる実験より、幼生の運動神経及び神経索に発現が認められた。さらにトランスジェニック個体による解析から、cionin受容体がコリン作動性神経に発現していることが示唆された。一方、成体においてはcioninペプチドが主に中枢神経に発現しており、受容体は中枢神経の他に消化管に認められた。Cioninは中枢神経において神経伝達物質もしくは神経修飾物質として作用すると共に、消化管で機能することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the evolution of the digestive hormone cholecystokinin (CCK)/gastrin in chordates, we analyzed the expression of cionin which is a CCK/gastrin ortholog and cionin receptor in the ascidian *Ciona intestinalis*. Analysis of cionin receptor gene promoter-driven fluorescence demonstrated that the cionin receptor was expressed in the visceral ganglion and tail nerve cord of larval ascidians. This expression pattern coincided with cholinergic neurons. In adult ascidians, cionin mRNA was exclusively expressed in the central nervous system, whereas the expression of cionin receptor mRNA was detected in both the central nervous system and digestive tract. These results suggest that cionin is released from the central nervous system and acts as a neurotransmitter or neuromodulator, affecting cionin receptor-expressing neurons. Alternatively, cionin can affect the digestive tract as a digestive hormone.

研究分野：比較内分泌学

キーワード：コレシストキニン ガストリン カタユウレイボヤ

## 1. 研究開始当初の背景

消化管ペプチドのコレシストキニン (CCK)とガストリンは、互いに高い配列類似性を示し、受容体を共有することから、共通祖先から進化したと考えられている。さらに、主に哺乳類において、消化管だけでなく脳でも生理作用が認められ、多機能ペプチドであると報告されている。また、脊椎動物の祖先的動物である原索動物カタコウレイボヤにおいても、CCK/ガストリンの祖先ペプチド cionin の存在が報告されているが、その生理作用は不明であった (Johnsen, 1998)。

## 2. 研究の目的

我々は、カタコウレイボヤにおいて、cionin が中枢神経に発現していたこと、哺乳類細胞株を用いたリガンド受容体解析により、cionin 受容体 (cioninR) を同定したことを報告している (Sekiguchi et al., 2012)。cionin は、cioninR を経て生理作用を発揮する為、その局在を明らかにすることは機能解析をする上で極めて重要である。

本研究の目的は、cioninR 及び cionin の発生過程及び成体における局在解析と発現局在に基づいた機能解析を行い、脊椎動物で多様化した CCK/ガストリンの始原的な生理作用を明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

### 1) ホヤ幼生における cioninR の局在解析

cioninR プロモーターを蛍光タンパク kaede ベクターに組み込んだコンストラクトを受精卵にエレクトロポレーション法により導入し、幼生まで発生させ蛍光発現のパターンを蛍光顕微鏡により解析した。

さらに小胞アセチルコリントランスポートのプロモーターを用いたコリン作動性神経の蛍光 (CFP) マーカートランスジェニック個体の受精卵に、上記のコンストラクトを導入し、幼生における kaede と CFP による蛍光の局在を比較した。

### 2) ホヤ成体における cioninR および cionin mRNA の組織発現分布解析

ホヤ成体から中枢神経、心臓、内柱、鰓、消化管、卵巣を切除し、Total RNA を抽出後、OligodT を用い cDNA を合成した。SYBER premix EX Taq (タカラ) を用いた real time PCR 解析により、cioninR および cionin mRNA の各組織における発現量を定量した。内部標準は、ホヤ EF1 $\alpha$  を用いた。

### 3) ホヤ成体における cionin ペプチドの局在解析

ホヤ中枢神経を固定し、連続パラフィン切

片を作製した。ウサギ抗 cionin 抗体を一次抗体として、ビオチン化ヤギ抗ウサギ IgG 抗体を二次抗体として、ABC 法により免疫組織化学を行った。同時に、吸収試験により特異性の検討を行った。

### 4) 消化管培養系の構築

末梢における cionin の機能を解析する基盤構築の一つとして消化管の器官培養を試みた。ホヤ消化管 (胃) を切除し、ホヤリンガー液 (NaCl, 25.9g/L; KCl, 0.75g/L; CaCl<sub>2</sub>, 1.05g/L; MgCl<sub>2</sub>, 5.295g/L; Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1.63g/L; NaHCO<sub>3</sub>, 0.06g/L; glucose, 1.0g/L) 中で培養した (Revis and Thorndyke, 1981)。胃の食道側と腸側にチューブを付け、HPLC ポンプで海水を流した。デンプンを海水中に加え、胃を通過させ、1 時間毎に 6 回通過海水を回収した。海水中のアミラーゼ活性は、アミラーゼ測定キット (キッコマン) により定量した。

## 4. 研究成果

### 1) ホヤ幼生における cioninR の局在解析

cioninR プロモーターを受精卵に導入することで、幼生の運動神経及び神経索に kaede 蛍光を検出できた。さらにコリン作動性 CFP マーカートランスジェニック個体受精卵への導入により、運動神経と神経索に kaede と CFP の蛍光が重なることを確認した。これらのことから、cioninR は、幼生において、コリン作動性神経に発現していることが示された。cionin は、幼生の運動に関与していることが示唆される。

### 2) ホヤ成体における cioninR および cionin mRNA の組織発現分布解析

カタコウレイボヤ各組織を用いた real time PCR 解析の結果、cioninR mRNA は、中枢神経の他、内柱、消化管、卵巣に発現が認められた。一方 cionin mRNA は、神経における発現が主であり、消化管など他の組織では、1/300 ほどの発現量しか認められなかった。以上のことから、cionin は主に中枢神経で合成され、中枢神経及び末梢の内柱、消化管、卵巣に作用するものと考えられる。

### 3) ホヤ成体における cionin ペプチドの局在解析

ホヤ成体の中枢神経は、入水孔と出水孔の間に位置している。中枢神経の前方からは、入水孔及び体壁筋の方向へ神経が投射し、後方からは出水孔、体壁筋に加え内臓にも神経が投射している。縦断面の連続切片を用いた、cionin 抗体による免疫組織化学の結果、cionin 抗体陽性神経の細胞体と神経線維が検出された。さらに、細胞体は中枢神経の前方部分に局在していること、神経線維は中枢神経全体に認められることが明らかになった。

また横断面による解析では、cionin ペプチドが中枢神経前方部の外周全体に発現していることを明らかにした。なお抗体の特異性については、吸収試験により確認することができた。

#### 4) 消化管培養系の構築

cioninR が発現している消化管の機能解析を行うために、消化管器官培養系の構築を試みた。アミラーゼ活性を指標とし、消化管が機能しているか否かを検討した結果、デンプン流入後1時間で、アミラーゼ活性の上昇が認められた。今後、この培養系を cionin 活性測定に活用する予定である。

#### 【要約】

1) ホヤ幼生において、cioninR は、運動神経及び神経索のコリン作動性神経に発現していることを示した。

2) cionin は、中枢神経で合成され、中枢神経で神経伝達物質もしくは神経修飾物質として作用すると共に、内柱、消化管、卵巣へ神経ホルモンとして作用することが示唆された。

3) cionin 作動性神経の細胞体が、中枢神経の前方部に局在することを明らかにした。

4) cionin 機能解析のためのホヤ消化管器官培養系を構築した。

#### 【引用文献】

- 1) Johnsen, AH.: Phylogeny of the cholecystokinin/gastrin family. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 19: 73-99 (1998)
- 2) Sekiguchi, T., Ogasawara, M., Satake, H.: Molecular and functional characterization of cionin receptors in the ascidian, *Ciona intestinalis*: the evolutionary origin of the vertebrate cholecystokinin/gastrin family. *Journal of Endocrinol.*, 213: 99-106 (2012)
- 3) Bevis PJ., Thorndyke, MC.: Stimulation of gastric enzyme secretion by porcine cholecystokinin in the ascidian *Styela clava*. *Gen Comp Endocrinol.*, 45:458-464(1981)

#### 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 6 件)

- (1) Suzuki, N., Maruyama, Y., Nakano, M., Hattori, A., Honda, M., Shimazaki, Y., Sekiguchi, T., Kamauchi, H., Mishima, H., Wada, S., Srivastav, A.K., Hayakawa, K. and Oshima, Y.: Increased PGE2 has a positive correlation with plasma calcium during goldfish reproduction. *J. Fac. Agr., Kyushu Univ.*, 59: 97-101 (2014) <http://www.agr.kyushu-u.ac.jp/english/journal/>, 査読有

- (2) Yachiguchi, K., Matsumoto, N., Haga, Y., Suzuki, M., Matsumura, C., Tsurukawa, M., Okuno, T., Nakano, T., Kawabe, K., Kitamura, K., Toriba, A., Hayakawa, K., Chowdhury, V.S., Endo, M., Chiba, A., Sekiguchi, T., Nakano, M., Tabuchi, Y., Kondo, T., Wada, S., Mishima, H., Hattori, A. and Suzuki, N.: Polychlorinated biphenyl (118) activates osteoclasts and induces bone resorption in goldfish. *Env. Sci. Poll. Res.*, 21: 6365-6372 (2014), doi: 10.1007/s11356-012-1347-5. 査読有
- (3) Yachiguchi, K., Sekiguchi, T., Nakano, M., Hattori, A., Yamamoto, M., Kitamura, K., Maeda, M., Tabuchi, Y., Kondo, T., Kamauchi, H., Nakabayashi, H., Srivastav, A.K., Hayakawa, K., Sakamoto, T. and Suzuki, N.: Effect of inorganic mercury and methylmercury on osteoclasts and osteoblasts in the scales of the marine teleost as a model system of bone. *Zool. Sci.*, 31: 330-337 (2014) doi: 10.2108/zs130265. 査読有
- (4) Satake, H., Aoyama, M., Sekiguchi, T., Kawada, T.: Insight into molecular and functional diversity of tachykinins and their receptors. *Protein Pept Lett.*, 20:615-627 (2014) doi:10.2174/0929866511320060002. 査読有
- (5) Undap, S. L., Matsunaga, S., Honda, M., Sekiguchi, T., Suzuki, N., Khalil, F., Qiu, X., Shimasaki, Y., Ando, H., Sato-Okoshi, W., Sunobe, T., Takeda, S., Munehara, H. and Oshima, Y.: Accumulation of organotins in wharf roach (*Ligia exotica* Roux) and its ability to serve as a biomonitoring species for coastal pollution. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 96: 75-79 (2013) doi: 10.1016/j.ecoenv.2013.06.019. 査読有
- (6) Yano, S., Kitamura, K., Satoh, Y., Nakano, M., Hattori, A., Sekiguchi, T., Ikegame, M., Nakashima, H., Omori, K., Hayakawa, K., Chiba, A., Sasayama, Y., Ejiri, S., Mikuni-Takagaki, Y., Mishima, H., Funahashi, H., Sakamoto, T. and Suzuki, N.: Static and dynamic hypergravity responses of osteoblasts and osteoclasts in medaka scales. *Zool. Sci.*, 30: 217-223 (2013) doi: 10.2108/zsj.30.217. 査読有

#### 〔学会発表〕(計 6 件)

- (1) 関口俊男: カルシウム調節ホルモンの分子進化. シンポジウム「海産無

脊椎動物研究の最前線」平成26年度  
日本動物学会中部支部大会，のと勤  
労者プラザ，石川県(2014, 11/24) (招  
待講演)

- (2) 谷口詩穂，小笠原道生，佐竹 炎，鈴  
木信雄，**関口俊男**：カタユレイボヤ  
における cionin および受容体の発現解  
析．平成 26 年度日本動物学会中部支部  
大会，のと勤労者プラザ，石川県( 2014,  
11/24 )
- (3) **関口俊男**：カタユレイボヤを用いた  
内分泌系進化の研究．日本動物学会第  
85 回仙台大会 関連集会ホヤの談話  
会，東北大学，宮城県( 2014, 9 /11-13 )  
( 招待講演 )
- (4) **関口俊男**：脊椎動物カルシトニンの  
起源と多様化の研究．全国国立大学  
臨海臨湖実験所所長会議シンポジウ  
ム「海産動物の生体制御学的研究と  
その拡がり」岡山大学，岡山県( 2014,  
6/5 ) ( 招待講演 )
- (5) **関口俊男**，帖地 藍，関あずさ，高垣裕  
子，池亀美華，田淵圭章，近藤 隆，北  
村敬一郎，清水宣明，矢野幸子，服部  
淳彦，鈴木信雄：新規メラトニン誘導  
体の卵巣摘出ラットに対する作用．第  
38 回日本比較内分泌学会大会，宮崎市  
民プラザ，宮崎県( 2013,10/24-26 )
- (6) **関口俊男**，上西篤志，山本 樹，谷内口  
孝治，鈴木信雄：円口類のカルシトニ  
ンとカルシトニン受容体についての研  
究．第 84 回日本動物学会，岡山大学，  
岡山県( 2013, 9/26-28 )

〔図書〕(計 4 件)

- (1) **Sekiguchi, T.**: Gastrin family. In  
“Handbook on Hormones”. Y. Takei, H.  
Ando, and K.Tsutsui. Eds. ELSEVIER,  
USA, in press
- (2) **Sekiguchi, T.**: Gastrin. In “Handbook  
on Hormones”. Y. Takei, H. Ando, and  
K.Tsutsui. Eds. ELSEVIER, USA, in  
press
- (3) **Sekiguchi, T.**: Cholecystokinin. In  
“Handbook on Hormones”. Y. Takei, H.  
Ando, and K.Tsutsui. Eds. ELSEVIER,  
USA, in press
- (4) **Sekiguchi, T.**: Caerulein. In  
“Handbook on Hormones”. Y. Takei, H.  
Ando, and K.Tsutsui. Eds. ELSEVIER,  
USA, in press

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：

種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

関口俊男 (Sekiguchi Toshio)

金沢大学・環日本海域環境研究センター・  
助教

研究者番号：40378568

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：