

令和元年6月10日現在

機関番号：63801

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04686

研究課題名(和文) 中枢神経系で働くマウス新規摂食行動制御遺伝子の機能解明

研究課題名(英文) Elucidation of the function of a novel mouse gene in the central nervous system

研究代表者

高田 豊行 (TAKADA, Toyoyuki)

国立遺伝学研究所・遺伝形質研究系・助教

研究者番号：20356257

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、実験動物マウスのコンソミックシステムを使用して、肥満表現型を対象にした遺伝子探索研究を行い、脳で発現する機能未知の遺伝子Aobs1を同定した。本申請研究により、Aobs1は、マウス脳内の摂食に関わる神経核を含む領域で、摂餌の内容で遺伝子発現量が変化し、それに伴い特定の摂食行動制御関連遺伝子の発現が変動することを見出した。この結果を活用して、さらに解析を進めた結果、マウスのAobs1は中枢で機能して、摂食行動における脳内の特定の神経核で、レプチンなどによる栄養シグナルの伝達に関わる可能性が示唆された。また、Aobs1変異マウスは、過食による肥満研究のための実験動物になりうることも確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年の食品の高栄養化や運動量の低下、ストレスの増加などの様々な環境変化により、肥満とその関連疾患が激増し、深刻な社会問題になっている。申請者らが独自に発見した中枢神経系で摂食行動制御に係わる新規遺伝子を対象にして、肥満に繋がる摂食行動制御に関する研究を行うことで、基礎医学的な摂食行動制御系の遺伝システムの理解がより深化し、未知の遺伝パスウェイの発見に至る可能性がある。また、一連の変異マウスは、摂食障害やそれに起因する肥満や代謝病研究のモデルとしても優れた実験動物となる。

研究成果の概要(英文)： We have previously identified a novel gene, Aobs1 (Ankirin-repeat containing Obesity-associated Brain Stem 1), by QTL analysis using mouse inter-subspecific consomic strains. However, the function of Aobs1 has not been elucidated. In this study, we found that Aobs1 expression levels increased in feeding behavior-associated nerve nuclei depend on fat content of foods. Aobs1 gene expression levels also linked some genes that control of food intake volume. Overall, our results suggest that the mouse Aobs1 is likely to function in the specific nerve nuclei for transmission of nutritional signals, such as leptin for food feeding behavior. In addition, Aobs1 mutant mice can be applied experimental animals for the aim of obesity research.

研究分野：哺乳動物遺伝学

キーワード：疾患モデル 摂食行動 肥満

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ヒトをはじめとする哺乳動物のエネルギー代謝恒常性は、中枢による摂食行動制御と末梢のエネルギー代謝により頑健に統御されている。しかし、近年の食品の高栄養化、モータリゼーションやインターネットの普及による運動量の低下、各種ストレスの増加などの様々な環境変化により、肥満とその関連疾患が激増し、深刻な社会問題になっている。一方、肥満に繋がる摂食行動や、それらの制御に関する基礎医学的な研究は、中枢、特に視床下部を中心とした研究が精力的に行われ、複数の神経核で発現する多様な因子の働きが知られている。特に、神経ペプチド Y、アグーチ関連ペプチド、*CART*、*POMC*、オレキシンなどのペプチド類、脳由来神経栄養因子、視床下部 AMP キナーゼなどのタンパク質、セロトニンやドパミンなどの神経伝達物質、脂肪酸やアミノ酸の代謝産物などの重要性が報告されている。また、上述の神経核を含む中枢メラノコルチン経路が、中枢での摂食の自立的制御に重要な役割を果たすことが報告されている (Schwartz et al. Nature 2000 ; Coll et al. Cell 2008 ; Cone Nature Neurosci. 2014 ; Morton et al. Nature Rev. Neurosci. 2014)。さらに、ドパミン系などの高次脳機能回路を介した全身性のインスリンシグナル経路 (Vogt and Brüning, Cell, 2012 など) や、末梢からのインスリン (膵臓)、アディポネクチンやレプチン (脂肪組織)、グレリン (胃)、コレシストキニン、ペプチド YY、*GLP-1* (腸) と中枢とのクロストークも摂食行動制御に関わっている。しかし、中枢での摂食行動制御は、これら以外の因子も関わって複雑に統御されており、未知の因子や遺伝パスウェイの存在が予想されている。申請者らは、マウス C57BL/6J (B6) 系統の遺伝的背景に日本産野生由来 MSM/Ms (MSM) 系統の第 13 番染色体末端のみを導入したコンソミック系統 13T が加齢・過食により肥満し、耐糖能およびインスリン感受性の悪化を示すことを見出した (図 1)。さらに、長年にわたる順遺伝学解析により、その原因がアンキリンリピートを持つ 1 つの遺伝子の塩基置換に起因することを突き止めた。この遺伝子は、ヒトを含む哺乳類に広く保存され網羅的発現解析やデータベース上で名称が与えられているものの、機能的アノテーションは為されていない。

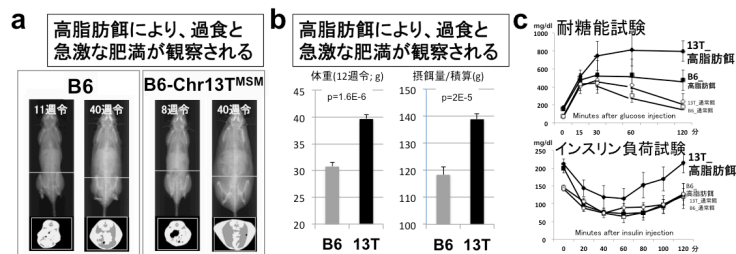


図1. コンソミック13T系統で観察される加齢による肥満 (a)、高脂肪餌による過食と急激な肥満 (b)および耐糖能とインスリン感受性の悪化 (c)。

ない。申請者らは、レポーター遺伝子を含む遺伝子破壊 ES 細胞株よりマウスを作製し、当該遺伝子が、間脳から延髄にかけて脳特異的な神経細胞に発現することを見いだした。この遺伝子破壊系統では、脳でのタンパク質の発現が消失し、高脂肪餌を過剰に摂取して急激に脂肪を蓄積する。また、この高脂肪餌の過剰摂取が嗜好の異常でないことを確認している。

以上の知見から、我々はこの遺伝子を *Aobs1* (オーブ 1; Ankirin-repeat containing Obesity-associated Brain Stem 1) と命名し、「*Aobs1* が中枢神経系での摂食制御に係わり、その機能異常が過食による肥満を引き起こす」との結論に達した。しかし、*Aobs1* が、どのような神経細胞で発現しているのか、また、アンキリンリピートを介した相互作用相手のタンパク質、既知の摂食行動制御系との関連など、その機能の全貌は未知である。興味深いことに、ヒト *AOBS1* 遺伝子は、ゲノムワイド関連解析 (GWAS) において脂肪蓄積、インスリン作用、2 型糖尿病、血中脂質濃度を定める量的形質遺伝子座 (QTL) の近傍に位置する (Scott et al. Nature Genetics 2012; Harder et al. J. Clin. Endocrinol. Metab. 2013; Shungin et al. Nature 2015)。したがって、*AOBS1* が関連表現型の原因遺伝子である可能性が高い。

### 2. 研究の目的

申請者らは、マウスの摂食行動を制御する新規遺伝子として、中枢の神経細胞で発現する機能未知の遺伝子 *Aobs1* (オーブ 1) を同定した。*Aobs1* の自然突然変異は、C57BL/6J の遺伝的背景で過食による肥満を惹起する。ヒト相同遺伝子 *AOBS1* の近傍には、GWAS により、肥満・脂質代謝異常の QTL が検出されている。本研究では、まず *Aobs1* を発現する神経細胞や神経細胞核、神経回路を同定する。次に、生化学的手法や免疫組織学的観察で、*Aobs1* 産物の化学修飾や相互作用するタンパク質を解析する。これらの解析を通して、*Aobs1* が摂食行動や肥満を制御する遺伝回路を解明し、*Aobs1* の中枢における機能を明らかにする。最後に、*Aobs1* 機能不全が遺伝的背景に依存して過食・肥満を発症するメカニズムを解明して、*Aobs1* 変異マウスを実験動物として確立することを目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究では、申請者らが発見した新規の摂食行動制御遺伝子 *Aobs1* の中枢神経系での機能と、その機能異常が過食・肥満を惹起するメカニズムを解明するため、以下の実験を行う。

(1) これまでの解析により、神経細胞マーカーの *NeuN* とレポーター遺伝子発現の共局在などから *Aobs1* が神経細胞に発現することを確認している。これを踏まえて、*Aobs1* が発現する神経細胞、神経核、神経回路の種類を免疫組織学解析などにより識別する。高感度で免疫染色に

利用できる抗体が作製できれば、神経細胞で発現する因子群との共局在を免疫組織学的に解析する。タンパク質タグを *Aobs1* タンパク質の任意の部位に、CRISPR-Cas9 によるゲノム編集技術により導入した遺伝子改変マウスを作製し、脳でのタグタンパク質を検出することで、*Aobs1* が発現する神経核や神経回路を解析する。

(2) コンソミック系統や遺伝子改変マウスなど、*Aobs1* 変異マウスを対象に、摂食行動制御に関わる神経核を含む脳部位を材料にして、NGS による RNA-seq 解析や既知の摂食行動制御関連遺伝子の qRT-PCR による遺伝子発現解析を行い、既知の遺伝パスウェイに属す遺伝子の発現変化を観察して、*Aobs1* 変異が影響する遺伝パスウェイを明らかにする。サンプルは *Aobs1* 遺伝子破壊および野生型、遺伝子発見の基になったコンソミック 13T、コントロールとして C57BL/6 および MSM/Ms 系統などから選択する。遺伝子発現解析を行う際は、週令、餌の種類などの飼育環境を変化させて採取したサンプルについても、既知の摂食制御遺伝子の発現動態を解析し、結果を相互作用因子探索の参考情報とする。一連の遺伝子発現解析により得られたデータの情報解析により、*Aobs1* 機能の作用点と既知の遺伝パスウェイに属す制御系の関連を明らかにする。

(3) (1) で作製した遺伝子改変動物などを使用して、*Aobs1* タンパク質の機能性修飾や細胞内局在、相互作用タンパク質を生化学的手法により明らかにする。

(4) *Aobs1* 遺伝子破壊および野生型、コンソミック 13T、B6 および MSM 系統を対象に、脳神経・摂食調節因子を投与して、*Aobs1* を発現する神経細胞の活動状態を観察して、それらの変化から、摂食関連の表現型を解析する。これにより、*Aobs1* の機能が、遺伝的背景に依存して加齢性肥満の発症に繋がるメカニズムを解明する。ヒト GWAS において脂肪蓄積、インスリン作用、2 型糖尿病、血中脂質濃度を定める量的形質遺伝子座 (QTL) の近傍に位置するヒトの *AOBS1* 遺伝子周辺の候補多型を収集しリスト化する。

(1) ~ (4) すべての結果を統合して、*Aobs1* の摂食行動制御に関わる中枢での機能の全貌と機能破綻による摂食行動異常のメカニズムを解明する。最後に、*Aobs1* の機能不全による表現型が遺伝的背景に依存する原因を究明し、*Aobs1* 変異マウスを実験動物として確立する。

#### 4. 研究成果

(1) 既存の抗 *Aobs1* 抗体は、組織免疫学的観察には向かないので、研究実施期間に 2 度、新たに複数の抗体を作製したが、いずれもウェスタンブロットによる検証で、シングルバンドを検出するなどの満足のいく結果を得ることができなかった。そのため、神経核に発現する因子群との共局在の解析は別の手法で行うことにした。次に、CRISPR-Cas9 によるゲノム編集技術によりフラッグタンパク質タグを *Aobs1* の C 末端側にノックインして作成したトランスジェニック

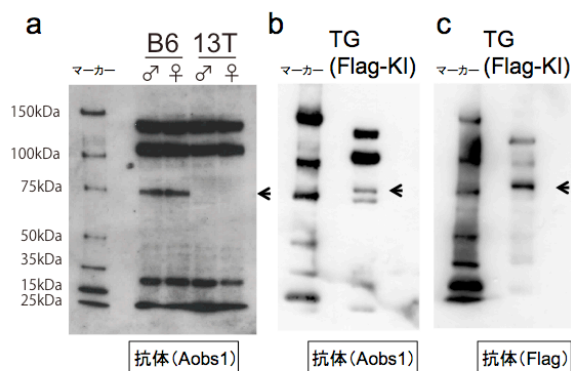


図2. Flagタンパク質タグを*Aobs1*タンパク質のC末端に導入した遺伝子改変マウス(Flag-KI)のヘテロ個体の脳組織を使用したウェスタンブロット解析。a) コンソミック13T、B6の*Aobs1*抗体による*Aobs1*タンパク質(矢印)の検出。b) Flag-KIを使用した、*Aobs1*抗体による*Aobs1*タンパク質(矢印)の検出。Flagタンパク質が付加したことにより、Flag付加アリの移動度が変化している。c) Flag-KIを使用した、Flag抗体によるFlagタンパク質(矢印)の検出。

マウスのライン化を行い、このトランスジェニックマウスラインの個体を使用して、脳組織におけるタグタンパク質の検出や、相互作用因子の探索を進めた。脳組織を使用してウェスタンブロットを行った結果を図2に示す。タグタンパク質は、図に示すように確認できたが、生体組織でのタンパク質の発現量が少ないためか、タグ抗体による免疫沈降が非常に困難であることが判明した。このため、現在、培養細胞に切り替えて解析を行ったが、残念ながら本研究の実施期間内に相互作用タンパク質を検出するには至らなかった。

(2) 研究期間内に、新学術領域研究

「先進ゲノム支援」による支援を受けて行った RNA-Seq 解析などにより、コンソミック系統や遺伝子改変マウスなど、*Aobs1* 変異マウスを対象に遺伝子発現解析を行い、摂食行動をはじめとした複数のパスウェイに属する遺伝子の発現変動を確認することができた。それらの遺伝子の発現動態は、飼育環境を変化させて採取したサンプルについても解析を行った。また、脳の *Aobs1* が発現する領域を対象にアイソフォームの分類 (亜種間差を含む) を一分子リアルタイム DNA シーケンサによる完全長 cDNA の解読 (Iso-seq: Isoform sequencing) などにより確認した。遺伝子発現解析結果の情報解析は、研究分担者である新潟大学工学部情報工学科、阿部貴志氏と共に行った。また、解析の一部は NIG DDBJ スパコンを利用した。結果の一例として、*Aobs1* 遺伝子破壊および野生型、およびそれらのヘテロ個体を使用して、発現に差があった遺伝子について、qRT-PCR 法により解析を行った結果を図3に示す。

*Aobs1* 遺伝子は、その破壊個体 ( $\Delta/\Delta$ ) で、遺伝子発現がほぼ観察できないことが確認できる。一方、摂食行動制御関連遺伝子 A は、*Aobs1* 遺伝子破壊個体で遺伝子発現量が高くなることが明らかになった。また、この傾向は、高脂肪食による飼育を行った個体で、一層顕著になることを見出した。このことは、脳内の摂食に関する神経核を含む領域で、摂餌の内容で *Aobs1* 遺伝子の発現量が変化すること。また、それに伴い摂食行動制御関連遺伝子 A も変動することが判明した。これまでの解析により、摂食行動制御関連遺伝子 A は血中レプチン濃度に関連したパスウェイに属する遺伝子であることが報告されているので、*Aobs1* 遺伝子破壊および野生型、およびそれらのヘテロ個体を使用して、レプチンの濃度に応答する神経核、あるいは神経細胞の反応を観察することで、*Aobs1* の機能の類推に役立てることができると考えた。

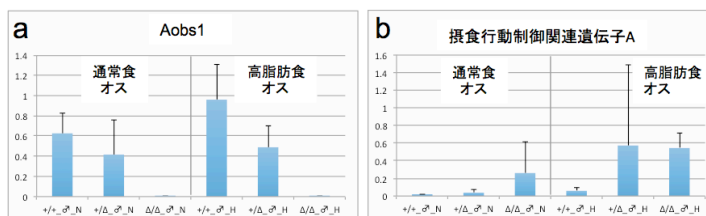


図3. *Aobs1* 遺伝子破壊 ( $\Delta/\Delta$ )、野生型 ( $+/+$ )、およびそれらのヘテロ ( $+/Δ$ ) のオスの脳組織を使用した定量PCRの結果。a) *Aobs1* 遺伝子発現、b) 我々が一連の遺伝子発現解析で確認した既知の摂食行動制御関連遺伝子の発現動態を示す。遺伝子発現はコントロールに対する相対発現量。各遺伝子について、左側は通常飼、右側は高脂肪食により飼育した個体の試料を使用した解析結果を示す。

(3) *Aobs1* の機能性修飾や細胞内局在、相互作用タンパク質を生化学的手法により明らかにする研究は、(1) で作製したタグタンパク質発現動物を用いた研究の困難性により、現在も継続しているが、本研究の実施期間内に十分な結果を得ることができなかった。

(4) (2) の結果を受けて、*Aobs1* 遺伝子破壊および野生型、およびそれらのヘテロ個体を使用して、絶食後に腹腔内にレプチンを投与して、図4に示す摂食行動に重要な神経核を対象にして、*Stat3* のリン酸化の検出による細胞の活性化を免疫組織化学的観察により解析した。コントロールとして、生理的食塩水を投与した場合は、*Aobs1* 遺伝子破壊および野生型の *Stat3* のリン酸化状態に差が見られなかったが、レプチンを投与した際に、図中の ARC、VMN、DMN あるいは PVN の *Stat3* リン酸化状態が異なる可能性を示した。これは、今後別の手法でも検証する必要がある。

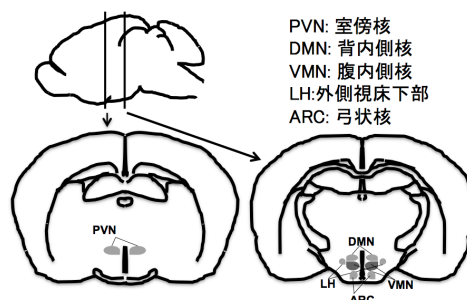


図4. レプチン投与によるリン酸化Stat3を観察した神経核(マウス)

以上、申請期間中に、(1) ~ (4) の研究計画について、すべての計画を滞りなく行えたわけではないが、一連の解析により *Aobs1* の機能を総合的に検討したところ、マウスの *Aobs1* は中枢で機能して、摂食行動における脳内の特定の神経核において、レプチンシグナルの伝達に関わる機能を有する可能性が非常に高いことが示唆された。今後、本申請研究により得た結果を論文発表により報告するとともに、*Aobs1* 変異マウスを過食による肥満研究のための実験動物として、研究コミュニティに普及させる。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 7 件)

- 高田豊行「遺伝子発現解析から表現型の加齢性変化を予測する」国立遺伝学研究所研究会「マウス遺伝学・温故知新」2019年3月15日、三島
- 高田豊行「マウス・ミシマバッテリーのゲノム情報を利活用した体質遺伝学研究」モロシヌス研究会2018年6月22日-23日、札幌
- 高田豊行「NIG\_MoG: マウス亜種間ゲノム多型を探索するナビゲーター」日本実験動物学会、2018年5月16日-18日、富山
- 高田豊行「ミシマバッテリーを利用した体質関連遺伝子探索」モロシヌス研究会2017年6月23-24日、熊本
- 高田豊行、城石俊彦「日本産野生由来マウス系統 MSM/Ms を用いた多因子肥満症の遺伝解

析」第31回日本糖尿病・肥満動物学会 年次学術集会、2017年2月10-11日、横浜

6. 高田豊行、近藤伸二、矢坂 拓、阿部貴志、清澤秀孔、鈴木 穰、豊田 敦、藤山秋佐夫、城石俊彦「エネルギー代謝表現型の亜種間差に関わる遺伝子発現動態の探索」日本遺伝学会 第88回大会、2016年9月7-10日、三島
7. 高田豊行、福多賢太郎、野口英樹、豊田敦、山崎由紀子、藤山秋佐夫、城石俊彦「マウス野生由来系統群「ミシマバッテリー」のゲノム解読と体質関連遺伝子探索への利用」第63回日本実験動物学会総会、2016年5月18-20日、川崎

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0件)

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

○取得状況 (計 0件)

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

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：阿部 貴志

ローマ字氏名：(ABE, Takashi)

所属研究機関名：新潟大学

部局名：自然科学系

職名：准教授

研究者番号 (8桁)：30390628

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。