

令和元年5月27日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14769

研究課題名(和文)新規視床下部小タンパク質の標的細胞及び受容体の同定

研究課題名(英文) Identification of target cells and the receptor for a novel hypothalamic small protein

研究代表者

浮穴 和義 (Ukena, Kazuyoshi)

広島大学・総合科学研究科・教授

研究者番号：10304370

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、鳥類のニワトリを用い、分泌性の小タンパク質 Neurosecretory protein GL (NPGL) をコードする遺伝子を発見した。NPGLの生理機能解明を進めてきた結果、NPGLが摂食行動や脂肪蓄積に関与していることを明らかにした。NPGLの作用機序を解明するためには、標的細胞や受容体の同定が必要不可欠である。本研究では、NPGLの標的細胞と受容体を同定するために、形態学的手法を用い、NPGL神経線維の投射先、NPGL投与後の活性化細胞及び結合細胞の検出を試みた。その結果、NPGLは摂食抑制に関わる POMCニューロンに投射していることが明らかとなり、標的細胞の候補細胞を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新たな生理活性物質の発見は、生体機能に関わる分子メカニズムの解明の糸口を与える。本研究では、我々が最近発見した新規脳因子 NPGL の標的細胞と受容体の同定を進めた。その結果、これまで摂食抑制を担う神経ペプチド産生細胞 (POMCニューロン) に新規脳因子 NPGL の産生細胞が神経連絡をし、POMCニューロンの活動を抑制することで摂食行動を亢進している可能性を示唆する結果を得た。

研究成果の概要(英文)：We have recently identified a novel cDNA encoding a small secretory protein termed neurosecretory protein GL (NPGL) from the chicken hypothalamus. In rodents, NPGL stimulates food intake and fat accumulation. The identification of target cells and the specific receptor is essential to elucidate the physiological roles of the neuropeptide. In this study, we sought target cells and the receptor for the neuropeptide by morphological analyses. NPGL-immunoreactive fibers were observed in close anatomical contact with pro-opiomelanocortin (POMC) neurons in the rostral region of the arcuate nucleus of the hypothalamus. These results showed one of the target cells for NPGL.

研究分野：神経内分泌学

キーワード：小タンパク質 視床下部 標的細胞 受容体 摂食 脂肪蓄積

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、逆薬理的な手法からオーファン受容体のリガンド同定がなされることで、神経科学や内分泌学などの生体調節学の分野が発展してきた。このように、新しい生理活性物質の発見から、生理作用の分子メカニズムが明らかになる例が多い。

研究代表者らは、鳥類のニワトリを用い、新たな神経ペプチドを探索する研究を進めた。その過程で、分泌性の小タンパク質をコードする遺伝子を発見した。この小タンパク質のC末端側の配列から、Neurosecretory protein GL (NPGL)と命名した。さらに、比較生物学的なゲノム解析から、NPGL 遺伝子のホモログ遺伝子は、鳥類のみならず、魚類・両生類・爬虫類・哺乳類などの脊椎動物に広く存在していることも見出した。これまで研究代表者らは、鳥類のニワトリ、哺乳類のラットやマウスを用いて NPGL の生理機能解明を進めてきた。その結果、これら新規小タンパク質が摂食行動や脂肪蓄積などのエネルギー代謝調節に関与していることを見出した。

一方で、NPGL の作用機序や生理的意義を解明するためには、標的細胞や受容体の同定が必要不可欠である。

2. 研究の目的

本研究では、新規分泌性小タンパク質である NPGL の標的細胞と受容体を探索することを目的とした。

先行研究では、80 アミノ酸残基からなる NPGL を化学合成する手法を確立し、合成ペプチドを用いた脳室内投与実験とアデノ随伴ウイルスベクターを用いた NPGL 前駆体遺伝子の過剰発現実験により、内因性の発現レベルに加えて外部から NPGL を添加、あるいは過剰に発現させる系を用いることで、見えてくる表現系を解析してきた。その結果、摂食行動の亢進や白色脂肪組織での de novo 脂肪合成を介した脂肪蓄積作用などを発見するに至った。

標的細胞を解析する最初的手段として、神経線維の投射を免疫組織化学的に解析する方法が常套手段である。さらに、神経ペプチドを脳室内投与し、最初期遺伝子の c-Fos 発現を指標に興奮する細胞を同じく免疫組織化学的手法により検出することが一般的である。

本研究においても、免疫組織化学的手法を用いた形態学的解析を進めた。

3. 研究の方法

NPGL に対する特異的な抗体を用いた神経線維の投射部位の同定

神経線維の投射から、標的細胞を推測することとした。そのため、抗 NPGL 抗体を用いた免疫組織化学的手法により解析した。

NPGL を脳室内投与後の最初期遺伝子 c-Fos 発現を指標とした標的細胞の同定の試み

生理活性物質が標的細胞に結合した際の神経活動の結果、最初期遺伝子の c-Fos の発現上昇が認められることが知られている。そのため、c-Fos に対する抗体を用いて、NPGL 投与後の反応を免疫組織化学的手法により解析した。

NPGL を脳室内投与後のシグナル伝達タンパク質のリン酸化を指標とした標的細胞の同定の試み

上記の最初期遺伝子の c-Fos に加え、生理活性物質が標的細胞に結合したのち、細胞内シグナル伝達が活性化される。この活性化の指標として、シグナル調節キナーゼ ERK 1/2 と Akt に着目し、そのリン酸化フォームを検出することで、NPGL の標的細胞を探索した。そのため、リン酸化 ERK 1/2 とリン酸化 Akt に対する抗体を用いて、NPGL 投与後の反応を免疫組織化学的手法により解析した。

ピオチン標識した NPGL を用いた視床下部スライス上での標的細胞の同定の試み

NPGL の受容体が発現する部位を検討する目的で、未固定の脳スライスを用いた受容体結合実験を行い、形態学的手法により NPGL が結合する脳領域を解析した。このとき、内因性の NPGL の検出を避けるため、NPGL をピオチン標識し、ピオチン・アビジン相互作用を利用することで加えた NPGL を検出することとした。

4. 研究成果

NPGL に対する特異的な抗体を用いた神経線維の投射部位の同定

抗 NPGL 抗体を用い、免疫組織化学的手法により、NPGL 産生細胞の神経線維の分布を解析した。まず、NPGL 産生細胞の細胞体の局在部位は、マウスの視床下部弓状核後外側部に局限していた。また、NPGL 陽性神経線維は視床下部領域内のみを観察された。特に、視床下部弓状核領域に密な投射が観察されたため、弓状核領域に発現していることが知られている摂食・エネルギー代謝調節に関わる神経ペプチド産生ニューロンへの投射があると予測した。そこで、摂食促進因子のニューロペプチド Y 産生細胞 (NPY ニューロン) と摂食抑制因子の α -メラノサイト刺激ホルモン (α -MSH) の前駆体発現細胞 (プロオピオメラノコルチン産生細胞、POMC ニューロン) をそれぞれの抗体を用い検出し、抗 NPGL 抗体を用いた二重免疫染色法にてこれら 2 種類の摂食調節細胞への投射を検討した。その結果、NPGL 陽性神経線維は NPY ニューロンではなく、POMC ニューロへの投射が観察された。この結果は、共焦点レーザー顕微鏡での観察でも認められた。この結果から、NPGL は摂食抑制に関わる POMC ニューロンの活動を修飾することでその生理作用を発揮している可能性が考えられる。先行研究において、マウスの脳室内に NPGL を投与すると、摂食行動を亢進する作用が観察されている。このため、NPGL は、POMC 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る可能性が示唆された。

NPGL を脳室内投与後の最初期遺伝子 c-Fos 発現を指標とした標的細胞の同定の試み

NPGL 投与後 90 分後にマウスを固定し、脳切片を用いて c-Fos 発現を免疫組織化学的手法により検討した。

しかしながら、コントロール群と異なる染色像は得られなかった。

NPGL を脳室内投与後のシグナル伝達タンパク質のリン酸化を指標とした標的細胞の同定の試み

次に、NPGL 投与後のリン酸化 ERK 1/2 とリン酸化 Akt の発現を指標に、標的細胞の検出を試みた。

しかしながら、コントロール群と顕著な変化は認められず、NPGL により刺激された細胞を特定できなかった。

ビオチン標識した NPGL を用いた視床下部スライス上での標的細胞の同定の試み

最後の実験として、ビオチン標識した NPGL を用い、未固定の脳スライス標本に作用させ、ビオチン・アビジン相互作用を用いた染色により、NPGL の受容体が存在する領域を検討した。

しかしながら、NPGL が結合していると思われる細胞は観察できなかった。

以上の形態学的解析により、NPGL 神経線維が POMC ニューロンに投射していることが示唆され、標的細胞の候補として新たな知見を得ることができた。しかしながら、神経活動及びシグナル伝達の指標となる c-Fos、リン酸化 ERK 1/2・Akt の発現上昇は認められなかった。このシステムでは神経活動やシグナル伝達の低下を検出することが困難である可能性があるため、今後、標的細胞の抑制を検出する系を確立し、解析を進める必要がある。

さらに、NPGL 受容体をビオチン標識 NPGL の結合により検出することも試みたが、NPGL 結合細胞の検出には至らなかった。これは検出感度の低さによりシグナルが検出できなかった可能性もある。今後、放射性同位体で標識した NPGL を用いた受容体オートラジオグラフィーによる解析手法を試みたいと考えている。

我々の先行研究では、カルシウムイメージングを用いたオーファン受容体探索も進めてきたが、現時点で、NPGL が反応を示す受容体の同定には至っていない。

今後は、生化学・分析化学的手法を用いたプロテオミクス解析により、NPGL と結合するタンパク質を同定することで、NPGL 受容体を同定していく研究を進める予定でいる。

NPGL は脳の視床下部領域に特異的に発現している新規脳因子であり、表現系は摂食行動の亢進と末梢の脂肪組織での脂肪蓄積として現れる。今後、NPGL の作用機序を解明するために NPGL 受容体の同定は必要不可欠なものであるため、今後も引き続き精力的に研究を展開していきたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者に下線)

〔雑誌論文〕(計 10 件、全て査読有)

1. Shikano K, Bessho Y, Kato M, Iwakoshi-Ukena E, Taniuchi S, Furumitsu M, Tachibana T, Bentley GE, Kriegsfeld LJ, Ukena K. Localization and function of neurosecretory protein GM, a novel small secretory protein, in the chicken hypothalamus. *Sci. Rep.* 8:704 (2018)
2. Shikano K, Taniuchi S, Iwakoshi-Ukena E, Furumitsu M, Bentley GE, Kriegsfeld LJ, Ukena K. Chronic subcutaneous infusion of neurosecretory protein GM increases body mass gain in chicks. *Gen. Comp. Endocrinol.* 265:71-76 (2018)
3. Ukena K. Avian and murine neurosecretory protein GL participates in the regulation of feeding and energy metabolism. *Gen. Comp. Endocrinol.* 260:164-170 (2018)
4. Shikano K, Kato M, Iwakoshi-Ukena E, Furumitsu M, Matsuura D, Masuda K, Tachibana T, Bentley GE, Kriegsfeld LJ, Ukena K. Effects of intracerebroventricular infusion of neurosecretory protein GL on body mass and food and water intake in chicks. *Gen. Comp. Endocrinol.* 256:37-42 (2018)
5. 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. Neurosecretory protein GL stimulates food intake, de novo lipogenesis, and onset of obesity. *eLife* 6:e28527 (2017)
6. Matsuura D, Shikano K, Saito T, Iwakoshi-Ukena E, Furumitsu M, Ochi Y, Sato M, Bentley GE, Kriegsfeld LJ, Ukena K. Neurosecretory protein GL, a hypothalamic small secretory protein, participates in energy homeostasis in male mice. *Endocrinology* 158:1120-1129 (2017)
7. Leprince J, Bagnol D, Bureau R, Fukusumi S, Granata R, Hinuma S, Larhammar D, Primeaux S, Sopkova-de Oliveira Santos J, Tsutsui K, Ukena K, Vaudry H. The Arg-Phe-amide peptide 26RFa/QRFP and its Receptor. *IUPHAR Review* 24. *Br. J. Pharmacol.* 174:3573-3607 (2017)
8. Masuda K, Furumitsu M, Ooyama H, Iwakoshi-Ukena E, Ukena K. Synthesis of neurosecretory protein GM composed of 88 amino acid residues by native chemical ligation. *Tetrahedron Lett.* 57:804-807 (2016)
9. Tachibana T, Kubo S, Khan MS, Masuda K, Ukena K, Wang Y. Peripheral injection of chicken growth hormone-releasing hormone inhibits feeding behavior in chicks. *J. Poult. Sci.* 53:29-33 (2016)
10. Ukena K, Iwakoshi-Ukena E, Osugi T, Tsutsui K. Identification and localization of gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH) orthologs in the hypothalamus of the red-eared slider turtle, *Trachemys scripta elegans*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 227:69-76 (2016)

〔学会発表〕(計 13 件)

1. 浮穴和義、齋藤鷹也、鹿野健史朗、古満芽久美、岩越栄子 第 36 回日本肥満学会「マウスにおける新規視床下部分泌性小タンパク質 NPGL の脂肪蓄積作用」2018 年 10 月兵庫
2. 浮穴和義、岩越栄子 平成 30 年度中四国動物生理シンポジウム「鳥類の脳で見出した新しいエネルギー代謝調節に関わる神経ペプチド」2018 年 9 月広島
3. Ukena K, Shikano K, Kato M, Furumitsu M, Iwakoshi-Ukena E. 8th Intercongress of Asia and Oceania Society for Comparative Endocrinology “Identification and function of two novel small secretory proteins, neurosecretory protein GL and neurosecretory protein GM, in the chicken hypothalamus” July, 2018 Australia
4. 浮穴和義、齋藤鷹也、鹿野健史朗、古満芽久美、岩越栄子 第 3 回食欲・食嗜好の分子・神経基盤研究会「マウスにおける視床下部分泌性小タンパク質 NPGL の生理作用の解析」2018 年 6 月愛知
5. 浮穴和義、鹿野健史朗、古満芽久美、岩越栄子 2018 年度中国四国地区生物系三学会合同大会山口大会「視床下部小タンパク質 NPGL は脂肪蓄積を促す」2018 年 5 月山口
6. 浮穴和義 第 42 回度日本比較内分泌学会大会シンポジウム「視床下部における新しいエネルギー代謝調節因子」2017 年 11 月奈良

7. 鹿野健史朗、松浦大智、齋藤鷹也、越智祐太、古満芽久美、岩越栄子、浮穴和義 第 22 回アディポサイエンスシンポジウム「視床下部分泌性小タンパク質 NPGL はマウスにおいてエネルギーホメオスタシスを制御する」若手優秀研究奨励賞受賞 2017 年 8 月大阪
8. Ukena K, Shikano K, Kato M, Saito T, Taniuchi S, Bessho Y, Furumitsu M, Iwakoshi-Ukena E. 18th International Congress of Comparative Endocrinology “Identification and biological action of a novel small secretory protein, neurosecretory protein GL, in the chicken hypothalamus” June, 2017 Canada
9. 浮穴和義 平成 28 年度日本比較内分泌学会大会及びシンポジウム「鳥類の視床下部に存在する神経ペプチドの探索と生理機能に関する研究」奨励賞受賞者講演 2016 年 12 月神奈川
10. Ukena K, Shikano K, Bessho Y, Iwakoshi-Ukena E. Neuroscience 2016 “The relationship between neuronal histamine and neurosecretory protein GM in the chick hypothalamus” November, 2016 USA
11. Ukena K, Iwakoshi-Ukena E, Shikano K, Bessho Y, Tachibana T. 11th International Symposium on Avian Endocrinology “Functional analysis of small secretory proteins in the chicken hypothalamus” October, 2016 Canada
12. 浮穴和義、岩越栄子、鹿野健史朗、近藤邦裕、谷内秀輔、益田恵子、別所裕紀、古満芽久美 第 34 回内分泌代謝学サマーセミナー「視床下部で新たに発見した分泌性小タンパク質の生理機能解析」優秀ポスター賞受賞 2016 年 7 月福岡
13. 浮穴和義、岩越栄子、鹿野健史朗 第 1 回食欲・食嗜好の分子・神経基盤研究会「新規視床下部分泌性小タンパク質によるエネルギー代謝調節」2016 年 6 月愛知

〔その他〕

ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/ukena/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：岩越 栄子

ローマ字氏名：(IWAKOSHI, eiko)

所属研究機関名：広島大学

部局名：大学院総合科学研究科

職名：研究員

研究者番号(8桁): 50311296

(2)研究協力者

研究協力者氏名：古満 芽久美

ローマ字氏名：(FURUMITSU, megumi)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。