

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 6月20日現在

機関番号：84404

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791065

研究課題名（和文） ニューロメジン S の新しい生体調節機構の解明

研究課題名（英文） Investigation of the novel biological role of neuromedin S

研究代表者

森 美和 (MORI MIWA)

独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・特任研究員

研究者番号：50363148

研究成果の概要（和文）：ニューロメジン S（NMS）は、ペプチドレベルでの脳内分布が不明である。そこで、ラット脳の各領域における組織含有量をラジオイムノアッセイで測定した結果、遺伝子発現量の高い視床下部に匹敵した高濃度の NMS が、低発現部位である中脳、橋・延髄でも検出された。これにより、主に視床下部に存在する NMS 産生神経細胞から脳幹への神経線維投射が推測され、脳幹に作用することによる NMS の未知の機能の存在が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The regional distribution of neuromedin S (NMS) in the rat brain was investigated using a highly sensitive radioimmunoassay. A high content of NMS peptide was found in the hypothalamus, midbrain, and pons–medulla oblongata, whereas abundant expression of NMS mRNA was detected only in the hypothalamus. These differing distributions of the mRNA and peptide suggest that nerve fibers originating from hypothalamic NMS neurons project into the brainstem. These results suggest novel, unknown physiological roles of NMS within the brainstem.

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	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生化学、ペプチド化学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：内分泌、神経ペプチド、生理活性ペプチド、ニューロメジン S

1. 研究開始当初の背景

生理活性ペプチドは、細胞間の情報伝達を担う主要な分子であり、ホルモンとしての内分泌的調節に加え、神経ペプチドとして摂食、飲水、性行動及び睡眠覚醒などの本能行動や、生体の恒常性を維持するための自律機能を調節する。このように、生理活性ペプチドは生体機能の調節において広範かつ重要な役割を果たしているため、新たな生体調節機構の解明を目的として、新規生理活性ペプチドの探索とその機能解析が古くから盛んに行われている。研究代表者の所属する研究室でも、これまでナトリウム利尿ペプチドファミリー（ANP、BNP、CNP）やアドレノメデ

ユリンの発見により新たな循環調節機構を、グレリンの発見により新しい摂食・エネルギー代謝調節機構を明らかにしている。

ニューロメジン S (neuromedin S: NMS) は、研究代表者の所属する研究室で最も新しく発見された生理活性ペプチドであり、中枢神経系、脾臓及び精巣で発現している。ラット脳では視床下部の視交叉上核で特に強い mRNA の発現が認められ、その局在と一致して視交叉上核に存在する概日時計の位相を変化させる興味深い機能を有する (Mori *et al.*, EMBO J., 2005)。

研究代表者らのグループと共同研究者を中心として、ラットへの NMS の脳室内投与

実験が行われた結果、視床下部の視交叉上核、弓状核、室傍核、及び視索上核が活性化され、これらの神経核の機能と一致して、概日時計の位相変化 (Mori *et al.*, EMBO J., 2005)、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン及び α -メラノサイト刺激ホルモンを介した摂食抑制 (Ida *et al.*, Endocrinology, 2005; Nakahara *et al.*, J. Endocrinol., 2010)、血中バソプレシン濃度上昇による尿量減少 (Sakamoto *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 2007)、オキシトシン分泌亢進による乳汁分泌増加 (Sakamoto *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 2008)、黄体形成ホルモンによる性腺刺激 (Vigo *et al.*, Endocrinology, 2007) のように、NMS の興味深い作用が示されている。しかしながら、NMS ニューロンが構成する脳内神経ネットワークが不明なため、NMS の生理的役割は未だ完全には確立されていない。

2. 研究の目的

新規生理活性ペプチドの発見とその機能解析による新しい生体調節機構の提唱は、これまで国際的に非常に高く評価されており、近年だけでもオレキシン (Sakurai *et al.*, Cell, 1998) やグレリン (Kojima *et al.*, Nature, 1999) の同定により、それぞれ睡眠覚醒や摂食・エネルギー代謝の新しい調節機構が解明されている。一方で、神経ペプチドの発現部位の解析とその知見に基づく生理機能解明についても、腰髄に存在するガストリン放出ペプチドによる雄性機能の制御 (Sakamoto *et al.*, Nat. Neurosci., 2008) や、視床下部弓状核のニューロメジン U による摂食・エネルギー代謝制御 (Hanada *et al.*, Nat. Med., 2004) のように、その成果は注目されている。本研究では後者のように、NMS について脳内分布をペプチドレベルで解析し、得られた情報に基づいてこれまで想定されていない新たな生理機能の検討を試みる。

3. 研究の方法

(1) NMS mRNA の脳内分布はこれまでに明らかにされているが、ペプチドレベルでの分布は不明である。このため、ラット NMS に特異的な抗血清を作製した。また、この抗血清を利用して NMS に対するラジオイムノアッセイを構築した。

(2) ペプチドレベルでの NMS の脳内分布を知るために、ラット脳を 6 つの領域に分割して、ラジオイムノアッセイにてそれぞれの領域におけるペプチド含有量を測定した。また、免疫組織化学染色での NMS の検出も試みた。

(3) 脳幹での NMS 受容体の発現は、これ

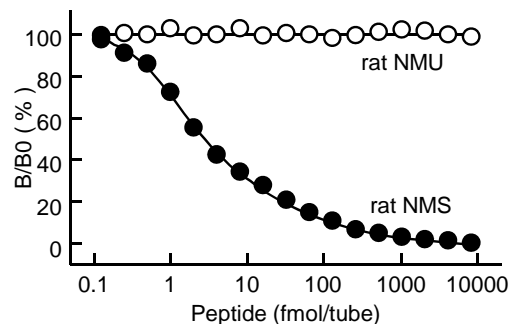
まで不明であったため、脳各部位における受容体の発現を RT-PCR にて検討した。

(4) 各種飼育条件において、脳内における NMS の組織含有量をラジオイムノアッセイにて測定した。

4. 研究成果

(1) ラット NMS は、36 アミノ酸残基で構成されるが、C 末端の 8 アミノ酸残基の構造は、ラットのニューロメジン U (NMU) と全く同一である。そこで、NMU との交差反応を回避するため、抗原部位には特異的配列である N 末端 20 アミノ酸残基の配列を利用した。抗原ペプチドをウサギに免疫して得られた抗血清の抗体価及び特異性は、ラジオイムノアッセイにて検討した。

合成ラット NMS を用いてラジオイムノアッセイの標準曲線を得た結果、中点は 6.2 fmol/tube、最低検出感度は 0.25 fmol/tube であり、高感度なラジオイムノアッセイが構築できたことが示された (図 1)。

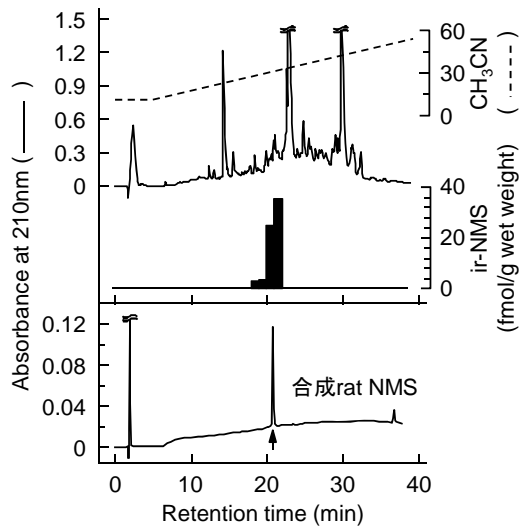


【図1】ラットNMSを検出するラジオイムノアッセイの標準曲線。ラットNMUへの交差反応はない。

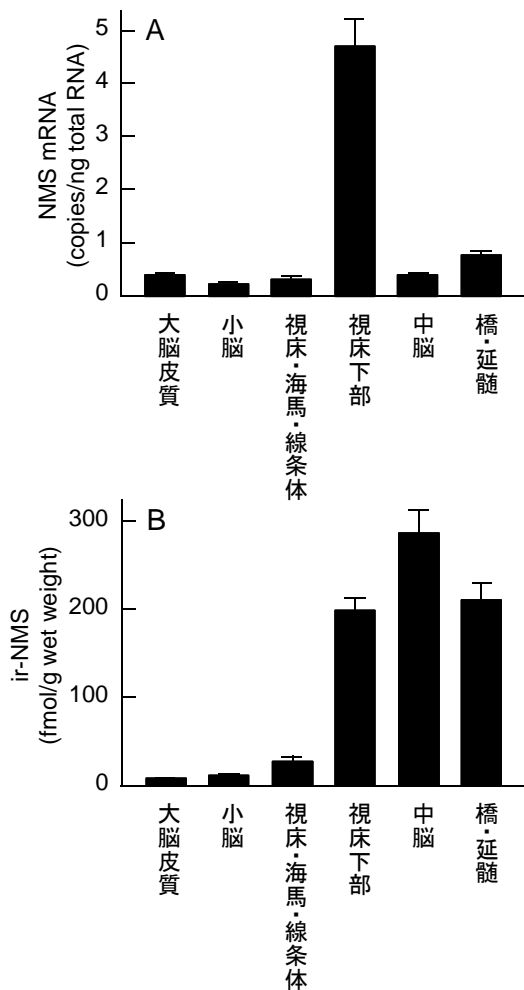
ラット NMS mRNA は、中枢神経系で強く発現している (Mori *et al.*, EMBO J., 2005)。そこで、ラット脳から得たペプチド抽出物を用いてラジオイムノアッセイの特異性を検討した。ペプチド抽出物は、逆相 HPLC にて 40 フラクションに分離した後、全てをラジオイムノアッセイに供した。この結果、合成ラット NMS の保持時間と一致した特異的な免疫活性が検出された (図 2)。また、直前に検出される微量な免疫活性は、ペプチド抽出の過程で酸化された NMS に由来する。これら以外のフラクションには、免疫活性が全く認められなかったため、本研究にて構築したラット NMS に対するラジオイムノアッセイは、極めて特異性が高いことが示された。また、全脳における NMS の組織含有量は、約 68 fmol/g 湿重量であった。

一方、ラット NMS mRNA は、脾臓と精巣でも発現しているが (Mori *et al.*, EMBO J., 2005)、これらの組織から得たペプチド抽出物ではラジオイムノアッセイにて免疫活性が検出されなかった。脾臓と精巣の細胞は構

成的分泌が主であることから、ペプチドが組織中に保持されにくいいため、NMS の免疫活



【図2】ラットNMSを検出するラジオイムノアッセイの特異性の確認。ラット脳から調製したペプチド抽出物を逆相HPLCにて分離した後、ラジオイムノアッセイを行うと、合成rat NMSの保持時間と一致して特異的に免疫活性が検出される。

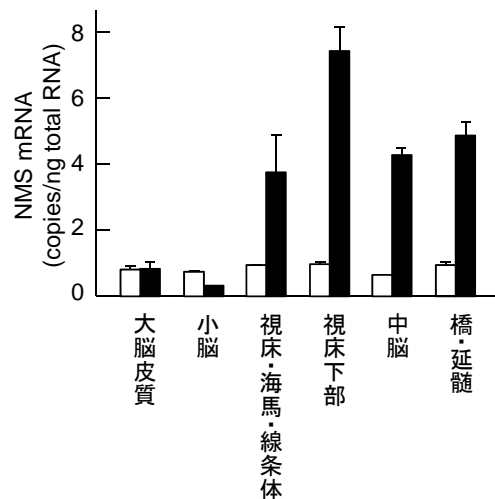


【図3】ラット脳におけるNMSのmRNA(A)とペプチド(B)の分布。

性が検出されなかったものと思われる。

(2) ラットの脳を、大脳皮質、小脳、視床・海馬・線条体、視床下部、中脳、橋・延髄の6つの領域に分割し、NMS の遺伝子発現量とペプチドの組織含有量を測定した (図3)。この結果、従来の報告と同様に NMS mRNA の強い発現は視床下部でのみ観察され、これに一致して豊富なペプチドも検出された。一方、遺伝子発現量の低い中脳と橋・延髄でも、視床下部に匹敵した濃度 (約 0.2~0.3 pmol/g 湿重量) でのペプチドの存在が明らかになった。これらの結果は、主に視床下部に存在する NMS 産生神経細胞から脳幹への神経線維投射が存在することを示唆している。また、免疫組織化学染色による解析では、脳幹網様体において NMS の免疫陽性反応が観察された。

(3) NMS の受容体は、NMU と同一であり、主に末梢組織で発現している 1 型と、中枢神経系に主に存在する 2 型の 2 種類が存在する (Brighton *et al.*, Pharmacol. Rev., 2004)。しかしながら、これらの脳幹での発現は不明であった。そこで、上記 6 つの領域での遺伝子発現量をリアルタイム PCR にて測定した (図4)。この結果、視床下部と同じく中脳と橋・延髄での 2 型受容体の十分な遺伝子発現が観察された。脳幹での受容体の存在が明らかにされたことから、NMS は同部位でも機能しうることが示された。



【図4】ラット脳におけるNMS1型受容体(白)と2型受容体(黒)の遺伝子発現の分布。

(4) 各種生理的条件下におけるラット脳での NMS の組織含有量を測定した。NMS は非常に強力な摂食抑制活性を有するが (Ida *et al.*, Endocrinology, 2005)、絶食状態にしても脳各部位におけるペプチドの組織含有量に変化は観察されなかった。一方、視床下部視交叉上核における NMS 遺伝子の発現量は、明期に高く暗期に低下する (Mori *et al.*,

EMBO J., 2005)。しかしながら、脳幹部だけでなく視交叉上核を含む視床下部でも明暗期でペプチド含有量に差が観察されなかった。今後、NMS の有する機能とペプチドの量的変化をさらに詳細に検討する必要がある。

本研究では、ラットの脳における NMS の分布を遺伝子とペプチドレベルで比較検討した結果、NMS 産生神経細胞は主に視床下部に存在し、そこからの神経線維投射が脳幹に達している可能性を示した。また、脳幹部での 2 型受容体の発現を明らかにしたことにより、NMS が脳幹で機能しうることを示した。一方で、これまでに明らかにされている NMS の機能は、全て視床下部の神経核に関連するものである。よって、本研究の成果は、脳幹に作用することによる NMS の未知の機能の存在を強く示唆している。最近、研究代表者の所属する研究室と共同研究者らにより、NMS が自律神経系を介して心拍数の調節に関与していることが示された。脳幹は中枢での循環調節に重要な部位であるため、今後は NMS と循環調節の関係を脳幹に着目して検討する必要がある。

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 2 件)

- ① Mori M, Mori K, Ida T, Sato T, Kojima M, Miyazato M, Kangawa K. Different distribution of neuromedin S and its mRNA in the rat brain: NMS peptide is present not only in the hypothalamus as the mRNA, but also in the brainstem. *Front Endocrin*, 査読有, 3, 2012, 152.
DOI: 10.3389/fendo.2012.00152
- ② 森健二、森美和、宮里幹也、寒川賢治、ニューロメジン S とその多様な機能、比較内分泌、査読無、第 37 巻、2011、124-133、
DOI: 10.5983/nl2008jsce.37.124

[学会発表] (計 3 件)

- ① 森美和、森健二、宮里幹也、寒川賢治、ニューロメジン S の機能と脳内分布、第 9 回 GPCR 研究会、2012 年 5 月 11 日、東京
- ② 森健二、森美和、宮里幹也、寒川賢治、ニューロメジン S の機能と脳内分布、第 85 回日本内分泌学会学術総会、2012 年 4 月 21 日、名古屋
- ③ 森美和、森健二、宮里幹也、寒川賢治、**Function and regional distribution of neuromedin S in rat brain.** 第 84 回日本

生化学会大会、2011 年 9 月 23 日、京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 美和 (MORI MIWA)

独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・特任研究員

研究者番号：50363148

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし