

助成番号 0741

塩代謝を制御する新規生理活性ペプチドの同定とその作用機構の解明

山口 秀樹, 中里 雅光

宮崎大学医学部内科学講座神経呼吸内分泌代謝学分野

概要 【目的】新規生理活性ペプチドの同定は、未知の情報伝達や制御機構の発見、ヒト病態の解析や創薬へとつながる。培養細胞株から新たな生理活性ペプチドの同定を試み、C 端がアミド化され生理活性が予測される 25 アミノ酸残基の NERP-1 (NeuroEndocrine Regulatory Peptide) と 38 アミノ酸残基からなる NERP-2 の新規ペプチドを発見した (JBC 282, 26354, 2007)。今回、ラット視床下部での新規ペプチド NERP の組織分布、細胞内局在、および水・電解質代謝調節における生理作用を検討した。

【方法と結果】免疫二重染色にて、NERP は視索上核や室傍核大細胞群に存在するバソプレッシン (AVP) と一部に共存していた。免疫電顕を用いた二重染色で、NERP と AVP は同一顆粒中に共存することが明らかとなった。48 時間後の絶水負荷で、室傍核と視索上核での NERP 前駆体タンパクをコードする遺伝子 *vgf* の発現が増強した。NERP は NaCl や angiotensin II のラット脳室内投与による血中 AVP 分泌促進作用を用量依存的に抑制した。この作用は C 端の非アミド構造体では認められず、NERP の生理作用の発現に C 端のアミド化が必須であった。NERP IgG の中枢投与による抗体中和実験で強制飲水による血中 AVP 分泌抑制がキャンセルされたことから、NERP は内因性に生物活性を有する生理活性ペプチドであることが明らかとなった。

【結論】NERP は、視床下部ニューロン分泌顆粒内で AVP と共存し、AVP 分泌を制御する新たな生理活性ペプチドである。

1. 研究目的

新規生理活性ペプチドの同定は、未知の情報伝達や制御機構の発見、ヒト病態の解析や創薬へとつながる。培養細胞株から新たな生理活性ペプチドの同定を試み、C 端がアミド化され生理活性が予測される 25 アミノ酸残基の NERP-1 (NeuroEndocrine Regulatory Peptide) と 38 アミノ酸残基からなる NERP-2 の二つの新規ペプチドを発見した¹⁾。NERP に対する特異的抗体を用いた検討で、NERP 前駆体タンパクをコードする *vgf* 遺伝子が発現する神経内分泌組織のなかで、中枢神経系、特に視床下部に高い NERP 免疫活性を認めた。今回ラットを用いて、視床下部での新規ペプチド NERP の組織分布、細胞内局在、および水・電解質代謝調節における生理作用を検討した。

2. 研究方法

2.1 HPLC/RIA による NERP 内在性分子型の同定

ラット NERP-1 および NERP-2 の C 端のアミノ酸を認識する抗体を作製し、既報に従い RIA を確立した²⁾。実験動物として 8~10 週齢の Wistar 系雄ラット (日本チャールズ・リバー (株), 滋賀) を用いた。室温・湿度を一定に保った明期 12 時間 (08:00 - 20:00)、暗期 12 時間 (20:00 - 08:00) サイクルの部屋に個別のケージにて自由摂餌・自由摂水で飼育した。実験操作時のラットへのストレスを軽減する目的で、ラットの馴化操作を毎日行った。10 週齢の Wistar 系雄ラットの視床下部を摘出し、既報に従い SepPak を用いてペプチド画分を精製・濃縮した³⁾。溶出したペプチド画分を逆相クロマトグラフィー (HPLC) で分離し、視床下部の免疫活性を RIA で検討した。

2.2 免疫染色による NERP の組織および細胞内局在

10 週齢の Wistar 系雄ラットをネンブタール(50 mg/kg BW, ip; Abbot Laboratories, Abbot Park, IL)で麻酔後、Paxinson & Watson の脳図譜に従い定位脳固定手術装置(ナリシゲ(株), 東京)にラット頭蓋を固定し、側脳室(Bregmaより前方0.8 mm、側方3.0 mm、脳表より1.8 mm)に直径0.9 mmのカニューレを挿入し、セメントで固定した。colchicine(200 µg)脳室内投与2日後、ネンブタール麻酔の後に、0.1% glutaraldehydeを含む2% paraformaldehyde (PFA)で灌流固定し免疫染色用に脳を摘出した。4°Cで48時間追固定を行い、20%スクロースを含む0.1 M PBに4°Cで2~3日かけて置換し保存した。マイクローム(大和光機工業(株), 埼玉)で40 µmに薄切し、0.1 M PBS中に4°Cで保存した。切片を室温で0.1 M PBSで5分間3回洗浄し、0.3% Trionを含む0.1 M PBSにて10分間インキュベートし、組織浸透性をあげた。0.1 M PBSで10分間3回洗浄した。10%正常ヤギ血清を含む0.1 M PBSTで3時間ブロッキングを行った。oxytocin (Chemicon, Temecula, CA, 1:15,000)、vasopressin (Peninsula laboratories, Torrance, CA, 1:80,000)をブロッキング溶液で希釈した。各抗体を添加し4°Cで24時間インキュベートした。切片を室温に戻し0.1 M PBSTで15分間3回洗浄し、蛍光色素抗体 Alexa 488(宿主:ヤギ, 抗マウス IgG 抗体, Molecular Probes, Inc: 1:400)で2時間インキュベートした。0.1 M PBSで10分間3回洗浄し、10%正常ヤギ血清を含む0.1 M PBSTで3時間ブロッキングを行った。NERP-1(1:2,500)、NERP-2(1:5,000)をブロッキング溶液で希釈した。各抗体を添加し4°Cで24時間インキュベートした。切片を室温に戻し0.1 M PBSTで15分間3回洗浄し、蛍光色素抗体 Alexa 568(宿主:ヤギ, 抗ウサギ IgG 抗体, Molecular Probes, Inc: 1:400)で2時間インキュベートした。0.1 M PBSで10分間3回洗浄し、Fluoromountで封入した。

また、免疫電顕用に、10 週齢の Wistar 系雄ラットを colchicine (200 µg) 脳室内投与 2 日後、0.1% glutaraldehydeを含む4% PFAで灌流固定し免疫染色用に脳を摘出した。免疫染色および免疫電顕は、既報の方法に従って行った^{4), 5), 6)}。抗体中和によるコントロール実験は、免疫前の家兎抗体および10 µgの合成ペプチドを添加した抗体を用いて検討した。

2.3 定量 *in situ* hybridization 法による視床下部 NERP 前駆体遺伝子 *vgf* 発現の評価

48時間水制限をした10週齢のWistar系雄ラット脳は摘出後直ちにドライアイス上で凍結し、-80°Cで保存した。-20°Cでクリオスタット(Leica Microsystems GmbH, Welzlar, Germany)を用いて12 µmに薄切し、室傍核(PVN)、視索上核(SON)を含む視床下部スライスを作製後、ゼラチンコーティングスライドガラスに貼り付けた。37°Cに加温したパラフィン伸展器上で切片を乾燥させ、乾燥後直ちに-80°Cで保存した。使用時に-30°C、室温と段階的に切片を解凍、乾燥させた。4% PFAを含む0.1 M PBで15分間固定を行った。0.1 M PBSで15秒間毎に2回洗浄後、プロテイナーズK(プロテイナーズK 1 µg/ml, 10 mM Tris-HCl(pH 8.0), 1 mM EDTA)処理を37°Cで15分間行い、4% PFAを含む0.1 M PBを用いて30分間室温で後固定した。0.1 M PBで1分間2回洗浄し、0.2 N HClで10分間インキュベートし、タンパク質を変性させた。0.1 M PBで1分間毎に2回洗浄し、0.1 M トリエタノールアミン(TEA)に1分間浸した後、0.25% 氷酢酸を含む0.1 M TEAで10分間処理した。0.1 M PBで1分間毎に2回洗浄した後、上昇系エタノールで脱水を行い風乾させた。予め85°Cで10分間加熱しておいたハイブリダイゼーション溶液(50% 脱イオン化ホルムアミド, 10 mM Tris-HCl(pH 7.6), 200 µg/ml イースト tRNA, 1× Denhart's solution, 600 mM NaCl, 0.25% SDS, 1 mM EDTA(pH 8.0), 10% 硫酸デキストラン)1 mlに³³P 3' end-labeled deoxyoligonucleotide probesでラベルしたNERP前駆体遺伝子 *vgf* (complementary to bases 1741-1785 and 1825-1870 of rat VGF nucleotides; accession number, M_74223)と vasopressin (AVP) 遺伝子 (complementary to bases 1843-1868 of rat vasopressin nucleotides)を加え、更に85°Cで3分間加熱した溶液を風乾後の切片に滴下した。上からパラフィルムを被せ、50°Cで17時間ハイブリダイズさせた。50°Cに加熱した2×SSC(300 mM NaCl, 30 mM クエン酸ナトリウム, pH 7.4)中でパラフィルムを外し15分間毎に2回洗浄し、0.2×SSCで15分間毎に2回洗浄した後、上昇系エタノールで脱水を行い風乾させた。スライドガラスを Emulsion (Kodak NTB3)でコートし、遮光した箱に4°Cで24時間後に現像した。Autoradiographic imagesは、MCID imaging analyzerを用いて定量した⁷⁾。コントロールとして、水制限をしていない

同週齢の Wistar 系雄ラット (n = 5 per group) を用いた。

2. 4 ラット脳室内 NERP または NERP IgG 投与による バソプレッシン分泌調節作用の検討

8 週齢の Wistar 系雄ラット (n = 8 - 14 per group) にネブタールで麻酔後、定位脳固定手術装置にラット頭蓋を固定し側脳室 (Bregma より前方 0.8 mm, 側方 3.0 mm, 脳表より 1.8 mm) に直径 0.9 mm のカニューレを挿入し、セメントで固定した。術後 1 週間の回復の後、異常のないラットを実験に用いた。午前 10 時の明期に、側脳室内に高張食塩水 (8.5 μmol NaCl/10 μl aCSF) または angiotensin II (0.1 nmol/10 μl aCSF) を脳室内に投与する 5 分前に、合成 NERP ペプチド (C 端がアミド体である NERP-1 と NERP-2、非アミド体である NERP-1-Gly と NERP-2-Gly) を脳室内に前投与した。高張食塩水または angiotensin II 脳室内投与 10 分後に断頭採血し、得られた血漿を SepPak で精製・濃縮し、RIA (Mitsubishi Chemical, Tokyo, Japan) を用いて血漿中 AVP 濃度を測定した。

脳室内にカテーテルを留置・固定した 8 週齢の Wistar 系雄ラット (n = 8 per group) に、胃ゾンデを用いて水を胃内に強制投与 (5 ml/100 g body weight) し、水負荷を行った。水負荷 15 分後、精製した抗 NERP-1-IgG (0.1 μg)、抗 NERP-2-IgG (0.1 μg)、免疫前家兎 IgG (0.1 μg) を脳室内に 60 秒以上かけて自由行動下で投与した。IgG 投与 45 分後に断頭採血し、得られた血漿を SepPak を用いて精製・濃縮し、AVP RIA キットを用いて血漿中 AVP 濃度を測定した。

動物実験に関しては学内倫理委員会の承認 (承認番号 108) を得て、当研究施設での動物実験指針に従い動物愛護の精神に基づいて行った。

2. 5 統計処理

得られた結果は means \pm SEM で表記した。統計解析は ANOVA and post-hoc Fisher's test を用い、危険率 0.05 以下を有意差ありとした。

3. 研究結果

3. 1 HPLC/RIA による NERP 内在性分子型の同定

NERP-1 および NERP-2 の C 端を認識する抗体は、HPLC で展開した合成 NERP-1 および NERP-2 をそれぞれ認識した。中点は NERP-1 が 20 fmol/tube NERP-2 が 10 fmol/tube であった。C 端が非アミド体である NERP-1-Gly

や NERP-2-Gly や 13 種類の生理活性ペプチドとの交叉性を検討した結果、いずれとも反応はなかった。ラット視床下部を用いた HPLC/RIA 解析にて、NERP-1 および NERP-2 ともに単一のピークを認め、大分子型は認めなかった。検出された NERP の溶出位置は、合成 NERP-1 および NERP-2 と同じであった (Fig. 1)。

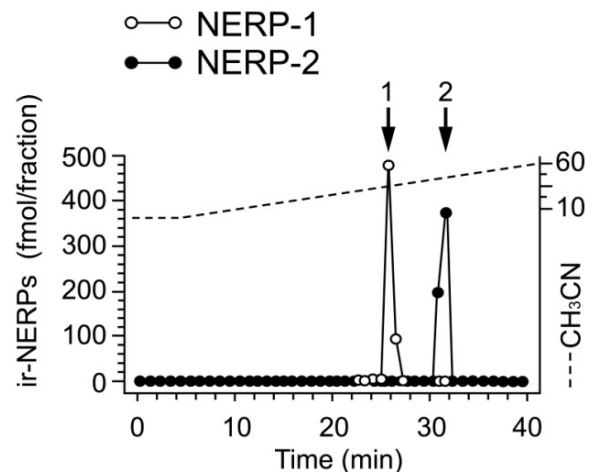


Fig. 1. Major endogenous forms of rat NERPs determined by RP-HPLC. Characterization of ir-NERPs from rat hypothalamus by RP-HPLC coupled with RIAs. Arrows 1 and 2 indicate the elution positions of synthetic rat 25-amino-acid-long NERP-1 (VGF285-309, open circle) and 38-amino-acid-long NERP-2 (VGF313-350, closed circle) of rat VGF (gi|13591864).

3. 2 免疫染色による NERP の組織および細胞内局在

NERP に対する特異的抗体を用いたラット脳の免疫染色で、視索上核に免疫陽性ニューロンを認めた。二重免疫染色にて、NERP-1 および NERP-2 ともに視索上核に内在する AVP と一部共存していた (Fig. 2, A-D)。一方、視索上核に内在するオキシトシンとは共存を認めなかった。過剰なペプチドを抗体に添加しておこなった中和免疫染色では、NERP による染色性が消失した (data not shown)。二重免疫電顕にて、NERP-1 および NERP-2 ともに視索上核内の AVP 細胞に存在し AVP と同一の貯蔵顆粒に局在していた (Fig. 2A, inset, 2C inset)。NERP-1 および NERP-2 ともに室傍核の magnocellular and parvocellular divisions に存在し (Fig. 2E, 2H)、二重免疫染色にて NERP-1 および NERP-2 ともに magnocellular divisions に存在する AVP と共存していた (Fig. 2G, 2J)。

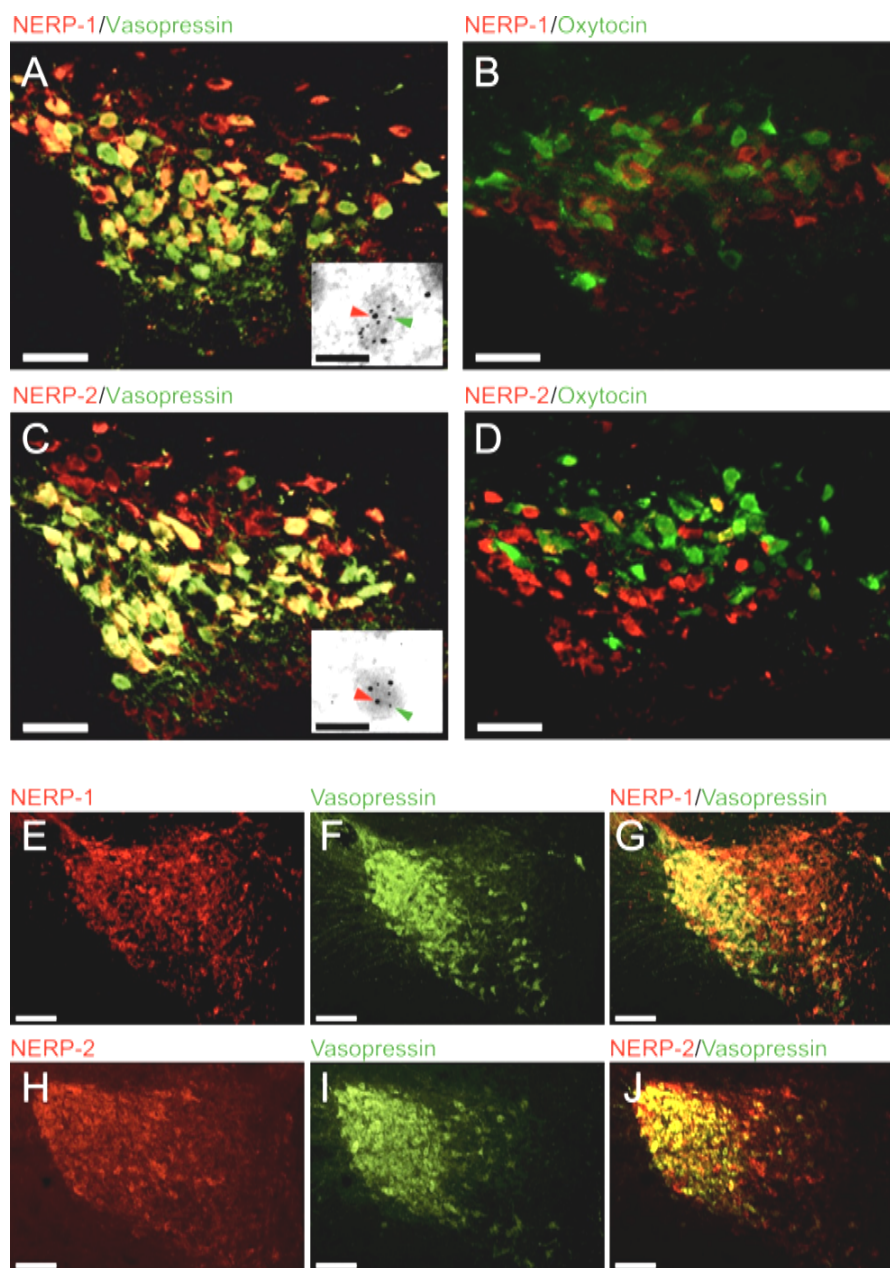


Fig. 2. NERPs colocalize with vasopressin in the PVN and SON of rats. A–D, NERPs-specific immunohistochemistry of the SON. NERP-1 and NERP-2 (both in red) colocalize with vasopressin (green), but rarely with oxytocin (green). *Scale bars*, 50 μ m. (Inset) Immunoelectron micrographs indicating the colocalization of NERPs (10-nm gold particles, red arrowhead) with vasopressin (5-nm gold particles, green arrowhead) in an SON neuron. *Scale bars*, 1 μ m. E–J, Immunofluorescence staining of NERPs in the PVN. NERP-1 and NERP-2 (both in red) colocalize with vasopressin (green). *Scale bars*, 100 μ m.

3. 3 定量 *in situ* hybridization 法による視床下部

NERP 前駆体遺伝子 *vgf* 発現の評価

48 時間後の絶水負荷で、室傍核と視索上核における NERP 前駆体遺伝子 *vgf* の発現は増強した (Fig. 3, A and B)。同時に検討した AVP の遺伝子発現も、48 時間の絶水負荷により、PVN は $153.0 \pm 13.6\%$; SON は $161.9 \pm 12.4\%$

と有意に増強した ($P < 0.01$)。

3. 4 ラット脳室内 NERP または NERP IgG 投与による バソプレッシン (AVP) 分泌調節作用の検討

既報^{8), 9)}のように、NaCl や angiotensin II (AII) のラット脳室内投与で血中 AVP 濃度が上昇した (Fig. 4, lanes 2 and lane 11)。NERP-1 は、NaCl や AII のラット脳室内投与

による血中 AVP 分泌亢進を用量依存的に抑制した。最小有効量が 0.3 nmol であった。NERP-2 も NERP-1 同様にラット脳室内投与による血中 AVP 分泌亢進を用量依存的に抑制したが、NERP-1 に比べ活性は弱かった。非アミド体である NERP-1-Gly または NERP-2-Gly は、NaCl や AII

のラット脳室内投与による血中 AVP 分泌亢進を抑制しなかった。

ラット胃への急性水負荷にて、血中 AVP 濃度は低下した。NERP IgG の脳室内前投与にて、急性水負荷による血中 AVP 濃度の低下は認められなかった (Fig. 5)。

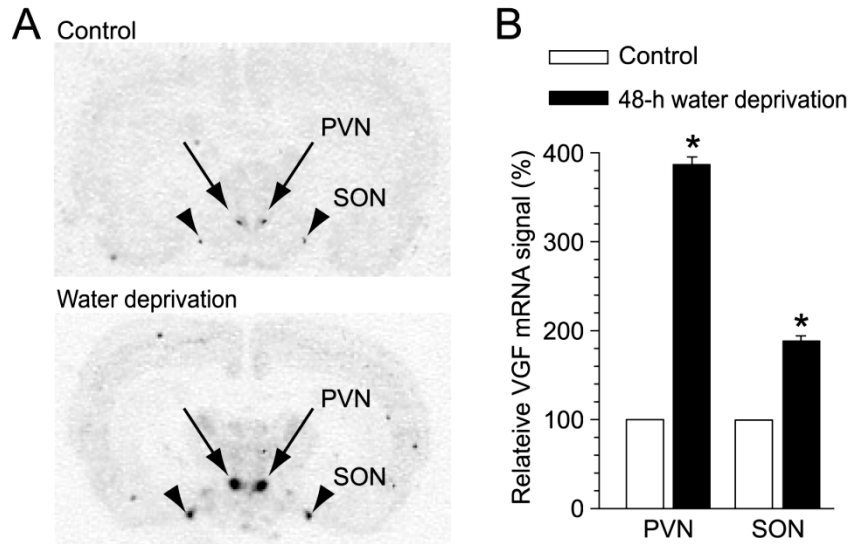


Fig. 3. *In situ* hybridization of *vgf* gene, precursor of NERPs, in the SON and PVN in rats after 48-h water deprivation. A, Increased VGF gene expression in the PVN (arrows) and SON (arrowheads) following 48-h water deprivation. B, Quantitative densitometric analysis of (A). * $P < 0.01$.

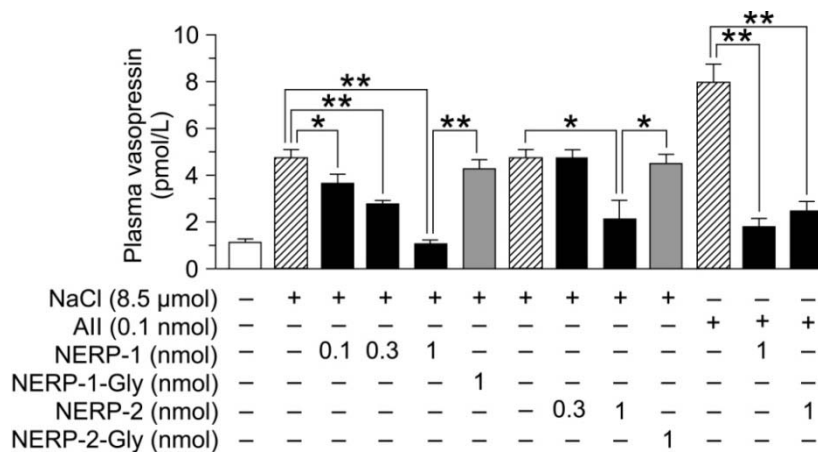


Fig. 4. NERPs suppress vasopressin secretion *in vivo* in rats. Effect of icv-administered NERPs on rat plasma vasopressin levels in response to icv stimulation with hypertonic NaCl or angiotensin II (AII). Icv administration of NERPs, but neither NERP-1-Gly nor NERP-2-Gly, to rats suppressed plasma vasopressin elevation induced by icv stimulation with hypertonic NaCl or AII. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

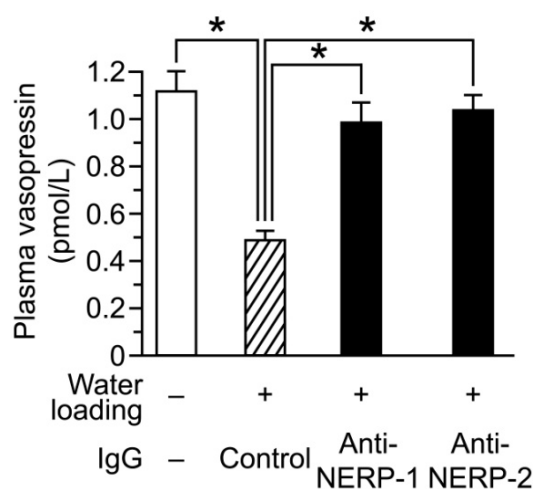


Fig. 5. Immunoneutralization of NERPs on the vasopressin secretion *in vivo* in rats. Icv administration of anti-NERP-1 IgG or anti-NERP-2 IgG reversed plasma vasopressin suppression induced by water loading. * $P < 0.01$.

4. 考 察

NERP の前駆体タンパクをコードする *vgf* 遺伝子は、神経成長因子 (NGF) を rat pheochromocytoma PC12 細胞に添加した際に誘導される遺伝子として同定された¹⁰⁾。VGF タンパクは 617 個のアミノ酸からなり、PC12 細胞内では dense core granules に局在し、調節性分泌 (regulated pathway) で分泌顆粒から放出されることが報告されている^{11), 12)}。VGF タンパクは prohormone convertases により切断される塩基性アミノ酸配列を多数有し、種々の生理活性ペプチドの前駆体タンパクであると考えられている¹³⁾。現在までに、VGF 前駆体タンパク由来の TLQP-62 や AQEE-30 ペプチドはラット海馬スライスを用いた解析でシナプス活動を活性化すること¹⁴⁾、アルツハイマー病予測マーカーの候補タンパクであること^{15), 16)}、AQEE-30 や LQEQ-19 ペプチドは性機能に関与すること¹⁷⁾ が報告されている。最近、VGF 前駆体タンパク由来の TLQP-21 が摂食・エネルギー代謝調節に関与すること¹⁸⁾、VGF 遺伝子改変マウスの解析から VGF タンパクが抗うつ作用を有することが報告されている¹⁹⁾。VGF 関連ペプチドはアミノ酸配列から存在が推定されるペプチド断片であったが、今回我々が同定した NERP-2 はヒトおよびラットアミノ酸配列 345-GLG-|-GRG-350、348-DLG-|-GRG-353 で切断されており、バイオインフォマテックス解析では存在の推定は困難であった。ペプチド機能の発現のためにはゲノム配列か

らは予測できない特異的切断や翻訳後修飾が必要である場合が多く、生体内に内在し機能するペプチドの同定と解析が不可欠である。佐々木らや南野らによるペプチド同定に特化した解析法^{20), 21)} は、新たな生理活性ペプチドの発見に有力なツールとなることが証明された。

培養細胞から同定された NERP の内在性分子型を NERP 特異的自家抗体の RIA を組み合わせた HPLC 法でラット視床下部抽出物を用いて解析した。ラット視床下部での NERP 免疫活性を合成 NERP-1 および NERP-2 の溶出位置のみに認め、NERP はわれわれが同定した分子型で存在することが明らかとなった。

NERP の前駆体タンパクをコードする *vgf* 遺伝子が中枢神経系に発現し、NERP の特異的抗体を用いた NERP 組織含量の検討にてラット脳、特に視床下部に高い免疫活性を認めたため、免疫染色を用いて NERP の視床下部での局在を検討した。視床下部の種々の神経核 (弓状核や外側野など、data not shown) に NERP 陽性ニューロンを認めたが、特に視索上核と室傍核に強い免疫染色性を認めた。視索上核と室傍核大細胞群に存在する AVP との二重染色で一部に共存を認めた。免疫電顕を用いた二重染色で、NERP と AVP は同一顆粒中に共存することが明らかとなった。

NERP が AVP と共存していたことから、NERP が水・電解質代謝調節に関与することが推察された。48 時間水制限したラットで視床下部 *vgf* 遺伝子発現を検討した結果、脱水により室傍核や視索上核の AVP 発現増強とともに NERP の前駆体タンパクをコードする *vgf* 遺伝子の発現も有意に増加した。この結果、NERP が生体内の水・電解質調節に関与することが示唆された。

AVP 分泌への NERP の関与を検討するため、高張食塩水やアンギオテンシン II (AII) の脳室内投与による血中 AVP 分泌促進作用への関与を検討した。ラット側脳室に高張食塩水や AII を投与すると既報のように血中 AVP 濃度は増加した^{8), 9)}。中枢内への NERP-1 前投与にて高張食塩水や AII による血中 AVP 分泌促進作用は用量依存性に抑制された。C 端がアミド体でない NERP-1-Gly は AVP 分泌抑制作用がなく、NERP の生理作用の発現に C 端のアミド化が重要であることが明らかとなった。NERP-2 も NERP-1 同様に高張食塩水や AII の中枢投与による血中 AVP 分泌促進作用を抑制したが、NERP-1 よりも活性は

弱かった。NERP IgG の中枢投与による抗体中和実験で、強制飲水による血中 AVP 分泌抑制がキャンセルされたことから、NERP は内因性に生物活性を有する生理活性ペプチドであることが明らかとなった。

以上、NERPは視床下部ニューロン分泌顆粒内でAVPと共存し、AVP分泌を制御する新たな生理活性ペプチドであることを明らかにした。NERPの発見は、AVPを介する体液・循環調節の新たな制御システムの解明や病態の解析に有用であると考えられる。

5. 今後の課題

AVP 分泌は、種々の neurotransmitters や neuromodulators による AVP ニューロンの電気活動で調節されている^{8),9)}。主要な AVP ニューロンへの神経シグナルは、シナプス前終末部から放出される興奮性の glutamate と抑制性の GABA (γ -aminobutyric acid) である。われわれは、新規ペプチド NERP が AVP 分泌を抑制することを明らかにしたが、作用機序としてシナプス前終末部もしくは AVP ニューロン自体に autocrine もしくは paracrine として作用し AVP ニューロンの興奮性を抑制することが推察される。パッチクランプ法を用いた電気生理学的な解析やマイクロダイアリース法を用いた Glutamate/GABA 動態の解析を行い、NERP 作用機構を明らかにしたい。また NERP の受容体は未同定であるため orphan GPCR や各種イオンチャネルをスクリーニングにて受容体を同定し、NERP の細胞内シグナル情報伝達機構を明らかにすることは重要な課題である。高齢者などに認められる ADH 分泌過剰症による低ナトリウム血症の発症に中枢での NERP 機能不全も推察されるため、ヒト検体を用いた NERP 解析は塩代謝異常病態の解明のための臨床重要課題の一つである。

文献

1. Yamaguchi H, Sasaki K, Satomi Y, Shimbara T, Kageyama H, Mondal MS, Toshinai K, Date Y, González LJ, Shioda S, Takao T, Nakazato M, Minamino N. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 26354-26360
2. Katafuchi, T., Kikumoto, K., Hamano, K., Kangawa, K., Matsuo, H., and Minamino, N. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 12046-12054
3. Mondal, M. S., Nakazato, M., Date, Y., Murakami, N., Yanagisawa, M., and Matsukura, S. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **256**, 495-499
4. Toshinai, K., Date, Y., Murakami, N., Shimada, M., Mondal, M. S., Shimbara, T., Guan, J. L., Wang, Q. P., Funahashi, H., Sakurai, T., Shioda, S., Matsukura, S., Kangawa, K., and Nakazato, M. (2003) *Endocrinology* **144**, 1506-1512
5. Gies, U., and Theodosios, D. T. (1994) *J. Neurosci.* **14**, 2861-2869
6. Date, Y., Ueta, Y., Yamashita, H., Yamaguchi, H., Matsukura, S., Kangawa, K., Sakurai, T., Yanagisawa, M., and Nakazato, M. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 748-753
7. Nakazato, M., Murakami, N., Date, Y., Kojima, M., Matsuo, H., Kangawa, K., and Matsukura, S. (2001) *Nature* **409**, 194-198
8. Yamashita, H., Ueta, Y., and Dyball, E. R. (2002) in *Hormones, Brain and Behavior*: 160, pp.1-49, Academic Press, New York
9. Wells, T., and Forsling, M. L. (1992) *J. Physiol. Pharmacol.* **43**, 59-64
10. Levi, A., Eldridge, J. D., and Paterson, B. M. (1985) *Science* **229**, 393-395
11. Possenti, R., Eldridge, J. D., Paterson, B. M., Grasso, A., and Levi, A. (1989) *EMBO J.* **8**, 2217-2223
12. Benson, D. L., and Salton, S. R. (1996) *Brain Res. Dev. Brain Res.* **96**, 219-228
13. Levi, A., Ferri, G. L., Watson, E., Possenti, R., and Salton, S. R. (2004) *Cell. Mol. Neurobiol.* **24**, 517-533
14. Alder, J., Thakker-Varia, S., Bangasser, D. A., Kuroiwa, M., Plummer, M. R., Shors, T. J., and Black, I. B. (2003) *J. Neurosci.* **23**, 10800-10808
15. Carrette, O., Demalte, I., Scherl, A., Yalkinoglu, O., Corthals, G., Burkhard, P., Hochstrasser, D. F., and Sanchez, J. C. (2003) *Proteomics* **3**, 1486-1494
16. Huang, J. T., Leweke, F. M., Oxley, D., Wang, L., Harris, N., Koethe, D., Gerth, C. W., Nolden, B. M., Gross, S., Schreiber, D., Reed, B., and Bahn, S. (2006) *PloS Med.* **3**, e428
17. Succu, S., Cocco, C., Mascia, M. S., Melis, T., Melis, M.

- R., Possenti, R., Levi, A., Ferri, G. L., and Argiolas, A. (2004) *Eur. J. Neurosci.* **20**, 3035-3040
18. Bartolomucci, A., La Corte, G., Possenti, R., Locatelli, V., Rigamonti, A. E., Torsello, A., Bresciani, E., Bulgarelli, I., Rizzi, R., Pavone, F., D'Amato, F. R., Severini, C., Mignogna, G., Giorgi, A., Schinina, M. E., Elia, G., Brancia, C., Ferri, G. L., Conti, R., Ciani, B., Pascucci, T., Dell'Omo, G., Muller, E. E., Levi, A., and Moles, A. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 14584-14589
19. Hunsberger JG, Newton SS, Bennett AH, Duman CH, Russell DS, Salton SR, Duman RS. (2007) *Nat Med.* **13**, 1476-1482
20. Sasaki, K., Sato, K., Akiyama, Y., Yanagihara, K., Oka, M., and Yamaguchi, K. (2002) *Cancer Res.* **62**, 4894-4898
21. Minamino, N., Tanaka, J., Kuwahara, H., Kihara, T., Satomi, Y., Matsubae, M., and Takao, T. (2003) *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **792**, 33-48

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、助成賜りました財団法人ソルト・サイエンス研究財団に厚くお礼申し上げます。

No. 0741

Functional Analysis of Novel Bioactive Peptides on the Salt and Water Regulation

Hideki Yamaguchi, Masamitsu Nakazato

Division of Neurology, Respiriology, Endocrinology and Metabolism, Department of Internal Medicine,
Miyazaki Medical College, University of Miyazaki

Summary

The discovery of novel neuropeptides opens avenues to delineate unidentified neural functions and to develop new drugs. We analyzed peptides secreted from human medullary thyroid carcinoma TT cells that produces amidated peptides, and have identified two novel amidated peptides, designated neuroendocrine regulatory peptide (NERP) -1 and NERP-2 (J Biol Chem, 282, 26354-60, 2007). NERP-1 and NERP-2 are 25 and 38 amino acids long, respectively, and are derived from distinct regions of the neurosecretory protein VGF. RP-HPLC coupled with radioimmunoassay analysis of hypothalamus extract demonstrated the endogenous presence of NERP-1 and NERP-2 in the rat. Ir- NERPs were highly abundant in the rat hypothalamus, especially in the SON and PVN. Immunofluorescence microscopy showed that NERPs frequently colocalized with vasopressin, but rarely with oxytocin. Within the PVN, immunostaining of NERPs was detected in both magnocellular and parvocellular divisions. Immunogold electron microscopy revealed the colocalization of NERPs with vasopressin in storage granules. VGF mRNA levels in both the PVN and SON were upregulated upon water deprivation in rats, accompanied by the upregulation of vasopressin mRNA levels. Icv injection of hypertonic NaCl or AII increased plasma vasopressin levels in rats. This stimulation was dose-dependently suppressed by icv injection of NERP-1 before injection of the vasopressin secretagogues. Similar effects were observed with NERP-2, but its potency was weaker than that of NERP-1. Neither non-amidated NERP-1 (NERP-1-Gly) nor non-amidated NERP-2 (NERP-2-Gly) suppressed vasopressin secretion. Icv administration of anti-NERP-1 IgG or anti-NERP-2 IgG significantly reversed plasma vasopressin suppression induced by acute water loading, suggesting that NERPs function as endogenous peptides to regulate vasopressin secretion. Further studies of NERPs and their receptors will pave the way for elucidating unknown regulatory mechanisms as well as developing novel therapeutics for inappropriate secretion of vasopressin.