

Gh-Igf1 axis 関連因子がアフリカチビネズミの矮小性に与える影響の解明

松屋 純人

鹿児島大学 共同獣医学部

〒890-0065 鹿児島市郡元 1-21-24

TEL: 099-285-8711

要旨

哺乳動物の体の大きさの調節メカニズムにおいて、Gh-Igf1 axis（成長ホルモン-インスリン様成長因子 1 シグナル伝達経路）は重要なシグナル伝達経路として知られる。アフリカチビネズミ（*Mus minutoides*）は最小の哺乳動物の一つであるが、その矮小性がどのように制御されているかは明らかにされていない。本研究では、アフリカチビネズミの Gh-Igf1 axis 関連因子の分子生物学的な解析を行った。その結果、アフリカチビネズミの *Igf1* 遺伝子および *Igfals* 遺伝子の配列を明らかにし、マウスとの比較解析およびバイオインフォマティクス解析を組み合わせることによって、アフリカチビネズミのそれぞれのタンパク質において特徴的なアミノ酸残基を同定した。今後は、アフリカチビネズミの *Igf1* 遺伝子の塩基配列を明らかにするとともに、*in vitro* および *in vivo* における研究を展開し、本研究において明らかにしたアフリカチビネズミにおいて特徴的なアミノ酸残基が、タンパク質の機能および体の大きさに与える影響を精査していく必要がある。

1. 諸言

地球上にはさまざまな大きさの哺乳動物が生息している。体の大きさは種ごとに一定であり、世代を超えても厳密に維持・調節されている。哺乳動物において、体の大きさを制御する因子は多岐に渡り、これまでに多くの分子メカニズムが同定されてきた。その中でも Gh-Igf1 axis（成長ホルモン-インスリン様成長因子 1 シグナル伝達経路）に関する研究の歴史は古く、体の大きさに強く影響することが知られている。特に、下垂体から分泌された成長ホルモンの刺激を受けて合成される Igf1 は、細胞の分裂や成長を促す重要な因子である。Igf1

遺伝子をノックアウトしたマウス (*Mus musculus*) は矮小化することが報告されており¹⁾、生体内における Igfl の合成から作用までの動態の解明は注力すべき課題である。

これまで我々は、世界最小の哺乳動物のひとつとして知られるアフリカチビネズミ (*Mus minutoides*) を用いて、哺乳動物の体の大きさに関する研究を行ってきた。アフリカチビネズミはマウスと同じ *Mus* 属に分類される齧歯類であり、生物学的な特性は類似しているにもかかわらず、約 10 倍もの体重差を示す²⁾。また、アフリカチビネズミの Gh-Igfl axis に関する研究は行われていない。

そこで、アフリカチビネズミとマウスの違いを明らかにすることによって矮小性のメカニズム解明するため、アフリカチビネズミの Gh-Igfl axis 関連因子の分子生物学的な解析を行った。本研究では、体内循環において Igfl と結合して三量体を形成する Igfbp3 および Igfals を主な解析対象とした。

2. 材料と方法

2.1. total RNA の抽出と逆転写反応

ISOGEN II (NIPPON GENE) を用いて、付属のプロトコルに従い、アフリカチビネズミの肝臓および腎臓から total RNA を抽出した。抽出した total RNA は、NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific) により濃度を測定して -80℃ で保存した。逆転写反応は、QuantiTect Reverse Transcription Kit (QIAGEN) を用いて、付属のプロトコルに従って行った。合成した cDNA は -20℃ で保存した。

2.2. RT-PCR

Ensembl データベース (<http://asia.ensembl.org/index.html>) から取得したマウス、シッキムハツカネズミ (*Mus pahari*) およびアルジェリアハツカネズミ (*Mus spretus*) の塩基配列を比較し、種を超えて高度に保存されている領域から *Igfl* 遺伝子、*Igfbp3* 遺伝子および *Igfals* 遺伝子のプライマーを設計した。続いて、KOD FX Neo (TOYOBO) を用いて、94℃ 2 min、(94℃ 10 sec、64℃ 30 sec、68℃ 30 sec) x 35 cycle、68℃ 1 min の条件で RT-PCR を行った。増幅産物は、アガロース電気泳動によるバンドの確認またはシーケンス解析に使用した。

2.3. シーケンス解析

PCR 反応後、AMPure XP (Beckman Coulter) を用いて、付属のプロトコルに従い、DNA の精製を行った。続いて、BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いてシーケンス反応を行い、CleanSEQ (Beckman Coulter) を使用して再び DNA を精製した。精製した DNA を用いて、サンガー法によるダイレクトシーケンス解析を実施した。

2.4. 配列解析

シーケンス解析によって得られた塩基配列は、ApE³⁾および CLUSTALW⁴⁾を用いて処理し、塩基配列およびそこから推測されるアミノ酸配列についてアラインメント解析を行った。さらに、Ensembl データベースから取得した外群を含む種々の脊椎動物のアミノ酸配列をもとに、MEGA X^{5,6)}を用いて近隣結合法 (Neighbor-joining method: N-J 法) による分子系統樹を作成した。また、複数のアルゴリズムを横断するツールである PredictSNP⁷⁾を用いて、アミノ酸残基の変化がタンパク質の機能に影響を与える可能性を推測した。

2.5. qRT-PCR

合成した cDNA から KAPA SYBR Fast qPCR Kit (Nippon Genetics) を用いて、CFX Connect リアルタイム PCR 解析システム (Biorad) を使用し、95 °C 3 min、(95 °C 3 sec、60 °C 20 sec) x 40 cycle の条件で qRT-PCR を行った。各遺伝子の発現量は *Gapdh* 遺伝子の発現量を用いて標準化し、相対 CT 法によって解析した。全ての結果は平均値±標準偏差として示した。値について t 検定を行い、 $P < 0.05$ を統計学的に有意差ありと判断した。

3. 結果

3.1. *Igf1* 遺伝子

Ensembl データベースにおいて、マウスの *Igf1* 遺伝子は 4 つの exon から構成され、コーディング領域は 462 bp からなる。この領域を分割してプライマーを設計し、PCR 反応を行った。しかしながら、電気泳動で目的のサイズのバンドは認められたものの、アフリカチビネズミの *Igf1* 遺伝子のコーディング領域の完全長を決定することはできなかった。

3.2. *Igfbp3* 遺伝子

Ensembl データベースにおいて、マウスの *Igfbp3* 遺伝子は 5 つの exon から構成され、コーディング領域は 879 bp からなる。この領域を 2 つに分割してプライマーを設計し、PCR 反応を行った。アフリカチビネズミの *Igfbp3* 遺伝子はマウスと同様に 879 bp からなり、塩基配列の 97.84 % が一致していた。アミノ酸配列を比較すると、マウスと同様にアフリカチビネズミも 293 個のアミノ酸から構成されており、286 個 (97.61 %) のアミノ酸残基が一致していた (Fig. 1A)。異なっていた 7 個のアミノ酸は、signal peptide 領域に 2 個、N-terminal 領域に 3 個、リンカー領域に 2 個位置していた (Fig. 1B)。系統解析を行ったところ、アフリカチビネズミやマウスだけでなく、ラット (*Rattus norvegicus*) やゴールデンハムスター (*Mesocricetus auratus*) を含む齧歯類のクラスターが形成された (Fig. 1C)。*Mus* 属の中でもアフリカチビネズミは比較的長い枝長を示した。また、PredictSNP を用いた予測において、すべてのアミノ酸残基の変化は “neutral” と判定された (Table 1)。腎臓における遺伝子発現解析では、アフリカチビネズミとマウスの間に有意な差は認められなかった (Fig. 2)。

Mus_musculus	MHPARPALWAAALTALLRGPPVARAGAGAVGAGPVVRCEPCDARALSQCAPPPTTAPAC
Mus_minutoides	MHPARPALWAAALTLLRGTPVARAGAGAVGAGPVVRCEPCDARALAQCAPPPTTAPAC
	*****;*****.*****;*****;*****;*****;*****
Mus_musculus	TELVREPGCGCCLTCALREGDACGVYTERCGTGLRCQPRPAEQYPLRALLNGRGFCANAS
Mus_minutoides	TELVREPGCGCCLTCALREGDACGVYTERCGTGLRCQPRPVEQYPLRALLNGRGFCANAS
	*****.*****
Mus_musculus	AAGSLSTYLPSPQAPAGNISESEEEHNAGSVESQVVPSTHRVTDSKFHPLHAKMDVIKKGH
Mus_minutoides	AAGSLSTYLPSPQAPAGNASEEEDHNAGSVESQVVPSTHRVTDSKFHPHAKMDVTKKGH
	*****;*****;*****;*****;*****;*****
Mus_musculus	ARDSQRYKVDYESQSTDTQNFSSSESKRETEYGPCRREMEDTLNHLKFLNVLSPRGVHIPN
Mus_minutoides	ARDSQRYKVDYESQSTDTQNFSSSESKRETEYGPCRREMEDTLNHLKFLNVLSPRGVHIPN

Mus_musculus	CDKKGFYKKKQCRPSKGRKRGFCWCVDKYQGPLPGYDTKGKDDVHCLSVQSQ
Mus_minutoides	CDKKGFYKKKQCRPSKGRKRGFCWCVDKYGGPLPGYDTKGKDDVHCLSVQSQ

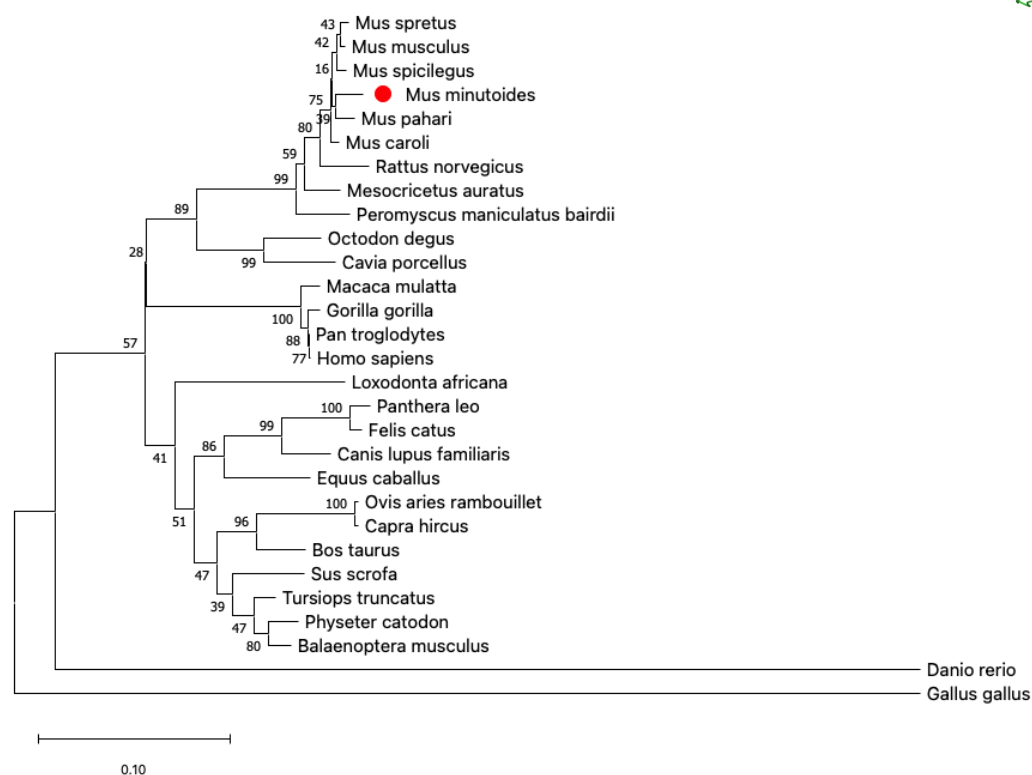
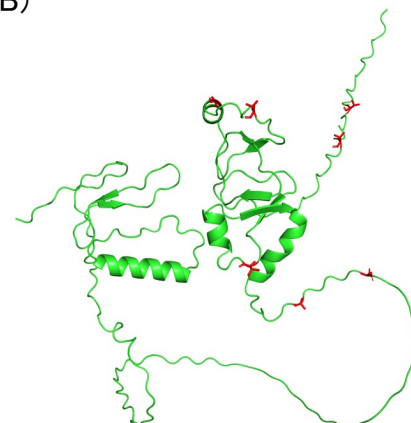


Fig. 1 Sequence analysis of Igfbp3 in African pygmy mouse.

Table 1 Prediction of the Functional Impact of amino acid substitutions in Igfbp3.

	PredictSNP	MAPP	PhD-SNP	PolyPhen-1	PolyPhen-2	SIFT	SNAP
A15T	N	D	N	-	-	N	N
P22T	N	N	N	-	-	N	N
S49A	N	N	N	N	N	N	N
A57T	N	N	N	N	N	N	N
A101V	N	D	N	N	N	D	N
I138A	N	N	N	N	N	N	N
E144D	N	N	N	N	N	N	N

N: neutral, D: deleterious

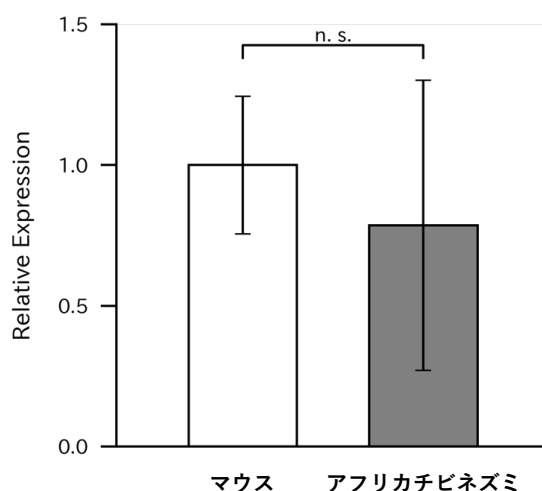


Fig. 2 Expression analysis of the *Igfbp3* gene

3.3. *Igfals* 遺伝子

Ensembl データベースにおいて、マウスの *Igfals* 遺伝子は 2 つの exon から構成され、コーディング領域は 1812 bp からなる。この領域を 4 つに分割してプライマーを設計し、PCR 反応を行った。アフリカチビネズミの *Igfals* 遺伝子はマウスと同様に 1812 bp からなり、塩基配列の 96.92 % が一致していた。アミノ酸配列を比較すると、マウスと同様にアフリカチビネズミも 603 個のアミノ酸から構成されており、586 個 (97.18 %) のアミノ酸残基が一致していた (Fig. 3A)。異なっていた 17 個のアミノ酸は、C 末端側に 4 個、N 末端側に 13 個が位置しており、分布に偏りが認められた (Fig. 3B)。系統解析を行ったところ、*Igfbp3* と同様に齧歯類のクラスターが形成されたが、アフリカチビネズミは *Mus* 属の中で最も早期に分岐した (Fig. 3C)。また、PredictSNP を用いた予測において、すべてのアミノ酸残基の変化は“neutral”と判定された (Table 2)。

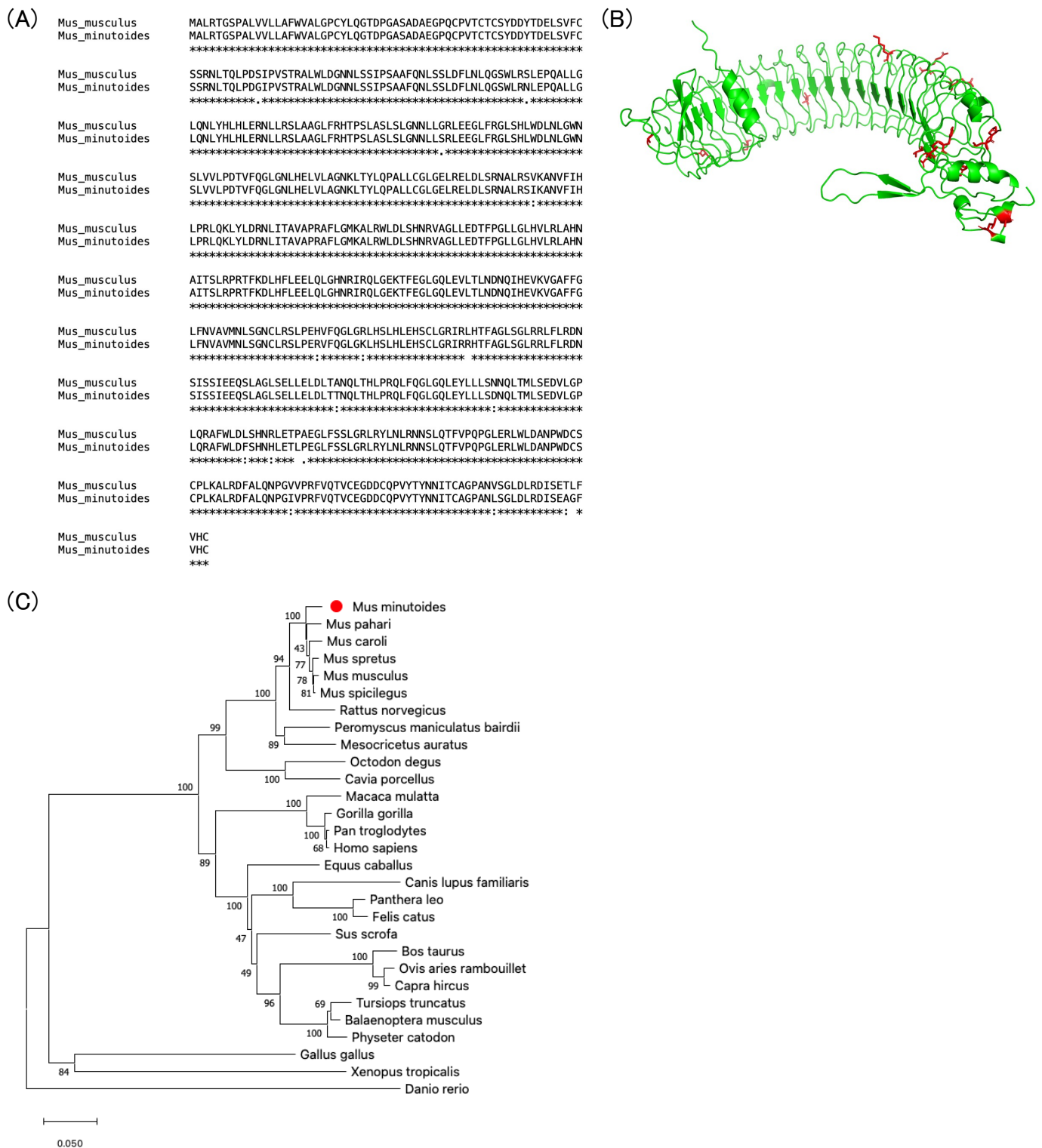


Fig. 3 Sequence analysis of Igfa1s in African pygmy mouse.

Table 2 Prediction of the Functional Impact of amino acid substitutions in Igfals.

	PredictSNP	MAPP	PhD-SNP	PolyPhen-1	PolyPhen-2	SIFT	SNAP
S71G	N	N	N	N	N	N	N
S112N	N	N	N	N	N	N	N
G159S	N	N	D	N	N	N	N
V233I	N	N	N	N	N	N	N
H380R	N	N	N	N	N	N	N
R387K	N	N	N	N	N	N	N
L403R	N	N	N	N	N	N	N
A443T	N	N	N	N	N	N	N
N467D	N	N	D	N	N	N	N
L489F	N	N	N	D	N	D	N
R493H	N	N	N	N	N	N	N
P497L	N	N	N	N	N	N	N
A498P	N	N	D	N	N	N	N
V556I	N	N	N	N	N	N	N
V587L	N	N	N	N	N	N	N
T598A	N	N	N	N	N	N	N
L599G	N	N	N	N	N	D	N

N: neutral, D: deleterious

4. 考察

Igf1 が生体内を循環する際、はじめに Igfbp3 と二量体を形成し、続いて Igfals と結合することによって Igf1 の安定性を向上させる⁸⁾。安定化した Igf1 は血液を介して標的器官へ到達し、細胞の成長や分裂を促進する。アフリカチビネズミにおいて、Igfbp3 および Igfals のアミノ酸配列長はマウスと同じであったが、それぞれ複数のアミノ酸残基が異なっていた。Igfbp3 においては、アフリカチビネズミとマウスの間で 7 個のアミノ酸残基が異なり、その中でも 3 個 (S49A、A57T、A101V) が Igf1 との結合に関与する N-terminal ドメインに位置していた。特に、A101V は PredictSNP による総合的な予測では“neutral”と判断されたが、アルゴリズム単位では MAPP および SIFT において“deleterious”と推測された。また、Igfals においてはアフリカチビネズミとマウスの間で 17 個のアミノ酸残基が異なり、その中でも N 末端の 2 つのドメイン (LRR18、LRRNT) に 8 個が密集していた (L489F、R493H、P497L、A498P、V556I、V587L、T598A、L599G)。特に、L489F は PredictSNP による総合的な予測では“neutral”と判断されたが、アルゴリズム単位では PolyPhen-1 および SIFT において“deleterious”と推測された。これらの Igf1 結合タンパク質の機能不全は矮小化や成長遅延につながることが報

告されているため^{9, 10)}、今回発見されたアミノ酸残基の違いがアフリカチビネズミとマウスの体の大きさの違いの一因となっている可能性が考えられる。アフリカチビネズミとマウスとの間で *Igfbp3* 遺伝子の発現量に有意な差は認められなかったため、発現量ではなくタンパク質の相互作用の差によって両者の違いが生じているのかもしれない。また、本研究では明らかにすることはできなかったが、アフリカチビネズミにおける *Igf1* のアミノ酸配列の解明は重要な課題であるため、RACE 法を用いたさらなる解析を実施する必要がある。

今後は *in vitro* および *in vivo* における研究を展開し、本研究において明らかにしたアフリカチビネズミの *Igfbp3* および *Igfals* における特徴的なアミノ酸残基が、タンパク質の機能および体の大きさに与える影響を精査していく予定である。

5. 謝辞

本研究を実施するにあたり、研究助成をいただきました公益財団法人サンケイ科学振興財団に心より感謝申し上げます。

6. 引用文献

- 1) J. P. Liu, J. Baker, A. S. Perkins, E. J. Robertson and A. Efstratiadis. 1993. Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (*Igf-1*) and type 1 IGF receptor (*Igf1r*). *Cell*. 75: 59-72.
- 2) K. Willan and J. Meester. 1978. Breeding biology and postnatal development of the African dwarf mouse. *Acta Theriologica*. 23: 55-74.
- 3) M. W. Davis and E. M. Jorgensen. 2022. ApE, A Plasmid Editor: A Freely Available DNA Manipulation and Visualization Program. *Front Bioinform*. 2: 818619.
- 4) J. D. Thompson, D. G. Higgins and T. J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*. 22: 4673-80.
- 5) S. Kumar, G. Stecher, M. Li, C. Knyaz and K. Tamura. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol*. 35: 1547-1549.
- 6) G. Stecher, K. Tamura and S. Kumar. 2020. Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) for macOS. *Mol Biol Evol*. 37: 1237-1239.
- 7) J. Bendl, J. Stourac, O. Salanda, A. Pavelka, E. D. Wieben, J. Zendulka, J. Brezovsky and J. Damborsky. 2014. PredictSNP: robust and accurate consensus classifier for prediction of disease-related mutations. *PLoS Comput Biol*. 10: e1003440.
- 8) H. Kim, Y. Fu, H. J. Hong, S. G. Lee, D. S. Lee and H. M. Kim. 2022. Structural basis for assembly and disassembly of the IGF/IGFBP/ALS ternary complex. *Nat Commun*. 13: 4434.
- 9) I. Ueki, G. T. Ooi, M. L. Tremblay, K. R. Hurst, L. A. Bach and Y. R. Boisclair. 2000. Inactivation

of the acid labile subunit gene in mice results in mild retardation of postnatal growth despite profound disruptions in the circulating insulin-like growth factor system. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97: 6868-73.

- 10) Y. Ning, A. G. Schuller, S. Bradshaw, P. Rotwein, T. Ludwig, J. Frystyk and J. E. Pintar. 2006. Diminished growth and enhanced glucose metabolism in triple knockout mice containing mutations of insulin-like growth factor binding protein-3, -4, and -5. *Mol Endocrinol*. 20: 2173-86.

Investigation of the role of Gh-Igfl axis-related factors in dwarfism in African pygmy mouse

MATSUYA Sumito

Joint Faculty of Veterinary Medicine, Kagoshima University

1-21-24, Korimoto, Kagoshima, 890-0065, JAPAN

TEL: 099-285-8711

The growth hormone–insulin-like growth factor 1 (Gh-Igfl) axis is a well-established signaling pathway that plays a critical role in regulating body size in mammals. the African pygmy mouse (*Mus minutoides*) is one of the smallest known mammals; however, the molecular mechanisms underlying its dwarfism remain largely unexplored. In this study, we performed molecular biological analyses of Gh-Igfl axis-related factors in *M. minutoides*. We successfully identified the full-length coding sequences of the *Igfbp3* and *Igfals* genes in *M.*

minutoides, and performed a combined approach of comparative analysis with the laboratory mouse (*Mus musculus*) and bioinformatic analysis to characterize the features of these genes and their encoded proteins. These analyses revealed unique amino acid substitutions in the *Igfbp3* and *Igfals* proteins of *M. minutoides*. Future research aims to sequence the *Igfl* gene of *M. minutoides* and conduct both *in vitro* and *in vivo* functional assays to determine how the identified amino acid variations affect protein function and overall body size.