

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15150

研究課題名(和文)下垂体隆起部におけるニューロメジンUの発現解析と生理的役割の解明

研究課題名(英文)Regulatory mechanism of neuromedin U expression in the pars tubercles

研究代表者

相澤 清香(AIZAWA, SAYAKA)

岡山大学・自然科学研究科・助教

研究者番号：90754375

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文):ニューロメジンU(NMU)は、ラットの脳下垂体隆起部において、明期に高く暗期に低くなる概日リズムをもって高発現し、それはメラトニンによって抑制される。本研究では、Nmu発現の制御として、アデノシンによる制御を研究した。ラットの隆起部ではアデノシン受容体サブタイプA2bが高発現していた。そこで次に、隆起部に対しアデノシン受容体アゴニストであるNECAを作用させると、NMU mRNA発現レベルが有意に増加した。さらにNmuプロモーター領域への作用を検討したところ、NECAはアデノシン受容体A2bを介して、Nmu遺伝子の5'上流域に存在するcAMP応答配列に作用し、Nmuプロモーター活性を促進した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

隆起部は、メラトニン受容体を脳内で最も高発現することから、日周的、季節的な生理現象への関与が古くより示唆されてきた。しかし隆起部は非常に微小で隣接する部位に影響を与えずに摘除することが困難なため、いまだその生理的役割には不明な点が多い。本研究ではNMUの発現制御機構を解析し、隆起部がメラトニンを介して外部の情報を受け取るだけでなく、内部恒常性の情報をアデノシンを介して受け取ることが明らかとなった。これまで不明であった隆起部の生理機能として、外部と内部の「情報の統合の場」であることが示された。光生物学や概日リズム障害といった臨床医学分野などへの波及効果は高いことが期待される。

研究成果の概要(英文):Neuromedin U (NMU) shows circadian expression in the rat pars tubercalis (PT), and is known to be suppressed by melatonin. Here we examined the involvement of adenosine in the regulation of the Nmu expression. It was found that the rat PT expressed adenosine receptor A2b and an adenosine receptor agonist NECA stimulated Nmu expression in brain slice culture. An in vitro promoter assay revealed that NECA stimulated Nmu promoter activity via a cAMP response element (CRE) in the presence of adenosine receptor A2b. Furthermore, NECA increased the levels of phosphorylated CRE binding protein. These results suggest that adenosine stimulates Nmu expression by activating cAMP signaling pathway through the adenosine receptor A2b in the rat PT. This is the first report demonstrating that Nmu expression in the PT is regulated by adenosine, which acts as an intravital central metabolic signal, in addition to melatonin, which acts as an external photoperiodic environmental signal.

研究分野：内分泌学

キーワード：下垂体 隆起部 ニューロメジンU メラトニン アデノシン 概日リズム 時間生物 内分泌

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

下垂体隆起部 (以下、隆起部) は、下垂体前葉が口吻側へ伸びた薄い細胞層の部分である (図 1)。ヒトを含む四肢脊椎動物に見られる組織であり、性腺刺激ホルモン、甲状腺刺激ホルモン (TSH) を産生する内分泌器官である。隆起部には、暗期に分泌が高まるメラトニンの受容体 (MT1) が高発現すること、時計遺伝子発現に日内リズムがあることから、隆起部は、明暗周期の情報を内分泌情報へと変換し、日周的、季節的な生理機能の制御をおこなっていると考えられてきた (図 1)。事実、ラット隆起部の TSH 発現は日内変動し、隆起部は外部環境の明暗情報を液性因子である TSH に変換して内分泌系に伝えている可能性が考えられる。さらにウズラなどの季節繁殖動物では、隆起部 TSH が脳の視床下部に作用し、性腺刺激ホルモン放出ホルモンの分泌を促進させ、繁殖行動を促すことが示された (Nature.2008;452:317-22)。この発見により、隆起部の TSH は脳神経系にフィードバック作用することで、季節性の繁殖を制御することが明らかとなった。また長年不明であった隆起部の役割が 1 つ解明され、隆起部で作られる他の因子も、リズムをもった生理現象になんらかの重要な役割を持つのではと期待される。

我々が以前にげっ歯類ラットの隆起部をレーザーマイクロダイセクション法で採取し、マイクロアレイ解析を行い網羅的に遺伝子発現を解析したところ、隆起部ではニューロメジン U (NMU) が高発現していることがわかった。さらにその発現は明期に高く、暗期に低くなるサーカディアンリズムを示すことが明らかとなった (Aizawa et al. PLoS One 2013)

(図 2)。NMU は中枢において摂食抑制作用を持つペプチドホルモンであることが報告されているので (Nakazato et al. BBRC 2000 など多数)、我々は、隆起部の NMU が、時間依存的に摂食を制御する機能を持つ可能性を示唆している。

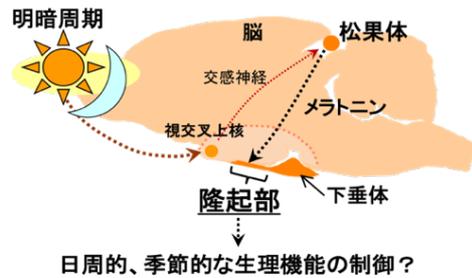


図1 隆起部の位置と役割

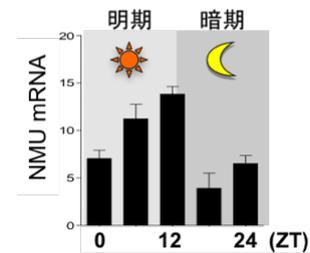
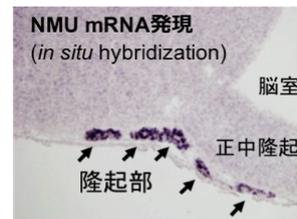


図2 隆起部のNMU発現と日内リズム

2. 研究の目的

本研究では、ラットの脳下垂体隆起部で高発現する NMU の機能の解明を目的に、以下の課題を行った。

- (1) NMU mRNA の発現制御機構を明らかにする。
- (2) NMU 遺伝子改変ラットの作製を試み、内因性の NMU の機能の解析を目指す。

3. 研究の方法

(1) NMU mRNA の発現制御機構の解明

ラット NMU プロモーター解析を行い、NMU 遺伝子の転写制御機構を解析する。ラット NMU 遺伝子 5'上流域について、Dual Luciferase assay を用いて培養細胞株を用いて *in vitro* で解析する。特に NMU 遺伝子 5'上流域に存在する cAMP response element や E-box に着目して解析を進める。

(2) NMU 遺伝子改変ラットの作製

遺伝子改変技術 CRISPR/Cas9 と遺伝子改変技術である rGONAD (Rat Genome-editing via Oviductal Nucleic Acid Delivery) (Kobayashi et al., 2018) を用いて、NMU 遺伝子改変ラットの作出を行う。NMU 欠損ラットを用いて、内因性の NMU の機能の解析を目指す。

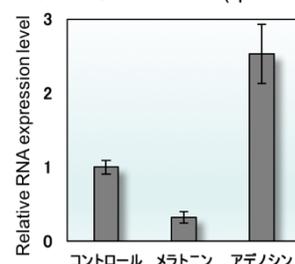
4. 研究成果

(1) NMU mRNA の発現制御機構の解明

本研究でははじめに、ラット隆起部におけるアデノシン受容体発現について検討した。アデノシン受容体は A1, A2a, A2b, A3 の 4 つのサブタイプが存在が報告されているが、隆起部ではそのうち、アデノシン受容体 A2b のみが高発現していた。

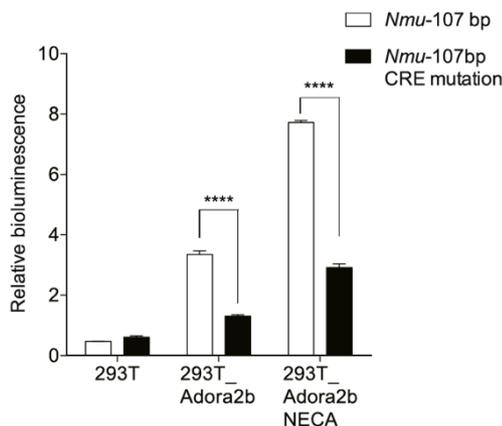
アデノシンは細胞代謝産物として産生され、細胞外シグナル因子として機能することが知られている。そこで次に、脳スライス培養法を用いてアデノシンの作用を検討した。マイクロス

脳スライス培養実験における隆起部NMU発現 (qPCR)



ライサーを用いてラット脳スライスを作成し、アデノシン受容体 A2b アゴニストである NECA を作用させたところ、隆起部における *Nmu* 発現が有意に増加した (右図)。

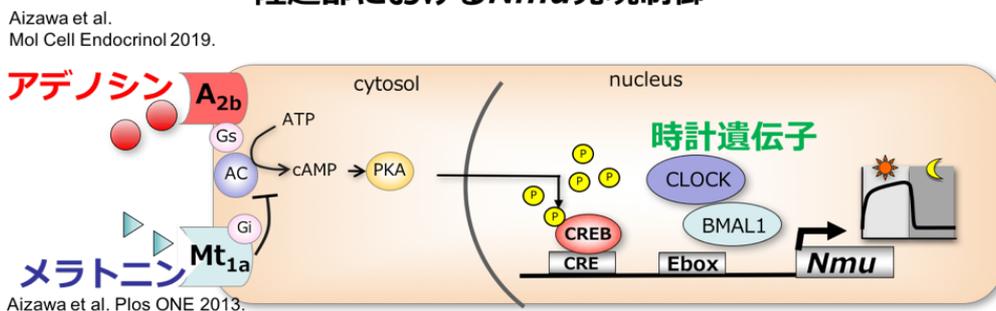
さらに、より直接的な転写活性の評価として行ったプロモーター解析においても、アデノシンがアデノシン受容体 A2b を介して *Nmu* の転写を促進することが明らかとなった。その作用は *Nmu* 5' 上流域の -96 ~ -103 塩基に位置する cAMP response element (CRE) を介していることも明らかになり、CRE を変異させると NECA によるルシフェラーゼ活性の促進は有意に減少した (右図)。



本研究は、隆起部における *Nmu* 発現が、外部光環境シグナルであるメラトニンだけでなく、生体内の脳代謝シグナルであるアデノシンによって制御されることを示した初めての報告である。以上の結果より、隆起部 NMU 発現は、アデノシンが促進しメラトニンが抑制するといった拮抗的な作用によって概日リズム発現を形成していると考えられた (下図)。本研究成果は 2019 年に国際学術誌 *Molecular and cellular endocrinology* に発表した。

さらなる解析として、時計遺伝子による制御機構の解析を進めている。時計遺伝子 CLOCK と BMAL1 が *Nmu* 5' 上流域に存在する E-box 配列を介して転写活性を促進することが新規に明らかになった。以上のことから、隆起部 *Nmu* 発現の概日リズムは、細胞外シグナル因子であるメラトニンとアデノシンに加えて、転写因子である時計遺伝子による制御によって形成されていることが示唆された。また、隆起部では時計遺伝子の概日リズム発現に関して膨大な研究がなされているが、そのターゲットは不明であった。本研究によって隆起部時計のターゲット因子が初めて同定されたことになり、時間生物学の分野において非常に重要な知見となる。

隆起部における *Nmu* 発現制御



(2) NMU 遺伝子改変ラットの作製

遺伝子改変技術 CRISPR/Cas9 と最新の遺伝子改変技術である rGONAD (Rat Genome editing via Oviductal Nucleic Acid Delivery) (Kobayashi et al., 2018) を用いて、NMU 遺伝子改変ラットの作出を試みた。雄ラットと雌ラットの交配を行い、朝にプラグの確認を行った。プラグの確認ができたメスラット 6 匹に対して rGONAD 法を行い、NMU をターゲットとする gRNA および Cas9 タンパク質を輸卵管の膨大部に注入した。その後、4 匹が正常に出産し、11 匹の産仔を得た。シーケンスを行い産仔のゲノムを解析すると、そのうち 5 匹で *Nmu* 遺伝子が改変されていた (右図)。さらに、ウェスタンブロッティング法によりタンパク質レベルでも NMU が産生されていないことを確認できた。よって、NMU を産生できないファウンダーラットを得ることに成功した。

Treated female	Pregnant rat	Newborns	Modified allele
6	3	11	5 (45%)

現在は F2 世代のヘテロ接合型同士の交配を重ね、*Nmu* 遺伝子改変ラットを作成し、予備実験を開始している。今後は摂食やエネルギー代謝を概日リズムの観点から解析を行う。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1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 Aizawa Sayaka, Gu Tingting, Kaminoda Arisa, Fujioka Ryuya, Ojima Fumiya, Sakata Ichiro, Sakai Takafumi, Ogoshi Maho, Takahashi Sumio, Takeuchi Sakae	4. 巻 496
2. 論文標題 Adenosine stimulates neuromedin U mRNA expression in the rat pars tuberalis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Endocrinology	6. 最初と最後の頁 110518 ~ 110518
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.mce.2019.110518	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 相澤清香	4. 巻 43
2. 論文標題 脳下垂体隆起部の新たな生理機能の探索	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 比較内分泌学	6. 最初と最後の頁 89-90
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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12件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 相澤清香, 神之田有紗, 原田有希菜, 高橋純夫, 竹内栄.
2. 発表標題 ニューロメジンUのラット下垂体隆起部における概日リズムの形成機構.
3. 学会等名 第44回日本比較内分泌学会大会及びシンポジウム.
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 後藤佑紀, 顧テイテイ, 神之田有紗, 原田有希菜, 小島史也, 高橋純夫, 竹内栄, 松山誠, 相澤清香.
2. 発表標題 ニューロメジンU遺伝子改変ラットの表現型解析.
3. 学会等名 第44回日本比較内分泌学会大会及びシンポジウム.
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 神之田有紗, 坂田一郎, 坂井貴文, 竹内栄, 高橋純夫, 相澤清香.
2. 発表標題 ラット下垂体主部及び隆起部の糖タンパク質ホルモン サブユニットの比較解析.
3. 学会等名 第44回日本比較内分泌学会大会及びシンポジウム.
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 相澤清香, 顧テイテイ, 神之田有紗, 原田有希菜, 高橋純夫, 竹内栄.
2. 発表標題 ラット下垂体隆起部におけるニューロメジンUの概日リズム発現の制御機構.
3. 学会等名 第26回学術大会日本時計生物学会.
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 相澤清香, 神之田有紗, 原田有希菜, 高橋純夫, 竹内栄.
2. 発表標題 ラット下垂体隆起部におけるニューロメジンUの概日リズム発現の制御機構.
3. 学会等名 日本動物学会第89回.
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 顧テイテイ, 後藤佑紀, 高橋純夫, 竹内栄, 松山誠, 相澤清香.
2. 発表標題 メスラットにおけるニューロメジンUの機能解析.
3. 学会等名 第77回岡山実験動物研究会.
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 相澤清香, 顧テイテイ, 神之田有紗, 坂田一郎, 坂井貴文, 小島史也, 泰山浩司, 御輿真穂, 高橋純夫, 竹内 栄
2. 発表標題 アデノシン受容体を介した下垂体隆起部ニューロメジンU 発現制御の解析
3. 学会等名 第43回日本比較内分泌学会大会及びシンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 相澤清香, 坂田一郎, 坂井貴文, 御輿真穂, 竹内栄, 高橋純夫.
2. 発表標題 下垂体隆起部で発現する因子とその制御機構.
3. 学会等名 第33回日本下垂体研究会学術集会シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 相澤清香, 顧テイテイ, 神之田有紗, 後藤佑紀, 塙 董, 坂田一郎, 坂井貴文, 小島史也, 泰山浩司, 御輿真穂, 高橋純夫, 竹内栄
2. 発表標題 アデノシンはラット下垂体隆起部のニューロメジンU mRNA発現を促進する
3. 学会等名 第89回日本動物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 相澤清香
2. 発表標題 隆起部ニューロメジンUの発現制御機構
3. 学会等名 第42回日本比較内分泌学会大会及びシンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 相澤清香, 顧テイテイ, 神之田有紗, 藤岡竜矢, 坂井田初季, 埜 董, 坂田一郎, 坂井貴文, 御輿真穂, 竹内 栄, 高橋純夫.
2. 発表標題 ラット下垂体隆起部におけるニューロメジンUの発現制御メカニズム
3. 学会等名 日本動物学会第88回富山大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 相澤清香, 顧テイテイ, 神之田有紗, 藤岡竜矢, 御輿真穂, 竹内栄, 高橋純夫.
2. 発表標題 ラット隆起部におけるニューロメジンUの発現とその制御メカニズム.
3. 学会等名 第73回岡山実験動物研究会例会
4. 発表年 2017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