

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591296

研究課題名(和文) 摂食抑制ペプチド Nesfatin-1 の細胞内及びインビボでの作用機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of intracellular and in vivo function of an anorexic peptide, Nesfatin-1

研究代表者

橋本 貢士 (Hashimoto, Koshi)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授

研究者番号：30396642

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：摂食抑制視床下部ホルモンであるNesfatin-1(NAP-1)の細胞内シグナル伝達経路を探索した。マウス神経芽細胞腫由来NB41A3細胞およびマウス視床下部にはNAP-1受容体の存在が示唆され、NAP-1はNB41A3細胞においてMAPキナーゼもしくはL型カルシウムチャネルの作用を介して細胞内のリン酸化CRE結合蛋白(p-CREB)を増加した。また膵細胞ではNAP-1は中枢神経系とは異なるシグナル伝達経路を利用する可能性が示唆された。さらにG蛋白共役型受容体(GPCR)候補遺伝子からNAP-1の受容体候補遺伝子GPCRnを同定。同遺伝子ノックアウト(GPCRnKO)マウスを樹立した。

研究成果の概要(英文)：In the current study, we explored the intracellular signaling pathway of a hypothalamic anorexic hormone, Nesfatin-1 (NAP-1). Radioreceptor assays indicated that NAP-1 specific receptor should be located in the cell membrane fraction of mouse hypothalamus and of NB41A3 cells, which derived from mouse neuroblastoma. Through MAP kinase and L-type calcium channel, NAP-1 increased intracellular phosphorylation of cAMP response element binding protein (CREB). Moreover, it was revealed that in pancreatic beta cells, NAP-1 employed a distinct signaling pathway from that in central nervous system. We identified a candidate gene (GPCRn) for NAP-1 specific receptor and established GPCRn deficient mice (GPCRnKO).

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：代謝学

キーワード：Nesfatin-1 Nesfatin-1受容体 摂食抑制ペプチド 細胞内シグナル伝達 CREB 膵細胞 視床下部 M30

1. 研究開始当初の背景

- (1) Nesfat in-1 (NAP-1) は我々の研究グループで発見した新規摂食抑制視床下部ホルモンである (Oh-I S, et al: *Nature* 443: 709-712, 2006)。NAP-1 のマウス脳室内及び末梢投与によって摂食抑制と体重減少が持続的に認められ、皮下脂肪だけでなく内臓脂肪も著明に減少する。摂食抑制と内臓脂肪減少効果と言う特色から、NAP-1 はいまや国民病とも言えるメタボリックシンドロームに対する有望な治療薬となることが期待される。
- (2) NAP-1 はマウス視床下部単離ニューロンにおいて細胞内カルシウムを増加させ、膵島および膵細胞系培養細胞にてインスリン分泌を惹起することが知られているが、その特異的受容体の同定を含め、細胞内シグナル伝達経路は未だ不明である。

2. 研究の目的

NAP-1の細胞内及びインビボでの作用機構を解析する。特に本研究ではNAP-1による組織特異的な細胞内シグナル伝達機構の解明を目的とし、NAP-1特異的受容体の同定を試みた。

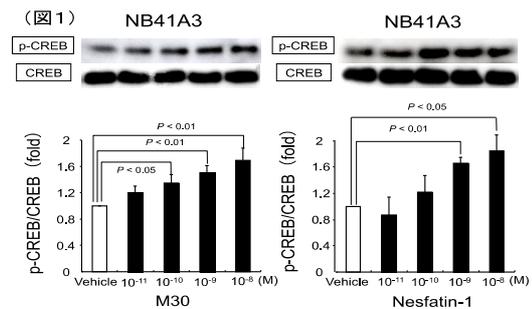
3. 研究の方法

- (1) 種々の神経系培養細胞および膵細胞系培養細胞にcAMP応答領域(CRE)を付加したluciferase レポーターを遺伝子導入し、NAP-1およびNAP-1中央部付近の23-52アミノ酸からなるペプチドであるM30添加によるレポーター活性を測定することで細胞内シグナル伝達経路を検討した。
- (2) 細胞内のリン酸化CRE 結合蛋白(p-CREB)をウエスタンブロットで定量した。
- (3) MAPキナーゼ (MAPK) 阻害薬およびL型カルシウムチャネル阻害薬を用いて細胞内シグナル伝達経路を解析した。

- (4) マウス視床下部とNB41A3細胞の膜分画を用いて、125I-NAP-1によるレセプターアッセイを行った。
- (5) NAP-1受容体はG蛋白共役型受容体(GPCR)であることが予想されていたため、³⁵S]GTP S アッセイを用いて、GPCR候補遺伝子からNAP-1の受容体の同定を行った。
- (6) NAP-1受容体候補であるGPCRnのノックアウトマウスを作成し、解析を行った。
- (7) 組織特異的なNesfat in-1の作用を解析するため、視床下部および膵細胞特異的Nesfat in-1ノックアウトマウスを作成した。

4. 研究成果

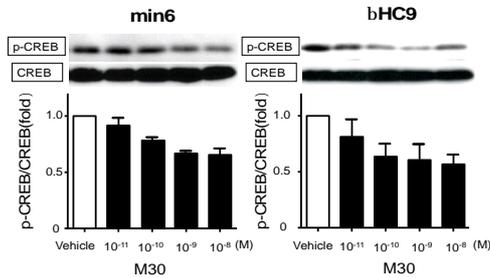
- (1) マウス神経芽細胞腫由来のNB41A3細胞にNAP-1を添加したところcAMP応答領域(CRE)レポーターの活性化を認めた。この活性化はM30でも認められ、変異M30ではこの活性化は消失した。さらにNAP-1とM30は、NB41A3細胞内のリン酸化CRE 結合蛋白(p-CREB)を増加させた(図1)、



細胞内cAMPの増加は認めなかった。

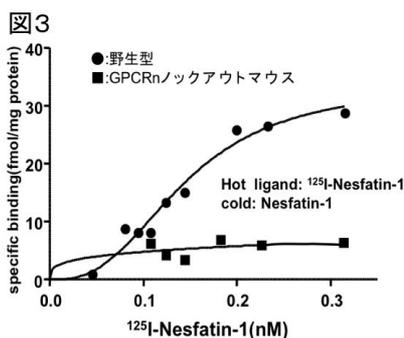
- (2) MAPキナーゼ (MAPK) 阻害薬およびL型カルシウムチャネル阻害薬により、M30によるCREBリン酸化反応は消失した。
- (3) マウス視床下部とNB41A3細胞の膜分画を用いて、125I-NAP-1によるレセプターアッセイを行うとKd値は各々約0.79nM、約0.165nMであり、NAP-1との特異的結合を認めた。一方、膵細胞系培養細胞ではp-CREBはNesfat in-1濃度依存的に減少した(図2)。

(図2) マウスインスリノーマ由来細胞



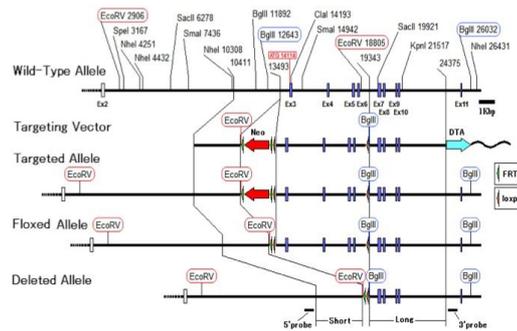
以上からマウス視床下部及びNB41A3細胞にはNAP-1受容体の存在が示唆され、Nesfat in-1は同細胞においてMAPKもしくはL型カルシウムチャネルの作用を介してp-CREBを増加させると考えられた。また膵細胞ではNesfat in-1は中枢神経系とは異なるシグナル伝達経路を利用する可能性が示唆された

- (4) [³⁵S]GTP S アッセイを用いて、GPCR候補遺伝子からNAP-1の受容体の同定を進め、候補遺伝子GPCRnを同定。同遺伝子ノックアウト(GPCRnKO)マウスを作成し解析したところ、GPCRnKOマウスの視床下部の細胞膜画分を用いたラジオレセプターアッセイでは、野生型マウスと比較してGPCRnKOマウスではNAP-1の視床下部細胞膜への結合が著明に減弱することが分かった(図3)。



- (5) 視床下部および膵細胞特異的なNAP-1ノックアウトマウスの樹立を試みた。現在各組織特異的なノックアウトマウスもF1が樹立されてきている(図4)。

図4



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 3 件)

- (1) Mori M, Yamada M, Okada S, Hashimoto K, Satoh T, Shimizu H, Yada T. Discovery of nesfat in-1 and overview of biological actions and new developments. *Curr Pharm Des.* 2013 **19**:6921-6928. <http://www.eurekaselect.com/118383/article> (査読有)
- (2) Ishida E, Hashimoto K, Shimizu H, Okada S, Satoh T, Kato I, Yamada M, Mori M. Nesfat in-1 Induces the Phosphorylation Levels of cAMP Response Element-Binding Protein for Intracellular Signaling in a Neural Cell Line. *PLoS One* 2012 **7**: e50918 DOI: 10.1371/journal.pone.0050918. (査読有)
- (3) Tagaya Y, Osaki A, Miura A, Okada S, Ohshima K, Hashimoto K, Yamada M, Satoh T, Shimizu H, Mori M. Secreted nucleobindin-2 inhibits 3T3-L1 adipocyte differentiation. *Protein Pept Lett.* 2012 **19**:997-1004. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3468916/pdf/PPL-19-997.pdf> (査読有)

〔学会発表〕(計7件)

- (1) **Koshi Hashimoto**, Emi Ishida, Shigeki Takeda, Tetsuro Satoh, Shuichi Okada, Masanobu Yamada, Masatomo Mori
Nesfatin-1 modulates the phosphorylation levels of cAMP response element binding protein for intracellular signaling in the neural and islet beta cell lines. 第36回 内藤コンファレンス「分子からみたエネルギーバランスと摂食行動の制御」
2013年09月10日～2013年09月13日
シャトレゼ ガトーキングダム サッポロ(北海道)
- (2) **橋本貢士**, 石田恵美, 武田茂樹, 登丸琢也, 石井角保, 小澤厚志, 渋谷信行, 佐藤哲郎, 岡田秀一, 清水弘行, 山田正信, 森昌朋 摂食抑制ペプチド nesfatin-1の細胞内シグナル伝達機構の解析とその特異的受容体の探索 第86回 日本内分泌学会学術総会 2013年04月25日～2013年04月27日 仙台国際センター(宮城県)
- (3) 石田恵美, **橋本貢士**, 三浦敦子, 佐藤哲郎, 岡田秀一, 山田正信, 清水弘行, 森昌朋 摂食抑制ペプチドnesfatin-1の細胞内シグナル伝達と受容体探索 第39回 日本神経内分泌学会学術集会 2012年09月28日～2012年09月29日 北九州国際会議場(福岡県)
- (4) 石田恵美, **橋本貢士**, 三浦敦子, 佐藤哲郎, 岡田秀一, 山田正信, 清水弘行, 森昌朋 摂食抑制ペプチドnesfatin-1の細胞内シグナル伝達と受容体探索 第55回 日本糖尿病学会年次学術集会 2012年05月17日～2012年05月19日 パシフィコ横浜(神奈川県)
- (5) 石田恵美, **橋本貢士**, 三浦敦子, 佐藤哲郎, 岡田秀一, 山田正信, 清水弘行, 森昌朋 摂食抑制因子nesfatin-1の受容体

と細胞内シグナル伝達の探索 第85回 日本内分泌学会学術集会 2012年04月19日～2012年04月21日 名古屋国際会議場(愛知県)

- (6) 石田恵美, **橋本貢士**, 三浦敦子, 佐藤哲郎, 岡田秀一, 山田正信, 清水弘行, 森昌朋 摂食抑制ペプチド nesfatin-1の細胞内シグナル伝達と受容体探索 第38回 日本神経内分泌学会 2011年11月26日 都道府県会館(東京都)
- (7) 石田恵美, **橋本貢士**, 佐藤哲郎, 岡田秀一, 山田正信, 清水弘行, 森昌朋 摂食抑制ペプチドnesfatin-1の受容体探索と細胞内シグナル伝達 第54回 日本糖尿病学会年次学術集会 2011年5月19日 札幌プリンスホテル(北海道)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/grad/cme/member/personal/hashimoto.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本 貢士 (HASHIMOTO KOSHI)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・寄附講座准教授

研究者番号: 30396642

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし