

## 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 10 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21770079

研究課題名（和文） エネルギーホメオスタシスに関与する新規視床下部神経ペプチドの同定と生理機能解析

研究課題名（英文） Identification and functional analysis of novel hypothalamic neuropeptides involved in energy homeostasis.

研究代表者

岩越 栄子（IWAKOSHI EIKO）

広島大学・大学院総合科学研究科・研究員

研究者番号：50311296

研究成果の概要（和文）：近年、摂食行動に関与する様々な神経ペプチドが哺乳類で単離・同定されており、活発に生理機能解析が進められている。しかしながら、非哺乳類の研究は少ない。本研究では哺乳類において最近見つかった 26RFa という神経ペプチドが鳥類においても存在しているのか、さらにエネルギーホメオスタシスに関係した機能を有しているかどうかを最初に解析した。さらに、神経ペプチドの前駆体遺伝子であると考えている鳥類で発見した新規遺伝子についての解析を 2 番目に行った。

研究成果の概要（英文）：Recently, many neuropeptides involved in food intake have been identified in mammals and extensive studies have been performed to reveal their physiological functions. However, there are little studies on these neuropeptides in non-mammals. In this study, firstly we sought the novel RFamide peptide, 26RFa, in the avian species, as the aspect of energy homeostasis. In addition, we further investigated a novel precursor gene encoding neuropeptide which we have originally identified in the avian brain.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：動物生理学

科研費の分科・細目：基礎生物学・動物生理・行動

キーワード：神経ペプチド、鳥類、視床下部、摂食行動

## 1. 研究開始当初の背景

現在、社会的に関心の高まっているメタボ

リックシンドロームの原因は肥満がきっかけであるが、その肥満を生み出す主要な原因

は食欲亢進である。近年、食欲に関する脳内伝達物質や神経回路網に関する研究が急速に進展しつつある。先行研究から脳の視床下部の弓状核において産生される摂食促進因子であるニューロペプチドYや摂食抑制因子である色素細胞刺激ホルモン ( $\alpha$ -MSH)、視床下部外側野において産生される摂食促進因子のオレキシンやメラニン凝集ホルモン (MCH) などが知られており、さらに、末梢からの情報として脂肪組織が産生するレプチンによって上記の視床下部摂食調節因子の発現が調節されていることが明らかになっている (参考総説論文; Nature 404:661-671:2000)。この食欲を含めたエネルギーホメオスタシスに関する研究は、主に哺乳類を用いた研究であり、非哺乳類の研究は遅れている。また、比較生理生化学的観点から、神経ペプチドの多様性と統一性を理解する上で視床下部ペプチドの同定と機能解析は優れた研究モデルとなり得ると考えている。

## 2. 研究の目的

我々は食欲旺盛な動物である鳥類、特にブロイラー種鶏を用いて新規の摂食調節因子を同定する研究を行っている。比較的最近、哺乳類の視床下部で発見された 26RFa という RFamide ペプチドは、新規の摂食調節因子の一つとして注目されている。そこで、本研究では鳥類のウズラやニワトリを用いて 26RFa を単離・同定することを最初の研究目的とした。

また、我々は哺乳類でも見つかっていない新規の摂食調節因子を発見する目的で、鳥類の摂食調節中枢に特異的に発現している新規遺伝子を網羅的に解析する研究を展開している。その中で、神経ペプチドの前駆体遺伝子と考えられる新規遺伝子 (コードネーム N1 と N1-like) を見出している。本神経ペプチドの生理機能の解析を 2 番目の目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 鳥類の視床下部に存在する 26RFa ペプチドの同定と機能解析

鳥類キジ目に属するウズラとニワトリの視床下部から RFamide ペプチドの新しいファミリーである 26RFa を同定することを試みた。まず、26RFa の前駆体 cDNA をクローニングした。さらに、質量分析により前駆体タンパク質にコードされている成熟神経ペプチドの同定を試みた。また、免疫組織化学的解析及び *in situ* ハイブリダイゼーション解析を行い、26RFa 前駆体遺伝子と成熟神経ペプチドの局在を解析した。さらに哺乳類で 26RFa の受容体として同定されている GPR103 のホモログ遺伝子をニワトリの脳からクローニングした後に HEK293T 細胞に発現させ、カルシウムイメージング解析を行った。最後に、26RFa の生理機能を解析するためにニワトリの脳室内に 26RFa を投与し、摂食行動に及ぼす影響を解析した。この際、レイヤー種鶏とブロイラー種鶏において 26RFa の効果を比較した。

### (2) 鳥類の視床下部で見出した新規ペプチド前駆体遺伝子の機能解析

我々は、鳥類ニワトリの視床下部漏斗部に高い発現を示し、神経ペプチドの前駆体タンパク質をコードしていると考えられる新規遺伝子 (コードネーム N1 と N1-like) を発見している。本研究では N1-like 遺伝子に着目して解析を進めた。まず、83 残基からなると推測される神経ペプチド (N1-like ペプチド) を大腸菌組換えタンパク質発現系により産出した。産出できた N1-like ペプチドをニワトリ雛の脳室内に投与し、摂食行動に与える影響を解析した。次に、エネルギーホメオスタシスに関与するかどうかを解析する目的で、48 時間絶食条件下での N1-like mRNA 発現を解析した。さらに、*in situ* ハイブリダイゼーション法と免疫組織化学的解析により N1-like ペプチドの脳内発現細胞と投射部位を解析した。

## 4. 研究成果

(1) 鳥類の視床下部に存在する 26RFa ペプチドの同定と機能解析

鳥類キジ目に属するウズラとニワトリの

視床下部から、26RFa の前駆体 cDNA をクローニングした。さらに、抗体アフィニティークロマトグラフィーと質量分析を組み合わせた手法により前駆体タンパク質にコードされている 27 残基からなる RFamide ペプチドを同定した。また、免疫組織化学的解析及び *in situ* ハイブリダイゼーション解析から 26RFa は前視床下部核に局在していることが明らかとなった (図 1)。さらに哺乳類で 26RFa の受容体として同定されている GPR103 のホモログ遺伝子をニワトリの脳からクローニングし HEK293T 細胞に発現させ、カルシウムイメージング解析を行った。この結果、鳥類 26RFa が GPR103 に結合することが明らかになった。最後に、26RFa の生理機能を解析するためにニワトリの脳室内に 26RFa を投与したところ摂食行動を促進する活性が見られた (図 2)。この摂食促進効果はレイヤー種鶏では見られず、ブロイラー種鶏においてのみ確認された (図 2)。

本研究により鳥類の視床下部に存在する新規 RFa ペプチドが、その特異的な受容体である GPR103 を介して摂食行動の調節に関与することが示唆された。

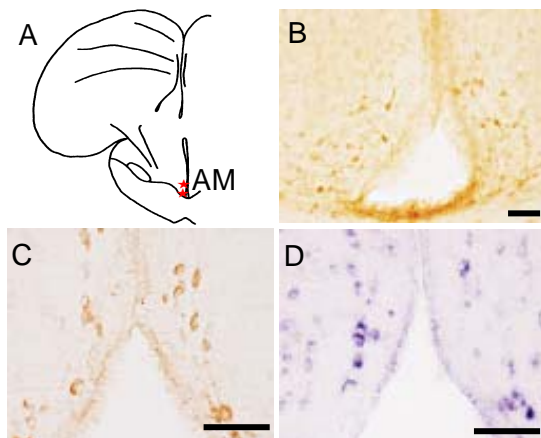


図 1、鳥類の視床下部における 26RFa の局在 A:前視床下部核 (AM) の位置、B:ウズラの脳における 26RFa 免疫陽性細胞、C:ニワトリの脳における 26RFa 免疫陽性細胞、D:ニワトリの脳における 26RFa mRNA 発現細胞  
スケールバー100  $\mu$  m

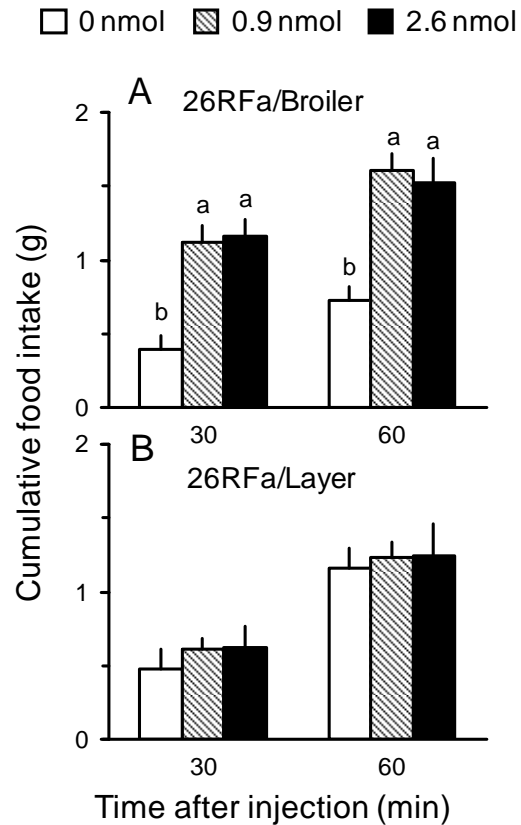


図 2、ニワトリの摂食行動に及ぼす 26RFa の効果 A:ブロイラー種鶏、B:レイヤー種鶏

## (2) 鳥類の視床下部で見出した新規ペプチド前駆体遺伝子の機能解析

本研究では N1-like 遺伝子に着目して解析を進めた。まず、83 残基からなると推測される神経ペプチド (N1-like ペプチド) を大腸菌組換えタンパク質発現系により産出した。産出できた N1-like ペプチドをニワトリ雛の脳室内に投与し、摂食行動に与える影響を解析した。その結果、N1-like ペプチドは濃度依存的に摂食行動を抑制させる効果が見られた。次に、48 時間絶食条件下での N1-like mRNA 発現を解析したところ、絶食条件下で N1-like mRNA 発現量が有意に増加した。さらに、*in situ* ハイブリダイゼーション法と免疫組織化学的解析により N1-like ペプチドの脳内発現細胞と投射部位を解析した結果、視床下部漏斗部内の乳頭体核と漏斗核で N1-like ペプチドが産出されていることが明らかになった。さらに、神経線維の密な投射は脳下垂体前葉との連絡部位である正中隆起外層であることも明らかになった。

これらの解析から、N1-like 遺伝子は摂食行動を含むエネルギーホメオスタシスに関わる遺伝子であることに加え、脳下垂体前葉ホルモンの合成や放出制御に関わっていることが示唆された。

以上の2つの研究から、視床下部神経ペプチドによる鳥類独自の摂食調節機構の一端を明らかにすることができた。今後も比較生理生化学的な観点から研究を進めていく。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計4件、全て査読有り)

1. 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)
2. 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)
3. 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)
4. 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2件)

1. 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」第36回日本比較内分分泌学会大会 東京 2011年11月23-24日

2. 岩越栄子、田中幸恵、橘哲也、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回日本比較内分分泌学会大会 静岡 2010年11月20日

[産業財産権]

○出願状況 (計2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

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]

2010年の第35回日本比較内分分泌学会大会において口頭発表した内容に対し、若手研究者最優秀発表賞を受賞した。

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩越 栄子 (IWAKOSHI EIKO)

広島大学・大学院総合科学研究科・研究員

研究者番号：50311296