

令和 元年 8 月 30 日現在

機関番号：82708

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2016～2018

課題番号：15KK0288

研究課題名（和文）魚類レプチンが持つ有用機能を解明する（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）Exploring the functions of leptin in fish(Fostering Joint International Research)

研究代表者

村下 幸司 (Murashita, Koji)

国立研究開発法人水産研究・教育機構・増養殖研究所・主任研究員

研究者番号：60597649

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 10,500,000円

渡航期間： 11ヶ月

研究成果の概要（和文）：効率的に魚類を養殖するには、魚類の摂食や栄養素利用の調節機構に着目した技術開発が有効と考えられる。そのための基盤研究として、ほ乳類において摂食や代謝に重要な役割を持つレプチンについて、魚類での機能を明らかにすることを目的とした。モデル魚（ゼブラフィッシュ）を用いてゲノム編集を行い、レプチン受容体欠損魚(lepr KO)を作出した。栄養素（タンパク質）投与後の各種遺伝子発現解析の結果、作出したlepr KO魚は野生型と比較して、栄養素の認知・吸収が効率的に行われていることが示唆された。魚類レプチンの機能については未解明な点が多く、本研究で作出した遺伝子欠損魚を用いたさらなる解析が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ほ乳類では「レプチン」の作用を抑えると、食欲が旺盛となり良く育つことが知られている。このレプチンによる生育成魚の機構を魚にも応用することで、より効率的な養殖が可能になると考えられる。魚類におけるレプチンの役割にはまだ不明な点が多いが、本研究によってレプチンの作用を持たないモデル魚の作成に成功した。今後、この魚を詳しく調べることで、魚類におけるレプチンの作用の解明が期待できる。

研究成果の概要（英文）：Leptin is a well-known peptide hormone that regulates appetite and energy metabolism in mammals whereas the function of leptin in fish is still obscure. In this study, leptin receptor knock-out (lepr KO) zebrafish was generated using CRISPR/Cas9 system. Gene expression levels of nutrient sensors and transporters of the lepr KO fish were higher than those of wild type after oral administration of single bolus of protein. The generated lepr KO fish will be a powerful tool to reveal the function of fish leptin in the further.

研究分野：魚類栄養生理

キーワード：レプチン レプチン受容体 ゼブラフィッシュ ゲノム編集

1. 研究開始当初の背景

(1)魚類養殖では世界的な生産量増大のためエサ原料が不足し、飼料価格の高騰や品質(摂餌性)の低下等の問題を抱えている。そのため飼餌料を効率的に利用する技術の開発が求められている。

(2)レプチンは遺伝性肥満マウスの病因子として発見されたホルモンで、受容体を介して強力に食欲を抑制する(Zhang et al., Nature, 1994)。また、摂食調節に加え、代謝調節等の広範かつ重要な生理作用を有することが哺乳類では知られている。一方、魚類のレプチンは哺乳類との相同性が極めて低く、また産生部位・挙動が異なることから、哺乳類と同様な機能を有するかは不明であった(Kurokawa et al., Peptides, 2005)。近年になり、魚種特異的な組換えレプチンの投与実験(Murashita et al., CBP, 2008)やレプチン受容体欠損魚(*lepr* KO)を用いた研究(Chisada et al., GCE, 2014)により、魚類においてもレプチンが摂食や代謝に重要な機能を有することが明らかにされつつある。しかし、効率的な魚類養殖へ向けた重要因子として着目され始めているものの、その機能の詳細は依然不明である。

(3)これまでに魚類で遺伝子欠損体を作成する方法として、ENU(N-ethyl-N-nitrosourea)等の化学薬剤を用いて点変異を導入する手法(TILLING法: Targeting Induced Local Lesions In Genomes)(Taniguchi et al., Genome Biol, 2006)が知られていたが、大変な労力がかかる上に求める変異体を得られるかどうか不確実であった。一方、近年それに変わる新たな手法として、CRISPR/Cas(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/Cas)を代表とする人工制限酵素を用いたゲノム編集技術が開発され、魚類においてもごく簡単に目的遺伝子を破壊することが可能になった(Ansai et al., Biology Open, 2014)。

2. 研究の目的

基課題では、メダカを用いて魚類レプチンの機能解析を行っている。しかし、メダカ一種のみの解析から魚類全般におけるレプチン機能を推定することは困難であり、将来的に多様な養殖対象魚への応用を考慮すると研究対象種を増やす必要がある。一方、ノルウェーは水産養殖分野で先進的な研究を行っており、特にノルウェー・ベルゲン大学では魚類栄養生理の研究を推進している。そこで、本課題では魚類全般におけるレプチン機能の解明を進めるために、ベルゲン大学においてメダカとの比較研究に適したゼブラフィッシュを用いてレプチンの機能解析を行うとともに、日本・ノルウェーの2国間で養殖技術開発に向けた協力体制を築くことを目的とした。

3. 研究の方法

基課題で対象とするメダカ(ダツ目:サンマの仲間)に加え、遺伝的に離れたゼブラフィッシュ(コイ目:コイの仲間)を研究対象とすることで、レプチンについて魚類全体に共通した機能と種固有の機能とを明らかにすることができる。そこで本研究ではゼブラフィッシュを用いて(1)レプチン受容体欠損魚(*lepr* KO)を作成し、(2)その栄養素利用や代謝に関する表現型を解析した。

(1) レプチン受容体欠損(*lepr* KO)ゼブラフィッシュの作出

ここでは、魚類全体のレプチン機能を明らかにするための強力な研究ツールとして、レプチン受

容体が欠損したゼブラフィッシュの作出を試みた。近年、TALEN や CRISPR/Cas 等を用いたゲノム編集技術が開発され、これまでは困難であった標的遺伝子の欠損魚作出が可能になっている。本研究においてもゼブラフィッシュ *lepr* の機能解析を目的に、CRISPR/Cas システムを用いた遺伝子欠損魚の作出を試みた。まず、データベースより入手した配列を基に 3 種の sgRNA を作製し、Cas9 mRNA と共に 1 細胞期の受精卵へ顕微注入することで変異導入を試みた。HRM 法 (High-Resolution Melting analysis) によって変異導入効率を確認し、最も効率よく変異が導入された sgRNA を用いて F0 変異導入個体を作成した。ここで作成した変異導入個体はモザイク様に複数の変異を持つことから、野生型 (wt) と掛け合わせた F1 の標的ゲノム配列を読むことで、単一の変異 (機能欠損が予想される変異) をヘテロに有する個体を単離した。さらに単離したヘテロ変異個体同士を掛け合わせることで *lepr* 変異遺伝子をホモに持つ *lepr* KO ゼブラフィッシュを作成した。

(2) *lepr* KO ゼブラフィッシュの表現型解析

ここでは、*lepr* KO ゼブラフィッシュの表現型解析として、代謝活性、栄養特性および栄養素利用に関する実験を行った。

(2)-1 代謝活性

本実験では、*lepr* が欠損することによってゼブラフィッシュの代謝量に違いが現れるかを確認するため、卵および孵化仔魚における呼吸量 (酸素消費量) を測定した。呼吸量の測定には、非接触センサーを用いた光学式酸素モニター (FireSting O₂, Pyroscience, Germany) を使用し、28 °C の一定温度下で密閉式バイアル内にて行った。

(2)-2 栄養特性

lepr KO および wt のゼブラフィッシュの間に栄養特性の違いがあるかを確認するため、栄養組成が異なる 2 つの飼料を用いて、予備的な検討を行った。ゼブラフィッシュ用市販飼料をベースとした、高蛋白/低脂質飼料 (HP/LL) および低蛋白/高脂質飼料 (LP/HL) を設計・作成し (Sparos, Portugal), ゼブラフィッシュが摂餌を開始する受精後 5 日から受精後 5 週間の間まで給餌試験を行った。試験期間中に 5 回サンプリングを行い、その時点での体長・体重を確認すると共に呼吸量を測定した。呼吸量の測定には上記 (2)-1 と同じ方法を用いた。

(2)-3 栄養素利用

ここでは、*lepr* 遺伝子の欠損が栄養素の利用効率に及ぼす影響を調べるため、タンパク質の経口投与後における栄養素認知・吸収に関わる各種遺伝子発現を調べた。すでに摂餌を開始している受精後 8 日齢の魚を供試魚とし、チューブ・フィーディング法を用いてラクトアルブミン加水分解物 (1 %, 5 % および 15%) を投与した (図 1)。投与後 1 および 3 時間後にサンプリングして RNA later にて固定保存した。サンプルは頭部および尾部を除去し、消化管を含む部分のみを遺伝子発現解析に用いた。



図1. ゼブラフィッシュ仔魚への栄養素投与実験

4. 研究成果

(1) レプチン受容体欠損(*lepr* KO)ゼブラフィッシュの作出

sgRNA を顕微注入した受精卵から得た個体 (F0) での変異導入効率は 94 %であった (図 2)。また、変異導入が確認された個体から次世代 (F1) への変異伝達率は 91 %であった。得られた F1 の中から、標的領域のシーケンスによりヘテロ変異個体を選別し、さらにそれを掛け合わせることで *lepr* 変異遺伝子をホモに持つゼブラフィッシュを作出

した。本研究によって作出した変異体は、16 塩基挿入によるフレームシフト変異によってリガンド結合領域以後が翻訳されないものであり、完全な機能欠損が予想される。

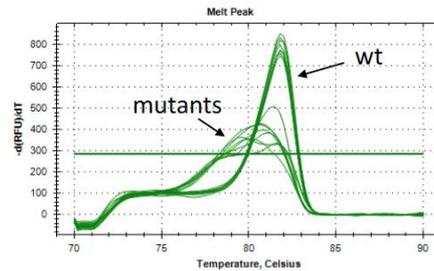


図2. HRM解析による変異導入の検出

(2) *lepr* KO ゼブラフィッシュの表現型解析

(2)-1 代謝活性

lepr KO 魚と wt 魚で卵および孵化仔魚における呼吸量 (酸素消費量) を比較した結果、受精後 29 時間では両者に差はみられなかったが、52 時間および 76 時間後には *lepr* KO 魚において高い酸素消費が確認された。しかし、受精後 100 時間ではその差が無くなり、124 時間後には逆に野生型魚で *lepr* KO 魚よりも高い酸素消費がみられた。*lepr* KO 魚は受精後 52 および 76 時間では、より活発な卵黄吸収と栄養代謝を行っていたことが示唆される。一方、124 時間後に酸素消費量が低くなったのは、卵黄吸収が wt 型よりも早く終了してしまったことで栄養代謝に起因する酸素消費が減少したためであるのかもしれない。

基課題で行ったメダカの場合は *lepr* KO 魚で僅かに呼吸量の低下がみられ、今回のゼブラフィッシュの結果とは異なった。現状ではこの違いが試験的な誤差 (魚のバッチの違い) による可能性も否定できないことから、今後、本結果を再検証すると共に、卵黄サイズの測定も必要と考える。

(2)-2 栄養特性

栄養特性の違いを調べることを目的とし、栄養組成が異なる飼料 (HP/LL および LP/HL) にて予備的な飼育試験を実施した。しかし、試験区とは関係なく全体の斃死率が高く、また生残した魚の多くも奇形を示した。奇形を示さなかった個体についても成長の遅延がみられた。これらは、調整した飼料がゼブラフィッシュの初期飼料として適さなかったためと推察される。今回の結果を受け、ベルゲン大学では受精後 2-3 週程度の稚魚で給餌試験を行うことを検討している。

(2)-3 栄養素利用

lepr KO 魚と wt 魚で栄養素の利用能力に違いがあるかを見るために、チューブ・フィーディング法によるタンパク質 (ラクトアルブミン加水分解物) 投与実験を実施した。その結果、*lepr* KO 魚では、タンパク質の投与によって腸管でのペプチド輸送体 (*pept1a* および *b*) や栄養素受容体 (*casr*, *t1r1*, *t1r2-2* および *t1r3*) の遺伝子発現が増大した。ゼブラフィッシュでは *lepr* 遺伝子が欠損することで栄養素 (タンパク質) の認知・吸収が効率的に行われていることが示唆される。

本試験で使用したチューブ・フィーディング法は、世界でも共同研究先機関であるベルゲン大学の Ivar Rønnestad 研究室のみが有する手法である。今回の在外研究により本手法を習得したことから、今後基課題で作出済みのレプチン関連遺伝子欠損メダカを用いた同様の試験が可能となった。

(3) その他の副次的成果

ノルウェー・ベルゲン大学と魚類における摂食調節機構に関する研究を行い、世界的な重要養殖対象種であるタイセイヨウサケを用いて基礎的知見を収集している。また、ノルウェーにおいてベルゲン大学との共同研究プロジェクトを獲得して人的交流も拡大しており、継続的な研究協力体制を構築することができた。

5. 主な発表論文等 (研究代表者は下線)

〔雑誌論文〕(計4件)

Ivar Rønnestad, Ana S. Gomes, Koji Murashita, Rita Angotzi, Elisabeth Jonsson, Helene Volkoff, Appetite-controlling endocrine systems in teleosts, *Frontiers in Endocrinology*, 3, Article 73, 1-24, 2017.

Ana S. Gomes, Ivar Rønnestad, Koji Murashita, Francesca Vacca, Raffaella Cinquetti, Amilcare Barca, Anders Aksnes, Elena Bossi, Tiziano Verri, Comparative Characterization of the Atlantic salmon, *Salmo salar* L., Di/Tripeptide Transporters PepT1a and PepT1b, *The FASEB Journal*, 33, 2019 (Proceedings)

Floriana Lai, Tharmini Kalanathan, Gunnar M. Berg, Koji Murashita, Ana S. Gomes, Sigurd Handeland, Ivar Rønnestad, Brain Distribution of Key Neuropeptides involved in Appetite Control in Atlantic Salmon, *Salmo Salar* (L.), *The FASEB Journal*, 33, 2019 (Proceedings)

村下幸司, ノルウェー・ベルゲン大学滞在記, 日本水産学会誌, 84, 970-973, 2018

〔学会発表〕(計4件)

Ana S. Gomes, Koji Murashita, Francesca Vacca, Elena Bossi, Tiziano Verri, Ann-Elise O. Jordal, Anders Aksnes, Ivar Rønnestad, Sensing and transport of peptides in the gastrointestinal tract of Atlantic salmon, *World Aquaculture*, 2017.06.26-30 (南ア, ケープタウン)

Koji Murashita, Comparison of aquaculture systems between Japan and Norway (Overview of fish aquaculture and fish feed research in Japan: an approach from fish physiology), Seminars on sustainable aquaculture, resource enhancement and conservation of salmon and other species, 2018.06.13 (大槌)

Ana S. Gomes, Ivar Rønnestad, Koji Murashita, Francesca Vacca, Raffaella Cinquetti, Amilcare Barca, Anders Aksnes, Elena Bossi, Tiziano Verri, Comparative Characterization of the Atlantic salmon, *Salmo salar* L., Di/Tripeptide Transporters PepT1a and PepT1b, *Experimental Biology*, 2019.04.06-09 (米国, フロリダ)

Floriana Lai, Tharmini Kalanathan, Gunnar M. Berg, Koji Murashita, Ana S. Gomes, Sigurd Handeland, Ivar Rønnestad, Brain Distribution of Key Neuropeptides involved in Appetite Control in Atlantic Salmon, *Salmo Salar* (L.), Experimental Biology, 2019.04.06-09 (米国, フロリダ)

〔図書〕(計0件)

〔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

6. 研究組織

研究協力者

〔主たる渡航先の主たる海外共同研究者〕

研究協力者氏名：イーバル ロンネスタッド

ローマ字氏名：Ivar Rønnestad

所属研究機関名：ベルゲン大学

部局名：生物科学部

職名：教授

〔その他の研究協力者〕

研究協力者氏名：アナ ゴメス

ローマ字氏名：Ana S. Gomes

University of Bergen・Researcher

研究協力者氏名：グンナール ベルグ

ローマ字氏名：Gunnar M. Berg

University of Bergen・Master student

研究協力者氏名：ニナ ティッセ

ローマ字氏名：Nina Tysse

University of Bergen・Master student

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。