

令和 5 年 5 月 27 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06768

研究課題名(和文)新たに発見した視床下部小タンパク質による熱産生低下機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of hypothermia induced by a newly discovered hypothalamic small protein

研究代表者

岩越 栄子(Iwakoshi, Eiko)

広島大学・統合生命科学研究科(総)・特任准教授

研究者番号：50311296

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々は視床下部から新規分泌性小タンパク質NPGLを見出している。哺乳類を用いた先行研究からNPGLが白色脂肪組織における脂肪蓄積を促すことを見出している。本研究では、げっ歯類において、NPGLによる熱産生低下作用を検討することを目的とした。げっ歯類を用いた解析から、NPGLは褐色脂肪組織での脂肪合成と脂肪蓄積を介し、熱産生を低下させることを見出した。形態学的解析から、約50%のNPGL産生細胞がGABA作動性神経細胞であることが分かった。本研究の遂行により、NPGLは視床下部内で作用し、エネルギー消費を低下させ、熱産生を下げる機能があることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々ヒトを含めた哺乳類は恒温動物であり、体温調節は極めて重要である。体温調節の制御理解は、熱中症や低体温症の対策・予防にも繋がる。研究代表者らが発見した新規脳因子のNPGLは脂肪蓄積や肥満などに関わることを見出していたが、本研究の遂行により、褐色脂肪組織の熱産生を抑制していることが明らかになった。本研究成果は、エネルギー代謝調節機構の解明へ重要な新知見を加えたため、学術的にも社会的にも大きな意義を持つ研究であると考えている。

研究成果の概要(英文)：We have discovered a novel small secretory protein, NPGL, in the hypothalamus. Previous studies in rodents have found that NPGL promotes fat accumulation in white adipose tissue. The purpose of this study was to investigate the effect of NPGL on reducing thermogenesis in rodents. In this study, we found that NPGL decreased thermogenesis through fat synthesis and fat accumulation in brown adipose tissue. Morphological analysis revealed that approximately 50% of NPGL-producing cells were GABAergic neurons. This study shows that NPGL produced in the hypothalamus has the function of lowering energy expenditure and thermogenesis.

研究分野：神経生理学

キーワード：視床下部 熱産生 褐色脂肪組織 神経ペプチド

1. 研究開始当初の背景

熱産生を含めた体温調節に関する研究は、代謝調節ホルモンである甲状腺ホルモンや体温のセットポイント維持に働くプロスタグランジンなどの先行研究がある。さらに、温度感受性チャネルである Transient Receptor Potential (TRP) チャネルが発見され、近年、温度生物学の分野が確立されている。一方で熱中症や低体温症による脳への影響が懸念されるが、自律神経系と内分泌系の中枢である視床下部領域への温度が与える影響は解析が進んでいない。

最近、研究代表者らは、過去にどの動物種においても学術論文として報告がなされていなかった小タンパク質(長鎖ペプチド)をコードする新規前駆体遺伝子を発見した(文献)。本新規遺伝子にコードされている小タンパク質は、既知因子とは相同性を示さない 80 アミノ酸残基の分泌性因子であり、C 末端の配列に因み Neurosecretory Protein GL (NPGL) と命名した。ラットにおいて、NPGL の脳室内への慢性投与や視床下部領域における前駆体遺伝子の過剰発現により、白色脂肪組織において脂肪蓄積が生じることを明らかにした(文献)。次に、NPGL による末梢組織への影響を解析したところ、熱産生に関わる褐色脂肪組織が白色脂肪組織化し、最終的に熱産生が低下することが示唆された。また、白色脂肪組織でのノルアドレナリン代謝回転の低下が認められたことから、この熱産生の低下は交感神経活動の低下を介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、研究代表者らが発見した新規脳因子 NPGL が熱産生低下に関与していることを明らかにし、その熱産生の中枢性制御機構を解明することである。

そのために、NPGL 産生細胞の神経ネットワークの解析、熱産生低下への寄与、分子メカニズムの解明を目指した。具体的には、遺伝子改変動物での熱産生能力の解析、褐色脂肪組織への影響、形態学的解析、低温環境曝露処理による NPGL 遺伝子発現の解析等を行い、NPGL の生理作用や生理的意義の解明を行った。

3. 研究の方法

(1) NPGL 遺伝子過剰発現ラットによる表現型解析

ユビキタス発現を可能にする CMV プロモーターの下流に NPGL 遺伝子を連結したベクターをアデノ随伴ウイルス(AAV)にて Wistar ラットの視床下部領域に感染させ、NPGL 遺伝子過剰発現ラットを作製した。褐色脂肪組織への影響と低温環境下での熱産生能を解析した。

(2) NPGL 遺伝子過剰発現マウスによる表現型解析

上記(1)と同様に AAV を用いて C57BL/6 マウスの視床下部に NPGL 遺伝子を過剰発現し、褐色脂肪組織への影響を解析した。個体レベルでのエネルギー消費量への影響を解析するために、呼吸代謝量を測定した。

一方、同様のベクターを ICR マウスの受精卵にインジェクションしてトランスジェニックマウスを作製し、同じく褐色脂肪組織への影響を解析した。

(3) NPGL 産生細胞の形態学的解析

脳内での NPGL 産生細胞の特性及び投射部位を解析することで、褐色脂肪組織への神経連絡を解析し、熱産生低下機構の神経回路網を明らかにする研究を進めた。具体的には、NPGL に対する抗体と古典的神経伝達物質のカテコールアミン、グルタミン酸、ガンマアミノ酪酸(GABA)などを検出するための合成酵素やトランスポーターなどのマーカータンパク質に対する抗体を用いて、免疫組織化学的解析を行った。

(4) 低温環境曝露下における NPGL 遺伝子発現への影響

熱産生能低下と NPGL 遺伝子発現の関係を明らかにするために、飼育温度を 10 に設定し、NPGL mRNA 発現解析を行った。Wistar ラットと C57BL/6 マウスを用い、2 週間低温飼育を行った。2 週間後に視床下部領域をサンプリングし、NPGL 遺伝子の mRNA 発現量を解析した。

4. 研究成果

(1) NPGL 遺伝子過剰発現ラットによる表現型解析

Wistar ラットを用い、NPGL 遺伝子を視床下部領域に 6 週間過剰発現したところ、体重・摂食量の増加は認められなかったが、褐色脂肪組織が白色化することを見出した。脂肪合成・脂肪酸化に関わる酵素群の mRNA 発現を解析したところ、脂肪合成に関わる因子の mRNA 発現が褐色脂肪組織で高まることを見出した。さらに、脂肪合成酵素がタンパク質レベルでも高まっていることを確認した。一方、熱産生に関わる UCP-1 が mRNA レベルでもタンパク質レベルでも発現が低下していることを見出した。この状態で飼育温度を 16 にし、3 日間、腹腔内及び褐色脂肪組織がある肩甲骨間皮下温度を測定したところ、腹腔内では変化が見られなかったが、

肩甲骨間皮下温度の有意な低下を認めた。最後に、褐色脂肪組織内の交感神経活動指標を測定するために、ノルアドレナリン代謝回転を測定したところ、NPGL 遺伝子過剰発現群において、ノルアドレナリン代謝回転の有意な低下を認めた。

以上の解析から、NPGL は褐色脂肪組織への交感神経活動を抑制することで褐色脂肪組織での熱産生を低下させることを明らかにした。この時、同時に褐色脂肪組織内での脂肪合成を促すことで、褐色脂肪組織の白色化を生じさせることも見出した。

(2) NPGL 遺伝子過剰発現マウスによる表現型解析

上記(1)と同様に、C57BL/6 マウスを用い NPGL 遺伝子過剰発現実験を行った。その結果、NPGL 遺伝子過剰発現により、体重と摂食量の顕著な増加に加え、褐色脂肪組織の重量増加と顕著な白色化が観察された。さらに、脂肪合成・脂肪酸化に関わる遺伝子群の有意な増加を見出した。呼吸代謝測定を行ったところ、NPGL 遺伝子過剰発現群において、エネルギー消費量の減少が認められた。

次に、ICR マウスを用いたトランスジェニックマウスを作製したところ、視床下部領域で野生型マウスに比べ約 4 倍成熟 NPGL を産出するラインを得た。生後 26 週目まで解析を行ったところ、摂食量の増加は認められなかったが体重が有意に増加した。体重増加は白色脂肪組織の増加によることが明らかとなった。さらに、褐色脂肪組織での白色化も認められた。

以上の結果から、NPGL は、エネルギー消費量を低下させ、熱産生を下げている可能性が示唆された。

(3) NPGL 産生細胞の形態学的解析

NPGL 抗体及び古典的伝達物質の合成酵素やトランスポーターに対する抗体を用いた免疫組織化学的解析の結果、NPGL 産生細胞は抑制性伝達物質の GABA を産出していることが示された。その割合を解析した結果、約 50%の NPGL 産生細胞が GABA 作動性神経細胞であることが分かった。

我々は、先行研究から、NPGL 神経線維は摂食抑制ニューロンの POMC ニューロンに投射していることを見出している(文献)。このことから、NPGL 産生細胞は POMC ニューロンを介して熱産生を低下させていることが示唆された。

(4) 低温環境曝露下における NPGL 遺伝子発現への影響

Wistar ラットと C57BL/6 マウスを用い、2 週間、10℃の温度環境下で低温飼育を行った。その結果、ラットとマウスでは低温飼育下では摂食量が顕著に増加したものの、体重、脂肪組織重量に違いが認められた。具体的には、ラットでは、2 週間の低温飼育により、体重と白色脂肪組織重量の減少が認められたが、褐色脂肪組織重量に変化は認められなかった。一方、マウスでは、体重に変化は認められないものの、白色脂肪組織重量が低下した一方で、褐色脂肪組織重量が有意に増加した。

低温飼育 2 週間後に視床下部領域をサンプリングし、NPGL 遺伝子の mRNA 発現量を解析した。その結果、ラットでは NPGL 遺伝子の mRNA 発現が上昇したが、マウスでは変化がなかった。

このことから、外部環境温度とエネルギー代謝調節に NPGL が何らかの影響を及ぼしている可能性が示唆された。

本研究では、初めて NPGL が褐色脂肪組織での脂肪合成・脂肪蓄積を介して熱産生を低下させる機能を有することを明らかにした。褐色脂肪組織での交感神経活動の低下を誘導していることも見出した。褐色脂肪組織の機能低下は肥満を促すことが知られており、肥満者のエネルギー消費の減少と熱産生低下に NPGL が関与している可能性が考えられる。

褐色脂肪組織の活性調節を視床下部因子が担っていることを示した本研究は、神経生理学分野に新知見を加えることができ、今後の肥満やエネルギー代謝調節の理解に役立つ成果を出すことができたと考えている。

< 引用文献 >

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)

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)

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)

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 2件/うちオープンアクセス 7件）

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Narimatsu Yuki, Iwakoshi-Ukena Eiko, Fukumura Keisuke, Shikano Kenshiro, Furumitsu Megumi, Morishita Masahiro, Bentley George E., Kriegsfeld Lance J., Ukena Kazuyoshi | 4. 巻 112 |
| 2. 論文標題 Hypothalamic Overexpression of Neurosecretory Protein GL Leads to Obesity in Male C57BL/6J Mice | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Neuroendocrinology | 6. 最初と最後の頁 606 ~ 620 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000518969 | 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 Narimatsu Yuki, Matsuura Daichi, Iwakoshi-Ukena Eiko, Furumitsu Megumi, Ukena Kazuyoshi | 4. 巻 23 |
| 2. 論文標題 Neurosecretory Protein GL Promotes Normotopic Fat Accumulation in Male ICR Mice | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences | 6. 最初と最後の頁 6488 ~ 6488 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms23126488 | 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 Fukumura Keisuke, Narimatsu Yuki, Moriwaki Shogo, Iwakoshi-Ukena Eiko, Furumitsu Megumi, Ukena Kazuyoshi | 4. 巻 26 |
| 2. 論文標題 Overexpression of the Gene Encoding Neurosecretory Protein GL Precursor Prevents Excessive Fat Accumulation in the Adipose Tissue of Mice Fed a Long-Term High-Fat Diet | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Molecules | 6. 最初と最後の頁 6006 ~ 6006 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/molecules26196006 | 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 Naito Mana, Iwakoshi-Ukena Eiko, Moriwaki Shogo, Narimatsu Yuki, Kato Masaki, Furumitsu Megumi, Miyamoto Yuta, Esumi Shigeyuki, Ukena Kazuyoshi | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 Immunohistochemical Analysis of Neurotransmitters in Neurosecretory Protein GL-Producing Neurons of the Mouse Hypothalamus | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Biomedicines | 6. 最初と最後の頁 454 ~ 454 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biomedicines10020454 | 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 Narimatsu Yuki, Iwakoshi-Ukena Eiko, Naito Mana, Moriwaki Shogo, Furumitsu Megumi, Ukena Kazuyoshi | 4. 巻 23 |
| 2. 論文標題 Neurosecretory Protein GL Accelerates Liver Steatosis in Mice Fed Medium-Fat/Medium-Fructose Diet | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences | 6. 最初と最後の頁 2071 ~ 2071 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23042071 | 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 Fukumura Keisuke, Narimatsu Yuki, Moriwaki Shogo, Iwakoshi-Ukena Eiko, Furumitsu Megumi, Ukena Kazuyoshi | 4. 巻 22 |
| 2. 論文標題 Effects of Overexpression of Neurosecretory Protein GL-Precursor Gene on Glucose Homeostasis and Insulin Sensitivity in Mice | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences | 6. 最初と最後の頁 4681 ~ 4681 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22094681 | 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 Kadota Atsuki, Iwakoshi-Ukena Eiko, Fukumura Keisuke, Shikano Kenshiro, Narimatsu Yuki, Furumitsu Megumi, Ukena Kazuyoshi | 4. 巻 22 |
| 2. 論文標題 Effects of Irregular Feeding on the Daily Fluctuations in mRNA Expression of the Neurosecretory Protein GL and Neurosecretory Protein GM Genes in the Mouse Hypothalamus | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences | 6. 最初と最後の頁 2109 ~ 2109 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22042109 | 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 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) 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 |

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 福村圭介、成松勇樹、鹿野健史朗、齋藤鷹也、近藤邦裕、古満芽久美、岩越栄子、浮穴和義 |
| 2. 発表標題 視床下部分泌性小タンパク質の脂肪蓄積作用 |
| 3. 学会等名 第5回食欲・食嗜好の分子・神経基盤研究会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 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 |
| 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（招待講演） |
| 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 |
|---------|---------|
|---------|---------|