

博士論文

家禽における視床下部分泌性小タンパク質
NPGL 及び NPGM の生理機能に関する研究
(要約)

Studies on biological action of
neurosecretory protein GL and
neurosecretory protein GM in poultry
species
(Digest)

令和 6 年 3 月

広島大学大学院統合生命科学研究科

統合生命科学専攻

生命環境総合科学プログラム

加藤 正暉

目次	1
第1章 序論	2
第2章 ニワトリ・ヒナにおける NPGL 及び NPGM の生理機能解析	2
第3章 ウズラにおける NPGL 及び NPGM の生理機能解析	3
第4章 <i>NPGL</i> 及び <i>NPGM</i> のノックアウトニワトリ・ウズラ作成のための guide RNA の設計	3
第5章 結論	4
参考文献	5

学位論文の要約

第1章 序論

家禽は、食用となる卵や肉に宗教的忌避感が少なく、安価で栄養価が高いことから世界の食糧生産を支える重要な畜産物である。我が国においても近年の消費者の低価格志向・健康志向の高まりによって、家禽の肉や卵を効率的に産出することが望まれている。そこで、家禽の効率的な生産を実現するために、家禽の摂食行動やエネルギー代謝のメカニズムに焦点を当てた研究が行われている。しかし、家禽の摂食行動やエネルギー代謝には未知の部分が多く、その全容は十分に解明されているとは言えない。

近年、鳥類の視床下部からパラログ関係にある2種類の分泌性小タンパク質 (neurosecretory protein GL: NPGL, neurosecretory protein GM: NPGM) をコードする新規遺伝子が同定されている。これらの遺伝子はエネルギー代謝の中枢である視床下部に特異的に発現し、脊椎動物に広く保存されていることから、エネルギー代謝調節に関わる重要な遺伝子であると推測されている。実際、NPGL に関してはラットでの脳室内慢性投与や遺伝子過剰発現実験によって、過食や脂肪蓄積に関する生理機能を有することが示されている。家禽に関しては、長期的な作用やエネルギー代謝における機能的役割については未だ明らかにされていない。また、NPGM に関しては、鳥類を含むすべての動物種で生理機能解析は行われていない。したがって本研究では、家禽 (ニワトリ・ウズラ) における NPGL 及び NPGM の生理機能を明らかにすることを目的とした。

第2章 ニワトリ・ヒナにおける NPGL 及び NPGM の生理機能解析

NPGL 及び NPGM の生理機能を解析するにあたって、環境の変化が NPGL 及び NPGM の遺伝子発現に与える影響は明らかになっていない。そこでニワトリ・ヒナを様々な環境下 (絶食, 暑熱, 炎症, 単離飼育) で飼育し、遺伝子発現を解析した。その結果、NPGL の遺伝子発現は単離飼育のみに応答し、NPGM の遺伝子発現は絶食, 炎症, 単離飼育に応答した。これらの結果から、NPGL 及び NPGM はそれぞれ環境の変化に応答して遺伝子発現量が変動すること、NPGL よりも NPGM の方が環境の変化に対する感受性が高いことが明らかになった。

次に、NPGL 及び NPGM がニワトリ・ヒナに与える影響を脳室内慢性投与によって解析した。8日齢のヒナに NPGL を13日間投与した結果、体重、摂食量、飲水量が増加した。また、腹腔内脂肪、皮下脂肪の重量が有意に増加し、肝臓と腹腔内脂肪組織で脂肪の蓄積が確認された。遺伝子発現解析の結果、肝臓では脂肪酸化因子の発現が減少しており、腹腔内脂肪では脂肪合成因子の発現増加と脂肪酸化因子の発現減少が認められた。同様の手法で NPGM を13日間投与した結果、体重、飲水量は有意に増加したが、摂食量に変化は認められなかった。組織重量では腹腔内脂肪の重量が増加した。また、肝臓と腹腔内脂肪組織で脂肪の蓄積が確認された。遺伝子発現解析の結果、肝臓で

脂肪酸化因子の発現が減少していたが、腹腔内脂肪では脂質代謝因子の発現に変化はなかった。以上の解析から、NPGL 及び NPGM はニワトリ・ヒナにおいて脂肪蓄積作用を有することが示唆された。

第3章 ウズラにおける NPGL 及び NPGM の生理機能解析

ニワトリ・ヒナを用いた解析から、NPGL 及び NPGM は脂肪蓄積作用を有することが示唆された。しかし、性成熟以降の生理機能は不明である。そこで、成熟過程での解析が容易なニホンウズラ (*Coturnix japonica*)を用いた解析を行った。しかし、ウズラにおける NPGL 及び NPGM に関する先行研究はないため、前駆体遺伝子の同定から行った。

NPGL 及び NPGM のシーケンス解析を行った結果、NPGL の成熟タンパク質は 80 アミノ酸残基、ニワトリとは 1 アミノ酸残基だけ異なり、相同性は 99%であった。NPGM の成熟タンパク質は 83 アミノ酸残基であり、ニワトリとの相同性は 100%であった。また、脳内の局在を解析した結果、NPGL は漏斗核と正中隆起に局在しており、NPGM は乳頭体核に局在していた。遺伝子発現量を雌雄で比較した結果、NPGL mRNA 発現はメスで高く、NPGM mRNA の発現には性差がないことが示された。加えて、絶食負荷による遺伝子発現を解析した結果、NPGL mRNA 発現はオスで増加したが、メスでは増加しなかった。一方、NPGM mRNA の発現はオス・メスともに絶食負荷で増加することが明らかになった。以上の結果から、NPGL 及び NPGM は視床下部内での局在が異なり、NPGL の遺伝子発現に性差が見られることが明らかになった。

次に、NPGL 及び NPGM がウズラに与える影響を脳室内慢性投与によって解析した。その結果、NPGL と NPGM は性成熟以降においてもエネルギー代謝に作用することが明らかになった。

ウズラは渡り行動に必要なエネルギーを蓄えるために日照時間の変化が刺激となり脂肪を蓄積することが知られている。そこで渡り行動と NPGL 及び NPGM の関連性を明らかにするために、日照時間の変化に伴う NPGL と NPGM の遺伝子発現量を解析した。その結果、NPGL は渡り行動前の生理的変化に重要な役割を担っていることが示唆される結果が得られた。

第4章 NPGL 及び NPGM のノックアウトニワトリ・ウズラ作成のための guide RNA の設計

これまで外因性の NPGL 及び NPGM の生理作用を明らかにしてきたが、今後は内因性の NPGL 及び NPGM の生理機能を明らかにする必要がある。鳥類は卵生であり、胚に占める卵黄の割合が大きいためから胚操作が困難であったが、始原生殖細胞に対する胚操作の確立と CRISPR-Cas9 の開発によって鳥類でもゲノム編集が可能になっ

ている。そこで、NPGL 及び NPGM のノックアウトニワトリ・ウズラの作成に必要な guide RNA (gRNA) の設計を行った。

gRNA の設計には様々な Web ツールが用いられているが、ニワトリとウズラのゲノムデータベースセットが利用できるツールとして UC SANTA CRUZ が提供している CRISPOR を用いた。gRNA の長さは 20bp で PAM 配列の設定は NGG とした。また候補配列のうちオフターゲットリスクが低く、かつシグナルペプチドもしくは成熟タンパク質の上流で切断が起きる様に設計した。また設計した gRNA の配列を BLAST 検索し、特異性を確認した。以上の条件で、ニワトリとウズラの NPGL 及び NPGM 特異的な gRNA の候補をそれぞれ 3 種類設計することができた。今後は、培養細胞を用いた Cel-1 assay による gRNA の活性を評価する予定である。

第 5 章 結論

NPGL 及び NPGM の家禽における生理機能として、共通して脂肪蓄積作用があることを明らかにした。NPGL に関しては、先行研究の哺乳類のラットやマウスで認められている効果と同様であった。一方、NPGM に関してはどの動物種でも解析が進んでいなかったが、家禽を用いて初めて生理作用を明らかにすることができた。

NPGL と NPGM はパラログ関係にある遺伝子であり、ニワトリ・ヒナを用いた解析では環境変化に対する応答性が異なることが明らかになった。ウズラを用いた解析によって、NPGL と NPGM の脳内の局在や、NPGL の遺伝子発現は雌雄で異なっていることを明らかにした。これらの結果から NPGL と NPGM はエネルギー代謝に作用して脂質代謝を制御する因子であるが、その発現制御や末梢組織への作用メカニズムは異なっていることが示唆された。また、渡り鳥の季節性に関しては、繁殖期に視床下部や下垂体に発現する甲状腺刺激ホルモンや脱ヨード化酵素が性成熟を促進することが報告されてきたが、渡り前の脂肪蓄積における脳内のメカニズムは明らかになっていなかった。本研究によって、NPGL が渡り行動に関わる重要な因子である事が示唆された。一方、NPGM は日照時間変化において応答を示さなかったが、投与実験の結果から卵巣の成熟などに関わる可能性が示された。

近年、鳥類でのゲノム編集技術が確立されたことによって内因性の NPGL 及び NPGM の生理機能に着目した研究を進めることが可能となった。そこで、NPGL 及び NPGM によるエネルギー代謝制御メカニズムの解明のために遺伝子ノックアウト家禽の作出を計画している。ノックアウト家禽の解析を進めることで、NPGL と NPGM の生物学的意義を明らかにする研究や家禽生産の向上につながる研究へと展開していく予定である。また、本研究によって明らかになった家禽における NPGL と NPGM の脂肪蓄積作用は、食品や家禽の肥満予防など畜産分野への応用が可能である。よって、今後は NPGL 及び NPGM の作用メカニズムの研究を通じて、家禽のエネルギー代謝を明らかにしていく必要がある。

参 考 論 文 (学位要件論文)

1. Kenshiro Shikano#, Eiko Iwakoshi-Ukena#, Masaki Kato#, Megumi Furumitsu, George E Bentley, Lance J Kriegsfeld, Kazuyoshi Ukena, Neurosecretory Protein GL Induces Fat Accumulation in Chicks. *Frontiers in Endocrinology*, Volume 10, Article 00392, 2019 (# コファーストオーサー)
2. Masaki Kato, Eiko Iwakoshi-Ukena, Megumi Furumitsu, Kazuyoshi Ukena, A Novel Hypothalamic Factor, Neurosecretory Protein GM, Causes Fat Deposition in Chicks. *Frontiers in Physiology*, Volume 12, Article 747473, 2021
3. Masaki Kato, Eiko Iwakoshi-Ukena, Yuki Narimatsu, Megumi Furumitsu, Kazuyoshi Ukena, Effect of Stressors on the mRNA Expressions of Neurosecretory Protein GL and Neurosecretory Protein GM in Chicks. *Frontiers in Physiology*, Volume 13, Article 860912, 2022
4. Masaki Kato, Eiko Iwakoshi-Ukena, Yuki Narimatsu, Megumi Furumitsu, Kazuyoshi Ukena, Expression of mRNAs Encoding Hypothalamic Small Proteins, Neurosecretory Protein GL and Neurosecretory Protein GM, in the Japanese Quail. *Zoological Science*, Volume 41, 2024

関 連 論 文

1. Kenshiro Shikano, Masaki Kato, Eiko Iwakoshi-Ukena, Megumi Furumitsu, Daichi Matsuura, Keiko Masuda, Tetsuya Tachibana, George E Bentley, Lance J Kriegsfeld, Kazuyoshi Ukena, Effects of intracerebroventricular infusion of neurosecretory protein GL on body mass and food and water intake in chicks. *General and Comparative Endocrinology*, Volume 256, 37-42, 2018