



Title	Identification of Amino-Terminal Region of Adiponectin as a Physiologically Functional Domain
Author(s)	氏家, 秀敏
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46150
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	比 塚 秀 敏
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 20108 号
学位授与年月日	平成 18 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科分子病態医学専攻
学位論文名	Identification of Amino-Terminal Region of Adiponectin as a Physiologically Functional Domain (アディポネクチンの生理的機能部位の同定)
論文審査委員	(主査) 教授 金倉 謙 (副査) 教授 下村伊一郎 教授 宮崎 純一

論 文 内 容 の 要 旨

〔目的〕

アディポネクチン (APN) 分子は N 端の non-homology region とそれに続く collagen 様ドメインおよび C 端の globular ドメインから構成され、構造上 soluble defense collagen family に属している。APN は、様々な生理活性を有し、動脈硬化や糖尿病発症の抑制および炎症反応の制御など生体内で重要な役割を果たすことが知られている。しかし、APN 受容体の同定や APN 多量体構造の解析など新しい知見にも拘わらず、APN 作用機序の詳細は未だ明らかでない。抗ヒト APN 抗体 (ANOC 9103、ANOC 9104) は、Cox-2 遺伝子発現誘導やマクロファージ食能抑制など主に APN による抗炎症作用を阻害することが知られている。本研究では、APN の抗炎症作用に関わる活性部位を決定することを目的として、種々の APN deletion 変異蛋白との結合をもとに ANOC 9103、ANOC 9104 の抗体認識部位の解析を行なった。さらに、APN 活性部位としての同定した抗体認識部位の役割を検討した。

〔方法ならびに成績〕

1. 作製した種々の APN deletion 変異蛋白に対する、抗ヒト APN 抗体 (ANOC 9103、ANOC 9104) の結合を Western blot で解析した。ANOC 9103 は APN 47-53 番のアミノ酸配列を、ANOC 9104 は APN 17-25 番のアミノ酸配列を含む APN deletion 変異蛋白とのみ結合した。さらに、APN 17-25 あるいは APN 47-53 のアミノ酸配列を含む合成ペプチド [Fragment-1 (APN 17-41)、Fragment-2 (APN 35-59)] を作製し、各合成ペプチドを固相化した ELISA 法にて ANOC 9103 と ANOC 9104 の結合を解析した。Fragment-1 は ANOC 9104 とのみ結合し、Fragment-2 は ANOC 9103 とのみ結合した。以上より、ANOC 9103 は APN 47-53 (collagen 様ドメイン開始部位) を、ANOC 9104 は APN 17-25 (non-homology region) を特異的に認識することが明らかとなった。ANOC 9103 と ANOC 9104 のエピトープは、互いに近傍に位置し、APN の N 端領域に存在していた。
2. FITC 標識した Fragment-1 と Fragment-2 の種々の細胞への結合を flow cytometry にて検討した。Fragment-1 はストローマ細胞株 MS-5 や単球性白血病細胞株 THP-1 など限られた細胞に対し結合能を示したが、Fragment-2 は幅広い種類の細胞に対して結合能を示した。以上より、Fragment-1 と Fragment-2 では、認識する細胞および結合

様式が異なると考えられた。

3. MS-5 細胞を APN で刺激すると Cox-2 遺伝子発現誘導が認められる。Fragment-1 あるいは Fragment-2 存在下で MS-5 細胞株を APN で刺激した後に、Cox-2 遺伝子発現を Real-time PCR にて、培養上清中の PGE₂ 濃度を ELISA にて解析した。Fragment-1 のみが、APN による Cox-2 遺伝子発現誘導および PGE₂ 産生誘導を有意に阻害した。以上より、Fragment-1 に対応する APN の N 端領域 (non-homology region) が、APN の Cox-2 遺伝子発現誘導作用に重要であることが明らかとなった。

4. N 端領域を欠損する変異蛋白あるいは APN 全長を発現するアデノウイルスを作製した。APN 欠損マウスにこれらアデノウイルスを感染させ、この変異蛋白の生体内作用を検討した。LPS 注射後に認められる血清 TNF- α の上昇を、N 端欠損変異 APN は全長 APN と比較して同等の抑制作用を示した。しかし、コラーゲン刺激後血小板凝集やコリン欠乏食負荷脂肪肝発症に関し、全長 APN 発現マウスでは著明に抑性されていたのに対し、N 端欠損変異 APN 発現マウスではこれらの抑制作用が有意に減弱していた。以上より、APN の生体内作用の一部で、APN の N 端領域が重要であることが明らかとなった。

[総括]

新たな APN 生理活性部位として、N 端領域の重要性を明らかにした。

論文審査の結果の要旨

アディポネクチン (APN) は、抗糖尿病、抗動脈硬化、抗炎症作用を持つ分泌蛋白である。抗ヒト APN 抗体 (ANOC 9103、ANOC 9104) は Cox-2 遺伝子の誘導等の APN の作用を阻害し、重要な APN 機能部位を認識すると考えられている。本研究では、(1)ANOC 9103、ANOC 9104 が APN の N 端領域を認識すること (2)これら抗体の認識部位に一致する合成ペプチドが種々の細胞株と結合し、APN による Cox-2 遺伝子の誘導を阻害すること (3)APN の N 端領域を欠損する変異蛋白ではコラーゲン刺激後の血小板凝集反応やコリン欠乏食による脂肪肝発症に対する APN の抑制作用が減弱していることを明らかにした。これまでに、APN 受容体 AdipoR1 や AdipoR2 との結合部位として APN の C 端領域の重要性が示されているが、他の領域の生理的意義は不明であった。本研究により、APN の N 端領域が新たな生理活性部位として同定された。本研究は、N 端領域を認識する未知の APN 受容体が存在する可能性を含め APN 作用機序解明に多大な貢献が期待でき、学位に値すると思われる。