

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06014

研究課題名(和文) エネルギーセンサーが操るインスリン様シグナルと追いつき成長

研究課題名(英文) Cellular energy-sensing mechanism modulates insulin-like growth factor signaling to facilitate catch-up growth.

研究代表者

亀井 宏泰 (Kamei, Hiroyasu)

金沢大学・生命理工学系・助教

研究者番号：00610362

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：『追いつき成長』は何らかの原因で一時的に成長遅滞に陥った個体が『遅滞要因の除去により成長を急加速させる現象』であり、様々な動物の胚や成長期の個体で観察される。本研究では、ゼブラフィッシュ胚を酸素の欠乏・再供給に供することで追いつき成長を誘導する独自の実験系を用いて「遅滞後の成長再開時には細胞のエネルギー感知の中核を担う脱アセチル化酵素サーチュイン(Sirt)が体成長を支えるインスリン・インスリン様成長因子シグナル(IIS)の下流に位置するMAPキナーゼの働きを修飾し、その働きを増強することが加速成長の誘導に必要な」という新しい体成長の仕組みを示すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では初期成長を調べる上で好適なモデル動物であるゼブラフィッシュを用いて追いつき成長におけるIISとSirtの関係を示すことができた。畜水産動物では、胎生期あるいは胚・仔魚期に成長遅滞に陥り遅滞要因除去後にも追いつき成長が見られない場合には、その後の生残率の低下・出生後の歩留まりを招き生産効率の低下につながる。また、ヒトでは追いつき成長経験者で肥満・二型糖尿病・心血管疾患などの発症リスクが増加することも指摘されている。今回得られた成果は内分泌シグナル制御による効率的な動物生産や健全な胎児・新生児の成長誘導の基盤的知見の一つとなることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Catch-up growth is a phenomenon in which an individual that has temporarily fallen into growth retardation for some reason rapidly accelerates its growth upon removal of the adverse condition, and is observed in embryos and growing individuals of various animals. In this study, using an original experimental system in which zebrafish embryos were subjected to oxygen deprivation and resupply to induce catch-up growth, we found that, when growth resumes after retardation, the deacetylase sirtuin (Sirt) that plays a central role in cellular energy sensing modified the insulin-like growth factor-MAPK signaling to induce the catch-up growth.

研究分野：動物生命科学

キーワード：追いつき成長 ゼブラフィッシュ インスリン様成長因子

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

動物の発生・成長は後天的な条件の悪化で遅滞するが、遅滞要因を除去すると成長の加速がおこり短時間で正常な成長度に復帰する。この現象は『*Catch-up growth*: 追いつき成長』として多くの動物で見られる。また、ヒトでは追いつき成長経験者で肥満・二型糖尿病・心血管疾患などの発症リスクが増加することも指摘されている。しかし、胎生期・出生直後の実験は容易ではなく、(基礎研究で汎用される)哺乳類モデルを用いても追いつき成長(特に成長加速の仕組み)を簡便・迅速に評価することは困難であり、この仕組みの分子機構の解明は立ち後れている状況であった。この様な状況の中、申請者はゼブラフィッシュ胚と酸素の欠乏・再供給を組み合わせた独自の『簡便・迅速な追いつき成長の実験系』を確立し、遅滞後の成長加速の誘導に必要なシグナル経路とそれを操る分子機構の解明を試みていた。

体成長を促進する主要因の一つとして、ほぼすべての動物種で保存されているインスリン・インスリン様成長因子(Igf)シグナル(IIS)が知られている。特にIgfの結合により活性化するIgf受容体とその細胞内基質であるインスリン受容体基質(Irs)を介して惹起されるIISは、標的細胞内のホスファチジルイノシトール3キナーゼ(PI3K)経路やマイトジェン活性化プロテインキナーゼ(MAPK)経路等で各種キナーゼ分子を活性化し、細胞増殖・遊走・分化促進、細胞死抑制、同化促進を介して個体の発生・成長を促す。追いつき成長でIISがどのように変化するか長らく不明だったが、これまでの申請者らの研究から、追いつき成長ではIISの下流で特にMAPK経路の成長促進作用が増強され、加速成長が誘導されることが示されていた。

### 2. 研究の目的

それでは、この変化は一体、何によって・いつ・どのように引き起こされているのだろうか? 成長遅滞を引き起こす低酸素や低栄養は、脱アセチル化酵素であるサーチュイン(Sirt)を含む低エネルギーセンサー分子群を活性化することが知られている。特に、Sirtの標的にはIISの最上流の制御分子であるIrsや代謝調節に関わる種々の転写因子があり、低エネルギー状態を経験することで、SirtによりIISの各経路や下流の遺伝子発現が大きく変化する可能性がある。そこで、本研究課題ではSirtが追いつき成長に関わるかを検討し、その関与の詳細を分子レベルで解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

複数のパラログ遺伝子が存在するSirt分子種の中でも特にSirt1とSirt2に的を絞って、これらの分子の特異的阻害剤を用い、IIS経路の活性化や体成長の変化を調べた。また、*sirt1*および*sirt2*の発現量の変化を定量PCR法や*in situ* hybridizationで調べ、成長遅滞や追いつき成長の過程における*sirt*遺伝子の発現動態を探るとともに、人工核酸試薬やCRISPR/Cas9システムを用いて*sirt*遺伝子の特異的機能喪失実験を行い、この遺伝子が真に体成長のシグナル伝達系に入力し、追いつき成長の発現に必要なかどうかを生化学的手法や分子生物学的手法により検討した。さらに、Sirtが追いつき成長を誘導する分子機構を解明するために、免疫共沈降法やプルダウンアッセイ法を用いてSirtとIISの接点を担う分子(そして、その他未知の相互作用分子群)のうち追いつき成長特異的にSirtと相互作用する分子を探索した。

### 4. 研究成果

追いつき成長が誘導される実験条件において、様々な濃度の Sirt1/2 阻害剤で処理を行い、薬剤濃度依存的な成長度の変化を調べた。その結果、常時常酸素条件下で飼育された通常成長胚では薬剤濃度に関わらず成長が妨げられることは無かった。それに対し、低酸素により成長が遅滞した後に常酸素に戻された胚では Sirtinol 処理により薬剤濃度依存的に著しい成長率低下が引き起こされ、薬剤未処理の対象群と比較して最大約 45% の成長の鈍化を認めた。Sirt1 と Sirt2 をそれぞれ独立に阻害する化合物を用いて調べたところ、Sirt1 の阻害では上記と同様の結果が得られたが、Sirt2 の単独阻害では胚成長に顕著な阻害は見られなかった。アンチセンスモルフォリノ (MO) を用いた実験でも、*sirt1* の特異的発現抑制を行なった場合にのみ追いつき成長特異的な成長阻害が見られた。しかし、*sirt2* の発現阻害では胚成長が阻害されることはなかった。更に、CRISPR/Cas9 システムを用いて *sirt1* の遺伝子欠損実験を行なったが、Sirt1 の機能阻害を行う化合物や MO を用いた場合と同じく、追いつき成長特異的に成長の鈍化が認められる結果を得た。これらのことから、Sirt1 は (遅滞が生じない様な通常条件下では成長促進に寄与しないものの) 低酸素と酸素の再供給により引き起こされる追いつき成長では、成長の加速を担う様になることが示された。

次に、Sirt1 が追いつき成長特異的に成長加速を誘導する分子機構を調べた。定量 PCR や *in situ* hybridization により *sirt1* 遺伝子の発現量や発現部位の変化を調べたが、低酸素による成長遅滞や再酸素化による追いつき成長において、(少なくとも個体レベルでは) この遺伝子の発現に際立った変化は見られなかった。次に Sirt1 の機能・発現阻害個体における MAPK 経路へのシグナル伝達を調べたところ、特に追いつき成長実験に供した場合においてのみ明確な MAPK 活性の低下が認められた。この Sirt1 阻害による MAPK 活性の低下は Igf 受容体の共阻害実験により変化することはなかった。以上の結果は Sirt1 が Igf 受容体の下流において追いつき成長特異的に MAPK 経路の活性化に必要となることを示唆する。この結果を受けて、ゼブラフィッシュ Sirt1 と IIS の細胞内シグナル伝達に関わる分子群をクローニングし、タグ付きタンパク質として哺乳類細胞に発現させ様々な培養条件の試料を用いて共免疫沈降実験を行なった。その結果、低酸素後に酸素を再供給した実験条件下ではインスリン受容体基質 2 (Irs2) と Sirt1 の相互作用が強まることが確かめられた。Irs2 はゼブラフィッシュゲノム中に複数存在するが、種々の生化学的実験・分子生物学的実験の結果 Sirt1 と結合する Irs2 分子種には特異的に追いつき成長特異的な MAPK 活性化促進作用があることも明らかにできた。また、精製したタグ付き Sirt1 タンパク質とゼブラフィッシュ胚の粗抽出液を用いたプルダウンアッセイから、Sirt1 は Irs2 以外にも約 60kDa の未同定タンパク質と追いつき成長特異的に相互作用している事も示された。

これらの結果より、Sirt1 は、追いつき成長特異的に様々な分子と相互作用することで、IIS-MAPK 経路の持つ生物活性をより効果的に成長に向かわせる役割を持つと考えられた。本研究の成果は、内分泌シグナル制御による効率的な動物生産や健全な胎児・新生児の成長誘導の基盤的知見の一つとなることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Kamei H.	4. 巻 Volume 294
2. 論文標題 Oxygen and embryonic growth: the role of insulin-like growth factor signaling.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Gen Comp Endocrinol.	6. 最初と最後の頁 113473
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ygcen.2020.113473.	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 -
1. 著者名 Kobayashi I, Kobayashi-Sun J, Hirakawa Y, Ouchi M, Yasuda K, Kamei H, Fukuhara S, Yamaguchi M.	4. 巻 147
2. 論文標題 Dual role of Jam3b in early hematopoietic and vascular development.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 181040
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/dev.181040.	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 -
1. 著者名 亀井 宏泰	4. 巻 166
2. 論文標題 日本比較内分泌学会奨励賞を受賞して：ゼブラフィッシュを用いた胚の成長制御機構に関する発生内分泌学的研究	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 比較内分泌学	6. 最初と最後の頁 4-5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5983/nl2008jsce.45.4	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 -
1. 著者名 Kamei H., Yoneyama Y., Hakuno F., Sawada R., Shimizu T., Duan C., Takahashi S.	4. 巻 159
2. 論文標題 Catch-up growth in zebrafish embryo requires neural crest cells sustained by Irs1-signaling.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Endocrinology	6. 最初と最後の頁 1547-1560
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1210/en.2017-00847. 2018	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 該当する

1. 著者名 Nishi H, Yamanaka D, Kamei H, Goda Y, Kumano M, Toyoshima Y, Takenaka A, Masuda M, Nakabayashi Y, Shioya R, Kataoka N, Hakuno F, Takahashi SI.	4. 巻 8
2. 論文標題 Importance of Serum Amino Acid Profile for Induction of Hepatic Steatosis under Protein Malnutrition.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 5461
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-23640-8. 2018	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12件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 Kamei H.
2. 発表標題 A catch-up story of tiny fish embryos: from a study focused on fluctuated environmental oxygen.
3. 学会等名 College de France, Center for Interdisciplinary Research in Biology, Department Seminar, in College de France - (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hanazuka M., Katayama H., Kamei H., Ohira T.
2. 発表標題 Characterization of red pigment-concentrating hormone receptor of the kuruma prawn <i>Marsupenaeus japonicus</i> .
3. 学会等名 International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry, Ottawa, Canada. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 花塚 真史・亀井 宏泰・片山 秀和・大平 剛
2. 発表標題 クルマエビ赤色素凝集ホルモン受容体のリガンド特異性の解析 (Characterization of ligand-specificity of red pigment concentrating hormone receptor of the kuruma prawn <i>Marsupenaeus japonicus</i> )
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会/第71回日本細胞生物学会大会 合同年次大会, 兵庫・神戸 (神戸国際会議場、神戸国際展示場)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 座主 彩香・亀井 宏泰
2. 発表標題 インスリン受容体基質2bは追いつき成長を担うシグナルを活性化する
3. 学会等名 第44 回日本比較内分泌学会及びシンポジウム, 埼玉・大宮 (埼玉大学)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渋川 夢風・亀井 宏泰
2. 発表標題 Sirt1はIGF-MAPK経路活性化を介して追いつき成長を促進する
3. 学会等名 第44 回日本比較内分泌学会及びシンポジウム, 埼玉・大宮 (埼玉大学)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 亀井 宏泰
2. 発表標題 『酸素』と『胚成長』の関係をつなぐインスリン様成長因子シグナルの機能調節』
3. 学会等名 大阪大学理学部生物学科 第442回 生物科学セミナー, 大阪大学・大阪 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kamei H., Shibukawa M.
2. 発表標題 NAD-dependent deacetylase Sirt1 is required for catch-up growth in zebrafish embryos.
3. 学会等名 Joint Symposium between Kanazawa Univeristy and Prince of Songkla University "Recent Advances in Marine Science, Aquaculture and Food Technology" (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Zasu A., Kamei H.
2. 発表標題 Role of insulin receptor substrate 2 (irs2) in catch-up growth in zebrafish.
3. 学会等名 Joint Symposium between Kanazawa Univeristy and Prince of Songkla University “Recent Advances in Marine Science, Aquaculture and Food Technology” (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 亀井宏泰・座主彩香
2. 発表標題 ゼブラフィッシュ胚の追いつき成長におけるprtgの役割
3. 学会等名 第43 回日本比較内分泌学会及びシンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 亀井宏泰
2. 発表標題 ゼブラフィッシュを用いた胚の成長制御機構に関する発生内分泌学的研究.
3. 学会等名 第43 回日本比較内分泌学会及びシンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 座主彩香・亀井宏泰
2. 発表標題 ゼブラフィッシュ胚の追いつき成長におけるインスリン受容体基質2の役割 (Role of insulin receptor substrate 2 (irs2) in catch-up growth in zebrafish embryos.)
3. 学会等名 2018 (平成30年) 年度 第41回 日本分子生物学会 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 洪川夢風・座主彩香・亀井宏泰
2. 発表標題 NAD依存的脱アセチル化酵素Sirt1はゼブラフィッシュ胚の追いつき成長に必要なである (NAD-dependent deacetylase Sirt1 is required for catch-up growth in zebrafish embryos.)
3. 学会等名 2018 (平成30年) 年度 第41回 日本分子生物学会 (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

金沢大学 研究者情報 <a href="https://ridb.kanazawa-u.ac.jp/public/detail.php?id=4489">https://ridb.kanazawa-u.ac.jp/public/detail.php?id=4489</a> 金沢大学理工学域生命理工学類 研究室紹介 (成長制御学研究室) <a href="http://bio.w3.kanazawa-u.ac.jp/bio-s/kamei/">http://bio.w3.kanazawa-u.ac.jp/bio-s/kamei/</a> Research Gate <a href="https://www.researchgate.net/profile/Hiroyasu_Kamei">https://www.researchgate.net/profile/Hiroyasu_Kamei</a> Loop (The Open Science Research Network) <a href="https://loop.frontiersin.org/people/37848/overview">https://loop.frontiersin.org/people/37848/overview</a>
--

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	伊藤 昭博  (Ito Akihiro)  (40391859)	東京薬科大学・生命科学部・教授    (32659)	

	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
連携研究者	小林 功  (Kobayashi Isao)  (30774757)	金沢大学・生命理工学系・准教授    (13301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件



8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
フランス	College de France	Universite de Paris		