

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：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590884

研究課題名(和文) 鍼通電で発見したAig11タンパク質の機能と鍼治療メカニズムの解明

研究課題名(英文) Study of the function of Aig11 protein and the mechanism of acupuncture

研究代表者

大田 美香(Ohta, Mika)

神戸大学・医学部附属病院・学術研究員

研究者番号：20274706

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)：鍼治療効果のメカニズム研究に際して発見したAcupuncture-induced 1-L (Aig11)タンパク質の機能と鍼治療メカニズムの解明の研究に取り組んだ。合成ペプチドを抗原として5種類のAig11タンパク質の抗体を作製し、特異性の高い抗体を得た。次に、ホモロジーモデリング法とフラグメントアセンブリ法を組み合わせた方法で、Aig11タンパク質の217番目から895番目までの679アミノ酸の立体構造を解析し、3個のCUBドメインと5個のSushiドメインの位置関係を明らかにした。この構造に類似の膜タンパク質は細胞接着や神経細胞の軸索誘導に関係しており、同様の可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We previously found acupuncture-induced 1-L (Aig11) gene and determined the full-length cDNA (Genbank accession no. DQ167195). Our aim is to elucidate the function of Aig11 protein and the mechanism of acupuncture therapy in this study. We used synthetic peptides as antigens and produced five anti-Aig11 antibodies. We obtained a specific antibody from those antibodies. The tertiary structure of Aig11 protein's 217-895 amino acids from N-terminus (679 out of 962 amino acids) was constructed by using homology modeling method and fragment assembly method. We then observed positional relation of three CUB domains and five sushi domains in structure. The result of our molecular simulation suggested that the Aig11 protein was possibly related to cell adhesion and/or axon guidance of neurons.

研究分野：東洋医学

キーワード：東洋医学 鍼治療 Aig11 ホモロジーモデリング法 フラグメントアセンブリ法

1. 研究開始当初の背景

(1)我々の研究グループは、鍼通電刺激の3時間後に特異的に発現誘導される遺伝子として、マウス Acupuncture-induced 1-L (*Aig11*) を1997年に発見し、2000年1月にゲノムデータベースに登録した (GenBank accession no. DQ167195)。この *Aig11* は、ゲノムデータベースに登録されている遺伝子の中で、鍼 (Acupuncture) の名前を冠した唯一の遺伝子である。我々は *Aig11* の完全長 cDNA 配列を決定し、ノーザンブロット解析とリアルタイム PCR 解析でこの遺伝子が主として脳で発現していることを明らかにした (Ohta M. et al, *Evidence based Complementary and Alternative Medicine*. doi:10.1093/ecam/nep121, 2011)。加えて、バイオインフォマティクス解析から、*Aig11* は962アミノ酸から成る分子量105 kDaのタンパク質であり、ドメイン解析では3個のCUBドメインと5個のsushiドメインから成っている。*Aig11* タンパク質の機能と鍼治療との関連を明らかにするために、細胞内局在の解析と立体構造解析に取り組むことが重要である。細胞内局在の解析では *Aig11* タンパク質の抗体作製および組織化学解析を、立体構造解析では X線結晶解析または分子シミュレーションによる立体構造解析がその候補となる。但し、膜タンパク質の結晶化は困難なことから、*Aig11* タンパク質は分子シミュレーションも有用な選択肢である。

(2)これまでに我々は、反復鍼通電刺激によるミオスタチン遺伝子の発現の抑制と、骨格筋の幹細胞である筋衛星細胞 (サテライト細胞) の増殖を促すことを見出した (Takaoka Y et al, *Physiol Genomics*, 30, 102-110, 2007)。この結果は、鍼通電刺激がミオスタチン遺伝子発現を抑制して骨格筋幹細胞の増殖やタンパク質合成の促進が生じたことを示唆しており、筋萎縮の予防効果が期待された。実際、後肢懸垂による筋萎縮マウスを用いた鍼通電治療実験で、鍼通電刺激で筋萎縮が抑制された (日本温泉気候物理医学会雑誌 74, 103-111, 2011: 2011年度第17回優秀論文賞受賞)。さらに、多面的なアプローチによる鍼治療効果のメカニズムの解明が必要である。

これらの研究成果を基盤として、*Aig11* タンパク質の機能と鍼治療効果の機序を明らかにする研究を着想した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、鍼治療効果のメカニズム研究で発見した *Aig11* タンパク質の機能を解明することと、鍼治療メカニズムの解明である。*Aig11* タンパク質と鍼治療に關与するタンパク質の機能を解析する。加えて、分子シ

ミュレーションによる *Aig11* タンパク質の立体構造解析を行ない、鍼治療における *Aig11* タンパク質の役割を解明する。

3. 研究の方法

(1) タンパク質の解析法

① *Aig11* タンパク質の抗体作製

抗体作製時に用いる抗原は、タンパク質そのもの、または抗原提示部位となりうる部位の合成ペプチドである。*Aig11* タンパク質は膜タンパク質であるため、*Aig11* タンパク質の分離精製は困難が予想される。今回は、合成ペプチドを抗原として抗体を作製する。その際、抗原認識部位のバイオインフォマティクス解析には、EMBOSS ソフトウェア

(<http://emboss.sourceforge.net/>, GPL ライセンスのため無料で利用可能) を用いる。抗体作製時には、3種類の抗原提示部位の候補ペプチドを混合してウサギに免疫する事で、力価の強い抗体が得られるように工夫する。抗体作製後、特異性の高い抗体を選択する。

② シグナル伝達経路のタンパク質の解析系の確立

タンパク質の合成に關与する PI3K/AKT シグナル伝達経路の解析のため、ウェスタンブロット法による評価系を確立する。

(2) 分子シミュレーションによる解析法

① 分子シミュレーションによるタンパク質の立体構造の解析方法の確立

近年、タンパク質の立体構造情報の蓄積に伴い、確実に高い精度で立体構造を得ることが可能となっている。その解析方法には、フラグメントアセンブリ法 (Bonneau R et al, *Protein*, 45, 119-126, 2001)、ホモロジーモデリング法 (Marti-Renom MA et al, *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 29, 291-325, 2000)、両者を組み合わせた手法などが確立されつつある (Kelly LA et al, *Nature Protocols*, 4, 363-371, 2009)。本研究では、フラグメントアセンブリ法で必要なプログラム (Ishida T et al, *Genome Informatics*, 14, 228-23, 2003) を基に実装する。同時に、「高い相同性で、立体構造が解かれている領域」をバイオインフォマティクス解析で明らかにし、ホモロジーモデリング法に用いる。

② *Aig11* タンパク質の立体構造の解析

MOE プログラム (Chemical Computing Group 社) を用いたホモロジーモデリング法とフラグメントアセンブリ法で、それぞれ *Aig11* タンパク質の立体構造を解析する。そして、両方法の長所を組み合わせたハイブリット法により構造解析する。

4. 研究成果

(1) タンパク質の解析

合成ペプチドを抗原として5種類のAig11タンパク質の抗体を作製した。具体的には、EMBOSS ソフトウェアで抗原認識部位を選択し、5種類のペプチドを合成した。そして、合成ペプチドを抗原として、ウサギを用いたポリクローナル抗体を作製した。5種類のAig11抗体の中から特異性の高い抗体を選択するため、ウェスタンブロッティング法で解析した。その結果、1種類が特異性の高い抗体であったが、組織解析には適さない可能性が明らかになった。作成したポリクローナル抗体よりも特異性が高いモノクローナル抗体の作製の可否を検討したが、最近抗体の販売が開始されたため、市販の抗体を入手した。この抗体を用いてAig11タンパク質の脳内局在や細胞局在を解明するため、現在実験を継続している。

次に、PI3K/AKT シグナル伝達経路が鍼治療効果に関与する結果を得た。PI3K/AKT シグナル伝達経路に関連するAkt, mTOR, p70S6Kのウェスタンブロッティング法の解析条件を決定し、評価法を確立した。

(2) 分子シミュレーションによる解析

分子シミュレーションによるタンパク質の立体構造の解析方法を確立し、Aig11タンパク質の立体構造解析を行った。Aig11タンパク質は3個のCUBドメインと5個のsushiドメインを持っている。CUBドメインは約110アミノ酸、sushiドメインは約60アミノ酸から成っている。これらのドメインはタンパク質の機能を知る上で重要な手掛かりになる。日本蛋白質構造データバンク(PDBj: Protein Data Bank Japan, <http://www.pdbj.org/>)のSequence Navigator機能を用いて、Aig11タンパク質の各ドメインに対してホモロジーが高く、立体構造が解かれている他のタンパク質の領域を検索した。その結果、利用可能な3個のCUBドメインと5個のSushiドメインの領域が得られた。MOEプログラムで各々のドメインの立体構造を計算し、構造最

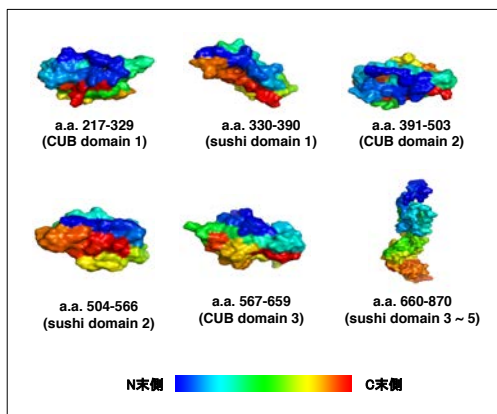


図1 Aig11タンパク質のドメイン部分の立体構造

適化を行った(図1)。その後、CUBドメインとSushiドメインの立体構造をドッキングシミュレーションで連結し、Aig11タンパク質の217番目から895番目の679アミノ酸の立体構造を解析した(図2)。この構造に類似の膜タンパク質は細胞接着や神経細胞の軸索誘導に関係しており、同様の可能性がある。この立体構造の解析により、3個のCUBドメインと5個のSushiドメインの位置関係を明らかにした。そして、MOEプログラムとNAMDプログラム(イリノイ大学)を利用した新たな解析系を確立し、解析時間の短縮が実現した。また、1つの構造最適化計算を複数の計算機で分散処理できる解析系を確立した。本研究の成果は、招待講演(日本東洋医学会学術総会・全日本鍼灸学会)等で発表した。

次に、鋳型が不要な立体構造解析法であるフラグメントアセンブリ法(Simons KT et al. *J Mol Biol*, 268, 209-225, 1997)を基にした解析プログラムを作成した。Aig11タンパク質の1番目から216番目の216アミノ酸と、896番目から962番目の67アミノ酸は、ホモロジーが高く、立体構造が解かれている他のタンパク質の領域が日本蛋白質構造データバンクになく、ホモロジーモデリング法の解析が困難である。作成した解析プログラムにより、Aig11タンパク質に存在するホモロジーモデリング法の適用が不可能な領域の立体構造解析が可能になると期待された。作成した解析プログラムで鋳型のない部分の立体構造を解析した結果、解析プログラムの改良点が明らかになった。引き続き、Aig11タンパク質の立体構造を解析するため、解析プログラムの研究開発に取り組んでいる。今後も、本研究終了後に新規採択された科学研究費補助金の研究に本研究の成果を活用し、鍼治療効果のメカニズム解明の研究を進める予定である。

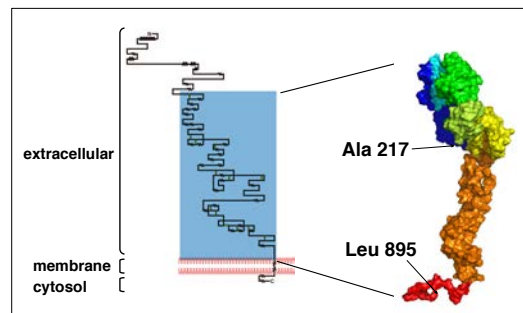


図2 Aig11タンパク質の立体構造

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2件)

- ① 大田美香、鍼灸研究の新展開：お灸のバイオフィーマティクス、全日本鍼灸学会雑誌、査読有、Vol 65、No 1、2015、pp. 3-4

- ② Yoichiro Hosokawa, Mika Ohta, Akihiko Ito, Yutaka Takaoka, Photomechanical ablation of biological tissue induced by focused femtosecond laser and its application for acupuncture. *Applied Physics A*, 査読有, Vol 110, 2013, pp. 613-616
DOI: 10.1007/s00339-012-7138-5

[学会発表] (計 5 件)

- ① 大田美香、三浦研爾、一瀬晃洋、菅野亜紀、高岡 裕、東洋医学の治療効果研究へのバイオインフォマティクスの応用、平成 26 年度日本東洋医学会関西支部例会、2014.10.26、スターゲイトホテル関西エアポート (大阪府)
- ② 大田美香、三浦研爾、前田英一、菅野亜紀、高岡 裕、熱刺激に対する細胞反応のバイオインフォマティクス解析、第 87 回日本生化学会大会、2014.10.18、国立京都国際会館 (京都府)
- ③ 大田美香 (招待講演)、鍼灸研究の新展開：お灸のバイオインフォマティクス、第 63 回全日本鍼灸学会学術大会、2014.5.17、ひめぎんホール (愛媛県)
- ④ 大田美香 (招待講演)、鍼刺激で発見したマウス Aig11 遺伝子とそのタンパク質の生化学/生物物理 (シンポジウム 5)、第 64 回日本東洋医学会学術総会、2013.6.1、城山観光ホテル (鹿児島県)
- ⑤ 大田美香、三浦研爾、菅野亜紀、小田剛、一瀬晃洋、前田英一、高岡 裕、鍼通電刺激の基礎研究で発見した Aig11 タンパク質の機能解析、平成 24 年度日本東洋医学会関西支部例会、2012.10.28、千里ライフサイエンスセンター (大阪府)

[図書] (計 1 件)

- ① Takaoka T, Ohta M, Sugano A, Ito A, Hosokawa Y. InTech Publishers (Edited by Chen LL, Cheng TO), New Technology: Femtosecond laser may be used for future Acupuncture therapy. *Acupuncture in Modern Medicine*, 2013, pp. 221-231

[その他]

ホームページ

<http://bionano.med.kobe-u.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大田 美香 (OHTA, Mika)
神戸大学・医学部附属病院・学術研究員
研究者番号：20274706

(2) 研究分担者

高岡 裕 (TAKOKA, Yutaka)
神戸大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：20332281

(3) 研究分担者

一瀬 晃洋 (ICHINOSE, Akihiro)
神戸大学・医学部附属病院・特命准教授
研究者番号：90362780

(4) 研究協力者

菅野 亜紀 (SUGANO, Aki)
神戸大学・医学部附属病院・特命助教
研究者番号：20457039