

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570069

研究課題名(和文) 有羊膜類動物の生殖と代謝機能における環境応答機構の分子生物学的解析

研究課題名(英文) Molecular biological analysis of the environmental response systems for reproduction and metabolism of the amniotes

研究代表者

朴 民根 (Park, Min Kyun)

東京大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00228694

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：陸上の環境に適応した有羊膜類動物の中で外温性動物である爬虫類は陸上生活に不利だと思われるが、有鱗目爬虫類は脊椎動物で最も適応放散した動物群でもある。その背景を解明するため、生殖と代謝に重点を置き研究を始めた。以前の研究で示唆された精巣機能の指標としてZFAND3遺伝子の解析と共に、代謝関連ホルモンの分子解析をニホンヤモリに重点に解析した。その結果proglucagon mRNAの新規variantと共にinsulinのアミノ酸配列での高い残基置換率を発見し、進化系統学的解析も含め詳しく解析した。これら代謝系ホルモンの分子生物学的特徴は有鱗目爬虫類の繁栄を解明する上で重要な糸口になると思われる。

研究成果の概要(英文)：Amniotes are highly adapted to survive in a terrestrial environment. Among them, reptiles are ectothermic and seem to be unfit for living in land environment. But squamate reptiles is one of most adaptively radiating group in the vertebrates. To reveal the background of their successful adaptation, we started this study mainly focused on the reproduction and energy metabolism. In our previous study ZFAND3 was found as a potential gene marker to monitor the physiological status of the testes and continuously characterized its unique 3' UTR structure. On the other hand, pancreatic hormones were also characterized because of its crucial role in regulating the energy metabolism. As a result, we found three novel splice variants of proglucagon mRNA, having different coding potential. We also found highly mutated insulin sequence from Japanese gecko. Finding these distinctive molecular features may contribute to understand the regulatory system underlying the prosperity of squamate reptiles.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学、形態・構造

キーワード：有羊膜類動物 爬虫類 鳥類 外温性動物 陸上環境因子 生殖腺 代謝 臍臓

1. 研究開始当初の背景

哺乳類や鳥類そして爬虫類を含む有羊膜類は、羊膜内で胚を発生させることで新たに陸上という環境で繁殖することができた脊椎動物である。しかし、陸上の不安定な環境の中で様々な適応と進化が強いられ、様々な生理機能が多くの影響を受けた。その中で最も代表的な例が体温調節能力の獲得であり、哺乳類と鳥類それぞれが独立してこの能力を獲得した。一方、同じ有羊膜類でありながら体熱産生機構を獲得していない動物群も数多くあり、これらの動物群全てを含めて爬虫類とよんでいる。

このような内温性の獲得で環境より高い体温を維持しながらも温度に対する精巢の機能は哺乳類と鳥類で極めて対照的な応答をしている。即ち、哺乳類より高い体温を持つ鳥類の精巢は体腔の中で正常な機能を発揮しているのに対し、哺乳類の精巢は体温ではその機能が維持できず体腔の外側に位置している。このような哺乳類での特徴は、外温性動物にみられる形質を引き継いだ結果だと思われるが、外温性動物である爬虫類の精巢における温度の影響は殆ど解析されていない。

一方、内温性動物は体熱産生のために必要なエネルギーを確保し続ける為に、常に餌を摂取し続けなければならなくなった。そして性成熟が年齢より体重により高い相関を示すことが哺乳類による研究から明らかになっており、エネルギー代謝が生殖に重要な影響を与えていることは以前から知られている。そして陸上での環境の温度は餌環境と密接な関係があることから、多くの動物が季節繁殖を行い、光がその重要な情報として利用されている。しかし、このような年周期の中で生殖腺の生理機能がどのように変化しているのか、その分子生物学的解析は十分進んでいないのが現状である。

このように有羊膜類動物の生殖腺の機能には、温度や光の環境が重要な影響を与えており、その研究も様々な分野で盛んに研究されてきた。しかし、その殆どの研究は非常に断片的な側面ではか着目しておらず、鳥類と哺乳類が独立して体温産生能力を獲得し進化する過程で、環境因子の影響によってどのように進化してきたかは重要な研究テーマである。

2. 研究目的

鳥類と哺乳類は外温性である原始爬虫類の中からそれぞれが独立して内温性を獲得した動物群である。このような進化的な背景を重視し、「生殖と代謝に対する環境因子(光

と温度)の影響を生殖腺と隣臓を中心とした消化器官での生理機能の変化を分子生物学的に解明する」ことを主目的として本研究を計画した。本研究を通じて、陸上の環境因子の影響を外温性有羊膜類であるトカゲ類の動物を対象として行い、その分子生物学的特性を明らかにすると共に今後の研究基盤を確保することがその具体的な目標である。このため、次のような具体的な小目標をもって研究を展開した。1)飼育環境によって発現が変動する遺伝子、ZFAND3 (Tex27) の分子同定と、生殖腺における性分化関連遺伝子の発現解析、2)外温性有羊膜類での消化器官の環境応答関連因子の分子生物学的解析。

3. 研究の方法

1) 実験動物

動物飼育で飼育した個体は東京大学動物実験実施規則に基づいて管理した。ニホンウズラ (*Coturnix japonica*) は受精卵を購入し(株式会社モトキ)、孵化して4週間までの雛は長日条件 (16h light/8h dark) で集団飼育した。その後雄は個別に、雌は集団で飼育した。ヒョウモントカゲモドキ (*Eublepharis macularius*) は研究室で飼育・管理した15ヶ月の成熟した雄を使用した。ニホンヤモリ (*Gekko japonicus*) は東京都で採集した個体を用いた。その他の動物は動物販売業者より購入した。動物は断頭により屠殺し、採取した組織はすぐに液体窒素によって凍結し、使用するまで -80 で保存した。In situ hybridization に用いた精巢と卵巣は4% PFA/PBS で固定した。

2) RNA 抽出と cDNA 合成

Total RNA を ISOGEN (Nippon Gene) を用いて組織から抽出した。RACE に用いた cDNA は SMART RACE cDNA Amplification Kit (BD Bioscience Clontech) を用いて、3 µg の total RNA から合成した。RT-PCR に用いた cDNA は 3µg の total RNA を M-MLV reverse transcriptase (Promega) を用いて逆転写した。逆転写した産物は 1/6 に希釈し、使用まで -30 で保存した。

3) RT-PCR と RACE による各 cDNA 配列の同定

先ず PCR で得られた部分配列に基づいて作成した遺伝子特異的プライマーを製し、5'RACE と 3'RAC により全長配列を同定した。

4) In situ hybridization によるウズラ生殖腺での mRNA 発現細胞の同定

RNA プロブは DIG RNA labeling mix (Roche Diagnostics K.K.) を用いて、ORF に相当する配列 (SE01 と AS01 で増幅) を digoxigenin (DIG) で標識して合成した。PFA

で一晩固定したウズラの精巣と卵巣をパラフィン切片にした。そして、この切片と DIG 標識 RNA プローブを用いて *in situ* hybridization を行った。

5) 塩基配列の解析

分子系統解析は CLUSTAL X (ver. 2.1) を用いて ORF の塩基配列アライメントを行い、近隣接合法により分子系統樹を作製した。各種設定は default のままとした。祖先型配列と dN/dS ratio の算出は同定した配列に対し、祖先型配列の推測と非同義置換/同義置換率 (dN/dS ratio) の推定を行った。一方各系統の dN/dS ratio 推定は codon substitution model[3] に基づいて解析を行うソフトウェア PAML4.7 CODEML を用いて異なる複数のモデルで行い、最適なモデルを Log likelihood Ratio Test によって検証した。解析は default の設定値で行った

6) ニホンヤモリのグルコース耐性試験

2012年10月から11月にかけて捕獲したニホンヤモリを実験前に4日間絶食させてから glucose 投与を行った。投与量は 2 g glucose/kg body weight になるよう行った。血清中のグルコース濃度はグルコース CII - テストワコー (Wako) を用いて測定した。

4. 研究成果

1) 飼育環境によって発現が変動する遺伝子、ZFAND3 (Tex27): 鳥類・爬虫類での ZFAND3 cDNA 配列の同定と生殖腺での発現解析

Zinc finger AN1-type domain 3 (ZFAND3, 別名 testis expressed sequence 27; Tex27) は当研究室の先行研究において、ヒョウモントカゲモドキの精巣で飼育環境によって発現が変動する遺伝子として見つけた。ZFAND3 は最初にマウスで発見された遺伝子であるが、その研究はほとんどなく、生理機能は不明である。本研究ではヒョウモントカゲモドキに加え、高い光感受性を示すウズラでそれぞれ2種類の ZFAND3 cDNA 全長配列 (short と long form) を同定した<図1参照>。

2つの mRNA isoform は 3'UTR 内の選択的 polyadenylation によって生じ、共通の ORF をもつことがわかった。Long form の 3'UTR 内には polyadenylation signal 周辺に哺乳類から両生類まで高く保存された部位が存在し、2つの isoform で mRNA の安定性、翻訳効率に違いがある可能性が示唆された。予想されるアミノ酸配列は N 末端に A20-like zinc finger domain、C 末端に AN1-like zinc finger domain をもっていた。また、鳥類・爬虫類の ZFAND3 のゲノム構造は他の脊椎動物とは異なっており、独自のエクソンが1つ追加されていることがわかった。

ウズラでの発現解析の結果、ZFAND3 mRNA は精巣のみならず卵巣で高い発現を示し、それぞれ精細胞、卵母細胞で発現していた<図2, 3参照>。

また、短日条件で退縮した精巣では発現量の有意な減少、卵巣では発現量の増加傾向がみられた。本研究の結果は、ZFAND3 が生殖細胞の成熟に深く関わっている可能性を示唆している。今後タンパク質レベルでの研究を行うことで、その生理機能、発現制御機構と共に生理機能を明らかにすることが期待される<図4参照>。

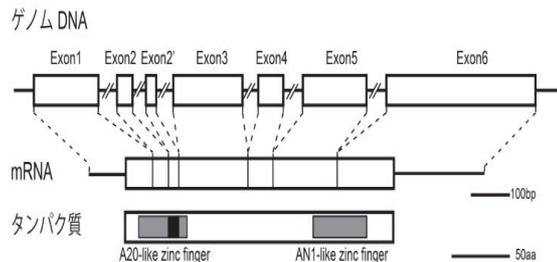


図1) 鳥類・爬虫類の ZFAND3 遺伝子、mRNA、タンパク質構造の模式図。遺伝子: 四角、線はそれぞれ exon, intron を表す。mRNA: 四角、線はそれぞれ ORF, UTR を表す。タンパク質: zinc finger domain はグレーの四角で、exon2' に対応するアミノ酸は黒で示す。



図2) ウズラ各組織での ZFAND3 mRNA の発現分布。ZFAND3-S/L: short と long form、ZFAND3-L: long form のみ。

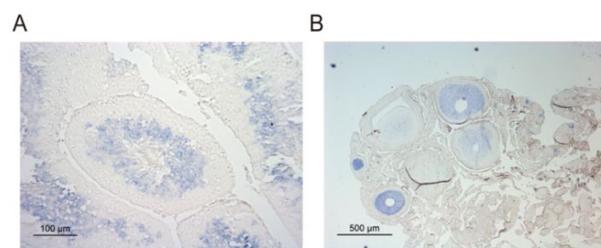
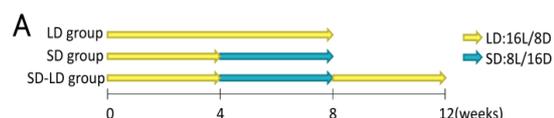


図3) *In situ* hybridization による ZFAND3 (Tex27) mRNA の発現解析。(A) 精巣で AS probe を用いたもの。(B) 卵巣で AS probe を用いたもの。



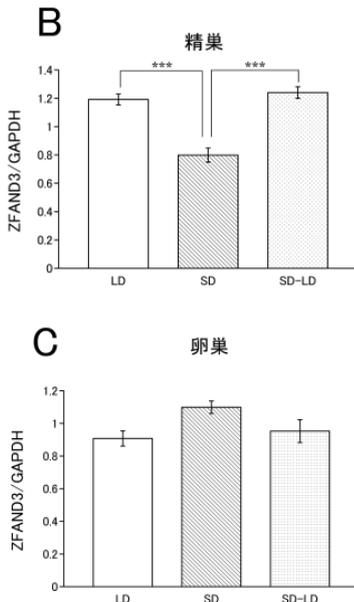


図4)ウズラ生殖腺での ZFAND3 mRNA 発現に対する光周期の影響。(A) ウズラの飼育条件。(B, C) 精巣、卵巢での発現解析の結果。縦軸: mRNA の相対発現量。横軸: ウズラの各グループを示す。***: $p < 0.001$ (t 検定)

2) 外温性有羊膜類での消化器官の環境応答関連因子の分子生物学的解析。

2-1) 有鱗目 insulin アミノ酸配列の変異蓄積とその分子進化学的解析

外温性羊膜類である爬虫類の中で、有鱗目は様々な環境に適応放散している。その背景には、エネルギー消費の少ない代謝機構による、貧弱な餌環境への適応があると考えられる。我々はこれまで、有鱗目のエネルギー代謝に関わる内分泌系に特有の分子生物学的特徴を見つけている。このことから本実験では基礎代謝が特に低いヤモリ目下に属するニホンヤモリ (*Gekko japonicus*) の血糖調節を行うホルモンである insulin の分子生物学的解析を行った。その結果 insulin のアミノ酸配列に他の脊椎動物では見られないほどの高い変異率があることを発見した。現在、有鱗目の各系統での insulin の分子解析も行っており、ニホンヤモリ以外の有鱗目でも複数の独立した変異が生じていることが判った。糖尿病などの場合 insulin の異所性発現が高まるとの報告があったが、ニホンヤモリの insulin mRNA 発現の組織特異性は大きく変わらなかった<図5 参照>。

また、insulin は標的細胞での糖同化を促進して血糖値を降下させる唯一のホルモンなので、糖負荷試験を実施した。その結果、グルコース投与後の血糖値上昇に 6 時間以上、平常値への回復には約 1 日を要することが分

かった<図6 参照>。これは、哺乳類の場合(上昇に 30 分、回復に 2 時間)よりも長いものの、他の爬虫類と同程度(トゲオアガマ)が、短い(ハララカ)。そのため、変異 insulin をもつ有鱗目でも血糖値制御機構は機能すると考えられる。これが insulin シグナリングの正常な機能を意味するのか、あるいは別の機構による補償が存在するのか、今後検証を進める予定である。

また、分子進化学的解析から、各系統の変異は独立に獲得されたことが示唆された。さらに、非同義置換/同義置換率の推定からは、ニホンヤモリとミナミヤモリで環境適応的な分子進化の存在が強く示唆された。

本研究で明らかになった有鱗目の insulin 変異とその独立した獲得は、変異を生じさせられる生理学的基盤の存在を強く示唆するものである。有鱗目の中でも、insulin の環境適応的な進化が示唆されるニホンヤモリでの生理学的研究は、有鱗目をはじめとする羊膜類のエネルギー代謝機構進化の解明につながると考えられる。

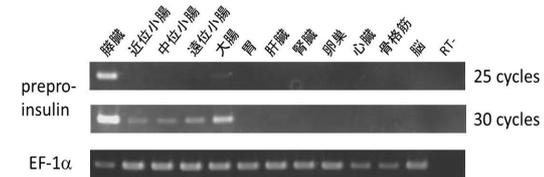


図5) RT-PCR によるニホンヤモリ各組織の preproinsulin の発現分布。各組織において、25cycles と 30cycles で PCR を行った。内部標準遺伝子は EF-1 α を用い、逆転写前の脾臓 total RNA を鋳型にしたものを陰性対照(RT-)とした。

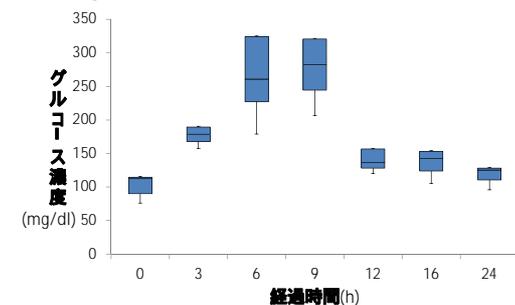


図6) グルコース投与後の血糖値変化。ニホンヤモリに 2 g glucose/kg body weight のドースでグルコース溶液を経口投与した。投与後 0h (5 匹), 3h (2 匹), 6h (3 匹), 9h (2 匹), 12h (3 匹), 16h (3 匹), 24h (3 匹) 経過時点で採血を行い、血清のグルコース濃度を測定した。経過時間ごとの濃度を箱ひげ図で示した。

2-2) 有鱗目における新規 proglucagon mRNA パリアントの分子同定と発現の系統間比較

有鱗目の繁栄に深く関わっていると考えられる「省エネルギー」型の代謝制御機構の実態を明らかにするためには、エネルギー摂取・代謝に関わる glucagon および glucagon-like peptide (GLP)-1/-2 をコードする proglucagon 遺伝子の働きも重要であり、先ずその分子同定から研究を進めた。その過程で3種類の新規 proglucagon mRNA スプライスバリエントを発見することができた<図7>。各バリエントは既知の mRNA と異なるホルモン配列組成をもっており、うち2種類は GLP-1 または GLP-2 のみをコードするものであった<図8参照>。また、小腸においてそれらのバリエントが優占的に発現していた。

これらの研究結果は、ヤモリ下目において選択的スプライシングを利用した GLP-1 および GLP-2 の独立な分泌系が機能していることを強く示唆する。今後、基礎代謝率の低さを特徴とするヤモリ下目におけるエネルギー代謝制御機構の解明に寄与すると期待される。

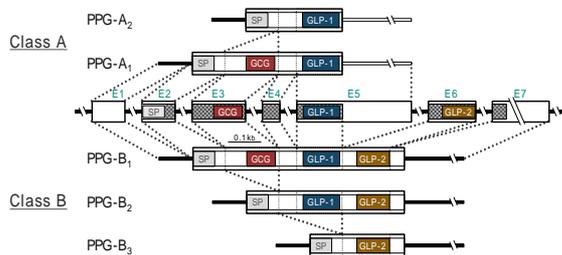


図7) 各 mRNA バリエントとゲノム DNA の関係を表す模式図。えられた解析情報を用いて、ニワトリゲノム構造から推定した。中央に推定されるニホンヤモリおよびヒョウモントカゲモドキのゲノム構造を示し、その上下に各々 Class A/B に属する mRNA を配置した。ゲノム DNA および 各 mRNA 間を結ぶ点線はスプライシング構造を表す。ゲノム DNA では白枠内が exon, 線分が intron を表す。また, exon 内の網掛部が ORF を表す。ゲノム DNA の上側には exon 1 (E1) ~ E7 までの位置を緑で記した。mRNA では、白枠内が ORF, 線分が UTR を表す。Class A/B mRNA の 3' UTR を各々白線および黒線で示した。signal peptide (SP) および各ホルモン配列部をその名称と共に示した。

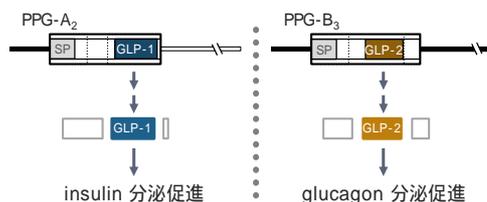


図8) ヤモリ下目で示唆される, PPG-A2/B3

による GLP-1/-2 生合成系の独立化と糖代謝系への機能を現した模式図。GLP-1/-2 の生合成を担う主要な mRNA バリエントの種類は組織発現解析の結果から推定した。PC1/3 によるプロセシング様式を酵素認識配列の保存性から推定した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

Park, MK., Kanaho, Y-I, Enomoto, M. (2013) Regulation of the cell proliferation and migration as extra-pituitary functions of GnRH. *Gen. Comp. Endocrinol.* 1281: 259-264. doi: 10.1016/j.ygcen.2012.09.023. (査読有り)

Kusakabe, T, Sakai, T, Aoyama, M, Kitajima, Y, Miyamoto, Y, Daido, Y, Fujiwara, K, Terashima, Y, Sugiuchi, Y, Yagisawa, H, Park MK, Satake, H, & Tsuda, M. (2012) A conserved non-reproductive GnRH system in chordates. *PLoS One* 7(7):e41955. doi: 10.1371/journal.pone.0041955. (査読有り)

Otake S, Endo D, & Park MK (2011) Molecular characterization of two isoforms of ZFAND3 cDNA from the Japanese quail and the leopard gecko, and different expression patterns between testis and ovary. *Gene* 488: 23-24. doi: 10.1016/j.gene.2011.08.021. (査読有り)

[学会発表](計 18 件)

山岸弦記・朴民根 (2014) 有鱗目 insulin アミノ酸配列の変異蓄積とその分子進化的解析. 日本動物学会関東支部第 66 回大会. 千葉(2014 年 3 月 15 日).

大嶽茂雄、朴民根 (2013) 光周期によるウズラの精巣機能変化における AMH シグナル系の関与. 第 18 回日本生殖内分泌学会学術集会、シェーンバッハ・サボー(東京)、(2013 年 12 月 7 日).

山岸弦記・朴民根 (2013) 爬虫綱ヤモリ下目の二つの系統で独立に生じたインスリン変異の蓄積. 第 38 回日本比較内分泌学会大会、宮崎市民プラザ(宮崎)、(2013 年 10 月 24-26).

倉形英里奈・鈴木雄大・朴民根 (2013) 有鱗目ヤモリ下目でみられる PGDPs アミノ酸配列の変異の特徴. 第 38 回日本比較内分泌学会、宮崎市民プラザ(宮崎)、(2013 年 10 月 24-26).

鈴木雄大・倉形英里奈・朴民根 (2013) 爬虫綱におけるプログルカゴン遺伝子 mRNA 新規バリエントの系統的広がりと言現の解析. 38 回日本比較内分泌学会、宮崎市民プラザ(宮崎)、(2013 年 10 月 24-26).

大嶽茂雄、朴民根 (2013) 光周期によるウ

ズラの精子形成の変化に伴う AMH 発現分布様式の変動 . 第 38 回日本比較内分泌学会大会、宮崎市民プラザ(宮崎)、(2013 年 10 月 24-26) .

Park MK (2013) GnRH regulation of the cell proliferation and migration, and its biological significance. Hui-Je Animal Biotechnology Symposium, Suanbo Park Hotel, Choongju, Korea (Aug16-17, 2013).

鈴木雄大・倉形英里奈・朴民根 (2012) プログルカゴン遺伝子由来の爬虫類特異的新規 mRNA の分子同定とその特徴 . 第 37 回日本比較内分泌学会 . 福井大学文京キャンパス(福井) (2012 年 11 月 30-12 月 1 日) .

倉形英里奈・鈴木雄大・朴民根 (2012) 爬虫類有鱗目のニホンヤモリにおける GLP 分子配列の特性と GLP 分解酵素 (DPP-4) の分子同定 . 第 37 回日本比較内分泌学会 . 福井大学文京キャンパス(福井) (2012 年 11 月 30-12 月 1 日) .

山岸弦記・朴民根 (2012) ヤモリ属インスリンアミノ酸配列における変異蓄積と糖負荷によるニホンヤモリの血糖値の動態 . 第 37 回日本比較内分泌学会 . 福井大学文京キャンパス(福井) (2012 年 11 月 30-12 月 1 日) .

大嶽茂雄・朴民根 (2012) 鳥類での AMHR2 の探索 - シンテニー解析とウズラでの cDNA 配列同定 - 第 37 回日本比較内分泌学会 . 福井 (2012 年 11 月 30-12 月 1 日) .

Park MK (2012) Various survival strategies of Squamataes and its molecular physiological characteristics. Hui-Je Animal Biotechnology Symposium, Suanbo Park Hotel, Choongju, Korea (Aug17-18, 2012).

吉田彩夏・小林彩・朴民根 (2012) ニホンヤモリの省エネルギー戦略における膵臓・消化管ホルモン役割 . 日本動物学会関東支部第 64 回大会 . 東京 (2012 年 3 月 17 日) .

Park MK (2012) GnRH regulation of the cell proliferation and migration, and its evolutionary implication. Symposium-2: Evolutionary and Developmental Endocrinology, (The Seventh Congress of the Asia and Oceania Society for Comparative Endocrinology, Kuala Lumpur, Malaysia: March 3-7, 2012)

大嶽茂雄・朴民根 (2011) 光周期によるウズラの生殖腺の機能変化における性分化関連遺伝子の役割 . 第 36 回日本比較内分泌学会 . 都道府県会館(東京) (2011 年 12 月 23-25 日) .

大嶽茂雄・朴民根 (2011) 光周期によるウズラの生殖腺の機能変化の分子生物学的解析 . 第 16 回日本生殖内分泌学会学術集

会、シェーンバッハ・サポー(東京)、2011 年 11 月 19 日 .

前廣清香・朴民根 (2011) 発生期を通じたニワトリの脳における Ad4BP/SF-1 発現解析 . 日本動物学会第 82 回大会 . 旭川市 (2011 年 9 月 21-23 日) .

大嶽茂雄・遠藤大輔・朴民根 (2011) 光周期がウズラの生殖腺の遺伝子発現に及ぼす影響 - 生殖腺特異的遺伝子 *Tex27* の mRNA variant の解析 - . 第 11 回東京大学生命科学シンポジウム、東京大学本郷キャンパス (東京) . 2011 年 6 月 4 日 .

[図書] (計 1 件)

Enomoto M, Kato T, Kanaho Y-I, Ustumi U, and Park MK (2003) GnRH functions as a cell proliferation and migration regulator: mode of action in extra-pituitary organs, In "Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH): Production, Structure and Functions", Edited by ES Sills, Nova Science Pub Inc. New York USA, p 213-232. ISBN: 978-1-62808-478-8 (査読有り)

○出願状況 (計 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

[その他]
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者
朴民根 (PARK, MIN KYUN)
東京大学・大学院理学系研究科・准教授
研究者番号 : 00228694

(2)研究分担者
なし ()
研究者番号 :

(3)連携研究者
なし ()
研究者番号 :