(1) 解析の量とスピード

最初の予測から 12 個の新規ペプチド - GPCR ペアを最終的に決定するまでに要した時間は約 9 か月である。前述した従来の reverse-pharmacology の戦略で 2~3 年に 1 ペア決まればよい方であることを考えると、PD-incorporated SVM を使った研究の効率は極めて優れている。

(2) 予測精度

本研究では 29 ペアを予測し、そのうちの 12 個を実験で証明した。すなわち、最終的な予測精度は 41% である。「はあ？ 半分以下かよ！？」という感想をお持ちになるかもしれないが、これまで試された多くのリガンド - 受容体ペア予測が、ほとんどの予測効率は数 % 以下にとどまることに加え、リガンドは全て合成物のみであることを鑑みると、PD-incorporated SVM の予測精度は非常に優れているとみなせる。少なくとも、従来のやり方では今回発見した Ci-GALP 受容体以外の新規 GPCR に辿り着ける可能性を筆者らは見いだせない。

(3) 汎用性

PD-incorporated SVM はどのような生物種やペプチドにも高い予測精度を示している。このことは、近年急速に明らかになっている非モデル生物、とりわけ、無脊椎動物の新規な種特異的ペプチド - GPCR ペアの解明に大きな貢献を果たせると期待できる。また、すでに GPCR が判明しているヒトやマウスのタキキニンが、全く別の（配列相同性や分子系統樹から予想できない）GPCR とも相互作用し、それが痛みの伝達に重要であることがごく最近明らかになった⁹⁾。このことはオーファン GPCR に新たなリガンドが存在するだけでなく、既知のペプチドの新たな標的 GPCR として機能している可能性を示唆している。すなわち、既知のペプチドとオーファン GPCR の相互作用予測に適用すれば、予想外のペプチド - GPCR ペアの解明につながる可能性が考えられる。

(4) ペプチド - GPCR 相互作用の新たな法則性の解明

今回の研究では、配列相同性や分子系統樹からは全

く予想できないペプチド - GPCR ペアを多数決定した。このことは、PD-incorporated SVM が配列相同性、分子系統樹、および立体構造のような従来の情報から導かれる法則性ではなく、全く別の法則性を見抜き、ペプチド - GPCR ペアを予測していると言える。さらに、PD-incorporated SVM はデータのフィードバックにより予測精度を高める性能、すなわち学習能力という大きな武器がある。このことは、様々な生物に対して予測結果を多く得れば得るほど、予測精度が高まる、つまり、未知のペプチド - GPCR 相互作用の法則性を解明することにつながっていく。このような法則性の解明はハイスループット reverse-pharmacology による評価系はもちろん、単なる配列相同性、構造予測、分子系統樹などのソフトウェアでは獲得および活用できない貴重な情報となる。どのような法則性により本予測器がペプチド - GPCR ペアを予測したかが明らかになれば、より高精度での予測が可能となるとともに、ペプチド - GPCR ペアすなわち、これらのマッチングがどのように進化・多様化してきたかという生物の進化の本質に迫ることができると期待している。

文献

- 1) Milabeau O, et al. Proc Natl Acad Sci USA, **110**, E2028-E2037 (2013).
- 2) Jékely G. Proc Natl Acad Sci USA, **110**, 8702-8707 (2013).
- 3) Laschet C, et al. Biochem Pharmacol, **153**, 62-74 (2018).
- 4) Shiraishi A, et al. Proc Natl Acad Sci USA, **116**, 7847-7856 (2019).
- 5) Kawada T, et al. Endocrinology, **152**, 2416-2427 (2011).
- 6) Matsubara S, et al. Gen Comp Endocrinol, **227**, 101-108 (2016).
- 7) Shiraishi A, et al. J Chem Inf Model, **53**, 1253-1262 (2013).
- 8) Triguero I, et al. Knowl Inf Syst, **42**, 245-284 (2015).
- 9) Green DP, et al. Neuron, **101**, 412-420 (2019).

クラゲの卵成熟誘起ホルモンと光受容によるホルモン放出

竹田 典代^{1,2}、Houlston Evelyn³、出口 竜作⁴

(¹ 広島大学・総合科学研究科、² 東北大学浅虫海洋生物学教育研究センター、

³ LBDV, CNRS Sorbonne Université、⁴ 宮城教育大学・理科教育講座)

E-mail: seaanemone0111@gmail.com

1. はじめに

刺胞動物門ヒドロ虫綱に属するクラゲは、進化の早い段階で前口動物・後口動物より分岐した原始的な動物で、散在神経系を持つ。クラゲは二胚葉性の動物で体のつくりは単純だが、複雑なライフサイクルを送っている。ヒドロ虫綱のクラゲの多くは、ヒドラのようにポリプ (polyp) 型の形態を持ち、普段は固着生活をしている。ポリプ単体で生息している種他に、ポリプ同士が

走根またはストロン (stolon) と呼ばれる、植物で例えると根のようなもので繋がって群体を形成している種がある。ポリプは無性的に増殖するが、有性生殖のシーズンになると、ポリプまたはストロンにクラゲ芽が形成される。クラゲ芽は稚クラゲとしてポリプやストロンから遊離して、浮遊生活を送るようになる。クラゲは成長して性成熟すると、メスでは卵、オスでは精子の形成を開始し、生存期間中 (種によるが、数ヶ月間) は毎日、放

図 1. エダアシクラゲのライフサイクル

無性生殖時期はポリプで増殖し群体を形成する。生殖シーズンになるとポリプはクラゲを形成する。クラゲは雌雄異体で、卵または精子を放出することによって有性生殖を行う。受精卵は発生を進めプラヌラ幼生に至る。幼生は変態してポリプとなり再び無性生殖時期に入る。

卵・放精を行う。本稿で紹介するクリティアクラゲ (*Clytia hemisphaerica*) やエダアシクラゲ (*Cladonema pacificum*) も同様のライフサイクルを送っている (図 1)。

2. クラゲの放卵過程

ヒドロ虫綱のクラゲは光状態の変化に応じて放卵することが古くから知られており、暗期から明期 (明刺激) または明期から暗期 (暗刺激) への変化が引き金となる¹⁻⁵⁾。クリティアクラゲは明刺激、エダアシクラゲは暗刺激に反応するが、これらの光刺激を受けた卵巢では、卵母細胞が卵成熟 (減数分裂) を開始し、卵成熟を完了した後、放卵に至る。放卵後の卵巢には未成長な卵母細胞が残されるが、これらは翌日以降の光刺激で放出されてくる。多くの動物では卵成熟の開始に卵成熟誘起ホルモン (Maturation Inducing Hormone; MIH) が必要であり、クラゲにおいても MIH の存在は示唆されていたものの^{6,7)}、その分子の実体は明らかになっていなかった。また、内胚葉を含まないように単離した卵巢だけでも光刺激に応じて卵成熟が起こること、卵母細胞そのものに光刺激を与えても卵成熟しないことなどから、クラゲ MIH は外胚葉上皮層から放出されていると考えられていた。これまでにいくつかの動物で MIH が同定されてきたが、多くの場合、大量の出発物質から精製のステップを経て活性のある物質に辿り着いている。クラゲでは大量の出発物質を得ることが困難なため、私たちは従来の方法を踏襲することは諦め、別の方法を用いることでクラゲ MIH の同定に至った⁸⁾。本稿ではその方法とクラゲ MIH 放出を引き起こす光受容物質について紹介する⁹⁾。

3. ペプチドによる卵成熟誘起

クラゲ MIH は低分子の安定した物質であると考えら

れること^{6,7)}、刺胞動物の様々な行動がペプチドに制御されていること^{10, 11, 12)} などから、私たちは卵巢に発現するペプチド前駆体遺伝子を探索することにした。クリティアクラゲにおいて、卵巢外胚葉、卵巢内胚葉、十分に成長した卵母細胞、成長途中の卵母細胞のトランスクリプトーム解析を行った結果、少なくとも 10 種類のペプチド前駆体遺伝子が存在し、卵巢外胚葉にはそのうち 2 種類 (Che-pp1, Che-pp4; 図 2A) の発現が見られた。次に、これらの遺伝子からペプチドとして切り出される配列を予測し、WPRPa, WPRAa, RPRGa, RPRYa の 4 種類のペプチド (末尾の a はアミド化を示す) を人工合成した。これらのペプチドがクリティアクラゲの卵成熟や放卵を誘起するかどうかを確かめるため、まずは単離した卵巢に投与した。その結果、 10^{-5} M では全てのペプチドで放卵が誘起され (WPRPa: 100%, WPRAa: 100%, RPRGa: 33%, RPRYa: 100%)、WPRPa と WPRAa においては 10^{-7} M でも 100% 放卵が誘起された。次に、卵巢から単離した卵母細胞にこれらのペプチドを投与したところ、 10^{-5} M および 10^{-6} M ではいずれのペプチドでもほぼ 100% の割合で卵成熟が誘起された。また、WPRPa と RPRYa では 10^{-8} M まで 100% 近い割合で、WPRPa では 10^{-9} M でも 50% 程度の割合で卵成熟が引き起こされた。一方、エダアシクラゲ口柄 (卵巢や胃腔などを含む) のトランスクリプトーム解析からは、4 種類 (Cpa-pp1, Cpa-pp2, Cpa-pp3, Cpa-pp4) のペプチド前駆体遺伝子が見つかり、このうち、Cpa-pp1 と Cpa-pp2 からは、それぞれ RPRPa と RPRAa が切り出されることが予測された (図 2A)。これらのペプチドを人工合成し、エダアシクラゲの単離卵母細胞に投与したところ、RPRPa では 10^{-8} M まで 100% 近い割合で、RPRAa では 10^{-7} M までは 100%、 10^{-8} M で 30% 程度の割合で

図 2. MIH 前駆体遺伝子と免疫染色

A. クリティアクラゲ (Che-pp1, Che-pp4) およびエダアシクラゲ (Cpa-pp1, Cpa-pp2) の MIH 前駆体遺伝子のアミノ酸配列。灰色: MIH として切り出されることが予想されるペプチドの配列、桃色: シグナルペプチドの配列、水色: 予想切断サイト、赤色: 塩基性または酸性のアミノ酸残基、黄色: C 末端のアミド化への転換が予測されるグリシン残基。

B. 抗 PRPa 抗体によるクリティアクラゲ卵巣の免疫染色像。卵巣上皮層に神経様のシグナルが見られる。スケールバーは 100 μm 。

卵成熟が誘起された。クリティアクラゲとエダアシクラゲの両種において、ペプチドの投与により卵成熟に至った卵は受精可能であり、プラヌラ幼生にまで発生したことから、これらのペプチドは正常に卵成熟を完了させる作用があることが示された。また、卵母細胞内にペプチドを顕微注射しても卵成熟を開始しなかったため、卵母細胞の細胞膜上にペプチドの受容体が存在すると予想された。次に、アミノ酸配列をわずかに変えたペプチドを人工合成し、卵母細胞に投与して卵成熟誘起活性を調べた。N 末端側を長くした場合、5 アミノ酸や 6 アミノ酸では 10^{-5}M で卵成熟誘起活性を示したが、 10^{-7}M では活

性は見られなかった。逆に、N 末端の W や R をなくした 3 アミノ酸 (PRPa や PRAa など) では活性が完全に消失した。また、C 末端のアミド化も重要で、アミド化されていないペプチド (WPRP-OH や RPRP-OH など) にも活性が全くなかった。

4. クラゲ MIH (神経ペプチド) と光刺激による放出

卵巣のみをごくわずかな量の海水中に閉じ込め、光刺激を与えて放卵後に上澄み海水を回収し、この中に単離卵母細胞を入れると卵成熟を開始するため、上澄み海水中には天然の MIH が含まれていることが分かる。卵

成熟を誘起するペプチド群が真にクラゲ MIH であるかどうかを調べるため、PRPa と PRAa を抗原とした抗体を作製し、吸収実験を行った。クリティアクラゲの天然 MIH に各抗体を加え、一定時間後に上澄みを卵母細胞に投与したところ、抗 PRAa 抗体やコントロール抗体 (normal IgG) では阻害効果は見られなかったが、抗 PRPa 抗体を加えた場合には卵成熟が阻害された。また、エダアシクラゲにおいても同様の結果が得られた。吸収実験の結果は、クラゲ MIH の主要成分が XPRPa であることを強く示唆している。

ヒドラが持つペプチドは、上皮性のペプチドか神経性のペプチドに二分される¹³⁾。卵成熟を誘起するペプチドがどちらに由来するか明らかにするため、抗 PRPa 抗体や抗 PRAa 抗体を用いて免疫染色を行った。その結果、クリティアクラゲではどちらの抗体で染色しても、卵巢上皮層の神経様の構造が染色された (図 2B)。さらに、2つの抗体を用いて二重染色を行ったところ、同じ神経細胞が染色されることが分かった。この結果は、クリティアクラゲペプチド前駆体遺伝子である Che-pp1 と Che-pp4 が同一細胞に発現しており、Che-pp1 からは WPRPa が、Che-pp4 からは WPRPa と WPRaA が切り出されることを示唆している (図 2B)。これに対し、エダアシクラゲでも抗 PRPa 抗体と抗 PRAa 抗体は神経様の染色パターンを示したが、二重染色では異なる神経細胞が染色された。次に、光刺激後に卵成熟を開始した卵巢を抗 PRPa 抗体で染色したところ、クリティアクラゲにおいても、エダアシクラゲにおいても、シグナルはほぼ消失し、神経様の染色パターンは検出されなくなった。この結果により、光刺激後に確かに XPRPa が卵巢の神経細胞から放出されていることが示された。

クリティアクラゲやエダアシクラゲ以外のクラゲでも WPRPa や RPRPa などのペプチドが MIH として機能するか確かめたところ、オベリアクラゲ、オワンクラゲ、ミサキアミネウミヒドラ、サルシアクラゲでは単離卵母細胞の卵成熟を引き起こす一方で、シロクラゲ、ドフラインクラゲ、タマクラゲには効果がないことが分かった。クリティアクラゲ、オベリアクラゲ、オワンクラゲは軟クラゲ目に、エダアシクラゲ、ミサキアミネウミヒドラ、サルシアクラゲ、タマクラゲは花クラゲ目に属しており、MIH として機能するペプチドの種類について、クラゲの系統との明確な関連は見られなかった。現段階では、XPRXa がクラゲ MIH の共通配列であり、X にどのアミノ酸を用いるかがクラゲの種により異なると予想している。ペプチドのように変異しやすい物質を MIH として利用することで、種特異性を持たせているのかもしれない。

5. MIH 放出を制御する光受容タンパク質

ここまでの研究により、クラゲ MIH が卵巢上皮層に存在する神経ペプチドであること、また、明または暗の光刺激によって放出されることが明らかになった。では、MIH 放出を促す光の変化をどこで、どのような物質が感じるのだろうか？クラゲの仲間には、傘や触手

図3. 光受容から MIH 放出までの経路

Opsin9 を含む光受容物質が光を受容し、MIH (XPRPa) を放出する。MIH は卵母細胞の細胞膜に存在する受容体を介して卵内にシグナルを伝達し、卵成熟を開始させると考えられる。

にレンズ眼のような発達した光受容器を持つ種もいるが¹⁴⁾、上述のように、卵成熟に必要な光刺激は卵巢上皮層の何らかの細胞で受容されると考えられる。私たちはクリティアクラゲに様々な波長の光を当て、放卵の誘起を試みた。その結果、430 nm から 520 nm の間（特に、470 nm ～ 490 nm）の波長が有効であることが分かった。光受容タンパク質として知られるオプシンの発現を調べたところ、卵巢に特異的に発現しているオプシン 9 (Opsin9) が得られた。興味深いことに、このオプシン 9 と MIH 前駆体遺伝子である Che-pp1 や Che-pp4 は同一細胞で発現していることが分かった。次に、CRISPR/Cas9 によるオプシン 9 ノックアウトクラゲを作出し、オプシン 9 の機能解析を行った。その結果、オプシン 9 ノックアウトクラゲは 15% 程度しか光刺激による卵成熟・放卵を示さなかった。さらに、このような卵巢の MIH を抗 PRPa 抗体による免疫染色で検出したところ、光刺激後もシグナルが存在する（消えない）ことが明らかとなった。一方で、オプシン 9 ノックアウトクラゲでも、WPRPa 投与による卵成熟・放卵は 100% 誘起されたため、MIH の下流の卵成熟・放卵に至るシグナル伝達経路は正常に働いていると考えられる。以上の結果から、少なくともクリティアクラゲにおいては、卵巢上皮中に存在する一部の神経細胞がオプシン 9 を含む光受容物質により主に青色光を受容して興奮し、そのまま WPRPa などの MIH を放出すると考えられる (図 3)。

6. 終わりに

両生類や魚類などの脊椎動物では「神経系-脳下垂体-ろ胞細胞」を介した経路、ヒトデでは「神経系-ろ胞細胞」を介した経路によって卵成熟が引き起こされる (図 4)。

図4. 様々な動物のMIH放出経路

より複雑な体制を持った動物ほどMIH放出経路も複雑になっているが、いずれも神経系を介した入力／出力によって制御されている。

クラゲでは神経系のみを介したシンプルな経路となっており、体制・構造が複雑になるにつれ経路が複雑になっていることが見て取れる。一方で、外界の環境要因(温度、明暗など)が引き金となり、神経系を介してMIH放出に至るという点は全ての動物において共通している。

近年の次世代シーケンサーやゲノム編集技術等の発展により、クラゲのように、いわゆるモデル動物ではないものの魅力的な特徴を備えた動物でも遺伝子操作を行い、機能解析することが可能になってきた。現在、クラゲでは、卵母細胞におけるMIH受容体が本稿の第二著者のグループの研究により明らかになりつつある。クラゲのシンプルな卵成熟・放卵制御機構を明らかにすることにより、本機構の原型や系統進化との関連の理解につなげていきたいと考えている。

最後になりましたが、本稿を執筆する機会を下さったサントリー生命科学財団の高橋俊雄先生に心から感謝申し上げます。また、本研究を今まで一緒に頑張ってきてくれた東北大学浅虫海洋生物学教育研究センター、宮城

教育大学出口研究室、仏国 Houliston 研究室のメンバーに深く感謝いたします。

文献

- 1) Ballard WW. Biol Bull, **82**, 329-339 (1942).
- 2) Hirai E & Kakinuma Y. Bull Mar Biol Stn Asamushi, Tohoku Univ, **8**, 49-54 (1957).
- 3) Freeman G & Ridgway EB. Roux's Arch Dev Biol, **197**, 197-211 (1988).
- 4) Takeda N, et al. Dev Biol, **298**, 248-258 (2006).
- 5) Amiel A, et al. Curr Biol, **19**, 305-311 (2009).
- 6) Ikegami S, et al. Nature, **272**, 611-612 (1978).
- 7) Freeman G. Roux's Arch Dev Biol, **196**, 83-92 (1987).
- 8) Takeda N, et al. Development, **145**, dev156786 (2018).
- 9) Artigas GQ, et al. Elife, **7**, e29555 (2018).
- 10) Ancil M. Gen Comp Endocrinol, **119**, 317-328 (2000).
- 11) Takahashi T, et al. Acta Biol Hung, **59**, 227-235 (2008).
- 12) Takahashi T & Takeda N. Int J Mol Sci, **6**, 2610-25 (2015).
- 13) Fujisawa T. Dev Growth Differ, **50**, Supple 1: S257-268 (2008).