

令和元年6月14日現在

機関番号：82708

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K18745

研究課題名(和文) 魚類レプチンが持つ有用機能を解明する

研究課題名(英文) Exploring the functions of leptin in fish

研究代表者

村下 幸司 (Murashita, Koji)

国立研究開発法人水産研究・教育機構・増養殖研究所・主任研究員

研究者番号：60597649

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：効率的に魚類を養殖するには、魚類の摂食や栄養素利用の調節機構に着目した技術開発が有効と考えられる。そのための基盤研究として、ほ乳類において摂食や代謝に重要な役割を持つレプチンについて、魚類での機能を明らかにすることを目的とした。モデル魚(メダカ)を用いてゲノム編集を行い、レプチンリガンド(aおよびb)およびその受容体の遺伝子欠損魚を作出した。リガンド欠損魚は野生型と比較して、成長、摂食量、呼吸量(代謝活性の指標)に、僅かな変化が認められた。魚類レプチンの機能については未解明な点が多く、本研究で作出した遺伝子欠損魚を用いたさらなる解析が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ほ乳類では「レプチン」の作用を抑えると、食欲が旺盛となり良く育つことが知られている。このレプチンによる生育成魚の機構を魚にも応用することで、より効率的な養殖が可能になると考えられる。魚類におけるレプチンの役割にはまだ不明な点が多いが、本研究によってレプチンの作用を持たないモデル魚の作成に成功した。今後、この魚を詳しく調べることで、魚類におけるレプチンの作用の解明が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Leptin is a well-known peptide hormone that regulates appetite and energy metabolism in mammals whereas the function of leptin in fish is still obscure. In this study, leptin-related genes including leptin a, leptin b and leptin receptor knock-out (KO) medaka were generated using genome editing techniques of TALEN and CRISPR/Cas. The growth, appetite and respiration (indicator for the metabolic activity) of the leptin-ligand (a and b) KO fish were slightly changed compared to the wild type while the observed effect was not obvious. Although we have not observed clear phenotypes of the generated mutants in this study, the leptin-related gene KO fish will be a powerful tool to reveal the function of fish leptin in the further.

研究分野：魚類栄養生理

キーワード：レプチン メダカ ゲノム編集

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 魚類養殖では世界的な生産量増大のためエサ原料が不足し、飼料価格の高騰や品質(摂餌性)の低下等の問題を抱えている。そのため飼餌料を効率的に利用する技術の開発が求められている。

(2) レプチンは遺伝性肥満マウスの病因子として発見されたホルモンで、受容体を介して強力に食欲を抑制する (Zhang et al., Nature, 1994)。また、摂食調節に加え、代謝調節等の広範かつ重要な生理作用を有することが哺乳類では知られている。一方、魚類のレプチンは哺乳類との相同性が極めて低く、また産生部位・挙動が異なることから、哺乳類と同様な機能を有するかは不明であった (Kurokawa et al., Peptides, 2005)。近年になり、魚種特異的な組換えレプチンの投与実験 (Murashita et al., CBP, 2008) やレプチン受容体欠損魚 (*lepr* KO) を用いた研究 (Chisada et al., GCE, 2014) により、魚類においてもレプチンが摂食や代謝に重要な機能を有することが明らかにされつつある。しかし、効率的な魚類養殖へ向けた重要因子として着目され始めているものの、その機能の詳細は依然不明である。

(3) これまでに魚類で遺伝子欠損体を作成する方法として、ENU(N-ethyl-N-nitrosourea)等の化学薬剤を用いて点変異を導入する手法 (TILLING 法: Targeting Induced Local Lesions In Genomes) (Taniguchi et al., Genome Biol, 2006) が知られていたが、大変な労力がかかる上に求める変異体を得られるかどうか不確実であった。一方、近年それに変わる新たな手法として、TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nuclease) や CRISPR/Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/Cas) といった人工制限酵素を用いたゲノム編集技術が開発され、魚類においてもごく簡単に目的遺伝子を破壊することが可能になった (Ansai et al., Biology Open, 2014)。

## 2. 研究の目的

本研究では、効率的な魚類養殖技術開発へ向けた基盤研究として、次の2項目を主な目的とした。

- (1) 今後の魚類レプチン機能解析の重要なツールとして、レプチン関連遺伝子欠損魚を作成する。
- (2) 作出したレプチン関連欠損魚について摂食・代謝に関する表現型を解析する。

## 3. 研究の方法

### (1) レプチン関連遺伝子欠損魚の作出

ここでは、TALEN を用いて2種類のレプチンリガンド (*lepa* および *lepb*) 欠損メダカを作成した。また、*lepr* KO 魚に関する既報 (Chisada et al., GCE, 2014) と比較するため、当初計画に加えて CRISPR/Cas を用いて *lepr* の欠損体も作出した。

#### (1)-1 レプチン (*lepa* および *lepb*) 欠損体の作出

メダカには A および B として分類される2種のレプチンリガンドが存在する (Kurokawa and Murashita, GCE, 2009)。これら2種レプチンについて、これまでに明らかにしている配列情報を基に TALEN RNA (Left-TALEN および Right-TALEN) を各2セット設計・作製した。作製した TALEN

RNA をメダカ 1 細胞期の受精卵にマイクロインジェクション法により導入し、3 日令胚から抽出したゲノム DNA を用いて HRM 法 (High-Resolution Melting analysis) により変異導入効率を求めた ( $n = 24$ )。設計・作製した各遺伝子 2 セットの TALEN コンストラクトの内、より変異導入効率が高いセットを実際の変異体作出に用いた。TALEN RNA を顕微注入した F0 個体はモザイクに変異を有することから、野生型と掛け合わせることで単一の変異をヘテロに有する F1 個体を作成し、HRM およびシーケンス解析により選別することで、機能欠損が予測される変異個体を単離した。単離したヘテロ変異体を掛け合わせ、さらに選別することで目的変異をホモに有する個体を作成した。

#### (1)-2 レプチン受容体欠損体の作出

レプチン受容体欠損魚の作出には、TALEN よりもさらに簡便にコンストラクト作製が可能な CRISPR/Cas システムを用いた。これまでに明らかにしてきた *lepr* の配列を基に single guide RNA (sgRNA) を設計・作製し、Cas9 mRNA と共に 1 細胞期のメダカ受精卵に顕微注入した。sgRNA は異なるエクソン上に 2 種を設計し、HRM 法にて変異導入効率を確認することで ( $n = 8$ )、より高効率に変異導入が可能なものを実際の変異体作出に用いた。TALEN での変異体作出時と同様に、野生型と掛け合わせた F1 個体から機能欠損が予測される個体を選別し、さらにそのヘテロ変異体を掛け合わせることで目的変異をホモに有する個体を作成した。

#### (1)-3 レプチン関連遺伝子の二重・三重欠損体の作出

魚類レプチンについてより詳細な機能解析を行うため、上記にて作成した *lepa*、*lepb* および *lepr* をそれぞれ掛け合わせてホモ化することで、各遺伝子の単独欠損に加えて、*lepa/b* 二重欠損および *lepa/b/r* 三重欠損体を作成した。

#### (2) レプチン関連遺伝子欠損体の表現型解析

ここでは、効率的な養殖技術開発へ向けて重要な指標となる成長、代謝活性および摂食に関する表現型を解析した。オフターゲットによる影響の可能性を排除するため、上記(1)で作成した *lepa*、*lepb*、*lepr*、*lepa/b* および *lepa/b/r* をそれぞれ野生型 (wt) と掛け戻して再度ホモ化し、それらの次世代を供試魚として用いた (計 5 系統)。

##### (2)-1 成長および代謝活性

各変異体および wt の計 6 系統について、同一日の同時刻に採取した各 50 粒の受精卵を試験に用い、受精後 1、5、12、19、27、35、47、61 および 76 日 (dpf) に代謝活性の指標として呼吸量を測定し ( $n = 2$ )、さらに 12 dpf 以後の魚については全長および魚体重を測定した ( $n = 10$ )。給餌は飽食給餌として 1 日 7 回行い、呼吸量の測定と体重測定には 16 時間絶食させた魚を用いた。呼吸量の測定には、非接触センサーを用いた光学式酸素モニター (FireSting O<sub>2</sub>, Pyroscience, Germany) を使用し、25 の一定温度下で密閉式バイアル内にて行った。また、各日齢の魚について事前検討を行うことで、バイアルサイズや収容尾数、測定時間等の条件を決定した。これら成長・呼吸量については、繰り返し実験として、採卵からの同一試験を異なる日に 3 度実施した。

##### (2)-2 摂食

ここでは、仔魚期および成魚期の魚における摂食量の比較を行った。仔魚期の魚には 13 dpf (ふ

化後3日齢)の wt, *lepa*, *lepb*, *lepa/b* および *lepr* (計5系統)を用いた ( $n = 3-12$ )。仔魚期における摂餌量の比較は, Shimada ら (PLOS ONE, 2012)の方法に準じて実施し, 餌となるパラメシアを 4-Di-10-ASP (ThermoFisher Scientific, USA)で標識し, 1時間における摂取量をその蛍光強度を測定することで定量した。また, 成魚期の魚には 59-66 dpf の wt, *lepa*, *lepb*, *lepr*, *lepa/b* および *lepa/b/r*を用いた(計6系統)。成魚期の摂餌量比較には Chisada ら (GCE, 2014)の方法を用い, 水槽内に投入した餌(アルテミア)量を一定時間毎に測定することでその摂餌量を算出した。成魚期の試験については, 同一日に6系統を同時比較し, 同じ試験を異なる日に4度実施した。

#### 4. 研究成果

##### (1) レプチン関連遺伝子欠損魚の作出

変異体作出に用いた *lepa* もしくは *lepb* を標的とした TALEN RNA および *lepr* に対する sgRNA を顕微注入した F0 個体への変異導入効率はそれぞれ 62.5 % (*lepa*), 41.7 % (*lepb*) および 100 % (*lepr*)であった。また, 変異導入が確認された F0 からの次世代への変異伝達率はそれぞれ 100 % (*lepa*), 68.8 % (*lepb*) および 50 % (*lepr*)であった。得られた F1 の標的領域のシーケンスを解析することで, フレームシフトによる完全な機能欠損が予想される個体 (*lepa*: 4塩基欠損, *lepb*: 4塩基欠損, *lepr*: 7塩基欠損)をそれぞれ単離し, さらに各変異をホモ化することで *lepa*, *lepb* および *lepr* 欠損メダカを作出した(図1)。

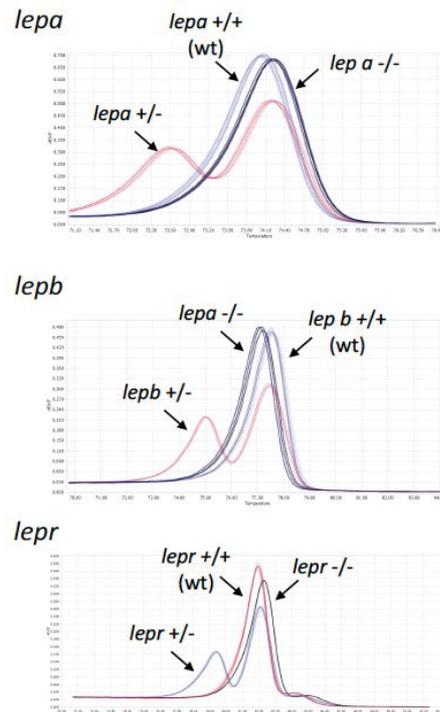


図1. HRM解析による変異体の検出

##### (2) レプチン関連遺伝子欠損体の表現型解析

27 dpf の *lepa*, 35 dpf の *lepb*, *lepr* および *lepa/b/r* 欠損魚の呼吸量(体重当たりの酸素消費量)は wt に対して有意に低かった。また, 27 dpf の *lepa*, *lepb*, *lepa/b* および *lepa/b/r*, 35 dpf の *lepa* ならびに 48 dpf の *lepb* の体重は wt よりも有意に高かった。一方, 61 dpf には *lepa* および *lepa/b* の魚体重は wt に対して低くなっており, 72 dpf ではいずれの変異体にも差がみられなかった。呼吸量・成長ともに僅かな差であったものの, レプチン関連遺伝子が欠損することで成熟前の若齢期における基礎代謝が僅かに弱まり, その間の体重増加に繋がったのかも示れない。

仔魚期における摂餌量を比較したところ, 有意ではないものの, *lepa*, *lepb* および *lepr* で wt よりも高い傾向がみられた。また, *lepa/b* の摂餌量は他よりも突出して高く, その差は wt に対して有意であった。一方, 成魚期にはどの変異体においても摂餌量に差が確認されなかった。

Chisada ら (GCE, 2014) の報告では *lepr* KO メダカは wt に対して明瞭な摂餌量と体重の増加が認められているものの, 本研究で作出した *lepr* 変異体には成長・摂餌量ともに影響が確認されなかった。その原因は不明であるが, リガンド欠損魚においてのみ若齢期の成長・代謝および

仔魚期の摂餌量の3項目に差が確認されたことから、メダカのレプチンには既知のレプチン受容体を介さない作用経路があるのかもしれない。ただし、本研究でみられた体重・呼吸量の差はごく僅かなものであり、また仔魚期における摂餌量試験では十分量のサンプル数が解析されたとは言えない。効率的な魚類養殖技術開発へ向け、本研究で作出したリガンド2種(*lepa* および *lepb*)および受容体(*lepr*)の単独・二重・三重欠損モデル魚を用いた今後のさらなる解析が期待される。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計1件)

Ivar Rønnestad, Ana S. Gomes, Koji Murashita, Rita Angotzi, Elisabeth Jonsson, Helene Volkoff, Appetite-controlling endocrine systems in teleosts, *Frontiers in Endocrinology*, 3, Article 73, 1-24, 2017.

### 〔学会発表〕(計1件)

Koji Murashita, Comparison of aquaculture systems between Japan and Norway (Overview of fish aquaculture and fish feed research in Japan: an approach from fish physiology), Seminars on sustainable aquaculture, resource enhancement and conservation of salmon and other species, 2018.06.13 (大槌)

### 〔図書〕(計0件)

### 〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

### 〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

なし

### (2)研究協力者

木下 政人

KINOSHITA, Masato

京都大学・農学研究科・助教

Ivar Rønnestad

University of Bergen・Professor

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。