

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 13 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870386

研究課題名(和文) 魚類と両生類から明らかにする新型アドレノメデュリンの機能：免疫・造血系に着目して

研究課題名(英文) Biological function of novel adrenomedullins in teleosts and amphibians: focusing on hematopoietic and immune system

研究代表者

御輿 真穂 (Maho, Ogoshi)

岡山大学・自然科学研究科・助教

研究者番号：00527997

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：脊椎動物において新規に発見されたアドレノメデュリン(Adrenomedullin, AM)の造血への関与について解析した。硬骨魚類のメダカにおいて、赤血球を特異的に破壊するとAM3の遺伝子発現が誘導されたことから赤血球産生への関与が示唆される。また、両生類のネツタイツメガエルでは胚の腹部血島にAM5のmRNA局在が観察され、成体においてはAM5遺伝子が造血幹細胞において発現していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We examined the hematopoietic function of novel adrenomedullins in vertebrates. The AM3 gene expression was induced after hemolytic anemia in teleost fish, medaka, suggesting its role in erythropoiesis. In *Xenopus tropicalis*, AM5 mRNA was detected in the ventral blood island at tailbud stage embryo and was expressed in adult hematopoietic stem cells.

研究分野：比較内分泌学

キーワード：アドレノメデュリン 造血 脊椎動物 メダカ ネツタイツメガエル

1. 研究開始当初の背景

アドレノメデュリン(adrenomedullin, 以下 AM)は、哺乳類や魚類で体液調節に重要な機能をもつホルモンである。ゲノム情報の利用により、それまで AM1 の 1 種類であると考えられていた AM が魚類では 5 種類からなるファミリーをなすことが見出され、魚類のこの発見をもとに哺乳類でもそれまで知られていなかった AM2 および AM5 が発見された。

AM2 と AM5 の機能については、先行研究の多い AM1 と同様の機能について解析されることが多いが、各々のタイプ間での相同性は低い。そのため、AM5 に特異的な作用が存在する可能性は高い。AM5 はブタなど哺乳類のいくつかの種では保存されているが、ヒトやラット・マウスでは欠損している。また、魚類と哺乳類以外の系統群では、四足動物の祖先に近い両生類のゲノムで AM5 遺伝子を発見している。AM1 および AM2 は全身の組織に発現しているが、AM5 は魚類の造血器官である腎臓、および同定された種の脾臓や胸腺に特異的に発現しており、免疫・造血への関与が示唆された。

2. 研究の目的

本研究では脊椎動物の主な系統群を用いて、AM5 の作用を明らかにすることを目的とした。脊椎動物全体の祖先に近い魚類、および四足動物の祖先といえる両生類において、それぞれのモデル動物を用いた。

- (1) 硬骨魚類のモデル動物にはメダカを用いる。AM5 遺伝子の組織分布を解析する。また、新型 AM 遺伝子ノックダウン/ノックアウト個体を作成し、免疫系・造血系の発生における表現型を解析する。また、薬剤処理によって赤血球を特異的に破壊し、AM5 遺伝子の発現動態を解析する。
- (2) 両生類のモデル動物にはネツタイツメガエルを用いる。野生型の初期発生胚における AM5 遺伝子の発現時期と局在、および成体における AM5 遺伝子の局在を同定する。

3. 研究の方法

(1)メダカにおける AM5 遺伝子の解析

成体のメダカから頭部、鰓、腸、脾臓、肝臓、腎臓、卵巣を採取し、RNA を抽出し逆転写後 Real-time PCR 法によって AM5 遺伝子の発現量を解析した。また、塩濃度の異なる飼育水に移した際の遺伝子発現動態についても同様に解析した。

フェニルヒドラジン(PHZ)を 2mg/L 添加した飼育水にメダカを 20 分間曝露させた後、経時的に血液と腎臓を採取して AM ファミリー遺伝子の発現動態を解析した。

CRISPR/Cas9 システムを利用したゲノム編集技術により、新型 AM 遺伝子のノック

アウト個体作出を行った。

(2) ネツタイツメガエルにおける AM5 遺伝子の解析

NF stage 14-33 の胚を採取し、RNA を抽出し逆転写後 RT-PCR 法によって AM5 遺伝子の発現を解析した。また、whole mount *in situ* hybridization 法を用いて NF stage 29-32 の胚における AM5 mRNA の局在を解析した。

成体の肺、心臓、胃、肝臓、腎臓、脾臓、血液を採取し、Real-time PCR 法によって AM5 遺伝子の発現を解析した。また、Percoll を用いた密度勾配法によって血液細胞を分離し、ギムザ染色による形態学的観察を行った。さらに、各々の分画における AM5 遺伝子の発現量を比較した。

4. 研究成果

(1) メダカにおける AM5 遺伝子の解析

メダカ AM ファミリーに属する全ての遺伝子を解析した結果、肝臓において AM3 および AM5 の発現が高く、腎臓で AM1、AM3、AM4、AM5 の発現が高かった(図 1)。

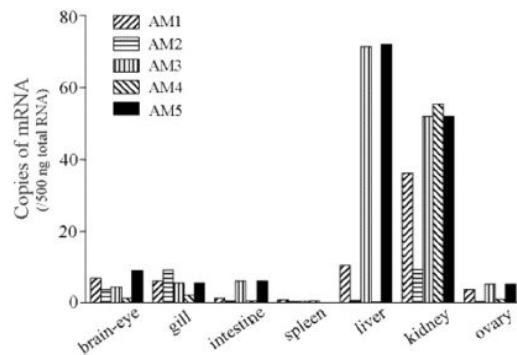


図 1. メダカ AM ファミリー遺伝子の淡水における組織分布

メダカを淡水(0 ppt)、汽水(11 ppt)、海水(33 ppt)にそれぞれ馴致させた際の AM ファミリー遺伝子の発現動態を解析したところ、5 タイプ全てが浸透圧刺激によって解析した組織のいずれかにおいて発現量を変化させた。腎臓を例にとると、AM1 と AM3 は発現量に変化がみられなかった。AM2 は 11 ppt、AM4 は 0 ppt において高発現し、AM5 は 33 ppt での発現量が減少していた。分子進化の解析により 5 種類の AM 遺伝子は 3 グループに分けられることがわかっており、AM1/AM4、AM2/AM3 はそれぞれ硬骨魚類の系統でゲノム重複によって生じたパラログである。しかし進化の過程でそれぞれが独自の機能をもつようになり、発現解析の結果から、AM1 と AM3 は腎臓における浸透圧調節作用をもたないと考えられる。魚類の腎臓は体液調節だ

けではなく造血を担う組織でもあるため、発現のみられる AM1 および AM3 は造血にかかわる可能性がある。この成果については論文として発表した。

PHZ の曝露による赤血球破壊後 1 日でメダカのヘマトクリットは約 60% 減少し、貧血を呈した。腎臓における AM ファミリー遺伝子の発現変化を解析したところ、AM5 遺伝子は PHZ 曝露後 1 日で対照群に比べて有意な発現量の増加がみられた。しかし、予想に反して AM3 遺伝子が PHZ 曝露後 3h および 3 日で有意な発現量の増加がみられ、その増加率は AM5 遺伝子よりも大きかった。赤血球産生が誘導されていることの指標として、造血ホルモンであるエリスロポエチン (Epo) の発現変化も解析したところ、Epo は PHZ 曝露後 6h から 1 日で発現量が増加した。この成果については現在投稿論文を準備中である。

研究開始当初は、AM ファミリーのうち他の動物で造血器官に特異的に発現する AM5 遺伝子がメダカにおいても造血に重要であると予想していたが、この実験結果はメダカにおいては AM5 よりもむしろ AM3 遺伝子が造血に関わることを示唆するものであった。そのため、次項のノックアウトメダカ作出においては、AM3 遺伝子をターゲットとすることにした。

前項の結果を踏まえ、メダカ AM3 遺伝子をターゲットとして CRISPR/Cas9 を設計した。受精卵に Cas9 mRNA、crRNA、tracrRNA をインジェクションし、F0 世代の AM3 変異体を得た。現在、変異が固定された F1 世代の作出を試みている。

(2) ネットイツメガエルにおける AM5 遺伝子の解析

NF stage 14-33 の胚における AM5 遺伝子の発現を解析したところ、孵化直後であるステージ 24 以降に発現がみられた。血液細胞分化の指標として転写因子 gata-1 の発現についても解析した結果、AM5 遺伝子と同時期のステージ 24 以降に発現がみられた。

ステージ 29-32 の尾芽胚における whole mount *in situ* hybridization によって、AM5 mRNA のシグナルは腹部血島に観察された。腹部血島には造血幹細胞、造血前駆細胞、血管芽細胞が集まり、後に主要な造血組織である肝臓、脾臓へと分化する。赤血球の分化を制御する gata-1 のシグナルも腹部血島に観察されたため、ネットイツメガエル AM5 遺伝子は器官発生のステージにおいて造血に関与することが示唆された。この成果については現在投稿論文を準備中である。

成体の各組織において AM5 遺伝子の発現を解析したところ、解析した全ての組

織で発現がみられたが、とりわけ脾臓と血液において高発現し、次いで肺と腎臓で高い発現傾向がみられた。造血に関わる gata 転写因子群のうち、赤血球の分化を誘導する gata-1、造血幹細胞に発現する gata-2、および T リンパ球の分化を誘導するとされる gata-3 の各遺伝子についても同様に解析した結果、AM5 遺伝子と発現パターンが一致するものはみられなかった。gata-1 は血液において顕著に発現が高く、gata-2 は肺と血液で高発現していた。gata-3 は腎臓において高い発現がみられた。前項の whole mount *in situ* hybridization の結果から、本項の実験開始時においては gata-1 と AM5 遺伝子が似た発現傾向を示すと予想していたが、gata-1 はほぼ血液においてのみ高発現するという異なるパターンを示した。AM5 遺伝子と gata-2 がともに肺と血液で高い発現を示したことから、AM5 遺伝子は赤血球よりもむしろ造血幹細胞において発現している可能性が考えられる。

そこで、次に血液細胞の単離を試みた。Percoll 法による密度勾配を利用してネットイツメガエルの血液を遠心分離し、ヒト血球の比重を参考にして赤血球を含む分画 A と白血球を含むと考えられる分画 B とに分けた。ヘモグロビンを構成する β -globin の遺伝子発現は分画 A で顕著に高く、分画 B ではほとんど検出されなかったことから、分画 A は赤血球分画であるといえる。また、ギムザ染色による形態学的観察によって、分画 A に含まれる細胞はほぼ赤血球であり、分画 B には顆粒球が多く含まれることを確認した。これらの分画における AM5 遺伝子および gata-2 の発現を解析したところ、有意差は検出されなかったものの両者とも分画 B において発現量が高い傾向がみられた。

分画 B には複数種の血液細胞が含まれると考えられたため、さらにこの分画を細分化して AM5 遺伝子および gata-2 の発現を調べた。ヒトにおいては造血幹細胞をはじめとする単核細胞が含まれる比重 1.074-1.082 g/ml の分画をネットイツメガエル血液から採取して解析した結果、AM5 遺伝子と gata-2 がともにその他の分画に比べて高く発現する傾向がみられた。このことから、AM5 は造血幹細胞に発現すると推定される。現在、セルソーターを用いてより正確な血液細胞の単離を行い、AM5 発現細胞の同定を進めている。

以上の成果から、脊椎動物 AM ファミリーに属するホルモンには造血に関わるタイプがあることが示唆された。硬骨魚類のメダカでは AM3 が赤血球産生に関与し、両生類のネットイツメガエルでは AM5 が造血幹細胞の

分化に関わると考えられる。

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 1 件)

Ogoshi M, Kato K, Sakamoto T, Effects of environmental salinity on expression of all the adrenomedullin genes suggest their osmoregulatory actions in the medaka, *Oryzias latipes*, *Zoological Letters* 1:12, 2015

doi:10.1186/s40851-015-0012-5

〔学会発表〕(計 1 件)

Ogoshi M, Yamaura S, Aoyagi K, Takeuchi S, Takahashi S, Adrenomedullin 5 expresses in the hematopoietic tissues in *Xenopus tropicalis*, 第 40 回日本比較内分泌学会・第 37 回日本比較生理生化学会合同大会 (CompBiol 2015 広島大会) 2015

〔図書〕(計 2 件)

Ogoshi M, Calcitonin Gene-Related Peptide; Calcitonin Receptor-Stimulating Peptide; Adrenomedullin; Adrenomedullin 2 and 5; Amylin, in: Handbook of Hormones: Comparative Endocrinology for Basic and Clinical Research, edited by Takei Y, Ando H, Tsutsui K, Academic Press, 2015, pp 235-246

御輿 真穂、坂本 竜哉、水・電解質代謝とホルモン、「ホメオスタシスと適応 恒」海谷啓之・内山実共編、裳華房、2016、印刷中

6. 研究組織

(1)研究代表者

御輿 真穂 (OGOSHI, Maho)

岡山大学・大学院自然科学研究科・助教

研究者番号：00527997