

平成 30 年 6 月 27 日現在

機関番号：11302

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26440177

研究課題名(和文)「クラゲの卵成熟誘起ホルモン＝神経ペプチド」であることの証明

研究課題名(英文) Identification of neuropeptides used as oocyte maturation-inducing hormones in jellyfish

研究代表者

出口 竜作 (DEGUCHI, RYUSAKU)

宮城教育大学・教育学部・教授

研究者番号：90302257

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：クラゲの卵巣では、「暗から明」または「明から暗」への光変化(明刺激または暗刺激)によって卵成熟が開始され、放卵へと至る。本研究では、エダアシクラゲにおいて、4個のアミノ酸から成り、C末端がアミド化されている神経ペプチド(RPRPa)が光刺激の下流で働く卵成熟誘起ホルモンの主成分であることを示す証拠を得た。また、他の種のクラゲでも、類似した神経ペプチドが卵成熟誘起ホルモンとして有効であることを確認した。さらに、これらのペプチドは、オスでは放精を引き起こすことも明らかにした。ペプチド性の卵成熟誘起ホルモンの存在は、全動物で初の発見となる。

研究成果の概要(英文)：Jellyfish oocytes undergo meiotic maturation in the ovary following a dark-light or light-dark transition (light or dark stimulation) and are then released as mature eggs. The present study provides evidence that a C-terminal amidated tetrapeptide, RPRPa, exists in neural-type cells in the ovarian epithelium and acts as maturation-inducing hormone (MIH) downstream of dark stimulation in *Cladonema pacificum*. Our data also indicate that slightly different neuropeptides may function in other jellyfish species. Furthermore, we confirm here that these neuropeptides can induce the release of sperm as well as eggs. To our knowledge, this is the first identification of peptidic MIHs among all animals.

研究分野：生物学

キーワード：卵母細胞 生殖巣 エダアシクラゲ

1. 研究開始当初の背景

(1) クラゲを含む刺胞動物は、2 胚葉性の単純な体制をもった、系統進化的に「原始的な」動物である。多くのクラゲでは、生殖細胞は一層の上皮におおわれただけの生殖巣内に存在しており、明暗変化(「暗明」の明刺激、または「明暗」の暗刺激)が刺激となって放出される。エダアシクラゲ(*Cladonema pacificum*)は暗刺激、*Clytia hemisphaerica*は明刺激など、どちらに反応するかは種ごとに決まっている。メスの場合には、明または暗刺激によって卵巣内の一次卵母細胞が卵成熟を開始し、減数分裂を完了した後に、成熟卵が卵巣上皮を破って放出されてくる。一方、オスでは、明または暗刺激後に精巣内の精子が運動性を高め、精巣上皮を破って放出されてくる。

(2) 下等動物から高等動物に至るまで、光や温度などの外界の環境変化が卵成熟開始や放卵・放精の引き金となっている例は多い。しかし、高等動物では、関与する細胞の種類が多く広範囲に分布しており、また多くの場合、生殖巣が生体内の奥深く(見えない部分)に存在するため、*in vivo*での観察・解析は難しい。これに対し、原始的で単純なクラゲでは、光受容から放卵・放精までの経路に関わる細胞がごく狭い領域に集結しているため、この全経路を顕微鏡下で再現し、観察することができる。

(3) カエル、硬骨魚、ヒトデなどの高等動物では、濾胞細胞から放出される低分子物質が卵成熟誘起ホルモンとして一次卵母細胞に作用し、卵成熟開始を促すことが知られている。申請者は、これまでの研究の過程において、エダアシクラゲの卵成熟誘起ホルモンの候補物質として、新奇の神経ペプチドを見いだした。しかしながら、生理的条件下で、すなわち、暗刺激を受けた後の卵巣中で、実際にこのペプチドが機能していることを示す証拠は得られていなかった。

2. 研究の目的

(1) エダアシクラゲにおいて、神経ペプチドが生理的な卵成熟誘起ホルモンとして機能していることを、種々の細胞生理学的・分子生物学的アプローチによって証明する。

(2) 他の種のクラゲでも、やはり神経ペプチドが卵成熟誘起ホルモンとして用いられていることを明らかにする。

(3) 神経ペプチドがオスにおいては放精を誘起することを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) エダアシクラゲのメスの口柄(卵巣を含む)のトランスクリプトーム解析を行い、発現が予想されるペプチドを探索する。

(2) これらのペプチドを試薬会社に依頼して人工的に合成し、エダアシクラゲの卵巣から単離した一次卵母細胞に濃度を変えて投与することにより、卵成熟誘起作用の程度を

評価する。また、ペプチドの配列を少しずつ変えることにより、卵成熟誘起のために重要な部分を調べる。

(3) 卵成熟誘起ホルモンの候補ペプチドに対する抗体を試薬会社に依頼して作製し、その特異性を確認する。次に、エダアシクラゲのメスから卵巣部分のみを集め、オイルに封じ込めた微量の海水中で暗刺激を施すことにより、卵巣から放出される天然の卵成熟誘起ホルモンを得る。そして、抗体がこのホルモンによる卵成熟誘起作用を抑制するか調べる。

(4) 抗体を用いた免疫組織化学により、ペプチドが実際に卵巣の神経細胞に存在することを明らかにする。また、Zenon 抗体ラベリングキットを使用して、複数の抗体を用いた同時染色も行う。さらに、暗刺激前後での染色パターンを比較し、神経ペプチドが実際に適当な時間に放出されているかを確認する。

(5) エダアシクラゲ以外のクラゲにおいても、神経ペプチドが卵成熟誘起作用を持つか、実際に卵巣に局在しているか、抗体が卵成熟を抑えるかなどについて明らかにする。

(6) エダアシクラゲや他のクラゲにおいて、オスの精巣を切り刻んで得た「精巣片」に神経ペプチドを投与し、放精が誘起されるか調べる。

4. 研究成果

(1) エダアシクラゲのメスの口柄におけるトランスクリプトーム解析を行った結果、神経ペプチドの前駆体タンパク質をコードすることが予想される4種類の遺伝子(Cpa-pp1~Cpa-pp4)を見いだすことができた。Cpa-pp1からはRPRPa、Cpa-pp2からはRPRaA、Cpa-pp3からはPGLWa、Cpa-pp4からはKGRFaをそれぞれC末端に含むペプチドが産生されると考えられた。

(2) RPRPa、RPRaA、PGLWa、KGRFaを人工的に合成し、エダアシクラゲの卵巣から単離した一次卵母細胞に投与して卵成熟誘起作用の有無を調べた。その結果、RPRPaは10 nM、RPRaAは100 nMといった低濃度でも卵成熟を誘起することが分かった(図1)。これに対し、PGLWaやKGRFaはその1000倍となるような高濃度にしても、卵成熟を誘起することはなかった。RPRPaやRPRaAの卵成熟誘起作用は、C末端のアミド化をなくすと完全に失われた。また、RPRPaやRPRaAにも全く効果は見られなかった。さらに、RPRPaやRPRaAのN末端側にアミノ酸を連結した場合にも、効果が弱まるか、失われることが分かった。以上の結果から、これらの卵成熟誘起作用は、4個のアミノ酸から成り、C末端がアミド化されている時に最大になると考えられた。

RPRPaやRPRaAの投与後に進行する卵成熟過程の経時変化(卵核胞崩壊、第一極体放出、第二極体放出のタイミングなど)は、生理的条件下である暗刺激の際に起こる変化と同様であった。また、ペプチド投与によって得ら

れた成熟卵は、通常の成熟卵と同様、高い確率で受精・卵割し、翌日には幼生にまで正常に発生した。

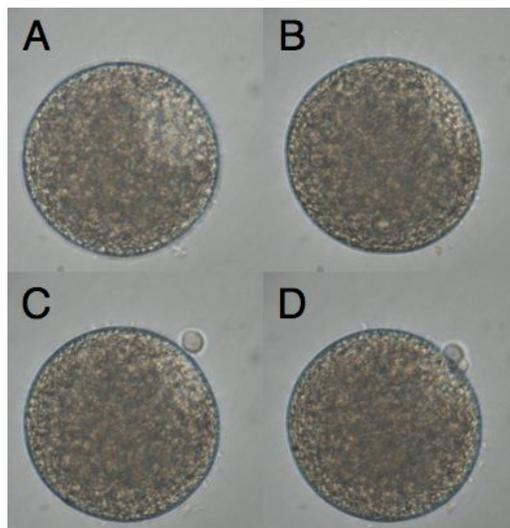


図1 RPRPa投与後のエダアシクラゲの卵成熟過程

(3) PRPaとPRAaを抗原としたウサギの抗体を作製し、それぞれが特異的である（両ペプチドにおけるPとAの違いを認識して結合することを確認した。これらの抗体をエダアシクラゲの一次卵母細胞に加えた後にペプチドを投与したところ、抗PRPa抗体はRPRPaによる卵成熟を阻害するがRPRPaaの効果は阻害しないこと、抗PRAa抗体はRPRPaaによる卵成熟を阻害するがRPRPaの効果は阻害しないこと、が明らかとなった。

次に、エダアシクラゲの卵巣から暗刺激後に放出された天然の卵成熟誘起ホルモンに及ぼす影響を調べたところ、抗PRPa抗体は強い阻害作用を示したのに対し、抗PRAa抗体の阻害作用はわずかであった。以上の結果は、RPRPaではなく、RPRPaが天然の卵成熟誘起ホルモンの主成分であることを強く示唆している。

(4) 暗刺激前のエダアシクラゲを固定し、抗PRPa抗体と抗PRAa抗体を用いた免疫染色を行ったところ、どちらの抗体も卵巣上皮に散在する神経様の細胞を認識した。しかし、両者の染色パターンは大きく異なっていたため、Zenon抗体ラベリングキットを使用して同時染色を試みた結果、互いに異なる細胞を認識していることが分かった（図2）。

また、エダアシクラゲに暗刺激を与えた後の変化を調べたところ、暗刺激から20分以内には、抗PRPa抗体による染色シグナルは大幅に減少したのに対し、抗PRAa抗体によるシグナルはほとんど残存していた。以上の結果は、RPRPaがエダアシクラゲの卵成熟誘起ホルモンの主成分であるという考えをさらに強く支持している。

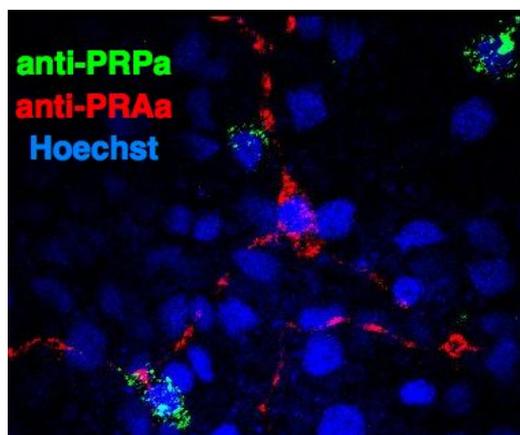


図2 抗PRPa抗体と抗PRAa抗体によるエダアシクラゲ卵巣上皮の同時染色

(5) エダアシクラゲと同様の実験を行った結果、暗刺激とは逆の明刺激によって卵成熟および放卵を開始するクラゲ、*Clytia hemisphaerica*では、N末端のアミノ酸がアルギニンではなくトリプトファンである神経ペプチド(WPRPa)が卵成熟誘起ホルモンであることを示唆する結果が得られた。RPRPaやWPRPa、その他の類似ペプチドは、サルシアクラゲ、ミサキアミネウミヒドラ、オベリアクラゲ、オワンクラゲなどでも卵成熟や放卵を引き起こしたが、有効なペプチドの種類はクラゲの種により異なっていた。また、タマクラゲ、シミコクラゲ、ドフラインクラゲ、シロクラゲなどには、今回試したいずれのペプチドも効果がなかった。以上の結果より、クラゲの卵成熟誘起ホルモンとして働く神経ペプチドは進化過程で大きく変異してきた可能性がある。

(6) オスの精巣に対する神経ペプチドの効果を調べたところ、エダアシクラゲではRPRPaが、*Clytia hemisphaerica*ではWPRPaが、それぞれ放卵を誘起することが分かった。この時の有効濃度は、卵成熟や放卵の誘起の際と同程度であった。同種内の雌雄で共通した神経ペプチドを用いることにより、放卵と放精のタイミングを同調させて受精率を高めていると予想される。

(7) 本研究の結果より、RPRPaやWPRPaなどの神経ペプチドは、エダアシクラゲや*Clytia*などのクラゲの体内で生理的に働く卵成熟誘起ホルモンであると考えられる。ペプチド性の卵成熟誘起ホルモンの存在は、全動物で初の発見となる。さらに、現在進行中の研究により、*Clytia*の卵巣上皮の神経細胞において、神経ペプチドが卵巣特異的に発現するオプシン(Opsin9)と共同在していること、このオプシンをノックアウトしたクラゲでは、光変化にตอบสนองした卵成熟・放卵が抑制されることが分かってきた。これらの結果は、「卵母細胞の近傍にある神経細胞が光受容から卵成熟誘起ホルモン放出までを単独で行う」という非常に単純な機構がクラゲには備わ

っていることを示唆している。ヒトデ、魚、カエルのような高等動物では、外界からの刺激が卵母細胞に伝わるまでに幾重もの複雑なシグナル伝達経路が存在するが、神経ペプチドはそのより上流で働き、卵成熟誘起ホルモンとしては用いられていない。本研究は、動物における卵成熟機構の「進化」を類推する上でも重要な知見をもたらしたと考えている。

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7件)

Quiroga Artigas, G., Lapebie, P., Leclere, L., Takeda, N., Deguchi, R., Jekely, G., Momose, T., Houliston, E. (2018). A gonad-expressed opsin mediates light-induced spawning in the jellyfish *Clytia*. *eLife* **7**, 査読あり. 10.7554/eLife.29555

Takeda, N., Kon, Y., Quiroga Artigas, G., Lapebie, P., Barreau, C., Koizumi, O., Kishimoto, T., Tachibana, K., Houliston, E., Deguchi, R. (2018). Identification of jellyfish neuropeptides that act directly as oocyte maturation-inducing hormones. *Development* **145**, 査読あり. DOI: 10.1242/dev.156786

星尚仁, 出口竜作 (2017). エダアシクラゲの卵サイズの計測. *宮城教育大学情報処理センター研究紀要~COMMUE~* **24**, 9-14, 査読なし.

<http://www.ipc.miyakyo-u.ac.jp/nenpo/no.24pdf/02.pdf>

Ikuta, T., Igawa, K., Tame, A., Kuroiwa, T., Kuroiwa, H., Aoki, Y., Takaki, Y., Nagai, Y., Ozawa, G., Yamamoto, M., Deguchi, R., Fujikura, K., Maruyama, T., Yoshida, T. (2016). Surfing the vegetal pole in a small population: extracellular vertical transmission of an 'intracellular' deep-sea clam symbiont. *Royal Society Open Science* **3**, 査読あり.

10.1098/rsos.160130

Deguchi, R., Takeda, N., Stricker, S. A. (2015). Calcium signals and oocyte maturation in marine invertebrates. *The International Journal of Developmental Biology* **59**, 271-280, 査読あり.

DOI: 10.1387/ijdb.150239ss

Arakawa, M., Takeda, N., Tachibana, K., Deguchi, R. (2014). Polyspermy block in jellyfish eggs: collaborative controls by Ca²⁺ and MAPK. *Developmental Biology* **392**, 80-92, 査読あり.

DOI: 10.1016/j.ydbio.2014.04.020

Nakano, T., Deguchi, R., Kyozuka, K. (2014). Intracellular calcium signaling

in the fertilized eggs of Annelida. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **450**, 1188-1194, 査読あり. 10.1016/j.bbrc.2014.06.056

〔学会発表〕(計21件)

出口竜作. クラゲの卵成熟誘起ホルモン. 日本動物学会第88回富山大会, 2017.

出口竜作. クラゲの有性化のための環境要因. 日本動物学会第88回富山大会, 2017.

Yamakawa, N. Physiological light-dark conditions for induction of spawning in the hydrozoan jellyfish *Cladonema pacificum*. The Joint meeting of the 22nd International Congress of Zoology & the 87th meeting of the Zoological Society of Japan, 2016.

Deguchi, R. Establishment of sperm attraction and fusion abilities during meiotic maturation of jellyfish oocytes. Oocyte Maturation and Fertilization Meeting IV, 2015.

Takeda, N. Neuropeptide regulates initiation of oocyte meiotic maturation and sperm release in the hydrozoan jellyfish *Cladonema pacificum*. Oocyte Maturation and Fertilization Meeting IV, 2015.

菅原朱莉. シミコクラゲの有性化条件の検討. 日本動物学会平成27年度東北支部大会, 2015.

高橋良. ヒドロ虫類 *Stylactaria multigranosi* の単為生殖. 日本動物学会第86回新潟大会, 2015.

荒川美緒. MAPキナーゼによるタマクラゲ卵の精子受容の制御. 日本動物学会第85回仙台大会, 2014.

遠藤一樹. タマクラゲ属における分子系統解析と緑色蛍光発色パターン. 日本動物学会第85回仙台大会, 2014.

〔図書〕(計2件)

原島広至, 大西卓嗣, 宇津木和夫, 福本伊都子, 三上周治, 田中俊雄, 岡本悦子, 中村雅浩, 中野剛, 出口竜作 他, エヌ・ティー・エス, 実験単~生物の授業やクラブ活動で使える実験集~, 2015, 174 (108-114).

井川智子, 伊藤千鶴, 伊藤昌彦, 稲葉一男, 井上直和, 岩尾康宏, 岩田容子, 岩野恵, 漆原秀子, 岡本龍史, 掛田克行, 河野重行, 坂本亘, 笹倉靖徳, 笹浪知宏, 佐藤賢一, 澤田均, 柴小菊, 関本弘之, 土屋亨, 出口竜作 他, 化学同人, 動植物の受精学, 2014, 340 (138-153, 185-202).

6. 研究組織

(1)研究代表者

出口 竜作 (DEGUCHI RYUSAKU)

宮城教育大学・教育学部・教授

研究者番号: 90302257

(3)連携研究者

立花 和則 (TACHIBANA KAZUNORI)
東京工業大学・バイオ研究基盤支援総合セン
ター・准教授
研究者番号：60212031

(4)研究協力者

荒川 美緒 (ARAKAWA MIO)
遠藤 一樹 (ENDO KAZUKI)
菅原 朱莉 (SUGAWARA AKARI)
高橋 良 (TAKAHASHI RYO)
竹田 典代 (TAKEDA NORIYO)
星 尚仁 (HOSHI TAKAHITO)
山川 奈帆美 (YAMAKAWA NAHOMI)