

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K20143

研究課題名（和文）摂食障害に着目したエピジェネティクス制御とGPCRの相関関係

研究課題名（英文）Correlation between epigenetic control and GPCR focusing on feeding disorders

研究代表者

濱本 明恵（Hamamoto, Akie）

岐阜大学・工学部・助教

研究者番号：60784197

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：摂食障害への関与が予測される一方、摂食関連Gタンパク質共役型受容体（GPCR）とヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）の関係はこれまで不明であった。そこで摂食亢進GPCRのメラニン凝集ホルモン受容体MCHR1に着目し、HDACとの関係を解析した。その結果、MCHR1とHDACとの相関関係を明らかにし、特にHDAC5、9、10の関与を示した。脳での共発現が推測されるHDAC10に着目した所、MCH刺激により発現が低下し局在も変化した。さらにHDAC10がMCHR1シグナル系のGq経路に選択的に制御するという興味深い結果も得た。本研究は摂食関連GPCRとエピジェネティクスの新たな分子機構となり得る。

研究成果の学術的意義や社会的意義

摂食障害は生命を脅かすリスクのある深刻な疾患であるが、その制御機構はいまだ不明確である。摂食におけるエピジェネティクスの関与について、DNAメチル化に関する研究は多数報告されているが、摂食関連GPCRとHDACの報告はほぼ存在しない。本研究は摂食行動に重要な役割を担うMCHR1に着目し、HDACと相関関係を有しており、お互い発現やシグナル制御に影響を及ぼすことを初めて明らかにした。本研究により摂食関連GPCRとエピジェネティクスの新たな分子機構が解明され、肥満・摂食障害などの新規治療戦略が期待される。

研究成果の概要（英文）：Although associated with eating disorders is predicted, the relationship between eating-related G protein-coupled receptors (GPCRs) and histone deacetylases (HDACs) has been completely unknown. Therefore, we focused on the melanin-concentrating hormone receptor (MCHR1), which is an orexigenic GPCR, and analyzed its relationship with HDAC. As a result, the correlation between MCHR1 and HDAC was clarified, and in particular, the involvement of HDAC5, 9 and 10 was shown. Focusing on HDAC10, which is presumed to be co-localized in the brain, the expression decreased and the localization changed due to MCH stimulation. Furthermore, we obtained an interesting result that HDAC10 selectively regulates the Gq pathway in MCHR1-mediated signaling system. It could be a new molecular mechanism for feeding-related GPCRs and epigenetics.

研究分野：生化学

キーワード：Gタンパク質共役型受容体 ヒストン脱アセチル化酵素 メラニン凝集ホルモン受容体 摂食障害

1. 研究開始当初の背景

拒食症や過食症をはじめとした摂食障害は、精神疾患の中でも生命を脅かす深刻な難病である。遺伝的素因と環境素因の双方が原因になると考えられているが、その発症メカニズムと摂食行動に与える機構ははまだ不明であり、摂食障害そのものに対する治療薬は存在しない。

摂食行動は主に視床下部を中心とする神経ネットワークによって制御されており、その情報伝達はメラニン凝集ホルモン(MCH)をはじめとした摂食調節ペプチドを介して行われている。これら摂食調節ペプチドの受容体は、主にGタンパク質共役型受容体(GPCR)である。GPCRは、細胞膜7回貫通構造をしており、細胞外でリガンドが結合すると細胞内でGタンパク質と相互作用(共役)して細胞内に情報を伝達することで、最終的に摂食行動やエネルギー代謝に影響を与える。即ち、摂食関連GPCRは、摂食行動の起点と言える。

最近、摂食障害にエピジェネティクスの関与が示唆された。エピジェネティクスとは、DNAメチル化、ヒストンの化学的修飾等による、DNA塩基配列の変化を伴わない後天的な遺伝子の修飾機構のことである。特にヒストンアセチル化は遺伝子の転写活性に深く関与しており、ヒストンがアセチル化された領域ではDNAの巻き付きが緩むため遺伝子の転写活性が高まる。一方、脱アセチル化された領域ではDNAの巻き付きがきつくなるため転写が抑制される。このヒストンの脱アセチル化を触媒する酵素が、ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)である。摂食行動とHDACを介したエピジェネティクスには重要な相関関係が想定される。

しかし、摂食行動に対してHDACがどのような制御を行っているか不明であり、摂食行動の起点となる摂食関連GPCRとHDACとの関係を示した報告は存在しない。一方、GPCRを介した代表的な細胞内シグナル系であるcAMPと細胞内Ca²⁺は、HDACの活性に影響を与えることが報告されている。さらに、摂食障害と併発しやすい鬱や統合失調症などの精神疾患や炎症に関与するGPCR(ドーパミン受容体やエンドセリン受容体など)は、HDACと相互作用することから、摂食関連GPCRとHDACも互いに影響しあう可能性が十分考えられる。

以上より、摂食関連GPCRとHDACの相関関係の解明は、摂食行動に対する新規メカニズムの解明につながり、摂食障害改善のための新規治療ターゲットとなり得る。

2. 研究の目的

摂食関連GPCRとHDACがお互い影響しているのかを明らかにする。HDACが摂食障害に関与する可能性が高いが、摂食行動の起点となる摂食関連GPCRとHDACとの関係を示した報告は現時点では無い。

GPCRにリガンドが結合するとGタンパク質を活性化し、cAMP量の変化や細胞内Ca²⁺濃度の上昇を引き起こす。GPCRの一つであるβアドレナリン受容体は、セカンドメッセンジャーであるcAMPやCa²⁺変化の下流でHDACの活性に影響を与えること、Gタンパク質βγサブユニットとHDACが直接結合することが報告されている。そこで、複数存在する摂食関連GPCRがどのHDACサブタイプの活性に影響するか、またHDACが摂食関連GPCRの発現や細胞内シグナル系に影響を与えるのかを網羅的に解析する。

3. 研究の方法

本研究ではMCH受容体とHDAC Class I、II(HDAC1-10)に焦点を当てて、お互いの相関関係と摂食行動に与える影響を解析する。

摂食関連GPCRの下流において、HDACの活性に変化が生じるかを明らかにするために、哺乳類培養細胞に各種摂食関連GPCRとタグ付けしたHDACをリポフェクション法により強制発現させる。GPCRのリガンドで刺激した際、HDACの局在や発現量の変化を細胞免疫染色法およびウエスタンブロット法、定量PCR法で解析する。またHDACの影響を受けるヒストンアセチル化部位とヒストンアセチル化活性を測定する。

HDACがGPCRの発現や細胞内シグナル系に与える影響を調べるために、摂食関連GPCRを強制発現した細胞に作用機序の異なるHDACの阻害剤を投与する。その後、GPCRの発現量の変化や細胞内シグナルの変化をレポーターアッセイ、各種キナーゼ活性測定などを実施し解析する。

in vivoにおいて、摂食関連GPCRとHDACの相関を解析するために、マウスの脳室内または腹腔内に摂食関連GPCRのアゴニストやアンタゴニスト、HDAC阻害剤を投与する。その後、各GPCRやHDACの発現変化を調べる。また摂食行動や鬱をはじめとした表現型も評価する。

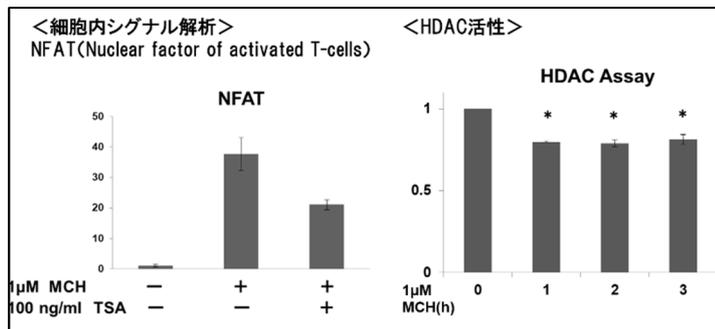
4. 研究成果

本研究では摂食亢進GPCRであるメラニン凝集ホルモン受容体MCHR1に着目して研究を行った。リガンドであるメラニン凝集ホルモンMCHは哺乳類においてアミノ酸19残基からなる神経ペプチドであり、脳の摂食中枢(視床下部)で合成され脳内に広く投射を行っている。MCHR1ノックアウトマウスやMCHR1アンタゴニストの投与により抗肥満作用・抗うつ作用を示すこ

とが報告されている。また、哺乳類において MCHR1 は G タンパク質の中でも Gi/o、Gq と共有することで細胞内カルシウム濃度の増加や cAMP の産生抑制、ERK 活性化を示す。

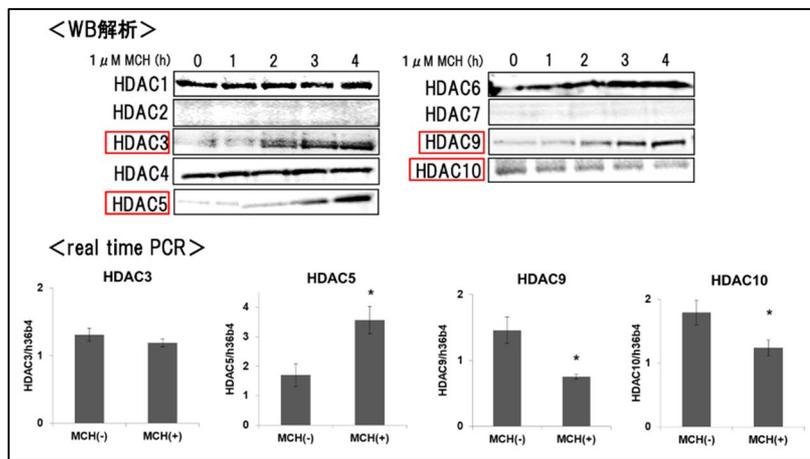
(1)MCHR1 と HDAC の相関関係解明

まず MCHR1 と HDAC が相関関係を示すか解析した。MCHR1 を発現する HEK293 細胞に HDAC 阻害剤であるトリコスタチン A (TSA) で処理した場合、細胞内シグナル下流の NFAT (Nuclear factor of activated T-cells) の転写活性が有意に低下した。また MCH を添加すると MCHR1 の発現量が時間依存的に増加するが、TSA を処理することにより増加率が抑制した。さらに、MCH-MCHR1 シグナルによる HDAC 活性への影響を調べるために HDAC 活性測定を行ったところ、MCH 添加により HDAC 活性が 20% と有意に低下することが判明した。以上より、MCHR1 と HDAC が相関関係を有することを初めて示した。



(2)MCHR1 と相関関係を示す HDAC サブタイプの特定

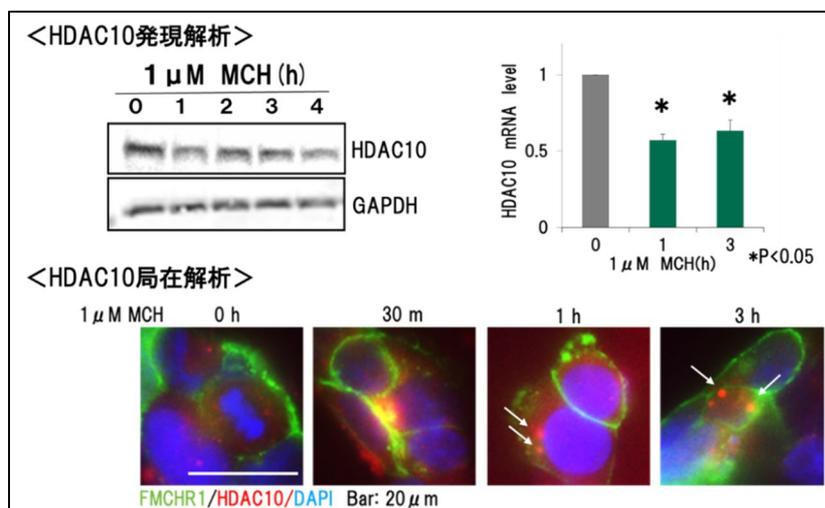
続いて、HDAC1-11 まで存在する HDAC のどのサブタイプが MCHR1 と相互作用しているか特定するために網羅的な解析を行った。HEK293 細胞に MCHR1 と各 HDAC を一過性発現させてウエスタンブロット解析を行ったところ、HDAC3、5、9、10 は MCH 添加により発現量が変化し、MCHR1 との相関関係が示唆された。また、MCH 添加による NFAT の転写活性においても HDAC3、5、9、10 過剰発現は影響を及ぼした。細胞免疫染色の結果、MCH 添加 4 時間後において HDAC5、9、10 は細胞内局在の変化が示唆されたが、HDAC3 は局在の変化が観察されなかった。さらに real-time PCR により MCH 添加 4 時間後の内在性 HDAC の遺伝子発現量を解析したところ、HDAC3 は発現が変化しなかったが、HDAC5 は mRNA 量が増加、HDAC9、10 は低下することが判明した。一方、細胞内カルシウム濃度測定では HDAC 過剰発現および TSA 処理による変化を示さなかったため、HDAC は MCHR1 の下流において作用することが示唆された。以上より、MCHR1 は HDAC5、9、10 と相関関係を有することを明らかにした。



(3)MCH-MCHR1 シグナル系が HDAC10 に与える影響

本研究では、MCH 添加により発現量が低下し、なおかつ MCHR1 と同じく脳の視床下部で発現している HDAC10 に着目し、詳細な解析を行った。

MCHR1 が安定発現した HEK293 細胞に MCH を添加しウエスタンブロット解析を行った結果、内在性 HDAC10 のタンパク質発現が低下した。次に、RT-PCR 法およびリアルタイム PCR 法を行ったところ、MCH 添加 1 時間後より、



内在性 HDAC10 の mRNA 発現が有意に (約半分まで) 低下した。さらに細胞免疫染色により局在を確認したところ、細胞質内に広く発現していた HDAC10 が MCH 添加により細胞内で凝集

することが観察された。以上より、MCH-MCHR1 シグナル系が HDAC10 の発現に影響を与えることが判明した。

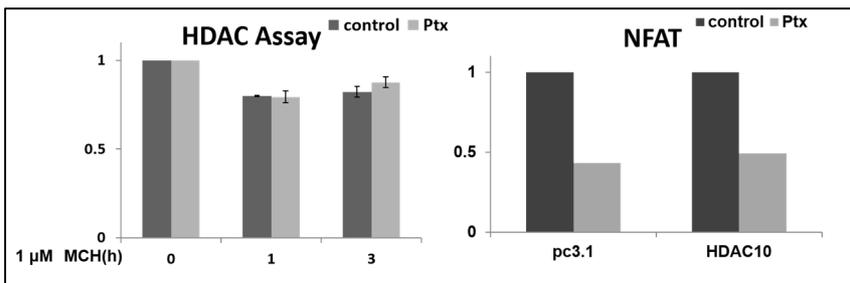
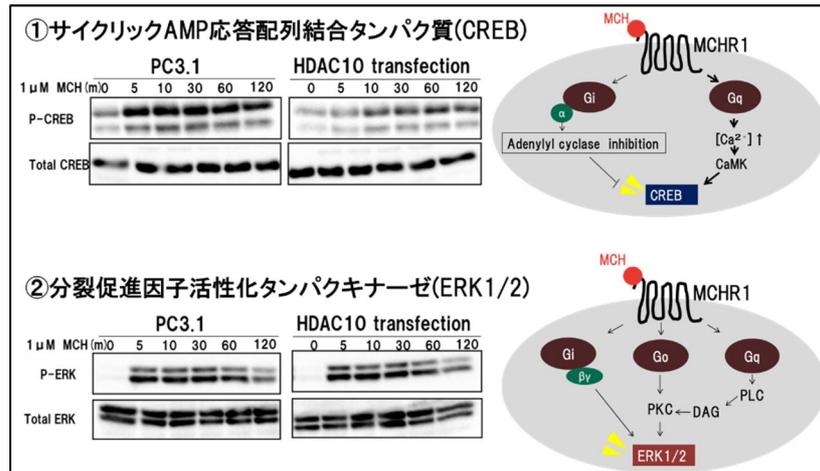
MCH 添加により HDAC10 発現が低下し、HDAC10 過剰発現により MCHR1 の発現が変化したことから、MCHR1 と HDAC10 が直接相互作用している可能性を考えた。そこで、MCH を 0-3 時間添加した MCHR1 を溶解して MCHR1 で免疫沈降法を行い、抗アセチル化抗体を用いたウエスタンプロット法により MCHR1 のアセチル化を解析した。その結果、MCH 添加により、MCHR1 が脱アセチル化されることが確認された。しかし、MCHR1 の免疫沈降サンプルにおいて HDAC10 の発現は確認されず、MCHR1 と HDAC10 は直接的ではなく間接的に相互作用することが分かった。

(4)HDAC10 が MCH-MCHR1 シグナル系に与える影響

HDAC10 が、MCHR1 シグナル系に与える影響について解析を行った。まず、Gq 経路で活性化される転写因子 cAMP 応答配列結合タンパク質 (CREB) に着目した。MCHR1 発現細胞に MCH を添加すると、CREB が活性化するが、この活性化は HDAC10 過剰発現下で抑制することが判明した。HDAC10 過剰発現下でリン酸化 CREB と結合する CRE の活性がどのように変化するか、レポーターアッセイにより解析した。その結果、HDAC10 過剰発現下で CRE 活性が 73% 抑制されていることが判明した。

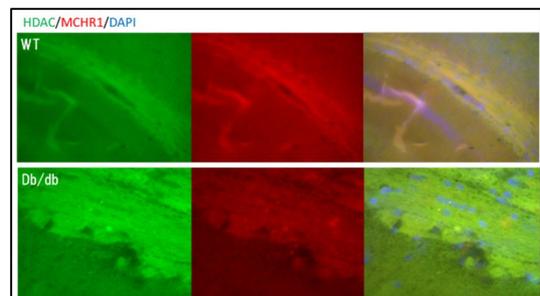
続いて、CREB より上流で活性化される分裂促進因子活性化タンパクキナーゼ (ERK1/2) に着目した。MCHR1 安定発現細胞に MCH を添加すると ERK1/2 が活性化するが、HDAC10 過剰発現下で解析を行ったところ、ERK1/2 リン酸化への影響は確認されなかった。従って、HDAC10 が ERK 活性には影響を与えず、細胞内シグナル下流である CREB リン酸化を抑制することが判明した。

さらに、Gi/o 阻害剤である百日咳毒素 (PTX) を用いることで、HDAC 活性は MCHR1 に共役する Gi/o、Gq の内、どちらのシグナル系に特異的か検討を行った。まず、MCHR1 発現細胞の HDAC 活性を測定したところ、PTX の影響を受けなかった。また、HDAC10 過剰発現下において細胞内シグナルの下流である NFAT の転写活性を解析したところ、PTX を加えた場合でも、同様の傾向が示された。したがって、PTX 添加による効果が認められなかったことから、HDAC10 は Gi/o 経路よりも Gq 経路選択的に関与する可能性が推測された。



(5)脳における MCHR1 と HDAC10 の機能解析

最後に、マウスの脳切片における MCHR1 と HDAC10 の局在を組織免疫染色により確認した。今回は MCHR1 の発現が確認されている海馬に着目し、観察を行ったところ、糖尿病肥満モデルマウス (db/db マウス) の海馬領域において HDAC10 の発現が増加していることが判明した。今後は MCH 投与時や絶食時などにおける HDAC10 の発現変化等を解析する予定である。



(6)HDAC9 における機能解析

(2)において MCHR1 との相関関係が示唆された HDAC9 に関して、HDAC10 と同様に MCHR1 との相関関係の解析を行った。まず、MCH が HDAC9 のタンパク質発現に与える影響をウエス

タンブロット法で調べたところ、抗 HDAC9 抗体による検出ができなかった（抗体の特異性の問題）。同様のサンプルを用い、HDAC9 過剰発現が MCHR1 発現量に与える影響を調べたところ、MCHR1 の発現に影響を与えることが判明した。さらに RT-PCR 法により HDAC9 の mRNA 発現を調べたところ、MCH 添加により発現量が有意に低下していることがわかった。細胞免疫染色を行ったが、MCH 添加による大きな変化は確認されなかった。

(結論)

本研究により、MCHR1 と HDAC の相関関係を初めて明らかにした。さらに、MCHR1 シグナル系により HDAC10 の発現が低下すること、HDAC10 は MCHR1 シグナル系の特に Gq 経路に関与することが判明した。今後は *in vivo* 実験を行うことで、生体内における MCHR1 と HDAC10 の機能解析に取り組む。

摂食に関係するエピジェネティクスの関与に関しては、特に DNA メチル化に関する研究が多数報告されている一方、ヒストンアセチル化に関しては、HDAC がエネルギー代謝や脂肪の蓄積などに重要なことが示されているが、摂食行動や摂食を制御する GPCR との関係を示した報告はほとんどない。本研究により摂食関連 GPCR のエピジェネティクスというこれまで注目されてこなかった新たな分子機構が解明され、肥満・摂食障害の新規治療戦略が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Hamamoto A, Isogai R, Maeda M, Hayazaki M, Horiyama E, Takashima S, Koketsu M, Takemori H.	4. 巻 9
2. 論文標題 High Content of 11 OH-Kaurenoic Acid in Adenostemma. lavenia (L.) O. Kuntze Leaf Extract.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Foods	6. 最初と最後の頁 73
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/foods9010073.	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 Saito Y, Hamamoto A, Kobayashi Y.	4. 巻 154
2. 論文標題 Selective signaling pathway via feeding-related ciliary GPCR, melanin-concentrating hormone receptor 1.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nihon Yakurigaku Zasshi.	6. 最初と最後の頁 179-185
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1254/fpj.154.179.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Okajima S, Hamamoto A, Asano M, Isogawa K, Ito H, Kato S, Hirata Y, Furuta K, Takemori H.	4. 巻 509
2. 論文標題 Azepine derivative T4FAT, a new copper chelator, inhibits tyrosinase.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 209-215
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.12.105.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takemori H, Hamamoto A, Isogawa K, Ito M, Takagi M, Morino H, Miura T, Oshida K, Shibata T.	4. 巻 8
2. 論文標題 Mouse Model of Metformin-Induced Diarrhea.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMJ Open Diabetes Res Care.	6. 最初と最後の頁 e000898
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/bmjdr-2019-000898.	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 Kato S, Aoe T, Hamamoto A, Takemori H, Nishikubo T.	4. 巻 2
2. 論文標題 New Deletions in the Hermansky-Pudlak Syndrome Type 5 Gene in a Japanese Patient.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Reports	6. 最初と最後の頁 15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/reports2020015	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19件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 加藤慎也、濱本明恵、竹森洋
2. 発表標題 化合物HCOQによるメラニン合成抑制機構の解明
3. 学会等名 第83回日本生化学会中部支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 磯貝亮介、濱本明恵、竹森洋
2. 発表標題 11-OHカウレン酸誘導体のメラニン形成抑制及び抗炎症作用
3. 学会等名 第83回日本生化学会中部支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹森洋、濱本明恵、五十川健太、伊藤雅文、高木優憲、森野博文、三浦孝典、押田恭一、柴田高
2. 発表標題 メトホルミン誘導性下痢のマウスモデルにおけるホクレオソートの止瀉効果
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 濱本明恵、島林沙樹、竹森洋
2. 発表標題 ゼブラフィッシュを利用した白斑評価
3. 学会等名 第90回動物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 早崎真純、竹森洋、濱本明恵
2. 発表標題 ゼブラフィッシュにおける白斑化現象
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 青山瑠里子、竹森洋、濱本明恵
2. 発表標題 摂食関連GPCRとHDACの機能相関関係
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林 卓広、磯貝 亮介、濱本 明恵、竹森洋
2. 発表標題 11-OHカウレン酸誘導体による一酸化窒素(NO)産出抑制作用
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 前田美和、伊藤弘成、濱本明恵、竹森洋
2. 発表標題 11 OHカウレン酸のメラニン合成酵素遺伝子発現抑制における構造活性相関
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡邊実夢、中村優介、岡島沙也花、濱本明恵、古田享史、竹森洋
2. 発表標題 薬物輸送システム開発のためのホワイトメラノソームの作成
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 61.Hatano O, Hayazaki M, Hamamoto A, Takemori H, Takaya H, Shano T, Isozaki K, Ohnishi K, Nakamura M
2. 発表標題 CLEM imagings of rhododendrol-induced vitiligo in Danio rerio and catalytic oxidation of Japanese cedar wood.
3. 学会等名 ABiS Symposium: Forefront and Future of Electron Microscopic Imaging
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 濱本明恵、青山瑠里子、竹森洋
2. 発表標題 摂食亢進GPCR を介したヒストン脱アセチル化酵素の制御
3. 学会等名 第84回日本生化学会中部支部例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 早崎真純、秦野修、竹森洋、濱本明恵
2. 発表標題 ゼブラフィッシュに対する白斑誘発性化合物の影響
3. 学会等名 第84回日本生化学会中部支部例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 渡邊実夢、中村優介、濱本明恵、古田享史、竹森洋
2. 発表標題 新規DDS 開発のためのメラニン合成制御剤の探索
3. 学会等名 第84回日本生化学会中部支部例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小林卓広、磯貝亮介、濱本明恵、竹森洋
2. 発表標題 11-OHカウレン酸における抗炎症作用機序の解析
3. 学会等名 第84回日本生化学会中部支部例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 前田美和、鈴木麻由、濱本明恵、竹森洋
2. 発表標題 11-OHカウレン酸の標的検索を目的とした修飾法の開発
3. 学会等名 第84回日本生化学会中部支部例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 磯貝亮介、濱本明恵、竹森洋
2. 発表標題 ヌマダイコンに含まれる抗炎症成分11-OHカウレン酸と転写因子NF- κ Bとの関係の解析
3. 学会等名 第84回日本生化学会中部支部例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 道前桃花、溝口桃加、竹森洋、濱本明恵
2. 発表標題 メラニン凝集ホルモン受容体1シグナル伝達経路におけるHDACの機能
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中紀花、小林卓広、濱本明恵、竹森洋
2. 発表標題 11-OHカウレン酸及びその誘導体によるマウスでの癌免疫亢進作用
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 道前桃花、青山瑠里子、溝口桃加、竹森洋、濱本明恵
2. 発表標題 ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)による食欲シグナルの制御
3. 学会等名 第85回日本生化学会中部支部例会
4. 発表年 2021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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------