

助成番号 0840

新規水・塩代謝調節ペプチドの発見とその分子生物学的研究

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】新規視床下部ペプチドである NERP (NeuroEndocrine Regulatory Peptide) は視床下部視索上核および室傍核の大細胞性神経分泌ニューロンで抗利尿ホルモン (AVP) と共存し、AVP 分泌を抑制する生理活性ペプチドであることを報告した (JBC 282, 26354, 2007)。今回、NERP の AVP 分泌抑制機序を解析した。

【方法と結果】ラット脳スライス標本を用いて視索上核大細胞性神経分泌ニューロンの興奮性シナプス後電流 (EPSCs) に対するアンギオテンシン II (AII) および NERPs の効果をパッチクランプ法により検討した。TTX 非存在下において NERPs 単独投与で EPSCs は変化しなかったが、AII 投与によって惹起される (誘発性) EPSCs の頻度増加は NERPs 添加により抑制された。TTX 存在下では AII 誘発性 EPSCs の頻度増加は NERP-1 投与で抑制されたが、NERP-2 ではその抑制効果が消失した。TTX 非存在下で GABA (A) 受容体阻害剤である bicucullin の前投与により AII 誘発性 EPSCs の頻度増加を抑制する NERP-2 の作用が消失した。NERPs のグルタミン酸 (Glu) 放出抑制作用を確認するため、ラット室傍核に微小透析用プローブを挿入して Glu 放出の経時的変化を検討した。NERPs は Glu 放出を抑制するも、NERPs の C 端がアミド体でない NERPs-Gly には Glu 放出抑制作用はなく、生理活性の発現に C 端のアミド化が必須であった。

【結論】NERP-1 はシナプス前 Glu 神経終末、NERP-2 はシナプス前 Glu 神経終末に連結する GABA 作動性介在ニューロンに作用して、シナプス前終末からの Glu 放出を抑制し、AVP 分泌を抑制することが示唆された。

1. 研究目的

新たな生理活性ペプチドの発見は、生体の未知な情報伝達・制御機構の発見に繋がり、疾患の成因に即した診断法や治療法の開発、新たな調節機構に基づく生体内物質を活用した創薬へと展開できる。しかし、その発見は極めて困難であり、オーファン GPCR のリガンド探索をはじめ種々の方法が試みられているが、効率的同定からはほど遠い状況にある。国立循環器病センター研究所薬理部の佐々木、南野らは、組織、細胞が産生するペプチドの一斉解析を行い、内在するペプチド総体をカタログ化した後、その中より構造特徴などにに基づき生理活性ペプチド候補を見出す方法を開発してきた。本法をヒト甲状腺髄様癌培養細胞株に適用した結果、最も有望と考えられた二種のペプチドが、NERP (NeuroEndocrine Regulatory Peptide) であった。機能解析を行った結果、NERP はラット視床下部の視索上核でバソプレッシン (AVP) と同一の貯

蔵顆粒に局在し AVP 分泌を抑制する新たな生理活性を有していた¹⁾。本研究では、新規水・塩代謝調節ペプチドである NERP のラットを用いた機能解析やヒト血中での NERP の変動を検討した。

2. 研究方法

2.1 動物

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) サイクルの部屋の個別ケージに自由摂餌・自由摂水下で飼育した。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。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. 2 *In vitro* hypothalamic explants を用いた NERP のバソプレッシン(AVP)分泌調節作用の検討

Static incubation を既報に従って行った²⁾。自由飲水・摂食下の8~10週齢のWistar系雄ラット(n=3 per group)を午前11時に断頭し、室傍核(PVN)および視索上核(SON)を含む脳スライスを作製し、3 mm 直径の金属でPVNおよびSONをパンチアウトし神経核を得た。PVNおよびSONを含む神経核をそれぞれ37°C、95% O₂、5% CO₂で十分に通気した人工脳脊髄液(aCSF, containing 124 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.3 mM MgSO₄, 1.24 mM KH₂PO₄, 2 mM CaCl₂, 25.9 mM NaHCO₃, and 10 mM glucose, pH 7.3)で満たしたシャーレに約1時間静置した。24穴の培養プレートにaCSF 800 μLを満たし、各wellに神経核を6ピースずつ移した。mediumにアンギオテンシンII(AII)とNERP(NERP-1とNERP-2、NERP-1-GlyとNERP-2-Gly)の最終濃度が10⁻⁶ Mとなる異なる組み合わせの溶液で5分間刺激した。NERPやAIIを含む溶液は5分間のaCSFをはさみ連続して刺激し、mediumは神経核を機械的に刺激しないように回収した。実験終了前にKCl(6 × 10⁻² M)の溶液で刺激し、組織片のviabilityを確認した。上記の灌流実験は5から8回繰り返し行った。

2. 3 *In vivo* microdialysis 法を用いた NERP のグルタミン酸分泌調節の検討

脳内微小透析実験法(microdialysis 法)は既報の方法に従って行った³⁾。ネンブタール麻酔(40 mg/kg)下に脳定位固定装置にラット頭部を固定し、Microdialysis用のガイドカニューレ(外径0.5 mm)をラット脳アトラス⁴⁾に従い、右室傍核の1 mm上方に留置・固定した。実験終了後にガイドカニューレの挿入位置を摘出脳のcresyl-violet染色にて解剖学的に確認し、適切に留置されたラットのデータのみを解析に用いた。Microdialysis用のガイドカニューレ挿入時に、脳室内投与用のカテーテルを左側脳室に留置・固定した。術後7日の回復期間の後、行動に異常のないラットを実験に用いた。実験当日午前10時に、Microdialysis用のプローブを介してリンゲル液(147 mM NaCl, 4 mM KCl, and 2.3 mM CaCl₂, pH 6.5)でPVNの灌流(微量注入ポンプを用いて2 μl/minの速度)を開始した。約3時間の灌流を行った後、NERP(1 nmol/3 μl)、AII(0.1 nmol/3 μl)を脳室内に投与(n=10-12 per group)し、PVNからの灌流液を10分ごとに回収した。NERP合成ペ

プチドとAII(0.1 nmol)を同時に脳室内に投与する場合はNERPを先に投与し、NERP投与2分後にAIIを投与した。50分の間隔をおいて連続して3回脳室内にテストペプチドを投与し、PVNからの灌流液を回収した。回収した灌流液中のグルタミン濃度をHPLC-ECD(Eicom)にて測定した。

2. 4 パッチクランプ法を用いた AVP ニューロンへの作用機構の検討

パッチクランプ法を用いた電気生理学的解析は、既報の方法に従って行った⁵⁾。ネンブタール麻酔下にラットのSONおよびperinuclear zoneを含むラット脳スライス標本を作成、灌流槽内に固定し、95% O₂、5% CO₂で十分に通気した人工脳脊髄液で灌流して実験を行なった。興奮性シナプス後電流(EPSC)および抑制性シナプス後電流(IPSC)のシナプス電流を溶液(pipette solution containing 140 mM potassium gluconate, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 10 mM EGTA, 2 mM Mg-ATP, pH 7.3)で満たしたピペットを介して視索上核大細胞性神経分泌ニューロンから記録した。NERPはAIIで刺激する2分前に灌流液中に添加し、少なくとも10分間記録した。灌流液中の最終濃度は、NERPが10⁻⁶ M、and AIIが10⁻⁷ Mとした。TTX(10⁻⁶ M, Sigma)またはbicuculline methiodide(10⁻⁵ M, Sigma)は刺激実験開始の5分前に灌流液中に添加しシナプス電位を記録した。

2. 5 健常者での高張食塩水負荷時のNERPの変動

医の倫理審査(承認番号380)で承認され、文書で本人の同意を得た健常男性(6名、24から34歳、平均年齢26.3歳、BMI: 20.2-25.5)に5%高張食塩水負荷試験(5%高張食塩水溶液を0.05 ml/kg体重/分の速度で2時間静脈内に投与し経時的に採血)を施行した。午前8時にルートを確保し、安静後の午前9時に5%高張食塩水を投与開始した。投与0、15、30、60、90、120分後に前腕に留置したルートからストレスなく採血し、遠心分離後の血漿成分をSepPakで分離・濃縮した。NERPは自家作製家兎ポリクローナル抗体を用いたRIA(Radioimmuno assay)法で、血中AVPはRIA(Mitsubishi Chemical, Tokyo, Japan)を用いて血漿中濃度を測定した。

2. 6 統計処理

得られた結果はmeans ± 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 *In vitro* hypothalamic explants を用いた NERP のバソプレッシン(AVP)分泌調節作用の検討

(Fig. 1)

NERP の視床下部への直接作用を明らかにするため、視床下部の PVN および SON の神経核を用いた *in vitro* assay 系で NERP の AVP 分泌抑制効果を検討した。パンチアウトして得られた視床下部組織片からメディアウム中に分泌される AVP を定量した結果、NERP-1 および NERP-2 は、室傍核組織片からの AVP 基礎分泌およびアンギオテンシン II 刺激による AVP 分泌を抑制した (Fig. 1A, 1B)。

しかし、非アミド体である NERP-1-Gly, NERP-2-Gly は、AVP 分泌抑制作用を認めなかった (Fig. 1A, 1B)。視床下部視索上核の組織片を用いた解析においても、NERP-1 と同様に AVP 基礎分泌およびアンギオテンシン II 刺激による AVP 分泌を抑制したが、非アミド体である NERP-1-Gly、NERP-2-Gly では抑制作用はなかった (Fig. 1C, 1D)。実験終了前に KCl 刺激により mediuum 中に AVP が過剰に分泌され、実験に用いた神経核の viability が確認された。

3.2 *In vivo* microdialysis 法を用いた NERP のグルタミン酸分泌調節の検討 (Fig. 2)

NERPs のグルタミン酸放出抑制作用を検討するため、ラット室傍核に微小透析用プローブを挿入してグルタミン

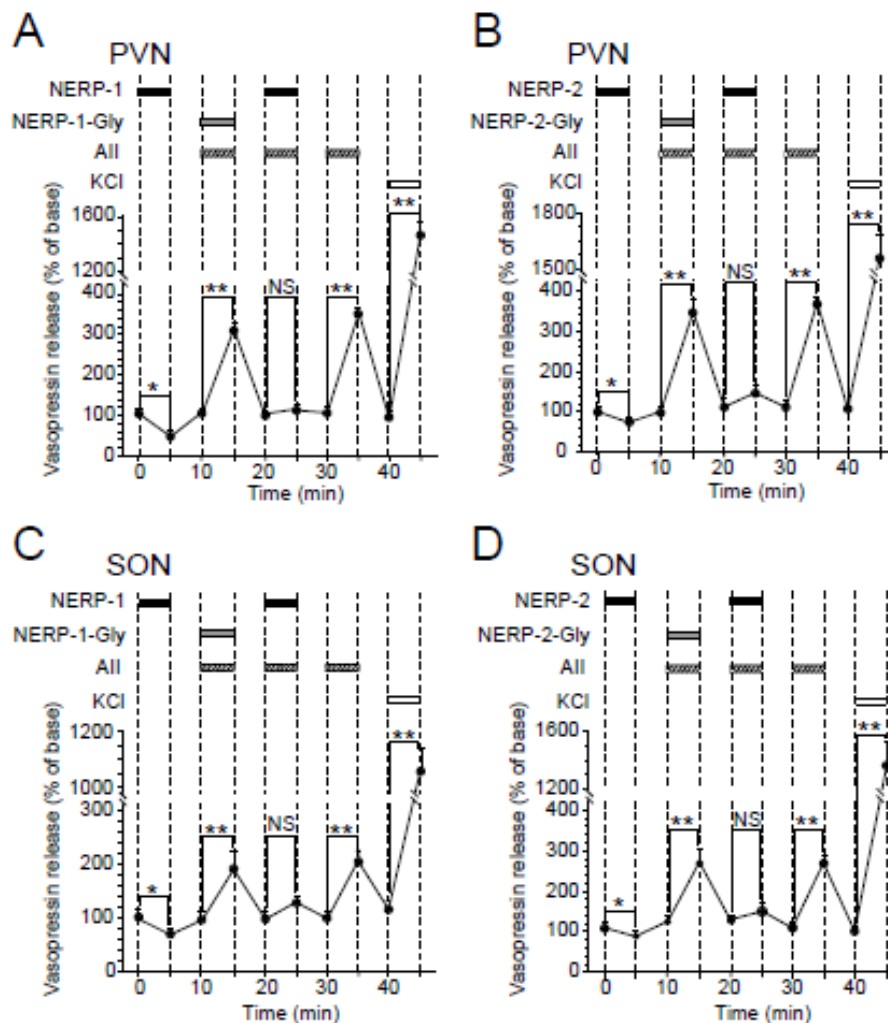


Fig. 1. NERPs suppress vasopressin secretion from PVN and SON explants. Black, grey, shaded, and white bars indicate the NERPs, NERPs-Gly, AII, and KCl administration periods, respectively. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, NS; not significant.

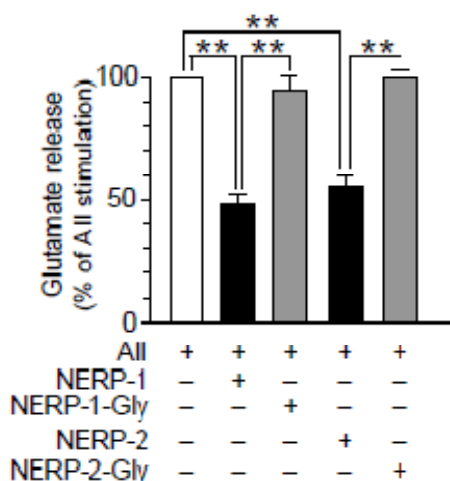


Fig. 2. Suppression of glutamate release from rat PVN by icv administered NERPs in *in vivo* microdialysis experiments. An icv administration of AII robustly increased Glu release from the PVN compared with control vehicle administration (AII, 81.7 ± 10.1 pmol/10 min; vehicle, 2.4 ± 0.2 pmol/10 min, $n = 10$ per group, $P < 0.001$). This stimulation was significantly suppressed by icv injection of NERP-1 and NERP-2, but neither NERP-1-Gly nor NERP-2-Gly was effective. $**P < 0.01$.

酸放出の経時的変化を検討した。非刺激時 10 分間のグルタミン酸の放出量の絶対値は 2.1 ± 0.3 pmol/10 min で、AII (0.1 nmol) 脳室内投与後のグルタミン酸の放出量は 50.8 ± 17.0 pmol/10 min と既報のように有意に増加した。NERP-1、NERP-2 の脳室内投与は、視床下部室傍核からの AII 刺激後グルタミン酸放出を有意に抑制した (Fig. 2)。NERP-1、-2 のグルタミン酸放出抑制作用は、NERP-1 で 19.2 ± 9.6 pmol/10 min、NERP-2 で 34.8 ± 1.4 pmol/10 min と、NERP-1 の活性が NERP-2 よりも強力であった。一方、NERPs の C 端がアミド体でない NERPs-Gly にはグルタミン酸放出抑制作用はなく、NERPs のグルタミン酸放出抑制作用に C 端のアミド化が必須であった。

3.3 パッチクランプ法を用いた AVP ニューロンへの作用機構の検討 (Fig. 3)

ラット脳スライス標本を用いて視索上核大細胞性神経分泌ニューロンの興奮性シナプス後電流 (EPSCs) に対する AII および NERPs の効果をパッチクランプ法により検討した。TTX 非存在下において NERPs 単独投与で

EPSCs は変化しなかったが、AII 投与によって惹起される (誘発性) EPSCs の頻度増加は NERPs 投与により抑制された (Fig. 3A, 3C)。NERPs の C 端がアミド体でない NERPs -Gly には、AII 誘発性 EPSCs の頻度増加作用は認めなかった (Fig. 3B, 3D)。TTX 存在下では AII 誘発性 EPSCs の頻度増加は NERP-1 投与で抑制されたが、NERP-2 ではその抑制効果が消失した (Fig. 3E, 3F)。TTX 非存在下で GABA (A) 受容体阻害剤である bicucullin の前投与により AII 誘発性 EPSCs の頻度増加を抑制する NERP-2 の作用が消失した (Fig. 3G, 3H)。以上の結果から、NERP-1 はシナプス前グルタミン酸神経終末、NERP-2 はシナプス前グルタミン酸神経終末に連結する GABA 作動性介在ニューロンに作用して、シナプス前終末からのグルタミン酸放出を抑制し、AVP 分泌を抑制することが示唆された。

3.4 健常者での高張食塩水負荷時の NERP の変動 (Fig. 4)

家兔に免疫して得られたヒト NERP-1、NERP-2 抗体は、C 端がアミド化された NERP を特異的に認識した。健常成人男性の早朝空腹時に採血し、得られた血漿を SepPak 処理し凍結乾燥した検体の一部を RIA 法で測定した。健常成人男性の早朝空腹時 NERP-1、-2 の血中濃度は、それぞれ 3.5 ± 1.0 と 2.0 ± 0.4 fmol/ml であった。RIA 法を組み合わせた HPLC 解析を行った結果、血漿中 NERP はヒト合成 NERPs ペプチド溶出部位のみに検出され、他の大分子型は認めなかった (data not shown)。健常男性に 5% 高張食塩水負荷試験を施行した結果、既報のように高張食塩水により血中 AVP は有意に増加 (投与前 0.8 ± 0.2 pg/ml、負荷 2 時間後 5.7 ± 1.5 pg/ml, $P < 0.01$) した。血中 NERP-1、-2 はともに低下し AVP と逆相関を示す傾向はあったが、統計学的に有意差を認めなかった (P 値, NERP-1, 0.081; NERP-2, 0.28, vs 120 min)。

4. 考察

NERP の前駆体蛋白をコードする *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⁶⁾。VGF 蛋白は 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^{7), 8)}。

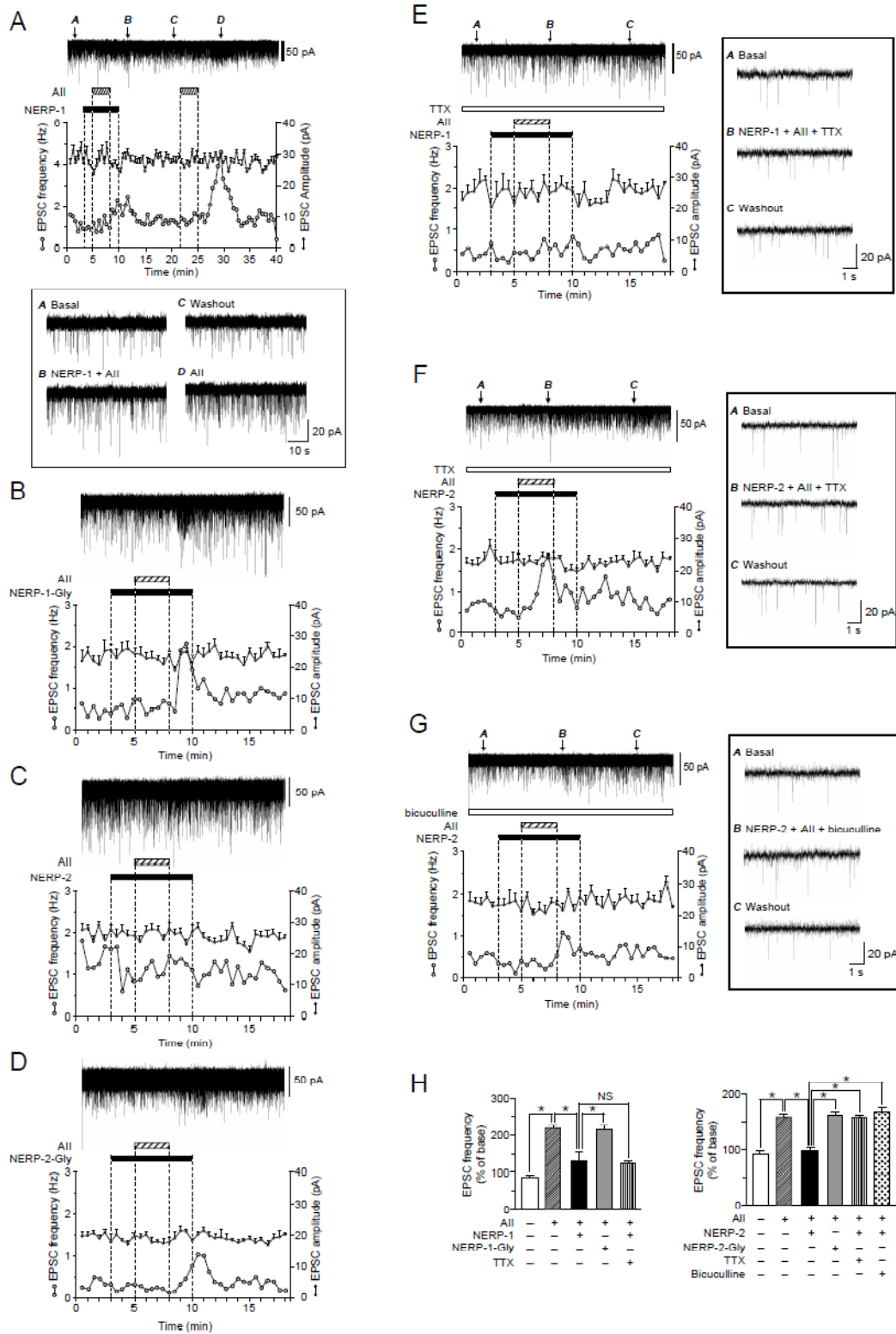


Fig. 3. NERPs suppress the frequency of AII-evoked EPSCs in vasopressin neurons of rats. Representative whole-cell patch-clamp recording showing the inhibitory effect of NERPs on AII-induced potentiation of EPSC frequency in SON vasopressin neurons (Fig. 3A, 3C). NERP-1 and -2 reduced the frequency of AII-evoked EPSCs without altering their amplitude. Neither NERP-1-Gly nor NERP-2-Gly was effective (Fig. 3B, 3D). This suppressive effects of NERP-2, not NERP-1, was abolished by TTX and bicuculline, a GABA_A receptor antagonist (Fig. 3E - 3H).

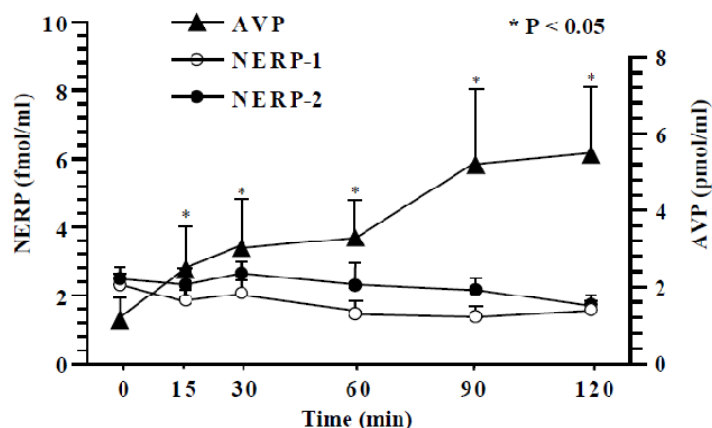


Fig. 4. Effect of peripheral high salt loading on plasma concentration of NERPs in human. Six normal subjects were subjected to high salt loading test to examine the effect of changes in plasma levels of NERPs on the response of an osmotic stimulus (5% NaCl, 0.05 mL/kg/min, 120 min). Plasma osmolality and plasma level of AVP increased during the osmotic stimulus, but the plasma levels of NERP-1 and -2 did not change.

VGF 蛋白は 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蛋白であると考えられている⁹⁾。現在までに、VGF 前駆体蛋白由来の 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¹⁰⁾、ヒト髄液中の VGF 関連ペプチドがアルツハイマー病や統合失調症の疾患候補マーカーであること¹¹⁾、¹²⁾、AQEE-30 や LQEQ-19 ペプチドはラット性機能に関与すること¹³⁾が報告されている。最近、VGF 前駆体蛋白由来の TLQP-21 がラットにおいて摂食・エネルギー代謝調節に関与すること¹⁴⁾、VGF 遺伝子欠損マウスの解析から VGF 蛋白が抗うつ作用を有することが報告されている¹⁵⁾。水・電解質代謝調節と VGF との関連に関して、ラット視床下部の *vgf* 遺伝子が塩分負荷により高発現することが報告¹⁶⁾されるも、水・電解質代謝調節の生理活性を有する VGF 関連ペプチドは未同定であった。

現在までに報告されている 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(抗体などで精製、同定されている物あり)、ペプチドの生成、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、生体内に内在するペプチド分子の配列、構造を正確に同定し機能探索実験を行うことが不可欠である。国立循環器病センターの佐々木、南野らにより同定された NERP-2 は、

ヒトおよびラットアミノ酸配列の 345～351 番目 -GLGGR-||-GL-、348～354 番目 -DLGGR-||-GL- 配列が二重線部で切断後、R の除去、アミド化反応を受けており、コンピュータ上でアミノ酸配列と切断酵素の特異性より生成ペプチドを予測する *in silico* 解析法では、存在を推定することは困難であった。今回、NERP 同定を可能としたペプチドーム解析法¹⁷⁾、¹⁸⁾、¹⁹⁾ は、新たな生理活性ペプチド発見に有力な方法論であることが証明された。

NERPのAVP分泌への関与を検討する際に、NERP前駆体蛋白VGFと同じ組織・細胞内分布を示すクロモグラニンを参考にした。クロモグラニンA (CgA)は副腎髄質クロマフィン顆粒内に存在し、457アミノ酸残基、分子量約49 kDaの親水性酸性糖蛋白である²⁰⁾。VGF 蛋白と同様に多数のプロテアーゼで切断される塩基性アミノ酸配列を多数有し、多数の CgA由来ペプチドが同定されている。CgA由来ペプチドは副腎髄質からのカテコールアミン分泌を抑制する *catestatin* のように抑制作用を有するペプチドが多い²⁰⁾ことから、NERPはAVPと共分泌され*autocrine* または *paracrine* 様式でAVP分泌を抑制する仮説をたて機能探索を行った。

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。既報²¹⁾、²²⁾ のように、NaCl やAII のラット脳室内投与で血中AVP濃度が

上昇した。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、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分泌亢進を抑制したが、NERP-1に比べ活性は弱かった。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った¹⁾。NERP IgGのラット中枢投与による抗体中和実験で、急性水負荷による血中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証明された。以上の知見から、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が明らかとなった¹⁾。

NERPの視床下部への直接作用を明らかにするため、視床下部の視索上核組織片を用いた*in vitro assay*法でNERPのAVP分泌抑制効果を検討した。NERP-1およびNERP-2は、視床下部組織片からのAVP基礎分泌およびアンジオテンシンII刺激によるAVP分泌を抑制し、*in vivo*で得られた知見と一致した。また、非アミド体であるNERP-1-GlyではAVP分泌抑制作用が見られず、NERPの生理作用の発現にC端のアミド化が重要であった(Fig. 1)。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グルタミン酸と抑制性のGABA(γ -aminobutyric acid)である。NERPsのグルタミン酸放出抑制作用を確認するため、ラット室傍核大細胞群に微小透析用プローブを挿入してグルタミン酸放出の経時的変化を検討した。その結果、NERPsは、AII刺激によるグルタミン酸放出を有意に抑制することが明らかとなった(Fig. 2)。NERPのグルタミン酸放出抑制の作用機序を明らかにするため、ラット脳スライス標本を用いて視索上核大細胞性神経分泌ニューロンの興奮性シナプス後電流(EPSCs)に対するAIIおよびNERPsの効果を実験室法により検討した。TTX非存在下においてNERPs単独投与でEPSCsは変化しなかったが、AII投与によって惹起される(誘発性)EPSCsの頻度増加はNERPs添加により抑制された。TTX存在下ではAII誘発性EPSCsの頻度増加はNERP-1投与で抑制されたが、NERP-2ではその抑制効果が消失した。介在ニューロンに存在するGABA(A)受容体の関与を検討した結果、

TTX非存在下でGABA(A)受容体阻害剤であるbicucullinの前投与によりAII誘発性EPSCsの頻度増加を抑制するNERP-2の作用が消失した(Fig. 3)。以上の結果から、NERP-1はシナプス前グルタミン酸神経終末、NERP-2はシナプス前グルタミン酸神経終末に連結するGABA作動性介在ニューロンに作用して、シナプス前終末からのグルタミン酸放出を抑制し、AVP分泌を抑制することが示唆された。

ヒト水・電解質代謝調節におけるNERPの変動を検討するため、健常成人に対して5%高張食塩水負荷試験を施行した。高張食塩水の持続点滴により血中AVPは上昇するも、血中NERP-1とNERP-2の濃度に有意な変動を認めなかった(Fig. 4)。ラットへのNERP末梢投与でAVP分泌抑制作用を示さない知見と併せて、NERPは中枢神経系においてAVP分泌を制御するlocal modulatorであることが示唆された。

5. 今後の課題

NERPの受容体は未同定であるため、Orphan GPCR(G蛋白共役型受容体)や各種イオンチャネルをスクリーニングし、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。今後NERPの基礎的な機能解析を進めるとともに、NERPがAVP分泌過剰症の病態に関与するかを探索し臨床医学へフィードバックしたい。

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.: Peptidomic identification and biological validation of neuroendocrine regulatory peptide-1 and -2. *J Biol Chem*, 282, 26354-26360, 2007.
2. Beak SA, Heath MM, Small CJ, Morgan DG, Ghatei MA, Taylor AD, Buckingham JC, Bloom SR, Smith DM.: Glucagon-like peptide-1 stimulates luteinizing hormone-releasing hormone secretion in a rodent hypothalamic neuronal cell line. *J Clin Invest*, 101, 1334-1341 (1998).
3. Jin QH, Kunitake T, Chu CP, Qiu DL, Kato K, Ishizuka Y, Kannan H.: Possible involvement of nitric oxide in the

- central salt-loading-induced cardiovascular responses in conscious rats. *Brain Res*, 963, 224-231 (2003).
4. Paxinos, G. & Watson, C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* (Academic Press, New York, 1986).
 5. Ozaki, Y., Soya, A., Nakamura, J., Matsumoto, T. & Ueta, Y. Potentiation by angiotensin II of spontaneous excitatory postsynaptic currents in rat supraoptic magnocellular neurones. *J Neuroendocrinol*, 16, 871-879 (2004).
 6. Levi A, Eldridge JD, Paterson BM: Molecular cloning of a gene sequence regulated by nerve growth factor, *Science*, 229, 393-395, 1985.
 7. Possenti R, Eldridge JD, Paterson BM, Grasso A, Levi A.: A protein induced by NGF in PC12 cells is stored in secretory vesicles and released through the regulated pathway. *EMBO J*, 8, 2217-2223, 1989.
 8. Benson, D. L. Salton S. R. Expression and polarization of VGF in developing hippocampal neurons. *Brain Res Dev Brain Res*, 96, 219-228, 1996.
 9. Levi A, Ferri GL, Watson E, Possenti R, Salton SR.: Processing, distribution, and function of VGF, a neuronal and endocrine peptide precursor. *Cell Mol Neurobiol*, 24, 517-533, 2004.
 10. Alder J, Thakker-Varia S, Bangasser DA, Kuroiwa M, Plummer MR, Shors TJ, Black IB.: Brain-derived neurotrophic factor-induced gene expression reveals novel actions of VGF in hippocampal synaptic plasticity. *J Neurosci*, 23, 10800-10808, 2003.
 11. Carrette O, Demalte I, Scherl A, Yalkinoglu O, Corthals G, Burkhard P, Hochstrasser DF, Sanchez JC.: A panel of cerebrospinal fluid potential biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's disease. *Proteomics*, 3, 1486-1494, 2003.
 12. Huang JT, Leweke FM, Oxley D, Wang L, Harris N, Koethe D, Gerth CW, Nolden BM, Gross S, Schreiber D, Reed B, Bahn S.: Disease biomarkers in cerebrospinal fluid of patients with first-onset psychosis. *PLoS Med*, 3, e428, 2006.
 13. Succu S, Cocco C, Mascia MS, Melis T, Melis MR, Possenti R, Levi A, Ferri GL, Argiolas A.: Pro-VGF-derived peptides induce penile erection in male rats: possible involvement of oxytocin. *Eur J Neurosci*, 20, 3035-3040, 2004.
 14. Bartolomucci A, La Corte G, Possenti R, Locatelli V, Rigamonti AE, Torsello A, Bresciani E, Bulgarelli I, Rizzi R, Pavone F, D'Amato FR, Severini C, Mignogna G, Giorgi A, Schininà ME, Elia G, Brancia C, Ferri GL, Conti R, Ciani B, Pascucci T, Dell'Omo G, Muller EE, Levi A, Moles A.: TLQP-21, a VGF-derived peptide, increases energy expenditure and prevents the early phase of diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103, 14584-14589, 2006.
 15. Hunsberger JG, Newton SS, Bennett AH, Duman CH, Russell DS, Salton SR, Duman RS.: Antidepressant actions of the exercise-regulated gene VGF. *Nat Med*, 13, 1476-1482, 2007.
 16. Mahata SK, Mahata M, Fischer-Colbrie R, Winkler H.: In situ hybridization: mRNA levels of secretogranin II, VGF and peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase in brain of salt-loaded rats. *Histochemistry*, 99, 287-293, 1993.
 17. Sasaki K, Sato K, Akiyama Y, Yanagihara K, Oka M, Yamaguchi K.: Peptidomics-based approach reveals the secretion of the 29-residue COOH-terminal fragment of the putative tumor suppressor protein DMBT1 from pancreatic adenocarcinoma cell lines. *Cancer Res*, 62, 4894-4898, 2002.
 18. Minamino N, Tanaka J, Kuwahara H, Kihara T, Satomi Y, Matsubae M, Takao T.: Determination of endogenous peptides in the porcine brain: possible construction of peptidome, a fact database for endogenous peptides. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 792, 33-48, 2003.
 19. Minamino, N. *et al.*: Identification of Novel Neuroendocrine Regulatory Peptide 1 and 2 by Peptidome Analysis Strategy. Peptide Science 2007, (ed. by Aimoto S, Ono S), The Japanese Peptide Society, Osaka, 2008, pp. 9-12.
 20. Taupenot L, Harper KL, O'Connor DT.: The chromogranin-secretogranin family. *N Engl J Med*, 348, 1134-1149, 2003.

21. Yamashita H, Ueta Y, Dyball REJ.: Electrophysiological and molecular properties of the oxytocin- and vasopressin-secreting systems in mammals. *In: Hormones, Brain and Behavior* (ed. by Pfaff D. W., *et al.*) 160 Academic Press, New York, 2002, pp.1-49.
22. Wells T, Forsling MLJ.: Aminergic control of vasopressin secretion in the conscious rat. *Physiol Pharmacol*, 43, 59-64, 1992.

田 陽一教授、斉藤 健博士、国立循環器病センター研究所薬理部 南野 直人部長、佐々木 一樹室長、大阪大学蛋白質研究所プロテオミクス総合研究センター 高尾敏文教授、里見 佳典博士、昭和大学医学部第一解剖学塩田 清二教授、影山 晴秋博士、宮崎大学フロンティア科学実験総合センター生命科学部門生理活性物質探索分野 伊達 紫教授との共同研究により遂行された。共同研究者に対して、この場を借りて深謝したい。また、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。

謝 辞

本研究は、産業医科大学医学部第一生理学教室 上

No. 0840

Identification and Functional Analysis of Novel Bioactive Peptides Regulating Salt and Water Homeostasis

Hideki Yamaguchi and Masamitsu Nakazato

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

Summary

Here, we report the identification of two novel peptides derived from the neurosecretory protein VGF, designated neuroendocrine regulatory peptide (NERP)-1 and -2, by focusing on carboxy-terminal amidation, a post-translational modification most frequently found in bioactive peptides (J Biol Chem, 282, 26354-60, 2007). Rat NERP-1 and NERP-2, which are highly homologous to human NERPs, are expressed in the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) and the supraoptic nucleus (SON) and participate in the central control of water balance.

NERPs dose-dependently suppressed vasopressin release induced by icv injection of hypertonic NaCl/angiotensin II (AII) *in vivo*. NERPs also suppressed basal and AII-induced vasopressin secretion from hypothalamic explants *in vitro*. Bioactivity of NERPs required carboxy-terminal amidation. To elucidate the mechanism by which NERPs suppress vasopressin secretion, we used an *in vivo* microdialysis technique to measure glutamate (Glu) release. The Glu release induced by icv administration of AII was significantly suppressed by icv injection of NERP-1 and NERP-2. Whole-cell patch-clamp recordings of SON slice preparations showed that NERP-1 reversibly reduced the frequency of AII-evoked excitatory postsynaptic currents (EPSCs) without altering their amplitude. This effect was not influenced by the Na⁺-channel blocker tetrodotoxin (TTX), applied to block all action potential-driven inhibitory postsynaptic currents. NERP-1 thus appears to act on the presynaptic terminal of glutamatergic neurons connected to vasopressin neurons. NERP-2 also reduced the frequency of AII-evoked EPSCs without altering their amplitude. This suppression was abolished by TTX and bicuculline, a GABA_A receptor antagonist, suggesting that NERP-2 modulates the excitability of GABAergic interneurons connected to the terminals of the glutamatergic neurons. Two NERPs of different sequences, derived from one precursor, serve as novel peptidergic retrograde modulators to suppress vasopressin neuron activity via different mechanisms.

Six normal subjects were subjected to salt-loading test to examine the effect of plasma NERPs on the response of an osmotic stimulus (5% NaCl, 0.05 mL/kg/min, 120 min). Plasma osmolality and plasma level of AVP increased during the osmotic stimulus, but the plasma levels of NERP-1 and -2 did not. The localization of NERPs in the hypothalamus and no change of plasma NERPs after the osmotic stimulus suggested that NERPs might work as a central neuromodulator in body fluid homeostasis.