

新しい食欲制御神経ネットワークの解明

浮 穴 和 義

広島大学大学院総合科学研究科 准教授

諸 言

膵臓から分泌されるインスリンや脂肪細胞から分泌されるレプチンに加え、胃から分泌されるグレリンなど、エネルギーホメオスタシスに関わる末梢調節因子の研究は多数あり、さらに近年では中枢性食欲調節因子に関する知見も蓄積されてきた。特に、視床下部の弓状核において産生される食欲促進因子であるニューロペプチド Y や食欲抑制因子である色素細胞刺激ホルモン (α -MSH)、視床下部外側野において産生される食欲促進因子のオレキシンやメラニン凝集ホルモン (MCH) などが知られている¹⁻³⁾。現在の飽食の時代にメタボリックシンドローム対策やダイエットが叫ばれているが、食欲をもたらす根本的な脳内分子メカニズムの解明は十分ではない。

我々は、食欲調節において既知分子だけでなく未知分子が関与しているのではないかと考え研究を進めた結果、鳥類や哺乳類の視床下部の食欲調節中枢に特異的に発現している新規遺伝子を発見した (未発表データのため、遺伝子名未定)。さらに興味深いことに、この新規遺伝子は神経ペプチドの前駆体遺伝子であると考えている。現在、合成した本新規神経ペプチドの脳室内投与や siRNA による遺伝子ノックダウンにより個体レベルでの機能解析を進めており、食欲を促進させるという予備的データを得ている (図 1)。さらに、絶食、肥満モデル動物や糖尿病モデル動物などにおける新規遺伝子の発現制御機構を解析しており、幾つかの基礎的知見を得ている。

しかしながら、本新規遺伝子発現ニューロンの局在や神経ネットワークについてはまったく解析が進んでいない。そこで、本神経ネットワークを解明することで新しい食欲制御に関する脳内分子メカニズムの理解が進むと考え、本研究を行った。研究材料としてマウスとラットを用いた。

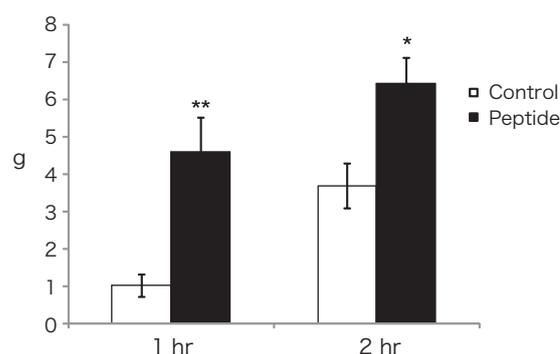


図 1 新規遺伝子がコードしている神経ペプチドの摂食行動への影響

ラットを用いて合成した新規神経ペプチドを脳室内投与し、累積摂食量を測定した。5 nmol (黒カラム) を投与したところ、1 時間及び 2 時間で摂食量を増加させる効果があった。
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

結 果

1. 緑色蛍光タンパク質 (GFP) トランスジェニックマウスを用いた新規遺伝子発現細胞の解析

近年の生命科学研究において局在解析の定法となっている緑色蛍光タンパク質 (GFP) を用いた解析を最初に試みた。新規遺伝子のプロモーターと緑色蛍光タンパク質 (GFP) cDNA とを連結させたベクターを作製し、新規遺伝子発現細胞に特異的に GFP が発現するトランスジェニックマウスの産出を行った。具体的には、新規遺伝子上流に位置するエンハンサー/プロモーター領域に続き、開始コドンの位置から GFP の cDNA を連結し、さらにポリ A シグナルを連結したベクターを構築した導入遺伝子を作成した。この導入遺伝子を前核期受精卵へ顕微注入し、ファウンダーマウスを得た。さらに、交配により F1 マウスを産出した。この F1 マウスやさらに交配したマウスを用いることで脳内 GFP 発現細胞を解析した。

その結果、GFP 発現細胞は脳内の特定の領域に数個レベルという極めて発現効率の低い状態であった。この

ため、新規遺伝子発現細胞の神経終末及び脳内の投射部位を解析することはできなかった。そこで、この解析手法は諦め、新規遺伝子がコードしている神経ペプチドに対する抗体を作成し、免疫組織化学的解析を行う実験に切り替えることとした。

2. *In situ* ハイブリダイゼーション法による新規遺伝子発現細胞の解析

上記のとおり、新規遺伝子の翻訳産物には神経ペプチドがコードされていると考えられ、この神経ペプチドに対する特異抗体を作成することとした。抗体作成のためには時間がかかるため、その間、*in situ* ハイブリダイゼーション法により新規遺伝子 mRNA の発現細胞の局在部位を詳細に解析する研究を行った。

まず、新規遺伝子 mRNA 発現細胞は、ラットの間脳視床下部の弓状核尾側に発現していることが明らかとなった (図 2)。

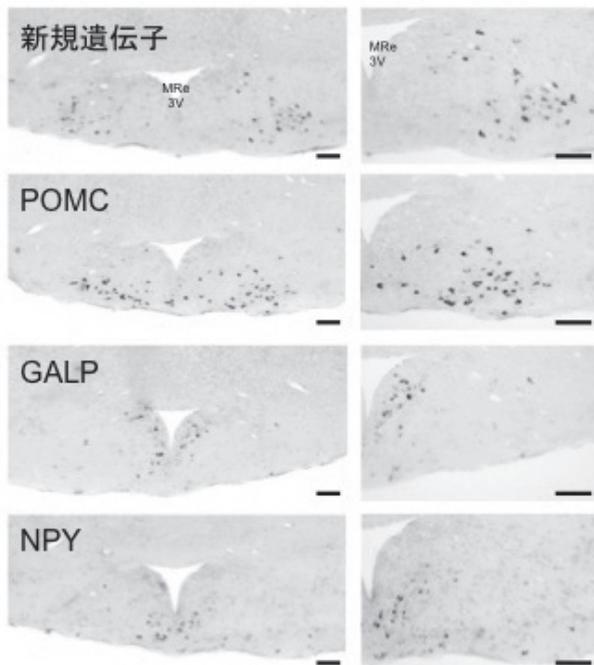


図 2 *In situ* ハイブリダイゼーション法による新規遺伝子及び既知の食欲調節因子の mRNA 発現細胞の検出

RNA プローブによる検出結果。POMC: α -MSH の前駆体タンパク質であるプロオピオメラノコルチン、GALP: ガラニン様ペプチド、NPY: ニューロペプチド Y。スケールバーは 100 μ m を示す。

この視床下部弓状核というのは、食欲調節に関わる様々な因子が発現していることが多くの先行研究から明らかになっており、末梢からのレプチンやインスリンなどの情報を受け取り、食欲調節を行っている中枢であ

ることが明らかにされている。そこで、既知の食欲調節因子との共存を明らかにする目的で、食欲促進因子のニューロペプチド Y (NPY)、食欲抑制因子の色素細胞刺激ホルモン (α -MSH) の前駆体タンパク質であるプロオピオメラノコルチン (POMC)、食欲調節因子のガラニン様ペプチド (GALP) との共存の可能性について、それぞれの遺伝子に特異的なプローブを作成し解析した。その結果、既知の食欲調節因子とは局在が異なることが明らかになった (図 2)。

次に、強力な食欲促進因子である NPY との神経連絡を解析する目的で、新規遺伝子 mRNA 発現細胞を *in situ* ハイブリダイゼーション法で検出し、NPY の神経線維を免疫組織化学的手法で検出する二重染色を行った。その結果、新規遺伝子発現細胞の周囲に密な NPY 神経線維の投射が認められた (図 3)。

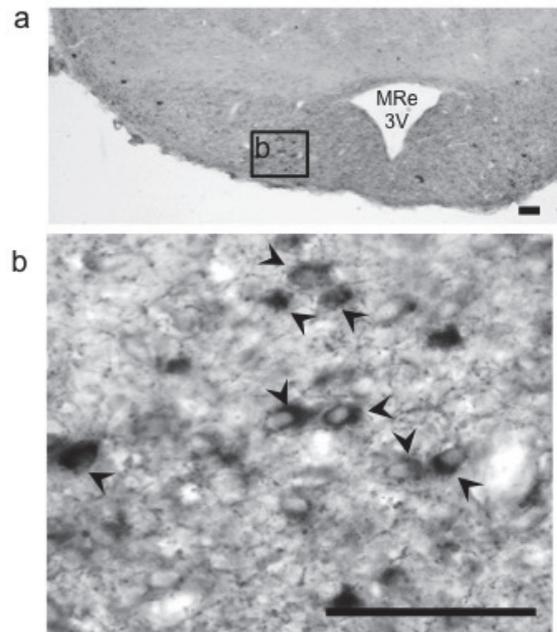


図 3 新規遺伝子発現細胞と NPY 神経線維の二重染色結果

新規遺伝子 mRNA 発現 (矢頭) を *in situ* ハイブリダイゼーション法により検出し、NPY の免疫陽性線維 (ドット状のシグナル) の検出を免疫組織化学的手法により行った。a の写真の枠部分を強拡大したものが b。スケールバーは 100 μ m を示す。

3. 特異抗体を用いた神経ペプチド免疫陽性細胞の解析

まず、新規遺伝子から翻訳される神経ペプチドに対する特異抗体の作成を試み、その結果、高い力価を示す抗体を得ることができた。抗体の特異性はドットブロット法により確認した。

次に、免疫組織化学的解析を行ったところ、視床下部

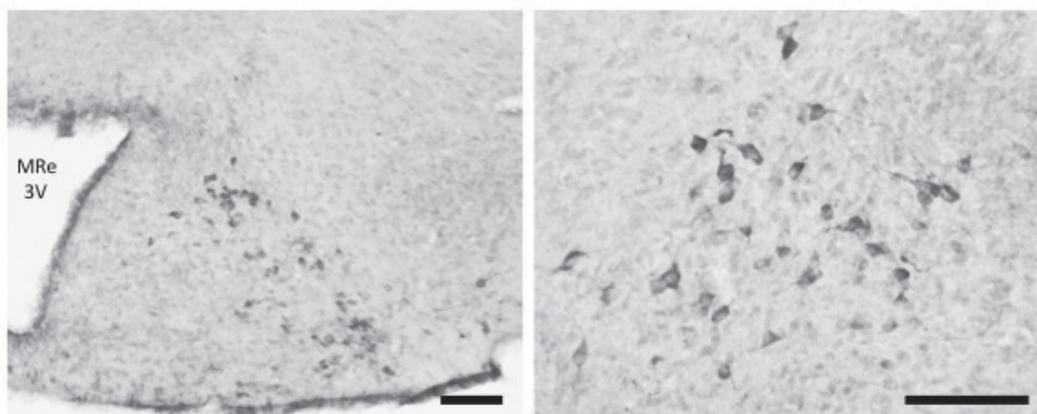


図4 新規遺伝子がコードしている神経ペプチドに対する抗体を用いた免疫組織化学的解析結果

特異的な抗体を用いて免疫組織化学的解析を行ったところ、視床下部弓状核尾側部分に免疫陽性細胞が検出できた。右の写真の拡大写真で細胞体と神経線維に免疫陽性反応があることがわかる。スケールバーは100 μ mを示す。

弓状核尾側に免疫陽性細胞が検出できた(図4)。さらに、過剰量の抗原で吸収させた中和抗体ではこの免疫陽性細胞は検出できなかったため、特異的な反応であることが示された。

この反応が出た領域は、上記の *in situ* ハイブリダイゼーション解析により mRNA 発現細胞が確認された領域と同じであった。

一方、免疫陽性反応を示す神経線維は視床下部領域に散在していた。その中でも正中隆起に比較的密な神経線維が検出できた(図5)。

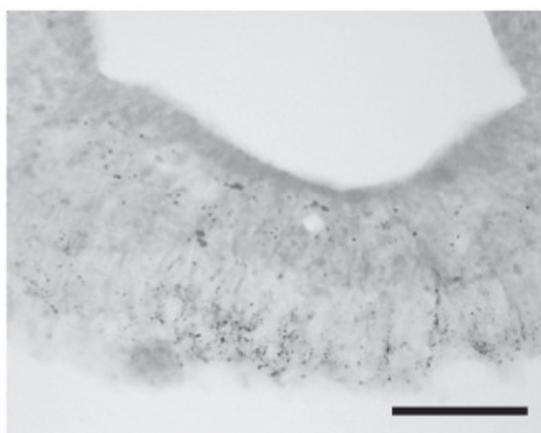


図5 視床下部正中隆起における神経ペプチドの免疫陽性線維

正中隆起に神経ペプチドの特異的な抗体で免疫陽性反応を示す神経線維(ドット状のシグナル)が検出された。スケールバーは100 μ mを示す。

考 察

本研究の申請書類では、我々が発見した新規遺伝子のプロモーター領域に GFP の cDNA 配列を結合させ、GFP 発現を指標に新規遺伝子発現細胞の局在と神経線維の投射を解析するというものであった。*In situ* ハイブリダイゼーション解析では、細胞体にのみシグナルが得られるため、新規遺伝子発現細胞の神経終末がどこかは不明である。つまり、新規遺伝子発現細胞の神経投射様式を明らかにすることができない。GFP トランスジェニックマウスでの期待は、新規遺伝子発現細胞に特異的に産出された GFP が軸索末端に輸送され、それにより神経終末の投射先が明らかになることであった。そこで、実際にトランスジェニックマウスの産出を試みたが、期待していた GFP の発現が不十分であり、本解析の遂行は途中で諦めざるを得なかった。この原因として、エンハンサー/プロモーター領域の絞り込みが不十分であり、転写効率が不十分であった可能性が考えられる。今後再度同様の解析を行う際には、ルシフェラーゼアッセイを行い、正確なエンハンサー/プロモーター領域の決定を行ったうえで解析を進める必要がある。さらに、GFP ではなく、他の蛍光タンパク質を用いることで検出感度を高める工夫を行う必要がある。

一方、既知因子を含めた *in situ* ハイブリダイゼーション解析により、新規遺伝子発現細胞は、視床下部の弓状核尾側にシグナルが検出された。隣接切片を用いた解析から、NPY、POMC、GALP の産生細胞とは異なる別の細胞であることが明らかになった。さらに、二重染色の結果から、新規遺伝子発現細胞は NPY 産生細胞から

の神経投射を受けて機能調節がなされている可能性が示された。今後、NPY 投与後の新規遺伝子の発現調節機構などを詳細に解析していく必要がある。

我々の先行研究において、新規遺伝子の翻訳後タンパク質から産生される神経ペプチドに対する抗体を作成し、免疫組織化学的に産出細胞の局在と神経線維の投射部位を解析する試みを何度となく試みた。しかしながら、力価が上がらず抗体が得られるものの、実際に免疫組織化学的解析を行うと陽性反応がまったく認められないという結果になった。固定液の変更やコルヒチン処理により軸索輸送を阻害した動物でもまったくポジティブな反応を得ることはできていなかった。そのために GFP トランスジェニックマウス作成に取り組みたいとの考えに至った。今回、GFP トランスジェニックマウスでの解析失敗の後に、神経ペプチドに対する抗体作成を再度試みたところ、初めて免疫陽性細胞の検出に成功することができた。過去の我々の解析との違いに関して原因は不明であるが、結果的に今回優れた抗体が得られたために期待以上の成果が得られた。おそらくエピトープとしての立体構造の認識の違いによるものと推察される。

さらに、脳下垂体前葉ホルモンの合成や分泌に関わる脳領域である正中隆起にも免疫陽性線維が検出されたことから、本神経ペプチドは脳下垂体前葉ホルモンの合成や分泌に関与している可能性が示唆された。

要 約

当初、新規遺伝子発現細胞の局在と投射部位の解析を目的として GFP トランスジェニックマウスを産出し解析を進めたところ、期待した結果を得ることができなかった。その後、*in situ* ハイブリダイゼーション法お

よび免疫組織化学的手法により形態解析を行ったところ、視床下部の弓状核尾側領域に新規遺伝子発現細胞が局在していることが明らかになった。既知因子の NPY、 α -MSH、GALP とは共存していないことも明らかになった。さらに、特異的な抗体の作成に成功し、新規遺伝子から神経ペプチドが産出されていることが本研究により初めて明らかになった。さらに、一部の免疫陽性線維は正中隆起に検出されたことから、本神経ペプチドが脳下垂体前葉ホルモンの合成や放出に関与している可能性が示唆された。

以上に示すとおり、本新規神経ペプチドが既知の食欲調節因子とは異なる脳内局在であったことから、新しい食欲制御神経ネットワークの理解が進んだと考えている。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、学術研究奨励金を賜りました公益財団法人三島海雲記念財団に心より感謝申し上げます。

また、本研究の遂行は、当研究室所属の岩越栄子博士、前嶋翔博士、大口悦宏氏、佐藤真実氏、佐藤瑠奈氏らの協力によりなされたものです。この場をお借りして感謝いたします。

文 献

- 1) J. E. McMinin et al.; *Obes. Rev.*, **1**, 37-46, 2000.
- 2) E. Valassi et al.; *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*, **18**, 158-168, 2008.
- 3) A. Sainsbury, L. Zhang; *Mol. Cell. Endocrinol.*, **316**, 109-119, 2010.