

報告書

平成15年度 丸木記念特別奨学研究費 B 研究実績報告書

神経ペプチドメラニン凝集ホルモンによる摂食行動調節の分子機構

受賞者 齋藤 祐見子 (埼玉医科大学薬理学教室)

共同研究者 川村 勇樹\*

肥満は、糖尿病や高血圧、高脂血症といった内分泌代謝異常のほか、ある種の癌などを高率に引き起こす。21世紀において肥満は更に医学上の大きな問題となると考えられる。これまでいくつかのペプチド(特にニューロペプチドYやレプチン)が摂食亢進や肥満発症に関わっているとされている。しかしながら現在、最も有望な抗肥満薬のターゲットとして国際的に注目を浴びているのはメラニン凝集ホルモン(melanin-concentrating hormone: MCH)である。MCHは当初サケ脳下垂体から見出された神経ペプチドであり<sup>1)</sup>、哺乳類ではMCHは視床下部外側野に著しく局在し、MCH陽性ニューロンは脳内に非常に広範囲にわたって投射する<sup>2)</sup>。1998年、MCH欠損マウスが作成され、摂食量が低下し体重も減少することが報告された<sup>3)</sup>。ノックアウトの結果、ヤセの形質が出現するのは世界初の例である。この決定的事実から、MCHは摂食行動の下流に存在する特に重要な“食欲誘起ホルモン”であることが明らかとなった。その受容体は長い間不明だったが、私はGタンパク質キメラを用いた新規アッセイ法を開発することでMCHの受容体がオーファン(孤児)Gタンパク質共役型受容体(GPCR)のひとつ、SLC-1(後にMCH1Rと改名)であることを同定した<sup>4,5)</sup>。その後、MCH1RのサブタイプMCH2Rが報告されたが<sup>6)</sup>、ノックアウトマウス作成<sup>7)</sup>やアンタゴニスト開発<sup>8,9)</sup>によりMCH1Rは摂食において非常に重要な役割を果たすことが明らかとなっている。そこで本研究は、摂食制御分子、MCH受容体の脳内情報伝達分子としての機能を詳細に解析することを目的とした。MCH1RのAsp<sup>123</sup>がMCHとの結合に決定的に関与していることは既に知られている。しかし受容体各機能の各ステップにどの部分のどのアミノ酸残基が深く関与しているか知ることは肥満治療薬創薬にとって貴重な情報であるにも関わらず、以前不明のままである。そこで一連の受容体変異体を作成し、HEK293T細胞へそれぞれの変異体プラスミドの遺伝

子導入(トランスフェクション)を行った。導入してから48時間後にリガンドとの結合(radioligand binding assay)・細胞膜への輸送・細胞情報伝達系(calcium influx・サイクリックAMP抑制・MAPキナーゼ活性化)についてアッセイ系を確立し、解析を行った。まず、7種の変異体作成によりN末端Asn<sup>23</sup>におけるN-linked glycosylationが受容体の細胞内輸送にとって必須であることを明らかにした<sup>10)</sup>(図1)。次にMCH1Rの細胞内C末端における19種類の変異体を作成し、様々な受容体機能解析を行った。その結果、C末端に存在する2つの塩基性アミノ酸(Arg<sup>319</sup>, Lys<sup>320</sup>)の持つポジティブチャージがMCHを介するcalcium influxにおいて特に重要な役割を果たすことを見出した(図1)。バイオフィーマティクス解析により、細胞内C末端における

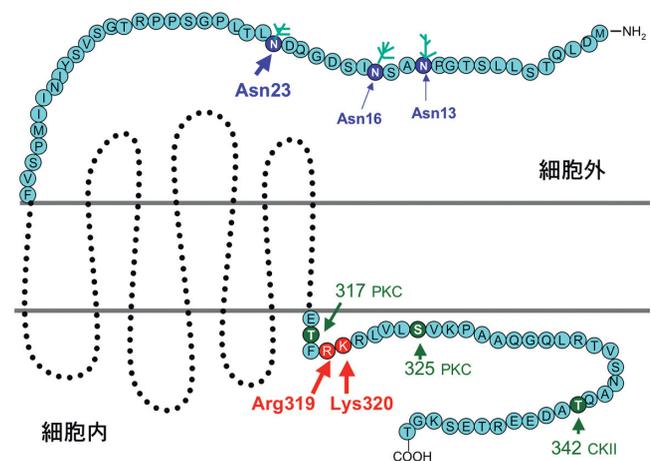


図1. メラニン凝集ホルモン受容体1(MCH1R)のN末端、C末端における構造活性相関<sup>10-12)</sup>。様々なMCH1R変異体を作成し、HEK293T細胞に遺伝子導入を行った。そして発現タンパク質量・受容体局在・細胞膜表面発現量・リガンド結合実験・受容体internalization・リガンドによる細胞情報伝達系活性化を解析した。その結果、Asn23, Arg319, Lys320, Thr317, Ser325の受容体機能における重要性が判明した。特にバイオフィーマティクスの活用によりArg319, Lys320は多くのGPCRのC末端で保存されているdibasic motifであることを明らかにした<sup>11)</sup>。

\*埼玉医科大学薬理学教室 (現)埼玉医科大学医学教育センター

この2つの塩基性アミノ酸残基の位置は多くのGPCRにおいて非常に高度に保存されていることも明らかにし, GPCRにおける新しいモチーフを提唱した<sup>11)</sup>. 更に, フローサイトメトリーを活用したアッセイ系を確立し, MCHR internalizationの定量的解析を初めて可能にした<sup>12)</sup>. その結果, ①MCH1R internalizationはリガンド添加直後から開始し, 30分以内にピークに達する ②internalizationには $\beta$ -arrestin 2, protein kinase C (PKC), dynamin Iが関与する ③細胞内C末端に存在する2つのアミノ酸 (Thr<sup>317</sup>, Ser<sup>325</sup>) がPKCによるリン酸化部位と考えられ, 受容体internalizationに関与する(図 1), 以上3点を明確にした. また, MCH1Rはペプチド受容体としては珍しく脳内全体に広く分布している<sup>13)</sup>. そこでyeast-two-hybrid法により, マウス脳部由来cDNAライブラリーを材料としてMCH1Rに結合する分子のスクリーニングを行った. いくつかの有力な既知・新規の候補分子を得て, そのうちの1つは脳線条体に高発現することが確認できた. 現在, 哺乳類細胞に候補遺伝子を導入して, 細胞内においてMCH1Rと結合するかどうか免疫沈降法などを利用して解析中である. 今後はMCH1Rを内在性に高発現する細胞株<sup>14)</sup>を活用して受容体結合する機能分子を1つ1つ解明し, 脳における摂食調節機構の包括的理解を目指す.

## 謝 辞

本研究の進展は丸山敬教授, 手塚満恵実験助手により支えられている. ここに記して深く感謝する.

## 参考文献

1. Kawauchi H. et al. (1983) Nature 305: 321-323.
2. Bittencourt JC. et al. (1992) J Com Neurology 319: 218-245.
3. Shimada M. et al. (1998) Nature 396:670-674.
4. Saito Y. et al. (1999) Nature 400: 265-269.
5. Saito Y. et al. (2000) Trend Endocri Metab 11: 299-303.
6. Hill J. et al. (2001) J Biol Chem 276: 20125-20129.
7. Marsh DJ. et al. (2002) Endocrinology 143: 2469-2477.
8. Takekawa S. et al. (2002) Eur J Pharmacol 438: 129-135.
9. Borowsky B. et al. (2002) Nat Med 8:825-830.
10. Saito Y. et al. (2003) FEBS Lett. 533, 29-34.
11. Tetsuka M. et al. (2004) Endocrinology in press
12. Saito Y. et al. (2004) Peptides in press
13. Saito Y. et al. (2001) J Comp Neurology 435: 26-40.
14. Saito Y. et al. (2001) Biochem Biophys Res Commun 289: 44-50.