

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 25 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21500329

研究課題名（和文） 脳ペプチドRLN3の機能形態学的研究—情動・摂食系への関与解明—

研究課題名（英文） Functional morphology of neuropeptide RLN3 -survey for the involvement in emotion and food intake-

研究代表者

田中 雅樹 (TANAKA MASAKI)

京都府立医科大学・医学研究科・准教授

研究者番号：80264753

研究成果の概要（和文）：

新規の脳ペプチド、relaxin-3 (RLN3)の生理機能探究のために遺伝子ノックアウト(KO)マウスを作製し一連の行動解析を行った。KO、およびヘテロマウスは野生型とほぼ同じ体重増加を示し寿命も野生型と差がなかった。不安状態検索で、軽度の抗不安様行動を示し、RLN3は情動行動に関与することが示唆された(Watanabe Y et al, Front Behav Neurosci 2011)。またRLN3脳室内投与を行ったラットに摂食亢進作用が見られ、反応するニューロンは、受容体の存在する視床下部室傍核(PVN)にc-Fos発現がみられた。PVNではCRFニューロンにc-Fosが誘導され、脳室内投与後血中ACTHも有意な上昇がみられた。以上よりRLN3はストレス応答の主軸である視床下部一下垂体系のCRF-ACTH反応を活性化させることも明らかになった(Watanabe Y et al, J Mol Neurosci 2011)。このようにRLN3は情動、摂食、ストレスを調節するペプチドであると思われ、さらに精査が望まれる。

研究成果の概要（英文）：

In order to investigate the function of newly peptide relaxin-3 (RLN3), we have made gene knockout mice and examined a battery of the behavioral tests. RLN3 KO mice exhibited normal growth and appearance, and were generally indistinguishable from wild genotype littermates. There was no difference in bodyweight among genotypes. However, KO mice exhibited a robust increase in the tendency to enter open arms in the elevated plus maze test. Thus RLN3 KO mice exhibit mild anxiolytic characteristics relative to wild-type mice, suggesting that this peptide is involved in anxiety-related behavior (Watanabe Y et al, Front Behav Neurosci 2011). We also investigated the hypothalamic action of RLN3 to stress-responding system by administrating it into the cerebral ventricle. RLN3 induced larger number of c-Fos expressions in the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN) after 1nmol icv injection compared with saline injection. A part of c-Fos in the anterior PVN was induced in the CRF containing neurons. Plasma ACTH level was also increased 15 min after RLN3 administration. These results suggest that RLN3 is able to stimulate hypothalamo-pituitary CRF-ACTH system which responds to external stress in acute phase (Watanabe Y et al, J Mol Neurosci 2011). I wrote a review article to summarize the function of RLN3 in the view of stress and food intake (Tanaka M, FEBS J, 2010).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経解剖学

キーワード：relaxin-3; knock out; behavioral test; anxiety; mouse

1. 研究開始当初の背景

Relaxin-3(RLN3)は2002年に発見された新規ペプチドで、これまで我々はRLN3の脳内発現について詳細な解析を行い、脳幹橋の背側正中部、第4脳室に面したNuclius Incertus (NI)と呼ばれる神経核のグリアではなくニューロンに集積発現することを免疫組織化学法やin situ hybridization法を用いて明らかにした。そして生理機能として中枢性のストレス制御に関与することを示した(Tanaka M, Eur J Neurosci 2005)。また発育期における分布や、発現がセロトニンの制御を受けることを報告した(Miyamoto Y, Regul Pept 2008)。RLN3陽性の軸索投射先の分布より、生理機能は視床下部機能や情動行動に作用することが強く疑われ、最近摂食亢進作用も指摘されていた。このようなことから、摂食、情動行動という観点から検索を行うために、RLN3遺伝子ノックアウトマウスを作製して、解析を開始した。

2. 研究の目的

1. 新規の脳ペプチドRLN3の生理機能を解明するために遺伝子ノックアウト(KO)マウスを作製し、行動解析を行うとともに、摂食、情動に関連のある視床下部、扁桃体における網羅的な遺伝子発現解析をKO、野生型マウ

スの組織を用いて検索する。

2. RLN3を脳室内投与して、視床下部下垂体系の変動を探る。

3. 研究の方法

1. RLN3 KOマウスを用いた解析：KOマウスの繁殖性、体重増加、寿命など一般的な性状を調べるとともに一連の行動テストバッテリーを行って行動量、不安様行動、うつ様行動、痛覚反応などをチェックし、脳神経系に異常がないか検索する。

2. マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析：野生型、ノックアウトそれぞれ成熟マウス5匹ずつの視床下部、扁桃体の組織を採取、total RNAを抽出して、Affymetrix社のGeneChipを用いて検索する。特に情動、摂食関連ペプチド、並びに受容体遺伝子に注目してサーチする。変動のみられた遺伝子について、リアルタイムPCRとin situ hybridizationを行って発現の差を確かめる。

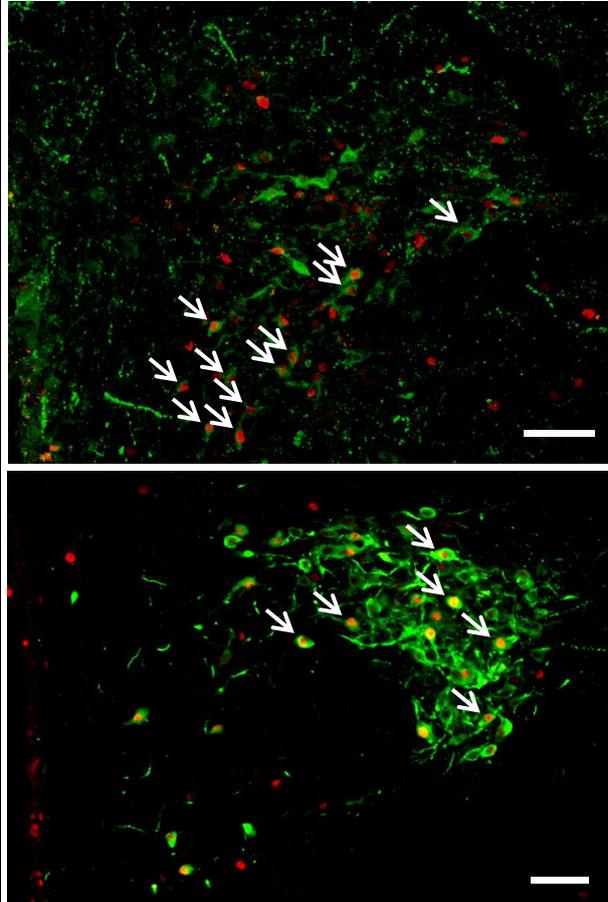
3. RLN脳室内投与実験：RLNを脳室内に投与して、摂食行動の変化を調べる。さらに視床下部内のいかなる神経細胞がRLNに反応するのかをimmediate early geneであるc-Fosをマーカーにして検索する。

4. 研究成果

新規の脳ペプチド、relaxin 3 (RLN3)/insulin like peptide 7 (INSL7)の生理機能探究のために、RLN3のエクソン1, 2をlacZ遺伝子とネオマイシンカセットで置換した遺伝子ノックアウト(KO)マウスを作製した。8回のバッククロスを経てRLN3遺伝子両端近傍のサテライトマーカー2つがC57系に置換したマウスを用いた。KOマウスでは遺伝子およびタンパク質発現が脳内に見られないことを組織化学で確認した後一連の行動解析バッテリーを行った。KO、およびヘテロマウスは野生型とほぼ同じ体重増加を示し、寿命も野生型と差がなかった。不安状態検索で、open fieldや明暗試験では差がないものの、高架式十字迷路では有意にopen armでの滞在回数と滞在時間がKOマウスでは長く、軽度の抗不安様行動を示した(Watanabe Y et al, Front Behav Neurosci 2011)。不安、情動と関係の深い扁桃体、をターゲットにKO、WTマウスのRNAを抽出してGeneChipを用いたマイクロアレイによる遺伝子発現の網羅的解析を行った。45037遺伝子のうちKOがWTより2倍以上増加しているのが102遺伝子、0.5倍以下に低下しているものが31遺伝子あった。情動、摂食関係ではmelanin concentrating hormone (MCH)が3.7倍と増加がみられ、定量PCR検索でもKOマウスの有意な増加が見られた。

次に、RLN3脳室内投与を行った。脳室内投与後2時間でRLN3を投与したラットは約4gの摂食亢進作用が見られた。反応するニューロンをc-Fos発現をマーカーとして摂食関連領域を探索すると、受容体の存在する室傍核(PVN)、視索上核(SON)にc-Fos発現がみられた。外側視床下部や弓状核にはほとんど発現がみられず、PVNやSONを介した

摂食亢進作用が示唆された。そこでいかなる神経ペプチドにc-Fosが誘導されるか二重免疫法で検索すると、PVNではCRF(下図a)やAVP(下図b)との共存が見られた。



RLN3はストレス反応調節物質でもあるので、脳室内投与後血中ACTHを測定すると生理食塩水投与群に比べて有意な上昇がみられ、またPVNでのCRF mRNA発現の増加も認められた。このことからRLN3はストレス応答の主軸である視床下部一下垂体系のCRF-ACTH反応を活性化させることが明らかになった(Watanabe Y et al, J Mol Neurosci 2011)。

その他、RLN3遺伝子の転写亢進に細胞内cAMP-PKA pathwayが重要であることを培養細胞用いた系で証明し活性化プロモーター領域がexon1の5'上流60-117の領域に存在することを報告した(Tanaka M et al, J Neurosci Res, 2009)。またこの約60塩基対

の領域に結合して RLN3 遺伝子の転写を活性化する転写因子を探索する過程で新規の STAT5A のスプライシングバリエントをクローニングしてこのバリエントが STAT5A の full length の機能を抑制することを明らかにして報告した(Watanabe Y et al, FEBS J, 2009)。

以上、これまでの RLN3 に関する我々のデータを中心にしてストレス、摂食関連タンパク質として FEBS Journal 誌へ総説を發表した (Tanaka M, FEBS J, 2010)。

今後、MCH との相関についてさらに検索を進めていくとともに、KO マウスに高脂肪食を与えるなどして摂食行動に変化が見られないか検討する予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

- ① Yoshimoto K, Watanabe Y, Tanaka M, Kimura M. Serotonin2C receptors in the nucleus accumbens are involved in enhanced alcohol-drinking behavior. European Journal of Neuroscience, 査読有, vol 35, 2012, 1368-1380, DOI: 10.1111/j.1460-9568.2012.08037.x.
- ② Watanabe-Hosomi A, Watanabe Y, Tanaka M, Nakagawa M, Mizuno T. Transendocytosis is impaired in CADASIL-mutant NOTCH3. Experimental Neurology, 査読有, vol 233, 2012, 303-311, DOI: 10.1016/j.expneurol.2011.10.020.
- ③ Watanabe Y, Tsujimura A, Takao K, Nishi K, Ito Y, Yasuhara Y, Nakatomi Y, Yokoyama C, Fukui K, Miyakawa T, Tanaka M. Relaxin-3-deficient mice showed slight alteration in anxiety-related behavior. Frontier in Behavioral Neuroscience, 査読有, vol 5, 2011, 50, DOI: 10.3389/fnbeh.2011.00050.
- ④ Watanabe Y, Miyamoto Y, Matsuda T, Tanaka M. Relaxin-3/INSL7 Regulates the Stress-response System in the Rat Hypothalamus. Journal of Molecular Neuroscience, 査読有, vol 43, 2011, 169-174, DOI: 10.1007/s12031-010-9468-0.
- ⑤ Watanabe Y, Tanaka M. p62/SQSTM1 in autophagic clearance of a non-ubiquitylated substrate. Journal of Cell Science, 査読有, vol 124, 2011, 2692-2701, DOI: 10.1242/jcs.081232.
- ⑥ Kikuchi M, Watanabe Y, Tanaka M, Akaji K, Konno H. Synthesis and cytotoxicity of the depsipeptides analogues of callipeltin B. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 査読有, vol 21, 2011, 4865-4868, DOI: 10.1016/j.bmcl.2011.06.026.
- ⑦ Tanaka M. Newly-discovered neuropeptides in the hypothalamus. FEBS Journal, 査読有, vol 277, 2010, 4989, DOI: 10.1111/j.1742-4658.2010.07930.x.
- ⑧ Tanaka M. Relaxin-3/insulin-like peptide 7, a neuropeptide involved in the stress response and food intake. FEBS Journal, 査読有, vol 277, 2010, 4990-4997, DOI: 10.1111/j.1742-4658.2010.07931.x.

⑨ Tatebe H, Watanabe Y, Kasai T, Mizuno T, Nakagawa M, Tanaka M, Tokuda T. Extracellular neurosin degrades alpha-synuclein in cultured cells. Neuroscience Research, 査読有, vol 67, 2010, 341-346, DOI: 10.1016/j.neures.2010.04.0081742-4658.2010.07930.x.

⑩ Tanaka M, Watanabe Y, Yoshimoto K. Regulation of relaxin 3 gene expression via cAMP-PKA in a neuroblastoma cell line. Journal of Neuroscience Research, 査読有, vol 87, 2009, 820-829, DOI: 10.1002/jnr.21895.

⑪ Watanabe Y, Ikegawa M, Naruse Y, Tanaka M. A novel splicing variant form suppresses the activity of full-length signal transducer and activator of transcription 5A. FEBS Journal, 査読有, vol 276, 2009, 6312-6323, DOI: 10.1111/j.1742-4658.2009.07339.x.

[主な学会発表] (計 4 件)

- 1) Tanaka M. Hypothalamic function and gene expression of relaxin3/INSL7. The satellite symposium "Neuroendocrine Functions of G-protein-coupled receptors (GPCRs)", Mar. 2010; Kyoto, Japan.
- 2) Tanaka M, Watanabe Y, Miyamoto Y. Involvement of relaxin3/INSL7 in the stress-responding system. The 7th International Congress of Neuroendocrinology, Jul. 2010; Rouen, France.
- 3) 田中雅樹, 渡邊義久. 脳ペプチド relaxin3/INSL7 の発現と機能. シンポジウ

ム: ホメオスタシス制御中枢における機能・形態・行動解析の update. 第 115 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2010 年 3 月 28-30 日; 盛岡.

- 4) 渡邊義久, 辻村敦, 高雄啓三, 宮川剛, 田中雅樹. Behavior analysis of relaxin-3 deficient mice. 第 34 回日本神経科学大会, 2011 年 9 月 14-17 日; 横浜.

[その他]
ホームページ

<http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/cellbio/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 雅樹 (TANAKA MASAKI)
京都府立医科大学・医学研究科・准教授
研究者番号: 80264753

(2) 研究分担者

渡邊義久 (WATANABE YOSHIHISA)
京都府立医科大学・医学研究科・助教
研究者番号: 50363990