

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：12101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580386

研究課題名(和文)リアルタイムレプチン活性測定法を用いた鳥類レプチンのスクリーニング

研究課題名(英文)Screening of avian leptin using real-time imaging assay for leptin

研究代表者

大久保 武(Ohkubo, Takeshi)

茨城大学・農学部・教授

研究者番号：70233070

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではバイオアッセイを利用し、ニワトリ、カラスの血液中にレプチン様活性を持つ分子の存在を明らかにした。さらにハヤブサゲノム中にレプチン遺伝子が存在することを世界で初めて見出すとともに、推定レプチン分子がニワトリレプチン受容体と結合して情報伝達を行うことをバイオアッセイにより明らかにした。本成果は鳥類レプチンの存在の有無に関する論争を終結させる上で学術的な意義が非常に高いものである。またレプチンによる下垂体ホルモン産生との関係を調査し、レプチンがPit-1存在下で成長ホルモン遺伝子の転写を促進することを見出した。

研究成果の概要(英文)：We identified leptin-like activity in the blood in chicken and crow using leptin specific bio assay in the present study. Furthermore, we found leptin gene in the falcon genome, and recombinant falcon leptin activates signal transduction cascade by coupling with chicken leptin receptor in vitro. the present results gave a academic significance in terminating the controversy about the existence of avian leptin. We also investigated the role of leptin on pituitary function, and by which revealed that leptin promote the transcription of chicken growth hormone gene with Pit-1.

研究分野：動物生理学

キーワード：レプチン 情報伝達 バイオアッセイ

1. 研究開始当初の背景

レプチンは、摂食制御のみならず、生体内のエネルギー代謝や生殖制御など広範な生理作用を持つホルモンである。そのため家畜においても、レプチンによる成長や生殖制御の研究がなされ、動物生産への応用が期待されている。家禽においてもレプチンは生産性改善に有効な因子のひとつであると考えられ様々な研究が展開されてきた。鳥類ではレプチンが摂食抑制などの作用を有することなどがレプチン投与実験にて明らかにされているが、レプチン遺伝子の存在については明らかにされていなかった。しかし研究代表者はニワトリレプチン受容体 cDNA のクローニングおよびレプチン受容体タンパク質の検出に成功し、鳥類においてもレプチンシステムが存在する可能性を示唆してきた。

鳥類ゲノム上にレプチンと相同性の高い遺伝子が見出せないことから、トリにはレプチンが存在しないとの考え方が存在したが、レプチンはその立体構造の類似性が機能と大きく関わっておりことが示されていた。そこでレプチンの生物活性を指標とした分析手法を開発し、ルシフェラーゼ活性を指標としたバイオアッセイと GFP 融合型 STAT3 の核内移行指標とした高感度のリアルタイムレプチン活性測定法バイオアッセイ法を開発した。リアルタイムレプチン活性測定法バイオアッセイ法では簡便かつ短時間で正常ラットの血清中レプチン活性の測定が可能であり、鳥類生体成分由来のレプチン活性のスクリーニングにも有効であるとの結論を得た。

2. 研究の目的

摂食やエネルギー代謝、生殖の制御に係るレプチンは鳥類を除く脊椎動物でその存在が明らかにされていた。受容体は存在するもののそのリガンドであるレプチン自身の存在については不確かな点が多く、オーファン受容体である可能性も指摘されていた。そこで本研究課題では、(1)リアルタイムレプチン活性測定法を用いた鳥類生体成分中のレプチン活性の評価、(2)鳥類レプチンの単離と構造決定、および(3)鳥類におけるレプチンの生理作用の解析を行い、比較ゲノミクスからのアプローチとは異なる方向性によりレプチンの同定を行うことで、鳥類レプチン研究の発展を目指すとともに長年にわたる鳥類レプチンの存在に関する学術的な論争を収束させることを目的とした。

3. 研究の方法

(1)リアルタイムレプチン活性測定法を用いた鳥類生体成分中のレプチン活性の評価

研究代表者が作製したニワトリレプチン受容体と GFP 融合型 STAT3 を安定的に発現している細胞株 (CHO-chLEPR/STAT3) に、ニワトリ、ウズラ、ハシブトガラス、ハシボソガラスの血清およびニワトリ肝臓、卵黄、脂肪

抽出液を処理し、細胞内の GFP 融合型 STAT3 の局在を蛍光顕微鏡下で継時的に観察した。

また血清等の処理にて、GFP 融合型 STAT3 の核内への移動が認められた細胞については、STAT3 のリン酸化をウエスタンブロット法により確認した。

(2) 鳥類レプチンの単離と構造決定

ハヤブサレプチン遺伝子のクローニング

ハヤブサ染色体 DNA の塩基配列を網羅的に決定し、他の動物との比較ゲノム解析によりレプチン遺伝子の推定を行った。また、定ハヤブサレプチンとレプチン受容体との相互作用についてシミュレーション解析を実施するとともに、推定レプチン遺伝子配列をもとに組換え型ハヤブサレプチンを発現させ、ニワトリレプチン受容体との結合によるレプチン遺伝子の活性化をルシフェラーゼアッセイにより確認した。

哺乳類細胞でのハトレプチンの発現と生物活性の解析

ハトレプチンの DNA 情報をもとに合成遺伝子を作製し、動物細胞用発現ベクターに挿入し、発現ベクターを作成した。得られた発現ベクターをニワトリ肝ガン細胞株 (LMH) に導入し、24 時間後に培養上清を回収した。培養上清を CHO-chLEPR/STAT3 に添加し、(1)と同様に蛍光顕微鏡観察およびウエスタンブロット解析を行った。

遺伝子導入後の LMH よりタンパク質を回収し、鳥類レプチン抗体を用いたウエスタンブロット解析により発現させたレプチンの検出を行った。

(3) 鳥類におけるレプチンの生理作用の解析

ニワトリ下垂体におけるレプチンタンパク質発現の解析

プロイラーヒナより下垂体を摘出し、細胞抽出液を調整した。細胞抽出液は抗ニワトリレプチン受容体抗体を用いたウエスタンブロット法に供し、レプチン受容体タンパク質の発現の有無を解析した。

レプチンによる成長ホルモン遺伝子の転写制御

ニワトリレプチン受容体を安定的に発現している細胞株 (CHO-chLEPR) にニワトリ Pit-1 α 発現ベクターとニワトリ成長ホルモン遺伝子プロモーターを持つレポーター遺伝子を導入し、レプチン刺激を行った。その後細胞を回収し、ルシフェラーゼアッセイによりレプチン依存的な転写活性の変化を測定した。

さらに、各種リン酸化酵素阻害剤および変異型ニワトリレプチン受容体発現細胞をもちいて、レプチン依存的な成長ホルモン遺伝子の転写に関わり情報伝達経路の特定を行った。

肝臓脂質代謝関連酵素に対するエストロゲンとレプチンの相互作用

レプチンは脂質代謝との関連が指摘され

ている。鳥類では肝臓が主要な脂質合成器官であり、肝臓にはレプチン受容体が存在している。また産卵鶏ではエストロゲン依存的に卵黄前駆物質の合成が誘導されることから、肝臓脂質代謝関連遺伝子の発現に対するレプチンとエストロゲンの相互作用について LMH を用いて解析した。LMH にレプチンとエストロゲンを単独あるいは同時に処理し、処理後の細胞から全 RNA を調整した。得られた全 RNA を鋳型に、リアルタイム PCR 法により、SREBP を始めとする各種脂質代謝関連遺伝子の mRNA 発現を定量的に解析した。

4. 研究成果

(1) リアルタイムレプチン活性測定法を用いた鳥類生体成分中のレプチン活性の評価
ニワトリ血清を処理した細胞では、処理後の時間経過に伴い GFP 融合 STAT 3 の核への移動が増加したことから、ニワトリ血清中にレプチン様活性を持つ分子が存在することが強く示唆された。しかしながら、血清以外の組織抽出液にはそのようなレプチン様活性を見出すことができなかった。さらに、ウズラ、ハシブトガラス、ハシボソガラスの血清中のレプチン様活性を調査し、ウズラ血清処理では STAT3 の核移行は観察されなかったが、ハシブトガラスとハシボソガラスの血清処理では、ニワトリ血清処理よりも高頻度な STAT3 の核移行が認められ、特にオスよりもメスカラス血清の方が、より強いレプチン様活性を示す傾向があった。またウエスタンブロット解析により、レプチン様活性が認められた血清は、レプチン受容体発現細胞内の STAT3 をリン酸化させるのに対し、レプチン受容体非発現細胞内の STAT3 リン酸化を誘導しないことを示し、その反応がレプチン受容体を介した特異的な反応であることを証明した。

また限外濾過法によるニワトリ血清の粗分画画分に対するレプチン様活性の評価を行い、レプチン様活性を持つ物質は血液中では分子量 10 万以上の分子として存在することを明らかにした。既知のレプチンの分子量は約 16,000 と推定されているため、血液中では結合タンパク質等に結合して循環していることが推察された。

(2) 鳥類レプチンの単離と構造決定

ハヤブサレプチン遺伝子のクローニング
ハヤブサ染色体 DNA 上にレプチン遺伝子が存在することを明らかにペプチドの構造を推定した。その結果、アミノ酸配列は他の動物のレプチンとの相同性は非常に低いものの、立体構造予測では既知のレプチンと類似の 4 つのヘリックス構造を持つことが明らかとなり、またその推定ハヤブサレプチンはニワトリレプチン受容体と高い親和性をもって結合し得ることを明らかにした。また、大腸菌で発現させた組換え型ハヤブサレプチンは、ニワトリレプチン受容体発現細胞にお

いてサイトカイン受容体の主要な細胞内情報伝達経路である JAK-STAT 経路を活性化させることをルシフェラーゼアッセイにより明らかにした。

哺乳類細胞でのハトレプチンの発現と生物活性の解析

鳥類レプチン遺伝子は非常に GC 含量が高い特徴的な構造をしているが、培養細胞に導入した推定ハトレプチン遺伝子は翻訳され分泌タンパク質として培養液中に放出されることが、バイオアッセイとウエスタンブロットにより確認できた。しかしながら、幅広い鳥類レプチンへの交差が期待されるレプチン抗体を作出したが、LMH 細胞で発現させたハトレプチンを特異的に検出することはできなかった。

(3) 鳥類におけるレプチンの生理作用の解析

ニワトリ下垂体におけるレプチンタンパク質発現の解析

抗ニワトリレプチン受容体抗体と特異的に交差する約 180 kDa のタンパク質が検出された。ニワトリ視床下部、肝臓および LMH においても機能性のレプチン受容体タンパク質が同等の大きさの分子として検出されることが示されており、それらと一致する結果を得た。従って、レプチンは下垂体に直接作用して生理機能を果たす可能性が示唆された。

レプチンによる成長ホルモン遺伝子の転写制御

レプチンは Pit-1 α 存在下でのみニワトリ成長ホルモン遺伝子の転写活性を上昇させることを明らかにした。またニワトリ成長ホルモン遺伝子プロモーターには STAT 応答配列が存在するが、その配列を除いてもレプチンによる転写の活性化が生じることを見出した。変異型ニワトリレプチン受容体発現細胞を用いた解析により、レプチン依存的な転写の活性化には JAK2 が不可欠ではあるが、STAT3 は必須ではないことを明らかにした。一方、MAPK や PI3K など複数のリン酸化酵素がこの転写の活性化に関与することを見出し、特に CK2 が重要な働きを担っていることを、阻害剤を用いた実験により明らかにした。

肝臓脂質代謝関連酵素に対するエストロゲンとレプチンの相互作用

SREBP1c mRNA 発現はエストロゲンおよびレプチンの単独処理により低下する傾向を示したが、エストロゲンとレプチンの同時投与により相加あるいは相乗効果はみとめられなかった。SREBP2 mRNA 発現はエストロゲンまたはレプチンの単独処理で変化は認められなかったが、エストロゲンとレプチンの同時処理で mRNA 発現有意に減少し、レプチンとエストロゲンの相互作用似より脂質代謝関連酵素遺伝子の発現を制御している可能性が示唆された。しかしながら、SREBP2 に発現が制御されていることが示唆されている HMG CoA 還元酵素の mRNA 発現には影響を与え

なかった。また脂肪酸合成酵素やコレステロールの異化を制御するコレステロール 7 α 水酸化酵素の発現を変化させなかった。

以上、本研究課題では鳥類ゲノムにレプチン遺伝子が存在することを明らかにし、推定タンパク質がレプチン受容体と結合し細胞内情報伝達を行うことを明らかにした。本成果は 10 年以上に及んだ鳥類レプチンの存在に関する学術的な論争を終結させた点で非常に意義あるものであった。また最近になり複数の鳥種のレプチン遺伝子が同定されたが、いずれもが構造配列に多量の GC 塩基を含む特徴を有するとともに、塩基配列およびアミノ酸配列がともに既知のレプチンとの相同性が低いことが占められた。この性質がこれまで鳥類レプチンの存在を明らかにする上で障害となっていた可能性が極めて高い。一方、当初本研究課題で遺伝子の単離を計画していたニワトリでは今のところレプチン遺伝子の同定には至っていない。この原因については、前述のとおり、GC 含量が極めて高い領域に存在するため、塩基配列の解析が困難などの原因が考えられる。しかしながら本研究課題において、ニワトリ血清中にもレプチン様活性を有する分子が存在することをバイオアッセイにより確認した。従って鳥類でも他の脊椎動物と同様にレプチンシステムが存在し、種々の生理機能を制御していることが強く示唆された。またこのような観点から、レプチンがニワトリ成長ホルモン産生細胞での細胞内カルシウムイオンを上昇させることからレプチンのカウイ体細胞への直接作用が示唆されていたが、本研究課題にて下垂体における受容体タンパク質の存在を確認するとともに、成長ホルモン遺伝子の転写を変化させる可能性を見出した。哺乳類では下垂体由来レプチンの存在も示されており、レプチンによる下垂体への直接作用など成長や生殖制御に関する研究が鳥類でも進展することが大いに期待できる。また本研究では肝臓での脂質代謝への関与の可能性も見出した。脂質代謝との関連の解明は家禽生産物の品質改善との関連もあり、今後さらに研究を推進する必要があると考えられる。

一方、前述のとおりニワトリをはじめとする重要家禽でのレプチン遺伝子の存在は明らかにできなかった。更なる研究の進展のためには、この問題を解決すべく引き続き研究を進めていかなければならない。

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 6 件)

Ohkubo T (2014) Recent progress in avian leptin research, *Journal of Poultry Science*, 51: 343-351. 査読有

り

Ohkubo T, Hirota K, Murase D, Hiromi Adachi H, Nozawa-Takeda T and Sugita S (2014) Avian blood induced intranuclear translocation of STAT3 via the chicken leptin receptor. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 174: 9-14. 査読有り

Prokop JW, Schmidt C, Gasper D, Duff RJ, Milsted A, Ohkubo T, Ball HC, Shawkey MD, Mays Jr HL, Cogburn LA and Londraville RL (2014) Discovery of the elusive leptin in birds: Identification of several 'missing links' in the evolution of leptin and its receptor. *PLoS ONE*, e92751. doi:10.1371/journal.pone.0092751 査読有り

Adachi H, Murase D and Ohkubo T (2013) Inhibitory mechanism of signal transduction through chicken leptin receptor by suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS3). *Journal of Poultry Science*, 50: 262-269. 査読有り

[学会発表](計 8 件)

Ohkubo T, Kodama T, Ohnuki R, 『Changes in appetite-associated genes in the chicken hypothalamus during incubation behavior』, 2014.10.19-23, 第 10 回アジア太平洋家禽学会、済州(韓国)

児玉孝弘、大貫瑠美、大久保武、『抱卵行動がニワトリ視床下部の摂食関連遺伝子の発現に及ぼす影響』, 2014.3.29, 日本家禽学会 2014 年度春季大会、筑波大学(茨城県・つくば市)

Murase D, Ogawa K, Ohkubo T, 『Role of transactivation domain of Pit-1 is different in the transcriptional regulation of GH gene by leptin in chicken and mouse』, 第 17 回国際比較内分泌会議、2013.7.15-19, バルセロナ(スペイン)

大久保武、『ニワトリレプチン受容体を通じた生理作用発現の分子機構に関する研究』, 日本家禽学会 2013 年度秋季大会 2013.9.7-8, (平成 25 年度日本家禽学会 賞受賞講演) 新潟大学、(新潟県・新潟市)

村瀬大輔、廣田佳菜子、安達洋泉、竹田努、杉田昭栄、大久保武、『鳥類血清中のレプチン様活性の検出』, 日本家禽学会 2013 年度春季大会、安田女子大学(広島県・広島市)

Murase D, Atomura S, Ohkubo T, 『Leptin regulates Pit-1 α -dependent chicken GH gene expression in mammalian cells』,

第 10 回国際鳥類内分泌学会、2012.6.5-9、
長良川国際会議場（岐阜県・岐阜市）
Atomura S、Adachi H、Murase D、Ohkubo T、
『Effect of STAT5b mutant on prolactin signal transduction』、第 10
回国際鳥類内分泌学会、2012.6.5-9、長
良川国際会議場（岐阜県・岐阜市）
Ueno U、Shiraishi J-I、Tanizawa H、
Kawakami S-I、Ohkubo T、Bungo T、
『Antisense reduction of neuropeptide
Y Y1 receptor modulates energy
expenditure in chicks』、第 10 回国際鳥
類内分泌学会、2012.6.5-9、長良川国際
会議場（岐阜県・岐阜市）

6 . 研究組織

(1)研究代表者

大久保 武 (OHKUBO TAKESHI)

茨城大学・農学部・教授

研究者番号：70233070

(2)研究分担者

無し

(3)連携研究者

無し

(4)研究協力者

無し