

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：17501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06199・19K21304

研究課題名(和文)新規脳内因子NPGL及びNPGMの新たなエネルギー代謝調節機構の解明

研究課題名(英文)Physiological function of NPGL and NPGM in energy metabolism

研究代表者

鹿野 健史朗(Shikano, Kenshiro)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：10825681

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者はこれまでに、エネルギー代謝調節機構に関わる新規脳内因子(Neurosecretory protein GL ;NPGL及びNeurosecretory protein GM ;NPGM)の生理機能解析をおこなってきた。本研究課題ではNPGL及びNPGMの遺伝子欠損マウスを作製・解析することで、両者の生理機能や分子メカニズムを解明することを目的とした。本研究により、NPGL及びNPGM遺伝子欠損マウスの作出に成功した。さらに、NPGL及びNPGM両遺伝子欠損マウスが食餌誘導性肥満を抑制することが明らかになった。今後、このモデルマウスを用いてエネルギー代謝調節機構の解明を行いたい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現代社会において肥満や肥満関連生活習慣病の増加が深刻な問題となっている。肥満の治療や予防法の確立には、食欲やエネルギー代謝調節機構の解明が必須である。本研究課題では、エネルギー代謝調節機構に関わる新規脳内因子(NPGL及びNPGM)遺伝子欠損マウスを作出及び解析することで、その生理機能や分子メカニズムを解明することを目的とした。本研究により、NPGL及びNPGM遺伝子欠損マウスの作出に成功し、さらに本モデルマウスが食餌誘導性肥満を抑制することを明らかにした。したがって、肥満を抑制する分子メカニズムの解明につながるモデル動物の作出に成功した。

研究成果の概要(英文)：Neurosecretory protein GL (NPGL) and Neurosecretory protein GM (NPGM) were discovered as a neurosecretory protein involved in energy metabolism. However, physiological functions and molecular mechanisms of NPGL and NPGM remains to be elucidated. In this study, we established NPGL and NPGM knockout mice by CRISPR/Cas9 system. Furthermore, NPGL and NPGM double knockout mice suppressed diet-induced obesity. In the future, we would like to clarify the mechanisms of energy metabolism regulation using this model mouse.

研究分野：内分泌

キーワード：視床下部 神経ペプチド エネルギー代謝 肥満

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Neurosecretory protein GL (NPGL) 及び Neurosecretory protein GM (NPGM) は、2014年に視床下部より分泌性小タンパク質をコードする遺伝子として発見された(1)。ゲノムデータベース解析より、両遺伝子は脊椎動物に高度に保存されていたことから、生理機能に重要な役割を果たすことが推測された。また、鳥類(ニワトリ)や哺乳類(ラット及びマウス)を用いた解析により、絶食負荷や肥満モデルにおいて、NPGL や NPGM の遺伝子発現量が変動することなどから両遺伝子がエネルギー代謝調節機構に関与することが示唆されている。

これまでに、NPGL 及び NPGM の生理機能を解析するために、ニワトリやラット、マウスを用いて投与実験や遺伝子過剰発現実験を行ってきた。ニワトリのヒナに NPGL あるいは NPGM を投与すると、摂食量や体重増加に変動が認められたことから、NPGL 及び NPGM がエネルギー代謝調節機構に関与することが示された(1)。また、哺乳類のモデル動物であるラットならびにマウスにおいても、NPGL 及び NPGM の脳室内投与や視床下部への遺伝子過剰発現により、脂肪組織における *de novo* 脂肪合成の亢進や高脂肪食給餌条件での摂食量の増加が生じることが明らかになっている(2,3)。さらに、ラットを用いた食餌選択実験により NPGL を投与すると炭水化物及び脂質、タンパク質の内、炭水化物摂取が増加することが示された。以上のことから、NPGL 及び NPGM は脊椎動物においてエネルギー代謝調節機構や嗜好性などを含む脳内高次機能に関与することが示唆された。

このように、gain of function の解析により、NPGL 及び NPGM システムがエネルギー代謝調節機構に関与することを明らかにしてきた。しかしながら、内在性 NPGL 及び NPGM の生理機能は明らかになっていないため、NPGL 及び NPGM システムの生理機能ならびに分子メカニズムは未だ不明である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、新規脳内因子(NPGL 及び NPGM)のエネルギー代謝調節機構に関わる生理機能や新たな生理機能を明らかにすることである。

先行研究においては、脳室内投与や視床下部内への遺伝子過剰発現により、NPGL 及び NPGM の gain of function の解析をおこなってきたが、本研究では CRISPR/Cas9 システムを用いて NPGL 及び NPGM のノックアウトマウスを作製し、NPGL 及び NPGM の loss of function を解析することで、NPGL 及び NPGM の生理機能を追究する。さらに、表現型解析により、NPGL 及び NPGM がエネルギー代謝調節や情動や記憶などの脳内高次機能などに関与するかを解析する。

3. 研究の方法

本研究では、CRISPR/Cas9 システムを用いてゲノム編集を行い、NPGL 及び NPGM の遺伝子欠損マウスを作製した。まず、ガイド RNA (gRNA) 設計ソフトウェアである CRISPRdirect (<https://crispr.dbcls.jp/>)を用いて、オフターゲット効果が低く PAM 配列を含む NPGL あるいは NPGM 遺伝子に対する特異的 gRNA を設計し、NPGL あるいは NPGM に対する gRNA を作製した。また gRNA に関しては、NPGL 及び NPGM の成熟タンパク質を確実に欠損させるために成熟タンパク質をコードする領域を挟むように 2 種類の gRNA を使用した。次に、自然交配させた C57BL/6 系統の野生型マウスの卵管膨大部から受精卵を採卵し、NPGL あるいは NPGM に特異的な 2 種類の gRNA 及び Cas9 タンパク質をエレクトロポレーション法を用いて受精卵に導入した。gRNA や Cas9 タンパク質を導入した受精卵が 2 細胞期に発生することを確認した後に、これらの受精卵を仮親マウスの卵管内に移植し、F0 マウスを作出した。得られた産仔からゲノム DNA を抽出し、NPGL あるいは NPGM 遺伝子それぞれに特異的なプライマーを用いて PCR を行い、ジェノタイプを行った。また F1 マウスのゲノム DNA から増幅した PCR 産物を用いて、DNA シーケンスを行い、遺伝子変異を確認した。さらに、作出した NPGL ノックアウトマウス及び NPGM ノックアウトマウスを交配させることで NPGL 及び NPGM ダブルノックアウトマウスを作出した。次に、NPGL 及び NPGM ノックアウトマウスの表現型解析をおこなった。これらのノックアウトマウスと野生型マウスを通常食及び高脂肪食給餌条件下において飼育し、経時的に体重を測定した。

4. 研究成果

CRISPR/Cas9 システムを用いてゲノム編集を行った結果、NPGL あるいは NPGM の成熟タンパク質領域を含む約 400bp の領域を欠損した遺伝子配列を持つ、C57BL/6 系統の NPGL あるいは NPGM ノックアウトマウスを作出した。これらの F0 マウスを野生型 C57BL/6 マウスと交配し、F1 マウスを作製し、次世代に遺伝子変異が引き継がれることを確認した。さらに F1 マウスを用いて DNA シーケンスを行った結果、NPGL ノックアウトマウスに関しては 351 塩基が、NPGM ノックアウトマウスに関しては 424 塩基が欠損していることが明らかになった(図 1)。さらに、免疫組織化学により、NPGL あるいは NPGM ノックアウトマウスにおいて、それぞれ NPGL あるいは NPGM 陽性細胞が欠失していることを確認した。次にこれらのマウスを交配させ、NPGL 及び NPGM ダブルノックアウトマウス(NPGL/NPGM dKO マウス)を作出した。

次に、これらの遺伝子改変マウスの表現型解析を行った。まずは、NPGL ノックアウトマウスとコントロールマウスを通常食あるいは高脂肪食給餌条件下で飼育し、体重を測定した。

普通食給餌条件下において体重を測定した結果、NPGL ノックアウトマウスとコントロールマウス間で体重に差は認められなかった(図2)。一方で、高脂肪食給餌条件下においては、NPGL ノックアウトマウスの体重がコントロールマウスに比べて減少する傾向が認められた(図3)。また、先行研究における gain of function による解析から NPGL と NPGM は同様の生理作用を有することが示されている。そのため、NPGL ノックアウトマウスでは NPGM が代償的に作用している可能性があるため、NPGL/NPGM dKO マウスを用いることで、より顕著な表現型が得られると推測し、現在解析を進めている。予備的な解析ではあるが、高脂肪食給餌条件下で NPGL/NPGM dKO マウスはコントロールマウスに比べて有意に体重が減少していた。以上より、NPGL/NPGM dKO マウスにおいて食餌誘導性肥満を抑制することが示唆された。今後は、再現性を確認するために個体数を増やして NPGL 及び NPGM ノックアウトマウスの表現型解析を行う。さらに、このモデルマウスを用いて、NPGL/NPGM システムの分子メカニズムやエネルギー代謝調節機構以外の生理作用にも関与しているかを解析していく。

これまで、NPGL/NPGM システムに関しては投与実験などによる gain of function を解析し生理機能解析を行っていたが、本研究により、loss of function の解析による内因性 NPGL/NPGM の詳細な生理機能解析が可能となった。また、摂食行動の調節機構にはエネルギーホメオスタシスを基盤とした調節機構のみならず情動や記憶などの脳内高次機能が関与しているため、今後、本モデルマウスを用いて、NPGL/NPGM システムの脳内高次機能への関与を解析する予定である。本研究課題を進展させることで、新たな中枢性エネルギー代謝調節機構の解明に繋がり、肥満改善のための基礎医学的知見の発見に結び付くことが期待される。

<引用文献>

1. Ukena K, Iwakoshi-Ukena E, Taniuchi S, Bessho Y, Maejima S, Masuda K, Shikano K, Kondo K, Furumitsu M and Tachibana T. Identification of a cDNA encoding a novel small secretory protein, neurosecretory protein GL, in the chicken hypothalamic infundibulum. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 446: 298-303, 2014.
2. Iwakoshi-Ukena E*, Shikano K*, Kondo K, Taniuchi S, Furumitsu M, Ochi Y, Sasaki T, Okamoto S, Bentley GE, Kriegsfeld LJ, Minokoshi Y and Ukena K. Neurosecretory protein GL stimulates food intake, de novo lipogenesis, and onset of obesity. *eLife* 6: e28527, 2017.
3. Matsuura D*, Shikano K*, Saito T*, Iwakoshi-Ukena E, Furumitsu M, Ochi Y, Sato M, Bentley GE, Kriegsfeld LJ and Ukena K. Neurosecretory protein GL, a hypothalamic small secretory protein, participates in energy homeostasis in male mice. *Endocrinology* 158: 1120-1129, 2017.

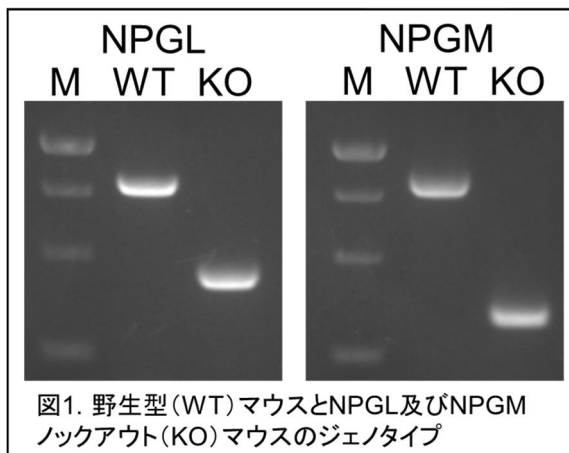


図1. 野生型(WT)マウスとNPGL及びNPGM ノックアウト(KO)マウスのジェノタイプ

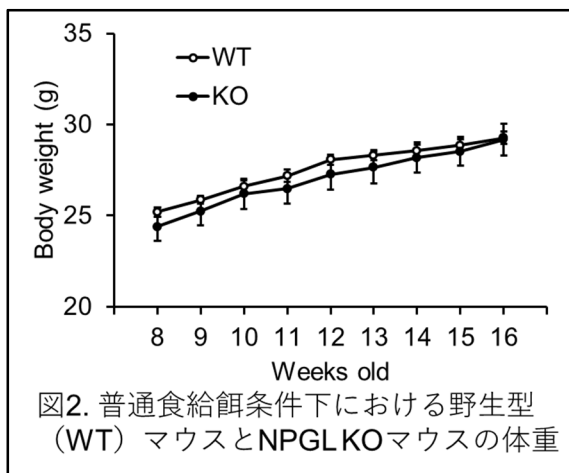


図2. 普通食給餌条件下における野生型(WT)マウスとNPGLKOマウスの体重

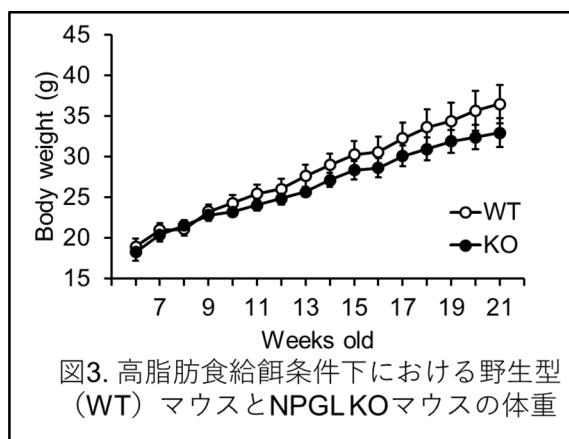


図3. 高脂肪食給餌条件下における野生型(WT)マウスとNPGLKOマウスの体重

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shikano Kenshiro, Iwakoshi-Ukena Eiko, Kato Masaki, Furumitsu Megumi, Bentley George E., Kriegsfeld Lance J., Ukena Kazuyoshi	4. 巻 10
2. 論文標題 Neurosecretory Protein GL Induces Fat Accumulation in Chicks	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Endocrinology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fendo.2019.00392	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Shikano Kenshiro, Iwakoshi-Ukena Eiko, Saito Takaya, Narimatsu Yuki, Kadota Atsuki, Furumitsu Megumi, Bentley George E, Kriegsfeld Lance J, Ukena Kazuyoshi	4. 巻 244
2. 論文標題 Neurosecretory protein GL induces fat accumulation in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Endocrinology	6. 最初と最後の頁 1~12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1530/JOE-19-0112	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 鹿野健史朗、森崎郁子、比嘉涼子、花田俊勝、花田礼子
2. 発表標題 新規脳内因子NPGL/NPGMノックアウトマウスの作製ならびに生理機能解析
3. 学会等名 第70回西日本生理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鹿野健史朗、森崎郁子、比嘉涼子、花田俊勝、花田礼子
2. 発表標題 CRISPR/Cas9法による視床下部分泌性小タンパク質NPGL/NPGM遺伝子欠損モデル動物の作出及び表現型解析
3. 学会等名 第44回日本比較内分泌学会大会及びシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鹿野健史朗
2. 発表標題 Physiological function of NPGL in feeding behavior and energy metabolism
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鹿野健史朗、松浦大智、齋藤鷹也、古満芽久美、岩越栄子、浮穴和義
2. 発表標題 マウスにおける新規脳内因子NPGLの生理機能解析
3. 学会等名 第69回西日本生理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鹿野健史朗、岩越栄子、谷内秀輔、古満芽久美、浮穴和義
2. 発表標題 NPGLは褐色脂肪組織においてde novo脂肪合成の亢進や熱産生の低下を引き起こす
3. 学会等名 第39回日本肥満学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shikano K, Matsuura D, Saito T, Iwakoshi-Ukena E, Furumitsu M and Ukena K
2. 発表標題 Neurosecretory protein GL, a novel hypothalamic small protein, regulates appetite and energy homeostasis in mice
3. 学会等名 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies (FAOPS) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

大分大学医学部 神経生理学講座
<http://www.med.oita-u.ac.jp/seiri1/>

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
--	---------------------------	-----------------------	----