

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：15301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06419

研究課題名（和文）下垂体隆起部におけるニューロメジンU発現の日内リズム形成メカニズムの解明

研究課題名（英文）The mechanism of circadian expression of neuromedin U in the pars tuberalis.

研究代表者

相澤 清香（AIZAWA, SAYAKA）

岡山大学・自然科学研究科・特別契約職員（助教）

研究者番号：90754375

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,500,000円

研究成果の概要（和文）：ラットの隆起部で発現するニューロメジンU（NMU）の発現制御機構の解明を行った。ラット隆起部ではメラトニン受容体MT1aとアデノシン受容体A2bが高発現していることが定量PCRにより示された。ラット脳スライス培養実験系において、隆起部NMU mRNA発現はメラトニンによって有意に抑制され、アデノシンによって有意に促進された。アデノシンとメラトニンが拮抗的に作用することで隆起部NMUの日内リズム発現が形成されていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The regulatory mechanism of the expression of neuromedin U (NMU) in the rat pars tuberalis. Quantitative PCR showed that melatonin receptor MT1a and adenosine receptor A2b are highly expressed in the rat pars tuberalis. In rat brain slice culture experiment, NMU mRNA expression was significantly suppressed by melatonin and significantly increased by adenosine. It is suggested that diurnal rhythm expression of NMU in the rat pars tuberalis is antagonistically regulated by adenosine and melatonin.

研究分野：内分泌学

キーワード：下垂体隆起部 概日時計 生物リズム

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の下垂体は、神経性下垂体の後葉と腺性下垂体の前葉、中葉、そして隆起部から構成される。隆起部は、下垂体前葉が口吻側へ伸び、正中隆起の下を覆うようにして形成された薄い細胞層である。隆起部は主に甲状腺刺激ホルモン産生細胞、性腺刺激ホルモン産生細胞および濾胞星状細胞から構成された内分泌器官である。これまでの研究により、隆起部ではメラトニン受容体が高発現し、生物時計を作り出す時計遺伝子の発現に日内リズムが認められることが明らかとなっている。そのため隆起部は、外部光環境の変化を受けて、日周的、季節的なメッセージを内分泌系に伝える重要な役割をもつと考えられ注目を集めている組織である。しかしながら隆起部は、その解剖学的位置や微小さから採取が難しく、また他の部位に影響を与えずに摘除することは困難であるためほとんど研究が進んでおらず、生理的機能には不明な点が多く残されている。

ラットの隆起部ではニューロメジン U (NMU) が高発現している。NMU はブタ脊髄より同定されたペプチドホルモンであり、その発現が腸管でもみられる脳腸ホルモンである。遺伝子改変動物を用いた検討において、NMU ノックアウトマウスは過食で肥満、NMU トランスジェニックマウスは食欲減少と痩せを示すことから、NMU は摂食行動やエネルギー代謝に重要な役割を持つと考えられている。さらにラットへの NMU の脳室内投与により、摂食量が減少し、運動量が増加することも報告されている。しかしながら脳内のどの領域でつくられる NMU がこれら摂食制御や代謝制御をもたらしているのかは明らかになっていない。ラット脳内においては、隆起部における NMU は他の部位に比べて非常に高いため、隆起部 NMU が重要な役割を担っていることが示唆される。興味深いことに、隆起部における NMU mRNA 発現は明期に高く、暗期に低くな

る日内変動を示す。さらに、ラットへのメラトニンの慢性投与によって、隆起部 NMU mRNA 発現は著しく減少することも示されている。隆起部 NMU の生理的役割の解明には、隆起部 NMU 発現の制御メカニズム、特に促進的な制御機構を同定する必要があると考えられる。

2. 研究の目的

隆起部 NMU 発現の日内リズム形成メカニズムの解明を目的に、ラットを用いて細胞外シグナル分子の同定と細胞内シグナル伝達経路を検討し、以下の点を明らかにする。

(1) 隆起部 NMU 発現制御に関わる細胞外シグナル因子の同定

(2) 隆起部 NMU の細胞内における転写調節因子の同定とプロモーター解析

3. 研究の方法

(1) 隆起部 NMU 発現制御に関わる細胞外シグナル因子の同定

ラット隆起部におけるメラトニン受容体 MT1 とアデノシン受容体 A2b の発現を定量 PCR にて検討した。その後、脳スライス培養法を用いた解析をした。ラット脳を採取し、マイクロライサーで 400 μ m の隆起部部分を含む脳スライスを作成した。得られた脳スライスを培養し、メラトニンおよびアデノシンの隆起部 NMU 発現に対する影響を検討した。

(2) 隆起部 NMU の細胞内における転写調節因子の同定とプロモーター解析

ラット NMU 配列 (GenBank No. NM_022239) の 5' 上流領域をクローニングし、pGL3 Luciferase Reporter Vector に組込んだ。アデノシンの作用を検討するためにアデノシン受容体 A2b の発現コンストラクトも作成した。細胞株にそれぞれのコンストラクトを導入し、アデノシンアゴニストを作用させ、Dual-Luciferase reporter assay によりプロモーター活性の評価を行った。

4. 研究成果

(1) 隆起部 NMU 発現制御に関わる細胞外シグナル因子の同定

ラット隆起部は微小な組織であるため、レーザーマイクロダイセクションにより隆起部を採取し、cDNA サンプルを調整した。この cDNA を用いて定量 PCR を行ったところ、ラット隆起部ではメラトニン受容体 MT1a だけではなく、アデノシン受容体のうちサブタイプ A2b が高発現していた。マイクロスライサーを用いて作成したラット脳スライスの培養実験系において、隆起部にメラトニンを作用させると、NMU mRNA レベルは有意に減少していた。一方で、アデノシン受容体アンタゴニストを作用させると、NMU mRNA 発現レベルは有意に増加した。本結果より、隆起部 NMU 発現制御に関わる細胞外シグナル因子として、メラトニンとアデノシンを同定することができた。ラット隆起部における NMU mRNA 発現には明期に高く暗期に低くなる日内リズムが見られる。本研究において同定されたアデノシンとメラトニンが拮抗的に隆起部に作用することで、NMU mRNA 発現の日内リズムが形成されていることが示唆された。

(2) 隆起部 NMU の細胞内における転写調節因子の同定とプロモーター解析

隆起部 NMU mRNA 発現の制御メカニズムの細胞内シグナル系を解析するために、隆起部 NMU 発現の転写制御因子の同定を *in vitro* 実験系で行った。データベース上に登録されているラット NMU 5' UTR 領域は、転写開始点を含む第一エクソンのみからなっており、その上流がプロモーター領域と考えられた。ラット NMU 遺伝子の転写開始点より上流 1000bp をクローニングし、pGL3 Luciferase Reporter Vector を作成した。作成したアデノシン受容体 A2b 安定発現株に NMU 上流-1000bp 域を含む pGL3 Luciferase Reporter Vector をトランスフェクションしアデノシン受容体アゴニストを作用させると有意な転写活性の促進が見られた。さらに、上流 200bp 領域を含む pGL3 Luciferase Reporter Vector を作成

し、同様に解析を行ったところ、同レベルの転写活性促進能が見られた。NMU 5' 上流-200bp 領域を解析すると、cAMP 応答配列 (CRE) が多く存在することがわかった。アデノシン受容体 A2b は Gs タンパク質共役受容体であるため、アデノシンは細胞内 cAMP を増加させ、cAMP 応答配列結合タンパク質をリン酸化し、NMU 5' 上流-200 領域に存在する CRE に結合し、転写を促進していると考えられた。本研究において隆起部 NMU の転写制御機構が明らかになった。NMU は隆起部だけでなく、消化管でも発現しているが、いずれの部位においても転写制御機構についての報告はない。本研究成果は NMU 発現制御機構に関する初めての報告となり基礎生物学的意義が高い。

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 1 件)

1. 相澤清香、脳下垂体隆起部の新たな生理機能の探索. 比較内分泌学. Vol.43, No.161(2017 年 5 月号)(査読なし)

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 相澤清香, 顧婷婷, 坂井田初季, 坂田一郎, 坂井貴文, 御輿真穂, 竹内栄, 高橋純夫. ラット下垂体隆起部におけるニューロメジン U の発現解析. 第 41 回日本比較内分泌学会大会. 2016 年 12 月 10 日. 北里大学 (神奈川・相模原)
2. 相澤清香. 脳下垂体隆起部の新たな生理機能の探索. 第 41 回日本比較内分泌学会大会. 2016 年 12 月 9 日. 北里大学 (神奈川・相模原) (依頼講演)
3. 相澤清香, 坂井田初季, 坂田一郎, 坂井貴文, 御輿真穂, 竹内栄, 高橋純夫. ラット脳下垂体隆起部の新規生理機能の探索. 第 71 回岡山実験動物研究会例会. 2016 年 6 月 25 日. 就実大学 (岡山県岡山市)

4. AIZAWA SAYAKA. Secretory pathway of thyroid stimulating hormone from the pars tuberalis. 第40回日本比較内分泌学会・第37回日本比較生理生化学会合同大会. 2015年12月12日. アステールプラザ(広島県広島市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

相澤 清香 (AIZAWA SAYAKA)

岡山大学・大学院自然科学研究科・助教

研究者番号：90754375