

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月28日現在

機関番号：17701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659124

研究課題名（和文） 神経ペプチドグレリンの新規受容体の同定と作用機構の解明

研究課題名（英文） Identification and characterization of desacyl-ghrelin

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・技術職員

研究者番号：00448573

研究成果の概要（和文）：

非修飾型グレリンを固定化したカラムを作成し、アフィニティ精製の手法によりブタ脳抽出液からグレリン結合たんぱく質を濃縮し、高塩濃度での溶出を行った後、SDS ポリアクリルアミド電気泳動と質量分析を行って、グレリンに結合する蛋白質の同定を試みたが、有意なバンドを検出するには至らなかった。次に、マウス脳 cDNA ライブラリーを培養細胞に発現させ、標識グレリンを作用させ、グレリンを検出することにより、グレリンと結合するクローンのスクリーニングを行い、いくつかの陽性クローンを含む細胞集団があることを検出できたので、現在受容体のクローニングをさらに進めようとしている。

研究成果の概要（英文）： Ghrelin is a peptide hormone to regulate appetite and is known to have two forms (acyl ghrelin and des-acyl ghrelin). Ghrelin receptor (GHSR), which recognizes the post-translational acyl-modification, expressed in various tissues. However, ghrelin without lipid-modification does not bind to GHSR and functions antagonistic to acyl ghrelin. These findings suggested the presence of unknown receptor specific for des-acyl ghrelin. We performed affinity-purification of des-acyl ghrelin-binding protein using pig brain extract. We tried to elute des-acyl ghrelin-associated protein by high salt condition (1M NaCl) but detected no significant condensation of candidate molecules. Next, we performed conventional receptor panning assay using COS7 cells transfected with sub-pooled mouse brain cDNA libraries. We detected several pools as “positive pools” and further selection of procedures for cloning is in process.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・環境生理学(含体力医学・栄養生理学)

キーワード：摂食調節

1. 研究開始当初の背景

グレリンは日本の中里らが胃から成長ホル

モン分泌促進物質として見出した 28 アミノ酸残基よりなる神経ペプチドで、アミノ末端

側のセリンが脂肪酸修飾された特徴的な構造を示す。グレリンは胃の壁細胞で産生され、食欲増進、体重増加などのエネルギー代謝に関わる作用があり、ただ一つの末梢臓器で作られる摂食促進効果があるペプチドである。グレリン受容体としては G 蛋白共役型 GHSR 受容体が知られているが、非修飾型グレリンは、この受容体に結合しないため、当初生理的な作用はないと考えられてきた。ところが、私共は、デスアシルグレリン（非修飾型グレリン）が修飾型グレリン依存性のインスリン分泌抑制や血糖上昇を阻害することや空腹時の食欲を低下させることを見出した。これらの現象は、デスアシルグレリンが、GHSR 受容体と全く異なる受容体を介して、修飾型グレリンのシグナルに干渉する可能性を示している。これまでに、修飾型グレリンの産生や分泌を制御する機構やグレリンが成長ホルモン分泌を促進する機構は精力的に解明が行われたが、デスアシルグレリンの受容体については未だ同定されず、他の研究グループにより最近その存在が想定されているのみである。

2. 研究の目的

グレリンの新規受容体同定とシグナル伝達機構の解明が目的である。血中グレリン濃度は神経性食思不振症などの病態での食欲と密接な関係を示すので、臨床的にも今後重要となる。血中には非修飾型グレリンが修飾型より多量に存在することや、非修飾型グレリンを投与すると修飾型グレリンによる食欲亢進を抑制することから、未知のグレリン受容体を介したシグナル伝達経路が、グレリンの作用を調節していると考えられるので、これを解明する。

3. 研究の方法

動物脳抽出液からデスアシルグレリンを固定化したカラムを用いてアフィニティクロマトグラフの手法でグレリン結合たんぱく質を濃縮する。カラム溶出液を電気泳動して、LC/MS 装置を用いて、可能な限り多数の候補分子を同定する。この実験は、目的分子がグレリンと結合できる活性を保ったまま可溶化されないと成立しないが、細胞膜を貫通している受容体は可溶化しにくいことが想定されるので、必要に応じて組織からのタンパク質抽出の際に、汎用されている TritonX-100 をはじめとして、CHAPS、オクチルグルコシド、ジギトニンといった界面活性剤を用いる比較的温和な可溶化から、コール酸などの強力な可溶化までを検討する。得られたアミノ酸配列情報を解析して、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候補分子に的を絞ってクローニングを行い、培養細胞で新規受容体を発現させて、非修飾型または修飾型グレリンとの結合を検証する予定であった。

4. 研究成果

連携研究者の乾が提供したデスアシルグレリンをカラムに固定化し、界面活性剤で可溶化したブタ脳抽出液を材料として、アフィニティクロマトグラフィの手法でグレリン結合たんぱく質を濃縮し、高塩濃度（1 M NaCl）で溶出した。

引き続き溶出画分を SDS-ポリアクリルアミド電気泳動して、銀染色の後、LC/MS 装置を用いて質量分析で候補分子の同定を目指した。しかしながら、クロマトグラフィの溶出条件を検討しても、非特異的なバンドが多数出現してデスアシルグレリンに特異的な結合蛋白質を確認できず、同定には至らなかった。

次に、サブプール化されたマウス cDNA ライ

ブラリーを COS7 細胞に発現させ、標識グレリンを作用させ、陽性クローンを含むサブプールのスクリーニングを行った。現在、陽性サブプールからの細分化した孫サブプールを作成し、クローニングを進めている段階である。

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)

[雑誌論文] (計 11 件)

(1)Toshiro Kibe, Takao Fuchigami, Michiko Kishida, Mikio Iijima, Kiyohide Ishihata, Hiroshi Hijioka, Akihiko Miyawaki, Ichiro Semba, Norifumi Nakamura, Tohru Kiyono, Shosei Kishida. A novel ameloblastoma cell line(AM-3) secretes MMP-9 in response to Wnt-3a and induces osteoclastogenesis, Oral Surg.Oral Med.Oral Pathol.Oral Radiol.、(印刷中)
DOI:10.1016/j.oooo.2013.03.005

(2)Takehiro Hayashi, Michiko Kishida, Yoshiaki Nishizawa, Mikio Iijima, Chihaya Koriyama, Masayuki Nakamura, Akio Sano, Shosei Kishida. Subcellular localization and putative role of VPS13A/chorein in dopaminergic neuronal cells、Biochemical and Biophysical Research Communications 419(2012)511-516
DOI:10.1016/j.bbrc.2012.02.047.

(3)Iwase S, Yamaguchi T, Miyaji T, Terawaki K, Inui A, Uezono Y. The clinical use of Kampo medicines (traditional Japanese herbal treatments) for

controlling cancer patients' symptoms in Japan: a national cross-sectional survey. BMC Complement Altern Med. 2012 Nov 20; 12:222
DOI:10.1186/1472-6882-12-222.

(4)Koyama KI, Asakawa A, Nakahara T, Amitani H, Amitani M, Saito M, Taruno Y, Zoshiki T, Cheng KC, Yasuhara D, Inui A. Intelligence quotient and cognitive functions in severe restricting-type anorexia nervosa before and after weight gain. Nutrition. 2012 Nov-Dec; 28(11-12):1132-6
DOI:10.1016/j.nut.2012.03.003.

(5)Saheki T, Inoue K, Ono H, Katsura N, Yokogawa M, Yoshidumi Y, Furuie S, Kuroda E, Ushikai M, Asakawa A, Inui A, Eto K, Kadowaki T, Sinasac DS, Yamamura K, Kobayashi K. Effects of supplementation on food intake, body weight and hepatic metabolites in the citrin/mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase double-knockout mouse model of human citrin deficiency. Mol Genet Metab. 2012 Nov; 107(3):322-9
DOI:10.1016/j.ymgme.2012.07.021.Epub2012Aug2.

(6)Ataka K, Nagaishi K, Asakawa A, Inui A, Fujimiya M. Alteration of antral and proximal colonic motility induced by chronic psychological stress involves central urocortin 3 and vasopressin in rats. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2012 May; 303(4):G519-28
DOI:10.1152/ajpgi.00390.2011.Epub2012M

ay31.

(7)Ando T, Mizuno S, Ishida T, Kondo Y, Miki I, Yoshida M, Azuma T, Ishikawa T, Takagi T, Yagi N, Kokura S, Naito Y, Yoshikawa T, Asakawa A, Inui A. Plasma ghrelin isoforms and gastric ghrelin O-acyltransferase expression are influenced by Helicobacter pylori status. Nutrition. 2012 Oct; 28(10):967-72
DOI:10.1016/j.nut.2011.11.023.

(8)Haruta I, Asakawa A, Ogiso K, Amitani H, Amitani M, Tsai M, Hamada S, Inui A. A case of anorexia nervosa with disseminated intravascular coagulation syndrome. Int J Eat Disord. 2012 Apr; 45(3):453-5
DOI:10.1002/eat.20954.Epub2011Aug30.

(9)Uemoto M, Asakawa A, Takamiya S, Asakawa K, Inui A. Kobe earthquake and post-traumatic stress in school-aged children. Int J Behav Med. 2012 Sep; 19(3):243-51
DOI:10.1007/s12529-011-9184-3.

(10)Cheng KC, Li YX, Asakawa A, Ushikai M, Kato I, Sato Y, Cheng JT, Inui A. Characterization of preptin-induced insulin secretion in pancreatic β -cells. J Endocrinol. 2012 Oct; 215(1):43-9
DOI:10.1530/JOE-12-0176.Epub2012Jul11

(11) Toshiro Kibe, Michiko Kishida, Masayuki Kamino, Mikio Iijima, Lin Chen, Mika Habu, Akihiko Miyawaki, Hiroshi Hijioka, Norifumi Nakamura, Tohru

Kiyono, Shosei Kishida. Immortalization and characterization of normal oral epithelial cells without using HPV and SV40 genes. Oral Science International 8(2011)20-28
DOI:10.1016/S1348-8643(11)00009-7.

[学会発表] (計4件)

(1)Akio Inui:Herbal (Kampo) Medicine and Anorexia-Cachexia Syndrome.Neuroscience Seminar Series Garvan Institute of Medical Research.2012.12.12.Sydney.

(2)Akio Inui:Herbal (Kampo) Medicine and Anorexia-Cachexia Syndrome.Neuroscience Seminar Series Garvan Institute of Medical Research.2012.12.12.Sydney.

(3)Akio Inui:Ghrelin and Energy Homeostasis Focused on Cancer Anorexia-Cachexia Syndrome. The 9th International Symposium on Growth and Nutrition in Children with Chronic Kidney Diseases.2012.4.13.San Diego.

(4)Akio Inui:Herbal (Kampo) Medicine and Anorexia-Cachexia Syndrome.Neuroscience Seminar Series Garvan Institute of Medical Research.2012.12.12.Sydney.

Francois M, Takagi K, Tennoune N, Beutheu Youmba S, Bole-Feysot C, Cravezic A, do Rego JC, Coëffier M, Inui A, Déchelotte P, Fetissoff SO:Etude de

l'expression de la ghréline central,l'anxiété et la dépression dans un modèle d'anorexie induite par le méthotrexate chezle rat. 1er Colloque du GIR-AFDAS-TCA(groupe interdisciplinaire de recherché de l'association française pour le développement des approches spécialisées des troubles du comportement alimentaire).2012.2.9.Paris.

〔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〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上田 雅博 (UEDA MASAHIRO)

鹿児島大学・自然科学教育研究支援センター・技術職員

研究者番号：00448573

(2) 研究分担者

岸田 昭世 (KISHIDA SHOSEI)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・教授

研究者番号：50274064

飯島 幹雄 (IIJIMA MIKIO)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・助教

研究者番号：00305111

岸田 想子 (KISHIDA MICHIKO)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・助教

研究者番号：40274089

(3) 連携研究者

乾 明夫 (INUI AKIO)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・教授

研究者番号：80168418