

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 18 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440174

研究課題名(和文) アンフィビアスに至る脊椎動物の進化モデル動物のグレリンシステムの変遷

研究課題名(英文) The change of the ghrelin system in the evolution model animals of amphibious vertebrate which moved ashore from the water

研究代表者

海谷 啓之(Kaiya, Hiroyuki)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・室長

研究者番号：40300975

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：チョウザメのグレリン前駆体cDNAと成熟型グレリンの構造を明らかにし、同一個体中で2種類のmRNAから異なる配列の成熟型グレリンが産生されること、受精卵から発生が進むにつれてグレリン遺伝子発現が増加することを明らかにした。アフリカ産肺魚において機能的なグレリン受容体GHS-Rを同定し、脳、心臓、腸などでの発現や、夏眠時の浸透圧調節やエネルギー代謝調節に関与する可能性を示した。アホロートルで発見した2種類のGHS-Rは、分布や発現量が異なっており、両生類には複数のGHS-Rが存在することが示唆された。アカハライモリやネツタイツメガエルにおいて、グレリンの腹腔投与は摂食量に影響を与えなかった。

研究成果の概要(英文)：We determined the nucleotide sequence of the ghrelin precursor of a sturgeon (vestel) and structure of the mature ghrelin, and noticed that two kinds of mature ghrelin were produced from different mRNAs in the same individuals. In addition, we clarified that expression of the ghrelin gene increases as the development progresses from fertilized egg. Furthermore, we identified a functional ghrelin receptor (GHS-R) in the African lungfish, and it expresses in the brain, heart and intestines, and suggested the possibility to participate in osmoregulation and energy metabolism during the estivation. Moreover, two kinds of GHS-R that we discovered in axolotls varied in tissue distribution and expression level, and it was suggested that there was plural GHS-Rs in amphibians. In the fire belly newt and the Western clawed frog, intraperitoneal injection of the ghrelin did not affect the food intake.

研究分野：比較内分泌学

キーワード：グレリン GHS-R 機能解析 摂食量 浸透圧調節 エネルギー代謝 遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

グレリン(ghrelin)は 1999 年に発見されたペプチドホルモンで、主に胃の粘膜層に存在するグレリン産生細胞から分泌される一方、視床下部にも存在する脳腸ペプチドのひとつである。グレリンのアミノ酸配列の第3位のセリン残基が脂肪酸(主にオクタン酸)で修飾されており、この構造は受容体への結合と生物活性の発現に必須である。グレリンは哺乳類において急性には成長ホルモン(GH)分泌や摂食亢進、慢性的には脂肪蓄積による体重増加や成長促進、グルコース代謝にも関わることがわかってきている。

哺乳類においてさまざまな働きをしているホルモンとして知られるが、国内外を含め、非哺乳類におけるグレリン研究はあまり進んでおらず、不明な点が多い。報告者は、グレリン発見当初から、鳥類、爬虫類、両生類、真骨魚類、軟骨魚類などを用いてグレリンの構造学的、生化学的、組織化学的、生理学的特徴を明らかにしてきた。近年、非哺乳類におけるグレリンの生理作用を解明する一助として、グレリン受容体(GHS-R1a)の同定にも着手し、平成 23 年度から両生類におけるグレリン受容体の同定と機能解析、生理作用の解明に着手した。この間、無尾両生類のウシガエル、アマガエル、ヒキガエル、有尾両生類のアカハライモリ、アホロートルを材料に研究を進めてきた。

その結果、アホロートル以外で受容体 cDNA の全塩基配列を同定、機能解析にも成功し、興味深い事象を見いだした。すなわち、ウシガエルグレリンは第3位のアミノ酸がスレオニン(Thr3)であるのに対し、アマガエルやヒキガエルのグレリンはセリン(Ser3)を持つが、ウシガエルグレリンはウシガエルの下垂体で、Ser3 のラットグレリンよりも 100 倍程度強いホルモン分泌活性を示す。このことから、当初、ウシガエルには Thr3 を認識する受容体が、アマガエルには Ser3 を認識する受容体が存在すると予想していた。ところが、ウシガエルとアマガエルの受容体は Ser3、Thr3 グレリンを同等に認識した。また、この受容体遺伝子は視床下部には発現するが、下垂体には発現していないことが判明した。一方、アカハライモリで同定した受容体は下垂体にも遺伝子発現がみられ、Thr3 よりも Ser3 グレリンを好む明確な選択性を示した。このことは、無尾両生類の下垂体には視床下部とは異なる新規受容体、あるいは新規のグレリン情報伝達系がある可能性を示唆している。

また、古い形質を残す有尾両生類のアホロートルのグレリンとその受容体の同定を試みた。しかしながら、グレリンについてはこれまで明らかにした両生類グレリンの情報を基に行った遺伝

子クローニングでは同定できなかった。また受容体については2種の異なる断片を同定したが、全長のクローニングには至っていなかった。

2. 研究の目的

(1) 無尾両生類の下垂体でグレリンが作用する機序として、視床下部に発現する受容体とは別の受容体、または新規のグレリンシグナル伝達機序の可能性を明らかにする。

(2) イモリおよびカエルにおけるグレリンによる摂食調節への関与を調べる。

(3) アホロートルのグレリンシステムについて、すなわちグレリンは遺伝子クローニングならびにペプチド精製から、また受容体 cDNA の部分配列から完全長を明らかにする。

(4) アフリカ産肺魚(*Protopterus annectens*)のグレリンシステムについて、完全長の受容体 cDNA を同定する。また、グレリンについてはペプチド精製を行い、cDNA 配列の同定を目指す。

(5) 軟質類のチョウザメにおいてグレリンを同定する。

以上により、脊椎動物が水中に棲息する硬骨魚類から両生類として上陸するまでのグレリンシステムの進化の過程を、現存する動物モデル、すなわち、軟質類→肺魚→有尾両生類→無尾両生類で追跡してみたい。

3. 研究の方法

(3-1) 下垂体の新規 GHS-R の候補として、ツメガエルのデータベース上にグレリン受容体と類似する受容体が2種類あることを見いだした。ツメガエル、ウシガエルでそれらのクローニングを進める。これらがカエルの下垂体にあるのかが鍵となる。新たな情報伝達機序は、下垂体における GHS-R アイソフォームの GHS-R1b に注目する。また異なる選択的スプライシング産物がなにかを精査する。

(3-2) 摂食調節作用について、合成したイモリグレリンまたはヒトグレリンを単独飼育またはグループ飼育したアカハライモリまたはネットアイツメガエルに、グラム体重あたり1~100pmol を腹腔内投与し、60 分以内の摂食量を測定した。また、アカハライモリにおいて腹腔投与したグレリンが血中に吸収されているかを腹腔投与後に心臓から採血し、血漿グレリン濃度を測定した。

(3-3) アホロートルおよび肺魚 GHS-R の cDNA クローニング:アホロートルでは2種類の、肺魚では1種類の cDNA 断片が同定できている。受容体 mRNA の組織発現を RT-PCR で調べ、発現が多い組織から全長 cDNA を RACE-PCR で決定する。決定した受容体 cDNA は哺乳類細

胞に受容体タンパクを発現させて機能解析を行う。

(3-4) チョウザメグレリンの単離と cDNA クローニング: 国内で独自の方法でチョウザメを繁殖している株式会社フジキンの平岡 潔氏と連絡を取り、MTA を締結して、チョウザメ(バステル: *Huso huso* × *Acipenser ruthenus* 交雑種)の組織提供を受ける。脳や胃のサンプルを用いてペプチドを単離、構造決定し、cDNA クローニングによってグレリン前駆体遺伝子を決定する。また、これまで確立した方法で脳または下垂体から GHS-R cDNA の同定を試みる。同定できた場合、受容体の機能解析を行う。

4. 研究成果

(4-1) 無尾両生類の下垂体でグレリンが作用する機序の検討

データベースの情報を基にアフリカツメガエルで GHS-R1a のクローニングを行ったが、脳では全長 cDNA が得られるのに対し、下垂体ではスプライズバリエーションの GHS-R1b の cDNA しか増幅しなかった。これはウシガエルと同様の結果であり、無尾両生類の下垂体には全長の GHS-R1a 遺伝子が発現していない可能性が示唆された。

一方、アフリカツメガエルには GHS-R1a の他にグレリン受容体に類似した2種類の受容体が存在することを見いだした。ツメガエルでそれらをクローニングしなければならなかったのだが、全長 cDNA を得る過程の 5' RACE-PCR で期待される産物が得られなかった。オーソログをウシガエルやアマガエルから同定する予定であったが、達成することができなかった。

(4-2-1) イベリアトゲイモリのグレリンの構造決定

摂食調節を調べるのに先立ち、イモリのグレリンの構造を決定するために、鳥取大から供与していただいたイベリアトゲイモリ2個体分の胃抽出物からグレリンの単離を試みた。グレリンの活性は認められたが、構造決定には至らなかった。同時に胃の total RNA を用いて PCR によるクローニングを試みた。既知の両生類グレリンの塩基配列を元にして作製したプライマーを用いて PCR を行ったが、期待された産物は得ることができなかった。

(4-2-2) アカハライモリおよびネツタイツメガエルにおけるグレリンの摂食調節への関与の検討

アカハライモリの単独飼育群または群飼育群において、グラム体重あたり 1、10、100 pmol の合成イモリグレリンを腹腔内投与して摂食量を検討したが、どの用量においても顕著な効果は見ら

れなかった。また、ネツタイツメガエルを用いて検討を行ったが、単独飼育群において合成ヒトグレリンの腹腔内投与は摂食に影響を与えなかった。

アカハライモリにおいて、腹腔内投与したグレリンが吸収され、血中に存在するかを検討したところ、投与20分後をピークにした血漿グレリン濃度の上昇が確認できた。このことから、少なくともアカハライモリやネツタイツメガエルの成体においてグレリンの摂食調節への関与は低いと推察された。

(4-3-1) 肺魚 GHS-R の cDNA クローニング

肺魚の全脳から抽出した total RNA から 361、281 アミノ酸からなる GHS-R1a、GHS-R1b をコードする cDNA を単離した。哺乳類細胞における発現系を用いた機能解析の結果、肺魚 GHS-R1a は機能的受容体であることが確認された。GHS-R1a mRNA は脳、心臓、腸などで発現していた。アフリカ産肺魚は乾燥時に夏眠という生理的休眠状態になるが、8週間の夏眠の間に採取したサンプルの解析結果から、グレリンシステムが夏眠時の浸透圧調節やエネルギー代謝調節に関与する可能性が示唆された。

(4-3-2) アホロートル GHS-R の cDNA クローニング

同定している2種類の GHS-R フラグメントを仮に GHS-R1、GHS-R2 と呼ぶが、それぞれに特異的なプライマーを作製し、3' および 5' RACE-PCR にて全長 cDNA の増幅を試みた。3' 側の塩基配列は決定できたが、5' 側は完全長を得ることができなかった。また、ゲノム DNA を用いてインバース PCR も試みたが、5' 側の配列を決定するに至らなかった。

3' RACE-PCR で得た塩基配列を基に定量的 PCR を確立し、GHS-R1、GHS-R2 の体組織分布を調べた。その結果、GHS-R1 mRNA は脳に最も多く、次いで脂肪、腎臓、精巣、胃腸管で高い発現が見られた。GHS-R2 の遺伝子発現量 GHS-R1 の 1/10 程度で、脳と下垂体に局限していた。

(4-3-3) アホロートルおよび肺魚のグレリンの単離・同定

胃の組織を収集するなか、胃組織中のグレリン含量を測定した(湿重量 各3個体の平均)。アホロートルは変態前の幼生型ではデカン酸修飾体が 9.36 fmol/mg、オクタン酸修飾体が 0.82 fmol/mg、また変態後の成熟型ではデカン酸修飾体が 12.86 fmol/mg、オクタン酸修飾体が 4.29 fmol/mg であった。一方、肺魚はデカン酸修飾体が 0.53 fmol/mg で、オクタン酸修飾体は検出

できなかった。比較としてキンギョはデカン酸修飾体が3.11fmol/mg、オクタン酸修飾体が8.91 fmol/mgである。幼生型アホロートルの胃は200mg/個体であるが、20g(100個体)程度の出発材料が必要と見積もられた。一方、肺魚は予想以上に含量が少なく、ペプチド精製をするには多くの個体から胃腸を収集しなければならないことが判明した。

一方、アホロートルの胃や肺魚の胃腸管のcDNAを用いて既知のグレリンの塩基配列からさまざまなプライマーをデザインしてPCRを行ったが、期待される産物は得られなかった。

(4-4) チョウザメグレリンの単離とcDNAクローニング、遺伝子発現部位について

胃からグレリンとその前駆体をコードするcDNAを単離した。前駆体タンパク質は114アミノ酸からなる。成熟型は27アミノ酸であり、C末端はアミド化されていた。また3位のセリン残基がオクタン酸で修飾されていた。興味深い事に、同一個体中で塩基配列の異なるmRNAが発現しており、グレリンの15位のアミノ酸がグルタミン酸とグリシンの場合があることがわかった。

チョウザメの発生過程におけるグレリン遺伝子発現を定量的PCRにて調べた。受精卵では弱いながら遺伝子発現が認められ、受精後6日までに80~2400コピー/ μ g total RNAまで遺伝子発現が上昇し、孵化後10日には6700~9500コピー/ μ g total RNA、20日には43000コピー/ μ g total RNAまで急激に遺伝子発現が上昇した。

シベリアチョウザメとシロチョウザメで胃のグレリン含量を調べる機会を得た。シベリアチョウザメではデカン酸修飾体が2.11fmol/mg、オクタン酸修飾体が18.11fmol/mg、シロチョウザメではデカン酸修飾体が6.18fmol/mg、オクタン酸修飾体が12.22fmol/mgであった。

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. Kihara M, Kaiya H, Win ZP, Kitajima Y, Nishikawa M. Protective Effect of Dietary Ghrelin-Containing Salmon Stomach Extract on Mortality and Cardiotoxicity in Doxorubicin-Induced Mouse Model of Heart Failure. *J Food Sci.* 2016. 81: H2858-2865. doi: 10.1111/1750-3841.13526.
2. Satou M, Kaiya H, Nishi Y, Shinohara A, Kawada S, Miyazato M, Kangawa K, Sugimoto H. Mole ghrelin: cDNA cloning, gene expression, and diverse molecular forms in *Mogera imaizumii*. *Gen Comp Endocrinol.* 2016. 232: 199-210. doi:10.1016/j.ygcen.2016.04.014.
3. Kitazawa T, Shimazaki M, Kikuta A, Yaosaka N, Teraoka H, Kaiya H. Effects of ghrelin and motilin on smooth muscle contractility of the isolated gastrointestinal tract from the bullfrog and Japanese fire belly newt. *Gen Comp Endocrinol.* 2016. 232: 51-9. doi: 10.1016/j.ygcen.2015.12.013.
4. Kitazawa T, Shimazaki M, Kikuta A, Yaosaka N, Teraoka H, Kaiya H. Effects of ghrelin and motilin on smooth muscle contractility of the isolated gastrointestinal tract from the bullfrog and Japanese fire belly newt. *Gen Comp Endocrinol.* 2016. 232: 51-59. doi:10.1016/j.ygcen.2015.12.013.
5. Kaiya H, Kangawa K, Miyazato M. Ghrelin receptor in Japanese fire belly newt, *Cynops pyrrhogaster*. *Comp Biochem Physiol B.* 2015. 189:15-22. doi: 10.1016/j.cbpb.2015.07.001.
6. Kitazawa T, Hiraga T, Teraoka H, Yaosaka N, Kaiya H. Correlation of ghrelin concentration and ghrelin, ghrelin-O-acetyltransferase (GOAT) and growth hormone secretagogue receptor 1a mRNAs expression in the proventriculus and brain of the growing chicken. *Peptides.* 2014. 63C: 134-142. doi:10.1016/j.peptides.2014.11.006.
7. Kaiya H, Konno N, Kangawa K, Uchiyama M, Miyazato M. Identification, tissue distribution and functional characterization of the ghrelin receptor in West African lungfish, *Protopterus annectens*. *Gen Comp Endocrinol.* 2014. 209: 106-117. doi: 10.1016/j.ygcen.2014.07.021.
8. Kakizawa S, Kaiya H, Takahashi A. Posttranslational modification of intercellular messenger systems. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2014. 5:27. doi: 10.3389/fendo.2014.00027.
9. Khan MS, Kaiya H, Tachibana T. Central injection of urocortin-3 but not corticotrophin-releasing hormone influences the ghrelin/GHS-R1a system of

- the proventriculus and brain in chicks. *Domest Anim Endocrinol.* 2014. 47: 27-34. doi: 10.1016/j.domaniend.2013.12.002.
10. **Kaiya H**, **Kangawa K**, **Miyazato M**. Molecular evolution of GPCRs: Ghrelin/ghrelin receptors. *J Mol Endocrinol.* 2014. 52: T87-100. doi: 10.1530/JME-13-0175.
 11. Shimizu S, **Kaiya H**, Matsuda K. Stimulatory effect of ghrelin on food intake in bullfrog larvae. *Peptides.* 2014. 51: 74-79. doi: 10.1016/j.peptides.2013.10.028.
- [学会発表] (計 17 件)
1. 12th International Congress on the Biology of Fish (16/6/12-16@Texas State University, San Marcos, Texas USA). Characterization of a third Channel Catfish Ghrelin Receptor Reveals Novel Ligand Affinity and Expression Patterns (Small, B., Quiniou, S., Bledsoe, J., **Kaiya, H.**)
 2. RegPep2016 (2016/7/11-15@Rouen ~ Normandy, France) Possible regulation of gastrointestinal motility by motilin in zebrafish – An in vitro study using isolated muscle strips (Kitazawa, T., Teraoka H., **Kaiya, H.**)
 3. 第 48 回日本臨床分子形態学会 (2016/9/23~24@くまもと県民交流館パレア(熊本))モルモットにおけるグレリン、グレリン受容体及びグレリン脂肪酸転移酵素の局在に関する免疫組織学的検討(奥原裕次、塚原芳美、小野里知哉、林 守道、**海谷啓之**、北澤多喜雄)
 4. 第 22 回国際動物学会&第 87 回日本動物学会 (2016/11/17-19@OIST および OCC (沖縄))Identification of ghrelin and its receptor in Schlegel's Japanese gecko, *Gekko japonicus* (**Kaiya H.**, Park MK., **Kangawa K.**, **Miyazato M.**)
 5. 第 41 回日本比較内分泌学会 (2016/12/9-11@北里大学相模原キャンパス(神奈川)) 5-1. ニホンヤモリにおけるグレリンとその受容体の同定 (**海谷啓之**、朴民根、寒川賢治、宮里幹也); 5-2. アマガエルの体液調節に関わる中枢神経系の解析(内山実、椋田崇生、露谷孔明、前嶋翔、**海谷啓之**); 5-3 ウナギにおけるバソトシンおよびイソトシンの体液調節作用とその受容体との機能相関(野畑重教、**海谷啓之**、竹井祥郎)
 6. 第 57 回日本脂質生化学会 (15/5/28-29@
 - 一橋大学(東京))モグラ・グレリンの精製と修飾脂質種の同定 (佐藤元康、**海谷啓之**、杉本博之)
 7. European Ornithologist's Union Conference 2015 (15/8/24-28@Badajoz, Spain) Stopover decision during migration: the role of hormones controlling food intake (Sara Lupi, **Hiroyuki Kaiya**, Massimiliano Cardinale, Wolfgang Goymann, Leonida Fusani)
 8. 第 57 回日本平滑筋学会 (15/8/25-27@山口大学(山口))ウシガエルの消化管収縮におよぼす ghrelin および motilin の影響(嶋崎未里、北澤多喜雄、寺岡宏樹、**海谷啓之**)
 9. 第 86 回日本動物学会 (15/9/17-19@朱鷺メッセ(新潟)) ウシガエルとイモリの胃腸管収縮に対するグレリンの効果(北澤多喜雄、嶋崎未里、菊田 歩、八百坂紀子、寺岡宏樹、**海谷啓之**)
 10. 第 40 回日本比較内分泌学会 (15/12/11-13@JMS アステームプラザ(広島))Distribution and Function of Neurohypophysial Hormone Receptors in Catshark (Natsuki Inoue, Yoko Yamaguchi, **Hiroyuki Kaiya**, Shigehiro Kuraku, Susumu Hyodo); Effect of ghrelin on contractile activity of gastrointestinal tract in the bullfrog and Japanese fire belly newt. (**Hiroyuki Kaiya**, Misato Shimazaki, Ayumi Kikuta, Noriko Yaosaka, Hiroki Teraoka, Takio Kitazawa)
 11. 第 87 回日本内分泌学会 (14/4/24-26@福岡国際会議場(福岡))各種脊椎動物の胃内デカン酸修飾型グレリン免疫活性量の比較検討(西 芳寛、平田留美子、御船弘治、**海谷啓之**、細田洋司、田尻祐司、佐藤元康、杉本博之、田中永一郎、児島将康)
 12. 第 11 回 GPCR 研究会 (14/5/9-10@日本科学未来館(東京))アフリカ産肺魚 *Proeotoerus annectens* のグレリン受容体 (**海谷啓之**、今野紀文、内山 実、寒川賢治、**宮里幹也**)
 13. REGPEP2014 (14/9/7-10@京都ガーデンパレス(京都))Chicken is a specific and useful animal model to study the functional role of ghrelin and motilin in regulation of gastrointestinal motility. (Kitazawa T, Teraoka H, **Kaiya H.**)
 14. 第 85 回日本動物学会 (14/9/11-13@東北大学(宮城))アフリカ産肺魚のグレリン受容体 (**海谷啓之**、今野紀文、内山 実、寒川賢治、**宮里幹也**)
 15. 第 65 回西日本生理学会 (14/10/23-24@琉

球大学 千原キャンパス(沖縄))海水魚・淡水魚の胃内に含まれるデカン酸・オクタン酸型グレリンの免疫活性量の比較検討(西芳寛、海谷啓之、内田勝久、御船弘治、山田和也、毛良明夫、細田洋司、田中永一郎)

16. 第39回日本比較内分泌学会(14/11/7-9@基礎生物学研究所(愛知)) Ghrelin receptor in West African lungfish; its identification, tissue distribution and functional characterization. (Hiroyuki Kaiya, Norifumi Konno, Kenji Kangawa, Minoru Uchiyama, Mikiya Miyazato)
17. ISAREN2014(14/11/7-9@基礎生物学研究所(愛知)) Ghrelin receptors in amphibians. (Hiroyuki Kaiya, Takio Kitazawa, Kenji Kangawa, Mikiya Miyazato)

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

海谷 啓之(KAIYA, Hiroyuki)

国立研究開発法人 国立循環器病研究センター
一研究所・生化学部・室長

研究者番号: 40300975

(2) 研究分担者

宮里 幹也(MIYAZATO, Mikiya)

国立研究開発法人 国立循環器病研究センター
一研究所・生化学部・部長

研究者番号: 50291183

(3) 連携研究者

(3-1) 寒川 賢治(KANGAWA, Kenji)

国立研究開発法人 国立循環器病研究センター
一研究所・所長

研究者番号: 00112417

(3-2) 今野 紀文(KONNO, Norifumi)

富山大学・理工学部・講師

研究者番号: 50507051

(4) 研究協力者

平岡 潔 (HIRAOKA, Kiyoshi)

株式会社 フジキン