

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K08307

研究課題名(和文) 中枢性摂食・エネルギー代謝調節における新規分泌タンパク質Brorinの機能解明

研究課題名(英文) The roles of Brorin in the regulation of feeding behavior and energy metabolism

研究代表者

三宅 歩 (Miyake, Ayumi)

京都大学・薬学研究科・講師

研究者番号：40346044

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：成体マウスの脳においてBrorinは視床下部の弓状核に高発現しており、Brorin遺伝子欠損マウスでは野生型マウスに比べ、摂食量が増加していることが分かっている。そこで、Brorin遺伝子欠損マウスの視床下部について摂食制御関連ペプチドの発現量を逆転写qPCR法により解析した。その結果、Brorin遺伝子欠損マウスでは野生型マウスに比べ、摂食促進ペプチドの発現量が増加していたが、摂食抑制ペプチドの発現量も増加していることを明らかにした。さらに、Brorin遺伝子欠損マウスの白色脂肪組織におけるLeptinの発現量が野生型マウスと比較して増加していることも明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Brorinは視床下部の弓状核に高発現し、白色脂肪組織においては低レベルで発現している。Brorin遺伝子欠損マウスでは摂食量の増加が認められ、摂食促進ペプチドの発現量が増加していたが、摂食抑制ペプチドの発現量も増加していることを明らかにした。さらに、Brorin遺伝子欠損マウスの白色脂肪組織で発現量の増加が認められたLeptinは代謝調節遺伝子であるとともに摂食抑制因子としても働くことが知られている。今後のさらなる解析により、Brorinによる摂食制御因子の調節機構が明らかになれば、摂食障害の原因解明および治療法の開発につながることを期待できる。

研究成果の概要(英文)：Brorin was predominantly expressed in the arcuate nucleus. Food intake and body weight were significantly higher in brorin knockout mice than in WT mice when they were fed normal chow. The arcuate nucleus greatly contributes to the regulation of feeding behavior, and several neuropeptides including Agouti-related peptide (AGRP), Neuropeptide Y (NPY), and Pro-opiomelanocortin (POMC) in the arcuate nucleus are the important regulators of feeding behavior. Therefore, we examined the expression levels of Agrp, Npy and POMC in the hypothalamus by reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). These expression levels were increased in brorin knockout mice fed normal chow. Furthermore, we examined the expression levels of Leptin in the white adipose tissues by RT-qPCR. Its levels in brorin knockout mice fed normal chow were significantly higher than those in WT mice.

研究分野：分子生物学

キーワード：視床下部 分泌タンパク質 摂食制御 脳・神経

1. 研究開始当初の背景

分泌性タンパク質は、増殖および分化因子として形態形成の様々な過程において重要な役割を担っている。申請者らは、Bioinformatics の手法などにより、ゲノム・遺伝子データベースから 15 種類以上の新規ヒト分泌性タンパク質を発見し、そのうちの 1 つを *Brorin* と命名した。ヒト以外にも *Brorin* をマウスとゼブラフィッシュから単離・同定しており、*Brorin* は脊椎動物に共通した分泌性タンパク質であることも明らかにしている。

Bmp (bone morphogenetic protein) は、骨・軟骨形成以外に脳の形成にも関与して分泌性タンパク質である。脳発生過程において *Bmp* は、神経系前駆細胞からニューロンおよびオリゴデンドロサイトへの分化を抑制し、アストロサイトへの分化を促進する。また *Bmp* は、細胞表面の受容体を介して細胞内にシグナルを伝達するが、その活性はアンタゴニストなどの制御を受けている。これまでに申請者らは、マウスおよびゼブラフィッシュにおいて *Brorin* が脳神経系特異的に発現しており、ゼブラフィッシュを用いた解析から *Brorin* が *in vivo* で *Bmp* アンタゴニスト活性を示すことと、GABA 作動性ニューロンおよびオリゴデンドロサイトの発生に関与していることを明らかにしている。

そこで申請者らは、哺乳類における *Brorin* の生理的役割を解明するために、*Brorin* 遺伝子欠損マウスを作製し、機能解析を行っている。*Brorin* 遺伝子欠損マウスの表現型の特徴としては、通常食飼育時における体重が野生型に比べ有意に増加しており、主要臓器である心臓、肺、腎臓などの重量には差が見られなかったものの、皮下および内臓共に白色脂肪組織重量は増加していた。さらに *Brorin* 遺伝子欠損マウスでは、野生型マウスと比較して摂食量も有意に増加しており、血糖値および血中インスリン濃度が上昇していた。これらの結果は、*Brorin* は食欲抑制とエネルギー消費の亢進に重要な役割を担っている可能性があることを示唆している。

2. 研究の目的

Brorin は胎児期から脳神経系特異的に発現しており、培養細胞を用いた実験から *Brorin* は細胞外に分泌して *Bmp* アンタゴニスト活性を示し、神経系前駆細胞のニューロンへの分化を促進することが明らかになっている。*Bmp* シグナルは、摂食制御の神経回路において中心的役割をもつ神経核が存在する視床下部の神経分化及び弓状核ニューロンの軸索投射に関与していることが報告されており、*Brorin* は胎児期から特に視床下部の弓状核において高発現している。さらに、*Brorin* 遺伝子欠損マウスでは、通常食飼育時の摂食量が野生型に比べ有意に増加しており、体重も野生型に比べ有意に増加していた。また、*Brorin* 遺伝子欠損マウスは高インスリン血症を呈していた。これらの結果は、*Brorin* は食欲抑制とエネルギー消費の亢進に重要な役割を担っている可能性があることを示唆している。

そこで本研究では、視床下部における摂食行動制御機構に *Brorin* がどのように関わっているのか分子レベルで明らかにすることを目的として、絶食時の野生型マウスの視床下部における *Brorin* の発現量の変化の有無について明らかにする。さらに、通常食飼育時の *Brorin* 遺伝子欠損マウスの視床下部における摂食制御関連遺伝子の発現量の変化を調べ、摂食量増加の原因についても明らかにする。

さらに、*Brorin* がエネルギー代謝にどのように関わっているのか分子レベルで明らかにするために、*Brorin* 遺伝子欠損マウスの腸間膜白色脂肪組織においてエネルギー代謝調節に関与している遺伝子の発現量の変化の有無を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) *Brorin* 遺伝子欠損マウスの視床下部における摂食制御に関与する遺伝子の発現量の検討

これまでの解析により、成体マウスの脳において *Brorin* は視床下部の弓状核に高発現しており、*Brorin* 遺伝子欠損マウスでは野生型マウスに比べて摂食量が増加していることが分かっている。そこで 22 週齢の *Brorin* 遺伝子欠損マウスと野生型マウスの視床下部から RNA を抽出した後、逆転写反応により cDNA を作製し、リアルタイム PCR 法を用いて摂食促進ペプチドである Agouti-related peptide (AgRP) と Neuropeptide Y (Npy) および摂食抑制ペプチドである Pro-opiomelanocortin (POMC) の発現量を比較検討した。測定は、相対検量線法で行い *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (Gapdh)* によって標準化した。統計的有意差は、Student t-test を用いて算出した。検定の結果、 $p < 0.05$ となったものを有意と判断した。

(2) 絶食時の野生型マウスの視床下部における *Brorin* の発現量の検討

自由摂食あるいは12時間絶食させた9-10週齢の野生型マウスの視床下部からそれぞれRNAを抽出した後、逆転写反応によりcDNAを作製し、リアルタイムPCR法を用いて*AgRP*、*Npy*、*POMC*および*Brorin*の発現量を比較検討した。測定は、相対検量線法で行い*Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (Gapdh)*によって標準化した。統計的有意差は、Student t-testを用いて算出した。検定の結果、 $p < 0.05$ となったものを有意と判断した。

(3) 野生型マウスの各組織における *Brorin* の発現量の検討

これまでに申請者らは、*Brorin* 遺伝子欠損マウスの通常食飼育時における体重が野生型に比べ有意に増加しており、主要臓器である心臓、肺、腎臓などの重量には差が見られなかったものの、精巢上体、皮下および内臓において白色脂肪組織重量が増加していることを明らかにしている。そこで、8週齢の野生型マウス(C57BL/6)の白色脂肪組織を含む各組織(脳、胸腺、脾臓、心臓、肺、肝臓、腎臓、胃、小腸、大腸、精巢上体白色脂肪組織、腸間膜白色脂肪組織、皮下白色脂肪組織、肩甲骨間褐色脂肪組織)からRNAを抽出した後、逆転写反応によりcDNAを作製し、リアルタイムPCR法を用いて*brorin*の発現量を比較検討した。測定は、相対検量線法で行い18S rRNAによって標準化した。

(4) *Brorin* 遺伝子欠損マウスの腸間膜白色脂肪組織におけるエネルギー代謝調節に關与している遺伝子の発現量の検討

22週齢の*Brorin* 遺伝子欠損マウスと野生型マウスの腸間膜白色脂肪組織からRNAを抽出した後、逆転写反応によりcDNAを作製し、リアルタイムPCR法を用いてエネルギー代謝亢進および摂食抑制に關与している*Leptin*の発現量を比較検討した。測定は、相対検量線法で行い18S rRNAによって標準化した。統計的有意差は、Student t-testを用いて算出した。検定の結果、 $p < 0.05$ となったものを有意と判断した。

4. 研究成果

(1) *Brorin* 遺伝子欠損マウス視床下部における摂食制御に關与する遺伝子の発現量の検討

Brorin 遺伝子欠損マウスでは、野生型マウスと比べて5週齢から体重が増加していた。また、成体マウスの脳において*Brorin*は視床下部の弓状核に高発現しており、*Brorin* 遺伝子欠損マウスでは野生型マウスに比べ、摂食量が増加していることが分かっている。そこで、22週齢の*Brorin* 遺伝子欠損マウスについて弓状核に発現している摂食促進ペプチドの発現量を逆転写qPCR法により解析したところ、視床下部における*AgRP*及び*Npy*の発現量が野生型マウスに比べて有意に増加していた。また、摂食抑制に關与する遺伝子*POMC*についても解析したところ、*Brorin* 遺伝子欠損マウスの視床下部における*POMC*の発現量は野生型マウスと比べて増加傾向を示した。

(2) 絶食時の野生型マウスの視床下部における *Brorin* の発現量の検討

Brorin 遺伝子欠損マウスにおいて、摂食促進ペプチドと摂食抑制ペプチドの発現量が共に増加していたことより、*Brorin*が*AgRP*、*Npy*及び*POMC*の発現を制御することにより摂食調節に關与している可能性が示された。そこで、絶食させた野生型マウスの視床下部における*Brorin*の発現量を逆転写qPCR法により解析した。絶食させた野生型マウスの視床下部における*AgRP*、*Npy*および*POMC*の発現量を逆転写qPCR法により調べたところ、これまでの他の研究グループからの報告と一致して、自由摂食マウスと比べ絶食させた野生型マウスの視床下部における*AgRP*および*Npy*の発現量は著しく増加し、*POMC*の発現量は減少していた。そこで*Brorin*についても同様に検討してところ、絶食させた野生型マウスの視床下部における*Brorin*の発現量は自由摂食マウスと比べて減少していた。

(3) 野生型マウスの各組織における *Brorin* の発現量の検討

Brorin 遺伝子欠損マウスでは通常食飼育時における体重が野生型に比べ有意に増加しており、白色脂肪組織重量が増加していたことより、白色脂肪組織における*Brorin*の発現量について検討した。8週齢の野生型マウスの白色脂肪組織を含む各組織(視床下部、胸腺、脾臓、心臓、肺、肝臓、腎臓、胃、小腸、大腸、精巢上体白色脂肪組織、腸間膜白色脂肪組織、皮下白色脂肪組織、肩甲骨間褐色脂肪組織)における*Brorin*の発現量を逆転写qPCR法により調べたところ、*Brorin*は視床下部において高発現していた。さらに白色脂肪組織と脾臓において、*Brorin*の低レベルの発現が検出された。

(4) *Brorin* 遺伝子欠損マウスの腸間膜白色脂肪組織におけるエネルギー代謝調節に関与している遺伝子の発現量の検討

白色脂肪組織において *Brorin* の低レベルの発現が検出されたことより、*Brorin* がエネルギー代謝制御に関与している可能性が示された。そこで、*Brorin* 遺伝子欠損マウスの腸間膜白色脂肪組織における *Leptin* の発現量を逆転写 qPCR 法により解析した。*Brorin* 遺伝子欠損マウスの腸間膜白色脂肪組織における *Leptin* の発現量は野生型マウスと比較して有意に増加していた。

摂食量の増加が認められた *Brorin* 遺伝子欠損マウスでは、摂食促進ペプチドの発現量が増加していたが、摂食抑制ペプチドである POMC の発現量も増加していた。さらに、*Brorin* 遺伝子欠損マウスの白色脂肪組織で発現量の増加が認められた *Leptin* は代謝調節遺伝子であるとともに摂食抑制因子としても働くことが知られている。今後のさらなる解析により、*Brorin* による摂食制御因子の調節機構が明らかになれば、摂食障害の原因解明および治療法の開発につながると期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Miyake A, Mekata Y, Fujibayashi H, Nakanishi K, Konishi M, Itoh N.	4. 巻 12
2. 論文標題 Brorin is required for neurogenesis, gliogenesis, and commissural axon guidance in the zebrafish forebrain.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0176036
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0176036	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 -

1. 著者名 Nakayama Y, Masuda Y, Ohta H, Tanaka T, Washida M, Nabeshima YI, Miyake A, Itoh N, Konishi M.	4. 巻 7
2. 論文標題 Fgf21 regulates T-cell development in the neonatal and juvenile thymus.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 330
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-017-00349-8	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 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤林英徳、大沼建斗、宮西峻平、三宅歩
2. 発表標題 前脳形成過程における分泌因子ゼブラフィッシュbrorin-likeの役割
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村川由佳、中西和也、加藤千智、三宅歩
2. 発表標題 前脳の神経上皮細胞の分化におけるゼブラフィッシュ Fgf22の作用機序
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中西和也、村川由佳、加藤千智、三宅歩
2. 発表標題 前脳形成過程におけるゼブラフィッシュ Fgf22の役割
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大沼健斗、藤林英徳、三宅歩
2. 発表標題 前脳形成における新規分泌因子ゼブラフィッシュbrorin-likeの役割
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤林 英徳、高橋 都史樹、三宅 歩
2. 発表標題 グリア細胞の分化における新規分泌性因子, ゼブラフィッシュ brorin-like の役割
3. 学会等名 ConBio2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中西和也、村川由佳、三宅 歩
2. 発表標題 前脳形成におけるゼブラフィッシュfgf22 の機能
3. 学会等名 ConBio2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大森 貴俊、中西 和也、加藤 千智、村川 由佳、三宅 歩
2. 発表標題 ゼブラフィッシュfgf22は前脳におけるオリゴデンドロサイトの分化を抑制する
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮西 峻平、大沼 建斗、藤林 英徳、三宅 歩
2. 発表標題 摂食・エネルギー代謝におけるマウスVwc2の機能解析
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤 千智、大森 貴俊、中西 和也、村川 由佳、三宅 歩
2. 発表標題 前脳のオリゴデンドロサイト分化におけるゼブラフィッシュfgf22の役割
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021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
研究協力者	小西 守周 (Konishi Morichika)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------