

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2010～2013

課題番号：22687004

研究課題名(和文) 視床下部で見出した新規摂食関連遺伝子及び翻訳産物の生理機能解明

研究課題名(英文) Study on physiological function of a novel food intake-regulatory hypothalamic gene and its transcript

研究代表者

浮穴 和義 (Ukena, Kazuyoshi)

広島大学・総合科学研究科・准教授

研究者番号：10304370

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 16,400,000円、(間接経費) 4,920,000円

研究成果の概要(和文)：最近、鳥類や哺乳類の視床下部に特異的に発現している新規の遺伝子を発見した。絶食や肥満状態等のエネルギー代謝状態の変化に応じてmRNA発現量が変化することから、摂食調節に関わっている新規調節遺伝子であると予想している。また、新規遺伝子の翻訳産物は神経ペプチドの前駆体タンパク質であると考えている。本研究では、翻訳産物である神経ペプチドの同定、摂食行動への影響、既知物質との形態学的な局在比較、末梢シグナル因子との相互作用、系統発生的な知見からの解析等の多岐にわたる解析を行った。

研究成果の概要(英文)：Recently, we have identified a novel hypothalamic gene which encodes a neuropeptide in the avian and mammalian brains. As the mRNA expression was changed during different energy states such as fasting and obesity, we predict that this novel gene may be involved in the energy homeostasis, especially food intake. In this study, we investigated the following analyses, identification of mature endogenous peptide, effect on food intake, histological relationships with known substances, regulatory mechanism by peripheral substances, and phylogenetic analysis.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・形態・構造

キーワード：神経ペプチド 視床下部 摂食調節

1. 研究開始当初の背景

我々は、鳥類や哺乳類において脳の視床下部弓状核付近に特異的に発現している新規遺伝子を最近発見した。この視床下部弓状核は脂肪細胞から分泌される摂食抑制因子であるレプチンをダイレクトに受容する部位であり、また、摂食調節関連因子が多数発現している部位であることから、摂食行動に重要な働きをしていることが知られている。ラットを用いた解析から、絶食、肥満モデル動物、糖尿病モデル動物へのインスリン補給などの条件で新規遺伝子 mRNA 発現量が変動することを見出している。以上の解析から、新規遺伝子は新しい摂食調節関連遺伝子であると考えている。さらに、この新規摂食調節関連遺伝子から翻訳されるタンパク質には分泌性ペプチドがコードされていると推測しており、新規神経ペプチドの前駆体遺伝子である可能性が高い。

2. 研究の目的

本研究の目的は、研究課題にある通り、新規摂食調節関連遺伝子及び翻訳産物の生理機能を解明することである。まず、新規摂食調節関連遺伝子が神経ペプチドの前駆体遺伝子であることを証明するために、培養細胞を用いた成熟ペプチドの同定を行った。さらに、合成ペプチドを作製し、脳室内へ単回投与を行い、摂食行動への影響を解析した。加えて、新規神経ペプチド抗体を用いた内因性ペプチド中和作用による影響を解析した。一方、既知の摂食調節因子との相関を解析する目的で、形態学的解析を行い、既知因子との共局在の可能性を解析した。また、末梢シグナルとの相互作用を解析する目的で、レプチンに着目して解析した。最後に、系統発生的な見地から、ゲノム情報を活用したバイオインフォマティクス解析により、新規遺伝子の脊椎動物における保存性と多様性を解析した。

3. 研究の方法

本研究では、主に培養細胞、ニワトリ及びラットを用いて以下の解析を行った。

新規摂食調節関連遺伝子から産出される成熟神経ペプチドの同定

新規摂食調節関連遺伝子のオープンリーディングフレームを含む DNA を培養細胞 (マウス神経芽細胞腫 NS20Y 細胞、CHO 細胞、マウス下垂体由来細胞 AtT20 細胞) にトランスフェクションし、分泌されたペプチドをウエスタンブロッティング及び質量分析にて解析した。

神経ペプチドの摂食行動への影響

神経ペプチドを大腸菌組換えタンパク質発現法及びペプチド化学合成法により産出し、脳手術を施しニワトリとラットへ投与し、摂食行動へ及ぼす影響を解析した。

既知の摂食調節因子との形態学的相関解析

我々の先行研究により、発見した新規摂食調節関連遺伝子の mRNA 発現量が視床下部弓状核近傍に発現していることは明らかとなっていたが、翻訳産物の神経ペプチドに対する特異的な抗体が得られていなかったために、翻訳産物に関する形態解析を行うことが出来なかった。本研究で、新規神経ペプチドに対する抗体を得ることに成功したので、弓状核付近に発現していることが明らかになっている既知因子との共存の可能性や神経線維の投射部位を解析した。

末梢シグナルによる新規摂食調節関連遺伝子の発現制御機構の解析

我々の先行研究により、新規摂食調節関連遺伝子の mRNA 発現量がレプチン受容体異常ラット (Zucker fa/fa) において低下していることを見出していたため、本研究ではより詳細にレプチンと新規摂食調節関連遺伝子の相互作用を解析した。そのために肥満モデル動物であるレプチン欠損 (ob/ob) マウスを用いて新規摂食調節関連遺伝子の発現解析を行うと同時に、レプチン投与によるレスキュー実験を行った。また、同じく肥満モデル動物であるレプチン受容体異常 (db/db) マウスでも解析を行った。さらに、レプチン受容体以降のシグナル伝達機構をリン酸化 STAT3 に着目して解析した。

新規摂食調節関連遺伝子の脊椎動物における存在

我々の先行研究から、鳥類のニワトリ、哺乳類のラット、マウス、ヒトにおいて新規摂食調節関連遺伝子 mRNA が脳内に発現していることを明らかにしている。本研究では、バイオインフォマティクスにより脊椎動物全般にわたり、新規摂食調節関連遺伝子が保存されているかについて詳細な解析を行った。

4. 研究成果

新規摂食調節関連遺伝子から産出される成熟神経ペプチドの同定

翻訳産物である前駆体タンパク質の配列から、成熟神経ペプチドは約 80 アミノ酸残基から構成されていると予想していた。そこで、この部分のペプチドを抗原として抗体を作製した。その後、前駆体遺伝子のオープンリーディングフレームを含む DNA を培養細胞にトランスフェクションし、培養液中に分泌された神経ペプチドをウエスタンブロット法により解析した。まず、NS20Y 細胞を用いた実験では、分泌される神経ペプチドが微量であったため、解析に至らなかった。そこで、CHO 細胞で解析を行ったところ、多量に培地へ分泌されていることが明らかと

なった。質量分析の結果、N末端部分はシグナルペプチド直後であることが検出できたが、C末端部分は予想していた部位よりもアミノ酸残基のより長いペプチドが複数存在していることが明らかとなった。これは、CHO細胞ではC末端部分を正確に切断する活性を持つプロセッシング酵素の作用が弱いと考え、次に下垂体前葉細胞由来のAtT20細胞を用いた。その結果、80アミノ酸残基の成熟ペプチドと予想される位置に陽性バンドを検出することが出来た。この結果から、新規遺伝子から80アミノ酸残基からなる神経ペプチドが成熟ペプチドとして切り出され細胞外へ分泌されることが示唆された。さらに、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いた解析により、ペプチド内部に一組のジスルフィド結合を有していることが示唆された。

神経ペプチドの摂食行動への影響

大腸菌組換えタンパク質発現系やペプチド化学合成法により効率よく合成神経ペプチドを産出できるシステムを確立した。その後、本合成ペプチドを用いてニワトリ及びラットの脳室内へ単回投与し、摂食行動へ及ぼす影響を解析した。その結果、ニワトリでは摂食行動を抑制する効果が認められた。一方、ラットにおいては普通食給餌下では顕著な効果は認められなかったが、高カロリー食給餌下では摂食行動を促進した。さらに、神経ペプチドに対する特異的抗体を脳室内へ投与し摂食量を測定したところ、普通食給餌下においても摂食行動が抑制された。これらの結果から、ラットにおいて新規神経ペプチドは摂食行動を促進する作用を有することが示された。

既知の摂食調節因子との形態学的相関解析

新規神経ペプチドに対する特異的な抗体を用い免疫染色を行ったところ、弓状核尾側部と結節乳頭体核に新規神経ペプチドの免疫陽性細胞が検出できた。この結果は、先行研究の *in situ* ハイブリダイゼーション法により解析していた新規遺伝子 mRNA 発現細胞の局在と完全に一致した。また、ニューロペプチドYや MSH発現細胞等との局在比較を行ったところ、これら既知の摂食調節関連因子とは発現細胞は異なることが明らかとなった。一方、唯一共局在が示された既知因子として、神経ペプチドのガラニンが検出できた。弓状核尾側部において約半数の細胞で両者が共存していた。また、新規神経ペプチドの免疫陽性線維は視床下部内に分布していることが明らかとなった。

末梢シグナルによる新規摂食調節関連遺伝子の発現制御機構の解析

まず、肥満を呈するレプチン欠損 (ob/ob) マウスにおける新規摂食調節関連遺伝子の

mRNA 発現解析を行ったところ、痩せ型のコントロールマウスに比べ発現量が有意に減少していた。そこで、レプチン欠損 (ob/ob) マウスにレプチンを補充するレスキュー実験を行ったところ、新規摂食調節関連遺伝子 mRNA 発現量はコントロールレベルにまで回復した。一方、レプチン受容体異常 (db/db) マウスでも解析を行ったところ、レプチン欠損 (ob/ob) マウスと同様に、コントロールマウスに比べ発現量が有意に減少していた。この研究から、新規摂食調節関連遺伝子はレプチンにより発現調節を受けている可能性が示唆された。次に、新規神経ペプチド産生細胞がレプチンをダイレクトに受け取っているのかを解析する目的で、レプチンを脳室内へ投与し、その後リン酸化 STAT3 の発現を免疫組織化学的手法により解析した。その結果、新規神経ペプチド産生細胞にはリン酸化 STAT3 は検出されなかった。以上の結果から、レプチンは新規摂食調節関連遺伝子発現細胞に間接的に作用し、発現制御を行っている可能性があると考えられた。

新規視床下部遺伝子の脊椎動物における存在

我々の先行研究から、鳥類と哺乳類において新規摂食調節関連遺伝子が存在していることを見出している。近年、大量のゲノム情報のデータ構築が進んでおり、この新規摂食調節関連遺伝子の系統発生的保存性や多様性を理解することは、新規摂食調節関連遺伝子及びその翻訳産物である神経ペプチドの生理的意義を考察するうえで極めて重要であると考えた。そこで、パイオインフォマティクス解析により新規摂食調節関連遺伝子の存在を解析した。その結果、脊椎動物全般において本新規摂食調節関連遺伝子は存在しており、無顎類のヤツメウナギにおいても存在が示唆された。今後、ゲノム情報のみならず転写産物の解析を行うことで、新規摂食調節関連遺伝子の発現部位や機能が解明できると考えている。

以上の一連の研究推進により、研究開始時点では不明であった多くの疑問が解決できた。具体的には以下の通りである。新規摂食調節関連遺伝子は神経ペプチドの前駆体遺伝子であること、摂食行動に関わる因子であること、ガラニンと共局在している神経細胞が存在していること、新規摂食調節関連遺伝子はレプチンにより間接的に発現が正に調節されていること、新規摂食調節関連遺伝子は脊椎動物で高度に保存された遺伝子であること、である。

本研究により、新規摂食調節関連遺伝子及び翻訳産物である神経ペプチドに関し、今後の詳細な生理機能及び生理的意義の解明のための知見が得られたと考えている。

(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13件)全て査読有

1. Ukena K, Osugi T, Leprince J, Vaudry V, Tsutsui K. MOLECULAR EVOLUTION OF GPCRS: 26Rfa/GPR103. *J. Mol. Endocrinol.* 52:T119-T131 (2014)
2. 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)
3. Masuda K, Iwakoshi-Ukena E, Bessho Y, Taniuchi S, Maejima S, Shikano K, Kondo K, Furumitsu M, Ukena K. Identification of neurotensin and LANT-6 and localization of mRNA encoding their precursor in the chicken brain. *Zool. Sci.* 31:353-359 (2014)
4. Ukena K, Tachibana T, Tobari Y, Leprince J, Vaudry H, Tsutsui K. Identification, localization and function of a novel neuropeptide, 26RfA, and its cognate receptor, GPR103, in the avian hypothalamus. *Gen. Comp. Endocrinol.* 190:42-46 (2013)
5. Ubuka T, Inoue K, Fukuda Y, Mizuno T, Ukena K, Kriegsfeld LJ, Tsutsui K. Identification, expression, and physiological functions of siberian hamster gonadotropin-inhibitory hormone. *Endocrinology* 153:373-385 (2012)
6. Ukena K, Vaudry H, Leprince J, Tsutsui K. Molecular evolution and functional characterization of the orexigenic peptide 26RfA and its receptor in vertebrates. *Cell Tissue Res.* 343:475-481 (2011)
7. Iwakoshi-Ukena E, Okada G, Okimoto A, Fujii T, Sumida M, Ukena K. Identification and structure-activity relationship of an antimicrobial peptide of the palustrin-2 family isolated from the skin of the endangered frog *Odorrana ishikawae*. *Peptides* 32:2052-2057 (2011)
8. Iwakoshi-Ukena E, Soga M, Okada G, Fujii T, Sumida M, Ukena K. Characterization of novel antimicrobial peptides from the skin of the endangered frog *Odorrana*

ishikawae by shotgun cDNA cloning. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 412:673-677 (2011)

9. Iwakoshi-Ukena E, Ukena K, Okimoto A, Soga M, Okada G, Sano N, Fujii T, Sugawara Y, Sumida M. Identification and characterization of antimicrobial peptides from the skin of the endangered frog *Odorrana ishikawae*. *Peptides* 32:670-676 (2011)
10. Shahjahan Md, Ikegami T, Osugi T, Ukena K, Doi H, Hattori A, Tsutsui K, Ando H. Synchronised expressions of LPXRFamide peptide and its receptor genes: seasonal, diurnal and circadian changes during spawning period in grass puffer. *J. Neuroendocrinol.* 23:39-51 (2011)
11. Tobari Y, Iijima N, Tsunekawa K, Osugi T, Haraguchi S, Ubuka T, Ukena K, Okanoya K, Tsutsui K, Ozawa H. Identification, localisation and functional implication of 26RfA orthologue peptide in the brain of zebra finch (*Taeniopygia guttata*). *J. Neuroendocrinol.* 23:791-803 (2011)
12. Tsutsui K, Ukena K, Sakamoto H, Okuyama S-I, Haraguchi S. Biosynthesis, mode of action, and functional significance of neurosteroids in the Purkinje cell. *Front. Endocrin.* 2:61. (2011) doi: 10.3389/fendo.2011.00061
13. Ukena K, Tachibana T, Iwakoshi-Ukena E, Saito Y, Minakata H, Kawaguchi R, Osugi T, Tobari Y, Leprince J, Vaudry H, Tsutsui K. Identification, localization, and function of a novel avian hypothalamic neuropeptide, 26RfA, and its cognate receptor, G protein-coupled receptor-103. *Endocrinology* 151:2255-2264 (2010)

[学会発表](計11件)

1. 谷内秀輔、岩越 - 浮穴栄子、浮穴和義 視床下部で見出した新規神経ペプチド前駆体遺伝子の進化的保存性 第84回日本動物学会大会 2013年9月27日岡山
2. 岩越栄子、古満芽久美、谷内秀輔、別所裕紀、浮穴和義 視床下部新規遺伝子がコードしている成熟神経ペプチドの同定 第37回日本比較内分泌学会大会 2012年11月30日 福井
3. 前嶋 翔、岩越栄子、佐藤慧太、坂本浩隆、坂本竜哉、浮穴和義 ラットの視床

下部新規神経ペプチドの形態学的解析
- 既知の生理活性物質との相関と絶食
処理に伴う変化 - 第 37 回日本比較内
分泌学会大会 2012 年 11 月 30 日 福
井

4. 鹿野健史朗、近藤邦裕、谷内秀輔、大口悦宏、大山晴香、益田恵子、前嶋 翔、岩越栄子、浮穴和義 ラットの視床下部新規遺伝子がコードしている神経ペプチドの摂食行動への影響 第 37 回日本比較内分泌学会大会 2012 年 11 月 30 日 福井
5. 古満芽久美、岩越 - 浮穴栄子、谷内秀輔、浮穴和義 視床下部で発見した新規遺伝子は分泌性ペプチドの前駆体か？ 第 83 回日本動物学会大会 2012 年 9 月 13 日 大阪
6. 谷内秀輔、岩越 - 浮穴栄子、古満芽久美、橋 哲也、浮穴和義 ニワトリ視床下部で発見した新規遺伝子がコードしている神経ペプチドの機能解析 第 83 回日本動物学会大会 2012 年 9 月 13 日 大阪
7. 前嶋 翔、佐藤真実、岩越 - 浮穴栄子、浮穴和義 ラットの視床下部新規遺伝子がコードしている神経ペプチドの形態学的解析 第 83 回日本動物学会大会 2012 年 9 月 13 日 大阪
8. 大口悦宏、佐藤真実、古満芽久美、益田恵子、岩越栄子、浮穴和義 ラットの新規摂食調節関連遺伝子がコードしている神経ペプチドによる摂食行動の解析 第 36 回日本比較内分泌学会大会 2011 年 11 月 23 - 24 日 東京
9. 岩越栄子、橋哲也、古満芽久美、浮穴和義 ニワトリの新規摂食調節関連遺伝子がコードしている神経ペプチドの摂食行動に及ぼす影響 第 36 回日本比較内分泌学会大会 2011 年 11 月 23 - 24 日 東京
10. 岩越 - 浮穴栄子、山崎玲子、古満芽久美、齋藤祐見子、浮穴和義 哺乳類培養細胞を用いた新規摂食調節関連遺伝子がコードしている神経ペプチドの同定 第 82 回日本動物学会大会 2011 年 9 月 21 日 旭川
11. 岩越栄子、田中幸恵、橋 哲也、浮穴和義 視床下部における新規摂食調節関連遺伝子の発見 第 35 回日本比較内分泌学会大会 2010 年 11 月 20 日 静岡

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 3 件)

1. 名称：ポリペプチド、核酸、発現ベクター、形質転換体、成長ホルモン発現抑制剤、非ヒト動物及び非ヒト動物の作製方法
発明者：浮穴和義、岩越栄子、谷内秀輔、鹿野健史朗、近藤邦裕
権利者：広島大学
種類：特許
番号：特願 2013-219578
出願年月日：2013 年 10 月 22 日
国内外の別：国内
2. 名称：ポリペプチド、ポリペプチドの製造方法、摂食調節組成物および摂食量の調節方法
発明者：浮穴和義、岩越栄子、益田恵子、古満芽久美
権利者：広島大学
種類：特許
番号：特願 2011-248006
出願年月日：2011 年 11 月 11 日
国内外の別：国内
3. 名称：ポリペプチド、摂食促進組成物および摂食量の促進方法
発明者：浮穴和義、岩越栄子
権利者：広島大学
種類：特許
番号：特願 2011-065216
出願年月日：2011 年 3 月 24 日
国内外の別：国内

〔その他〕
ホームページ等
<http://home.hiroshima-u.ac.jp/ukena/>

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
浮穴 和義 (UKENA KAZUYOSHI)
広島大学・大学院総合科学研究科・准教授
研究者番号：10304370