

Title	棘皮動物ヒトデ胚と幼生を用いたTGFb1機能とその活性化メカニズムの解析
Sub Title	Characterization of TGFb in the starfish <i>Patria pectinifera</i> : morphogenetic function and operation mechanism via astacin metalloprotease activation
Author	金子, 洋之(Kaneko, Hiroyuki)
Publisher	慶應義塾大学
Publication year	2021
Jtitle	学事振興資金研究成果実績報告書 (2019. )
JaLC DOI	
Abstract	<p>成長因子の一つであるトランスフォーミング成長因子 ( TGFb ) は多様な生理活性機能を有している。本研究では、棘皮動物イトマキヒトデ胚を用い、TGFbの機能特性の解明を目的とした。</p> <p>( 1 ) イトマキヒトデ後期原腸胚から単離したTGFb(PpTGFb) はLAPとTGFbが結合した複合体構造としてコードされている。</p> <p>( 2 ) 無細胞系で合成したPpTGFbリコンビナントタンパク質は、還元状態下でのウエスタンブロットでは約48kDaのバンドとして検出される。</p> <p>( 3 ) 後期原腸胚を用いたin situハイブリダイゼーション法下では、PpTGFbは身体の全ての部位の上皮細胞と間充織細胞に発現していた。</p> <p>( 4 ) モルフォリノオリゴを用いたPpTGFbのノックダウン個体 ( PpTGFbモルファント ) は、受精4日後には体のサイズが僅かに小さくなっていたが、形態的な不全は認められなかった。</p> <p>( 5 ) このPpTGFbモルファントの細胞数は、約75%でしかなかった。</p> <p>( 6 ) 間充織細胞に強く発現するアスタチン属のメタロプロテアーゼであるPpMC5のノックダウン個体と実験対照であるCMO個体から受精4日目に乖離細胞を得た。これらをPpTGFbリコンビナントタンパク質とインキュベートしたところ、CMO個体のサンプルでは明らかにPpTGFbが分解されていたが、MO個体由来のサンプルでは分解が抑制されていた。</p> <p>( 7 ) 上記 ( 6 ) のCMO個体とのインキュベーションにより生じたと推定される分解産物を、モルフォリノオリゴによるPpMC5欠失が誘導された初期原腸胚の胞胚腔に注入した。4日幼生に到るまで飼育を続け、その影響をみたところ、胚体サイズが増加するのみならず、構成細胞数も有意差を持って増加していた。</p> <p>以上の結果から、ヒトデ胚のPpTGFbは細胞増殖に関与しており、その前段階としてPpMC5によって活性化される必要があることが示唆された。これにより、間充織細胞が上皮細胞の増殖を誘起している実態もイメージできるようになった。</p> <p>Transforming growth factor (TGFb) has various physiological activities. Present study aims to examine TGFb's functional characteristics and mechanism activated by PpMC5 (astacin metalloprotease) during development of the starfish, <i>Patria pectinifera</i>. Obtained results as follows.</p> <p>(1) We identified an inherent TGFb from late-gastrulae of <i>P. pectinifera</i>, and referred to this as PpTGFb (GenBank accession No. 528218).</p> <p>(2) PpTGFb encodes 450-amino acid polypeptides with 45kDa of theoretical molecular weight, and its deduced sequence reveals an inactivated (latent) form consisting of leader sequence, LAP and TGFb1.</p> <p>(3) PpTGFb was indeed expressed in the epithelial and mesenchyme cells of whole body of late-gastrula embryos.</p> <p>(4) In PpTGFb morphant (400 μM, morpholino-oligo; MO) on 4-day-old bipinnaria larva, a little decrease of larval size (approximately 10% decrease of control CMO-larvae) occurred without any morphological irregularities.</p> <p>(5) In compared to control CMO-larvae, cell numbers of PpTGFb morphant shown in (4) decrease is approximately 20-25%.</p> <p>(6) When PpTGFb is incubated with dissociated cells of PpMC5-MO or PpMC5-CMO bipinnaria larvae, the resulting products were proteolytically degraded only in samples of PpMC5-CMO. On the other hand, an apparent inhibition of proteolysis of PpTGFb occurs in the PpMC5-MO samples.</p> <p>(7) MO of PpMC5 elicits larval size decrease. In PpMC5 morphants on 4-day-old bipinnaria larva, which the degraded samples of PpTGFb has injected into the blastocoel at the early gastrula-stage, decrease of larval size was significantly rescued. This is contrasted to control experiment. These observations were corroborated in quantifications of cell numbers.</p> <p>Together, our results suggest that PpTGFb participates in induction of cell proliferation and that it is necessary for PpTGFb to be proteolytically activated by PpMC5 prior to work.</p>
Notes	
Genre	Research Paper

URL

[https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara\\_id=2019000008-20190351](https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=2019000008-20190351)

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

研究代表者	所属	文学部	職名	教授	補助額	896	千円
	氏名	金子 洋之	氏名（英語）	Kaneko, Hiroyuki			
研究課題（日本語）							
棘皮動物ヒトデ胚と幼生を用いた TGFβ1 機能とその活性化メカニズムの解析							
研究課題（英訳）							
Characterization of TGFβ in the starfish <i>Patria pectinifera</i> : morphogenetic function and operation mechanism via astacin metalloprotease activation							
研究組織							
氏名 Name		所属・学科・職名 Affiliation, department, and position					
金子洋之（Kaneko, Hiroyuki）		文学部、生物学教室、教授					
倉石立（Kuraishi, Ritsu）		文学部、生物学教室、准教授					
古川亮平（Furuakwa, Ryohei）		文学部、生物学教室、助教					
坪川達也（Tsubokawa, Tatsuya）		法学部、生物学教室、専任講師					
中澤英夫（Nakazawa, Hideo）		医学部、生物学教室、助教（専任）					
1. 研究成果実績の概要							
<p>成長因子の一つであるトランスフォーミング成長因子(TGFβ)は多様な生理活性機能を有している。本研究では、棘皮動物イトマキヒトデ胚を用い、TGFβの機能特性の解明を目的とした。</p> <p>(1) イトマキヒトデ後期原腸胚から単離した TGFβ(PpTGFβ)は LAP と TGFβ が結合した複合体構造としてコードされている。</p> <p>(2) 無細胞系で合成した PpTGFβ リコンビナントタンパク質は、還元状態下でのウエスタンブロットでは約 48kDa のバンドとして検出される。</p> <p>(3) 後期原腸胚を用いた in situ ハイブリダイゼーション法下では、PpTGFβ は身体の全ての部位の上皮細胞と間充織細胞に発現していた。</p> <p>(4) モルフォリノオリゴを用いた PpTGFβ のノックダウン個体(PpTGFβ モルファント)は、受精 4 日後には体のサイズが僅かに小さくなってはいたが、形態的な不具合は認められなかった。</p> <p>(5) この PpTGFβ モルファントの細胞数は、約75%でしかなかった。</p> <p>(6) 間充織細胞に強く発現するアスタチン属のメタロプロテアーゼである PpMC5 のノックダウン個体と実験対照である CMO 個体から受精 4 日目に乖離細胞を得た。これらを PpTGFβ リコンビナントタンパク質とインキュベートしたところ、CMO 個体のサンプルでは明らかに PpTGFβ が分解されていたが、MO 個体由来のサンプルでは分解が抑制されていた。</p> <p>(7) 上記(6)の CMO 個体とのインキュベーションにより生じたと推定される分解産物を、モルフォリノオリゴによる PpMC5 欠失が誘導された初期原腸胚の胞胚腔に注入した。4 日幼生に到るまで飼育を続け、その影響をみたところ、胚体サイズが増加するのみならず、構成細胞数も有意差を持って増加していた。</p> <p>以上の結果から、ヒトデ胚の PpTGFβ は細胞増殖に関与しており、その前段階として PpMC5 によって活性化される必要があることが示唆された。これにより、間充織細胞が上皮細胞の増殖を誘起している実態もイメージできるようになった。</p>							
2. 研究成果実績の概要（英訳）							
<p>Transforming growth factor (TGFβ) has various physiological activities. Present study aims to examine TGFβ's functional characteristics and mechanism activated by PpMC5 (astacin metalloprotease) during development of the starfish, <i>Patria pectinifera</i>. Obtained results as follows.</p> <p>(1) We identified an inherent TGFβ from late-gastrulae of <i>P. pectinifera</i>, and referred to this as PpTGFβ (GenBank accession No. 528218).</p> <p>(2) PpTGFβ encodes 450-amino acid polypeptides with 45kDa of theoretical molecular weight, and its deduced sequence reveals an inactivated (latent) form consisting of leader sequence, LAP and TGFβ1.</p> <p>(3) PpTGFβ was indeed expressed in the epithelial and mesenchyme cells of whole body of late-gastrula embryos.</p> <p>(4) In PpTGFβ morphant (400 μM, morpholino-oligo; MO) on 4-day-old bipinnaria larva, a little decrease of larval size (approximately 10% decrease of control CMO-larvae) occurred without any morphological irregularities.</p> <p>(5) In compared to control CMO-larvae, cell numbers of PpTGFβ morphant shown in (4) decrease is approximately 20-25%.</p> <p>(6) When PpTGFβ is incubated with dissociated cells of PpMC5-MO or PpMC5-CMO bipinnaria larvae, the resulting products were proteolytically degraded only in samples of PpMC5-CMO. On the other hand, an apparent inhibition of proteolysis of PpTGFβ occurs in the PpMC5-MO samples.</p> <p>(7) MO of PpMC5 elicits larval size decrease. In PpMC5 morphants on 4-day-old bipinnaria larva, which the degraded samples of PpTGFβ has injected into the blastocoel at the early gastrula-stage, decrease of larval size was significantly rescued. This is contrasted to control experiment. These observations were corroborated in quantifications of cell numbers.</p> <p>Together, our results suggest that PpTGFβ participates in induction of cell proliferation and that it is necessary for PpTGFβ to be proteolytically activated by PpMC5 prior to work.</p>							
3. 本研究課題に関する発表							
発表者氏名 (著者・講演者)	発表課題名 (著書名・演題)	発表学術誌名 (著書発行所・講演学会)	学術誌発行年月 (著書発行年月・講演年月)				