

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：12401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14557

研究課題名(和文) グレリンの脂肪酸修飾機構の研究-中鎖脂肪酸起源の同定-

研究課題名(英文) The research for the origin of medium-chain fatty acid modifying ghrelin in mice

研究代表者

坂田 一郎 (SAKATA, Ichiro)

埼玉大学・理工学研究科・准教授

研究者番号：80610831

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：グレリンは28アミノ酸残基からなるペプチドホルモンである。3番目のセリン残基には中鎖脂肪酸が結合しているが、中鎖脂肪酸の由来については不明な点が多い。普通食と無脂肪食を与えたマウスの血漿アシルグレリン濃度と胃のアシルグレリン細胞数を比較した結果、普通食群と無脂肪食群の間に差は認められなかった。腸内細菌除去したマウスでは血中アシルグレリン量と胃のアシルグレリン細胞数は減少しなかった。グレリン産生細胞株(PG-1)に酸化阻害剤であるエトモキシルを処理すると、アシルグレリン産生が抑制された。以上の結果は、グレリン細胞によって長鎖脂肪酸を分解することで産生される中鎖脂肪酸を利用することが示された。

研究成果の概要(英文)：Ghrelin is 28-amino acids peptide hormone and Ser3 of ghrelin is modified by medium-chain fatty acid (MCFA). This modification is essential for ghrelin activities. We examined three possibilities of the MCFA origin; diet, intestinal bacteria and de novo synthesis using mice and ghrelinoma cell lines (PG-1 cell). We found that a fat-free diet and the removal of intestinal microbiota did not decrease acyl-ghrelin production in the stomach or plasma acyl-ghrelin levels in mice. Blockage of β -oxidation in PG-1 cells strongly decreased acylated ghrelin levels. These results suggest the medium-chain fatty acid used for the acyl-modification of ghrelin is produced in ghrelin-producing cells themselves by β -oxidation of long-chain fatty acids.

研究分野：内分泌学

キーワード：グレリン 側鎖修飾 長鎖脂肪酸 中鎖脂肪酸 酸化

1. 研究開始当初の背景

グレリンは、1999年に胃から発見されたペプチドホルモンであり、これまでに同定されている唯一の中鎖脂肪酸で修飾されるペプチドホルモンという構造的な特徴と、末梢から分泌される唯一の摂食亢進ホルモンであることから創薬ターゲットとして注目されている。グレリンは、中鎖脂肪酸修飾されたグレリン(アシル化グレリン)、脂肪酸修飾のないグレリン(デスアシルグレリン)の2つの分子型で組織及び血液中に存在しているグレリンは、摂食亢進作用だけではなく、成長ホルモン分泌促進、血糖値調節、消化管収縮運動刺激などの重要な生理作用から創薬・臨床応用が進んでいる。

一方、グレリンの分泌制御やグレリン細胞の細胞生物学的な研究は、グレリン細胞が胃粘膜に散在性に局在して存在していることから、グレリン細胞のみを採取することが困難であり、未知の部分が多い。しかしながら、2008年にグレリンの側鎖修飾酵素であるGOATが同定され、グレリンの側鎖修飾調節を含め、グレリン自体の制御機構についての研究が注目を集めている。しかしながら、アシル化グレリンの側鎖である中鎖脂肪酸の由来は未だ不明であり、グレリンというホルモンの生物学的意義及び臨床応用を考える上で重要な課題である。

2. 研究の目的

グレリンは28アミノ酸残基からなり、3番目のセリン残基が中鎖脂肪酸であるオクタン酸によって修飾され、この修飾が生理活性に必須である。近年、グレリン脂肪酸修飾酵素であるGhrelin-o-acyltransferase(GOAT)が発見されたが、グレリン修飾に必要なオクタン酸の由来についてはほとんど不明である。本研究では、アシル化グレリン産生に利用される中鎖脂肪酸がde novo合成系によるものか、外因性の食事に由来するのか、もしくは腸内細菌に依存するのかを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

C57BL/6J系統の雄マウス及びを応募者が樹立したグレリン産生細胞株(PNAS107(36):15868-73)を用いて検討を行った。まず、マウスに無脂肪食を3週間与え、空腹期と食後期の血液を採取し、血中アシル化グレリンとデスアシルグレリンを市販のELISAキットによって測定した。また、アシル化グレリンを特異的に認識する抗体を用いて免疫組織化学を行い、胃粘膜あたりのグレリン免疫陽性細胞数及び染色性を比較した。次に、アンピシリン、カナマイシン硫酸塩、バンコマイシン塩酸塩、メトロニダゾールをそれぞれ10mg/マウスとなるように混合した抗生物質をマウスに経口投与を5日間行うことで腸内細菌フリーマウスを作製し、血中グレリン濃度と胃での免疫組織化学を行った。さらに、

グレリン産生細胞株(PG-1細胞)を用いて、グレリン細胞に脂肪酸合成関連遺伝子が発現しているかをRT-PCR法により検討した。加えて、グレリン産生細胞株に脂肪酸合成阻害剤(FAS阻害剤)や酸化阻害剤であるエトモキシル(ET)を添加して培養を行い、アシル化グレリン産生に及ぼす影響を検討した。

4. 研究成果

(1)無脂肪食とアシルグレリン産生の関係
食前の血漿アシルグレリン濃度は、普通食群と無脂肪食群が同程度の値を示していた。食後の血漿アシルグレリン濃度も、普通食群と無脂肪食群には有意な差は見られなかった。トータルグレリン量に対するアシルグレリン量の比も、食前と食後の両方で、普通食群と無脂肪食群の間に有意な差は見られなかった。免疫組織化学の結果、普通食群と無脂肪食群のアシルグレリン陽性細胞の染色性に差は見られず、胃粘膜面積あたりのグレリン産生細胞数は、普通食群と無脂肪食群で変化は認められなかった。

(2)腸内細菌除去とアシルグレリン産生の関係

食前の血漿アシルグレリン濃度は、抗生物質投与群がコントロール群と比較して有意に高い値を示したが、食後では2群の値は同程度であった。血漿トータルグレリン濃度については、食前では抗生物質投与群がコントロール群と比較して高くなる傾向が見られたが、食前と食後の両方で2群間に有意差は認められなかった。トータルグレリン量に対するアシルグレリン量の比も、コントロール群と抗生物質投与群の間に有意な差は見られなかった。免疫組織化学の結果、コントロール群と抗生物質投与群のアシルグレリン陽性細胞の染色性に差は見られず、胃粘膜面積あたりのグレリン産生細胞数はコントロール群、抗生物質投与群ともほぼ同じ値であった。

(3)グレリン産生細胞株における脂肪酸合成・代謝関連遺伝子の発現

PG-1細胞のcDNAを鋳型としてPCRを行った結果、脂肪酸合成系に關与するアセチル-CoAカルボキシラーゼ(Acaca)、脂肪酸合成酵素(Fasn)、脂肪酸代謝系のAcot1,Acot2,Acot4,Acot6,7,8,9,10,11,12,13のmRNAが発現していた。また、PG-1細胞にはCrotのmRNAが発現していた(図1)。

4)アシルグレリン産生におけるFAS阻害剤と酸化阻害剤の作用

PG-1細胞にFAS阻害剤であるC75を添加したところ、培養液中のアシルグレリン量が減少する傾向が見られた。しかしながら、中鎖脂肪酸であるオクタン酸(OA)との共添加ではコントロール群と同程度の値を示して

り、C75 群と C75 + OA 群の間にも差が見られた。トータルグレリン量は 3 群とも同程度であった。トータルグレリン量に対するアシルグレリン量の比は、C75 群がコントロール群と比較して有意に減少していた。OA 添加では、コントロール群と同程度まで回復していた。

酸化阻害剤であるエトモキシル (ET) を添加した場合は培養液中のアシルグレリン量は ET 添加により著しく減少し、OA との共添加で回復していたが、長鎖脂肪酸 (SA) との共添加では回復しなかった。一方、トータルグレリン量は、全ての群が同程度の値を示していた。トータルグレリン量に対するアシルグレリン量の比は、ET 群と ET + SA 群でコントロール群よりも有意に減少していたが、ET + OA 群はコントロール群と同程度であった。

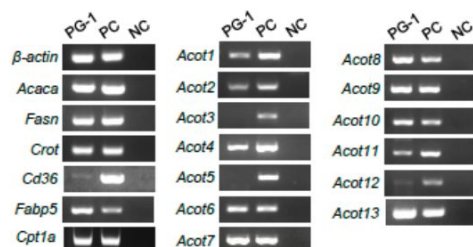


図1. 脂肪酸合成・代謝関連遺伝子の発現

以上の成果は、グレリン側鎖に利用される中鎖脂肪酸の由来には、長鎖脂肪酸をグレリン細胞に取り込み利用する割合が大きいことが示す。

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 4 件)

Chacrabati R, Gong Z, Ikenoya C, Kondo D, Zigman JM, Sakai T, Sakata I. The effect of glutamate on ghrelin release in mice. *Cell Biol Int*. 2017 Mar;41(3):320-327. doi: 10.1002/cbin.10728.

Takemi S, Sakata I, Apu AS, Tsukahara S, Yahashi S, Katsuura G, Iwashige F, Akune A, Inui A, Sakai T. Molecular Cloning of Ghrelin and Characteristics of Ghrelin-Producing Cells in the Gastrointestinal Tract of the Common Marmoset (*Callithrix jacchus*). *Zoolog Sci*. 2016

Oct;33(5):497-504.

Kuroda K, Hequing H, Mondal A, Yoshimura M, Ito K, Mikami T, Takemi S, Jogahara T, Sakata I, Sakai T. Ghrelin Is an Essential Factor for Motilin-Induced Gastric Contraction in *Suncus murinus*. *Endocrinology*. 2015

Dec;156(12):4437-47. doi:

10.1210/en.2015-1561.

Goswami C, Shimada Y, Yoshimura M, Mondal A, Oda S, Tanaka T, Sakai T, Sakata I. Motilin

Stimulates Gastric Acid Secretion in Coordination with Ghrelin in *Suncus murinus*. *PLoS One*. 2015 Jun

26;10(6):e0131554. doi:

10.1371/journal.pone.0131554.

〔学会発表〕(計 11 件)

竹見祥大、池之谷知佳、Zhi Gong、Rakhi Chacrabati、近藤大介、田中亨、坂井貴文、坂田一郎: グレリンを修飾する中鎖脂肪酸の由来に関する生体内合成系の検討. 日本比較内分泌学会 第 41 回大会、北里大学・相模原キャンパス(神奈川県横浜市) 2016 年 12 月 9 日

牧井崇、池之谷知佳、竹見祥大、坂井貴文、坂田一郎: マウスグレリン産生細胞における RESP18 の役割の検討. 日本比較内分泌学会 第 41 回大会、北里大学・相模原キャンパス(神奈川県横浜市) 2016 年 12 月 9 日

近藤大介、上田洸平、坂井貴文、坂田一郎: ウロコルチン 1 投与によるグレリン分泌作用の検討. 日本比較内分泌学会 第 41 回大会、北里大学・相模原キャンパス(神奈川県横浜市) 2016 年 12 月 9 日

尾島汐海、中村友亮、坂田一郎、坂井貴文: モチリン及びグレリンによる協調的摂食刺激作用の検討. 日本比較内分泌学会 第41回大会、北里大学・相模原キャンパス(神奈川県横浜市) 2016年12月9日

堀田太一、伊藤一真、小山航平、三上堯、坂田一郎、坂井貴文: スンクスにおける中枢性胃運動調節機構の検討. 日本比較内分泌学会 第41回大会、北里大学・相模原キャンパス(神奈川県横浜市) 2016年12月9日

Ikenoya C, Gong Z, Chacrabati R, Kondo D, Sakai T and Sakata I: Origin of medium-chain fatty acids that modify ghrelin in mice. 第40回 日本比較内分泌学会大会、広島市文化交流会館(広島県広島市) 2015年12月12日

池之谷知佳、Zhi Gong、Rakhi Chacrabati、近藤大介、坂井貴文、坂田一郎: マウスを用いたグレリンを修飾する中鎖脂肪酸の起源に関する研究. 日本動物学会 第86回新潟大会、朱鷺メッセ(新潟県新潟市) 2015年9月17日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0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0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
SUCRA :
<http://sucra-rd.saitama-u.ac.jp/search/profile.do?lng=ja&id=uaLmupym>
埼玉大学生体制御学コース :
<http://seitai.saitama-u.ac.jp/>
埼玉大学細胞制御学研究室 :
<http://cell.seitai.saitama-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者
坂田 一郎 (SAKATA, Ichiro)
埼玉大学・大学院理工学研究科・准教授
研究者番号: 80610831

(2)研究分担者
坂井 貴文 (SAKAI, Takafumi)
埼玉大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号: 40235114

(3)連携研究者 ()

研究者番号:

(4)研究協力者 ()