

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 23 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23657057

研究課題名（和文） 視床下部で新たに発見した神経ペプチドの受容体探索

研究課題名（英文） Search of receptor for a novel neuropeptide in the hypothalamus

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

研究成果の概要（和文）：最近、鳥類や哺乳類の視床下部に高発現している新規の遺伝子を発見した。翻訳産物からは神経ペプチドが産出され、エネルギーホメオスタシスに関与すると予想している。本神経ペプチドの生理機能の解明には受容体の同定が必要不可欠である。そこで、本研究ではオーファン受容体へのシグナル伝達を指標に受容体同定を試みた。残念ながら、受容体の同定には至らなかった。

研究成果の概要（英文）：Recently, we identified a novel hypothalamic gene in the avian and mammalian brains. We predict that this novel gene encodes a neuropeptide and this peptide is involved in the energy homeostasis. The identification of the specific receptor is essential to elucidate the physiological roles of the neuropeptide. In this study, we sought the receptor for the neuropeptide by signal transduction assay. Unfortunately, we could not find the specific receptor in this study.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：神経ペプチド

科研費の分科・細目：基礎生物学・動物生理・行動

キーワード：受容体、神経ペプチド、カルシウムイメージング、培養細胞

## 1. 研究開始当初の背景

我々は、比較生理生化学的な観点からの研究推進により、脊椎動物の間脳視床下部領域に特異的に発現している新規遺伝子を最近発見した。この新規遺伝子は神経ペプチドの前駆体遺伝子であることも明らかにしている。また、絶食や肥満などのエネルギー代謝状態に応じて mRNA 発現が変動することを見出しており、新規摂食調節関連遺伝子と捉えている。さらに、神経ペプチドの脳室内投与により摂食行動を抑制する効果があるというデータを得つつある。この神経ペプチドの生理機能の全容を明らかにするためには、受容体の同定が必要不可欠である。

## 2. 研究の目的

本研究では新規神経ペプチドの受容体をオーファン受容体に着目して同定することを目的とした。具体的なオーファン受容体の候補としてボンベシン受容体サブタイプ 3 (BRS-3) を選定した。この BRS-3 ノックアウトマウスは過食や肥満を呈することが知られており、高血圧や糖・脂質代謝異常に陥る (Nature 390:165-169:1997)。また、ヒトの病的肥満ではなく多くの中老年が陥る運動不足や生活習慣に伴う中程度の肥満状態を反映していると考えられている。そのため、BRS-3 の内因性リガンドは食欲低下やエネルギー消費亢進をもたらすことが考えられ、そのリガンド同定は、「夢のやせ薬」の開発

に極めて重要であると考えられてきた。メルクや武田薬品工業などの大手製薬企業や医学部・薬学部を中心とした豊富な資金を有する研究者たちが膨大な労力と研究資金を投じて BRS-3 のリガンド探索を行ってきた。しかしながら、ことごとくその試みは失敗し、現在では内因性リガンド探索ではなく、受容体作用薬（サロゲートリガンド）の開発が進んでいる (Cell Metab. 11; 95-96:2010, Cell Metab. 11; 101-112: 2010)。このような研究背景の中で、研究代表者らが発見した新規遺伝子がコードしている神経ペプチドは、その生理作用から考えて BRS-3 の内因性リガンドである可能性が高いと予測した。本研究は、これまで誰も成し得ていない BRS-3 のリガンド同定にチャレンジするものである。

### 3. 研究の方法

本研究では、細胞内カルシウムイメージングによる細胞応答を指標にし、研究代表者らが見出している新規神経ペプチドを作用させた。まず、BRS-3 は Gq タンパク質とカップリングしていることが知られているため、受容体の活性化以降はセカンドメッセンジャーとしてカルシウムイオン濃度の上昇を伴うと予想した。BRS-3 を発現した培養細胞を用い、新規神経ペプチドを作用させた際のカルシウム応答を指標にし、結合親和性を求めることで BRS-3 が新規神経ペプチドの受容体であるかどうかを解明した。

さらに、8 種類のオーファン受容体を発現させた培養細胞を用いて、同様の解析を行った。

### 4. 研究成果

まず 2011 年度は、新規神経ペプチドが、オーファン受容体のボンベシン受容体サブタイプ 3 (BRS-3) の内因性リガンドではないかと予測し、その可能性を検証した。BRS-3 を恒常的に発現している培養細胞を用い、神経ペプチドを作用させた際の細胞内カルシウムイオン濃度変化を指標に受容体応答能を解析した。しかしながら、新規神経ペプチドを 10  $\mu$ M の濃度で作用させても細胞内カルシウムイオン濃度の変化は認められなかった。この結果から、BRS-3 は新規神経ペプチドの受容体ではないことが示された。つまり、我々が発見した新規神経ペプチドの受容体が BRS-3 でないかという予測は、残念ながら外れたと思われる。本研究課題は新規神経ペプチドの受容体探索という挑戦的萌芽研究であるために、この結果もいたしかたないと考えている。

次に、受容体探索の基礎的知見を得るために、新規神経ペプチド含有神経細胞の神経終末の投射先を免疫組織化学的手法により解析した。その結果、マウスの視床下部の背内

側核に新規神経ペプチド様免疫陽性線維が密に投射していることが明らかになった。つまり、新規神経ペプチド産生細胞の投射先が明らかになったことから、受容体同定の端緒となる基礎的知見が得られたと考えている。今後は、この領域の神経細胞を用いて新規神経ペプチドの応答を解析していく必要があると考えている。

2012 年度は、別のオーファン受容体に対する効果を解析する研究を行った。ペプチド性リガンドと考えられるオーファン受容体を恒常的に発現した哺乳類細胞を立ち上げた。8 種類のオーファン受容体発現細胞を用い、新規神経ペプチドを作用させ、細胞内カルシウムイオン濃度の変化を解析した。しかしながら、8 種類の受容体全てにおいて有意な反応は認められなかった。

以上の解析から、現時点では新規神経ペプチドに対する受容体の同定には至らなかった。

生理機能が明らかになっている神経ペプチドでもその受容体が同定されていない例はコカイン・アンフェタミン調節転写産物 (CART)、ネスファチン、Neuroendocrine Regulatory Peptide (NERP) などがある。本研究でも神経ペプチドがリガンドと思われるオーファン受容体を用いて応答性を調べたが、現時点では有意な変化を検出できていない。今後も未解析のオーファン受容体を用いて解析を行っていく予定でいる。また、アッセイ方法の変更を行う必要があると思われる。例えば本研究で投射部位であると思われる背内側核から mRNA を抽出し、それをアフリカツメガエル卵母細胞に注入し、電気的な応答を指標にレセプターを同定するという発現クローニング法を考えている。あるいは、神経ペプチドを固定化したアフィニティーカラムを作成し、脳抽出物をカラムに結合し、特異的に結合したタンパク質を同定することで受容体を見つけるという手法も考えられる。

未知の受容体を発見するという研究は、非常に長い時間と莫大な研究費が必要となる気の長い研究であることは間違いがない。現在の早急な成果が求められる時代において、挑戦的な研究に対して研究助成を行う目的である本挑戦的萌芽研究の支援は非常にありがたく、重要な研究支援であると考えている。今後も事業の継続と益々の拡大を期待したい。

### 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 20 件)

1. Ukena K, Tachibana T, Tobaru 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.*, 査読有, (2013) in press
2. Nagata A, Hamamoto A, Horikawa M, Yoshimura K, Takeda S, Saito Y. Characterization of ciliary targeting sequence of rat melanin-concentrating hormone receptor 1. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 査読有, (2013) in press
3. Mizusawa K, Kobayashi Y, Yamanome T, Saito Y, Takahashi A. Interrelation between melanocyte-stimulating hormone and melanin-concentrating hormone in physiological body color change: roles emerging from barfin flounder *Verasper moseri*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 査読有, 181:229-234 (2013)
4. 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*, 査読有, 153:373-385 (2012)
5. Hamamoto A, Horikawa M, Saho T, Saito Y. Mutation of Phe318 within the NPxxY(x)(5,6)F motif in melanin-concentrating hormone receptor 1 results in an efficient signaling activity. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, 査読有, 3:147. doi: 10.3389/fendo.2012.00147 (2012)
6. Kobayashi Y, Mizusawa K, Saito Y, Takahashi A. Melanocortin systems on pigment dispersion in fish chromatophores. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, 査読有, 3:9. doi: 10.3389/fendo.2012.00009 (2012)
7. 齋藤祐見子 オーファン GPCR 系とうつ病 日本薬理学会編集「実践治療薬」金芳堂, 査読無, 巻無し, 273-280 (2012)
8. 長崎弘、齋藤祐見子 MCH 「摂食制御の分子過程」生体の科学, 査読無, 62:37-43 (2011)
9. 児島将康、齋藤祐見子 日本における生理活性ペプチド研究の流れとその展開 実験医学増刊号「代謝・内分泌ネットワークと医薬応用」, 査読無, 29:14-22 (2011)
10. 齋藤祐見子 MCH の最新の話 実験医学増刊号「代謝・内分泌ネットワークと医薬応用」, 査読無, 29:54-59 (2011)
11. 齋藤祐見子、児島将康 新規生理活性ペプチドの探索方法の進歩 実験医学増刊号「代謝・内分泌ネットワークと医薬応用」, 査読無, 29:80-85 (2011)
12. 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.*, 査読有, 343:475-481 (2011)
13. 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*, 査読有, 32:2052-2057 (2011)
14. 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.*, 査読有, 412:673-677 (2011)
15. 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*, 査読有, 32:670-676 (2011)
16. 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.*, 査読有, 23:39-51 (2011)
17. Tobaru 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.*, 査読有, 23:791-803 (2011)
18. 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., 査読有, 2:61. (2011) doi: 10.3389/fendo.2011.00061

19. Hamamoto A, Mizusawa K, Takahashi A, Saito Y. Signalling pathway of goldfish melanin-concentrating hormone receptors 1 and 2. Regul. Pept., 査読有, 169:6-12 (2011)
20. Mizusawa K, Kobayashi Y, Sunuma T, Asahida T, Saito Y, Takahashi A. Inhibiting roles of melanin-concentrating hormone for skin pigment dispersion in barfin flounder, *Verasper moseri*. Gen. Comp. Endocrinol., 査読有, 171:75-81 (2011)

〔学会発表〕(計 12 件)

1. 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
2. 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
3. 浮穴和義、谷内秀輔、前嶋翔、古満芽久美、大山晴香、岩越栄子 鳥類の視床下部で発見した新規神経ペプチド前駆体遺伝子の機能解析—摂食調節に着目して— 第 46 回日本味と匂学会 シンポジウム(招待講演) 2012 年 10 月 4 日 大阪
4. 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
5. 前嶋 翔、岩越—浮穴栄子、浮穴和義 新規摂食調節関連遺伝子がコードする神経ペプチドのラット視床下部における形態学的解析 第 17 回日本行動神経内分泌研究会 2012 年 8 月 30 日 京都
6. 浮穴和義、岩越—浮穴栄子、谷内秀輔、古満芽久美、橘 哲也 鳥類ニワトリの視床下部で発見した新規神経ペプチド

の前駆体遺伝子の解析 第 64 回日本動物学会中国四国支部大会 2012 年 5 月 13 日 島根

7. 大口悦宏、谷内秀輔、古満芽久美、大山晴香、佐藤真実、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の摂食行動とエネルギー代謝への影響 2012 年度日本動物学会中国四国支部広島県例会 2012 年 3 月 3 日 広島
8. 岩越栄子、橘 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 2012 年度日本動物学会中国四国支部広島県例会 2012 年 3 月 3 日 広島
9. 浮穴和義、岩越栄子 鳥類の視床下部漏斗部で発見した新規遺伝子の機能解析—摂食調節機構に着目して— 第 38 回日本神経内分泌学会学術集会 シンポジウム(招待講演) 2011 年 11 月 26 日 東京
10. 佐藤真実、岩越—浮穴栄子、浮穴和義 マウスの視床下部における新規摂食調節関連遺伝子の解析 第 82 回日本動物学会大会 2011 年 9 月 21 日 旭川
11. 浮穴和義、岩越—浮穴栄子、大口悦宏、古満芽久美、佐藤真実、益田恵子、斎藤祐見子 脊椎動物の視床下部に存在する新しい食欲調節ペプチドの発見と機能解析 平成 23 年度中国四国動物生理シンポジウム 2011 年 9 月 3 日 山口
12. 佐藤真実、岩越—浮穴栄子、浮穴和義 マウス視床下部における摂食調節に関わる新規遺伝子の mRNA 発現解析 第 63 回日本動物学会中国四国支部大会 2011 年 5 月 14 日 香川

〔産業財産権〕

○出願状況(計 1 件)

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

[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

(2) 研究分担者

斎藤 祐見子 (SAITO YUMIKO)  
広島大学・大学院総合科学研究科・教授  
研究者番号：00215568

(3) 連携研究者

( )  
研究者番号：