

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：17701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670037

研究課題名(和文) デスアシルグレリン受容体を介した新しい食欲制御機構の解明

研究課題名(英文) Research for a novel regulatory mechanism of appetite via a des-acyl ghrelin receptor

研究代表者

飯島 幹雄 (IIJIMA, Mikio)

鹿児島大学・医歯学域医学系・助教

研究者番号：00305111

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：グレリンは、28アミノ酸残基の食欲促進ペプチドホルモンで、主として胃で産生される。グレリンの3番目のアミノ酸のアシル化は、グレリン受容体の結合と活性化に必要である。最初、デスアシルグレリン(DAG)は不活性体と考えられていたが、現在、DAGは生物学的に活性であると信じられている。DAG受容体を単離するため、我々はマウスアダルト脳cDNA発現ライブラリーを導入した細胞を用いて、ビオチン化DAG結合アッセイを行った。我々は、1つのDAG受容体候補遺伝子の同定に成功した。この候補遺伝子産物は、インビトロでビオチン化DAGと結合した。さらなる研究が、DAG作用の詳細なメカニズムの決定に必要である。

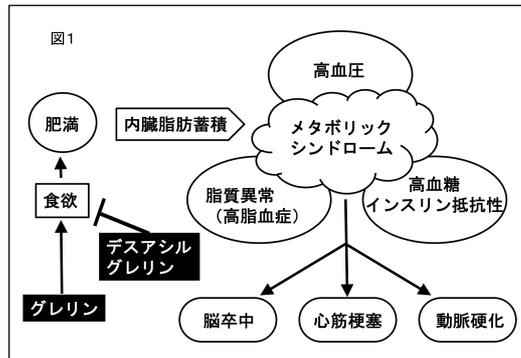
研究成果の概要(英文)：Ghrelin is a 28-amino acid orexigenic peptide hormone mainly produced by the stomach. The acylation of the third amino residue at ghrelin is required for its binding and activation of the ghrelin receptor. At first des-acyl ghrelin (DAG) was considered an inactive form of ghrelin, but now the DAG is believed to be a biologically active. To clone the DAG receptor(s), we performed a biotinyl DAG binding assay using the mouse adult brain cDNA expression library transfected cells. We succeeded in the identification of a DAG receptor candidate gene. This candidate gene product bound to the biotinyl DAG in vitro. Future study is required to determine the precise mechanism(s) of DAG action.

研究分野：細胞生物学

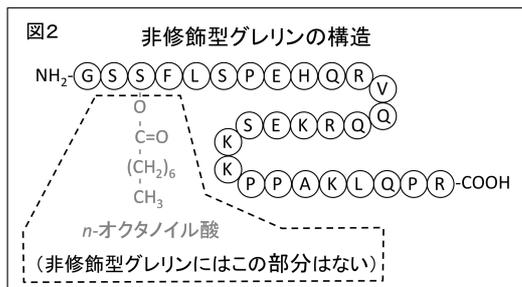
キーワード：デスアシルグレリン

1. 研究開始当初の背景

今日の先進諸国においては、内臓脂肪型肥満を共通の要因として、高血圧、高血糖、脂質異常のうち2つ以上を合併した状態であるメタボリックシンドローム（身体の代謝の恒常性が乱れ、血糖の維持に重要なインスリンの効きが悪くなるインスリン抵抗性を示すなどの状態）の増加が多くの人々の関心を呼んでいる（図1）。



グレリンは中里らが胃から成長ホルモン分泌促進物質（GHS）受容体リガンドとして見出した28アミノ酸残基よりなる神経ペプチドで、アミノ末端側のセリンが脂肪酸修飾された特徴的な構造を有する（図2）。



グレリンは、食欲増進、体重の増加などのエネルギー代謝に関わる作用があり、ただ一つの末梢臓器で作られる摂食促進効果があるペプチドである。非修飾型（デスアシル）グレリンは、GHS受容体に結合しないため、生理的な作用はないと考えられてきた。ところが、私共は、デスアシルグレリンが修飾型グレリン依存性のインスリン分泌抑制や血糖上昇を阻害することや空腹時の食欲を低下させることを見出した（連携研究者の乾ら、Gastroenterology 129巻、p8-25、2005年）。これらの現象は、デス

アシルグレリンが、GHS受容体と全く異なる受容体を介して、修飾型グレリンのシグナルに干渉する可能性を示唆している。しかし、デスアシルグレリン受容体同定の試みは多々行われてきたが、その存在が想定されている段階に止まっている。グレリンの作用を抑制することは、メタボリックシンドロームの新しい治療手段の開発につながるが、デスアシルグレリン自体の受容体やその下流のシグナルは全く分かっていない。これらは、基礎学問としても社会問題としても重要であり、研究者として挑戦心をかき立てられる研究対象である。

2. 研究の目的

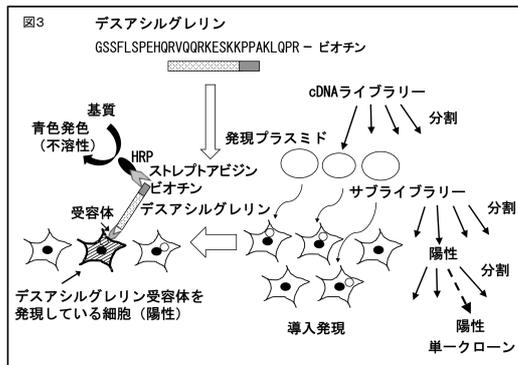
デスアシルグレリンに対する未知受容体を探索し、その機能を解析することにより、受容体作動薬開発の基盤を確立することを目的とする。グレリンは胃から分泌される神経ペプチドで食欲促進に働く。また、そのアミノ末端側が脂肪酸で修飾されており、その脂質を介して特異的にGHS受容体と結合するという特徴がある。しかし、脂質の修飾を受けていない非修飾型グレリンが、血中にグレリンより多量に存在することや、グレリン投与による食欲亢進を抑制することから、未知の受容体を介したシグナル伝達経路が、グレリンの作用を調節していると考えられる。そこで、これらを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 未知デスアシルグレリン受容体候補の同定

ビオチン標識デスアシルグレリンをリガンドとして、分割したcDNA発現ライブラリーを導入発現した細胞での結合実験を行う。結合実験で陽性と認められた発現ライブラリーは、さらに分割操作を繰り返して、最終的に一つの陽性クローンまでスクリー

ニングを繰り返す(図3)。得られた陽性クローンの配列をシーケンスし、未知デアシルグレリン受容体を同定する。



(2) 同定した受容体とデアシルグレリンとの結合検証

得られたアミノ酸配列情報を解析し、細胞膜貫通ドメインやシグナルペプチドを持つと思われる候補分子に的を絞って遺伝子全長のクローニングを行う。大腸菌で発現させた組換えデアシルグレリン受容体候補タンパク質と、デアシルグレリンとの結合を検証する。

(3) 細胞内シグナルの解析

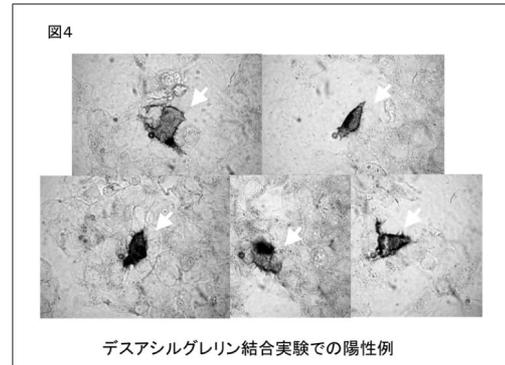
培養細胞で新規受容体を発現させてデアシルグレリンで刺激することにより、変化する細胞内シグナルを各種リン酸化抗体やレポーター遺伝子アッセイで検出し、デアシルグレリンの細胞内シグナル伝達の全容を解明する。

4. 研究成果

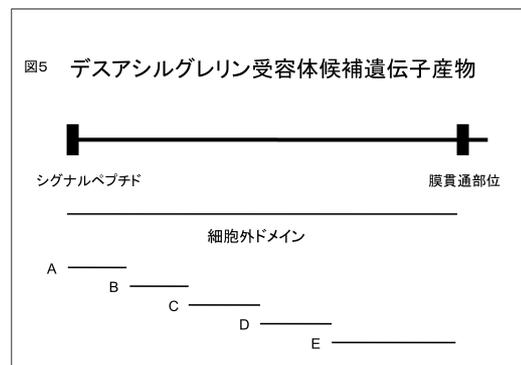
(1) 未知デアシルグレリン受容体候補の同定

アダルトマウス脳 cDNA 発現ライブラリーを 5000 クローンごとに分割した 96 サブライブラリーを COS 細胞に導入発現させ、ビオチン標識デアシルグレリンをリガンドとした結合実験をおこなった。その結果、いくつかのサブライブラリーで、陽性反応が認められた(図4)。陽性反応の認められたサブライブラリーを更に分割し、

COS 細胞における結合実験を繰り返し、ライブラリーサイズを減少させた。この操作を、陽性単一クローンになるまで繰り返し



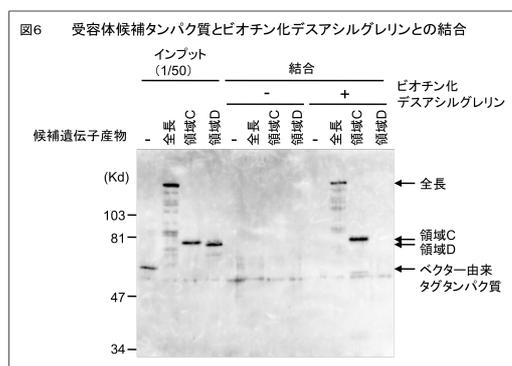
た。得られた陽性クローンのヌクレオチド配列を解析し、全長の遺伝子転写産物に、膜貫通ドメインやシグナルペプチドを有するものを選別したところ、1つのデアシルグレリン受容体候補遺伝子を同定した。この候補遺伝子の転写産物は、一回膜貫通型の受容体として知られていたが、グレリンやデアシルグレリンとの結合についての報告は知られていない(図5)。



(2) 同定したデアシルグレリン受容体候補とデアシルグレリンとの結合検証

同定したデアシルグレリン受容体候補遺伝子の全長をヒト細胞よりクローニングした。この全長と細胞外ドメインの部分配列(図5の細胞外ドメインのAからEの領域)に相当する組換えタンパク質を作製し、ダイナビーズ樹脂に結合させた。デアシルグレリン受容体候補タンパク質の結合したダイナビーズ樹脂とビオチン化デアシルグレリンを用いたプルダウンアッセイに

より、両者の結合について検討した。その結果、全長のデスアシルグレリン受容体候補タンパク質とビオチン化デスアシルグレリンとの結合を確認できた(図6)。このデスアシルグレリン受容体候補の細胞外ドメインの一部を結合させたダイナビーズ樹脂を用いて、デスアシルグレリン結合領域の検討を行った。その結果、約150アミノ酸の領域Cが、このデスアシルグレリン受容体候補とデスアシルグレリンとの結合に重要であることが分かった(図5,6)。



(3) 細胞内シグナルの解析

細胞レベルにおけるデスアシルグレリンの作用に対するデスアシルグレリン受容体候補遺伝子産物の関与を明らかにするため、デスアシルグレリン作用のアクセシ系を検討した。その結果、デスアシルグレリンを細胞に作用させたときの細胞のインピーダンス変化を測定する系が確立できた。そこで、現在、デスアシルグレリン受容体候補のノックダウンや過剰発現による、デスアシルグレリン作用への影響を検討している。

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 1件)

Park JS, Halegoua S, Kishida S, Neiman AM, A Conserved Function in Phosphatidylinositol Metabolism for

Mammalian Vps13 Family Proteins, PLoS One, 査読有, Vol. 10, No. 4, 2015, e0124836,

<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0124836>

[その他]

ホームページ等

<http://www.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~biochem1/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯島 幹雄 (IJIMA, Mikio)

鹿児島大学・医歯学域医学系・助教

研究者番号：00305111

(2) 研究分担者

岸田 昭世 (KISHDA, Shosei)

鹿児島大学・医歯学域医学系・教授

研究者番号：50274064

小山 浩史 (KOYAMA, Hirofumi)

鹿児島大学・医歯学域医学系・講師

研究者番号：40709656

岸田 想子 (KISHDA, Michiko)

鹿児島大学・医歯学域医学系・助教

研究者番号：40274089

加藤 郁夫 (KATO, Ikuo)

神戸薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：70509843

(3) 連携研究者

乾 明夫 (INUI, Akio)

鹿児島大学・医歯学域医学系・教授

研究者番号：80168418