Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-05

Dynorphin binds to neuropeptide Y and peptide YY receptors in human neuroblastoma cell lines

三浦，正樹

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
1996-02-14
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
乙1995
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2001995

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

氏名・(本籍)　三浦正樹　(兵庫県)

博士の専攻分野の名称　博士(医学)

学位記番号　博ろ第1497号

学位授与の要件　学位規則第4条第2項該当

学位授与の日付　平成8年2月14日

学位論文題目　Dynorphin binds to neuropeptideY and peptideYY receptors on human neuroblastoma cell lines

(ヒト神経芽細胞種由来細胞株を用いたニューロペプチドY及びペプチドYY受容体に対する神経ペプチドの相互作用についての検討

審査委員　主査　教授　春日雅人

教授　片岡　徹　教授　千原和夫

論文内容の要旨

1．緒言

Neuropeptide Y(NPY)は脳や末梢神経に分布し，PeptideYY(PYY)は脳や腸管に分布するペプタイドであり，その構造的類似性からPancreatic Polypeptide(PP)と共にPP-familypeptideと称されている。またNPYとPYYの受容体は哺乳類の脳，末梢組織や神経提由来の腫瘍細胞系に存在し現在のところ，Y_1，Y_2，Y_3の3つの受容体の存在が知られている。

近年，NPYが同じ標的細胞において別のホルモンの受容体への結合を調節する可能性を示唆する報告が増加している。そこで，本研究では，NPY及びPYYの受容体結合に対する神経ペプチドの影響を検討した。

2．材料及び方法

1）膜標品の作成

Y_1及びY_2受容体を有する2種類のヒト神経芽細胞種由来の培養細胞系(SK-N-MC,SMS-MSN)を使用した。培養後の細胞をCa^{2+}，Mg^{2+}-free phosphate-buffered salineによりculture flaskより遊離させ，細胞浮遊液として回収した。細胞は50mMヘペス塩酸バッファーで洗浄後，超音波破砕を行った。次に700 gで10分間冷却遠心後，その上清を10^5 gで20分間超遠心し，沈殿を50mMヘペス塩酸バッファーに懸濁後，再度10^5 gで20分間超遠心した。沈殿を再度懸濁後，実験に使用した。膜標品の蛋白量測定はBiorad社のキットを用い，IgGを標準とした比色法で行った。

2）標識リガンドの作成

Iodogenを用いてラベルしたNPY及びPYYをHPLCで分離し，N端側のtyrosineがラベルされたmonoiodinated peptideをリガンドに用いた。

3）結合実験

結合反応は，膜標品蛋白量100 μg／mlにdynorphinA及びそのflagment，U-50488(-)，α-neoendorphin，CRF，CCK-8，LH-RHを加え，標識NPY／PYY5pM，25℃，1.5または3時間の反

応条件下で行い，B／F分離は遠心法によった。GTPの非水解性アナログであるGTP$_{\gamma S}$やCキナーゼ，Aキナーゼの抑制剤であるH-7，H-8の関与についても同様の方法で検討した。さらにScatchard解析を行うためにDynorphinAの存在，非存在下でNPY／PYYを10^{-12}〜10^{-6}M添加して結合実験を行った。また標識NPY／PYYの受容体からの解離に及ぼすDynorphinAの影響を検討するため，膜標品と標識NPY／PYYを反応後，DynorphinAの存在，非存在下で1 μMのNPY／PYYを加え解離実験を行った。

4）細胞内cyclicAMP含量の測定

培養72時間後のSK-N-MC細胞を1mMIBMXを含む0.5mlのphosphate-buffered saline(PBS)で洗浄後，同じ溶液で37℃，20分インキュベートした。反応は0.25mlの培養液を10 μMのforskolinを含むfresh PBS-IBMXと各種濃度の神経ペプチドに置換し，37℃で開始した。6分後に0.2NHClを加えて反応を停止させた。cyclic AMP含量はヤマサcyclic AMP assay kit（ヤマサ醤油）を用いて測定した。

3．結果

1）各種神経ペプチド及びそのflagmentのNPY／PYY結合に及ぼす効果

SMS-MSN(Y_2)では10^{-5}〜10^{-6}MのDynorphinA及びCRFの前処置により標識NPY／PYY結合の抑制が認められ，SK-N-MC(Y_1)では10^{-5}〜10^{-6}MのDynorphinAとLH-RHにより結合の抑制が認められた。

α-neoendorphinもまた両細胞において結合の抑制を認めた。Dynorphin$_{1-13}$はSK-N-MCにおいて強い結合の抑制を示したが，Dynorphin$_{1-8}$Dynorphin$_{1-10}$Dynorphin$_{13-17}$は10^{-5}Mまで影響を及ぼさなかった。

2）DynorphinAによるNPY／PYY結合能抑制に及ぼすGTP$_{\gamma S}$とH-7，H-8の効果

DynorphinAがG蛋白質あるいは受容体のリン酸化を介してNPY／PYY結合能を抑制するかどうかを検討した。DynorphinAは10^{-5}MのGTP$_{\gamma S}$存在下においても結合を一部抑制した。またCキナーゼ，Aキナーゼの特異的な抑制剤であるH-7及びH-8を10^{-3}Mまで用いても，DynorphinAはNPY／PYY結合を抑制した。

3）NPY／PYYの受容体からの解離に及ぼすDynorphinAの効果

アロステリック効果を検討するため，標識NPY／PYYの受容体からの解離速度にDynorphinAが影響を及ぼすかどうかを検討した。DynorphinAはSK-N-MC及びSMS-MSN両細胞膜受容体からリガンドの解離速度に影響を及ぼさなかった。

4）SK-N-MCにおけるＰＹＹ結合とｃＡＭＰ反応に及ぼすU-50488(-)とDynorphinAの効果

最も強力なオピオイドのκ受容体アゴニストであるU-50488(-)のＰＹＹ結合に及ぼす効果と，DynorphinAのホルスコリン刺激によるｃＡＭＰ反応に及ぼす効果をSK-N-MCを用いて検討した。同じκ受容体アゴニストであるDynorphinAとは対照的に，U-50488(-)はＰＹＹ結合を10^{-4}Mまで抑制しなかった。DynorphinAはホルスコリンによるｃＡＭＰ反応を抑制せず，反対にＮＰＹは濃度依存的にｃＡＭＰ反応を抑制した。またDynorphinAは特に高濃度において，ＮＰＹによるｃＡＭＰ反応の抑制を阻害した。

5）Scatchard解析

Scatchard解析にてDynorphinAはNPY／PYYの高親和性部位の受容体数を変化させる事なく，NPY／PYY結合の親和性を減少させることが判明した。

4．考察

本研究により，DynorphinA,CRF,LH-RHがY_1及びY_2受容体の存在するSK-N-MC及びSMS-MSN細胞膜でのNPY／PYY結合を，濃度依存的に抑制する事が明らかとなった。特にDynorphinAは両細胞膜での結合を高濃度で強力に抑制した。この事から，DynorphinAのような他のペプチドがNPY及びPYYの受容体結合を調節する可能性が示唆された。そこでDynorphinAがどのような機序で受容体結合を調節するか検討を行った。まず最初に，κ受容体に親和性のあるDynorphinAのflagmentやα-neoendorphinにおいても一部結合の抑制が認められた事から，DynorphinAがκ受容体を介して結合に影響を及ぼす可能性を考えた。そこでκ受容体と結合する事によって，NPY／PYY受容体の細胞内情報伝達系，特にG蛋白質と受容体のリン酸化に影響を及ぼすかどうかを検討した。しかし，GTPアナログである$GTP_{\gamma S}$及びCキナーゼとAキナーゼの抑制剤であるH-7，H-8を用いてもDynorphinAはNPY／PYY結合を抑制した事から，その関与は否定された。次にDynorphinAがアロステリックな機序によってNPY／PYYの受容体結合の親和性を調整する可能性を検討した。もしアロステリックな機序によってDynorphinAがNPY／PYY結合を抑制するならば，受容体からのリガンドの解離に変化が起こるはずである。しかしながら，DynorphinAの投与によってもNPY／PYYの解離速度に変化はなく，アロステリック効果の関与は認められなかった。そこで次にDynorphinAが高濃度でNPY／PYY受容体に直接結合する可能性を検討した。そのために，非ペプチド性のκ受容体アゴニストであるU-50488(-)を用いて結合実験を行ったが，NPY／PYY結合の抑制は認められなかった。以上より，DynorphinAはκ受容体を介してではなく，直接NPY／PYY受容体を介して影響を及ぼす可能性が強く示唆された。またDynorphinAはホルスコリン刺激によるｃＡＭＰ反応を抑制せず，これはκオピオイド受容体が抑制性ＧＴＰ結合蛋白質とカップルしているというこれまでの報告と対照的であり，この結果からも上記可能性が示唆される。

現在のところ生体内におけるNPY／PYYとDynorphinの相互作用のもつ意義については明らかではない。しかし末梢神経や中枢神経でDynorphinとＮＰＹが共存するという報告は認められている。今回NPY／PYY結合を抑制するのに高濃度のDynorphinを必要としたが，交感神経終末ではＮＰＹは１μＭまで達すると推測されており，高濃度のDynorphinがＮＰＹとの共存部位でＮＰＹ受容体に作用し，血管系や神経系においてＮＰＹと拮抗的に作用する可能性が与えられる。またＮＰＹとDynorphinは脳内で摂食行動に関与しており，これらの相互作用も推測される。またCRFやLH-RHもNPY／PYY結合を抑制した事から，ゴナドトロピンやＡＣＴＨ分泌においてＮＰＹとLH-RHやCRFが相互作用を示す可能性も存在すると思われ，これらの相互作用の一部がreceptor levelで説明できる可能性がある。

5．まとめ

１）DynorphinA，CRF，LHRHは，NPY／PYYのY_1及びY_2受容体の存在するSK-N-MC及びSMS-MSN細胞膜に対するNPY／PYY結合を抑制した。特に両細胞膜において，高濃度のDynorphinAはNPY／PYY結合を強力に抑制した。

２）DynorphinAはNPY／PYYの受容体部位に直接作用する可能性が考えられた。

３）以上より，これらの神経ペプチドがNPYやPYYの受容体結合を修飾することによって，NPY／PYYの摂食促進作用やホルモン分泌作用を調節する可能性が考えられた。

論文審査の結果の要旨

Neuropeptide Y(NPY)は脳や末梢神経に分布し，PeptideYY(PYY)は脳や腸管に分布するペプタイドであり，その構造的類似性からPancreatic Polypeptide(PP)と共にPP-familypeptideと称されている。またNPYとPYYの受容体は哺乳類の脳，末梢組織や神経提由来の腫瘍細胞系に存在し，現在のところ，Y_1，Y_2，Y_3の３つの受容体の存在が知られている。近年，NPYが同じ標的細胞において別のホルモンの受容体への結合を調節する可能性を示唆する報告が増加している。そこで，本研究では，NPY及びPYYの受容体結合に対する神経ペプチドの影響を検討した。

この実験結果より，DynorphinA，CRF，LH-RHGがY_1及びY_2受容体の存在するSK-N-MC及びSMS-MSN細胞膜でのNPY／PYY結合を，濃度依存的に抑制する事が明らかとなった。特にDynorphinAは両細胞膜での結合を高濃度で強力に抑制した。そこでDynorphinAがどのような機序で受容体結合を抑制するか検討を行った。まず最初に，DynorphinAがκ受容体と結合する事によって，NPY／PYY受容体の細胞内情報伝達系，特にG蛋白質と受容体のリン酸化に影響を及ぼすかどうかを検討した。しかし，GTPアナログである$GTP_{\gamma S}$およびCキナーゼとAキナーゼの抑制剤であるH-7，H-8を用いてもNPY／PYYを抑制したので，その関与は否定された。次にDynorphinAがアロステリックな機序によってNPY／PYYの受容体結合の親和性を調節する可能性をNPY／PYYの受容体からの解離速度によって検討した。しかし解離速度に変化はなく，その関与は否定された。そこで次にDynorphinAがNPY／PYY受容体に直接結合する可能性を検討した。そのために，非ペプチド性のκ受容体アゴニストであるU-50488を用いて結合実験を行ったが，NPY／PYY結合の抑制は認められなかった。またDynorphinAはNPYによるｃＡＭＰ反応の抑制を阻害した。以上より，DynorphinAはκ受容体を介してではなく，直接NPY／PYY受容体を介して影響を及ぼす可能性が強く示唆された。

現在のところ生体内におけるNPY／PYYとDynorphinAの相互作用のもつ意義については明らかではない。しかし末梢神経や中枢神経でDynorphinとNPYが共存するという報告もあり，これらの事実からDynorphinがNPYとの共存部位でNPY受容体に作用し，血管系や神経系においてNPYと拮抗的に作用する可能性も考えられる。

本研究はDynorphinA，CRF，CCK，LH-RHがNPY／PYY受容体に及ぼす影響を検討し，特にDynorphinAについてはその作用機序を研究したものであるが，従来ほとんど行われていなかったNPYと別の神経ペプチドとの相互作用について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって，本研究者は，医学博士の学位を得る資格があると認める。