

令和 3 年 5 月 21 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07414

研究課題名(和文) 鍼刺激で発見したAig1l遺伝子の生物学的機能と鍼治療効果との関連の研究

研究課題名(英文) Relationship between the biological function and/or effect of acupuncture of Aig1l gene discovered by acupuncture stimulation

研究代表者

高岡 裕 (Takaoka, Yutaka)

神戸大学・大学院医学研究科・客員教授

研究者番号：20332281

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、申請者らが鍼治療効果のメカニズム研究において発見した、マウス Acupuncture-induced 1-L (Aig1l) の機能および鍼治療効果との関連の解明である。この遺伝子は、鍼治療3時間後のマウス骨格筋で我々が発見した。まずAIG1Lの立体構造をホモロジーモデリングにより解析して決定した。その際、部分立体構造を疎水性相互作用に基づき結合させ、全体構造を明らかにした。さらにAig1l遺伝子発現解析を行い、脳を中心とする神経細胞で特異的に発現していること、グリア細胞ではほぼ発現していないことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果、AIG1Lタンパク質は神経細胞特異的に存在する膜タンパク質であることが判明した。このことは、AIG1L遺伝子が鍼刺激3時間後の細胞から我々が発見した事と併せて考えると、鍼治療の刺激が神経細胞に影響を与えて治療効果を挙げている証拠といえる。この結果は、科学的に鍼灸の有用性を示すものである。また本研究では、部分理論立体構造解析結果を用いて、タンパク質全体の立体構造解析を可能にする方法を確立した。この結果も本研究成果として意義深く、その応用による研究成果にもつながった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to elucidate the relationship between the function of mouse Acupuncture-induced 1-L (Aig1l) and the acupuncture effect discovered in our study of the mechanism of acupuncture effect. This gene was discovered by homology modeling for each substructure.

The 3D structure of Aig1l was first determined by homology modeling. The substructures were combined based on hydrophobic interactions to reveal the overall structure. Furthermore, Aig1l gene expression analysis revealed that Aig1l is specifically expressed in neurons, mainly in the brain, and is almost completely absent in glial cells.

研究分野：in silico生物学

キーワード：Aig1l 膜タンパク質 鍼灸 漢方

1. 研究開始当初の背景

我々は、東洋医学(漢方)の治療方法の一つである鍼灸を研究対象に、その科学的な治療効果のメカニズムの研究を行ってきた。治療方法のうち鍼通電刺激を対象として、マウス骨格筋での効果について遺伝子発現を指標に解析している中で、マウス Acupuncture-induced 1-L (Aig1l)を鍼通電刺激3時間後に発現誘導される遺伝子として発見した[1]。現在まで、Aig1l はゲノムデータベースに登録されている遺伝子の中で、鍼(Acupuncture)の名前を冠した唯一の遺伝子である。

その後の解析で、我々は Aig1l の完全長 cDNA 配列を決定し、ノーザンブロット解析とリアルタイム PCR 解析でこの遺伝子が主として脳で発現していること、加えて Aig1l は 962 アミノ酸から成る分子量 105kDa のタンパク質であり、当時の 2 次構造解析予測プログラムの解析で 3 個の CUB ドメインと 5 個の sushi ドメインから構成される膜タンパク質であることが示唆された[2]。

引き続き研究を進める中で、Aig1l のポリクローナル抗体やマウスの脳細胞のプライマリカルチャーなど、様々な方法で Aig1l の生物医学的な機能解析に取り組むなど、この研究の準備を行ってきた。また、以前の科研費(課題番号 24590884)で、Aig1l の立体構造をホモロジーモデリング法で明らかにすべく、解析手法は確立している。そして、その後の分子シミュレーションソフトの進化と立体感構造データの蓄積により、モデリングによる正確な立体構造解析が実用レベルになりつつある。

これらの研究を継続して進め、更なる解析を準備する中で、Aig1l タンパク質の機能と鍼治療効果について多方面から解明する研究を着想した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、申請者らが鍼治療効果のメカニズム研究において発見した、マウス Acupuncture-induced 1-L (Aig1l) の機能および鍼治療効果との関連の解明である。そして、本研究により鍼治療メカニズムの一端を解明することを目的としている。この解明のために、細胞生物学的な手法に加えて in silico 構造解析など、多角的に取り組む。そして、鍼治療における Aig1l タンパク質の果たす役割を明らかにすることを目標とする。

3. 研究の方法

(1) Aig1l の脳内の細胞局在の解析

マウス脳からの神経細胞とグリア細胞のプライマリカルチャー

神経細胞は、妊娠 15 日のマウス胎児大脳より細胞を取り出し、0.2%トリプシン(in Puck's solution)で処理後、細胞をフラスコで培養した。培養 3 日目にグリア細胞上に分化した神経細胞塊が接着した状態になったところで、24 時間の 40mM シトシンアラビノシド処理により、グリア細胞から神経細胞が剥離しやすく処理した。培養 5 日目にフラスコを軽くたたくことで神経細胞だけが剥がれるので、これを回収し Ca Mg free PBS (以下 PBS) で洗浄後、ペレットを解析に供した。

グリア細胞は、妊娠 15 日のマウス胎児大脳より細胞を取り出し、0.2%トリプシン(in Puck's solution)で処理し、培養フラスコで培養した。10 日間ほど培養すると神経細胞が脱落し、残った細胞をグリア細胞(大部分はアストロサイト)として、0.25%トリプシン(in PBS)で処理し、細胞を回収し PBS で洗浄後、ペレットを解析に供した。

各細胞における Aig1l 遺伝子発現の解析

各細胞をマウス胎児の脳から調整した後、既報[2]に従い TRIzol(Invitrogen)を用いて、培養細胞から RNA を抽出し、TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems) にて Aig1l 遺伝子発現をリアルタイム PCR 解析にて検討した。

(2) 分子シミュレーション(ホモロジーモデリング)による Aig1l の立体構造解析

Aig1l の二次構造予測は、PSIPRED [3]で、ドメイン配列の解析には PFAM [4]を用いた。また、各ドメインの部分立体構造を個別にホモロジーモデリングで解析した。具体的には、Protein Data Bank (PDB)の BLASTP プログラム[5]で検索し、配列一致度が最も高い立体構造をホモロジーモデリングのテンプレートとして選択した。各ドメインのホモロジーモデリングに用いたテンプレートは以下の通り：CUB 1 ドメイン, PDB ID: 3DEM_A (identity = 25.943%); sushi 1 ドメイン, PDB ID: 6V06_A (identity = 37.838%); CUB 2 ドメイン, PDB ID: 1SZB_A (identity = 37.234%), sushi 2 ドメイン, PDB ID: 4AQB_A (identity = 23.684%); CUB 3 ドメイン, PDB ID: 5FWS_A (identity = 31.933%); sushi 3 ドメイン, PDB ID: 10K3_A (identity = 30.439%); sushi 4 ドメイン, PDB ID: 5HYP_A (identity = 34.483%); sushi 5 ドメイン, PDB ID: 5HYP_A (identity = 34.483%)。これらのテンプレートを用い、MOE プログラム (Chemical Computing Group 社) の homology modeling 機能で各ドメインの 3 次元構造を解析した。

引き続き、得られた各ドメインの部分立体構造を ZDOCK [6]でドッキング解析した。その

際、疎水性度を Eisenberg らの方法[7]で解析し決定した疎水性度が高い領域をドッキングサイトに設定して 2000 回ずつのドッキング解析を行った。ドッキングした結果が PSIPRED の 2 次構造解析結果と一致する結合を選択し、MOE プログラムを用いて構造を連結した。連結後の立体構造を、水分子付加、Amber03 力場の条件で GROMACS [8]で構造最適化し、Aig11 の立体構造を決定した。その際、PROCHECK プログラム (<https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/PROCHECK/>)にて、タンパク質としての立体構造を検証し、Disallowed region 2%以下が妥当とされることから、最もその値が低い構造を選択した[9]。

4. 研究成果

(1) Aig11 遺伝子の脳内の細胞局在

マウス胎児 (15 日) における遺伝子発現について、脳から神経細胞とグリア細胞をプライマリーカルチャーにより得て、Aig11 の発現を比較した。その結果、神経細胞で Aig11 の高い発現が確認された。対して、グリア細胞では Aig11 の遺伝子発現は低かったが、これはプライマリーカルチャーのためにグリア細胞に神経細胞が混入した可能性が高いためと考えられる (図 1)。よって、グリア細胞では Aig11 遺伝子発現はほぼないと考えて良いと判断された。この解析で用いた培養細胞はプライマリーカルチャーであるのでライン化しておらず、生体内での実態を反映しているものと言える。

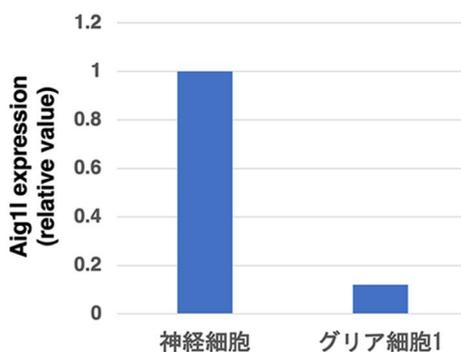


図1 Aig11の遺伝子発現

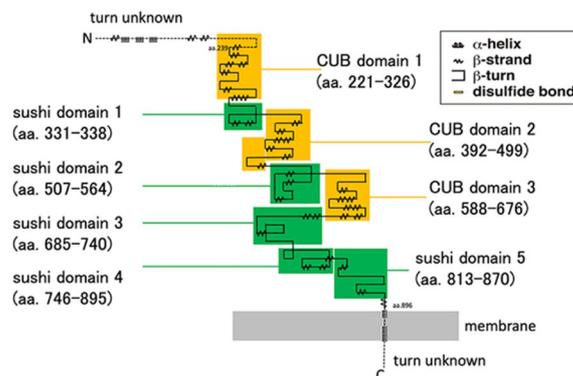


図2 2次構造予測結果

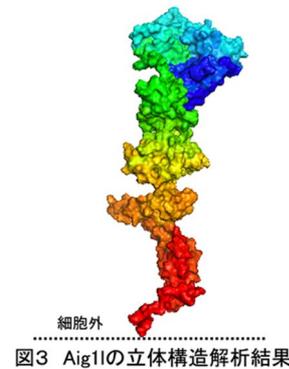
(2) Aig11 の立体構造

PSIPRED による 2 次構造解析結果を図 2 に示す。この予測された構造を基本に、解析した部分構造をドッキングにより結合、さらに連結して立体構造を構築した。

その後、構造最適化した。計算量 1000ps ごとに Ramachandran plot 解析を行い、4000ps では Disallowed region が 1.2%と最も低く、この構造を妥当な構造として選択した (図 3)。

解析可能だった立体構造は細胞膜外の部分であり、その外観からは細胞接着に関係して機能を発揮することが予想された。この結果と、脳細胞のプライマリーカルチャーでほぼ神経細胞で Aig11 が発現していたことと併せて考えると、Aig11 は神経細胞の接着に関係し、機能を発揮している可能性が示唆された。

しかし、N 末端側の約 200 アミノ酸、膜貫通ドメインから C 末端側の部分はテンプレート構造がなく、ホモロジーモデリングでは構造解析が出来なかった。そこで、全体の構造を決定すべく、引き続き理論構造解析を進めている。



<引用文献>

1. Takaoka Y, Ohta M, Ito A, Takamatsu K, Sugano A, Funakoshin K, Takaoka N, Sato N, Yokozaki H, Arizono N, Goto S, Maeda E: Electroacupuncture Suppresses Myostatin Gene Expression: Cell Proliferative Reaction in Mouse Skeletal Muscle. *Physiol Gen* 30(2), 102-110, 2007
2. Ohta M, Sugano A, Goto S, Yusoff S, Hirota Y, Funakoshi K, Miura K, Maeda E, Takaoka N, Sato N, Ishizuka H, Arizono N, Nishio H, Takaoka Y: Full-length sequence of mouse acupuncture-induced 1-L (*Aig11*) gene including its transcriptional start site. *eCam* doi:10.1093/ecam/nep121, 2011
3. Jones DT: Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J Mol Biol* 292, 195-202, 1999
4. Mistry J, Chuguransky S, Williams L, Qureshi M, Salazar GA, Sonnhammer ELL, Tosatto SCE, Paladin L, Raj S, Richardson LJ, Finn RD, Bateman A: Pfam: The protein families database in 2021. *Nuc Acids Res* 49(D1): D412-D419, doi: 10.1093/nar/gkaa913, 2020
5. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>

6. Pierce BG, Hourai Y, Weng Z: Accelerating Protein Docking in ZDOCK Using an Advanced 3D Convolution Library. *PLoS One* 6(9): e24657, 2011
7. Eisenberg D, Schwarz E, Komaromy M, Wall R: Analysis of membrane and surface protein sequences with the hydrophobic moment plot. *J Mol Biol* 179(1):125-42, 1984
8. Abraham MJ, Murtola T, Schulz R, Pall S, Smith JC, Hess B, Lindahl E: GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX* 1–2:19–25, doi:10.1016/j.softx.2015.06.001, 2015
9. Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS, Thornton JM: PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of applied crystallography*, 26:283–291, 1993

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kenji Sugawara, Kazuhiro Nomura, Yuko Okada, Aki Sugano, Masaaki Matsumoto, Toru Takarada, Atsuko Takeuchi, Hiroyuki Awano, Yushi Hirota, Hisahide Nishio, Yutaka Takaoka, Wataru Ogawa	4. 巻 10(3)
2. 論文標題 In silico and in vitro analyses of the pathological relevance of the R258H mutation of hepatocyte nuclear factor 4 identified in MODY1.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Diabetes Investigation	6. 最初と最後の頁 680-684
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.12960.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Daisuke Ariyasu, Emika Kubo, Daisuke Higa, Shinsuke Shibata, Yutaka Takaoka, Michihiko Sugimoto, Kazunori Imaizumi, Tomonobu Hasegawa, Kimi Araki	4. 巻 160(11)
2. 論文標題 Decreased Activity of the Ghrhr and Gh Promoters Causes Dominantly Inherited GH Deficiency in Humanized GH1 Mouse Models.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Endocrinology	6. 最初と最後の頁 2673-2691
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/en.2019-00306.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yutaka Takaoka, Atsuko Takeuchi, Aki Sugano, Kenji Miura, Mika Ohta, Takashi Suzuki, Daisuke Kobayashi, Takuji Kimura, Juichi Sato, Nobutaro Ban, Hisahide Nishio, Toshiyuki Sakaeda	4. 巻 14(1)
2. 論文標題 Establishment of the experimental procedure for prediction of conjugation capacity in mutant UGT1A1.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 1-17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0225244	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Mika Ohta, Aki Sugano, Naoya Hatano, Hirotaka Sato, Hirofumi Shimada, Hitoshi Niwa, Toshiyuki Sakaeda, Hajime Tei, Yoshiyuki Sakaki, Ken-ichi Yamamura, Yutaka Takaoka	4. 巻 27
2. 論文標題 Co-precipitation molecules Hemopexin and Transferrin may be key molecules for fibrillogenesis in TTR V30M Amyloidogenesis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Transgenic Research	6. 最初と最後の頁 15-23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11248-017-0054-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大田美香、高岡 裕
2. 発表標題 ミオスタチン遺伝子発現を指標にした手技による効果の違いの解析
3. 学会等名 第69回全日本鍼灸学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高岡 裕
2. 発表標題 痛みや組織修復と漢方：分子生物学による鍼治療効果機序の解明.
3. 学会等名 第45回日本東洋医学会九州支部学術総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高岡 裕、大田美香、菅野亜紀
2. 発表標題 臨床ゲノムデータの精密医療への二次利用：薬物代謝能予測から薬効予測に向けて.
3. 学会等名 第39回医療情報学連合大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 奥野海良人、大田美香、高岡 裕
2. 発表標題 切皮刺激による皮下組織への治療効果の検討（第一報）
3. 学会等名 第67回全日本鍼灸学会学術大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	大田 美香 (Ohta Mika) (20274706)	神戸大学・医学部附属病院・学術研究員 (14501)	
研究分担者	菅野 亜紀 (Sugano Aki) (20457039)	名古屋大学・医学部附属病院・病院助教 (13901)	
研究分担者	鈴木 高史 (Suzuki Takashi) (70305530)	神戸常盤大学・保健科学部・教授 (34535)	
研究分担者	奥野 海良人 (Okuno Arato) (50623980)	つくば国際大学・医療保健学部・講師(移行) (32104)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	相良 順一 (Sagara Jun'ichi)	茨城県立医療大学・保健医療学部医科学センター・准教授 (22101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------