

令和 2 年 5 月 21 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K07440

研究課題名(和文) 鳥類の視床下部で発見した分泌性小タンパク質による脂肪蓄積効果に関する研究

研究課題名(英文) Study of a secretory protein identified from the avian hypothalamus on fat accumulation

研究代表者

岩越 栄子 (Eiko, Iwakoshi)

広島大学・統合生命科学研究科(総)・研究員

研究者番号：50311296

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、鳥類ニワトリ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。先行研究からげっ歯類での解析からNPGLに脂肪蓄積作用があることが示唆されている。そのため、鳥類においても同様の効果が認められるかを解析した。その結果、NPGLの脳室内慢性投与により、体重、摂食量、飲水量が増加した。この体重増加の理由が、肝臓、腹腔内脂肪、皮下脂肪の増加であることを見出した。さらに、白色脂肪組織での脂質合成酵素の発現上昇と脂質酸化酵素の発現低下によることが明らかとなった。本研究の遂行により、哺乳類と鳥類で共通したNPGLの脂肪蓄積効果が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

鳥類の脂肪蓄積の先行研究は、主に肝臓に着目したものであった。本研究では、新規の脳因子の作用により、白色脂肪組織でも脂肪合成が生じ、脂肪蓄積が活発になされることを示した。畜産業界では、人為的に餌を大量に食べさせ脂肪肝を生じさせフォアグラを産出する技術があるが、動物福祉の点から問題となっている。今回の成果は、過食を伴わない脂肪蓄積制御が可能であることを示した。今回得られた基礎的な知見が畜産の応用分野へ利用できる可能性を示すことができたことから、学術的及び社会的意義は極めて大きい。

研究成果の概要(英文)： We recently found a previously unidentified cDNA in chicken hypothalamus which encodes the precursor for neurosecretory protein GL (NPGL). The present study showed that intracerebroventricular (i.c.v.) infusion of NPGL caused body mass gain in chicks. Subsequently, we found that NPGL increased the masses of the liver, abdominal fat, and subcutaneous fat, while NPGL did not affect the masses of muscles, including pectoralis major, pectoralis minor, and biceps femoris. Oil Red O staining revealed that fat deposition had occurred in the liver. In addition, the size of the lipid droplets in the abdominal fat increased. Furthermore, we found an upregulation of lipogenesis and downregulation of lipolysis in the abdominal fat, but not in the liver. These results indicate that NPGL is involved in fat storage in chicks.

研究分野：動物生理学

キーワード：鳥類 脂肪蓄積 白色脂肪組織 肝臓 視床下部

## 1. 研究開始当初の背景

我々は鳥類の視床下部漏斗部から、分泌性小タンパク質の前駆体をコードしている 2 種類の新規遺伝子を発見しており、それぞれ Neurosecretory protein GL (NPGL) 及び Neurosecretory protein GM (NPGM) と命名している[1]。これまでに NPGL mRNA の発現量は発達段階で増加することが分かっている。さらに、NPGL mRNA は視床下部漏斗部内の乳頭体核と漏斗核に発現しており、摂食行動を含めエネルギー代謝調節に関与していることが示唆されている。また、NPGL を皮下投与すると摂食行動への影響は認められないが、体重増加量が増加することを発見している[1]。これらの結果から、NPGL がニワトリの発達過程で成長・発達に関与している可能性が考えられる。一方、先行研究により、哺乳類のラットを用いた解析から、NPGL の脳室内慢性投与や前駆体遺伝子の視床下部領域での過剰発現を行うと、白色脂肪重量が増加する結果を得ていた。

## 2. 研究の目的

上述の通り、鳥類ニワトリにおける NPGL 及び NPGM の生理機能の解明は十分にはなされていない。また、NPGM の発達段階での変化や NPGL・NPGM 発現細胞の形態学的性質など、不明な点が多い。

まず、ニワトリにおける NPGL 及び NPGM の基礎的なデータを得ることを目的として研究を行った。

次に、NPGL の生理機能を解明することを目的とし、ニワトリのヒナにおいて NPGL の脳室内慢性投与を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) ニワトリにおける NPGL 及び NPGM の発達段階及び形態学的解析

1 日齢、8 日齢、15 日齢のニワトリの視床下部漏斗部を用いて NPGL と NPGM mRNA 発現レベルをリアルタイム PCR 法にて解析した。また、細胞の局在について、in situ hybridization 法及び、両者を特異的に認識する抗体を用いた免疫組織化学法を用いて形態学的解析を行った。

### (2) NPGL の脳室内慢性投与実験

8 日齢のヒナに脳室内慢性投与の手術を施し、NPGL の投与を行った。飼育期間中は体重、摂食量、飲水量を毎日測定し、13 日後に、肝臓、腹腔内脂肪、皮下脂肪、大胸筋、小胸筋、大腿二頭筋、血液をサンプリングし、各組織重量と血中グルコース濃度の測定を行った。肝臓はオイルレッド O 染色、腹腔内脂肪はヘマトキシリン・エオジン染色により形態学的解析を行った。NPGL 投与群とコントロール群の肝臓と腹腔内脂肪において、脂質代謝関連因子の mRNA 発現量をリアルタイム PCR を用いて測定した。

## 4. 研究成果

### (1) ニワトリにおける NPGL 及び NPGM の発達段階及び形態学的解析

視床下部漏斗部内の NPGL 及び NPGM mRNA 発現をリアルタイム PCR 法にて解析した結果、NPGL mRNA 発現は 1 日齢で低く、8 日齢で有意に高いことが明らかとなった(図 1)。一方、NPGM mRNA 発現は、1 日齢が高く、8 及び 15 日齢で低くなることが分かった(図 1)。

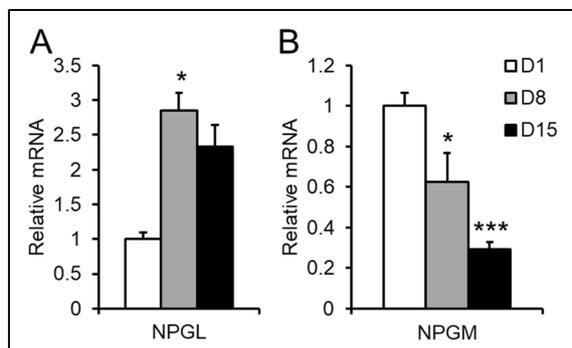


図 1. 孵化後の発達段階での NPGL (A) 及び NPGM (B) mRNA 発現量の変化

一方、in situ ハイブリダイゼーション法により NPGL と NPGM mRNA 発現細胞を検出したところ、視床下部漏斗部内の乳頭体核では、1 日齢で NPGL mRNA 発現が弱く、15 日齢では強かった。NPGM mRNA 発現は逆のパターンを示した。漏斗核では、1 日齢で NPGL mRNA 発現は認められず、15 日齢でシグナルが検出できた。NPGM mRNA 発現は逆のパターンを示した。

次に、免疫組織化学的解析により、特異的な抗体を用いて NPGL 及び NPGM の産生細胞を解析したところ、免疫陽性細胞数は in situ ハイブリダイゼーション法による解析と同様であつ

た。さらに同一細胞で NPGL と NPGM が産出されていることを見出した。

我々の先行研究で、視床下部漏斗部の乳頭体核にはヒスタミンニューロンの起始核が存在していることを見出している[2]。そこで、NPGL/NPGM 産生細胞とヒスタミンニューロンの分布を免疫組織化学法とヒスタミン合成酵素の in situ ハイブリダイゼーション法の二重染色を行った。その結果、両者のシグナルは完全に重なり、乳頭体核の NPGL/NPGM 産生細胞は全てヒスタミンニューロンであることを見出した。一方、漏斗核ではヒスタミンニューロンは存在せず、漏斗核と乳頭体核の性質が完全に異なることが示唆された。さらに、先行研究で、ヒスタミンは摂食抑制作用があることを見出しているが、NPGM についても単回投与により摂食抑制作用が生じることを見出した。

以上の結果から、NPGL と NPGM は同一細胞で産出されることが明らかとなったが、孵化後の発達段階では発現パターンが異なっていたこと、乳頭体核ではヒスタミンも産生していることが明らかとなり、発達段階での生理機能の違いや摂食抑制作用を示すヒスタミンを産生している生理的意義などを今後解析していく必要がある。

## (2) NPGL の脳室内慢性投与実験

NPGL の脳室内慢性投与群で体重、摂食量、飲水量が有意に増加した(図2)。また、肝臓、腹腔内脂肪、皮下脂肪の重量が有意に増加した(図3)。大胸筋、小胸筋、大腿二頭筋の重量、血中グルコース濃度に変化はなかった。形態学的解析においても肝臓と腹腔内脂肪で脂肪蓄積が確認された。脂質代謝関連因子の遺伝子発現解析の結果、肝臓では脂肪酸化因子の発現が減少しており、腹腔内脂肪では脂肪合成因子の発現が増加し、脂肪酸化因子の発現の減少が認められた。

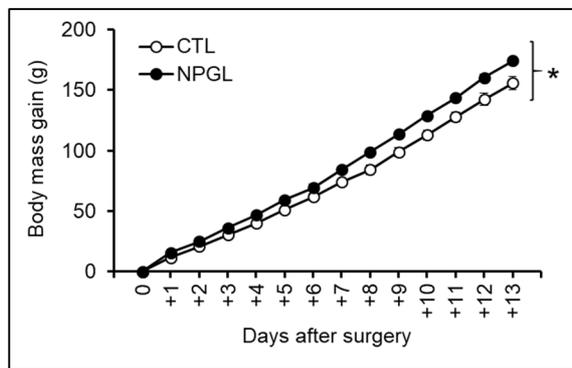


図2 . NPGL 脳室慢性投与後の体重増加量の変化

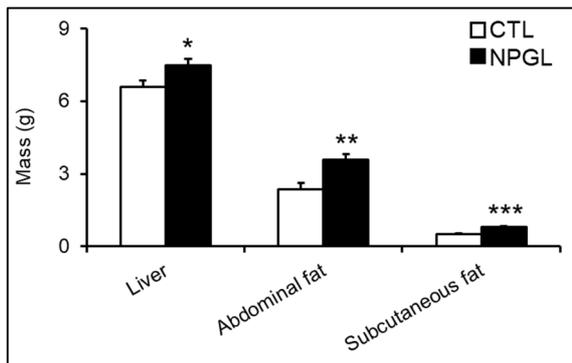


図3 . NPGL 脳室慢性投与後の肝臓、腹腔内脂肪、皮下脂肪量

以上の解析から、NPGL は肝臓で脂肪酸化因子の発現を抑制し、腹腔内脂肪で de novo 脂肪合成の亢進と脂肪酸化因子の発現を抑制することで脂肪蓄積を引き起こしている可能性が示唆された。

本研究により、ニワトリのヒナにおける NPGL は脂肪蓄積を含めたエネルギー代謝調節に関する新規脳内因子であることが示唆された。ニワトリにおいて de novo 脂肪合成は肝臓で主に行われており、脂肪組織は脂肪の蓄積を担っていると考えられてきた。しかし、本研究により NPGL が脂肪組織において de novo 脂肪合成を亢進させることを初めて明らかにしたことで、ニワトリの脂質代謝調節に関する新しい知見が得られた。

NPGL の脳室内慢性投与は現在進行中であるが、上記の通り発達段階での発現変動の違いや、脳室内単回投与により摂食行動を抑制したことから、NPGL とは異なる生理作用を有している可能性もある。

本研究の遂行により、鳥類ニワトリにおける新規分泌性小タンパク質の発現、形態、生理機能を明らかにすることができた。哺乳類のラットにおいて NPGL による脂肪蓄積作用が示唆されていたが、今回の解析により鳥類のニワトリでも脂肪蓄積作用が認められた。哺乳類と鳥類では摂食行動を含めたエネルギー代謝調節機構が異なる場合が多いという報告があるが、逆に、脂肪蓄積という共通の生理機能を見出すことができた。

畜産産業において、ガチョウを人為的に過食にしてフォアグラを産出するが、動物愛護の観点

から問題視されている。今回の研究で NPGL による肝臓や脂肪組織での脂肪蓄積作用を見出せたことで、過食に代わる脂肪蓄積の道が開かれたと考えており、学術的のみならず、畜産業界への応用面でも重要な知見を得たと考えている。

<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. Bessho Y, Iwakoshi-Ukena E, Tachibana T, Maejima S, Taniuchi S, Masuda K, Shikano K, Kondo K, Furumitsu M, Ukena K. Characterization of an avian histidine decarboxylase and localization of histaminergic neurons in the chicken brain. *Neurosci. Lett.* 578:106-110 (2014)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7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, 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 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, 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 Matsuura D, Shikano K, Saito T, Iwakoshi-Ukena E, Furumitsu M, Ochi Y, Sato M, Bentley GE, Kriegsfeld LJ, Ukena K.	4. 巻 158(5)
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

1. 著者名 Iwakoshi-Ukena E, Shikano K, Kondo K, Taniuchi S, Furumitsu M, Ochi Y, Sasaki T, Okamoto S, Bentley GE, Kriegsfeld LJ, Minokoshi Y, Ukena K.	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 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 chronic 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

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 浮穴和義、岩越栄子
2. 発表標題 エネルギー代謝調節に関わる新規神経ペプチドの発見と機能解析 鳥類と哺乳類の研究から
3. 学会等名 日本動物学会 第90回大阪大会 「第4回ペプチド・ホルモン研究会シンポジウム ~多様な動物種を用いたホルモン研究の新展開~」 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazuyoshi Ukena, Eiko Iwakoshi-Ukena, Kenshiro Shikano, Yuki Bessho, Tetsuya Tachibana
2. 発表標題 Functional analysis of small secretory proteins in the chicken hypothalamus.
3. 学会等名 11th International Symposium on Avian Endocrinology (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 加藤正暉、鹿野健史朗、古満芽久美、岩越栄子、浮穴和義
2. 発表標題 ニワトリにおける新規視床下部分泌性小タンパク質の脳室内慢性投与による影響
3. 学会等名 第40回鳥類内分泌研究会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Masaki Kato, Kenshiro Shikano, Eiko Iwakoshi-Ukena, Kazuyoshi Ukena
2. 発表標題 Effects of two novel hypothalamic small secretory proteins, neurosecretory protein GL and neurosecretory protein GM in chicks
3. 学会等名 第87回日本動物学会大会
4. 発表年 2016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
---------	---------------------------	-----------------------	----