

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 30 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2014

課題番号：26670458

研究課題名(和文) オミックス解析による摂食調節の統合的シグナル学の構築

研究課題名(英文) Integrative omics-based understanding of the appetite-regulating signals within the hypothalamus

研究代表者

中尾 一和 (Kazuwa, Nakao)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00172263

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)：リン酸化プロテオミクスとメタボロミクスによるマウス視床下部の解析を行い、物質レベルから、栄養素シグナルとリン酸化シグナルのクロストークの実態に迫った。さまざまな栄養状態やレプチン等のホルモン投与後のマウス視床下部からの抗チロシンリン酸化抗体による免疫沈降・網羅的質量分析を可能とする系の構築に成功し、銀染色等により可視化可能な複数の陽性シグナルを検出できた。さらにCE/MSを用いた中心代謝の主要な中間代謝産物の網羅的解析により、核酸やプリン代謝産物、ペントースリン酸回路の中間代謝産物の濃度の変化を認めた。リン酸基供与系の低下とタンパクリン酸化のグローバルな変化との関連性に興味もたれる。

研究成果の概要(英文)：We have undertaken phospho-proteomics and metabolomics analyses of the mouse hypothalamus to understand the cross-talk of nutrient signals and phospho-protein signaling. We have established an effective immunoprecipitation method using phospho-tyrosine antibody for the subsequent SDS-PAGE, Ag staining and MS-based annotation. We have already identified multiple novel positive bands in Ag-stained gels that appear by leptin stimulation, which could correspond to novel phosphor-proteins in leptin signaling pathway. In CE/MS-based analysis of the intermediate metabolites in central metabolic pathways revealed a drastic change in nucleic acid and purine metabolism and in pentose-phosphate pathway in hypothalamic samples from mice treated with leptin. Linkage between changes in phosphate group donors and global changes in phospho-proteomics may suggest a novel signaling dynamism of leptin actions in the hypothalamic energy center.

研究分野：内分泌学

キーワード：オミックス レプチン 食欲 肥満 シグナル伝達

## 1. 研究開始当初の背景

レプチンは視床下部の主に弓状核に発現するレプチン受容体を介して脳にシグナルを伝達し、摂食抑制やエネルギー消費の亢進をもたらす。レプチン受容体下流の細胞内シグナルについては JAK-Stat 経路や MAPK 経路、PI3K 経路などが存在することが知られている。最近、これらのタンパク質リン酸化シグナルに加えて、細胞内の代謝物 (metabolite) 濃度の変化を介した情報伝達の意義が注目され、AMP キナーゼの例に示されるように、代謝物シグナルとタンパク質のリン酸化シグナルのクロストークによる細胞機能制御の重要性が明らかとなりつつある。

## 2. 研究の目的

本研究では、エネルギー代謝制御の中核であり、レプチンをはじめとするエネルギー代謝制御ホルモンによる中枢作用のゲートウェイの働きを有する視床下部に特に着目し、代謝物シグナルとリン酸化タンパク質シグナルの両面から生化学的、病態生化学的解析を行った。

## 3. 研究の方法

- (1) 標準食ないし 60%kcal fat を含有する高脂肪食を 8 週齢より 7 週間与えた C57BL/6N 雄性マウスに、PBS ないしはリコンビナントマウスレプチン 3mg/kg を腹腔内投与し、1 時間後にサクリファイスし、速やかに視床下部を採取、液体窒素により凍結して、保存、ホモジナイズ後に中心代謝産物含量を CE/MS により解析した。
- (2) リコンビナントマウスレプチン投与 30 分後の視床下部 5 匹分を採取して 1%CHAPS 存在下にホモジナイズし、4G10 抗リン酸化チロシンモノクローナル抗体固体により免疫沈降し、沈降物を SDS-PAGE に展開してウエスタンブロットと銀染色に供した。

## 4. 研究成果

- (1) コントロール食マウスに対するレプチン投与は、CDP、Guanosine、Butyrcarnitine、Adenosine、HMG acid の増加、Ribulose 1,5-2 リン酸の減少をもたらしたが、これら変化は全て高脂肪食マウスでは消失していた。一方高脂肪食により、視床下部の 1-Methylnicotinamide、Pantothenic acid、Cystathionine、Fructose 6-リン酸、Glucose 6-リン酸、2-Deoxyguanosine、

Tyr、GABA、Phenylalanine、Gln、3-Hydroxybutyric acid が増加、Homoserine、Thr、Hydroxyproline、Carnitine、Lys、Carboxymethyllysine、UDP-glucose が減少し、解糖系やペントースリン酸回路、酸化還元状態、アミノ酸代謝、ケトン体産生の異常が示唆された。

- (2) さまざまな栄養状態やレプチン等のホルモン投与後のマウス視床下部からの抗チロシンリン酸化抗体による免疫沈降 - 網羅的質量分析を可能とする系の構築に成功し、銀染色等により可視化可能な複数の陽性シグナルを検出できた。
- (3) 以上より、中枢性エネルギー代謝制御異常における、リン酸基供与系の低下とタンパク質リン酸化のグローバルな変化との関連性に興味もたれ、今後の研究の展開が期待される。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者に下線)

[雑誌論文](計 10 件)

1. Increased bone turnover and possible accelerated fracture healing in a murine model with an increased circulating C-type natriuretic peptide.  
Kondo E, Yasoda A, Fujii T, Nakao K, Yamashita Y, Ueda-Sakane Y, Kanamoto N, Miura M, Arai H, Mukoyama M, Inagaki N, Nakao K. *Endocrinology*. 2015 Apr 10:en20141801.
2. Leptin improves Fatty liver independently of insulin sensitization and appetite suppression in hepatocyte-specific pten-deficient mice with insulin hypersensitivity.  
Yamamoto-Kataoka S, Ebihara K, Aizawa-Abe M, Nishio M, Kusakabe T, Yamamoto Y, Aotani D, Sakai T, Zhao M, Ebihara C, Gumbilai VM, Hosoda K, Suzuki A, Nakao K. *Horm Metab Res*. 2015 Mar;47(3):168-75.
3. The G-Protein-Coupled Long-Chain Fatty Acid Receptor GPR40 and Glucose Metabolism [Review].  
Tomita T, Hosoda K, Fujikura J, Inagaki N, Nakao K. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2014 Sep 26;5:152.

4. The regulation of circulating ghrelin - with recent updates from cell-based assays [Review].  
Iwakura H, Kangawa K, Nakao K.  
*Endocr J*. 2015 Feb 27;62(2):107-22S.
5. Role of endogenous ACTH on circadian aldosterone rhythm in patients with primary aldosteronism.  
Sonoyama T, Sone M, Tamura N, Honda K, Taura D, Kojima K, Fukuda Y, Kanamoto N, Miura M, Yasoda A, Arai H, Itoh H, Nakao K.  
*Endocr Connect*. 2014 Dec;3(4):173-9.
6. Leptin restores the insulinotropic effect of exenatide in a mouse model of type 2 diabetes with increased adiposity induced by streptozotocin and high-fat diet.  
Sakai T, Kusakabe T, Ebihara K, Aotani D, Yamamoto-Kataoka S, Zhao M, Gumbilal VM, Ebihara C, Aizawa-Abe M, Yamamoto Y, Noguchi M, Fujikura J, Hosoda K, Inagaki N, Nakao K.  
*Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2014 Oct 15;307(8):E712-9.
7. Inhibition of N-type Ca<sup>2+</sup> channels ameliorates an imbalance in cardiac autonomic nerve activity and prevents lethal arrhythmias in mice with heart failure.  
Yamada Y, Kinoshita H, Kuwahara K, Nakagawa Y, Kuwabara Y, Minami T, Yamada C, Shibata J, Nakao K, Cho K, Arai Y, Yasuno S, Nishikimi T, Ueshima K, Kamakura S, Nishida M, Kiyonaka S, Mori Y, Kimura T, Kangawa K, Nakao K.  
*Cardiovasc Res*. 2014 Oct 1;104(1):183-93
8. The effects of super-flux (high performance) dialyzer on plasma glycosylated pro-B-type natriuretic peptide (proBNP) and glycosylated N-Terminal proBNP in end-stage renal disease patients on dialysis.  
Nakagawa Y, Nishikimi T, Kuwahara K, Yasuno S, Kinoshita H, Kuwabara Y, Nakao K, Minami T, Yamada C, Ueshima K, Ikeda Y, Okamoto H, Horii K, Nagata K, Kangawa K, Minamino N, Nakao K.  
*PLoS One*. 2014 Mar 25;9(3):e92314.
9. An AKI biomarker lipocalin 2 in the blood derives from the kidney in renal injury but from neutrophils in normal and infected conditions.  
Kanda J, Mori K, Kawabata H, Kuwabara T, Mori KP, Imamaki H, Kasahara M, Yokoi H, Mizumoto C, Thoennissen NH, Koeffler HP, Barasch J, Takaori-Kondo A, Mukoyama M, Nakao K.  
*Clin Exp Nephrol*. 2015 Feb;19(1):99-106.
10. Macrophage-mediated glucolipotoxicity via myeloid-related protein 8/toll-like receptor 4 signaling in diabetic nephropathy.  
Kuwabara T, Mori K, Mukoyama M, Kasahara M, Yokoi H, Nakao K.  
*Clin Exp Nephrol*. 2014 Aug;18(4):584-92.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

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 なし

6. 研究組織  
(1)研究代表者  
中尾 一和 (NAKAO KAZUWA)  
京都大学大学院医学研究科・特任教授  
研究者番号：00172263

(2)研究分担者  
該当なし

(3)連携研究者

田中 智洋 (TANAKA TOMOHIRO)

京都大学大学院医学研究科・特定准教授

研究者番号：20402894