

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890111

研究課題名(和文) アディポカインの機能調節機構の解明

研究課題名(英文) Investigation on regulatory mechanism of adipokines

研究代表者

山本 浩靖 (YAMAMOTO, HIROYASU)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：00631201

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)： 内蔵脂肪組織でのアディポカイン分泌異常がメタボリックシンドロームの病因であり、その発現や機能調節の解明は新たな治療法開発に繋がる。そこで、その1つであるオメンチン発現の調節因子を検討した。Caco-2細胞でのオメンチン mRNA発現はインスリンで抑制、糖質コルチコイドで上昇した。オメンチン遺伝子上流1.5 kbのプロモーター解析では、これらの刺激に対する反応は認めず、1.5kbより上流の領域の関与が示唆された。一方、HepG2細胞溶解液に含まれるタンパクから抗アディポネクチン抗体で共沈してくる新規の結合タンパクを同定した。この結合には糖鎖は関与せず、新たな結合様式が示唆された。

研究成果の概要(英文)： Abnormal secretion of adipokines from visceral fat tissue is a pathogenesis of Metabolic Syndrome (MS), and elucidation of the mechanism in their expression and function would provide hints for the development of new therapies against MS.

We investigated the regulation in mRNA expression of omentin, an anti-atherogenic adipokine. Omentin mRNA expression is regulated by insulin and glucocorticoid, negatively and positively, respectively. However, these stimulants had no effects on promoter activity in its 1.5 kb-promoter region, suggesting that further upstream sequences are essential to respond to them. Also, we identified a novel adiponectin-binding protein (APNBP1) from HepG2 cell lysate, with immunoprecipitation and mass spectrometry techniques, and confirmed the association in vitro. Analysis of systematic APNBP1 mutants suggested that glycosylation sites in APNBP1 are not necessary, and that the sequence close to N-terminus is important for the interaction with adiponectin.

研究分野：内分泌

科研費の分科・細目：動脈硬化

キーワード：アディポカイン 動脈硬化

1. 研究開始当初の背景

メタボリックシンドロームは、内蔵脂肪の過剰蓄積に耐糖能障害、脂質異常、高血圧を合併する病態であり、これら危険因子の相乗的蓄積は動脈硬化疾患として重篤な心・脳血管障害を惹起する。近年では脂肪組織は単なるエネルギー貯蔵組織ではなく、分泌タンパクである「アディポカイン」を放出する内分泌臓器として位置付けられるようになり、アディポネクチン、レプチン、オメンチンなどが糖・脂質代謝、動脈硬化等の病態に大きな役割を果たすことが証明されてきた。

このうち、研究代表者の所属する研究室では、世界に先駆けてアディポネクチンの血中濃度測定法を開発しており、アディポネクチンが動脈硬化防御因子として働くことを発見している。さらに、低アディポネクチン血症が糖尿病・高血圧・冠動脈疾患の独立した危険因子であることも報告している。

また、共同研究を通じて、腸管と内臓脂肪で産生されるオメンチンの血中濃度は虚血性心疾患患者で低下していること、肥満度や代謝異常の危険因子の数と逆相関をすること、動脈硬化発症モデルマウスにオメンチンを投与することにより、動脈硬化性病変の発症・進展が抑制されることを報告してきた。

2. 研究の目的

先行研究の成果から、アディポカイン発現量の調節制御機構の解明、あるいは他の分子との相互作用を介したアディポカイン作用機序の解明は、メタボリックシンドロームにより惹起される動脈硬化性疾患の治療や予防に役立つことが予想される。

そこで本研究では、(1)オメンチン mRNA 発現調節機構の解明、(2)アディポネクチンの新規結合タンパクの同定とその複合体の動脈硬化発症機序における役割の解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1)オメンチン産生調節機構の解明

オメンチン mRNA 発現の評価

オメンチン産生能を有するヒト結腸ガン細胞株 Caco-2 細胞を、糖・脂質代謝に関係する様々な因子で刺激した。刺激 4-24 時間後に回収した細胞から RNA を抽出し、オメンチン mRNA 発現量を定量リアルタイム PCR 法にて評価した。

オメンチン・プロモーター・レポーター・ベクターの作製

ヒト末梢血白血球より抽出したゲノム DNA を鋳型とした PCR により、数種類のオメンチン・プロモーター配列 (0.5-1.5 kb) をクローニングした。シークエンスを確認した後、ホタル・ルシフェラーゼ遺伝子配列の上流にこれらのプロモーター配列を挿入し、レポーター・ベクターを作製した (pGL4-Omentin-luc)。

レポーター・アッセイ

で作製した pGL4-Omentin-luc を Caco-2 細胞に導入した。この時、干渉現象を補正するためにウミシイタケ・ルシフェラーゼ・ベクター (pRenilla-luc) を同時に遺伝子導入した。24 時間後、で結果の得られた各種因子により 4-24 時間刺激し、2 つのルシフェラーゼ活性を測定し、プロモーター活性を評価した。

(2)新規アディポネクチン結合タンパクの同定

アディポネクチン結合タンパクの検索

20%ヒト AB 血清を含む培地で培養したヒト肝癌由来細胞株 HepG2 より細胞溶解液を作製した。この細胞溶解液をマウス抗ヒトアディポネクチン抗体あるいはマウスコントロール IgG で免疫沈降した検体を SDS-PAGE にて展開し、銀染色を行った。抗アディポネクチン

ン抗体での免疫沈降サンプルに特異的に認められるバンドをゲルから切り出し、含有されるペプチド配列を質量分析により解析した。既知のタンパクのペプチド配列データベースを用いてタンパクを同定し、アディポネクチン結合候補タンパクとした。

アディポネクチンとの結合の確認

HepG2 細胞の mRNA から作製した cDNA から、同定されたタンパクの cDNA を PCR 法にてクローニングし、C 端に myc-tag を付加させる発現ベクターを作製した。

HEK293 細胞に myc-tag を付加したアディポネクチン結合候補タンパク、およびアディポネクチンを発現させ、その細胞溶解液を混和した後、と同様の免疫沈降法を行い、抗 myc 抗体を用いたウエスタン・ブロット法により両者の特異的な結合を解析した。

4 . 研究成果

(1) Caco-2 細胞におけるオメンチン mRNA 発現は、4 時間のインスリン刺激により、濃度依存的 (0 - 5 μ M) に低下を認めたが。種々のブドウ糖濃度下 (5 - 25 mM) での 24 時間の培養では、その発現に有意な変化を認めなかった。一方、24 時間の糖質コルチコイド(デキサメサゾン)による刺激では、濃度依存的 (1 nM - 10 μ M) な発現増加を認めた。また、フェノフィブリン酸や GW501516 などの peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) アゴニストの刺激によりオメンチン mRNA 発現は亢進した。

高インスリン濃度でオメンチン発現が低下することは、メタボリックシンドロームの病態におけるオメンチン血中濃度低下と合致する結果であると考えられた。また、脂肪組織局所の糖質コルチコイド産生によりオメンチン発現が調節される可能性も考えられた。さらに、脂質・糖代謝を改善させる PPAR アゴニストによりオメンチン発現が増加し

たことは、これらの薬剤が動脈硬化疾患治療薬にもなり得る可能性を示唆している。

(2) 転写開始点より -1.5kb 上流までのオメンチン・プロモーター領域を含むレポーター・ベクターを用いたアッセイでは、(1)の各刺激(インスリン、糖質コルチコイド)に伴う有意なプロモーター活性の変化は認められなかった。従って、これらの刺激に応答する転写因子作用部位は -1.5kb より上流に位置する可能性があると考えられ、より長いプロモーター領域を含むレポーター・ベクターを用いた解析が必要と考えられた。

(3) ヒトアディポネクチンを含有するヒト AB 血清で培養した HepG2 細胞溶解液から、抗ヒトアディポネクチン抗体で特異的に共沈する複数のバンドが SDS-PAGE で検出された。質量分析による解析から、アディポネクチン結合タンパク(adiponectin binding protein (APNBP)) の候補タンパクが同定された。

(4) (3)で同定されたタンパクの 1 つ APNBP1 についてさらなる解析を行った。APNBP1-myc とアディポネクチンをそれぞれ HEK293 細胞に強制発現させ、その細胞溶解液を混合し、抗アディポネクチンで免疫沈降、抗 myc 抗体でウエスタン・ブロットした。その結果、APNBP1-myc の共沈が認められ、*in vitro* の系でもアディポネクチンと APNBP1 が結合することが証明された。

(5) APNBP1 は糖化タンパクであり、既知の結合タンパクとはこの糖鎖を介して結合することが報告されている。そこで、この糖鎖修飾部位に変異を加えた変異 APNBP1 を作製し、アディポネクチンとの結合を検索した。5 つの糖鎖修飾部位のいずれの変異 APNBP1 もアディポネクチンと結合した。続いて、隣り合う 2 つの糖鎖結合部位に変異を導入した変異

体についても検討したが、全ての変異体でアディポネクチンとの結合が認められた。従って、APNBP1 とアディポネクチンとの結合には糖鎖は必要ではなく、新たな結合様式が想定された。

そこで、APNBP1 タンパクのN端から様々な長さのアミノ酸欠失変異体を作製し、アディポネクチンとの結合を調べた。N端5アミノ酸欠失変異体はアディポネクチンと結合したが、10アミノ酸欠失変異体では結合が減弱し、APNBP1 のN端近傍のアミノ酸配列がアディポネクチンとの結合に重要であると考えられた。

現在は、動脈硬化発症機序におけるアディポネクチンと APNBP1 との結合の役割を、細胞接着の側面から検討している。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

黒田奈々、山本浩靖、北村里菜、斉藤百香、木原進士、HepG2 細胞を用いたアディポネクチン結合蛋白の探索、第8回日本臨床検査学教育学会、2013年8月26日～2013年8月28日、大阪大学

黒田奈々、山本浩靖、北村里菜、斉藤百香、木原進士、HepG2 細胞を用いたアディポネクチン結合蛋白の探索、第60回日本臨床検査医学会学術集会、2013年10月31日～2013年11月3日、神戸国際会議場

〔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

6. 研究組織

(1)研究代表者：

山本 浩靖 (YAMAMOTO Hiroyasu)

大阪大学・大学院医学系研究科・保健学専攻・生体情報科学講座

研究者番号：00631201

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：