

氏 名 早川 英介

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第 1003 号

学位授与の日付 平成 18 年 9 月 29 日

学位授与の要件 生命科学研究科 遺伝学専攻  
学位規則第 6 条第 1 項該当

学位論文題目 Identification of neuropeptides and evolutionarily  
conserved peptide receptors in *Hydra*

論文審査委員 主 査 教授 広海 健  
教授 齋藤 成也  
教授 桂 勲  
助教授 平田 たつみ  
主幹研究員 南方 宏之（（財）サントリー  
生物有機化学研究所）

## 論文内容の要旨

Neuropeptides are utilized as transmitters and hormones in higher metazoans. In lower metazoans, the information of neuropeptides are still limited. *Hydra*, a member of Cnidaria, is one of the most basal metazoans that have a definite body plan and nervous system. It has been implicated that developmental processes and physiology of *Hydra* are highly regulated by various signalling peptides. Furthermore, neurotransmission in Cnidaria are thought to be performed exclusively with peptides. Thus, identification and characterization of neuropeptides are of particular importance to understand both development and physiology of *Hydra*. The information obtained from *Hydra* should also shed light on evolution of peptides and their receptors.

**Chapter I Identification of evolutionarily conserved neuropeptides and prediction of their receptors in Hydra**  
Some neuropeptide families are conserved among Chordata and Arthropoda. This suggests that neuropeptides are conserved throughout animal evolution and that evolutionarily conserved neuropeptides may be identified in *Hydra*. Thus, I attempted to identify such neuropeptides in Hydra by in silico datamining.

First, I developed an algorithm to detect possible neuropeptides in the Hydra EST database. I discovered a novel precursor gene that possibly encodes neuropeptide Y (NPY)-related peptides. The deduced precursor contained a N-terminal signal peptide, 3 putative NPY-related peptides, each flanked by an amidation motif "G(K/R) at the C-terminal side. The sequence of C-terminal 5 amino acids in one of the deduced peptides was quite similar to neuropeptide F, a member of NPY family, of *Helix aspersa* (Brown garden snail). In situ hybridization revealed that the gene was expressed in a subpopulation of neurons distributed in tentacles and foot region of *Hydra*. Thus, the peptides were designated as *Hydra* neuropeptide Fs.

Next, I looked for homologs of *Hydra* neuropeptides, Hym-355 and GLWamides in the *C. elegans* EST database. Genes that possibly encode Hym355-like and GLWamide-like peptides were found. The peptides similar to these *C. elegans* peptides were searched in the insect DNA databases. *C. elegans* Hym-355-like peptides showed similarity to insect PRXamides (Ecdysis triggering hormone, CAP, Pyrokinin), and *C. elegans* GLWamide-like peptides showed similarity to insect Allatostatin type B. These findings suggest that some of the neuropeptides are evolutionarily conserved throughout animal evolution.

Neuropeptides and their receptors (GPCRs) evolve together. In fact, GPCRs form clusters in a phylogenetic tree and those in a cluster often use the same or similar ligands. In this study, sets of novel GPCR genes were identified from the *Hydra* whole genome shotgun database. Phylogenetic analysis showed that some of the *Hydra* GPCRs were highly related to neuropeptide receptors known in higher metazoans. One of them (HGR001) was related to neuropeptide Y and cholecystokinin receptors. The gene was expressed in dividing nematoblasts (sting cell precursors) suggesting its involvement in proliferation and/or early differentiation of nematocytes.

These results suggest that some of the neuropeptides and their receptors are evolutionarily conserved and based on the conservation, novel peptides and GPCRs can be identified not only in *Hydra* but also in other animals.

**Chapter II Identification of novel neuropeptide family, Hym65 and Hym1533**

In the course of systematic identification of peptide signaling molecules combined with EST database analysis in *Hydra*, we have identified a novel neuropeptide family that consists of two members with a C-terminal motif

of FRamide; Hym-65 (IPTGTLIFRamide) and Hym-1533 (APGSLLFRamide). The precursor sequence deduced from cDNA contained a single copy each of Hym-65 and Hym-1533 precursor. The expression analysis by whole-mount in situ hybridization showed that the peptide encoding gene was specifically expressed in a subpopulation of neurons that were distributed throughout the body from tentacles to basal disc. Double in situ hybridization analysis showed that the population was further subdivided into two; one consisted of neurons expressing both Hym-65/1533 and Hym-176 (neuropeptide) encoding genes and the other consisted of neurons expressing only the Hym-65/1533 encoding gene. The neuron population did not overlap with that expressing the Hym-355 or GLWamide neuropeptide gene.

Hym-65 evoked elongation of the body column of epithelial *Hydra* that is composed of epithelial cells and gland cells but lacks essentially all the cells in the interstitial stem cell lineage including neurons. In contrast, Hym-1533 evoked the body column contraction. These results suggest that both of the neuropeptides directly act on epithelial (muscle) cells as neurotransmitters and are involved in the body movement in a longitudinal direction.

## 論文の審査結果の要旨

多細胞生物は細胞間のコミュニケーションを行うために多くの分泌因子を使う。中でも神経ペプチドは、動物の様々な行動を支配する重要な分子であり、多くの神経ペプチドやその受容体が後口動物（ヒトなど）からも前口動物（ショウジョウバエ、線虫など）からも見ついている。このような生体システムがどのように進化してきたかは、まだ解かれていない重要な問題である。ペプチドの1次配列はきわめて多様性に富み、異なる種で見つかったペプチドで共通性のあるのはC末の3-5アミノ酸だけであることが多いため、神経ペプチドの配列比較だけからペプチドの進化的起源を解析するのは困難である。これまでも、前口動物、後口動物の共通の祖先から派生した腔腸動物であるヒドラを用い、生化学的方法でペプチドを網羅的に同定しようという試みはあった。しかし、この大規模プロジェクトで同定された神経ペプチドのうち、前口動物、後口動物につながる配列を有するペプチドはRFアミドペプチドのみであり、神経ペプチドの進化の様相は明らかではなかった。

早川君は、神経ペプチドシステムの進化の問題にバイオインフォマティクスを使って取り組んだ。新規ペプチドをゲノム情報から予測するため、前駆体タンパク質のプロセシングや分泌のためのシグナルを指標に既存の神経ペプチドのファミリーに属するペプチドを生産しうるcDNAを選び出すアルゴリズムを開発した。それをもちいて、まずヒドラのESTデータベースから新規ペプチド遺伝子の候補を検索した。まず、ヒトからショウジョウバエやカタツムリなど様々な動物に広範に分布しているニューロペプチドYファミリーに属する3つのペプチドをコードしうる遺伝子を同定した。この遺伝子は、触手と足の神経細胞で発現しており、3つのペプチドコード領域の内一つは生体内でペプチドとしての存在が確認された。このペプチドのC末の5アミノ酸残基配列はカタツムリからとられていたニューロペプチドと完全に一致したので、前口動物につながる保存されたペプチドであると考えられた。また、ヒドラにはニューロペプチドY受容体と相同性のあるGタンパク質受容体があることも見いだした。

次に、同じアルゴリズムを用いてこれまでヒドラで同定されていた神経ペプチドと類似する分子が線虫や昆虫に存在するかどうか調べた。そして、ヒドラのHym-355ペプチドと類似のペプチドをコードしうる遺伝子を線虫、ショウジョウバエ、および蚊のデータベースから見いだした。またヒドラのGLWアミドファミリーの神経ペプチドが、昆虫でアラトスタチンタイプBとして知られているペプチドとモチーフを共有することも見いだした。ヒドラと線虫、昆虫で共有されている神経ペプチドファミリーが「複数種」存在するという早川君の発見は、神経ペプチドシステムが前口動物、後口動物の共通の祖先に由来するという仮説を支持するものである。

上記の成果の他に、早川君はバイオインフォマティクスを使って同定したヒドラの新しい神経ペプチド遺伝子の解析も行った。この遺伝子は2つのペプチド配列を含んでおり、体全体に分布するganglionic neuronと呼ばれる神経細胞種で特異的に発現していた。早川君は、この遺伝子によってコードされることが予測された2つの新規ペプチドをヒドラ抽出物から純化することに成功し、Hym-65とHym-1533と名付けた。さらに、これらのペプチドの機能を調べるために、内在性の神経細胞を持たない個体にペプチドを投与する実験を行い、Hym-65とHym-1533が、それぞれ体を伸長あるいは収縮させる活性があることを見いだした。この結果は、ヒドラの神経ペプチドが体の収縮運動を制御している可能性を示唆するものである。

早川君は「神経ペプチドシステムの進化」という観点で腔腸動物のヒドラを取り上げ、ヒドラと他の高等動物で多くの神経ペプチドファミリーが共通して使われていることを初めて示した。保存配列の短さから進化的議論が困難であった神経ペプチドが古い起源を持つことを示した仕事として評価できる。今後、神経ペプチドの機能の保存性を解析する基盤を築いたとも言える。以上の理由で、早川英介君の論文は博士号授与の要件を満たすと審査員全員一致で判断した。