

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24657050

研究課題名(和文) 脳内ペプチド遺伝子パラログにおける機能代償のZFN法を用いた実証

研究課題名(英文) Experimental demonstration of functional compensation among paralogous genes encoding neuropeptides

研究代表者

岡 良隆 (Oka, Yoshitaka)

東京大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70143360

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：一般的に、ゲノム重複によって倍化した遺伝子は、異なる機能をもつ遺伝子(パラログ)に分化していることが知られている。単細胞生物では、パラログの存在により遺伝子欠失の際に機能補償が起こり得ることが示唆されているが、多細胞生物では詳細は不明である。申請者らは、生殖や性行動の調節に重要と考えられている脳内ペプチドキスペプチンのパラログ遺伝子kiss1とkiss2において神経機能代償の例を発見した。そこで、この実験系を用いて、非モデル生物にも適用可能な遺伝子ノックアウト技術を開発し、進化の途上で起こった機能喪失を実験的に再現する、という挑戦的な萌芽研究を行った。

研究成果の概要(英文)：There is a general agreement that a whole genome duplication has occurred early during evolution to produce paralogous genes with diversified functions. Functional compensation of a deleted gene by its paralogous gene has been documented for unicellular organisms, but such functional compensation has not been demonstrated for multicellular organisms so far. We have recently found an example of possible functional compensation between the paralogous genes, kiss1 and kiss2, encoding peptides called kisspeptins, which are considered to be involved in the central regulation of reproduction and/or sexual behavior. Here, we attempted at demonstrating experimentally functional compensation mechanisms of kisspeptin genes using state-of-the-art gene knock-out techniques such as TALEN and CRISPR/Cas9, which can be applied to non-model organisms.

研究分野：神経生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学 動物生理・行動

キーワード：ペプチド 生殖 性行動 パラログ遺伝子 トランスジェニック メダカ

## 1. 研究開始当初の背景

一般的に、ゲノム重複によって倍化した遺伝子は、異なる機能をもつ遺伝子(パラログ)に分化していることが知られている。単細胞生物では、パラログの存在により遺伝子欠失の際に機能補償が起こり得ることが示唆されているが、多細胞生物では詳細は不明である。申請者らは、上述のパラログ *kiss1/2* において、神経機能代償の例を発見した。そこで、この系を題材として、非モデル生物にも適用可能な遺伝子ノックアウト技術を開発し、進化の途上で起こった機能喪失を実験的に再現する、という斬新なアイデアを提案する。

単細胞生物を用いたノックアウト実験 (Gu ら, 2003) や、ヒトの遺伝病に関する遺伝子の調査 (Hsiao & Vitkup 2008) によると、パラログをもつ遺伝子の方が、単独で存在する遺伝子よりも遺伝子喪失が表現型として顕在化する可能性が有意に低い。そこから遺伝子喪失時に生じる重複遺伝子による機能補償の存在が示唆され、「遺伝子のロバストネス」と呼ばれるようになった。しかし、その実体は、多細胞生物ではほとんどわかっていない。申請者らは、脊椎動物進化初期の2度にわたる全ゲノム重複において倍化した遺伝子 *kiss1*, *kiss2* について詳細な解析を行うことにより、哺乳類への進化の過程で偶然起こった *kiss2* 遺伝子の喪失を *kiss1* 遺伝子が機能補償したことを強く示唆する実験結果を得た。キスペプチン神経系は、GnRH ニューロンを介して生殖機能を制御し、受容体の欠損によって、ヒト、マウス共に生殖不全に陥ることから、現在神経内分泌学分野で最も注目されている神経系の一つである。最近申請者らは、キンギョを用いて、視索前野の *kiss2* ニューロンが性ステロイドによる強い発現制御を受けることを、真骨魚類において初めて発見した。両生類でも視索前野に *kiss2* ニューロンが存在することから、脊椎動物において性ステロイド感受性を示す視索前野ニューロンは、*kiss2* ニューロンであると予想

される。ところが、マウスなどの有胎盤哺乳類では、視索前野に存在してステロイド感受性を示すニューロンはすべて *kiss1* ニューロンである。哺乳類は単孔類と分岐した後に *kiss2* を失ったことが示唆されることから、元来、脊椎動物を通じて視索前野で *kiss2* が発現していたが、*kiss2* の喪失により、ペプチド産物が同一の受容体 (Gpr54) を活性化するのみならず、類似の発現制御配列をもつパラログ遺伝子 *kiss1* により機能の補償が行われたと示唆される。申請者らは、*kiss2* 喪失前の四足動物である *Xenopus tropicalis* を用いて、*kiss2* ノックアウトにより進化の過程で起きた *kiss2* の喪失に近い状態を実験的に再現し、*kiss1* が *kiss2* の喪失を機能補償し得るかどうかを検証する。

## 2. 研究の目的

太古の時代から引き継がれてきた生殖という現象は、神経系と内分泌系の巧みな協調によって見事に調節されている。申請者はこうした神経系と内分泌系の協調のしくみに興味を持ち、脳内の生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) およびそれを制御するキスペプチン (遺伝子 *kiss1/2*) というペプチド神経系の神経内分泌的機能に注目して研究を展開してきた。本研究では、*kiss1/2* 機能の多様性に関する最近の我々の発見をきっかけとして、遺伝子重複により生じたパラログ遺伝子の機能の多様化に関する進化生物学的解析を可能とする技術を開発して、多細胞生物における「遺伝子のロバストネス」を初めて実験的に証明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

以下のような順序で、2年間にわたって研究計画を進めた。

平成 24 年度

ZFN コンストラクトの作成、His-tag を用いた精製(複数候補を作成)

精製したZFN コンストラクトの invitro での切断効率の検証

最も効率の良い ZFN コンストラクトの *Xenopus* 受精卵へのマイクロインジェクション

平成 25 年度

モザイク状に *kiss2* 遺伝子が失われた細胞が存在する個体(3)と野生型株との交配

High Resolution Melting Curve Analysis による変異体の検出

in situ hybridization を用いた、*kiss2* 遺伝子喪失後の *kiss1* 遺伝子による機能補償の検証 in situ hybridization を用いた、*kiss2* 遺伝子喪失後の *kiss1* 遺伝子による機能補償の検証

このような手順で *kiss2* 遺伝子がノックアウトされた *Xenopus tropicalis* (継代によりホモ個体を作成) が系統確立されるはずである。そこで、この個体を用い、in situ hybridization による遺伝子発現の解析を行う。まず、*kiss2* の in situ hybridization により、脳内で *kiss2* がきちんと失われたことを確認後、*kiss1* の in situ hybridization を行う。*Xenopus laevis* を用いた先行研究によると、*Xenopus* の *kiss2* は視索前野と腹側視床下部に発現している。一方、*kiss1* は腹側視床下部のみに発現している。哺乳類では、その進化の過程で偶然起こった *kiss2* 遺伝子の喪失を *kiss1* 遺伝子が機能補償している(実際、ほ乳類では *kiss1* が生殖の中樞制御を行っている)という考え方が正しければ、今回作成した *Xenopus* の *kiss2* ノックアウト個体では、野生型と異なり視索前野でも *kiss1* が発現するようになっているはずである。

一方、*kiss1* が視索前野に発現してこな

かった場合には、*kiss1* による機能補償のない、純粋な *kiss2* のノックアウト個体が生産されたことになる。この場合は、哺乳類以外で初めての *kiss2* ノックアウト動物が確立されたということになり、この動物の生殖機能などを解析することにより、*kiss2* の脊椎動物における一般的な機能が初めてはっきりと証明されることになる。また、マウス、ラット以外の非モデル動物でもノックアウト動物を生産できる技術が確立されることにより、生物学一般にも大きなインパクトを与える。したがって、ノックアウト動物作成後は、*kiss1* による *kiss2* 機能の補償の有無にかかわらず、神経内分泌学上極めて重要な知見が得られることになる。

#### 4. 研究成果

*Xenopus tropicalis* における遺伝子の特異的な破壊を行うため、まず、Zinc Finger Nuclease 法による遺伝子破壊を検討した。まず、実験に供する *Xenopus tropicalis* の系統の *kiss2* 配列を PCR 法にて増幅、正確な塩基配列を決定した。その配列情報を元に、ゲノム上で二重鎖切断を引き起こすと予想される invitro での切断を試みたが、複数作成した zinc finger nuclease のなかで *kiss2* 配列を選択的に破壊する物は見られなかった。

そこで、zinc finger nuclease の後発かつ、切断効率が良いとされる transcription activator-like effector nuclease (TALEN) 法および CRISPR 法を試みた。認識する配列が自由に設計できる上、毒性も低いとされているが、原理自体は当初の計画に記したものとほぼ同じである。

研究室で日常的に飼育しているメダカを用いて TALEN 技術を試みたところ、TALEN mRNA によって、極めて効率的に GnRH1 遺伝子を破壊することに成功した。同様にして、

kiss1, gnrh1, gnrh2, gnrh3, lh, fsh, rfrp, it, vt, npff, npya の TALEN と受容体遺伝子 kiss2, gpr54-1, gpr54-2, era についても CRISPR による遺伝子ノックアウトメダカの作成に成功した。そこで、これと同じように、2種類の TALEN を合成し、mRNA としてインジェクションし、*Xenopus tropicalis* において kiss2 遺伝子を欠失した個体を作成中である。

既に *Xenopus tropicalis* の採卵、成体への飼育を可能にしている、GFP の mRNA のマイクロインジェクションによって全身を光らせたオタマジャクシを作ることでもできていて、*Xenopus tropicalis* kiss2 ノックアウト個体を作成する技術的なベースは、すべて整ったので、これを実施した。また、ノックアウト作成後の *in situ* hybridization についても、問題なく働くことを確認済みである。

したがって、あとは、kiss2 配列が切断可能な TALEN を設計し、実際にノックアウト個体を作ることのみである。現在までに、*Xenopus* kiss2 に対する二種類の TALEN を作成した。不運にもどちらもうまく切断できなかったが、おそらく確率的な問題なので、他のデザインを設計し、切断を試みている。

## 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 11 件)

- 1 Karigo, T., and Oka, Y. (2013) Neurobiological study of fish brains gives insights into the nature of gonadotropin-releasing hormone 1-3 neurons. *Frontiers in Endocrinology (Experimental Endocrinology)*. "Biology of Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons", 4: 177. (Article 177, 1-10) doi: 10.3389/fendo.2013.00177. 査読有
- 2 Zempo, B., Kanda, S., Okubo, K., Akazome, Y., and Oka, Y. (2013)

- Anatomical distribution of sex steroid hormone receptors in the brain of female medaka. *Journal of Comparative Neurology* 521: 1760-1780. doi: 10.1002/cne.23255. 査読有
- 3 Umatani, C., Abe, H., and Oka, Y. (2013) Neuropeptide RFRP inhibits the pacemaker activity of terminal nerve GnRH neurons. *Journal of Neurophysiology* 109: 2354-2363. doi:10.1152/jn.00145.2012. 査読有
- 4 Kanda, S., Akazome, Y., Mitani, Y., Okubo, K., and Oka, Y. (2013) Neuroanatomical evidence that kisspeptin directly regulates isotocin and vasotocin neurons. *PLoSOne* 8: e62776. doi:10.1371/journal.pone.0062776. 査読有
- 5 Hodne, K., Weltzien, F.-A., Oka, Y., and Okubo, K. (2013) Expression and putative function of kisspeptins and their receptors during early development in medaka. *Endocrinology* 154: 3437-3446. doi:10.1210/en.2013-1065. 査読有
- 6 Kawai, T., Abe, H., and Oka, Y. (2013). Burst generation mediated by cholinergic input in terminal nerve-gonadotrophin releasing hormone neurones of the goldfish. *Journal of Physiology-London* 591: 5509-5523. doi:10.1113/jphysiol.2013.258343. 査読有
- 7 Kanda, S., and Oka, Y. (2012) Evolutionary insights into the steroid sensitive kiss1 and kiss2 neurons in the vertebrate brain. *Frontiers in Genomic Endocrinology "Estrogenic control of hypothalamic GnRH neurons"* 3:28. (Article 28, 1-10) doi: 10.3389/fendo.2012.00028. 査読有
- 8 Kawai, T., Abe, H., and Oka, Y. (2012) Dopaminergic neuromodulation of synaptic transmission between the mitral and granule cells in the teleost olfactory bulb. *Journal of Neurophysiology* 107: 1313-1324. doi: 10.1152/jn.00536.2011. 査読有
- 9 Kanda, S., Karigo, T., and Oka, Y. (2012) Steroid sensitive kiss2 neurones in the goldfish: evolutionary insights into the duplicate kisspeptin gene-expressing neurones. *Journal of Neuroendocrinology* 24: 897-906. doi: 10.1111/j.1365-2826.2012.02296.x. 査読有
- 10 Karigo, T., Kanda, S., Abe, H., Okubo,

- K., and Oka, Y. (2012) Time-of-day dependent changes in GnRH1 neuronal activities and gonadotropin mRNA expression in a daily spawning fish, medaka. *Endocrinology* 153: 3394-3404. doi: 10.1210/en.2011-2022. 査読有
- 11 Hiraki, T., Takeuchi, A., Tsumaki, T., Zempo, B., Kanda, S., Oka, Y., Nagahama, Y., and Okubo, K. (2012) Female-specific target sites for both estrogen and androgen in the teleost brain. *Proceedings of the Royal Society. B, Biological sciences* 279: 5014-5023. doi: 10.1098/rspb.2012.2011. 査読有
- [学会発表](計 31 件)
- 1 Maehiro, S., Oka, Y., Okubo, K. "Identification of a novel transglutaminase gene is differentially expressed between the sexes in the medaka brain" The 7th AOSCE (The Asia and Oceania Society for the Comparative Endocrinology) Intercongress, Keelung, Taiwan (18-23, March 2014)
- 2 Takahashi, A., Islam, S., Akazome, Y., Abe, H., Okubo, K., Oka, Y. "Morphological analysis of the early development of GnRH neuron systems in the EGFP-expressing transgenic medaka lines" The 43th Annual Meeting of the Society for Neuroscience 2013, San Diego (9-13, November 2013)
- 3 Karigo, T., Oka, Y. "Neurobiological analysis of dopaminergic inhibition in the HPG axis regulation." The 43th Annual Meeting of the Society for Neuroscience 2013, San Diego (9-13, November 2013)
- 4 岡良隆 "生殖の中樞制御に関わるペプチドニューロン系の研究" 日本動物学会第 84 回大会、岡山 (2013 年 9 月 26 日 ~ 28 日) 平成 25 年度日本動物学会賞受賞者講演
- 5 岡良隆 "生殖・性行動調節にかかわる脳部位における性差" 日本動物学会第 84 回大会、岡山 (2013 年 9 月 26 日 ~ 28 日)
- 6 馬谷千恵、阿部秀樹、岡良隆 "終神経 GnRH ニューロンが視覚神経回路に及ぼす作用の解析" 日本動物学会第 84 回大会、岡山 (2013 年 9 月 26 日 ~ 28 日)
- 7 奥山輝大、横井佐織、阿部秀樹、磯江泰子、末廣勇司、今田はるか、島田敦子、川崎隆史、弓場俊輔、谷口善仁、亀井保博、田中実、成瀬清、武田洋幸、岡良隆、久保健雄、竹内秀明 "メダカの配偶者選択の分子神経基盤" 日本動物学会第 84 回大会、岡山 (2013 年 9 月 26 日 ~ 28 日)
- 8 貝瀬峻、神田真司、岡良隆 "RFRP ニューロンの自発活動と GnRH1 ニューロン発火抑制に関する電気生理学的解析" 日本動物学会第 84 回大会、岡山 (2013 年 9 月 26 日 ~ 28 日)
- 9 長谷部政治、神田真司、島田洋之、岡良隆 "性ステロイド感受性を示す Kiss1 ニューロンの電気生理学的解析" 日本動物学会第 84 回大会、岡山 (2013 年 9 月 26 日 ~ 28 日)
- 10 Oka, Y. "GnRH neurons involved in central regulation of reproduction and reproductive behavior" 2013 Gordon Research Conference, Neuroethology: Behavior, Evolution & Neurobiology; Networks, Circuits, and Modules, Mount Snow Resort, West Dover, VT, USA (17-25, August 2013) 招待講演
- 11 神田真司、岡良隆 "脊椎動物キスペプチン神経系の進化と未知の機能": 東京大学大気海洋研究所共同利用研究集会、柏 (2013 年 6 月 22 日) 招待講演
- 12 岡良隆 "生殖の中樞制御の鍵を握るキスペプチンとその受容体 GPR54 を発現するニューロンへの新たな生理学的アプローチ" 第 10 回 GPCR 研究会、東京 (2013 年 5 月 10 日 ~ 11 日) 招待講演
- 13 Kanda, S. and Oka, Y. "Functional and evolutionary diversity of vertebrate kisspeptin neuron systems 脊椎動物キスペプチン神経系の進化と多様な機能" Hiroshi and Aya Irisawa Memorial Award Symposium, The 90th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, Tokyo (27-29, March 2013) 招待講演
- 14 Kanda, S., Nakajo, M., Lee, J., Oka, Y. "gpr54-1-EGFP Transgenic Medaka - a New Approach towards the Understanding of Novel Functions of Kisspeptin Neurons" The 2nd World Conference on Kisspeptin Signaling in the Brain, Tokyo (6-9, November 2012) 招待講演
- 15 Okubo, K., Hodne, K., Kanda, S., Shimada, H., Oka, Y., Weltzien, F.A. "Embryonic Expression and Function of Kisspeptins and their Receptors in a Teleost Fish, medaka" The 2nd World Conference on Kisspeptin Signaling in the Brain, Tokyo (6-9, November 2012)
- 16 Shimada, H., Kanda, S., Akazome, Y., Abe, H., Okubo, K., Oka, Y. "Electrophysiological and Morphological Analysis of Kiss1 Neurons in Transgenic Medaka, *Oryzias latipes*" The 2nd World Conference on Kisspeptin Signaling in the Brain, Tokyo (6-9, November 2012)
- 17 Karigo, T., Uenoyama, Y., Oishi, S., Fujii, N., Mitani, Y., Kanda, S., Oka,

- Y. "Effects of Kisspeptins on LH Secretion and GnRH1 Neuronal Activities in Goldfish and Medaka." The 2nd World Conference on Kisspeptin Signaling in the Brain, Tokyo (6-9, November 2012)
- 18 Takahashi, A., Kanda, S., Akazome, Y., Oka, Y. "Generation of kiss1 Knockout Medaka using Efficient New Genetic Tools, TALENs" The 2nd World Conference on Kisspeptin Signaling in the Brain, Tokyo (6-9, November 2012)
- 19 Zempo, B., Kanda, S., Akazome, Y., Oka, Y. "Steroid Sensitive Hypothalamic Kiss1 Neurons in Medaka do not Co-express NKB or DYN" The 2nd World Conference on Kisspeptin Signaling in the Brain, Tokyo (6-9, November 2012)
- 20 Akazome, Y., Yamamoto, E., Oka, Y. "Kiss2 may Activate Receptors for Neuropeptide FF (NPFF) / RF Amide Related Peptide (RFRP) in Medaka" The 2nd World Conference on Kisspeptin Signaling in the Brain, Tokyo (6-9, November 2012)
- 21 Nakane, R., Kanda, S., Oka, Y. "Inhibitory Regulation of GnRH3 Neurons by RFRP Neurons in Medaka" The 2nd World Conference on Kisspeptin Signaling in the Brain, Tokyo (6-9, November 2012)
- 22 S. Kanda, Y. Oka "Neuroanatomical evidence for direct kisspeptin regulation of vasotocin and isotocin neurons" The 42th Annual Meeting of the Society for Neuroscience 2012, New Orleans, U.S.A. (13-17, October 2012)
- 23 C. Umatani, H. Abe, Y. Oka "Neuropeptide RFRP inhibits the pacemaker activity of extrahypothalamic GnRH neurons" The 42th Annual Meeting of the Society for Neuroscience 2012, New Orleans, U.S.A. (13-17, October 2012)
- 24 奥山輝大、横井佐織、阿部秀樹、末廣勇司、今田はるか、田中実、川崎隆史、谷口善仁、亀井保博、島田敦子、成瀬清、武田洋幸、岡良隆、久保健雄、竹内秀明 "メダカにおける、メスの配偶者選択行動の神経機構" 第 35 回日本神経科学大会、名古屋 (2012 年 9 月 18 日 ~ 21 日)
- 25 馬谷千恵、阿部秀樹、岡良隆 "RFRP による終神経 GnRH ニューロン発火活動抑制作用の解析" 第 35 回日本神経科学大会、名古屋 (2012 年 9 月 18 日 ~ 21 日)
- 26 河合喬文、阿部秀樹、岡良隆 "終神経 GnRH ニューロンにおけるコリン作動性入力を介したバースト活動の誘起" 第 35 回日本神経科学大会、名古屋 (2012 年 9 月 18 日 ~ 21 日)
- 27 阿部秀樹、西川穂高、末次翔太、岡良隆 "終神経 GnRH ペプチドニューロン細胞塊における GnRH ニューロン間結合様式" 第 35 回日本神経科学大会、名古屋 (2012 年 9 月 18 日 ~ 21 日)
- 28 苅郷友美、岡良隆 "生殖中枢制御に対するドーパミンを介した抑制作用に関する神経生物学的解析" 日本動物学会第 83 回大会、大阪 (2012 年 9 月 13 日 ~ 15 日)
- 29 北原翔一、神田真司、岡良隆 "絶食によるメダカ視床下部 NPY ニューロンの NPY mRNA 発現変動" 日本動物学会第 83 回大会、大阪 (2012 年 9 月 13 日 ~ 15 日)
- 30 神田真司、李惇馥、岡良隆 "キスペプチン受容体発現ニューロンの GFP 標識による未知のキスペプチン機能の探索" 日本動物学会第 83 回大会、大阪 (2012 年 9 月 13 日 ~ 15 日)
- 31 家田菜穂子、上野山賀久、山本恵理、岡良隆、杉原稔、小野幸輝、諏訪牧子、石井寛高、加藤昌克、尹成珠、佐久間康夫、前多敬一郎、束村博子 "ガラニン受容体を介したキスペプチン誘導性黄体形成ホルモン分泌の抑制的調節機構" GPCR 研究会、東京 (2012 年 5 月 12 日)

〔図書〕(計 1 件)

- 1 Kanda, S., and Oka, Y. (2013) Structure, synthesis, and phylogeny of kisspeptin and its receptor. In: "Kisspeptin Signaling in Reproductive Biology" (ed. by A. Kauffman and J. Smith), Chapter 2, Springer Verlag, New York, pp. 9-26. Adv Exp Med Biol. 2013;784:9-26. doi: 10.1007/978-1-4614-6199-9\_2 査読有

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.biol.s.u-tokyo.ac.jp/users/n\\_aibunpi/lab.html](http://www.biol.s.u-tokyo.ac.jp/users/n_aibunpi/lab.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡 良隆 (Oka, Yoshitaka)

東京大学・大学院理学系研究科・教授

研究者番号：70143360

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし