

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08497

研究課題名(和文)新規生理活性ペプチドNURPが担う新しい生体制御機構の解明

研究課題名(英文) Studies on the biological regulatory mechanisms by a novel bioactive peptide, neuromedin U precursor-related peptide (NURP)

研究代表者

森 健二 (MORI, Kenji)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・室長

研究者番号：00416223

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：プロラクチン分泌促進活性を持つNURPによる生体制御機構を理解するために、その作用機序を検討した。

NURPと同じ前駆体タンパク質から産生されるNMUは、プロラクチン分泌を逆に抑制するが、NURPは、NMU受容体のアンタゴニストとして機能しないことから、独自の受容体を介してプロラクチン分泌を促進することが示唆された。また、NURPの脳室内投与は、視床下部弓状核ではプロラクチン分泌を抑制しているドーパミン神経細胞を活性化せず、その外側領域の神経細胞を活性化していた。加えて、腹側海馬台において特異的な神経細胞の活性化が観察された。これらは、活性化領域でのNURP受容体の存在を示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新しく発見した強力なプロラクチン分泌促進活性を持つ生理活性ペプチドであるNURPについて、その作用機序と脳室内投与によって活性化される神経細胞を検討した結果、NURP受容体を同定するための基礎的情報を得るとともに、本ペプチドの新たな機能の存在を示唆した。これまで、生理活性ペプチドとその受容体は、創薬研究の重要な標的とされてきたことから、本研究の進展により応用研究への発展が期待できる。

研究成果の概要(英文)：To understand the role of neuromedin U precursor-related peptide (NURP), which has potent prolactin-releasing activity, the mechanism of biological regulation by this peptide was examined.

Although neuromedin U (NMU), produced from the same precursor protein as NURP, inversely inhibits prolactin secretion, NURP could not function as an antagonist of the NMU receptors, suggesting that it induces prolactin release through specific receptor for NURP. In addition, in rat brain, intracerebroventricular administration of NURP activated neurons in the hypothalamic arcuate nucleus without activating dopaminergic neurons, which inhibit prolactin secretion from the anterior pituitary. In addition, specific neuronal activation was observed in the ventral subiculum. These data suggest the presence of NURP receptors in the activated region of the rat brain.

研究分野：生化学、内分泌学

キーワード：生理活性ペプチド 神経ペプチド 受容体

1. 研究開始当初の背景

生理活性ペプチドは、ホルモンとしての内分泌的調節に加え、神経ペプチドとして摂食、飲水、性行動及び睡眠覚醒などの本能行動や、生体の恒常性を維持するための自律機能を調節する。このように、生理活性ペプチドは生体機能の調節において広範かつ重要な役割を果たしているため、新しい生理活性ペプチドを同定してその機能を明らかにできれば、未だ知られていない生体制御機構を新たに提唱することができる。このため、新規生理活性ペプチドの探索とその機能解析が古くから盛んに行われており、研究代表者の所属する研究室では、これまでナトリウム利尿ペプチドファミリー (ANP、BNP、CNP) やアドレノメデュリンの発見により新たな循環調節機構を、グレリンの発見により新しい摂食・エネルギー代謝調節機構を明らかにしている。また、ニューロメジン U (neuromedin U: NMU) の発見とその受容体の同定により、NMU が摂食・エネルギー代謝調節に関与することを示した。これらに加えて研究代表者も、NMU 受容体のもう 1 つの内因性リガンドとして新規生理活性ペプチド・ニューロメジン S (neuromedin S: NMS) を発見した。NMS は、視床下部の視交叉上核で特に強く発現しており、同部位に存在する概日時計の位相を変化させる。

NMU と NMS は、同一の活性部位を有する関連ペプチドであるが別々の遺伝子から産生される。それぞれの前駆体タンパク質には、NMU と NMS のアミノ酸配列の他に特徴的に相同性の高い 30 アミノ酸残基程度の領域が存在し、この両端にはプロセシングプロテアーゼによる切断配列 (Arg-Arg) が存在する。更に、これらの構造は全ての動物種で保存されているため、それぞれの前駆体タンパク質から新規生理活性ペプチドが産生されることが強く示唆された。そこで研究代表者は、NMU 前駆体から産生される新規生理活性ペプチドの存在を、特異抗体を用いたアフィニティクロマトにてラット脳及び小腸から当該ペプチドを精製することにより証明し、NMU precursor-related peptide (NURP) と命名した (引用文献)。

2. 研究の目的

ラットの脳室内へ NURP を投与すると、下垂体前葉ホルモンのうちプロラクチンの分泌が特異的に促進する (引用文献)。この他にも、自発運動やエネルギー消費、心拍数を増加し、体温を上昇させるなど NURP の持つ生物活性が示されているが (引用文献)、これらの機能が NURP の生理的役割かは不明である。そこで本研究では、NURP が関与する生体制御機構を明らかにすることを目的として、その作用機序や新たな機能の検討を試みた。

3. 研究の方法

(1) NMU 受容体に対する NURP のアンタゴニスト活性の検討

NMU 受容体 1 型及び 2 型は、NMU により刺激されると細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させる。そこで、NURP が 2 つの NMU 受容体のアンタゴニストとして機能するかを検討した。ラット NMU 受容体 1 型及び 2 型は、それぞれ CHO 細胞で安定的に発現させた。これらの細胞 (3×10^4 cells/well) に $0 \sim 1 \times 10^{-6}$ M の範囲で段階的に希釈したラット NURP36 を 10 分間反応させた後に、アゴニストであるラット NMU を終濃度 1×10^{-9} M となるように添加して、NMU 受容体に対する NURP のアンタゴニスト活性を評価した。NMU による刺激に应答する細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇は、FLIPR を用いた Calcium-mobilization assay にて検出した。

(2) NURP の脳室内投与によって活性化される神経細胞の検討

神経細胞活性化マーカーである cFos タンパク質の発現誘導を免疫組織染色により検出することで、NURP の脳室内投与によって活性化される神経細胞の同定を試みた。生理食塩水もしくは 1 nmole の NURP 又は NMU は、ラットの側脳室に留置したカテーテルを用いて投与し、90 分後に脳組織を摘出した。ラット脳から薄切した凍結切片は、パラホルムアルデヒドで固定した。正常口バ血清を用いてブロッッキング処理した切片は、goat anti-rat cFos antibody と 4 で一晩反応させた後に洗浄し、二次抗体である Alexa-488-labeled anti-goat IgG antibody と反応させた。弓状核のドーパミン神経細胞は、チロシンヒドロキシラーゼとの二重染色にて同定した。この際、一次抗体として rabbit anti-rat tyrosine hydroxylase antibody を、二次抗体として Alexa-555-labeled anti-rabbit IgG antibody を用いた。

4. 研究成果

(1) NMU 受容体に対する NURP のアンタゴニスト活性の検討

これまでに NURP がプロラクチン分泌を特異的に促進するなど、本ペプチドの明確な生物活性を示してきたが、その作用を仲介する NURP の受容体は未だ同定されておらず、その同定は NURP の生理的役割を解明するために不可欠である。

NURP の脳室内投与は、下垂体からのプロラクチンの分泌を特異的に促進するが、同じ前駆体タンパク質から産生される NMU は、プロラクチンの分泌を抑制する (引用文献)。このようにプロラクチン分泌の調節において、NURP と NMU は正反対の機能を示すことから、NURP

は NMU 受容体のアンタゴニストとして機能することで、NMU によるプロラクチン分泌抑制を解除する可能性が考えられた。そこで、CHO 細胞で発現させた NMU 受容体 1 型及び 2 型に対する NURP のアンタゴニスト活性を検討した。

その結果、これらの受容体にアゴニストであるラット NMU ($1 \times 10^{-9} \text{M}$) を反応させると十分な細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が確認されたが、事前にラット NURP を反応させておいても NMU のアゴニスト活性を阻害することができなかった。これは、NURP が NMU 受容体のアンタゴニストとして機能しないことを示しており、NURP は NMU 受容体とは異なる独自の受容体を介してプロラクチン分泌を促進していることが示唆された。

(2) NURP の脳室内投与によって活性化される神経細胞の検討

NURP の生理的役割を明らかにするためには、その作用機序の解明が重要であるが、NURP 受容体は未だ同定できていない。そこで、NURP 受容体の存在を理解することを目的として、NURP の投与によって活性化される細胞の同定を試みた。NURP を脳室内投与すると、強力なプロラクチン分泌促進に加えて、自発運動やエネルギー消費、心拍数を増加し、体温を上昇させるなど、NURP の明確な生物活性が観察できる。そこで、NURP の脳室内投与後に活性化される神経細胞を、マーカーとなる cFos タンパク質の発現誘導を免疫組織染色にて検出することで検討した。

下垂体からのプロラクチンの分泌は、視床下部弓状核のドーパミン神経細胞から分泌されるドーパミンにより抑制的に制御されている。NURP は初代培養した下垂体前葉細胞からのプロラクチン分泌を促進しないことや、ドーパミン受容体アンタゴニストを前投与したラットでは NURP 脳室内投与によるプロラクチン分泌促進活性が消失することから、NURP は視床下部弓状核のドーパミン神経細胞を抑制した結果としてプロラクチン分泌を促進すると考えられている(引用文献)。一方で、同じ前駆体タンパク質から産生される NMU は、弓状核のドーパミン神経細胞を活性化することでプロラクチン分泌を抑制すると考えられる。そこで、NURP 又は NMU を脳室内投与後の視床下部弓状核における神経細胞の活性化を検討した。NMU を脳室内投与すると、視床下部弓状核に存在するチロシンヒドロキシラーゼ陽性ドーパミン神経細胞での cFos タンパク質の発現誘導が観察された。これは、NMU によるドーパミン神経細胞の活性化を示しており、NMU によるプロラクチン分泌抑制活性の考えられるメカニズムと一致した。逆に、NURP を脳室内投与した場合は、弓状核ドーパミン神経細胞での cFos タンパク質の発現誘導は観察されず、NURP がドーパミン神経細胞を抑制するという考察と一致した。興味深いことに、弓状核ではドーパミン神経細胞が局在する外側の領域において、NURP の脳室内投与による神経細胞の活性化が観察された。

その他の脳領域を検討したところ、腹側海馬台において NURP 脳室内投与による神経細胞の特異的な活性化が観察された。同一の領域は NMU 脳室内投与では活性化されていない。また、海馬周辺領域では、 ^{125}I で標識した NURP の特異的な結合が観察されている。これらのことから、腹側海馬台での NURP 受容体の発現が示唆された。

以上の結果は、NURP 受容体を同定するための基礎的な情報であるとともに、本ペプチドの未だ明らかになっていない機能を明らかにするために有効であると考えられる。

<引用文献>

- Mori K, Ida T, Fudetani M, Mori M, Kaiya H, Hino J, Nakahara N, Murakami N, Miyazato M, and Kangawa K: Identification of neuromedin U precursor-related peptide and its possible role in the regulation of prolactin release. *Sci. Rep.* 7, 10468, 2017
- Ensho T, Maruyama K, Mori K, Miyazato M, Kangawa K, Nakahara K, and Murakami N: Neuromedin U precursor-related peptide (NURP) exerts neuromedin U-like sympathetic nerve action in the rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 492, 412-418, 2017
- Nakahara K, Maruyama K, Ensho T, Mori K, Miyazato M, Kangawa K, Uemura R, Sakota H, Nakazato M, and Murakami N: Neuromedin U suppresses prolactin secretion via dopamine neurons of the arcuate nucleus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 521, 521-526, 2020

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Tanaka Y, Taguchi S, Maruyama K, Mori K, Miyazato M, Kangawa K, Murakami N, and Nakahara K	4. 巻 534
2. 論文標題 Comparison of physiological functions between neuromedin U-related peptide and neuromedin S-related peptide in the rat central nervous system.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Commun.	6. 最初と最後の頁 653-658
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.11.025	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 3.Tanaka A, Takayama K, Furubayashi T, Mori K, Takemura Y, Amano M, Maeda C, Inoue D, Kimura S, Kiriyama A, Katsumi H, Miyazato M, Kangawa K, Sakane T, Hayashi Y, and Yamamoto A	4. 巻 17
2. 論文標題 Transnasal delivery of the peptide agonist specific to neuromedin-U receptor 2 to the brain for the treatment of obesity.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mol. Pharm.	6. 最初と最後の頁 32-39
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.molpharmaceut.9b00571	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 2.Nakahara K, Maruyama K, Ensho T, Mori K, Miyazato M, Kangawa K, Uemura R, Sakota H, Nakazato M, and Murakami N	4. 巻 521
2. 論文標題 Neuromedin U suppresses prolactin secretion via dopamine neurons of the arcuate nucleus.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Commun.	6. 最初と最後の頁 521-526
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2019.10.156	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 森健二	4. 巻 91
2. 論文標題 プロラクチン分泌促進活性を持つ新たな生理活性ペプチドの発見	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 697-700
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14952/SEIKAGAKU.2019.910697	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 森健二, 井田隆徳, 中原桂子, 村上昇, 宮里幹也, 寒川賢治
2. 発表標題 1. 新規生理活性ペプチドneuromedin U precursor-related peptide (NURP)の発見とそのプロラクチン分泌促進活性
3. 学会等名 第91回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森健二, 宮里幹也, 寒川賢治
2. 発表標題 8. 新規生理活性ペプチドであるNeuromedin U precursor-related peptideの同定とその機能
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------