

令和 2 年 6 月 29 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07478

研究課題名(和文) 非哺乳類におけるグレリンの存在意義：胃腸管に対する作用と遺伝子改変動物の作出

研究課題名(英文) The significance of existence of ghrelin in non-mammals: a new effect of ghrelin on gastrointestinal tract, and construction of gene modified animals in non-mammalian vertebrates.

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)：本研究では、グレリン遺伝子を欠損させたKOネツタイツメガエル、またグレリン受容体あるいはモチリン受容体遺伝子を欠損させたKOMダカ(GHSR-LR-KOおよびMLNR-KO)を作出した。GHSR-KOでは摂食量の減少が、またMLNR-KOのRNA-seq解析により、腎臓のSMAD3、pvalb-1、NCCRP1、StAR、脳においては成長ホルモン、プロラクチン、黄体形成ホルモン、gametocyte-specific factor-1の遺伝子発現が低下しており、メダカにおいてMLNRは水・電解質代謝、造血、免疫、ステロイドホルモン産生、生殖機能に関わっている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

グレリンやそのファミリーホルモンであるモチリンの非哺乳類、両生類や魚類における存在意義はまだ不明な点が多い。本研究ではゲノム編集技術(TALEN)によりネツタイツメガエル、メダカにおいてノックアウト(KO)個体を作成し、個体レベルでの遺伝子欠損の影響を調べた。その結果、メダカにおいてグレリン・GHS-R系は摂食調節に、モチリン・MLN-R系は水・電解質代謝、造血、免疫、ステロイドホルモン産生、生殖機能に関わっている可能性が示唆され、哺乳類と類似する点、相違する点があることが明らかとなった。特にモチリンは哺乳類において消化管運動調節のみが知られており、生体における新たな生理的役割が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, KO *Xenopus tropicalis* lacking the ghrelin gene, and KO medaka lacking the ghrelin receptor or motilin receptor genes (GHSR-LR-KO and MLNR-KO) were generated. GHSR-LR-KO showed a decrease in food intake. In addition, RNA-seq analysis of MLNR-KO showed that gene expression of SMAD3, pvalb-1, NCCRP1, StAR in the kidney, and growth hormone, prolactin, luteinizing hormone and gametocyte-specific factor-1 in the brain were down-regulated. Thus, it is suggested that the ghrelin/GHS-R system is involved in feeding regulation, while the MLN/MLN-R system is involved in water and electrolyte metabolism, hematopoiesis, immunity, steroid hormone production and reproductive function in Medaka.

研究分野：比較内分泌学

キーワード：グレリン モチリン グレリン受容体 モチリン受容体 遺伝子欠損動物 メダカ 魚類

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

グレリンは主に胃(腸)で産生・分泌されるペプチドホルモンであるが、視床下部にも微量に存在する脳腸ペプチドのひとつである。第3位のセリン残基に中鎖脂肪酸(主にオクタン酸)修飾は、受容体への結合と生物活性の発現に必須の構造である。グレリンは哺乳類において、急性には成長ホルモン分泌や摂食亢進に関わる一方、慢性にはグルコースや脂質代謝に関わり、体重増加や脂肪蓄積を惹起することが知られている。

ヒトやラット、マウスを用いた哺乳類での研究が精力的に推進される一方で、国内外を含め、非哺乳類におけるグレリンの研究の進展は遅れている。我々は、グレリン発見当初から、鳥類、爬虫類、両生類、真骨魚類、軟骨魚類などの非哺乳類において、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。近年は非哺乳類におけるグレリンの生理作用解明の一助とするためグレリン受容体(GHS-R1a)の同定にも着手し、受容体の機能解析や遺伝子の組織発現分布に加え、①真骨類には構造の異なる2種類の受容体アイソフォーム GHS-Ra と GHSR1a 様受容体(GHSR1a-LR)が存在し、進化的背景(有気管鰓・無気管鰓)と関連がある可能性、②有気管鰓魚には、遺伝子の倍加によって生じたと考えられる2種の機能的な受容体パラログ GHS-R1a と GHS-R2a が存在すること、③鳥類には特殊なスプライス変異体が存在すること、④両生類のグレリン受容体におけるリガンド選択性、⑤上陸する前の脊椎動物のモデルとなる肺魚のグレリン受容体におけるリガンド選択性など、受容体の進化的背景に伴う非哺乳類特有の成果を得てきた。

生体におけるグレリンの本質的な作用を知る上で、遺伝子改変技術を用いることは非常に有効な手段となる。哺乳類においては、2003年頃からグレリンやグレリン受容体の遺伝子欠失個体がマウスで作出され、その解析が進んでいる。内因性のグレリンが成長や摂食調節に果たす役割が注目されたが、意外なことに、グレリンシグナルを先天的に欠失していても外観や成長速度、摂食や糖代謝などは野生型マウスと差異がないことが報告された。一方で、グレリンとその受容体の双方を欠失したマウスでは、成長遅延や摂食量の低下が報告され、グレリンシステムの複雑さが示されている。

近年、ゲノム編集技術が進歩し、これまで遺伝子改変動物が作出しにくかった動物において TALEN (転写活性化様エフェクターヌクレアーゼ [Transcription Activator-Like Effector Nuclease])あるいは CRISPR/Cas9 [Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats / Crispr ASSociated protein]9)を用いることで遺伝子の機能消失(ノックアウト(KO))ができるようになってきた。しかしながら、これまで非哺乳類におけるグレリンの遺伝子 KO 動物は報告されていない。

2. 研究の目的

本研究では、両生類のなかで遺伝子情報が整っており、世代交代時間が比較的短いネットイツメガエル(*Xenopus tropicalis*)を用いてグレリン遺伝子の KO 個体を作成し、両生類におけるグレリンシステムの個体レベルでの本質的な関与について調べることを目的とした。また、魚類においても同様の方法が適用できることから、真骨魚類のメダカ(*Oryzias latipes*)を用いて KO 個体を作成することを試みた。メダカはグレリン遺伝子が先天的に消失している動物であることから、グレリン受容体(メダカではグレリン受容体様受容体 [GHSR-LR]という)並びにグレリンファミリーであるモチリンというペプチドホルモンの受容体(MLNR)の KO 個体の作成を試みた。これらの遺伝子改変動物を用いることにより、発生初期から成体に至る成長過程や、個体の行動学的、生理学的局面における本質的なグレリン系、モチリン系の関与を明らかにできると考えた。

3. 研究の方法

ネットイツメガエルとメダカにおいてデータベースの情報を元に RACE-PCR によって標的とするグレリン、GHSR-LR、モチリン、MLNR の cDNA クローニングを行い、塩基配列を確認した。TALEN は Platinum Gate TALEN kit (Addgene)を用い、機能欠損に適切な遺伝子部位を決め、TALEN を設計した。TALEN ベクターを作製し、HEK293T 細胞を用いた Single Strand Annealing Assay (SSA)アッセイによって標的箇所の遺伝子切断が確に行われるかを確認した。遺伝子切断が期待通りに起きることを確認できたら、TALEN mRNA を合成し、それを受精卵に注入した。発生が進み、ある程度成長した個体のヒレや尾を切り取り、DNA を抽出し、変異ターゲット部位を検出できるように設計したプライマーで PCR を行い、得られたフラグメントを適当な制限酵素で消化してジェノタイピングを行った。電気泳動後にバンドを切り出し、クローニングして遺伝子欠損部位の塩基配列の確認を行い、適切な遺伝子欠損が確認できた個体を成長させ、実験に供した。

メダカの GHSR-LR、MLNR においては、HEK293 細胞またはメダカ培養細胞(OLHdrR-e3 細胞)に受容体を過剰発現させ、Fluorometric Imaging Plate Reader (FLIPR)を用いて細胞内 Ca^{2+} 濃度の変動を調べることにより機能解析を行った。摂食行動の変化は、野生型(WT)メダカと遺伝子欠損(KO)メ

メダカを、水温を 26°C に維持した水槽で 3 日間絶食させた後に定量したブラインシュリンプを与え、10 分間の摂食量(数)の測定を行った。

4. 研究成果

4.1 ネットアイトメダカにおける KO 個体作出

F0 のジェノタイプピングの結果で有望個体であった No.7 と野生型 (WT) を交配し、F1 を得て遺伝子型を解析したが、F1 は調べた 20 個体全てで WT と同じジェノタイプであった。このような結果になることは考えにくく、変異配列が生殖系列に入っていないか、ヘテロ型が何らかの原因で致死している可能性が考えられた。さらに F0 の 6 匹のジェノタイプピングを行ったところ、1 匹だけホモ型がおり (下図: 右端)、明らかに体サイズや体重が他と比べて半分以下になっていた。ただ、No.6 は小さすぎて、うまく交配できるかどうか、また性成熟しているかどうかとも不確定であった。No.1, No.3, No.6 の変異配列を解析した結果、ほとんどが -9 bp 欠失であり、-9 bp 欠失は 3 つのアミノ酸が欠失するだけで終始コドンが入らず、今回の場合はホルモンの部位に変異導入サイトを設定しているため、シグナルペプチド部分の最後のアミノ酸とホルモンの最初の 2 アミノ酸が欠失した形になった。F1 においてヘテロ型やホモ型が得られなかったことから、原因追及のため実験はここで終了した。

黄色…TALEN 認識配列: 緑…変異導入箇所

WT GTCTCGTCTGGCCCGAGGCTGTTACCGCTGGAACCACTTTCTGAGCCCGGCAGATTTCG
 KO GTCTCGTCTGGCCCGAGGCTGTTACC-----AGTTTCTGAGCCCGGCAGATTTCG ▲ -9



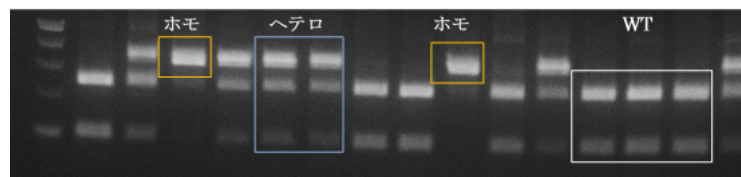
4.2 メダカのグレリン受容体様受容体 (GHSR-LR)

4.2.1 メダカにおける GHSR-LR の体組織における遺伝子発現と受容体機能解析

メダカ GHSR-LR mRNA は雄、雌とも脳と消化管に多く発現していた。HEK293 細胞あるいはメダカ培養細胞 (OLHdrR-e3 細胞) にメダカ GHSR-LR を過剰発現させ、メダカ MLN、ゼブラフィッシュ MLN、ニワトリ MLN、ヒト MLN、キンギョ GHRL、GHRP-6 を 1nM ~ 1000nM の濃度で処理して細胞内シグナリングを調べたが、細胞内 Ca²⁺ 濃度の変化は認められなかった。

4.2.2 メダカにおける GHSR-LR-KO 個体の作出と摂食行動解析

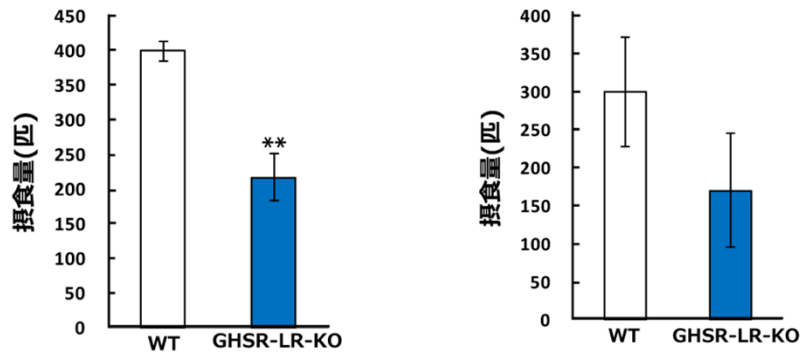
TALEN 処理により、メダカ GHSR-LR 遺伝子の第 1 エキソン内に 7 塩基欠損が確認された F1 個体を作成できた。F1 ヘテロ型と WT を交配し、F2 ヘテロ個体を得て、F2 ヘテロ型同士を交配させることにより、F3 でホモ型個体を得ることができた (下図)。



黄色…TALEN 認識配列: 緑…変異導入箇所

Wild type: TGTTCCTGGTTGGAGTGACCCGAAACGTCATGACTATTCTGGTGGTAGGCAGGCACAGGGAC
 Mutant: TGTTCCTGGTTGGAGTGACCCGAAACGT-----ATTCTGGTGGTAGGCAGGTACAGGGAC ▲ -7

このホモ型個体を成長させ、摂食行動を調べた。その結果、WT と比べて、雄の KO 個体では摂食量が有意に減少し、雌の KO 個体では減少傾向にあるものの有意な差は認められなかった (下図)。



4.3 メダカモチリン・モチリン受容体 (MLNR)

4.3.1 メダカにおける MLN、MLNR の体組織における遺伝子発現と MLNR の機能解析

メダカ MLN mRNA は雄、雌共に消化管でのみ高発現しており、前腸 > 中腸 > 後腸の順に多かった。一方、MLNR mRNA は雄、雌共に脳、眼、腎臓で、雌では卵巣においても高い発現が認められた。

HEK293 細胞にメダカ MLNR を過剰発現させ、細胞内シグナル応答を調べた。その結果、メダカ MLN、ゼブラフィッシュ MLN は細胞内 Ca²⁺濃度を上昇させたが、ヒトおよびニワトリ MLN、キンギョ GHRL には無反応であった。この結果は、同定したメダカ MLNR が機能的であることを確認したと同時に、魚類と四肢動物の MLN の一次構造の違いが受容体への親和性に影響していることを示した。

4.3.2 メダカにおける MLNR-KO 個体の作出と摂食行動解析

TALEN 処理により、メダカ MLNR 遺伝子の第1エキソン内に13塩基欠損が確認された F1 個体を作成できた。F1ヘテロ型と WT を交配し、F2ヘテロ個体を得て、F2ヘテロ型同士を交配させることにより、F3でホモ型個体を得ることができた(下図)。

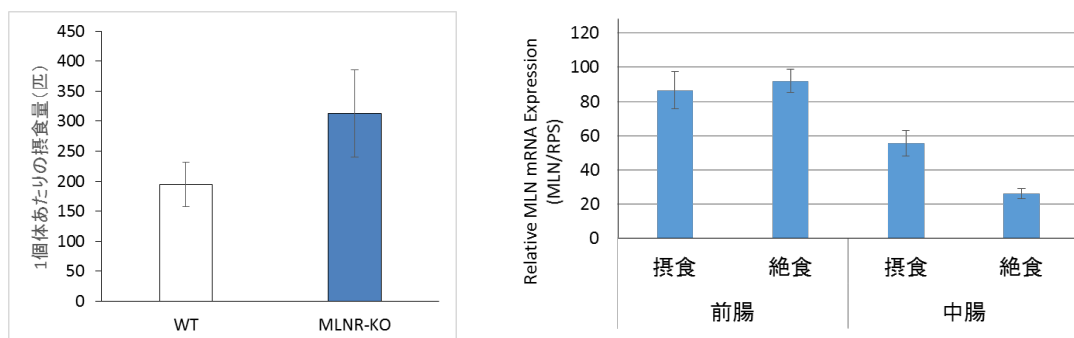
黄色…TALEN 認識配列: 緑…変異導入箇所

WT: GTGGTATGCCCTGGCCAGACCGCAGCTGGACCTTCATACAGGTGGAGCAATGGCCATGGACCCATACAACATAGATGAATAC
 #1: GTGGTATGCCCTGGCCAGACCGCAGCAGGTGGAGCAATGGCCATGGACCCATACAACATAGATGAATAC \triangleleft -13
 #3: GTGGTATGCCCTGGCCAGACCGCAGCAGGTGGAGCAATGGCCATGGACCCATACAACATAGATGAATAC \triangleleft -13
 #4: GTGGTATGCCCTGGCCAGACCGCAGCAGGTGGAGCAATGGCCATGGACCCATACAACATAGATGAATAC \triangleleft -13

WT のアミノ酸配列: MPWPRPQLDLHTGGAMAMPYNIIDE...

F2 のアミノ酸: MPWPRPQQVEQPWHTHT* (TAG がストップコドンとして有効に)

この MLNR-KO ホモ型雄個体を用いて摂食行動を調べた結果、WT と比べて、KO 個体では摂食量が増加する傾向が見られた。また、WT のメダカを5日間絶食させたところ、中腸における MLN mRNA の発現が減少しており、MLN の摂食への効果が示唆された。



4.3.3 メダカ MLNR-KO 個体を用いた RNA-seq 解析

MLNR は腎臓や脳で高発現をしていることから、WT と MLNR-KO 個体の腎臓と脳における RNA-seq 解析を行った。比較解析は WT で発現が高く、MLNR-KO でその発現が 1/2 以下に低下している 20 個の

遺伝子に絞り込み、候補遺伝子についてRT-PCRで発現比較を行った。その結果、腎臓ではSMAD3、pvalb-1、NCCRP1、StARの遺伝子発現が、脳においては成長ホルモン、プロラクチン、黄体形成ホルモン、gametocyte-specific factor-1がKO個体で低下していた。この結果から、MLNRは水・電解質代謝、造血、免疫、ステロイドホルモン産生、生殖機能に関わっている可能性があり、魚類におけるモチリンの作用は、哺乳類と類似する点と相相違する点があることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Okuhara Y, Kaiya H, Teraoka H, Kitazawa T.	4. 巻 99
2. 論文標題 Structural determination, distribution, and physiological actions of ghrelin in the guinea pig.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Peptides	6. 最初と最後の頁 70-81
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.peptides.2017.11.010.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Henderson LJ, Cockcroft RC, Kaiya H, Boswell T, Smulders TV.	4. 巻 285
2. 論文標題 Peripherally injected ghrelin and leptin reduce food hoarding and mass gain in the coal tit (Periparus ater).	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proc Biol Sci.	6. 最初と最後の頁 1879
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1098/rspb.2018.0417.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Eikenaar C, Hessler S, Ballstaedt E, Schmaljohann H, Kaiya H.	4. 巻 194
2. 論文標題 Ghrelin, corticosterone and the resumption of migration from stopover, an automated telemetry study.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Physiol Behav.	6. 最初と最後の頁 450-455
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.physbeh.2018.06.036.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Kitazawa T, Yoshida M, Teraoka H, Kaiya H.	4. 巻 249
2. 論文標題 Does motilin peptide regulate gastrointestinal motility of zebrafish? An in vitro study using isolated intestinal strips.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Gen Comp Endocrinol.	6. 最初と最後の頁 15-23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1016/j.ygcen.2017.02.014.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kitazawa T, Harada R, Sakata I, Sakai T, Kaiya H	4. 巻 274
2. 論文標題 A verification study of gastrointestinal motility-stimulating action of guinea-pig motilin using isolated gastrointestinal strips from rabbits and guinea-pigs	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Gen Comp Endocrinol.	6. 最初と最後の頁 106-112
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ygcen.2019.01.010.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Zhang S, Okuhara Y, Iijima M, Takemi S, Sakata I, Kaiya H, Teraoka H, Kitazawa T	4. 巻 285:
2. 論文標題 Identification of pheasant ghrelin and motilin and their actions on contractility of the isolated gastrointestinal tract	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Gen Comp Endocrinol.	6. 最初と最後の頁 113294
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ygcen.2019.113294.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kitazawa T, Kaiya H	4. 巻 10
2. 論文標題 Regulation of Gastrointestinal Motility by Motilin and Ghrelin in Vertebrates.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Front Endocrinol (Lausanne)	6. 最初と最後の頁 278
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fendo.2019.00278.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 海谷啓之、寒川賢治、宮里幹也
2. 発表標題 両生類においてグレリンは摂食調節に関与するか
3. 学会等名 第88回日本動物学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hiroyuki Kaiya, Kenji Kangawa, Mikiya Miyazato
2. 発表標題 Current knowledge of ghrelin in amphibians
3. 学会等名 グレリン国際シンポジウム(国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 砂田沙也加、石原美穂、中町智哉、松田恒平、今野紀文、海谷啓之
2. 発表標題 メダカにおけるグレリン - モチリン系とそれら受容体の特徴づけ
3. 学会等名 第44回日本比較内分泌学会 埼玉大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	今野 紀文 (Konno Norifumi) (50507051)	富山大学・学術研究部理学系・講師 (13201)	