

報告書

平成17年度 丸木記念特別奨学研究費B 研究実績報告書

アディポネクチン受容体を介する
アディポネクチンシグナル伝達機構の解明

受賞者 犬飼 浩一 (埼玉医科大学 内科学・内分泌・糖尿病部門)

緒言

脂肪組織は、発現遺伝子の約25%がホルモン、増殖因子などの分泌蛋白であり、このような脂肪組織由来の内分泌因子はアディポサイトカインと呼ばれ、肥満とメタボリックシンドロームを結びつける概念として既に確立された。その中で、アディポネクチンは、脂肪組織において最も多く発現している遺伝子産物として同定された。ほぼすべてのアディポサイトカインが肥満によってその血中濃度が上昇するが、アディポネクチンは肥満、糖尿病、動脈硬化疾患によって低下するという際立った異なる性質を持ち、抗糖尿病、抗動脈硬化作用を持つサイトカインとして注目を集めている。3年前、このアディポネクチン受容体が山内らのグループによって新たにクローニングされ、これによって細胞内情報伝達経路や生理学的役割の解明に大きく前進し、糖尿病や動脈硬化の治療面へ大きな期待が寄せられている。我々は、すでに、このアディポネクチン受容体 (AdipoR1, AdipoR2) の発現調節機構を検討するため、糖尿病モデルマウスや、培養筋肉細胞、脂肪細胞を用いて検討し、インスリンによって負の制御を、アディポネクチンによって正の制御を受けていることを解明した(原著論文1)。

目的

アディポネクチンのシグナル伝達機構は、アディポネクチン受容体がクローニングされたものの、まだ、それ以下のシグナルは全く不明である。現在までのところ、アディポネクチンの標的遺伝子として、AMPキナーゼの活性化、PPAR α の活性化、転写因子NF κ Bの転写抑制などの機能が知られているが、そこに至る経路は全く解明されていない。我々は、本研究において、アディポネクチン受容体直下のシグナル伝達経路の解明を目的とし、以下の2つの手法を用いて実験を行った。1) PMF法 (Peptide-Mass Finger print) を用い

て、アディポネクチンシグナル下流の遺伝子の増減を検討する。2) AMPKの上流に位置し、AMPKをリン酸化する働きのあるLKB1にアディポネクチンがどのような作用を及ぼすか検討する。

方法

1) アディポネクチン受容体 (AdipoR1, AdipoR2) の全長cDNAのクローニング：既に発表されたアディポネクチン受容体の塩基配列をもとに、PCR用5'端と3'端オリゴプライマーを作成し、購入されたmouse embryo cDNAライブラリーより全長アディポネクチン受容体を増幅し、TAクローニングベクターに挿入、DNA sequencerにより、遺伝子配列を確認する。アディポネクチン受容体は、筋肉などのインスリン感受性組織のほか、ubiquitousに存在するAdipoR1と、主に肝臓に発現が見られるAdipoR2の2種類のサブタイプが存在することが知られているが、これらの機能面での相違を明らかにする目的にて、2種類の受容体をクローニングする。2) アディポネクチン受容体発現ウイルスの作成：宝バイオ販売のアデノウイルス作成キット (Code6170) を用いて、アディポネクチン受容体発現ウイルスを作成する。概要としては、pAxCawtitコスミドベクター SwaIサイトにそれぞれのcDNAを挿入し、ヒト尿細管由来293細胞を宿主として細胞内における遺伝子相同組み替えにより、CAGプロモーター直下にそれぞれのcDNAを配置したアディポネクチン受容体発現ウイルスを作成する。3) PMF法を用いたアディポネクチン受容体特異的シグナルの解明：作成したアデノウイルスをマウス筋肉初代培養細胞に発現させ、購入した精製アディポネクチンを投与し、アディポネクチン受容体の発現の有無、アディポネクチン添加の有無によって、4種類の2次元電気泳動シートを作成する。アディポネクチン受容体特異的なシグナルによると思われるアディポネクチン受容体 (+)、アディポネクチン添加 (+) によってのみ増

幅される特異的遺伝子の同定を試みる。

結果

1) PMF法を用いて、アディポネクチンシグナル下流の遺伝子の増減を検討したところ、マウス骨格筋において、アディポネクチン添加により約9倍のFerritin Heavy Chain (FHC) 蛋白発現上昇を認め、この上昇は、NF κ Bの阻害薬にて消失すること、並びに、FHC遺伝子の転写はNF κ Bの転写刺激を受けていることから、アディポネクチンは、アディポネクチン受容体を通して、NF κ Bの転写を刺激し、最終的にFHC蛋白量を増幅させる働きがあることが明らかとなった。これにより、アディポネクチンによる骨格筋に対するシグナルは、最終的に酸化ストレス軽減の作用をもたらすことがわかり、現在、池上裕一大学院生が中心となって、詳細につき、さらなる検討をしている。2) まずAMPKの上流に位置し、AMPKをリン酸化する働きのあるLKB1が、アディポネクチンシグナルによって活性化されることを見出した。さらに、LKB1の変異抑制型蛋白を過剰発現させた状況化において、アディポネクチンを作用させると、アディポネクチンによるAMPK活性化が消失することから、アディポネクチンからAMPKに至る過程において、LKB1の活性化が必須であることを今井健太大学院生が証明した(原著論文2)。

結果と考察

アディポネクチンのシグナルは現在までのところ、全く解明されておらず、アディポネクチンの持つ抗動脈硬化作用や抗糖尿病作用のメカニズムについてはほとんどわかっていない。われわれは、2つの実験を

通じて、比較的アディポネクチンシグナルの上流すなわち、AMPKの上流域にLKB1という分子の活性化を介すということ、さらに下流域においては、NF κ Bのリン酸化を介してFHC蛋白量を増幅させる働きがあることが明らかとなった。特にFHCは抗酸化作用を強力に有し、抗動脈硬化作用の中心的な役割を果たしている可能性も強く、現在、さらに詳細な検討を行っている。

その他の共同研究

東北大学研究チームとの共同研究にて、マウスにPPAR γ のアデノウイルスを経静脈的に投与して肝臓に発現させると脂肪肝を引き起こすことがわかり、さらに、そのシグナルが精巣上脂肪組織に、内臓神経を介して情報が伝達され、脂肪肝を起こしにくくしていることがわかった(原著論文3)。

研究発表リスト

- 1) Inukai K, Nakashima Y, Watanabe M, Takata N, Sawa T, Kurihara S, Awata T, Katayama S, Regulation of adiponectin receptor gene expression in diabetic mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 288, E876-882, 2005.
- 2) Imai K, Inukai K, et al. LKB1, an Upstream AMPK Kinase, Regulates Glucose and Lipid Metabolism in Cultured Liver and Muscle cells. *BBRC* in press.
- 3) Uno K, Katagiri H, Inukai K, et al. Neuronal pathway from the liver modulates energy expenditure and systemic insulin sensitivity. *Science* 312(5780), 1656-1659, 2006.