

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：15401

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2016～2019

課題番号：15KK0259

研究課題名（和文）視床下部で発見した分泌タンパク質の生理的意義と作用機序の解明（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）Study on physiological significance and mechanisms of a novel hypothalamic secretory protein(Fostering Joint International Research)

研究代表者

浮穴 和義 (Ukena, Kazuyoshi)

広島大学・統合生命科学研究科（総）・教授

研究者番号：10304370

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 12,000,000円

渡航期間： 7ヶ月

研究成果の概要（和文）：我々は、鳥類の視床下部から分泌性小タンパク質NPGLをコードする新規遺伝子を見出している。本研究では、哺乳類のマウスとラットを用い、NPGLの生理機能を解明する研究を行った。まず、マウスを用いてNPGLを脳室内投与した結果、摂食行動が亢進した。次に、ラットを用いてNPGLの脳室内慢性投与や前駆体遺伝子の過剰発現を行ったところ、NPGLは摂食行動や脂肪組織重量の増加を引き起こすことが分かった。この脂肪蓄積の原因は、白色脂肪組織でのde novo脂肪合成であることを見出した。また、NPGL発現が絶食や血中インスリンレベルの低下により高まることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は、他の研究グループが発見した既知の脳因子に関する研究ではなく、自らが発見した新規の脳因子NPGLに関する研究を推進し、極めて学術的独自性と創造性が高い成果を得ることができた。本来、脂肪蓄積は飢餓に備えた自己防御機構の一つである。脂肪組織でのde novo脂肪合成は糖代謝の改善等の報告が最近なされ始めており、NPGLによる脂肪組織のde novo脂肪合成制御は、我々ヒトの生活習慣病改善に役立つ可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We recently identified a novel cDNA encoding a small secretory protein of 80 amino acid residues, termed neurosecretory protein GL (NPGL), from the chicken hypothalamus.

Homologs of NPGL have been reported to be present in mammals. In this study, we investigated the function of NPGL in mice and rats. We found that NPGL mRNA is robustly expressed in the lateroposterior part of the arcuate nucleus in the hypothalamus. NPGL-immunoreactive fibers were observed in close anatomical contact with POMC neurons in the arcuate nucleus. Furthermore, NPGL increased food intake in mice. We also found that NPGL increased food intake and the mass of white adipose tissue (WAT) in rats. NPGL induced carbohydrate intake. NPGL mRNA expression was upregulated by fasting and low insulin levels. These results point to NPGL as a novel neuronal regulator that drives food intake and fat accumulation through de novo lipogenesis and acts to maintain a steady-state fat level in rodents.

研究分野：神経代謝調節学

キーワード：視床下部 分泌性小タンパク質 摂食行動 脂肪蓄積 de novo脂肪合成

1. 研究開始当初の背景

我々は、視床下部に特異的に発現している神経ペプチドの前駆体遺伝子を探索した結果、80アミノ酸残基からなる分泌性の小タンパク質をコードする新規遺伝子を発見した[1]。本小タンパク質をC末端部分の配列から、Neurosecretory protein GL (NPGL)と命名した。鳥類ニワトリを用いた解析から、本NPGL遺伝子の発現細胞の局在部位は視床下部漏斗部内に局限していることを見出した。さらに、ゲノムデータベース解析の結果、本遺伝子のホモログ遺伝子は脊椎動物に保存されていることも明らかにしている。ラットを用いた解析から、飢餓状態、肥満状態、糖尿病状態において、本NPGL遺伝子の発現が変化することも見出しており、NPGLがエネルギー代謝調節に関与することが示唆されている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、新規分泌性小タンパク質であるNPGLの生理機能を解明することである。動物種は、哺乳類のマウスとラットを用いた。

まず、先行研究により確立されたNPGLの合成ペプチドを用い[2]、抗体を作製し、免疫組織化学的解析を行った。さらに、mRNA発現部位を解析するためにin situハイブリダイゼーション法を用いた解析を行った。

次に、合成NPGLを用い、脳室内単回及び慢性投与を行い、生じる生理作用の解析を行った。さらにラットにおいて、前駆体遺伝子の視床下部領域での過剰発現実験により、より長期的な期間でのNPGLの表現型を解析した。

3. 研究の方法

(1)形態学的解析

マウスとラットの視床下部からRNAを抽出し、cDNAを作製し、NPGL遺伝子のcDNAクローニングを行った。推定される前駆体タンパク質配列からNPGLをペプチド固相合成法により合成した。得られた合成NPGLに対する抗体をウサギ及びモルモットで作成した。得られた抗体を用い、免疫組織化学的解析を行った。

NPGL mRNA発現細胞を解析するためにin situハイブリダイゼーション解析を行った。

(2)脳室内単回投与による解析

マウスとラットの脳室内にカニューラを装着し、手術の回復を1週間待ち、NPGL単回投与を行った。その後、摂食量を経時的に測定した。

(3)脳室内慢性投与による解析

マウスとラットの脳室内にカニューラを装着し、浸透圧ポンプを皮下に埋め込み、2週間、慢性的に脳室内へNPGLを投与した。その後、摂食量と体重を毎日測定した。サンプリング時に、脂肪組織と肝臓などの末梢組織重量を測定した。さらに、マウスでは、呼吸代謝量、活動量についても測定した。また、飼料は、普通食、高カロリー食、マクロ栄養素食を用いた。

(4)NPGL前駆体遺伝子の過剰発現による解析

ラットを用い、NPGL発現細胞が局在する視床下部領域にNPGL前駆体遺伝子をアデノ随伴ウイルス(AAV)により過剰発現した。その後、摂食量と体重を測定した。サンプリング時に、脂肪組織と肝臓などの末梢組織重量を測定した。さらに、呼吸代謝量、活動量についても測定した。

(5)NPGL発現細胞のインスリン応答の解析

先行研究により、絶食時にNPGLのmRNA発現が増加し、逆にインスリン投与により発現が低下することを見出している。そこで、インスリンを脳室内に単回投与し、NPGL細胞がインスリン応答を示すかどうかを解析するために、インスリンシグナルの細胞内指標として、リン酸化Aktの反応を解析した。

4. 研究成果

(1)マウスを用いた解析

研究開始当初、NPGLの遺伝子情報はマウスのデータベース上に完全なものが記載されていなかった。そこでcDNAクローニングを行った。その後、リアルタイムPCRを用いた発現解析を行い、脳内では視床下部領域に局限して発現していること、末梢組織では発現が認められないことを見出した。

次に、免疫組織化学的解析とin situハイブリダイゼーション解析を行ったところ、NPGLは視床下部の弓状核後外側部にNPGL産生細胞体が局限しており、神経線維は視床下部領域に分布していることを見出した。さらに、摂食行動の一次ニューロンが局在している弓状核領域での解析から、摂食抑制に関わる α -メラノサイト刺激ホルモン(α -MSH)の前駆体タンパ

ク質であるプロオピオメラノコルチン (POMC) ニューロンの細胞体に NPGL 神経線維が投射していることを共焦点レーザー顕微鏡観察により見出した。一方、同じ弓状核の領域において、摂食促進に関わるニューロペプチド Y (NPY) ニューロンへの NPGL 神経線維の投射は観察されなかった。

次に、マウスの脳室内に NPGL を単回投与したところ、摂食行動を促進する効果が認められた。

一方、NPGL の慢性投与実験では、摂食量及び体重増加量が溶媒の対照群と比べて有意に増加した。このとき、白色脂肪組織重量が増加しており、体重増加の原因が脂肪蓄積であることが明らかとなった。また、呼吸代謝及び自発活動量を測定したところ、NPGL 投与により、エネルギー消費及び自発活動量が減少した。

摂食抑制因子の α -MSH 産生細胞への NPGL 神経線維の投射が観察された形態学的解析の結果から、摂食抑制ニューロンの活動を抑制することで摂食行動を亢進させ、脂肪蓄積を促進している可能性が示唆された。

(2) ラットを用いた解析

ラットでもマウスと同様に、NPGL 遺伝子が視床下部領域に特異的に発現していた。NPGL 産生細胞は、マウスでも認められた弓状核尾側部に加え、結節乳頭体核にも NPGL 産生細胞が局在していた。

次に、ラットの脳室内へ単回投与したところ、顕著な摂食行動への影響は観察できなかった。そこで、脳室内へ浸透圧ポンプを用い 2 週間、慢性的に投与した結果、対照群と比較して、摂食量や体重への影響は見られないものの、脂肪重量が増加していることを見出した。形態学的に脂肪滴の面積を計測したところ脂肪蓄積作用が確認できた。この効果は、NPGL 抗体を脳室内に慢性的に投与し、内因性の成熟 NPGL の作用をブロックした際には、逆に脂肪滴の大きさが対照群に比べ小さいという結果からも、内因性の NPGL による脂肪蓄積作用が示唆された。

2 週間の脳室内慢性投与では体重増加を観察するには短いと考え、AAV を用いたより長期間の NPGL 遺伝子過剰発現実験による影響を観察した。その結果、摂食量は過剰発現開始の約 3 週間後から対照群と比較して増加することが明らかになった。体重の増加は 45 日間の過剰発現では認められなかったが、脂肪重量は NPGL 慢性投与の結果と同様に、有意に増加させる働きがあることが示された。脂肪組織以外の内臓組織重量の変化は認められなかったが、筋肉重量の減少が認められ、このことが体重増加には影響がなかった原因と思われる。呼吸代謝量と活動量を測定したところ、マウスの結果と異なり、活動量への影響はないものの呼吸商の増加が認められ、脂肪代謝への影響が示唆された。そこで、脂肪組織や肝臓において、脂肪合成及び脂肪酸化に関わる酵素群の遺伝子発現解析を行った結果、脂肪合成に関与する遺伝子の発現亢進が観察された。脂肪合成に関わる酵素に関してウエスタンブロット解析や脂肪酸量を測定したところ、*de novo* 脂肪合成が亢進していることが示唆された。

一方、高カロリー食摂餌条件下で NPGL 遺伝子の過剰発現実験を行ったところ、摂食量、体重、脂肪蓄積共に顕著な促進効果が認められた。次に、タンパク質食、炭水化物食、脂肪食を別々に粉末飼料としたマクロ栄養素飼料を用いた行動解析では、NPGL 投与により炭水化物摂食を亢進する作用が認められた。このことから、NPGL は炭水化物からの *de novo* 脂肪合成を活性化し、その基質となる炭水化物摂取を積極的に促す作用があることが示唆された。

最後に、NPGL 産生細胞が血中インスリンレベルを感知することで発現制御が行われている可能性が考えられたため、インスリン応答の指標となるリン酸化 Akt の発現亢進を NPGL 産生細胞で解析した。その結果、NPGL 産生細胞はインスリンに応答することを明らかにした。

以上の解析から、NPGL 産生細胞は、飢餓状態で血中インスリンレベルが低下した際に発現が亢進し、摂食可能になった際に効率よく炭水化物を摂取し、*de novo* 脂肪合成を介して脂肪蓄積を行う働きがあることが示唆された。逆に、食後に血中インスリン量が上昇した際には、NPGL 発現は低下するという結果も得ていることから、インスリンと NPGL は協調しながら脂肪蓄積量を一定に保つ働きがあると考えられる。

以上の通り、これまで知られていなかった新しい視床下部因である NPGL を哺乳類において同定し、生理機能、生理的意義、作用機序の解明に関する研究を精力的に進めることができた。その結果、NPGL は、脂肪蓄積や摂食行動への影響など、エネルギーホメオスタシスに関わる重要な生理作用を有していることを初めて見出すことができた。これらの成果は *eLife* 誌、*Endocrinology* 誌、*J. Endocrinol.* 誌などに成果を掲載することができた。特に、アメリカ内分秘学会が選別する神経内分分泌学分野のトピックスに我々の論文が選ばれたことから分かるように、神経内分分泌学や代謝学などの分野で注目される発見をすることができたと考えている。

カリフォルニア大学バークレー校にて約 1 年間、共同研究を行うことができ、多くの成果を挙げる事ができた。特に、国際共著論文の執筆に関しては、Kriegsfeld 教授並びに Bentley 教授に多くのご尽力をいただいた。ここに感謝申し上げます。

< 引用文献 >

1. Ukena K, Iwakoshi-Ukena E, Taniuchi S, Bessho Y, Maejima S, Masuda K, Shikano K, Kondo K, Furumitsu M, Tachibana T. Identification of a cDNA encoding a novel small

- secretory protein, neurosecretory protein GL, in the chicken hypothalamic infundibulum. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 446:298-303 (2014)
2. Masuda K, Ooyama H, Shikano K, Kondo K, Furumitsu M, Iwakoshi-Ukena E, Ukena K. Microwave-assisted solid-phase peptide synthesis of neurosecretory protein GL composed of 80 amino acid residues. *J. Pept. Sci.* 21:454-460 (2015)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 7件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Shikano K, Iwakoshi-Ukena E, Saito T, Narimatsu Y, Kadota A, Furumitsu M, Bentley GE, Kriegsfeld LJ, Ukena K.	4. 巻 244
2. 論文標題 Neurosecretory protein GL induces fat accumulation in mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Endocrinol.	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1530/JOE-19-0112.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Shikano K, Iwakoshi-Ukena E, Kato M, Furumitsu M, Bentley GE, Kriegsfeld LJ, Ukena K.	4. 巻 10
2. 論文標題 Neurosecretory protein GL induces fat accumulation in chicks.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Front. Endocrinol.	6. 最初と最後の頁 392
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.3389/fendo.2019.00392.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Ukena K	4. 巻 260
2. 論文標題 Avian and murine neurosecretory protein GL participates in the regulation of feeding and energy metabolism.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Gen. Comp. Endocrinol.	6. 最初と最後の頁 164-170
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1016/j.ygcen.2017.09.019.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shikano K, Kato M, Iwakoshi-Ukena E, Furumitsu M, Matsuura D, Masuda K, Tachibana T, Bentley GE, Kriegsfeld LJ, Ukena K.	4. 巻 256
2. 論文標題 Effects of intracerebroventricular infusion of neurosecretory protein GL on body mass and food and water intake in chicks.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Gen. Comp. Endocrinol.	6. 最初と最後の頁 37-42
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1016/j.ygcen.2017.05.016.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Shikano K, Taniuchi S, Iwakoshi-Ukena E, Furumitsu M, Bentley GE, Kriegsfeld LJ, Ukena K.	4. 巻 265
2. 論文標題 Chronic subcutaneous infusion of neurosecretory protein GM increases body mass gain in chicks.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Gen. Comp. Endocrinol.	6. 最初と最後の頁 71-76
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1016/j.ygcen.2017.11.010.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Shikano K, Bessho Y, Kato M, Iwakoshi-Ukena E, Taniuchi S, Furumitsu M, Tachibana T, Bentley GE, Kriegsfeld LJ, Ukena K.	4. 巻 8
2. 論文標題 Localization and function of neurosecretory protein GM, a novel small secretory protein, in the chicken hypothalamus.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 704
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1038/s41598-017-18822-9.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Iwakoshi-Ukena Eiko, Shikano Kenshiro, Kondo Kunihiro, Taniuchi Shusuke, Furumitsu Megumi, Ochi Yuta, Sasaki Tsutomu, Okamoto Shiki, Bentley George E, Kriegsfeld Lance J, Minokoshi Yasuhiko, Ukena Kazuyoshi	4. 巻 6
2. 論文標題 Neurosecretory protein GL stimulates food intake, de novo lipogenesis, and onset of obesity	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e28527
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) DOI: 10.7554/eLife.28527	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 1.Matsuura D, Shikano K, Saito T, Iwakoshi-Ukena E, Furumitsu M, Ochi Y, Sato M, Bentley GE, Kriegsfeld LJ, Ukena K	4. 巻 158
2. 論文標題 Neurosecretory protein GL, a hypothalamic small secretory protein, participates in energy homeostasis in male mice.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Endocrinology	6. 最初と最後の頁 1120-1129
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1210/en.2017-00064.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Ukena K
2. 発表標題 Neurosecretory protein GL, a novel hypothalamic small protein, participates in the regulation of feeding and energy homeostasis in birds and rodents
3. 学会等名 The 5th Meeting of the Japan Branch of International Neuropeptide Society (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浮穴和義
2. 発表標題 新規視床下部因子によるエネルギー代謝調節 脳と食欲・脂肪・筋肉との関係に着目して
3. 学会等名 第27回日本運動生理学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ukena K, Shikano K, Kato M, Furumitsu M, Iwakoshi-Ukena E
2. 発表標題 Identification and function of two novel small secretory proteins, neurosecretory protein GL and neurosecretory protein GM, in the chicken hypothalamus
3. 学会等名 8th Intercongress of the AOSCE (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 浮穴 和義
2. 発表標題 新規脳因子の生理機能解析と今後の課題
3. 学会等名 第9回ペプチド・ホルモン研究会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	クリーグスフェルド ランス (Kriegsfeld Lance J.)	カリフォルニア大学バークレー校・心理学部・Professor	
その他の研究協力者	ベントレー ジョージ (Bentley George E.)	カリフォルニア大学バークレー校・統合生物学部・Professor	