

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：17601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658247

研究課題名(和文)新たに発見したNU1およびNU2ペプチドの生理機能の探索

研究課題名(英文)Study on physiological role for novel peptide, NU1 and NU2

研究代表者

村上 昇(Murakami, Noboru)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号：80150192

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：新規ペプチド NU1およびNU2のラット側脳室への投与が投与量依存性に摂食量の増加や体温の上昇をもたらすことが明らかとなった。NU1、NU2をそれぞれ側脳室に投与し、90分後に視床下部および中脳・脳幹を採取し遺伝子変化を解析した結果、NU1およびNU2の投与で、prostaglandin Eの合成酵素およびシクロオキシゲナーゼのmRNAの発現が著しく増加した。一方、NU1、NU2の側脳室投与による体温上昇は、インドメサジンの前投与により完全にブロックされた。以上の結果、新規ペプチドNU1、NU2はprostaglandin Eの合成を促進して体温を増加させることが判明した。

研究成果の概要(英文)：Intracerebroventricular (icv) injection of novel peptide, NU1 and NU2, increased the food intake and body temperature in a dose-dependent manner in rats. When expression of mRNA levels in the hypothalamus and midbrain/brainstem after icv injection of these peptides were examined using gene chip analysis, prostaglandin E synthetase mRNA and cyclooxygenase mRNA expressions increased dramatically. On the other hand, pretreatment with indomethacin completely blocked the increase of body temperature induced by NU1 and NU2. These results suggest that NU1 and NU2 increase the body temperature through prostaglandin E.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：新規ペプチド 摂食 体温

せてオートラジオグラフィにて結合部位を検索した。また、それぞれの標識していないホルモンを反応液に過剰に加える事で標識したホルモンの結合が阻害されるか否かを調べ、その結合がペプチドに特異的であるかを判定した。

4. 研究成果

NU1,2の側脳室投与の摂食におよぼす効果

NU1を無麻酔下で、ラットの側脳室に投与すると、投与後2、4、12時間後において投与量依存性に明期の摂食量が有意に増加した。暗期での投与では摂食量の増加は認められなかった。NU2の投与においても同様の増加を明期の投与群のみ認めた。

NU1,2の側脳室投与の体温におよぼす効果

NU1をラットの側脳室に投与すると明期においては、投与後すぐに体温が対象群よりも有意に高くなったが、その後、緩やかに下降し、投与10分から40分まで有意に低い体温を示した。一方、暗期の投与では投与後に体温は上昇し、60分後も対象群よりも有意に高い増加を示した。NU2の投与においても明期と暗期の効果の違いが認められ、明期では強制的な増加とその後の低下、暗期では継続的な増加が認められた。

NU2において、多量(2nmol)の投与を行うと、明期および暗期ともに背中体表温度は有意に低下し、尾の体表温度は有意に増加した。このことは体温の低下を意味していた。

NU1,2の側脳室投与のエネルギー代謝におよぼす効果

NU1あるいはNU2の無麻酔下での側脳室投与は、ラットの酸素消費量と二酸化炭素排出量を促進した。その結果、エネルギー消費(Kcal/h)が有意に促進された。

NU1,2の側脳室投与の循環器系におよぼす効果

NU1あるいはNU2の側脳室投与は心拍数を増加させた。一方で血圧には有意な変化は認められなかった。

NU1,2の側脳室投与のプロラクチン分泌におよぼす効果

NU2の側脳室投与後に、血液中の様々なホルモンを測定したが、唯一、プロラクチンの分泌のみ有意に増加した。NU1の投与でも有意な増加が認められた。

NU2の側脳室投与の行動量におよぼす効果

NU2の側脳室投与により、投与後30分では投与量依存的に行動量の抑制が認められたが、その後は1nmol投与群でのみ有意な促進が認められた。一方で2nmolでのNU2投与では変化が認められなかった。

NU1, NU2の側脳室投与による視床下部、中脳/脳幹における遺伝子発現におよぼす効果

NU2を側脳室に投与し、視床下部と中脳・脳幹を取り出し、ジーンチップで遺伝子発現を網羅的に解析した。その結果、視床下部においては12種類の遺伝子mRNAの発現が有意に増加し、一方で5種類の遺伝子mRNAの発現が有意に減少した。増加した遺伝子の多くはシグナルトランスダクションに関するMapやRabであったが、興味深い事に特に顕著なプロスタグランジンE合成酵素の増加が認められた。また、それらの有意な変化したものの中には、遺伝子番号のみ登録され機能が不明な遺伝子が5種類含まれていた。一方で減少した遺伝子では3種類が不明なものであった。

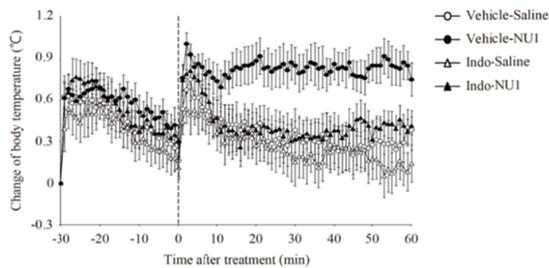
視床下部に比べて中脳・脳幹では19種類の遺伝子発現が増加しており、その中の12種類は機能が不明なものであった。また、プロスタグランジン合成酵素の遺伝子発現は顕著に増加していた。減少した遺伝子は14種類で、9種類は機能が不明なものであった。減少した遺伝子の中にはリガンドの不明なG蛋白共役受容体遺伝子も含まれていた。

プロスタグランジンEとプロスタグランジン合成酵素が増加した結果を受けて、これらを定量的にリアルタイムPCRで解析した。その結果、視床下部ではプロスタグランジンEおよびシクロオキシゲナーゼの遺伝子発現が有意に増加し、他のプロスタグランジンには変化がなかった。一方、中脳・脳幹でも、プロスタグランジンEとシクロオキシゲナーゼが増加し、他のプロスタグランジンの増加は認められなかった。

NU1,2の側脳室投与による体温上昇作用におよぼすインドメサジン前投与の効果

先の結果から、NU1およびNU2の体温上昇作用にプロスタグランジンが関与している可能性が示唆されたので、その可能性を確かめるために、プロスタグランジン合成の阻害薬インドメサジンの前投与によりNU1, 2による体温上昇作用が阻止されるか否かを検討した。その結果、インドメサジンの前投与はNU1, NU2の両者の体温上昇作用を完全に阻止した(下図)。

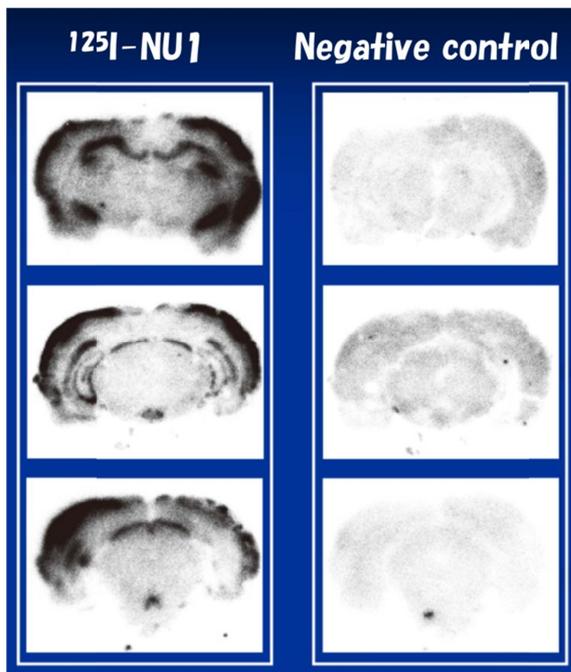
(A) NU1



オートラジオグラフィによるラット脳の NU1 および NU2 の結合領域 (作用部位) の探索

NU1, NU2 の作用部位を探索するために放射性同位元素 ^{125}I で標識した NU1 および NU2 を作成した。これを脳の連続凍結切片に作用させた後、FujiBas5000 で感光したフィルムの濃淡を解析した。尚、標識の特異性を調べるために、凍結切片との反応させる時に標識していない NU1, NU2 を過剰に加え、その解析結果と併せて特異性を調べた。

その結果、NU1 および NU2 は脳の特異的な部位で結合する事が判明した。一部の結果を下図に示す。



以上の結果、新規ペプチド NU1, NU2 は機能性ペプチドであり、視床下部機能において摂食や体温調節に重要な役割を演じている事が示唆された。これらのペプチドはニューロメジン U, S の前駆体から切り出される物であるが、ニューロメジン U や S とは全く異なる作用をしめす物で、極めて興味深いものである。今後、これらのペプチドとの関係や動態についての検討が必要であ

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 6 件)

Y Suzuki, K Nakahara, K Maruyama, R Okame, Y Inoue, N Murakami: Changes in mRNA expression of hypothalamic appetite-regulating peptides during different phases of lactation in rats. *J. Mol. Endocrinol.* 52:97-109, 2014 査読有り

K Nakahara, M Bannai, K Maruyama, Y Suzuki, R Okame, N Murakami: Characterization of a novel genetically obese mouse model demonstrating early-onset hyperphagia and hyperleptinemia. *Am. J. Physiology. Endocrinol. Metab.* 305(3):E451-463, 2013 査読有り

Hayakawa K, Hirose M, Tabei Y, Arai D, Tanaka S, Murakami N, Yagi S, Shiota K.: Epigenetic switching by the metabolism-sensing factors in the generation of orexin neurons from mouse embryonic stem cells. *J Biol Chem.* 288(24):17099-17110. 2013 査読有り

Y. Inoue, K. Nakahara, K. Maruyama, Y. Suzuki, Y Hayashi, K. Kangawa, N. Murakami: Central and peripheral des-acyl ghrelin regulates body temperature in rats *Biochemical and Biophysical Research Communications* 430:278-283, 2013 査読有り

K Nakahara, S Takata, M Ishii, K Nagao, M Bannai, M Takahashi, N Murakami: Hypothalamic gene expression involved in anorexia in rodents fed valine-deficient diet. *Amino Acids.* 42:1397-1404, 2012 査読有り

M Bannai, N Kawai, K Ono, K Nakahara, N Murakami: The effects of glycine on subjective daytime performance in partially sleep-restricted healthy volunteers *Front Neurol.* 3:61. 1-8, 2012 査読有り

M Bannai, N Kawai, K Ono, K Nakahara, N Murakami: The effects of glycine on subjective daytime performance in partially sleep-restricted healthy volunteers *Front Neurol.* 3:61. 1-8, 2012 査読有り

[学会発表] (計 8 件)

Y. Hayashi, Y. Inoue, K. Nakahara, K. Maruyama, Y. Suzuki, K. Kangawa, N. Murakami : Des-acyl ghrelin protects against body damage by heat stroke in rats. Society for Endocrinology Annual Meeting 6/17, 2013. Sao Francisco

延生 卓也、中原 桂子、村上 昇: ニューロペプチド S による明期の交感神経を介した体温及び血圧への作用、第 156 回日本獣医学会 秋季大会 2013 . 9 . 20 岐阜

鈴木 喜博、中原 桂子、延生 卓也、村上 昇: ラットの泌乳期間中の弓状核摂食関連ペプチド遺伝子発現による摂食亢進機序の

解析、第 156 回日本獣医学会 秋季大会
2013.9.20 岐阜

村上 昇：新規ペプチドの生理機能の解明
とそれを用いた獣医・畜産領域における応
用研究 平成 24 年度 日本農学会
2012.04.04 東京

大亀 吏江子、中原 桂子、長尾 健児、坂
内 慎、村上 昇：ラットにおける様々な生
理状態での血液・脳脊髄液中アミノ酸プ
ロファイル作成の試み 第 154 回日本獣医
学会 2012.9.15 盛岡

鈴木 喜博、中原 桂子、丸山 圭介、村上
昇：ラットの泌乳期中の摂食亢進機序の解
析、特に視床下部摂食関連ペプチド遺伝子
発現について 第 154 回日本獣医学会
2012.9.15 盛岡

高田 志織、中原 桂子、長尾 健児、坂内 慎、
村上 昇：バリン欠乏食給餌が遺伝的肥満
(ob/ob) マウスの脂質代謝に及ぼす影響
第 154 回日本獣医学会 2012.9.15 盛岡

赤木 愛、井上 賀之、森 健二、宮里 幹也、
寒川 賢治、中原 桂子、村上 昇：MS の体
温上昇作用の機序について 第 154 回日本
獣医学会 2012.9.15 盛岡

〔図書〕(計 件)

なし

〔産業財産権〕

○出願状況(計 件)

なし

○取得状況(計 件)

なし

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.agr.miyazaki-u.ac.jp/~vet/vet_phy/in
dex.htm](http://www.agr.miyazaki-u.ac.jp/~vet/vet_phy/index.htm)

6. 研究組織

(1)研究代表者

村上 昇 (MURAKAMI NOBORU)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号：80150192

(2)研究分担者

片山哲朗 (KATAYAMA TETSURO)

宮崎大学・フロンティア科学実験センタ
ー・准教授

研究者番号：30264652

(3)連携研究者

宮里幹也 (MIYAZATO MIKIYA)

独立行政法人国立循環器病研究センタ
ー・生化学部・部長

研究者番号：50291183