

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19532

研究課題名(和文) グレリンアシル化基質供給源の解明

研究課題名(英文) Exploration of the mechanisms for supplying octanoic acid for ghrelin acylation in X/A-like cells.

研究代表者

坂東 美佳 (BANDO, MIKA)

和歌山県立医科大学・医学部・特別研究員

研究者番号：70737874

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：独自に樹立したグレリン分泌細胞株MGN3-1細胞を用いて、グレリンアシル化基質供給源について解析を行った。グレリン分泌細胞株は、長鎖脂肪酸の輸送に関与するAcs11遺伝子発現が高いことにより、長鎖脂肪酸の蓄積能が高いことが判明した。また、Acs11阻害剤であるTriacsinCによって活性型グレリン産生量は有意に低下した。以上より、グレリン産生細胞株において、長鎖脂肪酸の取り込み能が高いことが、グレリンのアシル化に必要なオクタン酸の供給の一端を担っていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The mechanisms for supplying octanoic acid for ghrelin acylation in X/A-like cells are incompletely understood. We found that long-chain fatty acids were incorporated at a higher rate in the ghrelin-producing cell line MGN3-1 than in MIN6 cells, in part due to higher expression level of long-chain fatty acyl-CoA synthetase family member 1 (Acs11). Inhibition of ACSLs by triacsin C profoundly suppressed acylated ghrelin production. These results suggest that high incorporation of long-chain fatty acids into the ghrelin-producing cells plays a role in the supply of octanoic acid for ghrelin acylation.

研究分野：内分泌学

キーワード：グレリン アシル化 長鎖脂肪酸

1. 研究開始当初の背景

グレリンは1999年に発見された28個のアミノ酸からなるペプチドホルモンである。グレリンは、強力な成長ホルモン(GH)分泌刺激作用をはじめ、摂食刺激といったエネルギー調節に関する作用など、様々な生理作用を持つことが報告されている。グレリンの発現は胃に最も多く、その他、消化管や心臓、膵臓などにも微量ながら発現が認められる。

生体内には3番目のセリン残基がオクタン酸修飾を受けている活性型グレリンと、オクタン酸修飾を受けていないデスアシルグレリンが存在するが、活性型グレリンのみがグレリン受容体 GHS-R と結合し、生理活性を示す。

グレリンのオクタン酸修飾はグレリンアシル化酵素(GOAT)の働きによって仲介されることが報告されているが、アシル化の基質となるオクタン酸の由来については明らかになっていなかった。

胃で産生される活性化グレリン濃度は、中鎖脂肪酸、特にオクタン酸を摂取することにより増加することが報告されており、食物由来のオクタン酸が直接、グレリン活性化の基質として利用されていることを示している。しかし、グレリン濃度が絶食時に高値を示すことや、特に中鎖脂肪酸を摂取しなくても活性型グレリンは産生されることから、食物由来以外にもオクタン酸供給源が存在する可能性が示唆される。

これまでの我々の検討において、膵β細胞特異的にグレリン及び GOAT 遺伝子を過剰発現するトランスジェニック(Tg)マウスを作製・解析を行ったところ、標準食条件下では膵組織内活性型グレリン濃度の変化は認められず、グレリン活性化の基質となるオクタン酸を多く含む特殊飼料を与えた場合にのみ、膵臓内活性型グレリン濃度の上昇が認められた(坂東ら、Am J Physiol Endocrinol Metab. 2012,2013)。

これらのことから、(1)グレリン及び GOAT 遺伝子の発現だけでは活性型グレリンの産生には不十分であること、(2)胃に存在するグレリン産生細胞は、グレリンの基質となるオクタン酸を効率よく利用する機構、または産生する機構により、活性型グレリンを産生していることが推測された。

2. 研究の目的

本研究では、in vitro の系においてグレリンアシル化に利用される基質供給源の解明と、基質供給に関与する遺伝子の同定により、グレリンアシル化における基質供給機構を明らかにし、基質供給制御による、グレリン活性調節の新たな薬剤標的となりうる因子の探索を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

下記項目について、我々のグループが独自に樹立したグレリン産生細胞株である

MGN3-1 細胞株(岩倉、坂東ら、Endocrinology 2010)と膵β細胞株である MIN6 細胞株を比較検討した。

なお、MGN3-1 細胞は 10%FBS 入り DMEM 培地を用い、37 10%CO₂ 条件下で、MIN6 細胞株は 15%FBS、5μL/L 2-メルカプトエタノール入り DMEM 培地を用い、37 5%CO₂ 条件下で培養を行った。

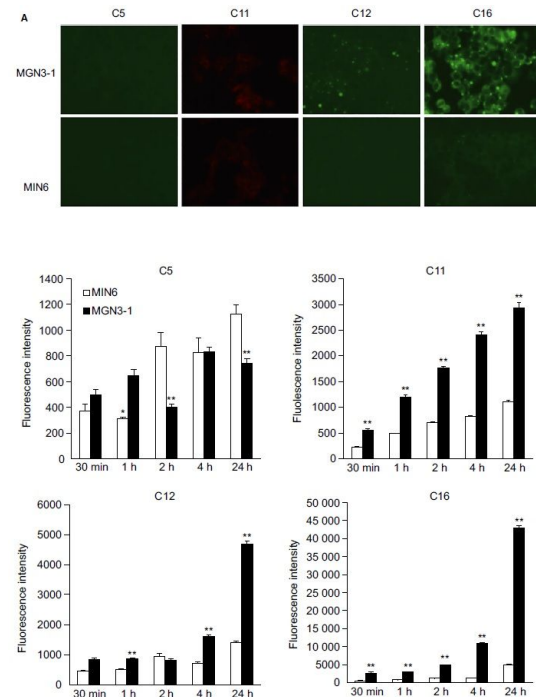
4. 研究成果

(1)オクタン酸供給源の解明

脂肪酸取り込み能の検討

BODIPY 蛍光ラベル C5,C11,C12,C16 脂肪酸をそれぞれ添加し、取り込まれた脂肪酸量を蛍光強度で比較したところ、長鎖脂肪酸である C16 の取り込み及び蓄積能が特に高いことが判明した(図1)。

(図1) 脂肪酸取り込みの比較

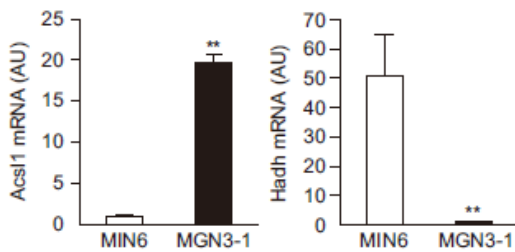


脂肪酸輸送遺伝子/β酸化関連遺伝子の検討

Genechip 法により、脂肪酸輸送・代謝関連遺伝子の網羅的解析を行い、MGN3-1 細胞で高発現・低発現の遺伝子について検討した。なお、解析は、GeneChip® Mouse Gene 1.0 ST Array (Affimetrix) 28,820 genes にて行った。

結果、長鎖脂肪酸輸送に関連する Acsl1 : Acyl-CoA synthetase long-chain family member 1 が高発現であること、中鎖以降のβ酸化に関わる HADH 発現量が低いことが確認された。また、定量 PCR でも同様の結果が得られた(図2)。

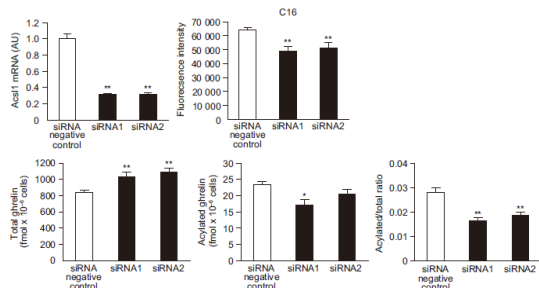
(図2) 定量PCR



同定遺伝子の、グレリン修飾への影響の検討

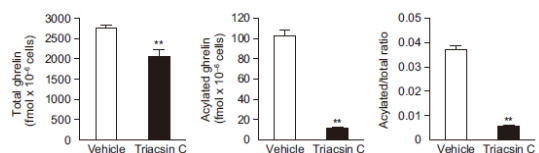
にて見出した *Acs11* 遺伝子について、siRNA によってノックダウンを行い、脂肪酸の取り込み能の変化、及びグレリン産生量について検討を行った。脂肪酸の取り込み能について有意に低下し、活性型グレリン産生量についても有意に低下した(図3)。

(図3) *Acs11* ノックアウト時の脂肪酸取り込み量及びグレリン産生量



また、*Acs11* 阻害剤である Triacsin-C の添加でも、同様の結果が得られた(図4)。

(図4) Triacsin-C による影響



以上の検討結果より、グレリン産生細胞では、*Acs11* 遺伝子発現が高いことにより長鎖脂肪酸の取り込み及び蓄積能が高く、HADH 遺伝子発現が低いことにより中鎖以降のβ酸化の進行が遅いことで、効率的にグレリン産生をおこなっていることが示唆された。

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4件)

1. Bando M, Iwakura H, Ueda Y, Ariyasu H, Inaba H, Furukawa Y, Furuta H, Nishi M, Akamizu T. IL-1β directly suppress ghrelin mRNA expression in ghrelin-producing cells. *Mol Cell Endocrinol.* 447:45-51. 2017 査読有

DOI:10.1016/j.mce.2017.02.032.

2. Bando M, Iwakura H, Koyama H, Hosoda H, Shigematsu Y, Ariyasu H, Akamizu T, Kangawa K, Nakao K. High incorporation of long-chain fatty acids contributes to the efficient production of acylated ghrelin in ghrelin-producing cells. *FEBS Lett.* 590(7):992-1001. 2016 査読有
DOI:10.1002/1873-3468.12132
3. Iwakura H, Dote K, Bando M, Koyama H, Hosoda K, Kangawa K, Nakao K. Establishment of Leptin-Responsive Cell Lines from Adult Mouse Hypothalamus. *PLoS One.* 11(2):e0148639. 2016 査読有
DOI:10.1371/journal.pone.0148639
4. Koyama H, Iwakura H, Dote K, Bando M, Hosoda H, Ariyasu H, Kusakabe T, Son C, Hosoda K, Akamizu T, Kangawa K, Nakao K. Comprehensive Profiling of GPCR Expression in Ghrelin-Producing Cells. *Endocrinology.* 157(2):692-704. 2016 査読有
DOI:10.1210/en.2015-1784.

[学会発表](計7件)

1. 坂東美佳, 岩倉浩, 上田陽子, 赤水尚史 「グレリン発現調節への炎症性サイトカインの影響の検討」, 第90回日本内分泌学会学術総会, 2017年4月20日~22日, ロームシアター京都, 京都市勧業館みやこめっせ(京都府京都市)
2. 坂東美佳, 岩倉浩, 上田陽子, 赤水尚史 「炎症性サイトカインのグレリン遺伝子発現への影響の検討」, 第37回日本肥満学会, 2016年10月7日~8日, 東京ファッションタウン(東京都江東区)
3. Bando M, Iwakura H, Koyama H, Kangawa K, Nakao K. 「LPS directly increased ghrelin and GOAT mRNA expressions via NF-kappaB signaling pathway in MGN3-1 cell」, The Obesity Society's 2015 Annual Scientific Meeting, 2015年11月2日~7日, Los Angeles(USA)
4. Kusakabe T, Izumi R, Noguchi M, Iwakura H, Koyama H, Bando M, Miyazawa T, Hosoda K, Kangawa K, Nakao K. 「Investigating the role of betatrophin in glucose and lipid metabolism using betatrophin knockout rats」, Keystone Symposia Diabetes:

New Insights into Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies (T2)、2015年10月25日~29日、kyoto(Japan)

5. 坂東美佳、岩倉浩、小山博之、寒川賢治、中尾一和 「グレリン産生におけるLPSの直接作用の検討」、第36回日本肥満学会、2015年10月2日~3日、名古屋国際会議場（愛知県名古屋市）
6. 泉諒太、日下部徹、野口倫生、岩倉浩、小山博之、坂東美佳、宮澤崇、寒川賢治、中尾一和 「ベータトロフィンのノックアウト開発とその糖脂質代謝調節における意義の解明」、第36回日本肥満学会、2015年10月2日~3日、名古屋国際会議場（愛知県名古屋市）
7. 小山博之、岩倉浩、坂東美佳、細田洋司、細田公則、寒川賢治、中尾一和 「GPCR発現プロファイル解析に基づく摂食促進ホルモン、グレリン分泌調節機構の解明」、第36回日本肥満学会、2015年10月2日~3日、名古屋国際会議場（愛知県名古屋市）

6. 研究組織

(1)研究代表者

坂東 美佳 (BANDO MIKA)

和歌山県立医科大学・医学部 特別研究員

研究者番号：70737874