

様式 C-19 (記入例)

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 22 年 5 月 28 日現在

研究種目：若手研究 B

研究期間：2008～2009

課題番号：20790742

研究課題名（和文） 視床下部における転写調節因子 ALF4 の成長ホルモン分泌調節に対する役割の検討

研究課題名（英文） The role of ALF4, a transcription factor, in the regulation of growth hormone secretion in the hypothalamus

研究代表者

小森 忠祐 (KOMORI TADASUKE)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：90433359

研究成果の概要（和文）：絶食時の視床下部においてALF4の発現増加が認められ、大部分のALF4陽性細胞はグレリン受容体(growth hormone secretagogue-receptor; GHS-R)を発現していた。また、ALF4は、視床下部においてグレリンにより誘導されることが明らかとなった。さらには、ALF4は、AMP-activated protein kinase (AMPK)の発現を誘導し、ALF4ヘテロ欠損マウスでは、絶食時におけるAMPK活性化の減少、摂食促進ニューロペプチド(ニューロペプチドYやアグーチ関連ペプチド)の発現低下、再摂食量の低下が認められた。これらのことより、ALF4は視床下部の機能と密接に関わっていることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）： AF5q31 expression was exclusively observed in growth hormone secretagogue-receptor (GHS-R)-expressing neurons during fasting. The intraperitoneal injection of ghrelin induced the expression of AF5q31 in the GHS-R-positive neurons of the arcuate nucleus and ventromedial hypothalamic nucleus. The decrease of AF5q31 expression in heterozygous mice attenuated the fasting-induced expression of AMPK α , as well as the expression of neuropeptide Y (NPY) and agouti-related peptide (AgRP) in the hypothalamus. Furthermore, the increase in fasting-induced food intake in heterozygous mice was less than that observed in wild-type mice. From these findings, ghrelin-induced AF5q31 in the hypothalamus appear to play an important role in the expression of AMPK, which may induce the expressions of NPY and AgRP, and thereby increase food intake.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：視床下部、転写因子、グレリン、AMP-activated protein kinase、摂食

1. 研究開始当初の背景

(1) 摂食と成長ホルモン分泌との関連の研究は精力的に行われており、マウスやラットでは絶食後 24 時間でその分泌が一過性に促進され、絶食後 48 時間においては分泌抑制状態になることが知られている (Frystyk, et al. *Am J Physiol*, 277: 245-252, 1999, Luque, et al. *Endocrinology*, 148: 300-309, 2007)。しかし、その分子メカニズムに関する知見は乏しいのが現状である。

(2) 当教室の森川は、48 時間絶食後の C57BL/6J マウスの視床下部において神経細胞の活性化を表す c-Fos の発現が増加することや、細胞内シグナル伝達分子である ERK や CREB が活性化することを明らかにした (Morikawa, et al. *J Neuroendocrinol.* 16: 1-8, 2004)。さらに、申請者は、絶食時のマウスの視床下部における遺伝子発現の変化を網羅的にとらえるために、cDNA マイクロアレイを用いて絶食時に誘導される遺伝子を検討した。その結果、いくつかの細胞内シグナル伝達物質や、転写因子の発現増加が認められた。これらのことから、絶食時の視床下部では転写因子カスケードが活性化されており、それらが成長ホルモン分泌調節に重要である可能性が示唆された。

(3) ALF4 は、絶食後 48 時間のラットの視床下部において増加することが報告されている (Li, et al. *J Biol Chem*, 277: 9069-9076, 2002) が、その視床下部における機能的役割は不明である。ALF4 はもともと急性リンパ芽球性白血病の原因遺伝子 MLL と転座を起こす遺伝子としてクローニングされており (Taki, et al. *Proc Nat Acad Sci USA*, 96: 14535-14540, 1999)、その視床下部との関連はまったく知られていないことから、視床下部における ALF4 の機能を解明することは、話題性、重要性が高いと考えられる。

2. 研究の目的

(1) 絶食時のマウスの視床下部において ALF4 が発現している細胞を同定する。

(2) 絶食時のマウスの視床下部において ALF4 の発現を誘導している分子を同定する。

(3) 絶食時のマウスの視床下部における ALF4 の役割を検討する。

3. 研究の方法

(1) 絶食時のマウスの視床下部において ALF4 が発現している細胞を *in situ* hybridization 法や免疫染色法を用いて検討する。

(2) 絶食時のマウスの視床下部において ALF4 の発現を誘導している可能性のある分子を野生型マウスに投与し、視床下部における ALF4 の発現変化をウエスタンブロット法を用いて検討する。また、培養細胞を用い、

直接的な誘導を検討する。

(3) ALF4 は転写因子であるため、絶食時のマウスの視床下部において ALF4 と関連している可能性のある分子の発現変化を、ALF4 を強発現させた培養細胞を用いて検討する。また、ALF4 遺伝子欠損マウスを用いた *in vivo* での検討も行う。

4. 研究成果

(1) 絶食時のマウスの視床下部における ALF4 発現細胞の同定

① 絶食時の野生型マウスの視床下部において ALF4 の mRNA 発現が増加していたことより、同条件における ALF4 の蛋白発現について検討したところ、摂食群と比較し、絶食群の視床下部においてその発現増加が認められた (図 1)。

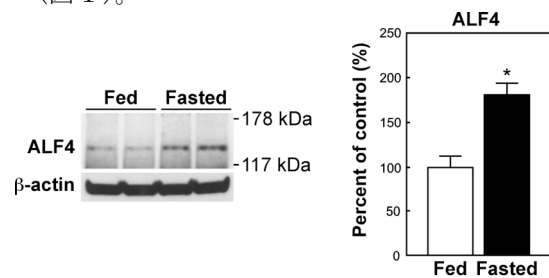


図 1 絶食時のマウスの視床下部における ALF4 蛋白の発現 (ウエスタンブロット法)

② 免疫染色法により ALF4 蛋白の視床下部内での局在を検討したところ、絶食時の野生型マウスの弓状核と腹内側核においてその強い発現を認めた (図 2)。また、ALF4 の蛋白発現は主に神経細胞の核内に局在していた (図 2)。

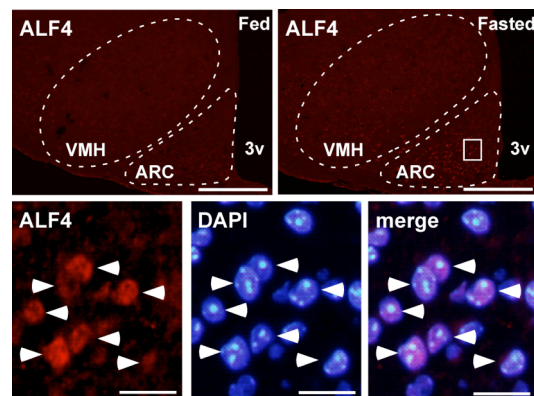


図 2 絶食時のマウスの視床下部における ALF4 蛋白の発現 (免疫染色法)

③絶食時の野生型マウスの視床下部における ALF4 と GHS-R の共存を検討したところ、大部分の ALF4 陽性細胞は GHS-R を発現していた (図 3)。

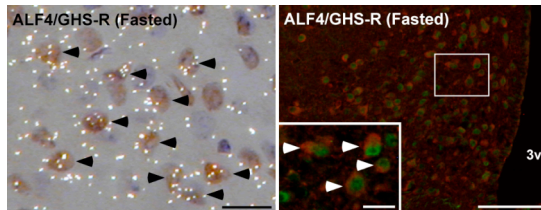


図 3 絶食時のマウスの視床下部弓状核における ALF4 と GHS-R の共存

(2) 視床下部における ALF4 発現誘導因子の検討

①野生型マウスの腹腔内にグレリンを投与し、視床下部における ALF4 の発現誘導を検討したところ、ALF4 の発現は、グレリン投与後 2 時間で増加し始め、4 時間で最高値に達した (図 4)。また、グレリンによって視床下部で増加した ALF4 は、弓状核と腹内側核の GHS-R を発現している細胞に局在していた (図 4)。

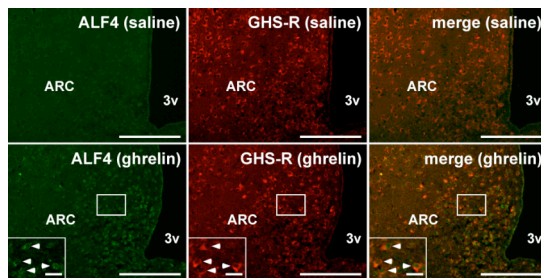
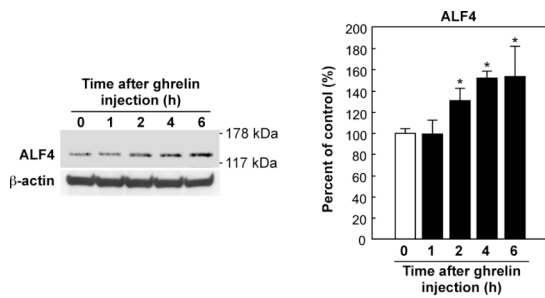


図 4 グレリンによる ALF4 蛋白の視床下部における発現誘導

②視床下部神経細胞の細胞株である GT1-7 細胞にグレリンを処置し、ALF4 の発現誘導を検討した。ALF4 の発現は、グレリン処置後 30 分目より増加し始め、4 時間を過ぎてても高値を保っていた (図 5)。また、ALF4 の発現は、刺激したグレリンの用量に依存的に増加した (図 5)。

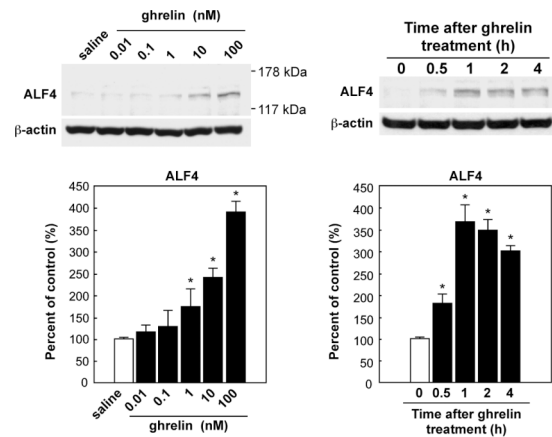


図 5 グレリンによる ALF4 蛋白の GT1-7 細胞における発現誘導

(3) 絶食時のマウスの視床下部における ALF4 の役割の検討

①マウスの視床下部の細胞株である GT1-7 細胞に ALF4 を強発現させ、AMPK の発現変化を検討したところ、AMPK の発現は、ALF4 の過発現により増加した (図 6)。

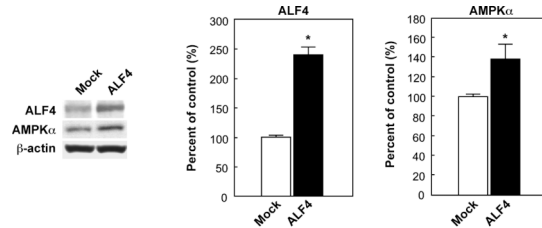


図 6 ALF4 による AMPK の GT1-7 細胞における発現誘導

②ALF4 ヘテロ欠損マウスの絶食時の視床下部における AMPK の活性化を検討した。野生型マウスの視床下部では、絶食時に AMPK の発現が増加したが、ALF4 ヘテロ欠損マウスではその発現の増加は認められなかった (図 7)。

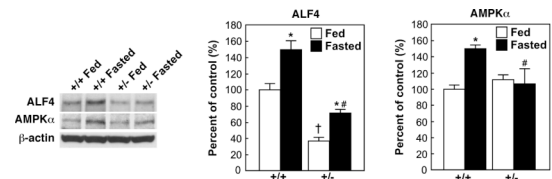


図 7 絶食時の ALF4 ヘテロ欠損マウスの視床下部における AMPK の発現変化

③ALF4 ヘテロ欠損マウスの絶食時の視床下部における NPY や AgRP の発現変化を検討した。野生型マウスの視床下部では、絶食時の NPY や AgRP の著明な発現増加が認められた。ALF4 ヘテロ欠損マウスの視床下部では、NPY や AgRP の発現は少し増加していたものの、野生型マウスの増加よりは有意に少なかった (図 8)。

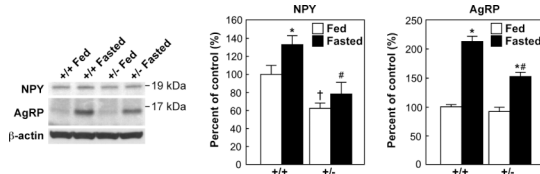


図 8 絶食時の ALF4 ヘテロ欠損マウスの視床下部における NPY と AgRP の発現変化

④ALF4 ヘテロ欠損マウスの絶食後の再摂食量について検討した。野生型マウス、ALF4 ヘテロ欠損マウス共に、絶食後の再摂食量の増加が認められた。しかし、その増加量は、野生型マウスと比べて ALF4 ヘテロ欠損マウスで少なかった (図 9)。

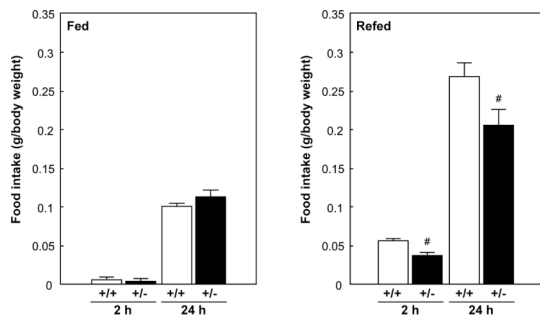


図 9 ALF4 ヘテロ欠損マウスの絶食後の再摂食量の検討

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)

[学会発表] (計 6 件)

(1) 小森 忠祐 Ghrelin-induced expression of a transcription factor, AF5q31, in the hypothalamus; possible roles in the expression of AMP-activated protein kinase-alpha A Keystone Symposium [Neuronal Control of Appetite, Metabolism and Weight] 2010年1月26日 Keystone, CO

(2) 小森 忠祐 Induction of AF5q31, a member of AF4 family of transcription factor, by fasting and ghrelin in the hypothalamus 39th Annual Meeting of Society for Neurosciences 2009年10月18日 Chicago, IN

(3) 小森 忠祐 Fasting-induced

expression of AF5q31, a transcription factor, and β Klotho in the hypothalamus 第52回国際神経化学大会 2009年6月24日 伊香保

(4) 小森 忠祐 A fasting-induced gene in the hypothalamus, AF5q31; putative roles in glucose metabolism. A Keystone Symposium [Type 2 Diabetes and Insulin Resistance] 2009年1月22日 Banff, AB

(5) 小森 忠祐 Role of a putative transcription factor AF5q31 in hypothalamic-pituitary-mediated somatic growth and energy homeostasis 38th Annual Meeting of Society for Neuroscience 2008年11月18日 Washington, DC

(6) 小森 忠祐 視床下部における転写調節因子 AF5q31 の身体の成長やエネルギー代謝に対する役割の検討 第51回国際神経化学大会 2008年9月11日 富山

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小森 忠祐 (KOMORI TADASUKE)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：90433359

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：