

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：32660

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K15835

研究課題名（和文）卵生 胎生の繁殖戦略によって逆転するエストロゲンの代謝制御

研究課題名（英文）Regulation of glucose metabolism by estrogen and its implication on evolution of reproductive strategies

研究代表者

山岸 弦記（Genki, Yamagishi）

東京理科大学・先進工学部生命システム工学科・研究員

研究者番号：80845868

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：エストロゲンは糖代謝の制御機能をもつが、繁殖への意義は明らかでない。本研究はエストロゲンが繁殖中代謝を制御するしくみと意義の解明を目指した。卵生動物のモデルに用いたヤモリのメスでは、繁殖期間中を通じて肝臓の糖新生酵素発現が低下し、糖新生活性の低下が示唆された。一方、糖新生酵素g6pc1の重複遺伝子は互いに異なるエストロゲン応答を示すことで、仔への栄養供給と、母体の維持の間でエネルギー供給を調節する可能性がある。さらに、非哺乳類の胎生動物は、エストロゲンによる抑制を迂回する糖新生の経路をもつことが示唆され、妊娠中も糖新生を継続して、胎仔に糖を供給できると推測される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、卵生脊椎動物の糖新生が繁殖中を通じて低下することを明らかにした。また、そのような糖新生活性の低下を補償するしくみの存在を示唆する結果を得た。これにより、エストロゲンによる繁殖中代謝の動態を明らかにした。同時に、胎生への移行に伴って新たな代謝経路が獲得された可能性を示し、卵生 胎生という繁殖戦略によりエネルギー代謝制御機構が変化することを明らかにした。以上を通じ、エストロゲンによる糖新生制御の進化的意義解明に道筋をつけた。さらに本研究の社会的意義として、卵生脊椎動物の繁殖中代謝を解明することで、人間の食糧として重要な水産魚種や鶏といった動物種の効率的な養殖法開発への応用が考えられる。

研究成果の概要（英文）：Estrogen has regulatory roles on glucose metabolism. However, significance of such regulation on reproduction is currently unclear. This research investigated the mechanisms through which estrogen regulates metabolism in reproducing vertebrates. This study used geckos as a model to study oviparous vertebrates. In the liver of female geckos, the expression of key gluconeogenic genes were repressed throughout reproductive period. This observation suggests lowered gluconeogenesis in reproducing females. Geckos were also found to possess two duplicated g6pc1 genes. Expression of these genes were differently regulated by estrogen. Such difference may aid in energy partitioning between reproduction and maternal survival. In viviparous fish, which was used as a viviparous vertebrate model, estrogen-insensitive gluconeogenic pathways were found. Such pathway may help reproducing females to provide embryos with glucose, because it can synthesize glucose under increased blood estrogen levels.

研究分野：比較内分泌学

キーワード：エストロゲン 卵生 胎生 糖新生 爬虫類

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

親から仔への栄養供給は繁殖中の動物に共通してみられるが、胎生動物は胎内の仔に直接栄養を供給する一方、卵生動物は卵黄を介して間接的に栄養を与えるという違いがある。この違いから従来、胎生の進化は母子を仲介する胎盤や栄養リボンといった構造の獲得が研究されてきた。その一方で、繁殖中に母親が栄養を動員するしくみの変化は注目されていない。妊娠中の哺乳類と、卵黄形成中の卵生動物の両方で栄養動員を引き起こすホルモンに、エストロゲンがある。興味深いことに、エストロゲンは哺乳類では血糖値を上昇させるのに対して、卵生動物では糖新生を抑制して血糖降下にはたらく。この相反する作用は、胎生への移行によって栄養動員の分子機構が再編成されたことを示唆する。しかし、哺乳類のエストロゲン作用が詳細に解析される一方で、卵生動物のエストロゲンが栄養動員を引き起こす分子機構は明らかでないため、栄養動員のしくみがどのように再編成されたのかは不明である。

2. 研究の目的

卵生動物の胚は、卵黄を栄養源として成長する。卵黄はタンパク質や脂肪を主成分とする一方で、糖質はわずかにしか含まれない。そのため、エストロゲンは繁殖中に糖新生を抑制することで、糖新生基質が卵黄タンパクと脂肪の合成に優先して供給されるよう、代謝系を再編する役割があると推測した。そこで本研究は、卵生の爬虫類をモデルとして、エストロゲンが繁殖中のエネルギー代謝を制御するしくみの解明を目指した。

一方、胎生動物の胎仔は、発生中に母親から糖を受け取って成長する。そのため、胎生の動物は、血中エストロゲン濃度が上昇する繁殖中にも糖新生を継続するしくみをもつと推測した。この仮説を、非哺乳類の胎生動物を用いて検証した。

3. 研究の方法

卵生動物の繁殖中に起こる代謝変動の解析には、爬虫類のソメワケササクレヤモリをモデルとして用いた。この動物は、理化学研究所生体モデル開発チーム (Resource Development Unit and Genetic Engineering Team, RIKEN Center for Biosystems Dynamics Research) より、Material Transfer Agreement に則って入手した。入手後は室温 28℃、日長 14 時間の飼育室で管理し、週に 3 回コオロギを餌として与えた。ホルモン測定は、血清を LC-MS/MS による測定に外注して行った。また、遺伝子発現の定量は、肝臓から total RNA を ISOGEN II (Nippon Gene, Tokyo, Japan) を用いて抽出し、3 µg を PrimeScript RT Master Mix (Perfect Real Time) (Takara Bio, Tokyo, Japan) で逆転写して得た cDNA をテンプレートとする定量 PCR (qPCR) で行った。本研究では、糖新生酵素のなかでも不可逆な律速段階を担う *pck* (phosphoenolpyruvate carboxykinase) と *g6pc1* (glucose-6-phosphatase catalytic subunit 1) に注目した。*pck* には 2 つのアイソザイムがある (*pck1* と *pck2*) が、ヤモリの肝臓には *pck2* のみが発現する。また、ヤモリは *g6pc1* の重複遺伝子を 2 つもち、いずれも肝臓に発現する。本研究では、これらを *g6pc1-1*、*g6pc1-2* と呼んで区別した。ソメワケササクレヤモリの各遺伝子の配列情報は、まずニホンヤモリの遺伝子配列を NCBI GenBank から取得し、これらをクエリ配列として Reptiliomix BLAST search (<https://transcriptome.cdb.riken.jp/reptiliomix/about.html>) で検索することで取得した。

また、糖新生酵素のエストロゲン応答性が、胎生の獲得によって変化するかを検証するため、非哺乳類の胎生脊椎動物をモデルに実験を行った。モデルとして胎生真骨魚のハイランドカープを用い、17 β -エストラジオール (E2) 曝露およびエストロゲン受容体のアンタゴニストであるタモキシフェンへの曝露を行って、肝臓の糖新生酵素発現を qPCR で定量した。

本研究に含まれる遺伝子組み換え実験と動物実験は、所属機関の組換え DNA 実験安全委員会と動物実験委員会の承認の下で実施した。

4. 研究成果

(1) 繁殖中の血中エストロゲン濃度と肝臓の糖新生酵素発現の相関

飼育下で通年繁殖するソメワケササクレヤモリを用いて、繁殖中のメスで起こる血中エストロゲン濃度の変動と、糖新生酵素の発現変動の相関を調べた。卵胞サイズと輸卵管内の卵の有無にもとづいて、メスを非繁殖状態、卵黄形成期、排卵後の 3 つのステージに分類し、それぞれについて血中 E2 濃度と、肝臓の糖新生酵素発現を定量した。

血中 E2 濃度は卵黄形成期にピークに達し、排卵後にやや下がるものの、非繁殖状態よりは高い値を維持した。これは、脊椎動物に一般的なパターンである。しかし、今回 LC-MS/MS 法で測定した値は、先行研究で報告されてきた非哺乳類血中 E2 濃度の 1/100 程度しかなかった。先行研究はイムノアッセイで測定を行っていたが、この方法は特異性の面で LC-MS/MS に劣る。そのため、非哺乳類の先行研究は、血中 E2 濃度を過剰に見積もっている可能性がある。

また、肝臓の *pck2*、*g6pc1-1*、*g6pc1-2* 発現をステージ間で比較したところ、*pck2*、*g6pc1-1* の

両者で、卵黄形成期の発現が非繁殖期と比べて有意に低下していた。一方、*g6pc1-2* の発現にはステージ間で有意な差は見られなかった。このことは、繁殖中にも *g6pc1-2* を介して糖新生が継続することを示唆する。糖新生には、全身にグルコースを供給する意義がある

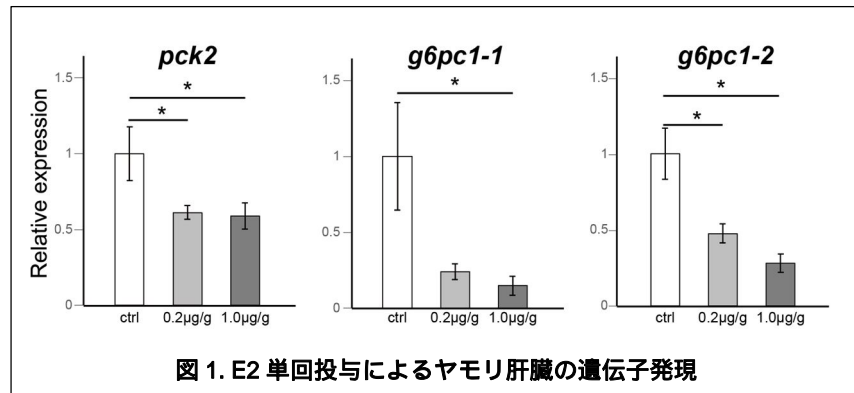


図 1. E2 単回投与によるヤモリ肝臓の遺伝子発現

ことから、*g6pc1-2* を介した反応を維持することで、母体の生存を維持している可能性がある (以上、現在論文投稿中)。

以上の結果から、血中 E2 濃度と遺伝子発現の差異が最も大きいステージとして、卵黄形成期と非繁殖状態を選択し、これらのステージで肝臓の RNA-seq を委託した。現在、納品データを解析することで、E2 存在下で起こる代謝系の変動の同定を行っている。

(2) エストロゲンによる糖新生酵素の制御

本項目では当初、E2 濃度依存的な遺伝子発現を、ルシフェラーゼアッセイにより解析する予定であった。しかし、ソメワケササクレヤモリでは、糖新生酵素の遺伝子上流領域を増幅することができなかった。そこで、E2 の投与量や投与期間を変えた場合の遺伝子発現の応答を調べた。E2 を体重 1g あたり 0.2 µg または 1.0 µg の割合で腹腔内に単回投与したところ、*pck2* と *g6pc1* の重複遺伝子のいずれも、投与によって有意に発現が低下した (図 1)。ところが、後者の濃度で 1 日おきの投与を 2 週間継続したところ、*g6pc1-2* の発現に有意差は見られなかった (図 2)。この結果は、*g6pc1* の重複遺伝子ごとに、異なる発現制御のしくみが存在することを示唆する。

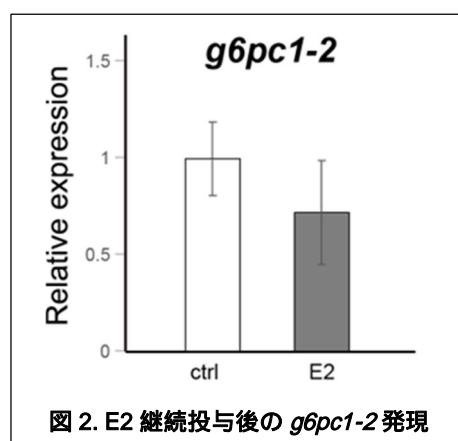


図 2. E2 継続投与後の *g6pc1-2* 発現

(3) *g6pc1* 重複遺伝子の進化的解析

g6pc1 遺伝子重複の起源を探索するため、GenBank と Ensembl のゲノムデータから配列を取得し、解析ソフトウェア MEGA (version 7.0.21) (Kumar et al., 2016) で分子系統樹を作製した。その結果、脊椎動物の系統では、条鰭類と肉鰭類で独立に遺伝子重複を生じたことが示唆された。さらに、肉

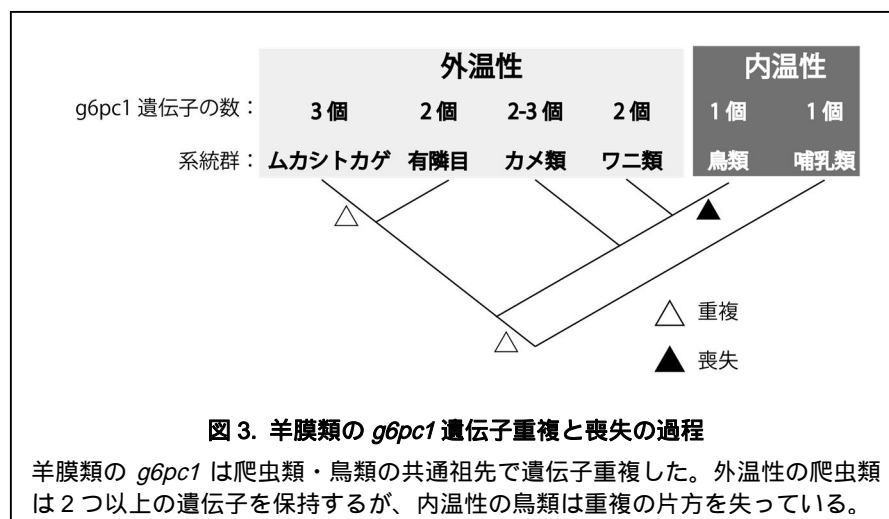


図 3. 羊膜類の *g6pc1* 遺伝子重複と喪失の過程

羊膜類の *g6pc1* は爬虫類・鳥類の共通祖先で遺伝子重複した。外温性の爬虫類は 2 つ以上の遺伝子を保持するが、内温性の鳥類は重複の片方を失っている。

鰭類の系統でも、両生類と羊膜類 (哺乳類・鳥類・爬虫類からなる群) で独立に重複が生じていた。羊膜類では、現生の爬虫類すべてに二つ以上の *g6pc1* 遺伝子が存在するのに対し、哺乳類には一つしか存在しなかった。鳥類も同じく *g6pc1* を一つしか持たない。一方、近縁なワニ・カメには 2 - 3 個の遺伝子が存在することから、鳥類は重複遺伝子を喪失したと考えられる (Yamagishi et al., 2022)。この結果は、*g6pc1* の重複と体温調節戦略の関係を示唆する (図 2)。

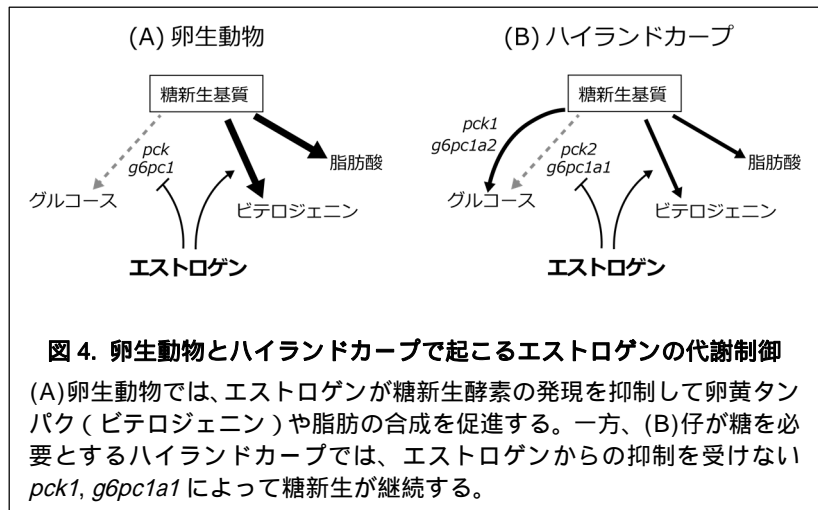
さらに、遺伝子上流領域の配列を種間比較したところ、羊膜類では重複後に各遺伝子の上流がそれぞれ独自に変異を蓄積したことが示唆された (Yamagishi et al., 2022)。このことは、重複遺伝子が互いに異なる発現制御を受けることを示唆し、ヤモリで行った *in vivo* の実験結果とも整合的である。

(4) ヤモリ糖新生酵素の遺伝子操作

ヤモリ肝臓で糖新生酵素発現を操作する目的で、アデノ随伴ウイルス(AAV)をベクターとして遺伝子導入を試みた。ヤモリ胚へのインジェクションでは、セロタイプ1のAAVを用いることで肝臓に外来遺伝子を強制発現させることができたものの、成体では十分な発現が得られなかった。一方、別種のヤモリであるヒョウモントカゲモドキでは、成体でも高効率な導入に成功した。今後はこの種をモデルとすることで、実験が可能だと考えている。

(5)非哺乳類胎生種のエストロゲン応答

ハイランドカーブの肝臓には、*pck*のアイソザイムが2つ(*pck1*, *pck2*)と、*g6pc1*の重複遺伝子が2つ(*g6pc1a1*, *g6pc1a2*)発現していた。2週間のE2曝露により、*pck2*の発現が有意に低下し、*g6pc1a1*の発現も低下傾向を示した。これらの遺伝子発現は、E2と同時にタモキシフェンを投与することで回復した。このことは、*pck2*と*g6pc1a1*の発現が、エストロゲン受容体を介して制御されることを示唆する。一方、*pck1*と*g6pc1a2*はE2投与による発現変動が認められなかった。これらの結果は、糖新生の律速段階が、同じ機能を持つ2つの遺伝子によって冗長的に制御されており、片方の遺伝子がエストロゲンから抑制されないことで、繁殖中も糖新生を進行できることを示唆する(図3)。この仕組みは、仔の成長に糖を必要とする胎生の繁殖様式に適しており、胎生移行との関連が推測される。



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 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Genki Yamagishi, Shinichi Miyagawa	4. 巻 41
2. 論文標題 Neuroendocrinology of Reproduction and Social Behaviors in Reptiles: Advances Made in the Last Decade	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Zoological Science	6. 最初と最後の頁 87-96
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2108/zs230060	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 -

1. 著者名 Genki Yamagishi, Min Kyun Park, Shinichi Miyagawa	4. 巻 39
2. 論文標題 Phylogeny of g6pc1 Genes and Their Functional Divergence among Sarcopterygian Vertebrates: Implications for Thermoregulatory Strategies	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Zoological Science	6. 最初と最後の頁 419-430
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2108/zs210113	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 -

〔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 山岸弦記、宮川信一
2. 発表標題 胎生魚ハイランドカープのエストロゲン非依存な繁殖中代謝
3. 学会等名 第47回日本比較内分泌学会大会及びシンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山岸弦記、宮川信一
2. 発表標題 卵生動物におけるエストロゲン応答性の糖代謝制御の検証
3. 学会等名 第46回日本比較内分泌学会大会及びシンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山岸弦記、朴民根、宮川信一
2. 発表標題 羊膜類の糖新生酵素g6pc1の遺伝子重複とその生理学的意義の解明
3. 学会等名 第45回日本比較内分泌学会大会及びシンポジウム
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Genki Yamagishi, Taisen Iguchi, Shinichi Miyagawa	4. 発行年 2022年
2. 出版社 John Wiley & Sons Ltd	5. 総ページ数 34
3. 書名 Epigenetic Regulation of Sex Determination and Toxicity in Non-mammalian Vertebrates. In: Genomic and Epigenomic Biomarkers of Toxicology and Disease: Clinical and Therapeutic Actions	

〔産業財産権〕

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------