

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 24 日現在

機関番号：37303

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22700772

研究課題名（和文） 摂食亢進ホルモンの作用阻害を利用した肥満予防のための新規機能性食品の開発

研究課題名（英文） Development of a novel functional food for overweight prevention based on the inhibition of ghrelin

研究代表者

野嶽 勇一（NODAKE YUICHI）

長崎国際大学薬学部生化学研究室・助教

研究者番号：30332282

研究成果の概要（和文）：強力な摂食亢進ホルモンであるグレリンとグレリン受容体（GHS-R）間の詳細な結合機序については、未だ不明な点が多い。本研究では、両者の分子間ネットワークを包括的に解析するための評価系の構築に取り組んだ。ラットの胃から抽出した total RNA を用いて、RT-PCR 法にて GHS-R の cDNA をクローニングした。この cDNA を鋳型として、グレリンとの結合に必要とされる GHS-R の 4 つの細胞外領域部位を PCR 法にて増幅後、増幅 DNA 断片を発現ベクターに挿入し、大腸菌内で過剰発現させた。得られた組換え GHS-R 細胞外領域部位をセンサーチップに固定し、グレリンとの分子間相互作用を表面プラズモン共鳴法により解析した。

研究成果の概要（英文）：The binding mechanism of ghrelin that is a hunger-stimulating hormone to its receptor (GHS-R) has many unknown aspects. In this study, I tried to construct a comprehensive evaluation system of the interaction between both molecules. GHS-R cDNA was obtained from RT-PCR using rat stomach total RNA. Four extracellular regions of GHS-R that were important for binding to ghrelin were amplified by PCR based on the GHS-R cDNA and inserted into the expression vector. The interaction between recombinant extracellular region proteins fixed on a sensor chip and ghrelin was evaluated by surface plasmon resonance analysis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：薬学・食品・蛋白質・生理活性

1. 研究開始当初の背景

1990 年代後半、栄養過多や運動不足を原

因とする生活習慣病やメタボリック症候群等の疾病概念が登場し、我々の健康や食生活に対する考え方に大きな影響をもたらした。その一方で、生活習慣の改善以外にこれらの疾病に対する有効な打開策が存在しない状況が継続している。このいわば、切り札無き「国民総“避”肥満化」事業において近年脚光を浴びているのが、摂食亢進ホルモンである「グレリン」である。

グレリンは、合成成長ホルモン分泌促進因子に対する受容体 (GHS-R) に特異的な内在性リガンドとして、胃から発見に至った。グレリンは、成長ホルモン分泌促進活性に加え、強力な摂食亢進作用を示す初めての消化管ペプチドとして注目されており、脂肪組織から分泌されるレプチンの摂食抑制効果への拮抗を介して、生体のエネルギー代謝調節に深く寄与している。また、循環器系や代謝系の調節に対しても関与し、生体の恒常性の維持において多彩な役割を担う (図 1)。現在、グレリンによる循環器疾患や拒食症等の摂食障害の治療応用のための臨床研究が精力的に進行中である。

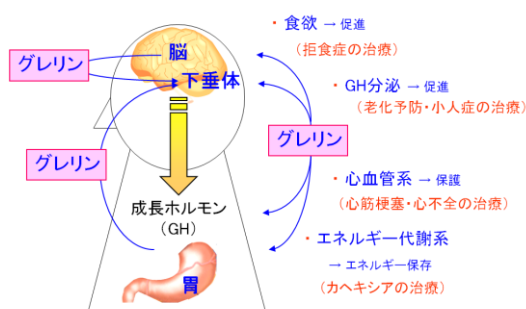


図1 グレリンの生理作用

2. 研究の目的

発見から約 10 年のグレリン研究では、その多様な生理機能が脚光を浴び、応用や創薬へ向けた研究が中心に展開されてきた。一方で、グレリンの稀有な分子構造やリガンド受容体結合等に関する生化学研究には未だ開拓の余地が多分に残されている。

28 個のアミノ酸より構成されるグレリンは、3 位の Ser 残基が中鎖脂肪酸 (n-オクタン酸) によって修飾された極めて特徴的な構造を有する (図 2)。この Ser³ のアシル化修飾は成長ホルモン分泌促進活性の発現に必須であり、非アシル化グレリンでは生理活性

が消失する。したがって、この修飾脂肪鎖がシグナル伝達における一種のスイッチとして機能し、グレリンと GHS-R との結合に深く寄与している可能性が示唆される。また、不飽和脂肪酸 n-decenoyl 基で修飾されたグレリンも微量ながら存在するため、「リガンド受容体結合における脂肪鎖の役割」が非常に注目されている。

グレリンを構成するアミノ酸残基の中にも、GHS-R との結合に重要な役割を担う部位が存在する。哺乳類のグレリンは N 末端側の 10 アミノ酸残基の保存性が特に高く、グレリンの修飾脂肪酸と周囲のテトラペプチドで構成する立体構造 GSS(n-octanoyl)F は、GHS-R への結合とその後の生理活性の発現に必須であり、活性発現の中心となる。同時に、GHS-R に対して高い相同性を保持している G タンパク質共役型受容体 (GPCR) ファミリーに含まれるモチリン、ニューロメジン U、ニューロテンシン等との一次構造の比較により、リガンドとの結合に重要な幾つかのアミノ酸残基が存在することが示唆されている。よって、この「グレリンの活性中心を構成するアミノ酸残基が GHS-R との間で形成する結合ネットワークをリガンド・受容体双方の角度から詳細に解明する」という課題は、グレリンの生理活性を理解する上で重要度が高いと言える。

そこで、本研究では、7 回膜貫通領域を持つ典型的な GPCR である GHS-R (366 アミノ酸) の細胞外領域部位を調製し、グレリンと GHS-R との結合機序における双方の重要アミノ酸残基及び修飾脂肪鎖が担う役割について原子レベルで理解することを目的とした。

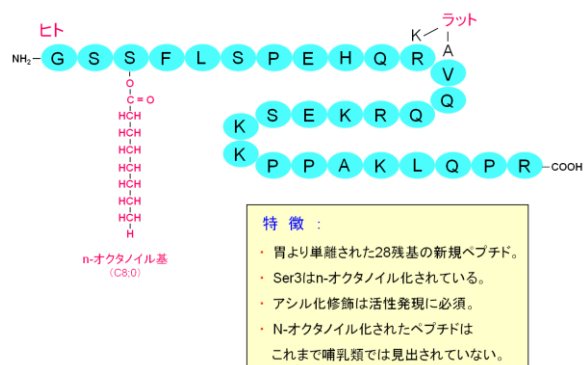


図2 グレリンの構造と特徴

3. 研究の方法

本研究では、GHS-R のグレリンとの結合に必要な 4 つの細胞外領域部位を各々 Loop 1 : Met¹-Ala⁴⁰、Loop 2 : Trp¹⁰⁴-Tyr¹²⁸、Loop 3 : Glu¹⁸⁸-Ser²⁰⁷、Loop 4 : Phe²⁸⁹-Cys³⁰⁴ とし、Loop 1~4 の発現・精製系の構築に取り組んだ。さらに、調製した組換え Loop 1~4 タンパク質とグレリンとの分子間相互作用について、表面プラズモン共鳴法を用いた評価系の構築に取り組んだ。

4. 研究成果

(1) GHS-R 細胞外領域部位の発現・精製系の構築

ラットの胃から抽出した total RNA を鋳型として、GHS-R の cDNA を RT-PCR 法にてクローニングした。得られた cDNA を基に、Loop 1~4 に対応するプライマーをデザインし、これを用いて PCR 法にて Loop 1~4 の各部位を増幅した。次いで、増幅 DNA 断片を発現ベクター pET11a に挿入し、Loop 1~4 タンパク質を大腸菌 *E. coli* BL21 (DE3) 株内で過剰発現させた。研究計画立案時から膜タンパク質の安定発現系の構築の難易度の高さが予想されていたように、SDS-PAGE による発現チェックの結果、可溶性タンパク質として極めて低い発現量であることが確認された。不溶性タンパク質の可溶化実験も慎重に実施したが、収量の改善には至らなかったことから、宿主大腸菌を *E. coli* SoluBL21 株に変更して発現実験の再検討に取り組んだ。その結果、若干の改善が見出されたが、精製効率・収量のさらなる向上を図るために、Loop 1~4 の N 末端へ His-tag を導入するためのプライマーを再度デザインした。さらに、可溶性タンパク質の発現量の増大のための低温培養 (15°C) を可能にするコールドショック専用発現ベクター pColdI 中に各増幅断片を挿入して新たな発現系を構築した。His-tag を付加させた目的タンパク質は、Ni-キレートカラムに供して回収後、最終的にゲルろ過クロマトグラフィーによって精製した。

(2) 表面プラズモン共鳴法を用いた分子間相互作用評価系の構築

導入された His-tag を介して、Loop 1~4 の GHS-R 細胞外領域部位を Biacore 用の His-tag 付加タンパク質専用のセンサーチップ

上に固定した。付加された His-tag がアンカーとなるため、リガンドとの結合を妨げずにセンサーチップへの固定が可能になることが期待された。実際に、表面プラズモン共鳴法による分子間相互作用の解析により、センサーチップに固定した Loop 1~4 の各タンパク質においてグレリンとの結合能を確認したため、以降の実験にこれを評価系として用いる。

(3) 今後の展開

今後、本研究で構築したグレリン-GHS-R 細胞外領域部位相互作用評価系を用いて、組換え GHS-R 細胞外領域部位やその部位特異的アミノ酸変異体をグレリンに作用させ、結合に重要なアミノ酸残基を推定する。同様に、Loop 1~4 と des-acyl-グレリンとの相互作用を検討し、修飾脂肪酸の機能をより深く考察する。

また、組換え GHS-R 細胞外領域部位単独及び組換え GHS-R 細胞外領域部位-グレリン複合体について結晶化条件をスクリーニングし、X 線結晶構造解析によるグレリンの Ser³ に付加した修飾脂肪鎖及び重要アミノ酸残基の役割の解明実験に取り組む。

本研究の生化学・分子生物学的手法や X 線結晶構造解析を通して得られる知見は、グレリンに対する阻害剤を探索するための基礎となり得ることから、最終的にはグレリン阻害剤を利用した肥満予防に効果を示す新規機能性食品の開発に貢献する。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者および連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

1. 野嶽勇一、松本周三、晦日房和、玉屋圭、深澤昌史、河村俊哉、榊原隆三
長崎県内資源を活用した新規乳酸菌発酵食品開発のための高機能性植物性乳酸菌のスクリーニング
日本食生活学会誌, **23**, 1-6 (2012).
2. 石橋源次、宮崎美絵、本多英俊、榊原隆三
アルコール投与されたラットのアルコール濃度に及ぼす乳酸菌産生物質 (PS-B1) 摂取の影響
九州共立大学総合研究所紀要, **5**, 55-58 (2012).

<http://www.lib.kyukyo-u.ac.jp/kiyosoken5.pdf>

3. 野嶽勇一, 深澤昌史, 荒川正幸, 榊原隆三
乳酸菌代謝生産物質 PS-B1 における肝機能および脂質代謝改善作用について
日本食生活学会誌, **22**, 13-19 (2011).
DOI: <http://dx.doi.org/10.2740/jisdh.22.13>
4. 石橋源次, 廣戸美絵, 本多英俊, 榊原隆三
乳酸菌代謝生産物質 (PS-B1) の血圧上昇抑制作用
九州共立大学総合研究所紀要, **4**, 77-80 (2011).
<http://www.lib.kyukyo-u.ac.jp/kiyosoken4.pdf>
5. 石橋源次, 本多英俊, 榊原隆三
乳酸菌代謝生産物質 (PS-B1) の非肥満 II 型糖尿病モデルラットに対する血糖上昇抑制効果
九州共立大学総合研究所紀要, **4**, 71-76 (2011).
<http://www.lib.kyukyo-u.ac.jp/kiyosoken4.pdf>
6. 野嶽勇一, 深澤昌史, 榊原隆三
環状重合乳酸のガン細胞増殖抑制効果
長崎国際大学論叢, **10**, 239-48 (2010).
<http://library.niu.ac.jp/NiuDA/RNS/PDF/RN10-025.pdf>

[学会発表] (計 5 件)

1. 野嶽勇一
ヒト常在乳酸菌生産物質の生理活性解明研究
日本食生活学会第 44 会大会 (東京) 2012 年 5 月
2. 岩永真理恵, 野嶽勇一, 深澤昌史, 小野原侑子, 石橋源次, 榊原隆三
乳酸菌発酵物 PS-B1 の肝障害保護作用
日本薬学会第 132 年会 (札幌) 2012 年 3 月
3. 野嶽勇一, 深澤昌史, 榊原隆三
新規乳酸菌発酵物 PS-B1 のヒト前骨髄性白血病細胞 HL-60 に対する細胞増殖抑制作用
日本農芸化学会 2012 年度大会 (京都) 2012 年 3 月
4. 野嶽勇一
乳酸菌代謝生産物質及びタンパク質コンジュゲートに関する研究

日本農芸化学会西日本支部総会 (福岡)
2011 年 1 月

5. 野嶽勇一, 富松裕美, 中尾瑞穂, 料屋紘和, 湯浅 (小島) 明子, 湯浅勲, 深澤昌史, 榊原隆三
豆乳の乳酸菌発酵物が示す有用作用
BMB2010 (神戸) 2010 年 12 月

[産業財産権]
○出願準備中 (計 1 件)
名称: 新規乳酸菌とそれを用いた肝細胞保護剤 (保護成分)
発明者: 榊原隆三, 野嶽勇一, 深澤昌史, 河村俊哉, 晦日房和, 玉屋圭, 松本周三
権利者: 同上
種類: 特許
国内外の別: 国内

[その他]
ホームページ
http://www.niu.ac.jp/~pharm1/lab/biochemistry/biochem_index.html

6. 研究組織
- (1)研究代表者
野嶽 勇一 (NODAKE YUICHI)
長崎国際大学・薬学部生化学研究室・助教
研究者番号: 30332282
- (2)連携研究者
榊原 隆三 (SAKAKIBARA RYUZO)
長崎国際大学・薬学部生化学研究室・教授
研究者番号: 30127229
深澤 昌史 (FUKASAWA MASASHI)
長崎国際大学・薬学部生化学研究室・准教授
研究者番号: 20238439