

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440162

研究課題名(和文)ニホンヤモリの糖代謝関連ホルモンの分子生物学的な特徴の系統学的解析と生理学的意義

研究課題名(英文) Phylogenetic analysis of the molecular characteristics of glucose metabolism-related hormones and their physiological significance

研究代表者

朴 民根 (Park, Min Kyun)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・准教授

研究者番号：00228694

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)：外温性有羊膜類の中で、有鱗目は最も適応放散した動物であり、低いエネルギー要求性の寄与が考えられる。我々はニホンヤモリのインスリンとプログルカゴンの分子生物学的特徴を発見しており、本研究ではそれらの特徴がもつ有鱗目での系統学的背景を調べた。有鱗目インスリンの変異は有鱗目の分岐時から蓄積されており、dN/dS の推定値からニホンヤモリのインスリンの変異には強い適応進化圧を受けたことが示唆された。一方、一つのホルモンのみをコードするプログルカゴン mRNA は高い組織・系統特異性をもって有鱗目で発現・分布していた。今後、ニホンヤモリは有羊膜類の代謝機構の研究に有用なモデルとして寄与できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Among ectothermic amniotes, squamata is the most adaptively radiating group, and their lower energy requirement seems to have played a key role in this radiation. Recently, we found some distinguishing molecular characteristics in insulin sequence and proglucagon mRNA of the Japanese gecko. To map their phylogenetic background, we investigated those characters from various squamate species. Phylogenetic analysis of insulin suggest that squamate insulins have accumulated mutation after their divergence. Furthermore, the estimated values of dN/dS ratio suggest that insulin genes of the Japanese gecko have undergone adaptive evolution. On the other hand, single hormone (GLP-1 or GLP-2) encoding proglucagon mRNA variants were prominently expressed in the Gekkota species with tissue- and lineage specificity in the reptile clade. The obtained results suggest that the Japanese gecko could be a useful animal model to understanding of amniotes' energy metabolism.

研究分野：生物学

キーワード：insulin glucagon GLP-1 GLP-2 膵臓 肝臓 エネルギー代謝 ヤモリ

1. 研究開始当初の背景

哺乳類や鳥類、爬虫類の総称である有羊膜類は、羊膜内で胚を発生させることで陸上という不安定な環境に適応した脊椎動物である。陸上への適応の過程で、哺乳類と鳥類は体熱産生機構を獲得し、体温を一定に保つことで繁栄している。一方、体熱産生機構を獲得していない有羊膜類の動物を爬虫類と呼ぶ。このような外温性有羊膜類は、必要とするエネルギー量を大きく減らし、餌環境に応じた柔軟なエネルギー代謝調節が可能であると考えられる。中でも有鱗目ヤモリ下目の動物は「待ち伏せ型」捕食者であり、有鱗目の中でも最も少ないエネルギー消費によって繁栄している。我々は最近、日本産ヤモリ下目であるニホンヤモリ (*Gekko japonicus*) を用いた研究で、血糖量の調節に直接関与する膵臓ホルモンである insulin と proglucagon において次のような注目すべき分子生物学的特徴を発見した：ニホンヤモリの insulin アミノ酸配列の極めて低い保存性、GLP-1 または GLP-2 のみをコードする新規 mRNA の発見とその優占的な発現。エネルギー代謝に重要なホルモンでの著しい分子生物学的特性の変化がエネルギー代謝制御機構にどのような影響を与えるかを明らかにするために、その進化系統学的な背景の解明がまず重要な第一歩になると考えた。

2. 研究目的

ヤモリ下目の動物は有羊膜類の中でもエネルギー利用量を減らすことで適応繁栄している動物である。本研究ではニホンヤモリで発見した「insulin と proglucagon の分子生物学的特徴の進化的背景とその生理学的意義」を明らかにすることを目的とし、両ホルモンの分子生物学的特徴の進化系統学的背景を明らかにすることとした。

3. 研究の方法

1) 実験動物

動物飼育で飼育した個体は東京大学動物実験実施規則に基づいて管理した。ニホンヤモリ (*Gekko japonicus*) は東京都で採集した個体を用い、その他の動物は動物販売業者より購入した。全ての動物は断頭・脱血による屠殺し、採取した組織はすぐに液体窒素によって凍結し、使用するまで -80 で保存した。

2) RNA 抽出と cDNA 合成

Total RNA を ISOGEN (Nippon Gene) を用いて組織から抽出した。RACE に用いた cDNA は SMART RACE cDNA Amplification Kit (BD

Bioscience Clontech) を用いて、3 μ g の total RNA から合成した。RT-PCR に用いた cDNA は 3 μ g の total RNA を M-MLV reverse transcriptase (Promega) を用いて逆転写した。逆転写した産物は 1/6 に希釈し、使用まで -30 で保存した。

3) 塩基配列の解析

分子系統解析は CLUSTAL X (ve. 2.1) を用いて ORF の塩基配列アライメントを行い、近隣接合法により分子系統樹を作製した。各種設定は default のままとした。祖先型配列と dN/dS ratio の算出は同定した配列に対し、祖先型配列の推測と非同義置換/同義置換率 (dN/dS ratio) の推定を行った。一方各系統の dN/dS ratio 推定は codon substitution model[3] に基づいて解析を行うソフトウェア PAML4.7 CODEML を用いて異なる複数のモデルで行い、最適なモデルを Log likelihood Ratio Test によって検証した。解析は default の設定値で行った。

4) 分子系統解析

CLUSTAL X (ver.2.1) (<http://www.clustal.org/clustal2/>) を用いて ORF の塩基配列アライメントを行い、近隣接合法により分子系統樹を作製した。各種設定は default のままとした。

5) 祖先型配列と dN/dS ratio の算出

同定した配列に対し、祖先型配列の推測と非同義置換/同義置換率 (dN/dS ratio) の推定を行った。各系統の dN/dS ratio 推定は codon substitution model[3] に基づいて解析を行うソフトウェア PAML4.7 (<http://abacus.gene.ucl.ac.uk/software/paml.html>) CODEML を用いて異なる複数のモデルで行い、最適なモデルを Log likelihood Ratio Test によって検証した。解析は default の設定値で行った。

5) 各組織における mRNA の発現解析

逆転写には Oligo (dT) と M-MLV Reverse Transcriptase を用い、逆転写産物の終濃度が 25ng/ μ L になるよう希釈して cDNA サンプルを作製した。これをテンプレートとして、特異的プライマーを用いて PCR を行った。内部標準としては EF-1 α (Elongation Factor-1 alpha) を用いた。

4. 研究成果

本研究では、insulin と proglucagon の分子生物学的特徴の進化的背景を明らかにし、その生理学的意義を追求することを目的として計画・実行された。

1) 有鱗目 insulin アミノ酸配列の変異蓄積とその分子進化的解析

1-1) proinsulin 配列の同定

本研究では、有鱗目 25 種類 (ヤモリ下目 20 種、スキנק下目 3 種、Anguimorph 種、ヘビ類 1 種) とカメ目 1 種の proinsulin cDNA 配列を各動物の膵臓から同定した。

同定した proinsulin アミノ酸配列の相似性は、ヒトに対して 44-90%、ニワトリに対して 45-90%、アノルトカゲ (*Anolis carolinensis*) に対して 49-95% と動物種によって差が大きかった。一方、成熟 insulin 領域の相似性は同順に、60-92%、58-94%、58-98% とやや高い傾向がみられた。

有鱗目のうち最も相似性が低い種はサバンナモニターで、ヒト、ニワトリ、グリーンアノールに対する値は、それぞれ proinsulin 領域で 43%、50%、51%、成熟 insulin 領域で 60%、58%、58% となった。サバンナモニターに次ぐ相似性の低さはササクレヤモリで見られる。その値はヒト、ニワトリ、グリーンアノールに対しそれぞれ、proinsulin で 62%、62%、67%、成熟 insulin で 72%、74%、80% と、サバンナモニターの場合より 10-30% ほど高い。この 2 種間ほどの差は他の有鱗目の間では見られない。

各 chain の挿入・欠失は、ホルモンとして機能しない C-peptide に多くみられた。特にヤモリ下目では、他の有鱗目や既知の脊椎動物と比較して欠失が多くみられた。一方、成熟 insulin 領域では B-chain C 末端においてササクレヤモリ、ヒラオヤモリ、ホソユビヤモリが 2 残基を、ホオグロヤモリとサバンナモニターが 3 残基を欠失していた。A-chain については、ホソユビヤモリが C 末端に Ser と Lys の 2 残基、ヨロイトカゲが同じく C 末端に Ile、Glu、Ser の 3 残基を付加していた。ジスルフィド結合形成部位 (A7-B7、A20-B19、A6-A11) の Cys や PC 認識部位は保存されていたが、受容体結合部位や六量体形成に関わる残基に変異をもつ動物が存在した。

1-2) 祖先配列と dN/dS ratio の推定

有鱗目の insulin 変異がどのような分子進化の過程で獲得されたかを解析するため、選択圧の指標である非同義置換/同義置換率 (dN/dS ratio) と祖先型配列の推定を行った。解析は、dN/dS ratio の変遷モデルを複数構築し、PAML4、7 CODEML によって検定する方法で行った。その結果、最も支持されたモデルを図 1 に示す。有意水準 5% で支持されたモデルにおいて、dN/dS ratio の上昇が 1) 有鱗目の分岐 2) ヤモリ下目の分岐 3) ヤモリ科の分岐 4) イロワケヤモリの分岐 5) サバンナモニターの分岐 6) ニホンヤモリとミナミヤモリの共通祖先の分岐、の計 6 か所においてみられた。このうち 4)、5)、6) では 1 を超える dN/dS ratio が算出された。

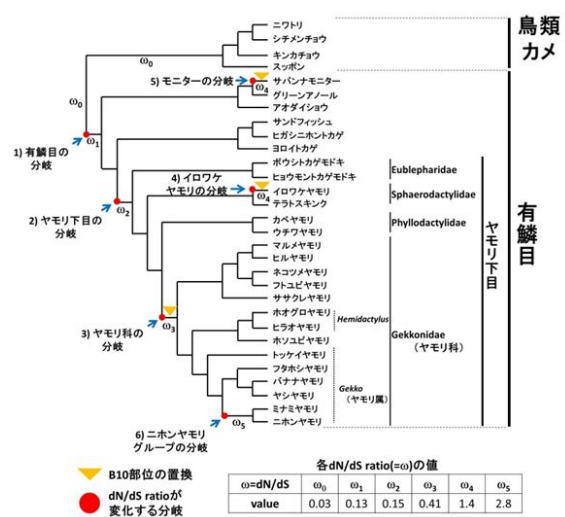


図 1. PAML により推定した配列と dN/dS ratio (=ω) の変遷。

有鱗目の insulin が経た分子進化を推測するため、祖先型配列と dN/dS ratio の推定を行った。推定は、配列を同定した種のほかに、既知の配列 (NCBI GenBank に登録のデータを使用) を加えて爬虫類・鳥類のグループで行った。dN/dS ratio の値は表で示した。

2) 有鱗目における proglucagon mRNA バリエーションの分子同定とその分子進化的解析

2-1) ニホンヤモリおよびトカゲモドキ proglucagon mRNA スプライスバリエーションの分子同定

Class A/B mRNA の増幅を目的とした 2 セットのプライマーペアを用いて、ニホンヤモリおよびトカゲモドキの膵臓または小腸 cDNA ライブラリを鋳型とした PCR 法をおこなった。得られた増幅断片から PPG-A/B 配列を同定した。各プライマーペアは、当研究室で同定済みであったニホンヤモリの部分配列を参考に、Class A/B mRNA の ORF 全長の増幅を目的として作成した。RT-PCR 法の結果、予想外に複数の増幅断片が計 3 種類みられたため各々の配列を同定した。Class A mRNA の増幅を目的とした PCR 法からは、ニホンヤモリおよびトカゲモドキ両種で PPG-A 配列 (ORF 456 塩基) より短い ORF (294 塩基) をもつ Class A mRNA 配列が同定された。Class B mRNA の増幅結果からは、両種で PPG-B 配列 (ORF 642 塩基) より短い ORF (288 塩基) をもつ Class B mRNA 配列が同定された。トカゲモドキでは、両配列の中間の長さの ORF (480 塩基) をもつ Class B mRNA 配列も併せて同定された (図 2 参照)。

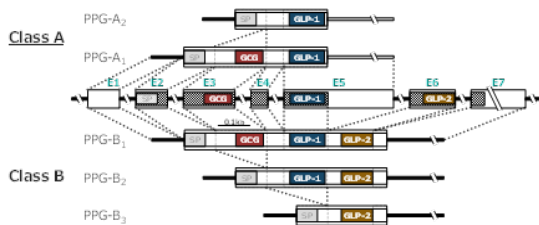


図 2. 有鱗目の proglucagon mRNA の各バリエーションとゲノム DNA の関係を表す模式図。

各バリエーションには、signal peptide と共に 1 つ以上のホルモン配列がコードされており、その組合せは全て異なっていた。すなわち、PPG-A₁ には glucagon および GLP-1 が、PPG-A₂ には GLP-1 のみがコードされ、PPG-B₁ は glucagon、GLP-1 および GLP-2 が、PPG-B₂ には GLP-1 および GLP-2 が、そして PPG-B₃ には GLP-2 のみがコードされている。

2-2) ニホンヤモリおよびトカゲモドキ proglucagon 遺伝子の組織発現解析

ニホンヤモリおよびトカゲモドキの各組織を用いた RT-PCR 法により、各バリエーションの発現様式を解析した。proglucagon 遺伝子の発現は主に膵臓や小腸でみられ、その発現様式は組織間で異なっていた。Class A mRNA の発現は、膵臓では PPG-A₁/A₂ 共にみられ、特に PPG-A₁ が優占していた。小腸では PPG-A₂ が優占していた。Class B mRNA の発現は、ニホンヤモリの膵臓で PPG-B₁/B₃ 共に同程度にみられ、トカゲモドキの膵臓では PPG-B₃ のみがみられた。ニホンヤモリ的小腸では PPG-B₃ が、トカゲモドキの小腸では PPG-B₂/B₃ が発現していたが、いずれの種においても PPG-B₃ が優占していた。また、胃や全脳においても PPG-B₃ の発現がみられた。

2-3) 有羊膜類 proglucagon 遺伝子発現様式の系統間比較

有鱗目の下位分類群である 6 下目の中で、ヤモリ下目を除いたスキルク下目・カナヘビ下目・ヘビ類・イグアナ下目・オオトカゲ類の各下目から 1 種ずつ計 5 種を、有鱗目以外の爬虫類 3 目のうちカメ目から 1 種を解析対象に加えた。また、PPG-A/B のみの発現が知られる鳥類、一つの PPG のみの発現が知られる哺乳類からも 1 種ずつを加え、計 10 種の有羊膜類を用いた。

スッポンおよびマウス以外の proglucagon mRNA 配列は未報告であったため、他種配列から作成したプライマーペアを用いて PPG-A₁ (または proglucagon A₁、PG-A₁) および PPG-B₁ (または PG-B₁) 塩基配列を膵臓および小腸 cDNA ライブラリから同定した。同定された各配列がコードすると推定されるアミノ酸配列を他動物種の配列と比較

した。PGDPs 配列内に挿入・欠失は認められず、また各ホルモン配列の N/C 末端側にはプロセシング酵素 PC2、PC1/3 の認識・切断部位となる塩基性アミノ酸が保存されていた。爬虫類・鳥類に特異的な exon 4 は、用いた全ての爬虫類で保存されていた。

同定した cDNA 配列を参考に作成したプライマーペアを用いて、各動物種の膵臓および小腸 cDNA ライブラリを鋳型とした RT-PCR 法をおこなった。解析の結果、全ての動物種において proglucagon 遺伝子の発現がみられた。また、用いた全ての爬虫類で exon 3 を欠いたバリエーション (PPG-A₂/B₂/B₃) が同定された。Class A mRNA では、カメ目のスッポンでは膵臓や小腸で PPG-A₂ の発現がみられ、その発現強度は PPG-A₁ と同程度であった。有鱗目 Unidentata (スキルク下目・カナヘビ下目・ヘビ類・イグアナ下目・オオトカゲ類) に属する 5 種では PPG-A₁/A₂ の発現がみられた。膵臓では、PPG-A₁ が優占的に発現しており、小腸では PPG-A₂ が優占的または PPG-A₁ と同等に発現していた。一方、Class B mRNA では、スッポンの膵臓や小腸で PPG-B₂ の発現がみられたが、その発現強度は PPG-B₁ と同程度であった。Unidentata に属する 5 種では PPG-B₁/B₂ が発現していた。膵臓では、PPG-B₁ の発現がみられ、小腸では PPG-B₂ が優占的に発現していた。一方、PPG-B₃ の発現はヤモリ下目でのみみられた。

3) 今後の研究展望

本研究で行われた進化系統学的解析から、insulin 配列での高い変異と、一つのホルモン (GLP-1 又は GLP-2) のみをコードするプログルカゴン mRNA バリエーションの発現が、ヤモリ下目の動物種で最も顕著であることが明らかとなった。特にニホンヤモリが含まれるヤモリ属では insulin 変異が環境適応的なものである可能性も示唆された。省エネルギー型であると考えられるヤモリ類の代謝制御機構の解明に、ニホンヤモリは重要なモデル動物として大きく寄与できることが示唆された。ニホンヤモリの体内には明瞭な脂肪組織が存在しておらず、肝臓に多くの脂肪が蓄積され、脂肪組織特異的なホルモン (adiponectin) が発現していることも本研究の結果として得られており、今後、肝臓を中心としたエネルギー代謝系の酵素群の発現変動の解析を通じて、哺乳類に最も近い動物種でのエネルギー代謝系の新たな知見が得られることが期待されており、今後もこの方向で研究を続けていく。

(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3件) (全て査読有)

Mawaribuchi S, Musashijima M, Wada M, Izutsu Y, Kurakata E, Park MK, Takamatsu N, and Ito M. (2017) Molecular Evolution of Two Distinct *dmrt1* Promoters for Germ and Somatic Cells in Vertebrate Gonads. *Molecular biology and evolution* 34(3): 724-733. DOI:

10.1093/molbev/msw273

Yamagishi G, Yoshida A, Kobayashi A, and Park MK (2016) Molecular characterization of insulin from squamate reptiles reveals sequence diversity and possible adaptive evolution. *Gen. Comp. Endocrinol.* 225(): 197-211. DOI:

10.1016/j.ygcen.2015.08.021

Otake S. and Park MK (2016) Expressional changes of AMH signaling system in the quail testis induced by photoperiod. *Reproduction* 152(5): 575-589. DOI: 10.1530/REP-16-0175

[学会発表](計14件)

朴民根、大嶽茂雄(2016年)成体ウズラの精巣における性分化関連遺伝子の発現変動とその生理学的意義、第40回日本鳥類内分泌学会、2016年11月3-4日、ホテルメルパルク松山(愛媛県、松山市)(要旨集46-47)。

Yamagishi G, and Park MK (2016) Lipid accumulation and adipose tissue-like gene expression in the liver of the Japanese gecko (*Gekko japonicus*). The joint meeting of the 22nd International Congress of Zoology and the 87th Meeting of the Zoological Society of Japan, Nov. 14-19, Okinawa Convention Center (Okinawa, Ginowan), Abstract p404.

Kaiya H, Park MK, Kanagawa K, and Miyazato M (2016) Identification of ghrelin and its receptor in Japanese gecko, *Gekko japonicus*. The joint meeting of the 22nd International Congress of Zoology and the 87th Meeting of the Zoological Society of Japan, Nov. 14-19, Okinawa Convention Center (Okinawa, Ginowan), Abstract p360.

山岸弦記・朴民根(2016)“脊椎動物の陸上移行とエネルギー代謝”、第41回日本比較内分泌学会シンポジウム：内分泌現象から見た生物の不思議 - 時・継・愛・恒・巡・守 -、2016年12月9-11日、(北里大学、神奈川県、相模原)(p35)。

海谷啓之、朴民根、寒川賢治、宮里幹也(2016)ニホンヤモリにおけるグレリン

とその受容体の同定、第41回日本比較内分泌学会大会、2016年12月9-11日、北里大学、神奈川県、相模原)(p40)。

倉形絵里奈、朴民根(2016)爬虫類の proglucagon 遺伝子の構造と mRNA のスプライシング様式、第41回日本比較内分泌学会大会、2016年12月9-11日、北里大学、神奈川県、相模原)(p70)。

山岸弦記・朴民根(2016)ニホンヤモリの insulin とその標的器官にみられる適応的な分子機構。第41回日本比較内分泌学会大会、2016年12月9-11日、北里大学、神奈川県、相模原)(p71)。

Oatake S, and Park MK (2015) Expression changes of genes related to the AMH signaling systems during the progression of spermatogenesis in the Japanese quail. 第40回日本比較内分泌学会大会・日本比較生理生化学会第37回大会合同大会、2015年12月11-14、JMS アステールプラザ(広島県広島市) 要旨集 p51。

Kurakata E, and Park MK (2015) Characterization of preproglucagon mRNA variants encoding only glucagon in Gekkota. 第40回日本比較内分泌学会大会・日本比較生理生化学会第37回大会合同大会、2015年12月11-14、JMS アステールプラザ(広島県広島市) 要旨集 p63。

Yamagishi G, and Park MK (2015) Molecular evolution and tissue distribution of glucose-6-phosphatase catalytic subunit (G6PC) in reptiles. 第40回日本比較内分泌学会大会・日本比較生理生化学会第37回大会合同大会、2015年12月11-14、JMS アステールプラザ(広島県広島市) 要旨集 p40。

Kurakata E, Suzuki Y, Yoshida A, Kobayashi A, and Park MK (2014) Molecular characterizations and expression analysis of preproglucagon mRNA variants specific to reptiles. In “Abstract of JSCE 2014 and ISAREN 2014”, pp 97. (Session 5: Metabolism, The 8th International Symposium on Amphibian and Reptilian Endocrinology and Neurobiology (ISAREN 2014), November 7-9, 2014, National Institute for Basic Biology (Aichi, Okazaki).

Yamagishi G, Yoshida A, Kobayashi A, and Park MK (2014) Molecular characterization of highly divergent insulins from squamates. In “Abstract of JSCE 2014 and ISAREN 2014”, pp98. (Session 5: Metabolism, The 8th International Symposium on Amphibian and Reptilian Endocrinology and Neurobiology (ISAREN 2014), November 7-9, 2014, National Institute for Basic Biology (Aichi, Okazaki).

Yamagishi G, and Park MK (2014)

Molecular characterization of squamate insulins and its receptors, and their evolutionary implication. In "Abstract of JSCE 2014 and ISAREN 2014", pp155. (Joint Meeting of the 39nd Annual Meeting of the Japanese Society of Comparative Endocrinology (JSCE) and the 8th International Symposium on Amphibian and Reptilian Endocrinology and Neurobiology (ISAREN 2014), Nov. 7-9, 2014, National Institute for Basic Biology (Aichi, Okazaki). Otake S, and Park MK (2014) Expression analysis of TGF- β superfamily members in the adult testis of the Japanese quail, In "Abstract of JSCE 2014 and ISAREN 2014", pp151. (Joint Meeting of the 39nd Annual Meeting of the Japanese Society of Comparative Endocrinology (JSCE) and the 8th International Symposium on Amphibian and Reptilian Endocrinology and Neurobiology (ISAREN), Nov. 7-9, 2014, National Institute for Basic Biology (Aichi, Okazaki).

[図書] (計 6 件)

朴民根・山岸弦記 (2016) 第 5 章 両生類と爬虫類の移動”第 6 巻 回遊・渡り：ホルモンから見た生命現象と進化シリーズ”、安東宏徳・浦野明央編、日本比較内分泌学会、裳華房、169 (pp84-100)。

Park MK (2016) Glucagon family, In "Handbook of Hormones: Comparative Endocrinology for Basic and Clinical Research", Ed by Y. Takei, H. Ando and K. Tsutsui, Elsevier, 646 (pp127-128, +5 supplements).

Park MK (2016) Gastric Inhibitory Peptide, In "Handbook of Hormones: Comparative Endocrinology for Basic and Clinical Research", Ed by Y. Takei, H. Ando and K. Tsutsui, Elsevier, 646 (pp129-134, +7 supplements).

Park MK (2016) Glucagon, In "Handbook of Hormones: Comparative Endocrinology for Basic and Clinical Research", Ed by Y. Takei, H. Ando and K. Tsutsui, Elsevier, 646 (pp132-134, +6 supplements).

Park MK (2016) Glucagon-like peptide-1, In "Handbook of Hormones: Comparative Endocrinology for Basic and Clinical Research", Ed by Y. Takei, H. Ando and K. Tsutsui, Elsevier, 646 (pp135-137, +7 supplements).

Park MK (2016) Glucagon-like peptide-2, In "Handbook of Hormones: Comparative Endocrinology for Basic and Clinical Research", Ed by Y. Takei, H. Ando and K. Tsutsui, Elsevier, 646 (pp138-139, +7 supplements).

〔産業財産権〕
○出願状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

朴民根 (PARK, MIN KYUN)
東京大学・大学院理学系研究科・准教授
研究者番号：00228694

(2)研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：