

新規ペプチドNMUによる生体時計調節作用

Regulation of circadian oscillator by the novel peptide, neuromedin U (NMU)

中原桂子 宮崎大学農学部獣医生理 助教授

Keiko Nakahara: Department of veterinary physiology, Faculty of Agriculture,
Miyazaki University

和文要旨

新規ペプチド、ニューロメジンU (NMU), の生体時計および反射機能におよぼす役割について検討した。NMUの中枢での存在部位を免疫組織化学的に検索したところ、生体時計部位である視交叉上核に認められた。NMU mRNA 発現は視交叉上核内で概日リズムを示し、そのピークはCT4-8時であった。NMUを脳室へ投与すると、投与時刻依存性に行動リズムの位相変位をおこし、また視交叉上核において Fos 蛋白質の発現と時計関連遺伝子 *per1* mRNA 発現量の増加をおこした。これらの結果は NMU が時計機構に局所的に作用し、時計を調節していることを示唆している。次に、NMU ノックアウト (NMU-KO) マウスにおいて痛みや熱に対する反射を調べた結果、反射機能の低下が認められた。一方、NMU の脳室内投与は投与量依存的にこれらの反射を亢進した。NMU 投与後、Fos 発現が反射に係わる脊髄、延髄弧束核および視床下部に認められた。これらのことから、NMU が反射機能に重要な役割を演じていると推測された。

Abstract

We investigated the role of novel peptide, neuromedin U (NMU), for circadian clock and reflex function. Immunohistochemical analysis revealed the presence of a gut-brain peptide, neuromedin U (NMU), in the suprachiasmatic nucleus (SCN), which is the site of the master circadian oscillator. The expression of NMU mRNA exhibited a circadian rhythm, with the peak expression in the SCN occurring at CT4-8 h. Icv injection of NMU induced the expression of Fos protein in the SCN and caused a phase-dependent phase shift of the circadian locomotor activity rhythm. Furthermore, ICV injection of NMU increased the expression of *Per1*, but not *Per2* in the SCN. These results indicate that NMU may play some important role in the circadian oscillator by exerting an autocrine or paracrine action in the SCN. Next, we compared nociceptive reflexes in NMU KO and wild-type mice. Hot plate and formalin tests revealed that reflexes to heat and pain were significantly decreased in NMU KO mice. Conversely, icv injection of NMU into wild-type mice stimulated nociceptive reflexes in a dose-dependent manner. After NMU injection, increased c-Fos expression was observed in a wide range of locations in hypothalamus, brainstem and spinal cord. These results suggest that endogenous NMU may be involved in reflexes.

研究目的

近年 GPR66(FM3)および FM4 の内因性リガンドとして23個のアミノ酸からなるニューロメジンU (NMU) が我々を含めて3つのグループから同時に同定された。この発見により、GRP66 (FM3) お

よび FM4 はそれぞれニューロメジンU 受容体 1 (NMUR1), 2 (NMUR2) と命名された。我々を含め、NMUを内因性リガンドとして同定した幾つかのグループは、このホルモンが摂食抑制ホルモンであることを報告した。しかし、NMUの作用

部位を検討するため、神経活性化の指標となる cFos の発現を NMU 投与後に調べた結果、視交叉上核(体内時計部位)あるいは脊髓や延髄弧束核(これらは反射、あるいは迷走神経支配などに関する)に多く発現していることから、NMU の作用が単に摂食抑制に留まらない可能性が推測された。そこで、本研究では NMU の新たな生理作用として、生体時計や反射機能への役割の可能性について検討した。

研究経過

実験 1) NMU の生体時計機構への関与について

NMU が生体時計機構へどのように関与しているかを調べるために、まず NMU の視交叉上核における発現を免疫組織化学的に検索した。用いた抗体は、合成 NMU を抗原にウサギ免疫で作成したものである。次に、視交叉上核内における NMU 受容体 mRNA の発現および NMU mRNA の発現に概日リズムが存在するか否かを、恒常暗下飼育ラットにおいて経時的に視交叉上核を取り出し、リアルタイム PCR で測定した。さらに、NMU の脳室内投与が時計のリズムに影響をおよぼすか否かを行動リズムを指標に検討した。また、NMU の投与において視交叉上核中のどのような遺伝子が影響を受けているのかを調べるため、マイクロアレイで検索し、有意な変化が認められた遺伝子 mRNA について、さらにリアルタイム PCR で定量化した。

実験 2) NMU ノックアウトマウスとワイルドマウスの熱や痛み反射の比較

NMU のノックアウトマウスを作成し(児島ら)、58 度の温熱に対する反射およびホルマリン接種に対する痛み反射をワイルドマウスと比較した。温熱反射はカットオフタイムを 30 秒間に設定し、ジャンプもしくは後肢をなめる反応が最初に見られるまでの時間を反射開始として判定した。痛覚反

射は 1%ホルマリン溶液 20 μ l を右後肢のパッド部分に投与し、投与後 1 時間までに肢をなめる時間を計測した。脳および脊髓をは投与後、c-Fos 免疫染色に供した。別に、側脳室に NMU あるいは生理食塩水を投与して、温熱や痛覚刺激に対する反応を評価した。

研究成果

脳の視交叉上核で NMU 陽性細胞が認められた(図 1a)。また、この視交叉上核に NMU の受容体 1 および 2 の mRNA の発現も認められた。それらの発現量を経時的に調べた結果、NMU と受容体 1 の mRNA は明期に相当する時刻に増加し、暗期に相当する時刻には低下することが(図 1 b, c)、受容体 2 の mRNA は暗期相当時刻に増加し、明期相当時刻に減少することが判明した(図 1 c)。さらに、ニューロメジン U を脳室内投与すると Fos 蛋白質が視交叉上核において発現した。NMU を恒常暗下で自由継続リズムを示すラットに投与すると、投与時刻依存性に、行動リズムの前進や後退が認められた(図 2 a)。時刻依存性位相反応をプロットしてみると、non-phot ic 型の位相反応であることが判明した(図 2 b)。特にサーカディアン時刻(CT) 6 時の投与は位相前進を起こしたので、この時刻の投与により、どのような遺伝子が増変したのかをマイクロアレイとリアルタイム PCR で検討した結果、時計関連遺伝子の転写因子と目される、幾つかの遺伝子 mRNA が増加していること、さらに時計関連遺伝子 *per1* の mRNA が増加したことが判明した。以上の結果は、ニューロメジン U が、視交叉上核内において、オートクラインあるいはパラクライン的に時計遺伝子に作用していることを示唆している。このように直接時計の遺伝子に作用できる蛋白質は極めて珍しい。

NMU ノックアウトマウス (NMU - K

O)は熱反射機能が低下していることが判明した(図3a)。次にホルマリンテストによる痛み反射を調べると、第2相(10分後からの反応)の慢性的痛みに対する反応が低下していることが判明した(図3b)。逆に、ワイルドマウスで、NMUを脳室内に投与すると、熱反射も痛み反射も通常より亢進することが示された(図4ab)。そこで、ニューロメジンU投与後の神経活性化の指標としてFos蛋白質の発現部位を調べてみると、弧束核や脊髄後核(ラミナエ)などに発現が認められた(図4c)。また、ホルマリンによる痛みを与えた後、脊髄のニューロメジンUmRNAの増加が認められた。以上の結果は、ニューロメジンUが熱や痛みの反射機能に関わっていること、その部位は恐らく脊髄の可能性を強く示唆している。

今後の課題と発展

体内時計の中樞は視交叉上核に存在していることが広く知られている。今回、新規蛋白質NMUが時計部位に局在して存在し、その受容体も同居していること、またNMUの投与で実際に視交叉上核にFosが発現したことから、NMUが視交叉上核に作用していることが証明された。NMUの投与がリズムを変化させ、時計関連遺伝子のmRNAの発現量を変化させたことから、NMUが時計に重要な役割を演じていることは間違いない。最近、NMUのノックアウトマウスで、リズムの異常が発見された(未発表)こともこの仮説を支持している。今後、NMUがどのように時計を調節しているのか、あるいは、リズム障害の治療に応用できるのが重要な研究課題である。一方、NMUノックアウトマウスで、痛みや

温熱反射機能が低下していることが見出された。逆にNMUを投与するとこれらの反射機能が亢進した。このことは、NMUが反射機構に関与していることを示唆している。免疫組織学的にもNMUの投与によって反射に関わる脊髄や弧束核においてFosが発現したのもこれを支持する。老齢化に伴う反射能力の低下がNMUに関連しているのか?あるいは、治療にNMUが適用できるのか?が今後の極めて重要な課題である。

今回の有意義な研究に多大な援助を頂きました日産科学振興財団に深謝いたします。

発表論文リスト

K.Nakahara, Y. Egi, M.Kojima, R. Hanada, T.Ida, M. Miyazato, K.Kangawa, N.Murakami

Neuromedin U is involved in nociceptive reflexes and adaptation to environmental stimuli in mice

Biochemical and Biophysical Research Communications 323:615-620, 2004

K. Nakahara, R. Hanada, N. Murakami, H. Teranishi, H. Ohgusu, N. Fukushima, M. Moriyama, T. Ida, K. Kangawa, M. Kojima

The gut-brain peptide neuromedin U is involved in the mammalian circadian oscillator system

Biochemical and Biophysical Research Communications 318:156-161,2004

K Nakahara, K Fukui, N Murakami

Involvement of thalamic paraventricular nucleus in the anticipatory reaction under food restriction in the rat

J.V.M.S. 66:1297-1300,2004

村上 昇、中原桂子、寒川賢治:「グレリンと胎児・新生児」日本臨床「臨床分子内分泌学」2004

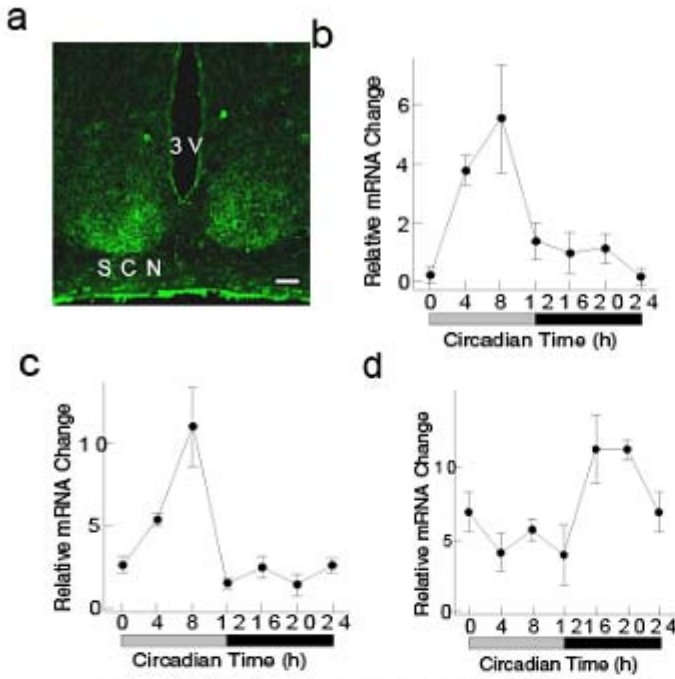


図1 視交叉上核におけるNMUペプチド発現(a)、NMU mRNA(b)、NMUR1 mRNA(c)、NMUR2 mRNA(d)発現リズム

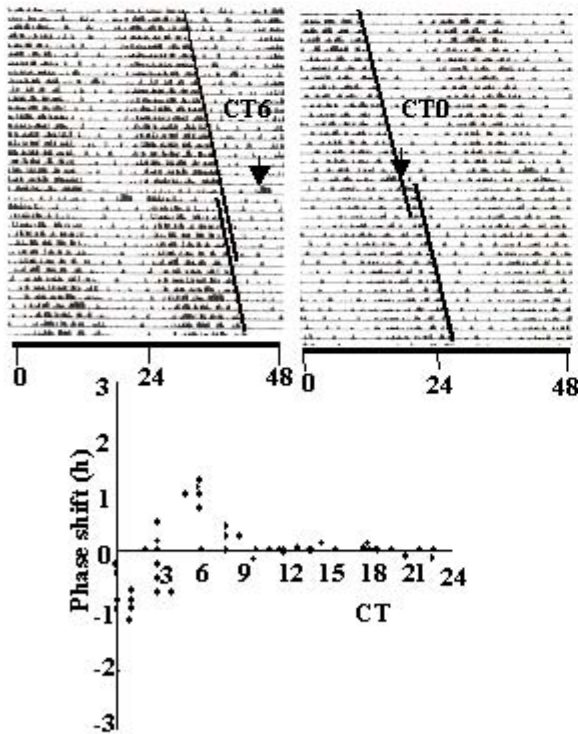


図2 NMU脳室内投与の行動リズムへの影響上は行動図の例で左は位相前進、右は後退を示す。下は投与時刻(CT)と位相変位の関係

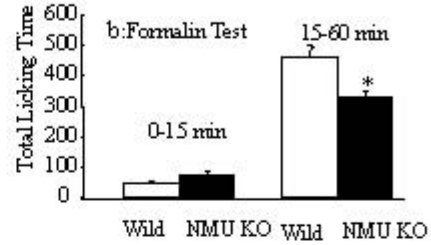
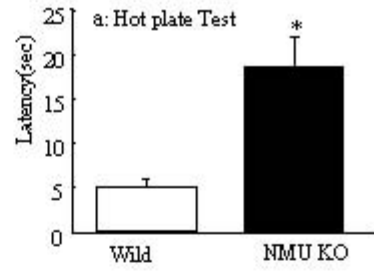
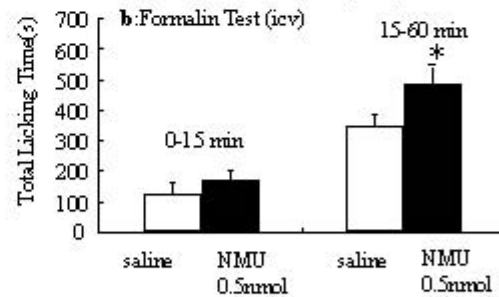
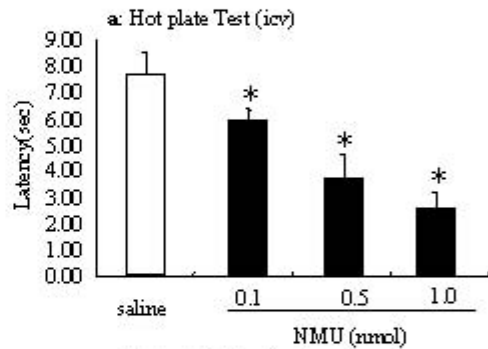


図3 NMUノックアウトマウスとワイルドマウスの熱、痛み反射機能の比較



c 頰束核(左)脊髄(右)のFos発現



図4 NMU脳室内投与の熱(a)、痛み(b)反射、およびFos発現(c)への影響