

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570086

研究課題名(和文)両生類のホメオスタシスに対するグレリンシステムの役割の探求

研究課題名(英文)Exploring of the role of the ghrelin system in homeostatic regulation in amphibians

研究代表者

海谷 啓之(KAIYA, Hiroyuki)

独立行政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) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：無尾両生類3種(ウシガエル、アマガエル、ヒキガエル)と有尾両生類1種(アカハライモリ)からグレリン受容体を同定し、その機能解析を行った結果、無尾両生類の受容体はグレリンの第3位のアミノ酸がセリンかスレオニンかを認識しないが、有尾両生類の受容体はセリンを持つグレリンに高い親和性を示した。また、腹腔投与したホモログなグレリンの摂食調節に対する効果を検討したが、イモリ成体では無効、ウシガエル幼生では摂食を増加させた。イモリでは絶食後に脳や下垂体、胃におけるグレリンならびにGHS-R1a遺伝子発現に変化があることから、グレリンシステムがエネルギー代謝調節に関わることが示唆される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we identified ghrelin receptors (GHS-R1a) in three species of Anura (bullfrog, Japanese tree frog, and Japanese toad) and one species of Caudata (Japanese fire-belly newt). Functional analyses revealed that ghrelin receptors for Anura did not recognize serine or threonine at the third amino acid of ghrelin, but that of newt showed a high affinity for ghrelin with serine. We examined the effect of ghrelin on feeding regulation after intraperitoneal injection. Homologous ghrelin had no effect in newt, but increased food intake in bullfrog larvae. However, a fasting affects expressions of ghrelin and GHS-R1a genes in newt. Overall, it is suggested that the ghrelin system participates in energy homeostasis in amphibians. Our findings provide new evidences to ghrelin function in vertebrates.

研究分野：基礎生物学

科研費の分科・細目：形態・構造

キーワード：グレリン GHS-R 無尾両生類 有尾両生類 機能解析 遺伝子発現部位 腹腔投与 摂食調節

## 1. 研究開始当初の背景

グレリン(ghrelin)は1999年にラットの胃から単離された28アミノ酸からなるペプチドホルモンで、第3位のセリン残基に脂肪酸(主にオクタン酸)修飾がある特殊な構造を持つ。その構造は受容体への結合や生物活性の発現に重要であることがわかっており、その作用は主に末梢性あるいは中枢性に成長ホルモン(GH)分泌や摂食を亢進することによる体重増加・成長促進・エネルギー蓄積であるとされる。その受容体は growth hormone secretagogue receptor (GHS-R) と呼ばれ、活性発現に関与する「GHS-R1a」と、mRNAの選択的スプライシングによって第6膜貫通領域からの構造が部分的に欠如した非機能的とされる「GHS-R1b」が存在する。

研究代表者は、グレリンの発見以来、様々な非哺乳動物(鳥類、爬虫類、両生類、真骨魚類、軟骨魚類)のグレリンの構造を決定し、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、グレリンの生理作用機序を解明する目的でGHS-Rの同定に着手し、魚類のティラピア、ニジマスにおいてグレリン受容体のオーソログであるグレリン受容体様受容体(GHSR1a-LR)を、またアメリカナマズ、キンギョ、鳥類のウズラにおいてGHS-R1aのcDNAを同定した。これらの研究と既存の研究から、(1)魚類には構造の異なる2種類のオーソログ(GHSR1a-LRとGHS-R1a)が存在すること、(2)ナマズとキンギョでは機能的なグレリン受容体のパラログ、GHS-R1aと2aの2種類が存在すること、(3)鳥類にはGHS-R1aのみが存在することが明らかとなり、グレリン受容体の進化的背景が見えてきた。

そのような中、両生類のグレリン受容体の構造は明らかにされていなかった。研究代表者は2001年にウシガエルのグレリンを同定しているが、最近、様々な両生類のグレリンの構造を決定したところ、脂肪酸修飾されている第3位のアミノ酸はウシガエルやトノサマガエルなどが含まれるアカガエル(*Rana*)属のみがスレオニン残基(Thr3)であり、他に調べた両生類は哺乳類など他の動物と同様にセリン残基(Ser3)であることがわかった。また、2001年に発表した研究において、Thr3を持つウシガエルのグレリンはラットへ静注したときにGH分泌が促進されなかったが、ウシガエル下垂体に処理するとGH分泌が促進された。一方、ラットのグレリンはその逆の効果を示した。このことは、受容体がペプチド全体の構造とは別に、Thr3かSer3かを認識し、種特異的な作用を発揮していることが示唆された。

## 2. 研究の目的

本研究では、カエルなどの無尾両生類と、イモリなどの有尾両生類においてGHS-Rを同定し、その構造比較や受容体の機能性や特性を調べるとともに、受容体遺伝子の発現分布を調べ、両生類においてグレリンがどのような生理作用に関わるのかを明らかにすることを目的とした。

そのために、構造解析ではcDNAをクローニングによりGHS-R遺伝子の塩基配列を決定し、推定されるアミノ酸配列を決定する。特性解析では、受容体遺伝子の組織分布や発現量の測定、受容体発現細胞を作製し、グレリンやGHS-R1aアゴニストを用いて受容体の機能性やリガンド特異性を調べる。また、グレリンの作用については、摂食調節と浸透圧調節への関与の可能性を調べた。

本研究において新たな動物種(両生類)でグレリン受容体を同定することは、受容体構造の共通性や性質などを調べる上で意義がある。また、冬眠や変態など特徴的な生態をもつ両生類は研究材料として非常にユニークであり、GHS-Rの構造や機能において進化的変遷を明らかにできるとともに、受容体-リガンド関連において、受容体の構造学的な特徴・重要性和、受容体分布を足がかりに両生類におけるグレリンの作用、グレリンシステムが両生類の恒常性維持に対してどのような役割を果たしているのかを知ることができる。

## 3. 研究の方法

### (1) 材料

無尾両生類はウシガエル(*Rana catesbeiana*)、アマガエル(*Hyla japonica*)およびヒキガエル(*Bufo japonicus*)を、有尾両生類はアカハライモリ(以下イモリ: *Cynops phyllorhogaster*)およびメキシコサラマンダー(以下アホロートル: *Ambystoma mexicanum*)を用いた。

### (2) RACE-PCRを用いたグレリン受容体のクローニング

グレリン受容体は、塩基配列が報告されている動物種間の配列を比較すると保存性の高い部位にデザインしたセンス鎖、アンチセンス鎖の縮重プライマーを用いて、脳や下垂体のtotal RNAからRT-PCRを行い、約700bpのフラグメントを得る。次に、3'-あるいは5'-RACE-PCRによって3'側および5'側の塩基配列を決定する。

### (3) 受容体遺伝子発現部位の検討

全身の各組織を採取してtotal RNAを抽出。同定したGHS-R cDNAの塩基配列情報を元に適所に遺伝子特異的なプライマーを作製し、SYBR Greenを用いたリアルタイムPCR法により、GHS-R mRNAの組織分布や発現量を調べる。

### (4) 哺乳類細胞を用いた受容体の機能評価

GHS-R1aタンパク質をコードするcDNAを哺乳類細胞発現用プラスミドベクター(pCDNA3.1-V5-His-TOPO)に組み込み、それを哺乳類細胞(HEK293)に導入し、GHS-Rタンパク質を一過性あるいはG418選択により安定発現させた。その細胞にグレリン、およびGHS-R1aアゴニストのGHRP-6およびhexarelin

(以下、Hex)を処理して細胞内カルシウム(Ca)イオン濃度の変動をFLIPRで調べた。

### (5) 両生類におけるグレリンの生理作用

#### ①浸透圧調節(主として飲水調節)

両生類は口から水を飲まず、腹皮から水チャンネル(アクアポリン)を介して水を吸収する。連携研究者の内山らのアマガエルで用いられている水吸収実験方法に従い、絶水によって13%体重を減少させたアマガエルの脳室内にラットグレリンを25pmol/体重で投与し、6時間ビデオカメラで撮影して、水の入ったシャーレにカエルが入った時間を計測した。また、アマガエルを絶水させ、体重を20%減少させた際のGHS-R1aの遺伝子発現変化を調べた。

#### ②摂食調節

連携研究者の松田らが確立した、ウシガエル幼生に色付きほうれん草を食べさせ、腸に溜まっているその餌の重量を測定する方法で、腹腔または脳室内にカエルグレリンを投与後、餌を与えて15分後の摂食量を調べた。

ウシガエルとアマガエル成体においてそれぞれ20日間、10日間の絶食処理を施し、様々な組織を採取して受容体の遺伝子発現を調べた。

イモリにおいて腹腔内にグレリンを投与した後に摂取した餌の粒数をカウントして摂食量を測定した。2日間絶食したイモリにイモリグレリン(50 pmol, 100 pmol/g 体重)を腹腔内投与し、単位時間(投与後5,10,20,30分後)当たりの摂食量を計測した。

## 4. 研究成果

### (1) GHS-R1a cDNA の同定

無尾両生類のウシガエル、アマガエル、ヒキガエルの全脳 total RNA からそれぞれ 1125 bp, 1116 bp, 1116 bp の翻訳領域をもつ cDNA を単離した。それぞれの cDNA は 374 および 371 アミノ酸からなる GHS-R1a に類似した受容体をコードしていた。

また、有尾両生類のイモリの全脳 total RNA から 1137bp の翻訳領域をもつ cDNA を単離したが、2つの翻訳領域候補があり、ひとつは 1137bp、もうひとつは 1089bp で、それぞれ 378、362 アミノ酸からなる GHS-R1a に類似した受容体をコードしていた。アホロートルについて、同様の方法で脳の total RNA から cDNA のクローニングを試みたが、RT-PCR の段階で断片を得ることができなかった。そこで、異なる部位で縮重プライマーを作製して RT-PCR を行ったところ、2つの GHS-R 様の断片 GHSR $\alpha$ 、GHSR $\beta$  を得たので、RACE-PCR によりそれぞれの全長の増幅を試みたが現時点で完全長のクローニングは成功していない。全身組織におけるそれらの転写産物の分布を調べてみたところ、GHSR $\alpha$  は脳、胃腸管、脾臓で、GHSR $\beta$  は脳、胆嚢で多く発現していた。何故増幅できないのか原因を追求している。

同定した受容体について、他の GHS-R1a との

類似性を調べたところ、GHS-R1a がもつコンセンサス配列を持つこと、また、系統樹解析でも四肢動物の GHS-R1a の傘下に分類された(図1)。

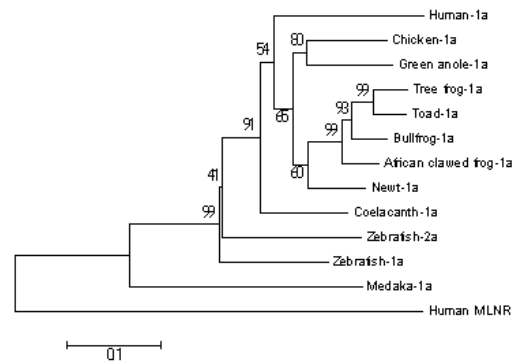


図1 同定した両生類を含む GHS-R1a の NJ 法による系統樹(Bullfrog:ウシガエル、Toad:ヒキガエル、Tree frog:アマガエル、Newt:イモリ)

### (2) 同定した GHS-R1a 様受容体の機能評価

次に、その受容体タンパク質をコードしている部分の cDNA を哺乳類細胞に強制発現させ、受容体がグレリンに応答して細胞内シグナル伝達系を活性化させるかを検討した。その結果、同定した全ての受容体がグレリン、および GHS-R1a アゴニストの GHRP-6 や Hex によって活性化され、細胞内 Ca イオン濃度の上昇を引き起こした。このことは同定した受容体はグレリン受容体であることを示している。

また、本検討で、受容体の特性が認められた。すなわち、無尾両生類3種の受容体はウシガエルグレリン(以下、カエルグレリン)とラットグレリンに対して同程度の親和性を、GHRP-6 や Hex はグレリンよりも10倍低い親和性を示した(図2)。

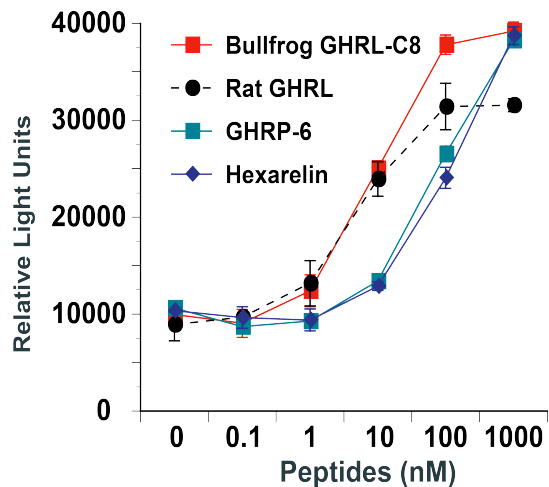


図2 ウシガエル GHS-R1a の各種アゴニストに対する用量反応関係

一方、有尾両生類のイモリの受容体は378アミノ酸残基からなる長鎖型よりも362アミノ酸からなる短鎖型の方が細胞内Ca<sup>2+</sup>イオン濃度を上昇させる機能が強かった。両受容体はラットグレリンとイモリグレリンに対して同程度の親和性を示したが、カエルグレリンに対しては10倍程度低い親和性を示し、それはGHRP-6の親和性と同程度であった(図3)。

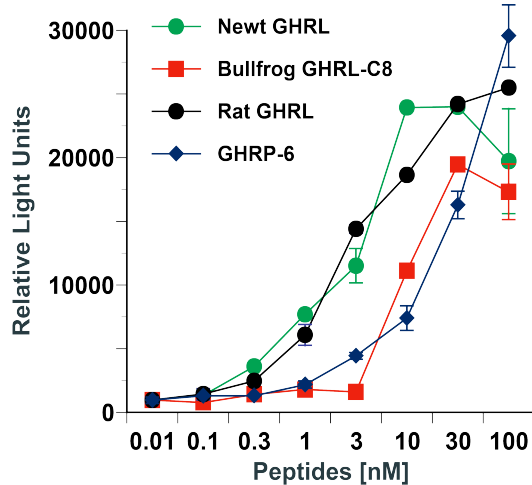


図3 イモリの短鎖 GHS-R1a の各種アゴニストに対する用量反応関係

### (3) 受容体遺伝子発現の組織分布

無尾両生類のウシガエルでは強い発現が脳(間脳、中脳)、胃、精巣で、弱い発現が小腸、大腸、副腎、腎臓、精巣で見られた。アマガエルでは強い発現が脳や胃腸管で、弱い発現が肺、心臓、肝臓、脾臓、皮膚で認められた。ヒキガエルでは全身の臓器で遺伝子発現が認められたが、アマガエルと同様に強い発現が脳や下垂体、胃腸管で、弱い発現が肺、心臓(心房、心室)、肝臓、膵臓、脾臓、腎臓、生殖腺、皮膚で認められた。

有尾両生類のイモリでは強い発現が脳、胃腸管で、弱い発現が下垂体、肺、肝臓、膵臓、腎臓、生殖腺、皮膚で認められた。アホロートルでは GHS-R 様受容体の遺伝子発現は調べることができている。その結果、GHSR $\alpha$ は脳、胃腸管、脾臓で、GHSR $\beta$ は脳、胆嚢で強く、腎臓、筋肉、生殖腺で弱く発現していた。

以上の結果から、グレリンが様々な器官で作用している可能性が示唆された。

### (4) 両生類におけるグレリンの生理作用

#### ①アマガエルにおける飲水調節

アマガエルにラットグレリンを25 pmol/g 体重で脳室内に投与し、腹皮からの水吸収を360分間測定したが、効果は認められなかった。

#### ②ウシガエル幼生における摂食調節

ウシガエルグレリンの腹腔内投与(8, 16 pmol/g 体重)、また脳室内投与(0.5, 1 pmol/g 体重)は用量依存的にウシガエル幼生の摂食量を増加

させた(図4)。この効果は GHS-R1a のアンタゴニストの投与により抑制された。また、摂食後に視床下部や胃腸管のグレリンの遺伝子発現が減少した。

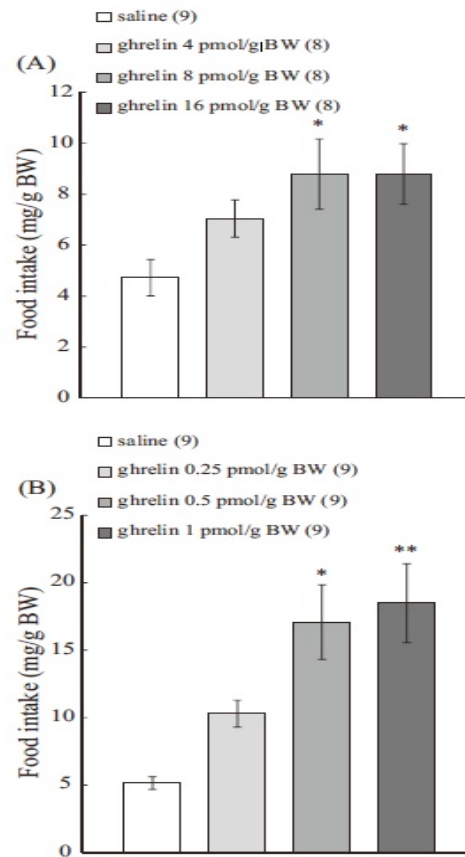


図4 ウシガエル幼生におけるグレリンによる摂食亢進作用(A: 腹腔投与、B: 脳室内投与)

### ③ウシガエル成体における絶食の影響

胃と全脳において GHS-R1a の遺伝子発現変化を調べたが、胃では絶食10日目に一過性の上昇が認められたが、脳では20日間顕著な変化は認められなかった。

### ④アマガエル成体における絶食の影響

10日間の絶食で、胃、腹皮で遺伝子発現の増加が認められた。

### ⑤イモリにおける摂食調節

イモリグレリンの腹腔内投与は50 pmol、100 pmol/g 体重いずれにおいても30分間の摂食量に変化を与えなかった。

### (5) 考察と総括

本研究において、4種の無尾および有尾両生類のグレリン受容体の構造と機能に加え、組織分布が明らかとなった。ウシガエルの受容体はアマガエルの受容体と84%の類似性があるが、ヒキガエルの受容体はアマガエルと91%の類似性がある。イモリの受容体はウシガエルと80%の類似性を示した。系統学的にもヒキガエルとアマガエルは近縁にあり、全体的に系統学的な位置

や生息域(水棲(イモリ)、半陸生(ウシガエル)、陸生(アマガエル、ヒキガエル))を反映しているように思われる(図1)。

機能においては、無尾両生類の受容体は Ser3、Thr3 の違いを認識しないが、有尾両生類のイモリの受容体は両者の違いを認識している。この違いが受容体のどの構造(アミノ酸)の違いによるものか、比較検討が必要である。

遺伝子発現部位では、ウシガエル、アマガエルにおいて、下垂体での発現が認められない。ウシガエルの結果は、既報のようにグレリンが下垂体に作用することと矛盾する。本研究では全脳 total RNA から受容体を単離した。また、機能解析でもウシガエル、アマガエルの受容体は Ser3、Thr3 の違いを認識しない。このことから、これまで四肢動物では1種類の GHS-R1aしか発見されていないが、本研究で同定した物とは別に Ser3、Thr3 を認識するような、イモリで単離されたような受容体が存在する可能性が考えられる。以後、更なる探索が必要である。また、胃腸管で強い遺伝子発現が認められた。胃腸管運動への関与が考えられるが、今後、検討が必要である。

生理作用について、浸透圧調節および摂食調節への関与の可能性を検討した。飲水(吸水)への関与は否定的であった。グレリンはウナギ(魚類)やラット(哺乳類)、ニワトリ(鳥類)で飲水を抑制することが知られている。投与の量や部位を再検討する必要があるかもしれないが、アンジオテンシンやバソシンではこの方法で吸水が刺激される。摂食調節についてはウシガエル幼生において摂食亢進効果やグレリンの遺伝子発現が摂食後に減少することが認められた。また、ウシガエルやアマガエルにおいて絶食処理によって受容体遺伝子の発現が増加することから、哺乳類同様、負の栄養バランス時、グレリンが栄養摂取および蓄積の方向に働く可能性を示唆する。ただし、イモリでは摂食亢進作用は認められず、これが種差であるのか、投与の部位や量による結果なのか、あるいは実験の不備であるかは今後検討が必要である。

有尾両生類のアホロートルに関しては受容体の全配列を決定できなかった。RACE PCR で増幅が困難であったことから、グレリン受容体の欠如の可能性、またグレリンペプチドの存在の確認も視野に今後研究していきたい。

総括として、両生類にはグレリンとその受容体が存在し、少なくとも摂食調節や既報のように成長ホルモン分泌などエネルギー代謝系、内分泌系の調節に働いている。今後、本研究で明らかになった受容体の分布(作用部位)の結果を元に、両生類の恒常性維持に対するグレリンの関与を明らかにしていきたい。

##### 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 10 件)

1. **Kaiya H**, Koizumi Y, Konno N, Yamamoto K, Uchiyama M, Kangawa K, Miyazato M. Ghrelin receptor in two species of anuran amphibian, bullfrog (*Rana catesbeiana*) and Japanese tree frog (*Hyla japonica*). *Front Endocrinol.* 2:31, doi:10.3389/fendo.2011.00031 査読有
2. Kitazawa T, Nakamura T, Atsuki S, Teraoka H, Hiraga T, **Kaiya H**. Molecular identification of ghrelin receptor (GHS-R1a) and its functional role in the gastrointestinal tract of the guinea-pig. *Peptides.* 2011, 32:1875-1886. 査読有
3. **Kaiya H**, Miyazato M, Kangawa K. Recent advances in the phylogenetic study of ghrelin. *Peptides.* 2011, 32, 2155-2174. 査読有
4. **Kaiya H**, Hosoda H, Kangawa K, Miyazato M. Determination of nonmammalian ghrelin. *Methods Enzymol.* 2012, 514: 75-87. 査読有
5. Yamaguchi Y, **Kaiya H**, Konno N, Iwata E, Miyazato M, Uchiyama M, Bell JD, Toop T, Donald JA, Brenner S, Venkatesh B, Hyodo S. The fifth neurohypophysial hormone receptor is structurally related to the V2-type receptor but functionally similar to V1-type receptors. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2012, 178(3): 519-528. 査読有
6. **Kaiya H**, Kangawa K, Miyazato M. What is the general action of ghrelin for vertebrates? - Comparisons of ghrelin's effects across vertebrates. *Gen Comp Endocrinol.* 2013, 181: 187-191. 査読有
7. **Kaiya H**, Kangawa K, Miyazato M. Update on ghrelin biology in birds. *Gen Comp Endocrinol.* 2013 190:170-175. 査読有

8. **Kaiya H, Kangawa K, Miyazato M.**  
Ghrelin receptors in non-Mammalian  
vertebrates. *Front Endocrinol (Lausanne)*.  
2013;4:81. doi: 10.3389/fendo.2013.00081.  
査読有
9. Shimizu S, **Kaiya H, Matsuda K.**  
Stimulatory effect of ghrelin on food intake  
in bullfrog larvae. *Peptides*. 2014 51:74-79.  
査読有
10. **Kaiya H, Kangawa K, Miyazato M.**  
Molecular evolution of ghrelin receptors. *J*  
*Mol Endocrinol*. 2013 Dec 18. [Epub ahead  
of print] 査読有

[学会発表] (計 12 件)

1. 第 84 回日本生化学学会(11/9/21-24: 発表  
9/23、国立京都国際会館(京都)) グレリン  
の構造・機能と生物多様性(海谷啓之、宮  
里幹也、寒川賢治)
2. 第 36 回日本比較内分泌学会(11/11/22-25:  
都道府県会館(東京))ニホンウナギのグレリ  
ン受容体(海谷啓之、寒川賢治、宮里幹  
也)
3. 第 83 回日本動物学会(12/9/13-15: 大阪大  
学)両生類の視床下部から同定した下垂体  
に発現していないグレリン受容体(海谷啓之、  
寒川賢治、宮里幹也)
4. 第 37 回日本比較内分泌学会  
(12/11/29-12/1: 福井大学)有尾両生類ア  
カハライモリのグレリン受容体(海谷啓之、  
寒川賢治、宮里幹也)
5. 第 9 回 GPCR 研究会(12/5/11-12: 日本科学  
未来館(東京))非哺乳類には複数のグレリ  
ン受容体が存在する(海谷啓之、松田恒平、  
寒川賢治、宮里幹也)
6. International Symposium on Avian  
Endocrinology 2012 (12/6/5-9: 岐阜) Update  
on ghrelin biology in birds (**Hiroyuki Kaiya,**  
**Kenji Kangawa,** and **Mikiya Miyazato**) (招待  
講演)
7. The 7<sup>th</sup> Asia and Oceania Society of  
Comparative Endocrinology (12/3/3-8: マレ  
ーシア) - GHRELIN: GROWTH  
HORMONE-RELEASING PEPTIDE  
SECRETED FROM THE STOMACH  
(**Hiroyuki Kaiya,** **Kenji Kangawa,** and  
**Mikiya Miyazato**) (招待講演)
8. The 7<sup>th</sup> Asia and Oceania Society of  
Comparative Endocrinology (12/3/3-8: マレ  
ーシア) GHRELIN RECEPTOR IN TWO

SPECIES OF ANURAN AMPHIBIAN,  
BULLFROG AND JAPANESE  
TREE-FROG (**Kaiya H.,** Koizumi Y., Konno  
N., Yamamoto K., Uchiyama M., Kangawa  
K., Miyazato)

9. 第 84 回日本動物学会(13/9/26-28: 岡山大  
学)有尾両生類アカハライモリのグレリン受  
容体(海谷啓之、寒川賢治、宮里幹也)
10. 第 84 回日本動物学会(13/9/26-28: 岡山大  
学)ウシガエル幼生におけるグレリンの摂食  
亢進作用(清水駿介、海谷啓之、東 森生、  
内山 実、松田恒平)
11. 第 10 回 GPCR 研究会(13/5/10-11: 日本科  
学未来館(東京))有尾両生類アカハライモリ  
のグレリン受容体(海谷啓之、寒川賢治、宮  
里幹也)
12. 東京大学大気海洋研究所共同利用集会  
「海洋生物のさまざまな適応戦略」(13/6/22  
-23: 東京大学大気海洋研究所)動物にとっ  
てグレリンはどのようなホルモンか? ~比較  
内分泌学的考察~(海谷啓之)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

海谷 啓之 (KAIYA, Hiroyuki)  
独立行政法人 国立循環器病研究センター・  
研究所・室長  
研究者番号: 40300975

##### (2) 研究分担者

宮里 幹也 (MIYAZATO, Mikiya)  
独立行政法人 国立循環器病研究センター・  
研究所・部長  
研究者番号: 50291183

##### (3-1) 連携研究者

寒川 賢治 (KANGAWA, Kenji)  
独立行政法人 国立循環器病研究センタ  
ー・研究所・所長  
研究者番号: 00112417

##### (3-2) 内山 実 (UCHIYAMA, Minoru)

富山大学・理工学部・教授  
研究者番号: 50095072

##### (3-3) 松田 恒平 (MATSUDA, Kouhei)

富山大学・理工学部・教授  
研究者番号: 60222303

##### (3-4) 今野 紀文 (KONNO, Norifumi)

富山大学・理工学部・助教  
研究者番号: 50507051