

平成 30 年 9 月 13 日現在

機関番号：17701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670114

研究課題名(和文) 食欲を調節するアドロピンやオーグリンのシグナル伝達の解明

研究課題名(英文) Analysis of signaling pathway of adropin and augurin regulating appetite

研究代表者

上田 雅博 (Ueda, Masahiro)

鹿児島大学・研究支援センター・技術専門職員

研究者番号：00448573

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、アドロピンやオーグリンなどのエネルギー代謝や食欲、その他様々なシグナルに關与するペプチドホルモンの未知の受容体を同定し、さらにその下流のシグナル伝達経路の詳細を解明することを目的としている。

ビオチン標識したアドロピンの受容体のスクリーニングを行ったが候補を濃縮できなかった。次に酵母 two-hybrid法を改変して用いる方法を考案し、アドロピンと結合する可能性のある部分cDNAを得た。今後は、ヒト細胞でこの分子を発現させて、実際にビオチン化したアドロピンと結合するか否か、細胞内で遺伝子発現などを変化させるかを解析予定である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we planned to discover the receptors for adropin and augurin which are the peptide hormones regulating energy metabolism, appetite and various signaling pathways.

We utilized COS7 cell which overexpressed sub-pooled cDNA library from mouse brain, biotin-labelled peptides, streptavidin-HRP, and chromogenic substrate system. However, we failed to obtain the clones that gave positive signals about ligand-binding. We modified classical yeast two hybrid method and obtained the candidate molecules which potentially interact with adropin.

We plan to analyze whether this protein really bind to adropin using biotin labelled-adropin and cell based assay and the binding between these molecules alter the gene expression of the cells.

研究分野：シグナル伝達、分子間相互作用

キーワード：摂食調節 シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

生体が大きなストレスを受けたとき、視床下部から放出される副腎皮質ホルモン放出因子(corticotropin releasing factor、以下CRF)は、下垂体を刺激して副腎皮質刺激ホルモン(adrenocorticotrophic hormone、ACTH)を分泌させ、副腎皮質に働きかけ、内分泌を動かす視床下部 - 下垂体 - 副腎系(hypothalamic-pituitary-adrenal axis、以下HPA axis)を駆動する。

胃から分泌されるグレリンや、脂肪細胞から分泌されるレプチン、視床下部から分泌されるニューロペプチドYは視床下部に作用して、食欲を調節する。視床下部は別名「食欲中枢」といわれるが、近年視床下部でアドロピンやオーグリンなどいくつかのオーファンリガンドの発現が報告されている。

アドロピンは、肝臓でも発現しており、高カロリー食を与えたマウスでは発現が亢進することや、肝臓の脂肪合成に関わるPPAR

遺伝子の発現と関わっていることが明らかとなっている。しかしながら、アドロピン受容体と細胞内シグナル経路については解明されていない。

オーグリンはラット脳室内投与によりCRF放出促進を起こすが、オーグリンの食欲への関与や、その受容体や細胞内シグナル経路も不明である。

アドロピンもオーグリンもHPA axisを駆動したり、食欲に影響を及ぼしたりする可能性が高い。したがって、オーファンリガンドであるアドロピンやオーグリンに対する未知受容体や細胞内シグナルを解明することは、食欲の調節に障害があり治療が困難な過食症や食思不振症の病態解明や新しい治療法開発のために必要であると考えられる。

2. 研究の目的

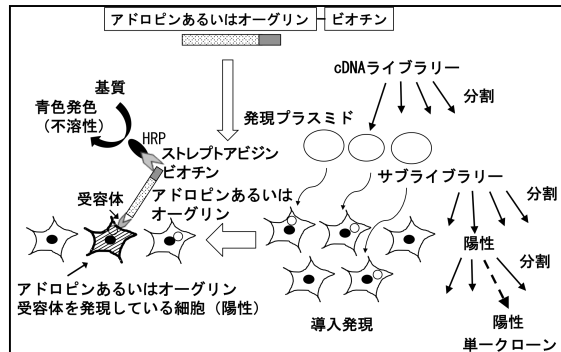
本研究は、アドロピンやオーグリンなどのエネルギー代謝や食欲、その他様々なシグナルに関与するペプチドホルモンの未知の受容体やシグナル伝達経路を生化学的手法、培養細胞を用いた分子生物学手法を用いて、同定・解明し、肥満や過食症、食思不振などの様々な症状に対して、新しいアプローチで創薬や治療法開発を行うための知見を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

アドロピンやオーグリンの作用機構を解明し、臨床応用への手がかりを得るため、以下を行う。

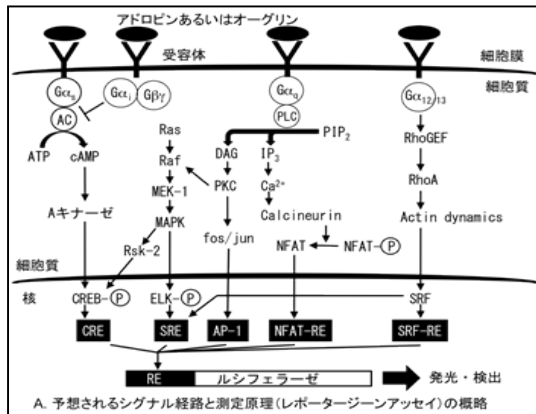
- (1) ピオチン標識アドロピンあるいはオーグリンを用いて、視床下部に存在すると推定される受容体を同定するため、脳由来cDNA発現ライブラリーを分割したサブライブラリーを導入した細胞での結合実験を行う。結合実験で陽性と認められたサブライブラリーは、さらに分割操

作を行い、陽性単一クローンを得るまでスクリーニングを繰り返す。得られた陽性クローンの配列をシーケンスし、未知アドロピンあるいはオーグリン受容体候補を同定する。

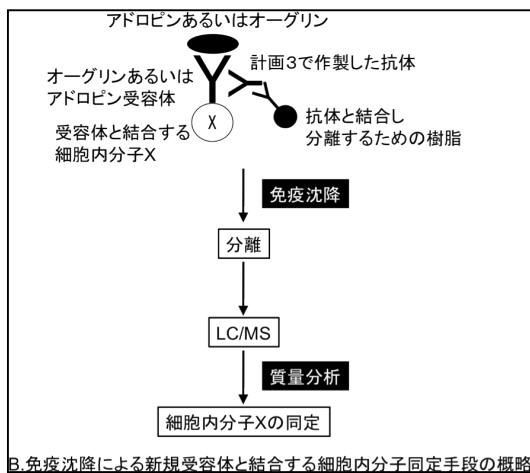


- (2) (1)で同定した受容体候補分子のアミノ酸配列情報を解析し、細胞膜貫通ドメインやシグナルペプチドを持つと思われる分子のみを受容体候補として絞り込み、クローニングして培養細胞での発現ベクターを作製する。作製した受容体発現ベクターを培養細胞に導入発現し、氷温でアドロピンあるいはオーグリンを細胞培地に添加する。その後、細胞を回収して、抗アドロピンあるいはオーグリン抗体を用いた免疫染色、またはホモジナイズ後、膜画分に含まれるアドロピンあるいはオーグリンをウエスタンブロットで定量、あるいは放射性物質を使って標識したアドロピンあるいはオーグリンを用いたRIAアッセイにより、クローニングした新規受容体とアドロピンあるいはオーグリンとの結合の有無を解析する。
- (3) (1)、(2)で同定したアドロピンあるいはオーグリン受容体に対する抗体を作製する。組み換えアドロピンあるいはオーグリン受容体タンパク質を大腸菌中で発現させた後、精製する。得られた精製タンパク質をウサギ、モルモットあるいはマウスに免疫し、抗体を得る。得られた抗体を用い、各種臓器でのアドロピンあるいはオーグリン受容体発現を免疫組織化学的手法あるいはウエスタンブロットで定量する。また、グレリンやレプチン、ニューロペプチドY各受容体の発現分布と比較し、同一細胞上にそれら受容体とアドロピンあるいはオーグリン受容体が共に発現しているか否かを確認する。
- (4) (1)(2)で同定したアドロピンあるいはオーグリン受容体を培養細胞で発現させ、アドロピンあるいは

オーグリンで刺激することにより、変化する細胞内シグナルを各種リン酸化抗体やレポータージーンアッセイで検出する。



また、(3)で作製した、同定した新規受容体に対する抗体を用い、免疫沈降により新規受容体と結合する細胞内分子を精製し、LC/MSを用いた質量分析により同定する。さらに、(3)でアドロピンあるいはオーグリン受容体発現が確認できた臓器由来の初代培養細胞や細胞株を用いて、受容体以降のシグナルを検出する。これらの実験で得られた結果と既知のグレリンやレプチン、ニューロペプチドY各受容体を介したシグナル伝達とを総合的に解析して、アドロピンあるいはオーグリンが制御する細胞内シグナルを解明する。



4. 研究成果

COS7 細胞や 293 細胞でマウス脳 cDNA ライブラリーを発現させ、ピオチン標識したアドロピンを結合させて、ストレプトアビジン-HRP と発色基質を用いて受容体のスクリーニングを行ったが候補を濃縮することができなかった。これは、293 細胞内でのプラスミド DNA の維持が不安定で、欠失が 48 時間

以内でも高頻度で発生することによるものと考えられた。

続いて、ファージディスプレイ法を用いて、アドロピンと結合するペプチド鎖を発現するクローンの濃縮を目指したが、非特異的に吸着されるクローンが多く、アドロピン特異的に結合するファージクローンの同定を行うことができなかった。

そこで、2 分子結合に多くの実績がある酵母 two-hybrid 法を改変して用いる方法を考案し、アドロピンと結合する可能性のある部分 cDNA を得た。

今後は、ヒト細胞でこの分子を発現させて実際にピオチン化したアドロピンと結合するか否か、細胞内で遺伝子発現などを変化させるかを解析する予定である。

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)

[学会発表](計6件)

(1) 日本産業衛生学会(2017年5月12日)

東京ビックサイト、東京・江東区

抗がん剤ドキシソルピシの心毒性に対する
グレリン・デスアシルグレリン治療効果
の検討

野中美希、呉林なごみ、村山尚、杉原匡
美、宮野加奈子、白石成二、細田洋司、
岸田昭世、寒川賢治、櫻井隆、上園保仁

(2) グレリン国際シンポジウム(2017年
4月23日)みやこめっせ、京都市

Therapeutic potential of ghrelin and
des-acyl ghrelin against
chemotherapy-induced cardiotoxicity

Miki Nonaka, Nagomi Kurebayashi,
Takashi Murayama, Masami Sugihara,
Kiyoshi Terawaki, Seiji Shiraishi,
Kanako Miyano, Hiroshi Hosoda, Shosei
Kishida, Kenji Kangawa, Takashi
Sakurai and Yasuhito Uezono

(3) Biophysical Society, 61th annual meeting (2017年2月11～15日) ニューオーリンズ ルイジアナ州、米国

Effects of ghrelin and des-acyl ghrelin on doxorubicin-induced cardiotoxicity

Miki Nonaka, Nagomi Kurebayashi, Takashi Murayama, Masami Sugihara, Seiji Shiraishi, Kanako Miyano, Hiroshi Hosoda, Shosei Kishida, Kenji Kangawa, Takashi Sakurai and Yasuhito Uezono

(4) 第75回日本癌学会総会(2016年10月8日) パシフィコ横浜、横浜市

Des-acyl ghrelin as well as ghrelin have preventive effects on the doxorubicin-induced cardiotoxicity

Miki Nonaka, Seiji Shiraishi, Kanako Miyano, Moeko Eto, Shosei Kishida, and Yasuhito Uezono

(5) ISC2016国際シンポジウム(2016年7月12日) 東京医科歯科大学、東京・文京区

ドキシソルビシン毒性に対するデスアシルグレリンの治療効果の検討

野中美希、杉原匡美、呉林なごみ、村山尚、白石成二、細田洋司、岸田昭世、寒川賢治、櫻井隆、上園保仁

(6) 第43回日本毒性学会学術年会(2016年6月29日) ウィンクあいち(愛知県産業労働センター)、名古屋市

ドキシソルビシン毒性に対するデスアシルグレリンの治療効果の検討

野中美希、杉原匡美、呉林なごみ、村山尚、白石成二、宮野加奈子、細田洋司、岸田昭世、寒川賢治、櫻井隆、上園保仁

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

名称: 酵母と断片化 cDNA ライブラリーを用いたタンパク質の新しい同定法
発明者: 岸田 昭世
権利者: 同上
種類: 特許権
番号: 2016-112107
出願年月日: 2016年6月3日
国内外の別: 国内

取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上田 雅博 (Masahiro Ueda)
鹿児島大学・自然科学教育研究支援センター・技術専門職員
研究者番号: 00448573

(2) 研究分担者

岸田 昭世 (Shosei Kishida)
鹿児島大学・医歯学域医学系・教授
研究者番号: 50274064

飯島 幹雄 (Mikio Iijima)
鹿児島大学・医歯学域医学系・助教
研究者番号: 00305111

岸田 想子 (Michiko Kishida)

鹿児島大学・医歯学域医学系・助教
研究者番号： 40274089

小山 浩史 (Hirofumi Koyama)
鹿児島大学・医歯学域医学系・講師
研究者番号： 40709656

加藤 郁夫 (Ikuo Kato)
神戸薬科大学・薬学部・教授
研究者番号： 70509843

(3)連携研究者
(なし)

研究者番号：

(4)研究協力者
(なし)