

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09893

研究課題名(和文) 抗肥満高耐糖能マウスにおける責任遺伝子の同定と糖代謝における役割の解析

研究課題名(英文) Identification of the causative gene and analysis of its role in glucose metabolism in antiobesity and high glucose tolerance mice.

研究代表者

佐藤 貴弘 (Sato, Takahiro)

久留米大学・付置研究所・准教授

研究者番号：50368883

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：抗肥満高耐糖能マウスは、突然変異によって偶発的に出現した矮小変異マウスである。これまでの解析から、このマウスは安静時の血糖値が低く、高い耐糖能を示すこと、また、高脂肪食を負荷しても肥満しにくいことを示してきた。つまり、このマウスは高耐糖能と抗肥満を特徴とするマウスであることから、新しい系統として樹立し機能解析を進めることによって生活習慣病の発症や病態の理解につながると考えられる。本研究では、抗肥満高耐糖能マウスの責任遺伝子が第16番染色体上のCrebbp遺伝子であることを決定し、また、この遺伝子に生ずる一塩基欠損がフレームシフトを引き起こすことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で樹立に成功した抗肥満高耐糖能マウスは、糖負荷によって著しく血糖値が上昇したり、高脂肪食負荷によって過度の肥満を呈したりする従来の疾患モデルマウスとは異なり、これらの負荷条件下でも恒常性を維持できる高い適応力を持っている。このことから、糖尿病や肥満症の発症・進行の研究において、新しいタイプのモデル動物としての利用が期待される。さらに、本研究から抗肥満高耐糖能マウスの責任遺伝子を明らかにすることができたため、遺伝子レベルで基礎研究を進めることが可能となった。したがって、抗肥満高耐糖能マウスを用いた研究成果は、今後、新たな創薬ターゲットや治療戦略の創出にも繋がることを期待される。

研究成果の概要(英文)：The anti-obesity high glucose tolerance mouse is a dwarf mutant mouse that emerged by mutation. From the analysis so far, it has been shown that this mouse has a low blood glucose level at rest, exhibits high glucose tolerance, and is resistant to obesity even when loaded with a high fat diet. In other words, since this mouse is characterized by high glucose tolerance and anti-obesity, it is considered that establishment of a new strain and advancement of functional analysis will lead to the understanding of the onset and pathological condition of lifestyle-related diseases. In the present study, we determined that the gene responsible for antiobesity and high glucose tolerance mice was the Crebbp gene on chromosome 16, and revealed that a single nucleotide deletion in this gene causes a frameshift.

研究分野：神経内分泌学

キーワード：CREBBP

## 1. 研究開始当初の背景

突然変異とは生物が持つ遺伝物質の質的・量的な変化であり、また、その変化によって生じる状態を指す。個体レベルでは突然変異によって表現型に異常を来す場合もあり、このような突然変異によって生じたマウスは、医学研究に大きな展開をもたらす疾患モデルマウスとして有用である。このため、エチルニトロソウレア (N-ethyl-N-nitrosourea) などにより、ゲノム DNA に高率で点突然変異を誘導したミュータントマウスの作製も進められている。一方で、頻度は少ないものの、マウスの飼育過程で偶発的に突然変異が出現する例も知られている。このような自然発生変異マウスは、自然界で生じやすい突然変異により生じていると考えられ、貴重な研究資源として利用されている。

我々は、胃から分泌されるホルモンのグレリンについて、その生理機能を明らかにするためにグレリン遺伝子欠損マウスを作製して解析を進めていたが、このマウスを維持する過程において、グレリン遺伝子ヘテロ欠損の矮小変異雄マウスが偶発的に出生した。このような矮小変異雄マウスは1個体のみ得られたが、同腹の正常な雄マウスと比べて体重が約 30%程度小さいことがわかった。また、矮小変異マウスの外貌を観察すると、両眼乖離および鼻部延長という頭部形成異常を呈していた。

そこで、矮小変異雄マウスに見られるこれらの異常形質がグレリン遺伝子欠損により生じたものではないことを確認するため、この矮小変異雄マウスを C57BL/6J 系統の雌マウスと交配した。産まれた仔には複数の矮小変異マウスが含まれており、このうちの一部はグレリン遺伝子欠損を持たない野生型の矮小変異マウスだった。そこで、このマウスを C57BL/6J 系統のマウスと 10 世代以上のバッククロスを重ねたところ、同腹から正常マウスと矮小変異マウスが出生した。また、この矮小変異マウスも両眼乖離および鼻部延長という頭部形成異常を持っており、偶発的に生じた最初の個体と同様の異常形質を示すこともわかった。このような肉眼観察による異常形質を明確にするため、体長(鼻尖から尾根まで)と体重を計測したところ、同腹の正常マウス群に比べ、矮小変異マウス群では体長が短く、かつ偶発的に生じた最初の個体と同様に体重が 30%程度軽かった。これらの値から体格指数を算出したところ、両群間に差は見られなかった。したがって、矮小変異マウスは、栄養摂取不良などにより痩せが生じたために矮小になっているのではなく、正常マウスと同等の体格のまま小型化していることもわかった。一方、高精度ノギスを用いた鼻背長と両眼間隔の計測により頭部形成異常についても確認したところ、正常マウスに比べ、矮小変異マウスでは鼻背長が短く、両眼間隔が広がっていることが示された。このように、バッククロスを進めた後に出生した矮小変異マウスも最初に得られた矮小変異マウスと同様の外貌を呈していたことから、矮小変異マウスに見られる異常形質は何らかの遺伝子変異により生じていると考えられた。

また、正常個体と矮小変異個体の出生比率を調べたところ、正常個体:矮小変異個体=277:138=約 2:1 であり、メンデルの法則にははたがっていないかった。しかしながら、矮小変異マウスの性別に関わらず C57BL/6J マウスと交配すれば矮小変異マウスが生まれてくることや、矮小変異マウスと C57BL/6J マウスを交配すると正常マウスと矮小変異マウスの双方が生まれること、これらの交配によって出生するマウスは食殺される例が非常に多いことなどから、矮小変異マウスの出現は常染色体優性遺伝しているという仮説のもとで研究を進めた。

形態学的観察によって矮小変異マウスの特徴的な形質が明らかになったので、次に、血液生化学的検査によりこのマウスに見られる表現系を調べたところ、矮小変異マウスでは、アルカリホスファターゼ、カルシウム、無機リンの値が高くなっていることがわかった。一方、矮小変異マウスでは血中のグルコース濃度が低い値を示しており、血液生化学的検査で得られた値では最も特徴的な差として観察された。そこで、グルコース寛容試験 (2 g/kg グルコース、腹腔内投与) を行なったところ、矮小変異マウスでは血糖値の上昇幅が極めて小さく、著しく耐糖能が高いこともわかった。また、高脂肪食負荷実験を行うと、実験開始前に比べて高脂肪食負荷 (12 週間) 後の体重は、正常マウスでは約 55%増加したが矮小変異マウスではわずか 4%の増加だった。このことから、矮小変異マウスは肥満に対して抵抗性を持つこともわかった。

このような解析から矮小変異マウスに特徴的な形質が明らかとなってきたが、既知の遺伝子変異動物や遺伝子改変動物が掲載されたデータベース上には該当する記載がなかったことから、我々が見出した矮小変異マウスこれまでに知られているモデル動物とは全く異なる「抗肥満高耐糖能マウス」としての表現系を持つマウスだと考えられた。したがって、この矮小変異マウスにどのような遺伝子変異が生じているのかを明らかにできれば、今後、新たな創薬ターゲットの発見や治療戦略の創出に繋がる研究展開が期待できると考えた。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、自然発生矮小変異マウスの責任遺伝子を明らかにし、抗肥満高耐糖能マウスを新しいマウス系統として樹立することを研究目的とした。さらに、この変異遺伝子が糖脂質代謝にどのような影響を及ぼしているのかについて、その一端を明らかにすることも目的とした。

### 3. 研究の方法

抗肥満高耐糖能マウスの責任遺伝子を決定するため、C57BL/6J マウスを用い、責任候補遺伝子である *Crebbp* の該当部位を CRIPR/Cas9 法により欠損させた。出生したマウスは形態学的解析や血液生化学的検査などを行い、自然発生矮小変異マウスと比較解析した。

定量 PCR アレイに供するため、正常マウスと矮小変異マウス（10~12 週齢、雄）から肝臓、膵臓、骨格筋（腓腹筋）、白色脂肪を採取し、常法によって RNA 抽出後に cDNA を合成した。これらの cDNA サンプルを用い、目的のパスウェイを持つ定量 PCR アレイプレート（RT2 Profiler PCR Arrays; 株式会社キアゲン）にて遺伝子発現量を測定し、ホームページ上に提供されている解析ソフトでデータを解析した。

行動解析は、それぞれ次のような方法で実施した。フットプリント試験は、マウスの後肢に墨汁をつけ、塩化ビニール管製の半円筒で覆った白紙上を 50 (cm) 歩かせ、足跡から歩幅を測定した。四肢の握力は、小動物用筋弛緩測定装置（トラクションメーター; 株式会社ブレインサイエンス・イデア）にて行った。高架式十字迷路解析はビデオ画像行動解析装置（Smart Jr.; バイオリサーチセンター株式会社）を用い、移動距離や各アームの滞在時間などを調べた。

本研究の実施に必要な遺伝子組み換え実験に関しては、久留米大学遺伝子組換え実験安全委員会の承認を得て実施した。また、すべての動物実験は年度毎に更新の必要な久留米大学動物実験委員会の承認を得て実施した。

### 4. 研究成果

本研究では、我々が見出した矮小変異マウスの異常形質がどのような遺伝子の変異によって生じているのかを決定し、抗肥満高耐糖能マウスとして樹立することができた。また、この変異遺伝子が糖代謝や脂質代謝にどのような影響を及ぼしているのか、その一端も解析した。

このような研究目的を達成するためには、矮小変異マウスにどのような遺伝子変異が生じているのかを明らかにすることが必須である。そこでこの課題に取り組んだが、マウスの遺伝暗号の長さは約 2,600 (Mb)、遺伝子数は約 22,000 個程度とされているため、限られた研究期間内に目的を達成することは困難を極めた。しかし、科研費（課題番号：26461388 及び 17K09893(本研究)）の助成を受け、最終目的である責任遺伝子及び欠損部位まで決定し、抗肥満高耐糖能マウスとして樹立することができた。また、研究成果は、特許として国際出願し、公開されている（公開番号：PCT/JP2019/025902）。

本研究に先立って矮小変異マウスの責任遺伝子を決定するための戦略を立てた（右図）。効率よく研究を進めるため、はじめに、高速遺伝子マッピング法による解析を行い、変異箇所が存在する染色体領域を絞り込む実験を行なった。そのために、データベースの整った DBA/2J マウスとのバッククロスを行い、得られた F2 マウス個体から尾を採取して実験を進めたところ、矮小変異マウスの責任候補遺伝子は第 16 番染色体の 38,931,238 (bp) より上流に存在することが明らかとなった。さらに、この領域内の 10 か所でプローブを再設計して遺伝子マッピング解析を行ったところ、責任候補遺伝子の存在領域は 21,678,473 (bp) より上流であることまで絞り込むことができた。

この絞り込んだ領域内において、次世代シーケンシング解析（北海道システムサイエンス株式会社）を行った。もし、変異が点突然変異の場合には一塩基多型 (SNP) など含まれるために 10,000 か所を超える候補部位の抽出が予測される。そこで、責任候補遺伝子を効率よく見出すため、すでに実施した遺伝子マッピングの結果を利用し、理化学研究所が一般公開していた PosMed (Positional Medline) システム（現在、停止中）を用いたバイオインフォマティクスによる解析も同時に進めた。この方法により、責任候補遺伝子として可能性の高いものをランキングすることができるため、数十個程度まで絞り込むことができる。実際、次世代シーケンシング解析では 10,000 か所程度の候補箇所が抽出されたが、そこからタンパク質をコードしている領域などの条件で絞り込みをかけ、見出された SNPs のうち、変異個体間あるいは正常個体間で塩基が異なっているものを除いた 317 か所についてサンガー法によるシーケンシング解析を行った。サブクローニング後のコロニーピッキングに際しては、矮小変異マウスの変異がヘテロ変異である可能性を考慮し、1 か所の変異に対して複数のコロニーをピッキングしてシーケンシング解析を行った。このような方法で次世代シーケンシング解析の結果から抽出された候補領域と、PosMed 解析から抽出された候補領域とを比較しながら解析を進めると、タンパク質をコードしている領域で変異が存在するのは chr16: 4,138,835 のみであることがわかった。すなわち、自然発生矮小変異マウスの責任候補遺伝子として *Crebbp* (CT→C) を抽出することができたため、本研究で

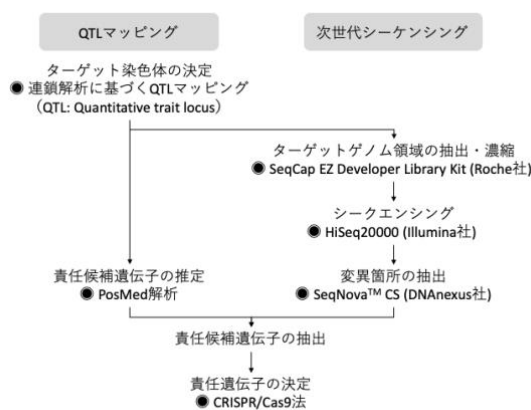


図. 本研究の戦略

は CRISPR/Cas9 法によってこの遺伝子変異を C57BL/6J マウスに対して人為的に導入し、同じ形質が得られるかを観察した。その結果、外貌など全ての形質が自然発生した矮小変異マウスと一致したことから、chr16: 4,138,835 の *Crebbp* (CT→C) が自然発生矮小変異マウスの責任遺伝子であると決定することができた。

本研究で使用した自然発生矮小変異マウスは、矮小であることや血糖値が低いこと以外にも、鼻部形成異常や温順な性格などの観察が得られている。そこで、抗肥満高耐糖能マウスとして樹立し、疾患モデル動物としての利用の可能性を探るため、糖脂質代謝に加えて行動解析なども実施した。自然発生矮小変異マウスのグルコース寛容試験下において、グルコース投与 15 分後の骨格筋では、脂質代謝関連の遺伝子発現量が減少していた。一般的には、高濃度グルコース投与で骨格筋の脂質代謝関連の遺伝子発現量が増加することから、矮小変異マウスでは肝臓の糖取り込み量が正常マウスに比べて多くなっているため、骨格筋の脂質代謝関連の遺伝子発現量が正常マウスよりも小さい値になったと考えられる。このことは、矮小変異マウスで糖取り込みのペースウェイが亢進しているという結果や、矮小マウスに高脂肪食を与えても肥満になりにくいという結果と一致していることから、今後、詳細な解析が必要である。

次に、行動学的な解析から、矮小変異マウスでは特徴的な歩行姿勢が見られることや、温順な性質を持つことなどが示された。フットプリント試験（歩行解析）から、矮小変異マウスは、歩幅が狭く（正常マウス： $5.5 \pm 0.1$  (cm)、矮小変異マウス： $4.8 \pm 0.3$  (cm)； $p=0.002$ ）、後肢間隔の広い（正常マウス： $2.9 \pm 0.1$  (cm)、矮小変異マウス： $3.0 \pm 0.1$  (cm)； $p=0.026$ ）、いわゆる”どたどた歩き”をすることがわかった。また、矮小変異マウスでは、瞬間的な握力（正常マウス： $309.4 \pm 10.5$  (arbitrary unit)、矮小変異マウス： $263.2 \pm 7.5$  (arbitrary unit)； $p=0.0009$ ）、および、保持力を示す持続的な握力（正常マウス： $107.2 \pm 4.9$  (arbitrary unit)、矮小変異マウス： $77.5 \pm 4.3$  (arbitrary unit)； $p<0.0001$ ）のいずれもが正常マウスよりも小さかった。一方、高架式十字迷路による試験から、矮小変異マウスは closed arm に滞在する時間が長く、total の進入回数が少ないことなどが明らかとなったことから、好奇心や不安レベルが低い可能性も示唆された。

以上から、自然発生矮小変異マウスは、代謝学的側面から捉えると耐糖能が高く肥満になりにくい抗肥満高耐糖能マウスであると考えられた。一方、行動学的側面からは、自然発生矮小変異マウスの精神や運動の発達が遅滞している可能性も示唆された。

本研究では、CRISPR/Cas9 システムを用い、責任候補遺伝子として抽出された *Crebbp* (CT→C) が自然発生矮小変異マウスの責任遺伝子であることを決定することができた。CREBBP は、cAMP 反応エレメント (cAMP response element, CREB) の N 末端側領域に位置するセリン残基がプロテインキナーゼ A (protein kinase A, PKA) によって活性化された際、リン酸化 CREB に結合するコアクチベーターとして同定されたタンパク質で、現在では、核内ホルモン受容体や転写活性化因子に共通する転写共役因子として機能することが明らかとなっている。したがって、*Crebbp* に変異が生じると様々な疾病の発症・進展に影響を与えることが予想される。実際、発症機序は十分には解明されていないが *Crebbp* が責任遺伝子として同定されているルビンシュタイン-テイビ症候群 (Rubinstein-Taybi syndrome) では、精神運動発達遅滞や特異顔貌（両眼乖離）といった主症状の他に低身長や幅広い鼻稜などの合併症が見られる。このような症状は、今回解析した自然発生矮小変異マウスの特徴に類似しているものもあることから、このマウスをモデル動物として利用することにより、ルビンシュタイン-テイビ症候群の発症機序などを理解する手がかりが得られることも期待される。

また、自然発生矮小変異マウスは耐糖能が非常に高く、高脂肪食負荷試験を行ってもほとんど体重の変化を認めなかった。したがって、矮小変異マウスは「抗肥満高耐糖能マウス」として捉えることができるため、肥満研究にも有用だと考えられる。今後、本マウスがモデルマウスとして普及することにより、ルビンシュタイン-テイビ症候群などの病態解明が進むことが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐藤貴弘、三浦郁生、大石佳苗、若菜茂晴、児島将康
2. 発表標題 自然発生矮小変異マウスの責任遺伝子の同定
3. 学会等名 第45回日本神経内分泌学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤貴弘、大石佳苗、児島将康
2. 発表標題 新たに見いだした自然発生矮小変異マウスにおける内分泌学的解析
3. 学会等名 第33回日本下垂体研究会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤貴弘、藤原研、大石佳苗、御船弘治、児島将康
2. 発表標題 自然発生矮小変異マウスにおけるソマトトロフ軸の解析
3. 学会等名 第34回日本下垂体研究会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 CREBBP遺伝子に変異を導入された遺伝子改変動物	発明者 佐藤貴弘, 大石佳苗, 児島将康	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-124666	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----