

平成21年5月21日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2005～2008
 課題番号：17380120
 研究課題名（和文） 網羅的プロオーム及びトランスクリプトーム解析による成長と早死に関する研究
 研究課題名（英文） Studies of growth and death for GH transgenic amago using proteome and transcriptome analysis.

研究代表者
 森 司 (MORI TSUKASA)
 日本大学・生物資源科学部・准教授
 研究者番号：60241379

研究成果の概要：GH 遺伝子組み換えサケの脳下垂体においては GH の発現だけでなく、翻訳関連タンパク質は減少する。一方でアポトーシス関連タンパク質の発現は増大した。また GH 遺伝子組み換えサケ脳下垂体で発現変動していたタンパク質は機能ネットワークを形成し、転写・翻訳や細胞増殖機構などに関与していることが推定された。MT-B のような constitutive なプロモーターで GH を発現させると脳下垂体は機能を失う方向で退化していくことが明らかになった。脳下垂体で特異的に遺伝子発現を誘導しているプロモーター(GH 遺伝子プロモーター)を使っても形質転換体は大きくならないことと上記の結果から、形質転換体の肥大は脳下垂体による制御システムと直接関係していないことが推察された。脳下垂体が退化(機能低下)を起こしてしまうと、GH 以外の下垂体ホルモンの分泌も正常に行われなくなることから、代謝や免疫系を始めとした下垂体ホルモンによる恒常性維持機構や生殖系に異常が起き、それが GH 遺伝子組み換え個体の異常な表現型と関連していることが推察された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	3,800,000	0	3,800,000
2006年度	8,400,000	0	8,400,000
2007年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008年度	600,000	180,000	780,000
年度			
総計	15,100,000	870,000	15,970,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：GH 遺伝子組み換えアマゴ、トランスクリプトーム、プロテオーム

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物において、成長制御の中心的な役割を担うホルモンが成長ホルモン(Growth Hormone;GH)である。GH は脳下垂体前葉から合成・分泌され、筋肉、骨、軟骨に直接、もしくはインスリン様成長因子 I (IGF-I)を介して作用することで細胞増殖や細胞分化を引き起こし、成長を促す。GH の働きは成

長促進作用だけではなく、全身の諸臓器に働き、タンパク質・脂質・炭水化物やミネラルなどの代謝や水、電解質の調整、脳、心臓、免疫機能やアポトーシスの制御にまで関わる。そのため GH は生涯に渡り分泌され、恒常性を維持する重要な機能を担っている。例えば、ヒトでは GH が不足すると成長障害が起きるだけでなく、体脂肪の増加や骨量の低

下、さらにはうつ病や性欲低下などの影響が起きることが知られている。

GH を合成・分泌する脳下垂体は個体の恒常性維持や成長、生殖の制御を行う内分泌器官である。脳下垂体は上皮組織由来の内分泌腺と間脳由来の神経が融合した器官で、数種類の下垂体ホルモンの合成分泌を行い、それらホルモンの分泌のバランスを調節することで様々な生理現象を制御している。脳下垂体からのホルモンの分泌は、分泌されたホルモンのフィードバック制御や視床下部の調節をうけている。そのため、脳下垂体腺腫などによりこの調節が適切に行われない場合、ヒトでは糖尿病、高血圧、高脂血症、動脈硬化、心血管障害などの合併症を伴い寿命の低下が引き起こされる。また、最近では、脳下垂体は日長の変化を体内に伝える体内カレンダーの役割を担い、季節性繁殖を行う動物において極めて重要な器官であることが報告された。このように、脊椎動物において、脳下垂体のホルモン分泌調節と個体の生存とは密接に関係することが示されている。

GH の機能を解析する手法として、GH 遺伝子組換え(Transgenic; Tg)動物が用いられてきた。Tg 技術は様々なプロモーターと目的遺伝子を連結することで、異所的(ectopic)あるいは同所的に目的遺伝子を発現させることが可能なため、目的遺伝子の過剰発現(あるいは抑制)によって遺伝子の生体機能を明らかにする為の技術として汎用されている。また、産業生物では有用形質(成長性、耐病性など)を付加させるために Tg 技術は利用されており、GH の機能解析に加え成長性向上の目的から GHTg 動物はマウス、ラットやゼブラフィッシュなどのモデル生物だけでなく、ヒツジやサケ、ティラピアなどの産業動物まで幅広い種で作製されている。このような GHTg 動物は非組換え体と同量の餌の量でより大きく成長するなど産業上の利点があるが、一方で非組換え体よりも斃死率が高いという問題がある。これは上記の GH の持つ多様な機能が GHTg 動物の表現型にでることに起因していると考えられている。例えば、形態異常は GHTg 動物の特徴的な表現型で、骨の変形や内部組織の肥厚により顔や四肢末端の肥大が起きる。その他、脂質代謝の変化さらには生存率や繁殖率の低下がみられるなど GH の過剰産生による負の影響が GHTg 動物で報告され、これらの表現型は GH が過剰に産生されることで起こるヒトの先端巨大症でも報告されている。

2. 研究の目的

本研究では、ベニザケのメタロチオネイン B(MT-B)プロモーターにギンザケの GH 構造遺伝子を連結した DNA をサケ科魚類の一種であるアマゴ (*Oncorhynchus masou*

isikawae)に導入することで作製した GHTg サケを用いた。この GHTg サケは MT-B プロモーターによって脳下垂体以外にも様々な器官で GH が発現することによって非組換え体と比較して 4~5 倍の成長促進作用を示す。一方、稚魚から幼魚期にかけての特に斃死率が高くなることなど GHTg 動物に特徴的な表現型がみられた。加えて、吻部形態の変化や腸上皮の肥大成長がみられ、さらに本来 GH を産生する器官である脳下垂体は同じサイズの非組換え体と比較すると著しく収縮することが観察された。このことから遺伝子組換えによる、異所的な GH の過剰発現が重要な内分泌器官である脳下垂体にどのような影響を与え、それが GHTg サケの表現型とどのように関連しているかを明らかにするために、脳下垂体に着目して iTRAQ 法によるプロテオーム解析とマイクロアレイによるトランスクリプトーム解析を行った。

GHTg サケは産業上注目されている動物であるが、Omics 解析は哺乳類に比べ報告は僅かである。加えて脳下垂体は生存や生殖に重要な器官であることから GHTg サケを飼育・繁殖する際に有用な知見を得られる可能性が高いが、脳下垂体が微小な器官(ヒトでは脳重量の 0.01%)であるために発現している分子の網羅的解析研究の報告はない。加えて、魚類は脳下垂体による内分泌制御機構を進化上最初に獲得した生物であり、魚類にしかない脳下垂体ホルモンもあるなど、産業利用だけでなく、進化生物学や比較生理学などのさまざまな面からも GH(の過剰発現)と脳下垂体の関係を研究する意義は大きい。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

ベニザケ MT-B プロモーターにギンザケ GH1 の構造遺伝子を連結した遺伝子をアマゴの受精卵にマイクロインジェクションして、GHTg 個体を作製した。この個体を独立行政法人水産総合研究センター養殖研究所において飼育し、遺伝子導入の確認および系統の維持は Devlin らの方法に従った。飼育は閉鎖水槽でアマゴの標準的な飼育方法に準じ、日長条件は自然光と同じにした。

(2) マイクロアレイによる脳下垂体発現 RNA の解析

サブトラクション法により GHTg(Hetero)の脳下垂体で発現増加もしくは減少している mRNA を選択的に抽出し、1915 遺伝子を選抜した。ひとつの遺伝子につき 3 スポットを固定化した cDNA チップを作製した。サンプルの標識を Cy5 および Cy3 で行い、このチップを用いた 2 色法によるマイクロアレイ解析により、GHTg で発現が増加もしくは減

少している遺伝子のプロファイリングを行った。測定結果を LOWESS 正規化し、Cy5、Cy3 いずれかの蛍光を確認できたスポットを脳下垂体発現遺伝子とした。この遺伝子に unpaired t-test を行い、Tg/cont の発現比が 1.5 倍以上もしくは 1/1.5 以下でかつ p 値が 0.05 以下の遺伝子を“Tg で発現変動していた遺伝子”とした。また、これらの遺伝子に対し特徴的な生物機能を抽出するために Maudsley らの手法に従い Gene Ontology のアノテーションを行った。

(3) iTRAQ 解析

一度に 4 群のプロテオームの比較定量が iTRAQ 解析では可能なことから、未成熟個体の GHTg Homo、Hetero、非組換え体;Non-Tg からそれぞれ脳下垂体を摘出し、Ando らの培養条件で、脳下垂体の器官培養を行った。また、血中に過剰量の GH があることで発現するタンパク質を検出するために Non-Tg は GH の添加群 (Non-Tg+GH) と非添加群 (Control) に分けて培養を行った。これらの群と GHTg 群のプロテオームを比較することで、GHTg 個体で発現が増減するタンパク質だけでなく、過剰な GH が存在することだけでは発現せずに GH 遺伝子を組換えた場合、すなわち GHTg 個体特有に発現するタンパク質が存在するか否かを検討することもできると考えた。以下の実験では各実験群の血中 GH の濃度は Non-Tg+GH = Homo>Hetero>Non-Tg (Control) と設定(仮定)した。それぞれの群の脳下垂体 (n=20) から可溶化緩衝液を用いて抽出したタンパク質を超遠心、限外濾過により精製、脱塩後、還元アルキル化およびトリプシン消化を行い、4 種類の iTRAQ タグ(114~117)を 4 群の脳下垂体ペプチドに標識をした (114:Non-Tg;control,115:Homo, 116: Hetero,117:Non-Tg+GH)。標識後、4 サンプルを混合し、陽イオン交換カラムと逆相カラムを用いた 2D nanoLC システムで分離し、ダイレクト nanoLC/MALDI プレートスポットティングシステムを用いてターゲットプレートにスポットした。プレート上の各スポットを MALDI TOF/TOF MS (ABI,4800)により測定した。測定した結果を GPS Explorer および Protein Pilot ソフトウェアを用いて、4 群の iTRAQ 量比の標準化および、タンパク質の同定を行った。ソフトウェアの統計解析条件を満たしたタンパク質のみをクラスター解析に用いた。

(4) 発現変動タンパク質の動態解析とタンパク質間相互作用のネットワーク解析

同定および定量した脳下垂体ペプチドの中から、実験群のいずれかでコントロールより iTRAQ 比が 1.25 倍以上または 0.8 (1/1.25) 倍以下のタンパク質を“発現に変化があった

タンパク質”とした。条件に該当したタンパク質を Gene Cluster を用いてピアソン相関解析による発現傾向に基づいた階層型クラスタリングを行った。クラスター毎に特徴的な生物機能を抽出するために遺伝子と同様の手法で Gene Ontology のアノテーションをクラスター毎に行った。また、これらのタンパク質の中から、GH の過剰発現と関係があるタンパク質を絞りこむために Grosserr らの手法によりタンパク質間の相互作用解析を行った。

4. 研究成果

(1) マイクロアレイによる脳下垂体発現 RNA の解析

脳下垂体 cDNA チップ上の 5745 スポット (1915×3 遺伝子)のなかで約 30%にあたる 1690 スポットが今回の実験で発現していたと考えられた。このなかで Tg 個体において有意(p<0.05)に“発現変動”(発現量が 1.5 倍以上もしくは 1/1.5 倍以下)があった遺伝子は 148(既知遺伝子,101;EST,37)スポットあり、発現遺伝子全体の約 10%が発現変動していた。既知遺伝子中で発現が増加していた 18 (16.8%) スポットに対し、発現が減少していた遺伝子は 84 (83%) スポットであり、発現変動している遺伝子のほとんどは発現が減少していた。Tg で発現が上昇していた遺伝子は脳下垂体ホルモンの一つである Prolactin(PRL,1.9 倍)や PRL と GH の転写因子である Pit1(1.7 倍)、ストレス応答遺伝子 Tar binding protein(1.5 倍)、ferritin(1.7 倍)、解糖系酵素リンゴ酸デヒドロゲナーゼ(1.7 倍)など一部の遺伝子であった。一方で Tg で減少している遺伝子は増殖マーカー遺伝子 PCNA(0.4 倍)やアポトーシス抑制遺伝子 Nampt(0.3 倍)など細胞増殖を制御するものやリボソームの合成、成熟化に関わる nucleolin(0.3 倍)などの遺伝子が含まれていた。また、脳下垂体から分泌される多くのホルモン (PRL 以外 GH,GTH,TSH,SL,POMC) は Non-Tg と同じ、もしくは大きく減少(~0.1 倍)していた。これらの発現が変化している遺伝子を用いて Gene Ontology 解析を行い脳下垂体の表現型とどのように関係しているかを推定したところ、細胞増殖や mRNA の転写制御あるいはタンパク質の生合成のように細胞の生存に直接関わるものが多く含まれていることが分かった。

(2) iTRAQ 法による比較定量プロテオーム解析

脳下垂体ペプチドを iTRAQ タグで標識し、分画したものを MS/MS 測定したところ、45,305 のスペクトルが測定され、2,345 種類のタンパク質が同定された。そのうちの約 10%にあたる 188 種類のタンパク質が Homo,

Hetero, Non-Tg+GH の実験群いずれか(もしくはすべて)で発現変動がみられた。これらの脳下垂体タンパク質の中で過剰添加 GH もしくは GH 遺伝子組換えと関連がより深いものを推定するために、実験群間と Non-Tg で発現変動の傾向に基づいて階層型クラスタリングを行った。Homo、Hetero の GHTg 間が最も近接してクラスタリングされ、その外側に Non-Tg+GH、さらに最も外側に Control (Non-Tg)が配置されたことから、変動タンパク質の発現傾向は Homo および Hetero の遺伝子組換え体が Non-Tg+GH より近いことが示された。また、Homo 個体で発現しているタンパク質の中で Non-Tg+GH と発現傾向が類似して、Hetero 個体で発現しているタンパク質とは発現傾向が異なるクラスター(A,E,F)に属しているタンパク質は GH 遺伝子を組換えることで発現するわけではなく、過剰な GH 添加によりで発現するタンパク質の候補とした。クラスターAには DEAH (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 57や A-Raf などの転写制御に関わるタンパク質が、クラスターEには ribosomal protein S20 や asparaginyl-tRNA synthetase、Hsp40、eIF3 などタンパク質の翻訳およびタンパク質への機能付加に関わるタンパク質(シャペロン、修飾酵素)がグループ化され、遺伝子解析の結果同様、転写制御あるいは翻訳関連タンパク質が GH と関係していることが示唆された。加えて、GH はこのクラスターEに含まれていたことから、Tg、Non-Tg+GH のいずれの群でも減少していることが示された。また、クラスターFには MIF などのアポトーシス抑制タンパク質が含まれていた。また、クラスターCは GHTg と Non-Tg+GH とで発現傾向が異なっていることから、このクラスターC群の GH 遺伝子を組換え個体でより強く発現するタンパク質の候補とした。プロテオーム解析の結果選抜された 188 種類の発現変動タンパク質は 3 群共に Non-Tg に比べ減少しているものが多く、遺伝子解析の結果と同じく、発現が変動していたタンパク質は発現が抑制されているものが多い傾向であった。また、各タンパク質の Non-Tg に対する発現比は 3 群とも 3 倍以内に抑えられ、遺伝子の変化比は 10 倍ほど変化していたものがあつたことと比較すると、タンパク質の発現変動は遺伝子より小さく抑えられていた。

(3) 解析データの評価 1: 発現変動タンパク質の動態解析

クラスター毎に特徴的な Gene Ontology が存在するかを調べるため、各クラスターに分類されたタンパク質の biological function と molecular function を調べた結果、各クラスターに特徴的な機能を推定することができた。

(4) 解析データの評価 2: タンパク質間相互

作用ネットワーク解析

実験群(Homo, Hetero, Non-Tg+GH)のいずれかにおいて発現変動がみられた 188 種類のタンパク質間相互作用ネットワーク解析の結果、65.9%にあたる 124 種類のタンパク質が 16 のタンパク質間ネットワークを形成した。

<考察>

魚類において、過剰 GH が脳下垂体に及ぼす影響、逆に脳下垂体がホルモン量の異常にどのように対応するかを明らかにするためにマイクロアレイおよび iTRAQ 法による比較定量トランスクリプトーム解析とプロテオーム解析を行った。

マイクロアレイの結果、GHTg 個体で発現変動している遺伝子は細胞の増殖の制御に関与する遺伝子が挙げられ、増殖能の低下もしくはアポトーシスの活性化を示唆する結果になった。また、転写、翻訳関連遺伝子の発現低下に加えて PRL 以外の脳下垂体ホルモンは発現が減少していた。これらホルモンは脳下垂体の転写産物の多くを占める報告から、GHTg 個体から抽出した脳下垂体の転写翻訳機能が非組換え個体に比べ低下していることが推測された。

一方、プロテオーム解析の結果でも PRL 以外のホルモンの発現低下がみられた。さらに、クラスターA,E,F などの過剰な GH によってタンパク質発現の影響を受けることが予測されたタンパク質群にアポトーシス関連を始めとした細胞増殖あるいは転写、翻訳関連タンパク質が多く含まれていた。これら二つの実験結果から、(遺伝子組換えによって異所的に発現する)過剰な GH によって、脳下垂体の機能が低下(退化)していくことが示唆された。一方、脳下垂体特異的なプロモーターで作製した GHTg サケは非組換え体と成長が変わらないという報告があるが、本実験で使用した MT-B のように様々な組織で恒常的に発現するプロモーターで作製した GHTg サケでは脳下垂体を介した GH 制御機構と関係なく GH が生産されることで脳下垂体の機能低下が起きていると考えられる。

発現変動があつたタンパク質同士の相互作用をネットワーク解析で調べた結果、iTRAQ 解析で発現が変動していたタンパク質の約 7 割が変動タンパク質同士で相互作用を持つことが明らかになった。例えば Akt-caspase 経路とその関連タンパク質がネットワークを形成していた。Akt の活性化はアポトーシスを抑制し、細胞増殖を亢進させることが知られている。(A)中にアポトーシスを抑制する HSPA8 や DNAJB11 などが含まれていたが、これらのタンパク質は実験群(Tg, Non-Tg;GH)で減少していた。このことから、ネットワーク解析の結果からも Tg、Non-

Tg+GH の脳下垂体において細胞増殖の抑制やアポトーシスが起きていることが示唆された。また、他のネットワーク中から予測される生物機能には脂質代謝や腸管の異常など GHTg 動物で報告があるものに加え翻訳後修飾、核酸の代謝など本研究の iTRAQ 解析から新たに得られた機能も含まれていた。以上の結果から iTRAQ 解析で得られた変動タンパク質の大半は互いに関連をもち、これらのタンパク質の相互作用によって表れる生物機能は GH によって影響を受ける可能性をもつことが示された。また、16 のネットワークの内、相互作用しているタンパク質の種類が多い 2 つのネットワークに脳下垂体ホルモンは含まれていた。これらのネットワークから抽出された生物機能は GHTg サケの表現型と密接に関係していた。この結果は GH により他の脳下垂体ホルモンの発現は影響を受け、それが GHTg 動物の表現型に大きく関与していることを示唆している。したがって過剰な GH によって脳下垂体が退化(機能低下)を起こしてしまうと、GH 以外の下垂体ホルモンの分泌も正常に行われなくなることから、代謝や免疫系を始めとした下垂体ホルモンによる恒常性維持機構や生殖系に異常が起き、それが GHTg 個体の異常な表現型と関連していることが推察された。また、実験群における脳下垂体ホルモンの発現傾向は GH 細胞の異常増殖、GH の過剰分泌が原因でおこる先端巨大症患者者に似ていたことから、GH の過剰分泌に対する脳下垂体の反応は魚類からヒトまで保存されている可能性がある。また、上記の Akt-Caspase 経路以外に STAT5a/b や Ras を介した転写制御やなど細胞株を用いて明らかにされた既知の GH の細胞内シグナル伝達経路がネットワーク解析から複数得られた。脳下垂体でも GH の濃度などに合わせ複数の GH シグナル伝達経路を使い分けていることが予測される。

一方 Non-Tg+GH では発現が変化しない、組換え体独自に発現変動するタンパク質群も得られた。ただし、組換え体だけで産生されるタンパク質は測定できなかった。このことから、少なくとも脳下垂体では、GH を外から過剰量添加しても遺伝子組換えにより GH を過剰発現させても、GH の濃度によって発現変動を受けるタンパク質の発現量は異なるが発現する種類は変わらないことが示された。

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 1 件)

① Tsukasa Mori, Ikuei Hiraka, Youichi Kurata, Hiroko Kawachi, Nobuhiro Mano, Robert H. Devlin, Hiroyuki Nagoya, Kazuo Araki. Changes

in hepatic gene expression related to innate immunity, growth and iron metabolism in GH-transgenic amago salmon (*Oncorhynchus masou*) by cDNA subtraction and microarray analysis, and serum lysozyme activity. *General Comparative Endocrinology*, 151,42-54 (2007). (査読あり)

[学会発表] (計 1 件)

① T.Mori, I.Hiraka, Y.Kurata, R.H.Devlin, H.Nagoya, and K. Araki Changes in hepatic gene expression related to innate immunity, growth and iron metabolism in GH-transgenic amago salmon (*Oncorhynchus masou*) cDNA subtraction and microarray analysis. 5th World Fisheries Congress in Yokohama Japan October 20-24,(2008).

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 肝細胞の遷移芽様細胞への変化に関与する新規遺伝子

発明者: 森 司 杉山 学

番号: 特願 2008-018920

出願年月日: 平成 20 年 1 月 30 日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 司 (MORI TSUKASA)

日本大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号: 6 0 2 4 1 3 7 9

(2) 研究分担者

平野 久 (HIRANO HISASHI)

横浜市立大学・木原生物学研究所・教授

研究者番号: 0 0 2 7 5 0 7 5

(3) 連携研究者