

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09009

研究課題名(和文) NMUとの機能的連関に着目した、新規ペプチドホルモンNURPの生理機能の解明

研究課題名(英文) Study on physiological functions of a novel peptide, NURP, focusing on the functional relationship with NMU

研究代表者

丸山 圭介 (MARUYAMA, KEISUKE)

宮崎大学・農学部・准教授

研究者番号：20612386

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)：本研究は新規ペプチドホルモン、ニューロメジンU関連ペプチド(NURP)の生理機能の解明を主たる目的とする。NURPは、摂食及び体温調節などに作用するニューロメジンU(NMU)と同一の前駆体から切り出される。本研究では、NURPとNMUが標的とする脳領域を比較した。その結果、NURPはNMUと異なり、視床下部の各神経核を強く活性化することはなかった。しかし、NURPは腹側海馬台を活性化することを見出した。さらに、このNURPにより活性化される腹側海馬台のニューロン群は、主にGABA発現ニューロンであることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、NURPとNMUの発現と生理的機能における複雑な関係の一端を明らかにした。これまでの内分泌学の歴史において、新規ペプチドホルモンの発見とその生理機能の解明は、内分泌メカニズムの新たな理解に繋がってきた。本研究はその第一歩であり、ニューロメジンUファミリーが担う内分泌メカニズムの解明の研究基盤となっていくと考える。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to elucidate the physiological functions of a novel peptide hormone, neuromedin U-related peptide (NURP). NURP is produced from the same precursor as neuromedin U (NMU). NMU acts on feeding and thermoregulation. In this study, we compared the brain regions targeted by NURP and NMU. As a result, unlike NMU, NURP did not strongly activate the hypothalamus. However, we found that NURP activates the ventral subiculum. Furthermore, it was found that the neurons of the ventral hippocampal formation activated by NURP are mainly GABA-expressing neurons.

研究分野：内分泌学

キーワード：新規ペプチドホルモン ニューロメジンU ニューロメジンU関連ペプチド NMU NURP プロラクチン c-Fos

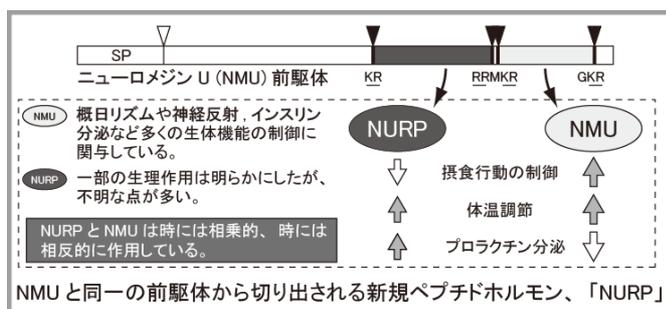
科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

現代社会が抱える医学的な問題のひとつである「肥満」と大きく関連する、エネルギー恒常性の維持において、食欲あるいは体温調節などの自律神経機能は、視床下部により支配される。最近では、ペプチドホルモンがこの視床下部における生体機能調節に深く関与していることが良く知られている。

「ニューロメジン U (NMU)」もそのようなペプチドホルモンのひとつで中枢、末梢に広く発現しており、申請者の所属する研究グループでは、強力な摂食抑制作用や体温上昇作用を有することを明らかにしている。さらに、エネルギー代謝調節のみならず概日リズム制御や痛み、熱に対する反射機能、末梢においてインスリン分泌抑制など、様々な恒常性維持機構に関与している。その中で、最近、申請者は NMU 前駆体に含まれる新たなペプチドホルモン、「ニューロメジン U 関連ペプチド (NURP)」の存在を明らかにした (Mori et al., 2017、Ensho et al., 2017、右図)。NURP はプロセシングの過程において、NMU とは別個のペプチドホルモンとして切り出され分泌される。さらに、申請者はこの NURP が、NMU と同様に



体温上昇作用を有することを見出し、この新規ペプチドホルモンが生理活性を有していることを示した (Ensho et al., 2017)。一方で、摂食制御、プロラクチン分泌調節においては、NURP と NMU はまったく逆の作用を示す (Nakahara et al., 2020)。すなわち、同一の前駆体から産生される NURP と NMU が、時には相乗的に、ある時には相反的に機能していることを示す。さらに、NURP は、NMU の受容体には結合しない。これらの研究成果は、NURP が NMU とは異なる作用機序、生理的役割を持つことを示唆する。しかしながら、これまで明らかにした NURP の生理作用は、限定的であり未解明な部分も多い。

### 2. 研究の目的

生理活性を有する新規ペプチドホルモン、「NURP」の発見は、NMU による中枢及び末梢における恒常性維持機構の制御が、これまで考えられているよりも、より複雑なものであることを強く示唆する。従って、NURP の生理機能を明らかにし、NURP と NMU による生体恒常性維持の制御機構とは、どのようなものか再定義する必要がある。そこで本研究は、NMU との機能的関係性に着目しつつ、中枢及び末梢における NURP の生理機能を明らかにすることを主たる目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) NURP、NMU が標的とする、脳領域の比較 (c-fos 発現を指標とした形態学的解析)

これまでの研究成果を鑑みると、NURP と NMU の作用機序は異なる可能性が高い。そこで、ラット側脳室へ NURP、NMU を投与し、神経活動マーカーである c-fos の脳内発現を免疫染色により比較して、NURP、NMU が標的とする脳領域の違いを明らかにする。また、NURP 投与により活性化するニューロンの特徴づけを行う。

#### (2) NURP が標的とするニューロンの特徴づけ

NURP 投与により活性化するニューロンの特徴づけを、様々な神経マーカーとの蛍光二重免疫染色により行う。

### (3) NURP、NMU 遺伝子の発現変化

プロラクチンの分泌調節においては、NMU がプロラクチン分泌を抑制するのに対して、NURP はプロラクチン分泌を亢進する。しかしながら、相反する作用を有する NURP と NMU を含む前駆体ペプチドの遺伝子が、生理的条件下においてどのように発現変化しているのか、不明である。そこで、生理的にプロラクチン濃度が増加する条件下において、NURP/NMU mRNA の発現変化を調べる。具体的にはまず、発情前期の雌ラットを用いて、子宮頸部を機械的に刺激して偽妊娠ラットを作成する。数日後、二峰性のプロラクチンサージが誘起される時間帯に、この偽妊娠ラットの視床下部を経時的にサンプリングし、リアルタイム PCR 法により発現変化を解析する。

### (4) NURP 発現ニューロンの可視化

NURP、NMU の前駆体の構造から、両ペプチドは同一のニューロンから分泌されると予想されるが、両ペプチドの生理作用の違いを鑑みると、「NURP と NMU は、本当に我々が考えているように、同じニューロンから同時に分泌されるのであろうか？」という疑問を持たざるを得ない。そこで、NURP に特異的な抗体を作製し、ラット脳における NURP 発現ニューロンの局在を明らかにする。

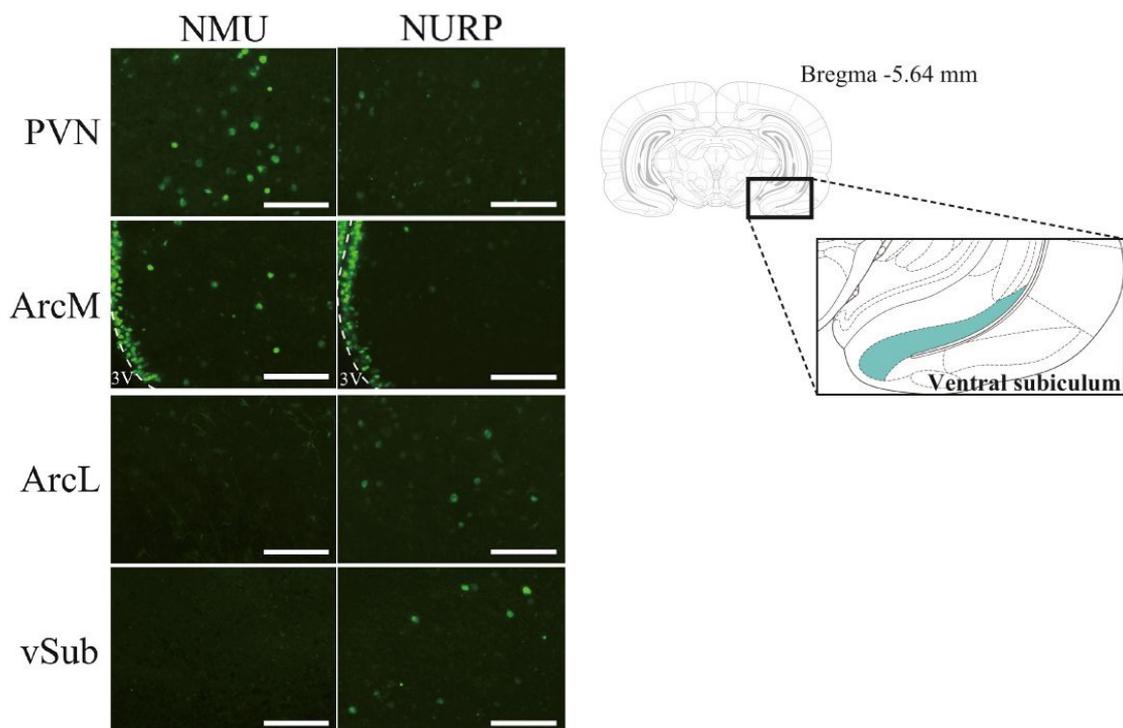
### (5) 膵 細胞のグルコース応答性インスリン分泌における NURP の作用の探索

マウス単離膵島あるいは膵 細胞株を用いて、グルコース応答性インスリン分泌における NURP の作用を明らかにする。

## 4. 研究成果

### (1) NURP、NMU が標的とする、脳領域の比較 (c-fos 発現を指標とした形態学的解析)

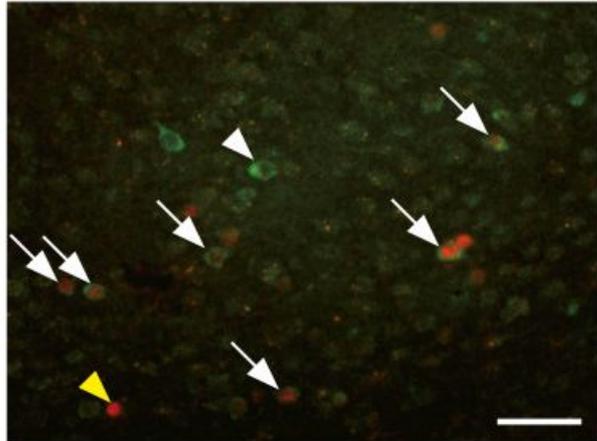
ラット側脳室へ NURP、NMU を投与し、c-fos の脳内発現を免疫染色により比較した。その結果、NMU の投与では室傍核 (PVN) などを含む視床下部領域に多くの c-fos 発現が認められた。また、プロラクチン分泌の制御に関与する弓状核内側 (ArcM) においても、強い c-fos 発現が認められた (下図、Tanaka et al., 2021 改変)。



一方、NURP 投与では弓状核外側 (ArcL) などのごく一部の視床下部領域にしか c-fos 発現が観察されなかった。しかしながら、NURP 投与群の脳切片では、腹側海馬台 (Ventral subiculum, vSub) と呼ばれる神経核に c-fos 発現が観察された (上図)。

### (2) NURP が標的とするニューロンの特徴づけ

腹側海馬台は情動行動や不安行動に関連する脳領域と考えられている。そこで、このニューロン群はどのような特徴を持つのか、c-Fos 抗体と各種ニューロンマーカーとの二重蛍光免疫染色により検討した。その結果、NURP 投与により活性化するニューロン群の多くは、GAD67 陽性であり、GABA 作動性ニューロンであることが分かった (右図、Tanaka et al., 2021、赤: c-Fos 陽性 緑: GAD67 陽性)。腹側海



馬台の GABA 作動性ニューロン群は不安行動と関連することが報告されており、本研究の結果と考え合わせると、NURP が腹側海馬台において、不安行動の発現に関与している可能性が示唆される。

### (3) NURP、NMU 遺伝子の発現変化

偽妊娠誘導から 5 日後、深夜 22 時から翌朝 6 時まで、2 時間ごとに、採血および視床下部のサンプリングを実施した。コントロール群として、発情後期の雌ラットを用いて、深夜 22 時に同様のサンプリングを行った。その結果、血中プロラクチン濃度は 22 時、0 時においてコントロール群と同様に低い値を示したが、2 時から濃度が上昇し始め、6 時に最も高い値を示した (ノクターナルサージ)。一方、NURP/NMU mRNA の発現はプロラクチン濃度が低い 22 時や 0 時では高い値を示したが、プロラクチン上昇がみられた 2 時以降ではその発現量は半分ほどに減少した。つまりノクターナルサージにおけるプロラクチン濃度上昇局面では、NMU の産生は低下していると考えられる。従って、プロラクチンの分泌抑制作用を有する NMU の発現低下が結果的にプロラクチンの分泌亢進につながっている可能性が示唆される。

### (4) NURP 発現ニューロンの可視化

ラット脳における NURP 発現ニューロンの局在を明らかにするため、ラット NURP に対する特異的抗体を作製し、免疫染色による可視化を試みた。各種染色法を用いて実験条件の最適化を進めたものの、特異的な陽性反応を得ることはできなかった。

### (5) 膵 細胞のグルコース応答性インスリン分泌における NURP の作用の探索

マウス単離膵島あるいは膵 細胞株を用いて、グルコース応答性インスリン分泌における NURP 添加の影響を調べた。その結果、NURP がインスリン分泌に影響を及ぼす可能性があることがわかった。

#### < 引用文献 >

1. Mori K, Ida T, Fudetani M, Mori M, Kaiya H, Hino J, Nakahara K, Murakami N, Miyazato M, Kangawa K. Identification of neuromedin U precursor-related peptide and its possible role in the regulation of prolactin release. *Sci Rep.* 7, 10468, 2017

2. Ensho T, Maruyama K (Equal contribution), Mori K, Miyazato M, Kangawa K, Nakahara K, 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.
3. Nakahara K, Maruyama K, Ensho T, Mori K, Miyazato M, Kangawa K, Uemura R, Sakoda H, Nakazato M, Murakami N. Neuromedin U suppresses prolactin secretion via dopamine neurons of the arcuate nucleus. *Biochem Biophys Res Commun.* 521, 521-526, 2020.
4. Tanaka Y, Taguchi S, Maruyama K, Mori K, Miyazato M, Kangawa K, Murakami N, Nakahara K. Comparison of physiological functions between neuromedin U-related peptide and neuromedin S-related peptide in the rat central nervous system. *Biochem Biophys Res Commun.* 534, 653-658, 2021.

## 5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Tanaka Yukie, Taguchi Shimon, Maruyama Keisuke, Mori Kenji, Miyazato Mikiya, Kangawa Kenji, Murakami Noboru, Nakahara Keiko	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 Biochemical and Biophysical Research Communications	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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Maruyama Keisuke, Kaiya Hiroyuki, Miyazato Mikiya, Murakami Noboru, Nakahara Keiko, Matsuda Kouhei	4. 巻 517
2. 論文標題 Purification and identification of native forms of goldfish neuromedin U from brain and gut	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 433 ~ 438
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.07.108	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 -
1. 著者名 ENSHO Takuya, MARUYAMA Keisuke, QATTALI Abdul Wahid, YASUDA Masahiro, UEMURA Ryoko, MURAKAMI Noboru, NAKAHARA Keiko	4. 巻 81
2. 論文標題 Comparison of glucose tolerance between wild-type mice and mice with double knockout of neuromedin U and neuromedin S	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 1305 ~ 1312
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.19-0320	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 -
1. 著者名 Islam Md Nurul, Mita Yuichiro, Maruyama Keisuke, Tanida Ryota, Zhang Weidong, Sakoda Hideyuki, Nakazato Masamitsu	4. 巻 244
2. 論文標題 Liver-expressed antimicrobial peptide 2 antagonizes the effect of ghrelin in rodents	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Endocrinology	6. 最初と最後の頁 13 ~ 23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1530/JOE-19-0102	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 -

1. 著者名 Nakahara Keiko, Maruyama Keisuke, Ensho Takuya, Mori Kenji, Miyazato Mikiya, Kangawa Kenji, Uemura Ryoko, Sakoda Hideyuki, Nakazato Masamitsu, Murakami Noboru	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 Biochemical and Biophysical Research Communications	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 杉山和気、松居裕司、村上 昇、丸山圭介、中原桂子
2. 発表標題 偽妊娠ラットにおけるニューロメジンU (NMU) とNMU前駆体関連ペプチドの発現解析
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田口 史門、延生 卓也、森 健二、宮里 幹也、寒川 賢治、丸山 圭介、村上 昇、中原 桂子
2. 発表標題 ニューロメジンS前駆体中の新規ペプチド (NSRP) の生理機能の探索
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
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
研究分担者	張 維東 (ZHANG WEIDONG) (90753616)	宮崎大学・医学部・助教  (17601)	

#### 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
---------	---------