

機関番号：84404

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20570065

研究課題名（和文）魚類における新規グレリン受容体の同定とその作用連関の解明

研究課題名（英文）Identification of novel ghrelin receptor in fish and clarification of the relationship between the receptor and biological action.

研究代表者

海谷 啓之（KAIYA HIROYUKI）

独立行政法人 国立循環器病研究センター・生化学部・室長

研究者番号：40300975

研究成果の概要（和文）：本研究において、キンギョの脳から大きく2種類に大別される機能的なグレリン受容体(GHS-R1a, 2a)と、それぞれの受容体のサブタイプ(GHS-R1a-1[構成アミノ酸数360アミノ酸(aa)], 1a-2[360aa], 2a-1[366aa], 2a-2[367aa])、計4種類の受容体cDNAを同定した。それぞれの受容体は組織特異的な遺伝子発現を示し、組織特有の生理作用に関わっていることが示唆された。魚類以外の脊椎動物では1種類のグレリン受容体(GHS-R1a)のみが知られているが、本研究で同定されたGHS-R2aは新しいタイプの受容体であり、これに対する新規リガンドの存在が想定された。キンギョの脳や腸の抽出物を用いて新たなリガンドを探索したが、本研究の期間ではその発見には至らなかった。

研究成果の概要（英文）：In this study, we cloned cDNAs for four functional ghrelin receptors (GHS-R1a-1, 1a-2, 2a-1 and 2a-2) that composed of 360, 360, 366 and 367 amino acids, respectively in goldfish brain. Each receptor mRNA showed tissue-specific expression, suggesting that each receptor mediates tissue-specific action of ghrelin in goldfish. One species of ghrelin receptor, GHS-R1a has been known to be present in vertebrates other than fish examined so far. We tried to isolate new ligands for the new functional GHS-Ra, which is the novel type of ghrelin receptor, from tissue extracts of goldfish brain and intestine, but unfortunately the new ligand was not able to find out during the course of this study.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：比較内分泌学、生化学

科研費の分科・細目：基礎生物学・形態構造

キーワード：グレリン、グレリン受容体、魚類、キンギョ

## 1. 研究開始当初の背景

グレリン (ghrelin) は 1999 年にラットの胃から単離された 28 アミノ酸からなるペプチドホルモンで、第 3 位のセリン残基には主にオクタン酸による脂肪酸修飾があり、その構造は受容体への結合や生物活性の発現に重要である。

グレリンの主な作用は、末梢性あるいは中枢性の成長ホルモン (GH) 分泌促進や摂食亢進作用である。その受容体は growth hormone secretagogue receptor (GHS-R) と呼ばれ、活性発現に関与する GHS-R1a と mRNA の選択的スプライシングによって部分的に受容体構造が欠如し、活性に関与しないとされる GHS-R1b の存在が知られている。

研究代表者は、これまで様々な非哺乳類 (鳥類、爬虫類、両生類、真骨魚類、軟骨魚類) でグレリンの構造を決定し、生化学的、組織化学的、生理学的特徴を明らかにしてきた。一方、生理作用及びその機序を解明する目的で、非哺乳類のグレリン受容体の同定に着手し始めた。特にキンギョにおいては、連携研究者の松田 (富山大) と共に摂食調節機序についての詳細な解析を推進していることから、キンギョのグレリン受容体の探索を積極的に行っていたが、その過程で生物活性発現に関わる受容体 GHS-R1a に類似した受容体が 2 種類存在することを見いだした。これまでグレリン受容体が同定されている哺乳類や鳥類、魚類において、GHS-R1a のサブタイプの存在は報告されていないが、キンギョに近縁なゼブラフィッシュにはデータベース上、この度同定した配列と類似の配列が存在することがわかった。

このような背景から、本研究では、このキンギョで発見した生物活性発現に関わると考えられる 2 種類の GHS-R1a の cDNA の全塩基配列の決定とその特徴付け、さらにキンギョにおけるグレリンシステムと生理作用の関連を明らかにしたいと考えた。

## 2. 研究の目的

グレリンは、視床下部以外からの GH 分泌調節のほか、末梢性に摂食を亢進することが示され、肥満や病的痩せなどにおける食欲・代謝改善の治療応用を目指して、今日も盛んに研究されている。そのような中、研究代表者は様々な非哺乳類のグレリンの構造を世界に先駆けて発表し、各動物種における生理作用について国内外の多くの研究者と共同研究を行い、大きな成果を挙げているが、これまで生理作用の鍵を握る受容体本体の構造や性質はほとんどわかっていなかった。

非哺乳類のグレリン受容体はこれまで鳥類のニワトリと 3 種の真骨魚類で明らかにされているが、受容体機能の解析や生理作用

との関連はほとんど明らかにされていない。本研究は、下垂体機能調節や摂食調節機序が詳しく調べられているキンギョにおいてグレリン受容体を同定し、グレリンによる作用と受容体との関連を明らかにしようとするものである。さらに哺乳類や他の動物種でも存在が知られていない GHS-R1a サブタイプ、GHS-R2a の存在を確認したことから、新たなグレリンシステムを提示する先駆的な研究となるかもしれない。

本研究には 3 つの特色がある。第 1 に、まだほとんど知られていない非哺乳類のグレリン受容体 (真骨魚類で 4 種類目、非哺乳類では 5 種類目) を同定することが挙げられる。非哺乳類を含めグレリン系の解明において、新たな動物種でグレリン受容体を同定することは、動物種を越えた受容体構造の共通性や性質などを調べる上で意義がある。

第 2 に、哺乳類でも同定されていない新たな機能的グレリン受容体を同定することが挙げられる。今回、キンギョで新たに同定した第 2 の機能的 GHS-R2a は、哺乳類ではその存在が確認されておらず、ゼブラフィッシュでその存在が発見できたが、機能やリガンド選択性などは全くわかっていない。この新たな GHS-R2a の構造や性質、機能の解析は、キンギョにおける複雑なグレリン系の制御機構を解明するだけでなく、例えば、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン (CRF) には 1 型、2 型受容体が知られているが、各々は発現部位も異なる一方で 1 型受容体は主に CRF に、2 型受容体は最近ウロコルチンという新たな CRF ファミリーリガンドが主要な結合因子であることがわかったように、GHS-R2a に対する特異的なリガンド (第 2 のグレリン) が発見される可能性もあり、グレリンとグレリン受容体系の比較内分泌学的進化の過程を解き明かす起点になるかもしれない。

第 3 に、キンギョ自身のグレリンをセットにして「相同な系を用いた実験」が可能である。キンギョのグレリンは研究代表者が海外のグループと共同で同定したものであり、連携研究者の松田教授と共に既に生理実験に用いている。すなわち、同定した受容体は即座に相同な系による機能評価が可能であり、他のグループにはない研究のアドバンテージがある。蓄積している作用の知見と共に、本研究で組織レベル、あるいは細胞レベルで受容体の分布やシグナル伝達機構を明らかにすることにより、個体レベルにおけるグレリンシステムのリガンドと受容体、また作用との関連を総合的に解釈できる。

## 3. 研究の方法

(1) RACE-PCR を用いたグレリン受容体のクローニング

グレリン受容体は、塩基配列が報告されている動物種間の配列を比較すると、保存性の高い部位がいくつか存在する。その部分に設計したセンス鎖、アンチセンス鎖の縮重プライマーを用いて、キンギョ脳 total RNA から 3'-RACE oligo-dT で調整した 1 本鎖 cDNA をテンプレートとして RT-PCR をしたところ、688 bp と 692 bp のフラグメントを得ることができ、その塩基配列を明らかにした。これらは互いに塩基レベルで 75%、アミノ酸レベルで 82% のホモロジーを示し、明らかに GHS-R1a の特徴を有しているが、2 つは異なる受容体と考えられた。そこで、その塩基配列情報を基に、各々の塩基配列において共通性の低い部分 2 カ所にそれぞれに特異的なセンスおよびアンチセンスプライマーを設計し、Nested PCR を含む RACE-PCR によって 3' 側および 5' 側の塩基配列を決定する。最後に、正確性の高い DNA ポリメラーゼと cDNA の 5' 端、3' 端に設計したプライマーを用いて RT-PCR を行い全長 cDNA の正確な塩基配列の確認を行った。また、受容体タンパク質をコードしている部分に設計したプライマーによって得た PCR 産物を哺乳類細胞発現ベクターに組み込み、受容体機能解析に用いた。

## (2) ゲノム DNA からのキンギョグレリン受容体遺伝子および GHS-R1b の同定

一方、これまでの経験では転写率の問題か、3' RACE-PCR では GHS-R1a cDNA の選択的スプライシングで生じる GHS-R1b の cDNA が得られない場合が多かった。GHS-R1b はその構造にイントロン構造の一部を含むことから、キンギョの組織から得たゲノム DNA をテンプレートとして、正確性の高い DNA ポリメラーゼとキンギョ GHS-R をコードする塩基配列に特異的なプライマーを用いて RT-PCR を行い、同定した GHS-R 遺伝子の配列を明らかにすると共に、GHS-R1b の塩基配列を明らかにする。

## (3) 受容体遺伝子発現部位の組織レベルの検討

同定した GHS-Ra cDNA の塩基配列情報を基に、適所に遺伝子特異的なプライマーを作製し、サイバークリーンを用いたリアルタイム PCR 法により、各種 GHS-R のキンギョ体組織分布や遺伝子の発現量を調べる。

## (4) 哺乳類細胞を用いた受容体の性質機能評価

GHS-Ra タンパク質をコードする cDNA を当研究室で実績のある哺乳類細胞発現用プラスミドベクター (pCDNA3.1-V5-His-TOPO) に組み込む。そのコンストラクトを CHO あるいは HEK293 などの哺乳類細胞に FuGENE6 を用いたリポフェクションによって導入し、

GHS-Ra タンパク質を一過性あるいは G418 選択により安定的に発現させる。その後、GHS-Ra を発現させた細胞に様々な濃度のキンギョグレリン、GHS-R アゴニスト (GHRP-6、Hexarelin)、GHS-R アンタゴニスト (D-Lys<sup>3</sup>-GHRP-6) を処理し、細胞内カルシウムイオン濃度の変動および濃度依存性を調べた。

## (5) 2 種の機能的な GHS-Ra が関与する生理現象の探索

本研究ではエネルギー代謝への関与を検討した。数日間絶食させたキンギョから脳、下垂体、腸を採取し、同定した GHS-Ra 遺伝子の発現がどのように変化するかをリアルタイム PCR 法で調べた。

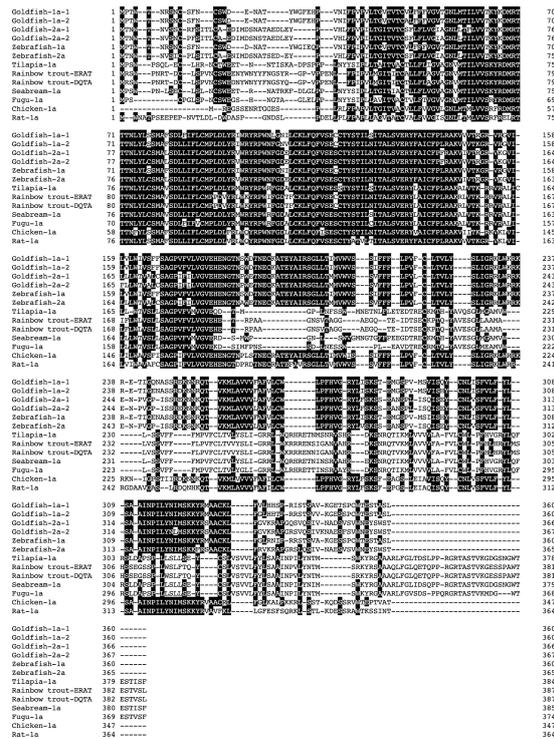


図1 キンギョグレリン受容体のアミノ酸配列の比較

## 4. 研究成果

### (1) キンギョ GHS-Ra cDNA の同定

研究申請時に、塩基レベルで 75%、アミノ酸レベルで 82% のホモロジーを示す GHS-R1a の特徴を有した 2 つの cDNA フラグメント (688 bp と 692 bp) を同定していたが、その全長を明らかにした。また、2 種類あると推定していた cDNA は、それぞれにサブタイプが存在し、計 4 種類の cDNA を同定した。

692 bp の cDNA フラグメントからは、全長が 1083 bp からなる 2 種の cDNA が同定された。また、688 bp の cDNA フラグメントからは、全長が 1101 bp あるいは 1104 bp からなる 2 種の cDNA が同定された。それぞれの cDNA にコードされているタンパク質のアミノ酸配列は、ゼブラフィッシュのグレリン受容体 GHS-R1a および GHS-R2a に、それぞれ 95% の類似性を示した。また、GHS-R1a と GHS-R2a は 74% の相同性を示した。同定したグレリン受容体様受容体は、この時点では仮にゼブラフィッシュに習い、GHS-R1a-1、1a-2、2a-1、2a-2 と名付けた (図 1)。

## (2) ゲノム遺伝子の同定

上記の様に、ゼブラフィッシュには GHS-R1a、2a が存在しているが、それぞれにサブタイプがあることは知られておらず、同定したサブタイプは点突然変異による変異体である可能性がある。そこで、同定した 4 つの cDNA がキンギョのゲノム遺伝子上に存在するかを調べた。その結果、4 つの受容体に特有のゲノム遺伝子を同定し、タンパク質をコードしている部分のゲノムの長さはそれぞれ 1722 bp (1a-1)、2059 bp (1a-2)、2012 bp (2a-1)、2859 bp (2a-2) であり、それに含まれるひとつのイントロンの長さはそれぞれ 640 bp (1a-1)、977 bp (1a-2)、909 bp (2a-1)、1759 bp (2a-2) であった。このことにより、確実に 4 つのグレリン受容体が存在することが示された。

## (3) 受容体タンパク質の機能評価

次に、その受容体タンパク質部分をコードしている cDNA を哺乳類細胞に強制発現させ、受容体の機能解析をした。その結果、GHS-R2a-2 以外の受容体タンパク質はキンギョグレリンや GHS に反応することを見だし、同定した 2a-2 以外は確実にグレリン受容体であることを確認した (図 2)。これをもって、同定した cDNA にコードされているタンパク質がグレリン受容体であると結論した。また、その感度は 2a-1 の方が 1a-1 や 1a-2 より良いが、反応性は 1a-1 や 1a-2 の方が 2a-1 より大きかった (図 2)。この結果は GHS-R1a と 2a が機能的なグレリン受容体ということの世界で初めて示した。また、GHS-R2a が GHS-R1a に比べ、より低濃度のグレリンで作用を發揮することを示し、生理学的に重要な可能性を示唆する。

## (4) 受容体遺伝子発現の組織分布

それぞれ GHS-R1a-1、1a-2、2a-1、2a-2 の遺伝子がどの組織に発現しているのかをリアルタイム PCR 法で調べた (図 3)。その結果、1a-1 は終脳、迷走葉、精巣に多く、肝臓、腸、卵巣にも発現が見られたが (図 3A)、1a-2

は特に肝臓と精巣で多かった (図 3B)。2a-1 は終脳、間脳、迷走葉、精巣に多く、腎臓や卵巣にも存在した (図 3C)。また 2a-2 は受

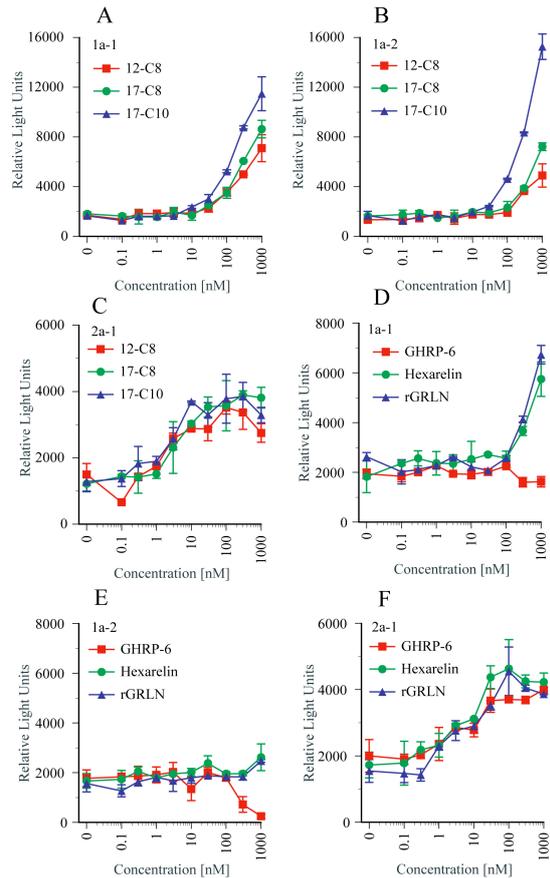


図 2 キンギョグレリン受容体を発現させた HEK293 細胞の細胞内 Ca イオン濃度の変化

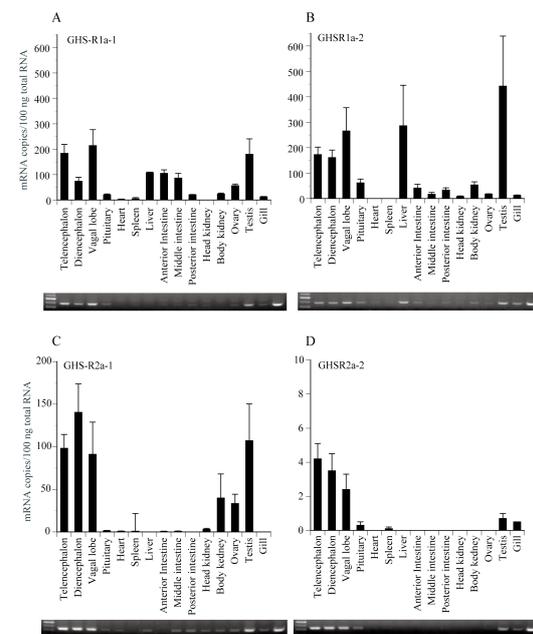


図 3 キンギョグレリン受容体遺伝子発現の組織分布

容体機能が不明であるが、脳組織での遺伝子発現が認められた (図 3D)。以上の結果は、キンギョには4つのグレリン受容体が中枢や末梢器官に存在し、それぞれが器官 (組織) 特異的な生理作用に関与していることを示唆している。

### (5) 受容体遺伝子の発現変動：絶食実験

各受容体の遺伝子が発現している組織はわかったが、これらがどのような生理現象に関わるのかを明らかにするため、7日間の絶食実験を行い、遺伝子発現の変化を調べた。その結果、絶食後3日目、5日目、7日目の間脳、嗅葉、下垂体、腸では変化は見られなかったが、絶食後7日目の迷走葉で、1a-1の遺伝子発現が減少した。一方、1a-2は変化しなかった。また、肝臓において1a-2の遺伝子発現が増加したが、1a-1には変化は見られなかった。このことは、少なくともGHS-R1aはエネルギー代謝の調節に関わっている可能性が示唆される。なお、GHS-R2aには変化が見られなかった。

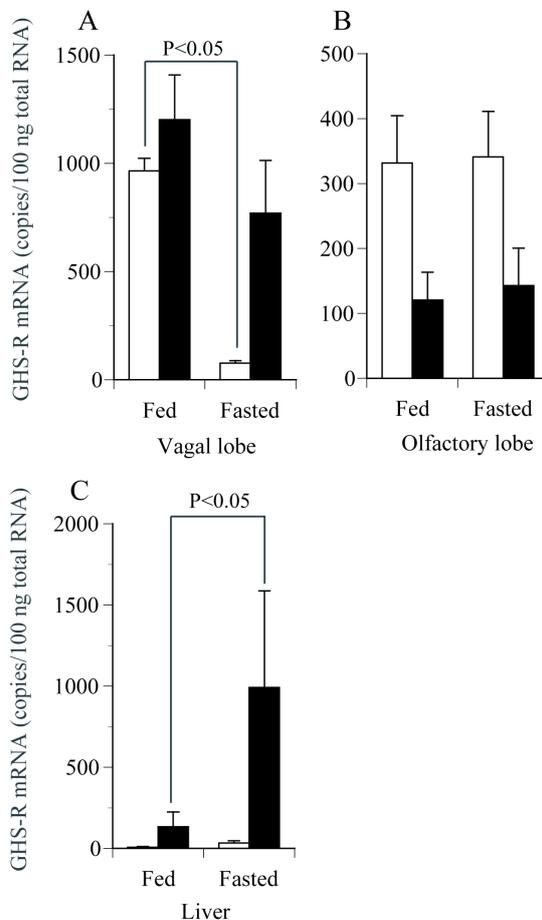


図4 絶食7日後の迷走葉、嗅葉、肝臓におけるGHS-R1a-1 (□)、1a-2 (■) 遺伝子発現の変化

### (6) キンギョグレリン受容体に対する新規リガンドの探索

これまでの哺乳類を中心としたグレリンの研究では、1種の受容体とそのリガンドであるグレリンが1種類同定されている。一方、キンギョには、アミノ酸配列や性質の異なる2種のグレリン受容体GHS-R1a, 2aが存在し、さらにサブタイプも存在する。このことは、その2種の受容体に対するリガンド、すなわち既知のグレリンとは異なる「第2のグレリン」が同定できる可能性があり、生体における新しいグレリンシステムの存在を示すことができる可能性を示唆する。

同定した4種類のキンギョグレリン受容体1a-1, 1a-2, 2a-1, 2a-2のうち、キンギョグレリンに対して親和性の低かった1a-1, 1a-2に対する新しい内在性リガンドの存在を想定し、そのペプチド性リガンドの同定を目指して研究を遂行した。ペプチドホルモンの含量が多い脳およびグレリンの存在する腸の組織抽出物からペプチド画分を得、イオン交換クロマトグラフィーで強塩基性画分を調整し、ゲル濾過HPLC、CMイオン交換HPLC、逆相HPLCで展開したペプチド画分を1a-1, 1a-2, 2a-1ならびにラットグレリン受容体(rGHS-R)を発現させた細胞に処理し、細胞内Caイオン濃度の上昇を指標にグレリンを追跡した。

その結果、グレリンに高親和性の2a-1ならびにrGHS-Rでは同定済みのキンギョグレリンが単離できたが、1a-1および1a-2に対して高親和性に反応するペプチド画分を得ることはできなかった。

以上の結果は、少なくとも脳と腸には第2のグレリンが存在していない可能性が高いことを示す。一方、既知のキンギョグレリン遺伝子は脾臓でも高い発現が認められる。従って、脾臓に予想するペプチドが存在する可能性は残っているが、本年度はその実験を遂行することができなかった。

### (7) まとめ

本研究において、キンギョの脳から4種の機能的なグレリン受容体を同定した。グレリンは各々の受容体に結合するが、異なる親和性を示し、各々の受容体は組織特異的な遺伝子発現を示したことから、器官 (組織) 特有の生理作用に関与することが示唆された。また、絶食実験から、少なくともGHS-R1aはエネルギー代謝調節に関与していることが示唆された。これまでグレリンがキンギョの摂食調節に関与していることが明らかになっていくが、GHS-R1aのどちらの受容体がそれに関与するのかがGHS-Rアゴニストを用いた実験で明らかにできる可能性がある。今後、第2のグレリンの存在も含め、キンギョにおける

グレリンシステムの全容を明らかにすることにより、グレリンの進化的背景やグレリンの生理作用をさらに深く理解できるものと思われる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 15 件)

1. Kaiya H, Miura T, Matsuda K, Miyazato M, Kangawa K. Two functional growth hormone secretagogue receptor (ghrelin receptor) type 1a and 2a in goldfish, *Carassius auratus*. *Mol Cell Endocrinol*. 2010;327(1-2):25-39. 査読有
2. Cruz SA, Tseng YC, Kaiya H, Hwang PP. Ghrelin affects carbohydrate-glycogen metabolism via insulin inhibition and glucagon stimulation in the zebrafish (*Danio rerio*) brain. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2010;156(2):190-200. 査読有
3. Kaiya H, Kodama S, Ishiguro K, Matsuda K, Uchiyama M, Miyazato M, Kangawa K. Ghrelin-like peptide with fatty acid modification and O-glycosylation in the red stingray, *Dasyatis akajei*. *BMC Biochem*. 2009;10:30. 査読有
4. Jönsson E, Kaiya H, Björnsson BT. Ghrelin decreases food intake in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) through the central anorexigenic corticotropin-releasing factor system. *Gen Comp Endocrinol*. 2010;166(1):39-46. 査読有
5. Kaiya H, Riley LG, Janzen W, Hirano T, Grau EG, Miyazato M, Kangawa K. Identification and genomic sequence of a ghrelin receptor (GHS-R)-like receptor in the Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Zoolog Sci*. 2009;26(5):330-7. 査読有
6. Small BC, Quiniou SM, Kaiya H. Sequence, genomic organization and expression of two channel catfish, *Ictalurus punctatus*, ghrelin receptors. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2009;154(4):451-64. 査読有
7. Kitazawa T, Maeda Y, Kaiya H. Molecular cloning of growth hormone secretagogue-receptor and effect of quail ghrelin on gastrointestinal motility in Japanese quail. *Regul Pept*. 2009;158(1-3):132-42. 査読有
8. Ishida Y, Sakahara S, Tsutsui C, Kaiya H, Sakata I, Oda S, Sakai T. Identification of ghrelin in the house musk shrew (*Suncus murinus*): cDNA cloning, peptide purification and tissue distribution. *Peptides*. 2009;30(5):982-90. 査読有
9. Buyse J, Janssen S, Geelissen S, Swennen Q, Kaiya H, Darras VM, Dridi S. Ghrelin modulates fatty acid synthase and related transcription factor mRNA levels in a tissue-specific manner in neonatal broiler chicks. *Peptides*. 2009;30(7):1342-7. 査読有
10. Kaiya H, Mori T, Miyazato M, Kangawa K. Ghrelin receptor (GHS-R)-like receptor and its genomic organisation in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2009;153(4):438-50. 査読有
11. Peddu SC, Breves JP, Kaiya H, Gordon Grau E, Riley LG Jr. Pre- and postprandial effects on ghrelin signaling in the brain and on the GH/IGF-I axis in the Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Gen*

- Comp Endocrinol. 2009;161(3):412-8. 査読有
12. Miura T, Maruyama K, Kaiya H, Miyazato M, Kangawa K, Uchiyama M, Shioda S, Matsuda K. Purification and properties of ghrelin from the intestine of the goldfish, *Carassius auratus*. Peptides. 2009;30(4):758-65. 査読有
13. Kaiya H, Furuse M, Miyazato M, Kangawa K. Current knowledge of the roles of ghrelin in regulating food intake and energy balance in birds. Gen Comp Endocrinol. 2009;163(1-2):33-8. 査読有
14. Riley LG, Fox BK, Breves JP, Kaiya H, Dorough CP, Hirano T, Grau EG. Absence of effects of short-term fasting on plasma ghrelin and brain expression of ghrelin receptors in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. Zoolog Sci. 2008;25(8):821-7. 査読有
15. Kaiya H, Miyazato M, Kangawa K, Peter RE, Unniappan S. Ghrelin: a multifunctional hormone in non-mammalian vertebrates. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol. 2008;149(2):109-28. 査読有

[学会発表] (計 4 件)

1. 海谷啓之、小泉泰士、今野紀文、内山実、寒川賢治、宮里幹也「無尾両生類 2 種のグレリン受容体 (GHS-R1a) の同定」第 35 回日本比較内分泌学会、2010 年 11 月 18-20 日 (静岡)
2. 海谷啓之、三浦徹、松田恒平、宮里幹也、寒川賢治「キンギョグレリン受容体の同定とその性質」第 34 回日本比較内分泌学会、2009 年 10 月 22-24 日 (大阪)
3. Kaiya H, Miura T, Matsuda K, Miyazato M, Kangawa K. "Ghrelin receptor in goldfish: Identification and characterization" 16<sup>th</sup> International Congress of Comparative Endocrinology, 2009 年 7 月 22-26 日 (中国 (香港))
4. 海谷啓之、蓮沼至、筒井和義、寒川賢治、宮里幹也「グレリンにおいて脂肪酸修飾のある第 3 位のアミノ酸配列は全ての両生類でスレオニンなのか？」第 33 回日本比較内分泌学会、2008 年 12 月 5・6 日 (広島)
6. 研究組織
- (1) 研究代表者  
海谷 啓之 (KAIYA HIROYUKI)  
独立行政法人 国立循環器病研究センター・生化学部・室長  
研究者番号：40300975
- (2) 研究分担者  
宮里 幹也 (MIYAZATO MIKIYA)  
独立行政法人 国立循環器病研究センター・生化学部・部長  
研究者番号：50291183
- (3) 連携研究者  
寒川 賢治 (KANGAWA KENJI)  
独立行政法人 国立循環器病研究センター・所長  
研究者番号：00112417
- 松田 恒平 (MATSUDA KOUHEI)  
富山大学・理工学部・教授  
研究者番号：60222303
- 北澤 多喜雄 (KITAZAWA TAKIO)  
酪農学園大学・獣医学部・教授  
研究者番号：50146338