

**Doctoral Thesis**

**Studies on Biological Action of Novel Neurosecretory Proteins  
in Chickens and Rats  
(Digest)**

**Kenshiro Shikano**

**Division of Integrated Arts and Sciences  
Graduate School of Integrated Arts and Sciences  
Hiroshima University**

**March 2018**

## Contents

|   |     |
|---|-----|
| Abbreviation .....  | 2   |
| General Introduction .....  | 3   |
| <br>  |     |
| Chapter 1. Effects of chronic intracerebroventricular infusion of neurosecretory protein GL on body growth and food intake in chickens..... | 10  |
| Summary .....   | 11  |
| Introduction .....  | 12  |
| Materials and Methods .....   | 14  |
| Results .....   | 17  |
| Discussion .....  | 19  |
| Figures .....   | 22  |
| <br>  |     |
| Chapter 2. Effects of neurosecretory protein GL on de novo lipogenesis in white adipose tissue and feeding behavior in rats. ....           | 27  |
| Summary .....   | 28  |
| Introduction .....  | 29  |
| Materials and Methods .....   | 30  |
| Results .....   | 40  |
| Discussion .....  | 45  |
| Figures .....   | 48  |
| <br>  |     |
| Chapter 3. Effect of neurosecretory protein GL on brown adipose tissue in rats. ....  | 70  |
| Summary .....   | 71  |
| Introduction .....  | 72  |
| Materials and Methods .....   | 74  |
| Results .....   | 77  |
| Discussion .....  | 79  |
| Figures .....   | 82  |
| <br>  |     |
| Chapter 4. Effects of neurosecretory protein GL on body growth and growth hormone/insulin-like growth factor 1 axis in young rats. ....     | 88  |
| Summary .....   | 89  |
| Introduction .....  | 90  |
| Materials and Methods .....   | 92  |
| Results .....   | 94  |
| Discussion .....  | 96  |
| Figures .....   | 98  |
| <br>  |     |
| Chapter 5. Effect of neurosecretory protein GM on fat accumulation in rats. ....  | 106 |
| Summary .....   | 107 |
| Introduction .....  | 108 |
| Materials and Methods .....   | 110 |
| Results .....   | 114 |

|                                      |     |
|--------------------------------------|-----|
| Discussion -----                     | 117 |
| Figures -----                        | 120 |
| General Summary and Discussion ----- | 129 |
| Acknowledgements -----               | 134 |
| References -----                     | 135 |

## 学位論文の要約

### 序論

エネルギーバランスの異常は肥満を引き起こし、さらには糖尿病や心血管疾患などの合併症をもたらす。肥満問題の解決には、エネルギーの摂取や消費のメカニズムの解明が重要である。肥満の主な原因は過食であると考えられているため、これまでは摂食行動制御に着目した研究が数多く報告されてきた。視床下部はエネルギーホメオスタシス調節の中核として知られており、視床下部に存在する様々な生理活性物質が摂食行動を制御している。最近、鳥類の視床下部より2種類の新規視床下部分泌性小タンパク質 (NPGL 及び NPGM) の前駆体遺伝子が発見された。NPGL 及び NPGM は約 80 アミノ酸残基からなる小タンパク質であり、その遺伝子は脊椎動物において高度に保存されていることがわかっている。鳥類ニワトリを用いた NPGL の皮下慢性投与実験により体重増加に関与することが示唆されているものの、視床下部に発現する NPGL の脳内における作用は不明である。また、哺乳類などその他の動物種における新規小タンパク質の生理作用も示されていない。本研究では、鳥類ニワトリ及び哺乳類ラットを用いて、NPGL 及び NPGM の生理機能の解明を目的とした。

### 第1章 ニワトリを用いた NPGL 脳室内慢性投与の成長及び摂食量に及ぼす影響

*In situ hybridization* 法により、ニワトリにおける NPGL mRNA 発現細胞の局在は示されているが、タンパク質レベルでの内在性 NPGL の局在は不明である。また、NPGL の皮下慢性投与により体重が増加することが示されているが、NPGL の脳内での生理作用は明らかになっていない。第1章では免疫組織化学的手法を用いて、ニワトリの脳における NPGL 産生細胞及び神経線維の局在を解析した。その結果、NPGL 産生細胞は mRNA 発現と同様にニワトリの視床下部の漏斗核及び乳頭体核に局在することが明らかになった。また NPGL の神経線維は視床下部内や視床下部と下垂体の連絡路である正中隆起外層に局在していた。これらの結果から、NPGL は視床下部あるいは下垂体を介して作用することが示唆された。次に、浸透圧ポンプを用いた NPGL の脳室内慢性投与により、脳内における NPGL の作用を調べた。NPGL 脳室内慢性投与により摂食行動が亢進し、また体重の増加も認められた。以上より、ニワトリにおいて NPGL は脳内で作用し摂食行動や成長を誘導することが示された。

### 第2章 ラットを用いた NPGL の白色脂肪組織における *de novo* 脂肪合成及び摂食行動に及ぼす影響

第2章では哺乳類における NPGL の局在や生理作用を明らかにするために、哺乳類のモデル動物であるラットを用いて解析を行った。まず初めに、NPGL の mRNA 及びタンパク質の局在を調べた結果、NPGL は摂食中枢である視床下部の弓状核及び結節乳頭体核に局在することが明らかになった。次に、NPGL の前駆体遺伝子の過剰発現や脳室内慢性投与実験により生理作用の解明を試みた。その結果、NPGL の過剰発現及び投与により高カロリー食給餌下において過食が生じ、肥満を惹起した。一方で、内因性 NPGL の働きを抗体投与により阻害すると、脂肪蓄積の抑制が認められた。また、NPGL の過剰発現や投与により白色脂肪組織において糖質から脂質を生成する *de novo* 脂肪合成が亢進した。さらに NPGL を投与し、飼料選択実験を行うと炭水化物摂取が増加した。次に NPGL の発現がどのように誘導されるかを解析した。その結果、NPGL はインスリン低下により発現が亢進することが示唆された。以上より、NPGL は飢餓時に備え

て、*de novo* 脂肪合成の亢進や摂食行動の亢進により脂肪量を調節する因子であることが示唆された。

### 第3章 ラットを用いた NPGL の褐色脂肪組織に及ぼす影響

脂肪組織には主にエネルギーの貯蔵を行う白色脂肪組織とエネルギーを燃焼し熱産生を行う褐色脂肪組織がある。第3章においては NPGL が褐色脂肪組織に及ぼす影響を解析した。NPGL の前駆体遺伝子の過剰発現により、褐色脂肪組織重量は変化しないものの、形態学的解析により褐色脂肪組織における脂肪の蓄積が観察された。さらに内因性 NPGL を抗体中和すると褐色脂肪組織における脂肪蓄積が抑制された。以上のことから、NPGL が褐色脂肪組織において脂肪を蓄積させることが明らかになった。また、褐色脂肪組織において *de novo* 脂肪合成酵素の発現が亢進し、その一方で熱産生に関わる因子の発現が低下することが判った。さらに、NPGL により寒冷曝露下において熱産生能が低下することが示された。以上のことから、NPGL は褐色脂肪組織において脂肪蓄積を引き起こし、熱産生能を低下させることが示された。最後に視床下部の NPGL がどのように脂肪組織を制御するかを調べた結果、NPGL が褐色及び白色脂肪組織における交感神経活動を抑制することが示された。以上のことから、NPGL は交感神経活動の抑制を介して、脂肪組織における *de novo* 脂肪合成や褐色脂肪組織の機能低下を引き起こすことが示唆された。

### 第4章 ラットを用いた NPGL の成長及び成長ホルモン/インスリン様成長因子(GH/IGF1)軸に及ぼす影響

NPGL は高カロリー食給餌下においては過食が生じ体重が増加するが、普通食給餌下においては脂肪重量が増加するものの体重増加は認められない。そのため、除脂肪重量が減少している可能性がある。そこで、第4章では NPGL の骨格筋や骨への影響を解析し、NPGL が成長制御に関与するかを調べた。成熟ラットに NPGL の前駆体遺伝子を過剰発現すると、飼料効率が有意に低下し、摂取したエネルギーの内、成長に利用する割合が減少することが示唆された。一方、成長の速い幼若ラットに NPGL を過剰発現すると、対照群に対して、摂食量は変わらないが体重や飼料効率が顕著に低下した。また体長や骨長、骨格筋重量が低下したことから、NPGL が脂肪を増加させる一方で骨や骨格筋の成長を抑制させることが明らかになった。そこで NPGL が GH/IGF1 軸へ及ぼす影響を解析したが、変化は認められなかった。次に、幼若ラット及び成熟ラット、老齢ラットを用いて、NPGL と成長や摂食行動制御に関わる様々な因子の発達段階における遺伝子発現を解析した。その結果、それぞれ発達段階において発現量の変動が見られたが、NPGL は GH とのみ同様の発現パターンを示した。NPGL は他の摂食亢進因子とは発現パターンが異なっていたため、単に摂食を促し脂肪蓄積を引き起こす因子ではなく、NPGL は発達段階において脂肪量を調節・維持する因子であることが示唆された。

### 第5章 ラットを用いた NPGM の脂肪蓄積に及ぼす影響

NPGL 遺伝子にはパラログ関係にある NPGM 遺伝子が存在するが、その局在や生理作用は明らかになっていない。個体のエネルギー状態により NPGM 発現が変化するかを解析したところ、NPGM はインスリン低下に応答して合成が高まることが示唆された。次に形態学的解析により、NPGM の局在を調べた。その結果、NPGM は視床下部において NPGL と同一細胞で産生されることが示された。また NPGM は NPGL とは異なり軸索輸送を阻害するコルヒチン処理をしなくても細胞体に検出された。そのため NPGM は刺激に応答して軸索終末への輸送が開始し、一方で NPGL は恒常的に輸送されることが示唆された。さらに既知

の摂食調節因子との蛍光二重染色を行った結果、NPGM/NPGL 細胞の一部は弓状核において摂食亢進作用を持つガラニンと共局在した。NPGM 前駆体遺伝子の過剰発現による作用を調べると、白色脂肪組織重量が増加し、脂肪組織における *de novo* 脂肪合成の亢進も認められた。さらに、NPGM が交感神経活動の抑制を介して作用することが示唆された。以上より、NPGM は NPGL と同じく、飢餓時に備えて *de novo* 脂肪合成の亢進により脂肪量を調節する因子であることが明らかになった。

## 総合考察

鳥類ニワトリ及び哺乳類ラットを用いた本研究により、新規視床下部分泌性小タンパク質 (NPGL 及び NPGM) は摂食行動や脂質代謝などのエネルギーホメオスタシスを制御する因子であることが明らかになった。特にラットにおいては NPGL 及び NPGM が脂肪組織の *de novo* 脂肪合成を亢進させる作用が示された。これまで、脂肪組織の *de novo* 脂肪合成を制御する中枢性因子は報告されておらず、本研究によって初めて中枢性脂肪合成制御因子を明らかにした。*De novo* 脂肪合成は余剰の糖質から脂質を生成し、脂肪としてエネルギーを貯蓄するプロセスである。飽食の現代社会において脂肪合成は肥満人口を増加させる要因の一つであり、その制御機構の一端を明らかにできた。一方で交感神経活動を介して脂肪組織を制御していることが示唆されたが、どのような神経回路で交感神経活動を制御しているかは不明であり、NPGL/NPGM 細胞の標的細胞や受容体の探索が不可欠である。

NPGL 及び NPGM は脊椎動物において高度に保存されているため、鳥類及び哺乳類以外の動物種においてもエネルギーホメオスタシス調節に関与している可能性が高いと考えられる。しかしながら、本研究では、ニワトリにおける NPGL 及び NPGM の脂肪蓄積や脂質代謝への影響は明らかにしていない。また魚類や渡り鳥などは脂肪組織ではなく肝臓や筋肉にエネルギー源として脂肪を蓄えることが知られているため、様々な動物種を用いて NPGL 及び NPGM の生理作用を調べる必要がある。

ラットにおいて NPGL 及び NPGM は同一細胞で産生され、同様の生理作用を有することを明らかにした。一方で NPGL と NPGM は軸索終末への輸送が異なる可能性があり、NPGL は恒常的に軸索終末に輸送され、NPGM は刺激に応じて輸送が開始されることが示唆された。本研究により両者はともにインスリン低下に応答して遺伝子発現が増加することを示したが、その他にも両者を制御する因子が存在する可能性があるため、遺伝子発現のみならず軸索輸送についても検討する必要がある。これらの解析により、NPGL 及び NPGM の生理機能をさらに明らかにすることで、エネルギーホメオスタシス調節機構の解明に繋がることが期待される。

## 論文目録

### 学位論文

論文題目 Studies on Biological Action of Novel Neurosecretory Proteins in Chickens and Rats  
(ニワトリ及びラットにおける新規視床下部分泌性小タンパク質の生理機能に関する研究)

### 参考論文

#### I 関係論文

- 1 著者名: Kenshiro Shikano, Masaki Kato, Eiko Iwakoshi-Ukena, Megumi Furumitsu, Daichi Matsuura, Keiko Masuda, Tetsuya Tachibana, George E. Bentley, Lance J. Kriegsfeld, Kazuyoshi Ukena  
論文題目: Effects of chronic intracerebroventricular infusion of neurosecretory protein GL on body mass and food and water intake in chicks  
雑誌名: General and Comparative Endocrinology (査読制度あり)  
巻(号)、頁、発行年: Vol. 256, 37 頁-42 頁, 2018
- 2 著者名: Eiko Iwakoshi-Ukena, Kenshiro Shikano, Kunihiro Kondo, Shusuke Taniuchi, Megumi Furumitsu, Yuta Ochi, Tsutomu Sasaki, Shiki Okamoto, George E. Bentley, Lance J. Kriegsfeld, Yasuhiko Minokoshi, Kazuyoshi Ukena  
論文題目: Neurosecretory protein GL stimulates food intake, de novo lipogenesis, and onset of obesity  
雑誌名: eLIFE (査読制度あり)  
巻(号)、頁、発行年: e28527, 2017

#### II その他

- 1 著者名: Daichi Matsuura, Kenshiro Shikano, Takaya Saito, Eiko Iwakoshi-Ukena, Megumi Furumitsu, Yuta Ochi, Manami Sato, George E. Bentley, Lance J. Kriegsfeld, Kazuyoshi Ukena  
論文題目: Neurosecretory Protein GL, a Hypothalamic Small Secretory Protein, Participates in Energy Homeostasis in Male Mice.  
雑誌名: Endocrinology (査読制度あり)  
巻(号)、頁、発行年: Vol. 158 (No.5), 1120 頁-1129 頁, 2017
- 2 著者名: Kenshiro Shikano, Shusuke Taniuchi, Eiko Iwakoshi-Ukena, Megumi Furumitsu, George E. Bentley, Lance J. Kriegsfeld, Kazuyoshi Ukena  
論文題目: Chronic subcutaneous infusion of neurosecretory protein GM increases body mass gain in chicks.  
雑誌名: General and Comparative Endocrinology (査読制度あり) (印刷中: 2017 年 11 月 16 日受理)
- 3 著者名: Kenshiro Shikano, Yuki Bessho, Masaki Kato, Eiko Iwakoshi-Ukena, Shusuke Taniuchi, Megumi Furumitsu, Tetsuya Tachibana, George E. Bentley, Lance J. Kriegsfeld, Kazuyoshi Ukena  
論文題目: Localization and function of neurosecretory protein GM, a novel small secretory protein, in the chicken hypothalamus  
雑誌名: Scientific Reports (査読制度あり) (印刷中: 2017 年 12 月 19 日受理)