

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

平成10年度 報 告 書

生活習慣病の中樞制御に関する研究（H10長寿005）

主任研究者 木山 博資（旭川医科大学）

生活習慣病の中枢制御に関する研究

主任研究者 木山 博資 旭川医科大学・教授

肥満、高血圧、脂質・糖代謝障害などのいわゆる生活習慣病と類似の病態を示すBRS-3欠損マウスの解析から体重と負の相関にある可能性の高い因子を同定した。また、ニューロメジンB受容体(NMBR)やニューロテンシン受容体(NRT1)の欠損動物を作成し、解析を開始した。さらに新規のボンベシン受容体の可能性のあるクローンを同定するとともに、別のニューロテンシン受容体(NTR2)遺伝子も同定した。また、生活習慣病の中枢制御にとって最も重要な領域と考えられる視床下部に極めて豊富で、神経特異的な新規遺伝子の詳細な脳内発現を明らかにし、本遺伝子の欠損動物作成のためマウスのゲノム遺伝子をクローニングするとともに遺伝子構造を決定した。さらに、アデノウイルスベクターを用いた生体内神経細胞への遺伝子導入法を確立した。

分担研究者

和田 圭司（国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第四部・部長）

心とした中枢制御の存在が明らかになったことである。脳の老化・加齢により中枢制御がうまく作動しなくなることが、成人病を惹起もしくは増悪させる一つの要因ではないかとの仮説が立てられる。本研究ではこのような仮説に基づいて成人病の中枢制御のメカニズムを解明することにある。解明の糸口として本研究組織で得られたBRS-3欠損動物が有効であると考えられる。また、神経特異的に局在し、かつニューロペプチドに関連する分子を新たに同定し、生活習慣病の中枢制御の新たな機構を解明し、それをモデル動物として生活習慣病の新しい治療法の開発を行うことも目的の一つである。このため3年に及ぶ申請期間のうち初年度にあたる10年度は、ボンベシン、ニューロテンシンなど摂食との関連性が指摘されている神経ペプチド及びその受容体の欠損動物の作成や欠損動物を用いた中枢性制御機構について新たな知見を導き出し、

A. 研究目的

加速的な超高齢化に向かっている日本の社会にとって、高齢者が健康で活力ある生活を送るためには、加齢に伴って多くの人が直面し寿命に多大な影響を及ぼす疾病、成人病を克服しなければならない。肥満、高血圧、脂質・糖代謝障害などのいわゆる成人病は生活習慣にもその原因があるとされ、「生活習慣病」とも云うことができる。最近の遺伝子欠損動物を用いた研究から、脳に限局するペプチド受容体のファミリーメンバーを欠損させると、「生活習慣病」の症状を呈する動物が得られることが明らかになってきた。このことはいわゆる成人病の原因として中枢由来のファクターが関与しうること、すなわち神経ペプチドを中

さらに予防・治療薬開発の前身となる物質（リード物質）を見つけたすことを目指した。また、遺伝子探索により得られた視床下部に局在する新規分子の機能探索と欠損モデル動物の作成も開始した。

B. 研究方法

1. ボンベシン受容体の解析を通じた生活習慣病の分子機序解明及び予防・治療薬の開発（和田）

1) BRS-3の内因性リガンド並びにBRS-3機能に関連した遺伝子群の同定

2) ニューロメジンB受容体（NMBR）欠損マウスの作製と解析

3) 新しいボンベシン受容体遺伝子の同定

2. ニューロテンシン受容体の生体機能の解明と老化研究への応用（和田）

1) ニューロテンシン受容体（NTR1）欠損マウスの表現型の解析

2) NTR2遺伝子の単離

3. 視床下部に局在する新規遺伝子の解析（木山）

1) 組織学的な脳内発現局在の検索

2) ゲノム遺伝子のクローニングと構造決定

3) ノックアウトベクターコンストラクトの構築。

4) Clone #13新規遺伝子のプロテアーゼ機能の解析

4. アデノウイルスを用いた遺伝子導入法の開発（木山）

C. 研究結果

1. ボンベシン受容体について

BRS-3ノックアウトマウスと野生型間で発現量に差のある遺伝子を脳、脂肪組織からそれぞれ複数単離し、体重と負の相関を持つ可能性の高い遺伝子を同定することが出来た。また、NMBR欠損マウスを作成し

た。NMBR欠損マウスは正常に発育しており体重増は認めなかった。また、新しいボンベシン受容体遺伝子と考えられるクローンの同定に成功した。（和田）

2. ニューロテンシン受容体について

ニューロテンシン受容体（NTR1）欠損マウスを作成したが、体重増は認めなかった。一般行動科学的解析を現在遂行中である。また、別の受容体であるNTR2遺伝子を単離し、遺伝子構造を決定した。（和田）

3. 新規遺伝子について

新たな遺伝子（Clone #13）は視床下部の神経細胞に極めて豊富に局在しており、他の脳内の領域にはほとんど発現が認められなかった。また、本分子は神経以外の組織においても全く発現が認められず、極めて神経とりわけ視床下部に特異的であることが明らかになった。また、cDNAの塩基配列からニュートラルエンドペプチダーゼのファミリーに属すると考えられた。本遺伝子のゲノムをクローニングし遺伝子構造を決定した。その結果翻訳領域は18個のエクソンよりなることが明らかになった。これをもとに、ノックアウトベクターの構築を開始した。（木山）

4. 遺伝子導入について

アデノウイルスベクターによる脳内への遺伝子導入系を確立した。これにより、生活習慣病関連遺伝子群の生体への導入が可能になると考えられる。（木山）

D. 考察

血圧、エネルギー収支、など生体の恒常性の維持に生理活性ペプチドが重要な役割を担っていることは周知でペプチドを題材にした研究も数多く展開されている。その中でボンベシンやニューロテンシン及びその受容体については特異的アンタゴニストの不足や生理作用の多様性のために研究が

遅れていた。しかし分担研究者の和田は遺伝子欠損マウスの作製を通してBRS-3がエネルギー収支、血圧維持において実は極めて重要な分子であることを世界に先駆けて示した。さらに、ニューロテンシン受容体やニューロメジンB受容体のノックアウトの成功は、神経ペプチドが関与する他の自律機能の解明に大きな手段を提供すると考えられる。これに加えて、新たな新規のエンドペプチダーゼが極めて特異的に視床下部に存在することの証明は生活習慣病の中樞制御の問題に新たな切れ口が得られたものと考えられる。現在、本遺伝子の欠損動物の作成に取りかかった所であるが、今後の展開が期待される。また、アデノウイルスを用いて遺伝子を導入するシステムが確立したことは、将来的な遺伝子治療の可能性を示しており、本研究が治療法の開発へと展開してゆくうえで極めて重要な進展であると考えられる。

E. 結論

生活習慣病のモデルとなりうるBRS-3欠損動物のほかに、ニューロテンシン受容体、ニューロメジンB受容体などの欠損動物が得られた。これらの欠損動物に関しては今後の解析結果が待たれる。さらに新たに検出された視床下部に豊富なエンドペプチダーゼについては欠損動物の作成を開始した。

F. 研究発表

1. 論文発表

Wada K, Wada E, Watase K, Yamada K, Ohki-Hamazaki H: Bombesin, obesity and social behavior. *Mol Psychiat* 3: 204-206, 1998

Ohki-Hamazaki, H., Sakai, Y., Kamata, K., Ogura, H., Okuyama, S., Watase, K., Yamada, K. and Wada, K. Functional properties of two

bombesin-like peptide receptors revealed by the analysis of mice lacking neuromedin B receptor. *J. Neurosci.*, 19, 948-954, 1999

Mansur K, Iwahashi Y, Kiryu-Seo S, Su Q, Namikawa K, Yodoi J, Kiyama H (1998) Up-regulation of thioredoxin in motor neurons after nerve injury. *Mol. Brain Res.* 62: 86-91.

Toki H, Namikawa K, Su Q, Kiryu-Seo S, Sato K, Kiyama H (1998) Enhancement of extracellular glutamate scavenge system in injured motoneurons. *J. Neurochem.* 71:913-919.

Kiryu-Seo S, Matsuo N, Wanaka A, Ogawa S, Tohyama M, Kiyama H (1998) A sequence-specific splicing activator, Tra2-beta, is up-regulated in response to nerve injury. *Mol. Brain Res.* 62: 220-223.

Tanabe K, Nakagomi S, Kiryu-Seo S, Namikawa K, Imai Y, Ochi T, Tohyama M, Kiyama H (1999) Expressed-sequence-tag approach to identify differentially expressed genes following peripheral nerve axotomy. *Mol. Brain Res.* 64:34-40.

Namikawa K, Su Q, Kiryu S, Kiyama H (1998) Enhanced expression of Raf-1 activator, 14-3-3, in injured motoneurons. *Mol. Brain Res.* 55: 315-320.

山田一之, 浜崎浩子, 和田恵津子, 関口正幸, 和田圭司: 嗅覚系におけるニューロメジンB受容体(NMB-R)の機能について. *日本味と匂学会誌* 5: 561-564, 1998

和田圭司: 太らない遺伝子: BRS-3. *Isotope News*, 528, 10-11, 1998

和田圭司: 新しい薬理的・生物学的ツールを利用した精神・神経疾患克服への挑戦. 脳の科学, 20, 800-804, 1998

和田圭司: ボンベシン受容体遺伝子と肥満. 遺伝子医学, 2, 447-449, 1998

和田圭司: ボンベシン・ボンベシン受容体系と肥満. 臨床科学, 34, 1049-1055, 1998

和田圭司: ボンベシン受容体と肥満. 内分泌・糖尿病科, 7, 229-236, 1998

和田圭司: 遺伝子と脳機能. 遺伝子医学, 2, 550-554, 1998

和田圭司: 肥満の新しい分子機構. 化学と生物, 36, 758-759, 1998

2. 学会発表

和田圭司: ボンベシン受容体と肥満. 第3回アディポサイエンス研究会「肥満の分子機構と脂肪細胞機能」, 大阪, 8. 8, 1998

和田圭司: 神経伝達物質受容体・トランスポーターの発生工学的機能解析と疾患モデルの作製. 第126回日本獣医学会ワークショップ「動物モデル—発生原理に基づいた神経疾患モデル研究の新しい展開」, 江別, 8. 23, 1998

和田圭司, 山田一之, 渡瀬 啓, 前野浩巳, 浜崎浩子, 和田恵津子: 遺伝子操作動物を用いたアプローチ. 第21回日本神経科学第41回日本神経化学合同大会シンポジウム「精神疾患の分子メカニズム」, 東京, 9. 21, 1998

和田圭司: ボンベシン受容体と肥満. 第19回日本肥満学会ワークショップ「肥満バイオサイエンスのトピックス」, 松山, 12. 3, 1998

Wada, K: Generation and characterization of a new obese model mouse: The bombesin receptor subtype-3 deficient mouse. Japan-US Cooperative Medical Science Program International Symposium on "Diabetes, Obesity

and Carbohydrate Metabolism". Kisarazu, 12. 12, 1998

涛川一彦、岡戸晴夫、木山博資、活性型Akt発現組換えアデノウイルスを用いた傷害運動神経の細胞死防御. 第104回日本解剖学会総会、ミニシンポジウム、東京、3月30日1999年

中込咲綾、瀬尾寿美子、木山博資: ラット脳内におけるエンドセリンシグナリング関連分子のmRNA局在. 第21回神経科学会第41回神経化学会合同大会、東京、9月21日、1998年

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

生活習慣病の中枢制御に関する研究

主任研究者 木山 博資 旭川医科大学・教授

生活習慣病の中枢制御にとって最も重要な領域と考えられる視床下部に極めて豊富で、しかも他の組織にはほとんど発現が見られない神経特異的な新規遺伝子が得られており、本遺伝子の機能探索とともに、遺伝子構造の解析を行った。in situハイブリダイゼーションにより、本遺伝子は極めて視床下部に豊富であり、大脳皮質や海馬・小脳など脳の他の領域にはほとんど発現が認められないことが明らかになった。cDNAの塩基配列から本遺伝子はメタロエンドペプチダーゼのファミリーに属すると考えられ、視床下部ニューロペプチドのプロセッシングに関与することが期待される。本遺伝子の欠損動物作成のため、マウスのゲノム遺伝子をクローニングするとともに遺伝子構造の決定を行った。

A. 研究目的

肥満・高血圧・糖尿病などに代表される生活習慣に密接に関連した疾患、いわゆる生活習慣病の中枢制御機構の解明と、そのメカニズムから生活習慣病の新たな切れ目の治療法の開発を行うことが本研究の目標である。従来の研究より、これら生活習慣病と類似の病態を示すモデルとして、ボンベシン受容体やNPY、レプチン、オレキシンなどの、視床下部のニューロペプチドやその受容体の欠損マウスがある。このことから、今までに機能がよくわかっていなかった視床下部を中心に局在するニューロペプチド群が一躍脚光を浴びるに至った。我々の戦略は、生活習慣病の中枢制御の最も重要な中枢と考えられる視床下部に極めて特異的に局在し、かつニューロペプチドに関連する分子を同定し、生活習慣病の中枢制御の新たな機構を解明し、それをモデル動物として生活習慣病の新しい治療法の開発を行うことにある。このため3年に及ぶ申請期間のうち初年度にあたる10年度は、遺

伝子探索により得られた遺伝子の、脳内局在を明らかにすると同時に、本分子の機能探索と欠損モデル動物の作成を開始した。このため、ゲノムライブラリーをスクリーニングしゲノムのクローニングと遺伝子構造の決定、さらにノックアウトのためのベクターコンストラクトの構築が、本年度の目標であった。

また、将来の遺伝子治療を視野に入れ、神経系への効率良い遺伝子導入法の開発も同時に行った。

B. 研究方法

1) 新規遺伝子の脳内発現局在

得られた新規遺伝子(Clone # 13)の脳内局在を同定するために、cDNAのうち約5000ベース程度の断片を新たなプラスミドに組み込み、35S-UTPを用いてin vitroで標識し、RNAプローブを作成した。これを用いて、in situハイブリダイゼーション法を行った。ラット脳の各レベルや胎生期の全身の凍結切片を作成した。

2) Clone#13のゲノム遺伝子のクローニング

マウス129由来ラムダFIXIIゲノムライブラリーを約 1×10^6 になるようプレティングし、本遺伝子翻訳領域内約500bpとdifferential displayで得られた3'端非翻訳領域の約200bpをプローブとしてスクリーニングを行った。プローブはランダムプライマー法にて32P-dCTP標識し、熱変性後 1×10^6 cpm/mlになるようハイブリダイゼーションバッファー

(6xSSC/5xDenhardt's/0.5%SDS)に加えた。一晩65度にてハイブリダイズした後、2xSSC/0.5%SDS、0.1xSSC/0.5%SDSでメンブレンを洗いフィルムオートラジオグラフィーを行った。5個の陽性シグナルが得られたことから定法に従いPhage DNAを抽出し、インサートをpBluescriptに組み替え塩基配列を決定した。

3) ノックアウトベクターコンストラクトの構築

得られた遺伝子構造をもとに、コンベンショナルなノックアウトを目指しポジティブ・ネガティブセレクション、PCRスクリーニングなど行えるよう計画した。

4) Clone #13の機能解析

プロテアーゼ様のドメインを有することから、合成人工基質を用いてどのようなアミノ酸配列のペプチドに作用するかを検討した。

5) 遺伝子導入法の開発

以前より我々が行ってきた遺伝子の効率良い神経細胞への導入法に関して、アデノウイルスが最も効率良く神経細胞に導入することができたので、これを用いての遺伝子導入を検討した。また、発現制御を可能にするために、Cre-loxPを用いたコンストラクトの作成を試みた。

C. 研究結果

1) Clone #13の脳内発現

ラット脳を用いたin situハイブリダイゼーション法の結果、本遺伝子の発現は、視床下部に最も強いことが明らかになった。特に、外側視床下部、視床下部内側核群、視床下部前域に強いハイブリダイゼーションシグナルが観察された(図1)。このほか、線条体では、ソマトスタチンやアセチルコリンを含有する大型の内在性ニューロンに強い発現が認められた(図1)。

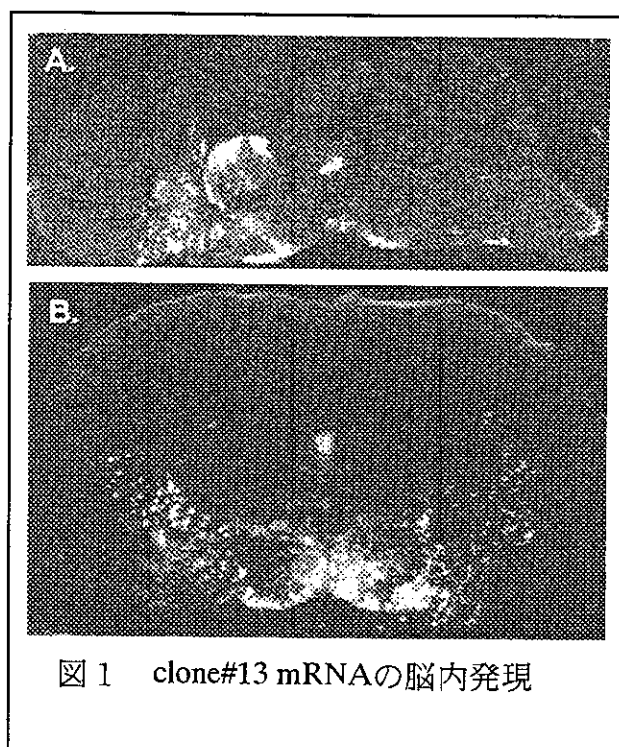


図1 clone#13 mRNAの脳内発現

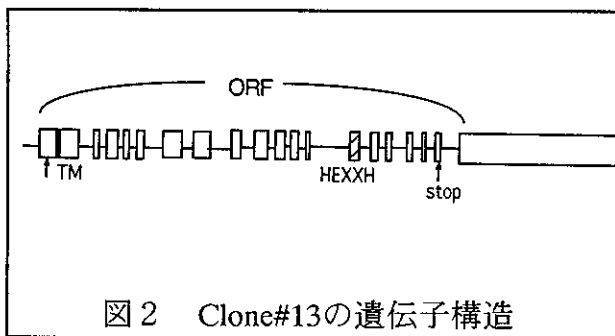
このほか下位脳幹では主に運動脳神経核(顔面神経核、三叉神経運動核、など)にも同様の強い遺伝子発現が観察された。本遺伝子は、嗅球、大脳皮質、海馬、小脳などには全く発現していなかった。

また、本遺伝子は胎生期の11日頃より神経系に発現し、神経堤由来の細胞群にも胎生期の一時期に多く発現していることが明らかとなった。知覚・自律神経節での発現は、胎生期には極めて強いものの、生後は

発現がかなり弱くなることが明らかになった。

2) Clone#13のゲノム遺伝子のクローニング

ゲノムライブラリースクリーニングにより得られたクローンの解析の結果、本遺伝子翻訳領域は約7.5kb、18exonから構成されることが明らかとなった(図2)。



3) ノックアウトベクターコンストラクトの構築。

現在構築を開始した所である。ATGを含む最初のエクソンをネオマイシン耐性遺伝子に変え、さらにプロテアーゼ活性部位にミュテーションを加え不活化させる予定であり、2年目の平成11年度前半中には完成し、ES細胞のスクリーニングへ持ってゆけると考えている。

4) Clone #13の機能解析

現在までに十数個の合成ペプチドを用いてプロテアーゼ活性を検討した。現在までに、コントロールより数倍程度の活性を有する基質が得られている。

5) 遺伝子導入法の開発

アデノウイルスにリポーターとしてLacZを導入し遺伝子の導入効率の検定を行った。その結果、アデノウイルスを用いた遺伝子導入により、脳内の神経細胞やグリア細胞に、かなりの効率で遺伝子を導入できることが明らかになった。また、導入遺伝子の発現の制御ができるようにCre-loxPのシステムの導入のため、Creを発現するアデノ

ウイルスベクターの作成も行った。

D. 考察

生活習慣病の中枢制御にとって最も重要な領域である視床下部に特異的に発現し、ニュートラルエンドペプチダーゼ様活性を有する新規遺伝子は、神経ペプチドのコバーティングやプロセッシングに極めて重要な役割を有するものと考えられる。ボンベシン、ニューロテンシン、NPY、オレキシン、など生活習慣病に関連した多くの神経ペプチドが視床下部に豊富に局在することから、Clone#13はこれら視床下部神経ペプチドに関連があると考えられる。

Clone#13の構造上の特徴は、18エクソンからなる翻訳領域(約8キロベース)に続き、3'末ノンコーディング領域をコードする大きな19番目のエクソンが存在する。メタロプロテアーゼのうち、ニュートラルエンドペプチダーゼに属すると考えられるドメインがあり、ネプリリジンファミリーのメンバーと考えられる。最も構造が近いものにエンドセリンコンバーティングエンザイムがあるが、エンドセリンコンバーティング活性はないことは確認した。基質の同定は合成ペプチドを用いて試みているが、特異性の高い基質は未だ得られていない。本新規遺伝子が生活習慣病といかなる関連を有するかは、現在進行中の欠損マウスの作成によるところが大きい。現在まで、ゲノムのクローニングが終了し、ノックアウトベクターのコンストラクトの作成にかかっているが、平成11年度の進展が期待される。また、アデノウイルスを用いた遺伝子導入法は、培養細胞系のみならず生体においても良好な結果が得られることが明らかになったので、今後本遺伝子の視床下部への導入を試みることにより、生活習慣病の新たな分子機構が解明されることが期

待される。また、将来の遺伝子治療を視野に入れた展開が可能である。

E. 結論

新規の視床下部に局在するニュートラルエンドペプチデースが得られた。生活習慣病に関与すると考えられるニューロペプチドのコンバーティングやプロセッシングに関与するものと考えられ、本分子の機能を解明することにより、新たな生活習慣病の機序が明らかになることが期待される。

F. 研究発表

1. 発表論文

- Mansur K, Iwahashi Y, Kiryu-Seo S, Su Q, Namikawa K, Yodoi J, Kiyama H (1998) Up-regulation of thioredoxin in motor neurons after nerve injury. *Mol. Brain Res.* 62: 86-91.
- Toki H, Namikawa K, Su Q, Kiryu-Seo S, Sato K, Kiyama H (1998) Enhancement of extracellular glutamate scavenge system in injured motoneurons. *J. Neurochem.* 71:913-919.
- Kiryu-Seo S, Matsuo N, Wanaka A, Ogawa S, Tohyama M, Kiyama H (1998) A sequence-specific splicing activator, Tra2-beta, is up-regulated in response to nerve injury. *Mol. Brain Res.* 62: 220-223.
- Tanabe K, Nakagomi S, Kiryu-Seo S, Namikawa K, Imai Y, Ochi T, Tohyama M, Kiyama H (1999) Expressed-sequence-tag approach to identify differentially expressed genes following peripheral nerve axotomy. *Mol. Brain Res.* 64:34-40.
- Namikawa K, Su Q, Kiryu S, Kiyama H (1998) Enhanced expression of Raf-1 activator, 14-3-3, in injured motoneurons. *Mol. Brain Res.* 55: 315-320.

2. 学会発表

- 涛川一彦、岡戸晴夫、木山博資、活性型Akt発現組換えアデノウイルスを用いた傷害運動神経の細胞死防御。第104回日本解剖学会総会、ミニシンポジウム、東京、3月30日1999年
- 中込咲綾、瀬尾寿美子、木山博資：ラット脳内におけるエンドセリンシグナリング関連分子のmRNA局在。第21回神経科学会第41回神経化学会合同大会、東京、9月21日、1998年

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

生活習慣病の中樞制御に関する研究

分担研究者 和田 圭司 国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第四部・部長

ボンベシン、ニューロテンシンなど摂食との関連性が指摘されている神経ペプチド及びその受容体に焦点を当て、生活習慣病の中樞制御の分子機構解明に向けた研究を展開した。ボンベシンについてはBRS-3欠損マウスの解析から体重と負の相関にある可能性の高い因子を同定した。またNMBR欠損マウスを新たに作製し、また新規のボンベシン受容体の存在の可能性を示した。ニューロテンシンについてはNTR1欠損マウスを作製し、NTR2遺伝子を同定した。

A. 研究目的

本研究では3年の申請期間中に肥満、高血圧、糖尿病など生活習慣に密接に関連した疾患（生活習慣病）の中樞性制御機構について新たな知見を導き出し、さらに予防・治療薬開発の前身となる物質（リード物質）を見つけだすことを目標とする。そのため、ボンベシン、ニューロテンシンなど摂食との関連性が指摘されている神経ペプチド及びその受容体に焦点を当てた研究を展開する。分担研究者の和田はこれまでにボンベシン受容体サブタイプ3（BRS-3）欠損マウスが肥満、高血圧、糖代謝異常を呈することを発見し（Nature, 390, 165, 1997）、BRS-3が中樞性の生活習慣病関連の新たな制御因子であることを同定している。なおボンベシン受容体にはBRS-3の他ニューロメジンB受容体、ガストリン放出ペプチド受容体が存在する。ニューロテンシン受容体には高親和性（NTR1）と低親和性（NTR2）の2種の受容体の存在が知られている。

B. 研究方法

1. ボンベシン受容体の解析を通じた生活

習慣病の分子機序解明及び予防・治療薬の開発

1) BRS-3の内因性リガンド並びにBRS-3機能に関連した遺伝子群の同定

生化学的アプローチの他、ノックアウトマウスと野生型間でRAP-PCR法などによるdifferential screeningを行った。

2) ニューロメジンB受容体（NMBR）欠損マウスの作製と解析

129系統由来のES細胞を使用しエクソン2を不活化した遺伝子欠損マウスを常法通り作製した。表現型の解析は行動科学的に、病態生理学的に行った。

3) 新しいボンベシン受容体遺伝子の同定

BRS-3、NMBR、およびガストリン放出ペプチド受容体を欠くトリプルノックアウトマウスを使用し、RT-PCR法で未知のボンベシン受容体を検索した。

2. ニューロテンシン受容体の生体機能の解明と老化研究への応用

1) ニューロテンシン受容体（NTR1）欠損マウスの表現型の解析

NMBR同様常法に従いNTR1欠損マウスを作製し、表現型の解析を行動科学的、組

織学的に行った。

2) NTR2遺伝子の単離

NTR2 cDNAをプローブにしてマウスゲノムライブラリーをスクリーニングした。

C. 研究結果

1. ボンベシン受容体について

1) BRS-3の内因性リガンド並びにBRS-3機能に関連した遺伝子群の解析

ノックアウトマウスと野生型間で発現量に差のある遺伝子を脳、脂肪組織からそれぞれ複数単離した。シーケンスの結果、内在性リガンドの可能性の高い配列を持ったクローンは得られなかった。しかし体重と負の相関を持つ可能性の高い遺伝子を同定することが出来た。

2) NMBR欠損マウスの解析

NMBR欠損マウスは正常に発育し生殖が可能であった。体重増は認めなかった。一般行動科学的解析（自発運動量など）においてNMBR欠損マウスと野生型マウスの間で差を認めなかった。

3) 新しいボンベシン受容体遺伝子の同定

トリプルノックアウトマウス脳組織cDNAクローン中にNMBR cDNAプローブに弱く反応するクローンを見出した。

2. ニューロテンシン受容体について

1) ニューロテンシン受容体 (NTR1) 欠損マウスの表現型の解析

NTR1欠損マウスは正常に発育し生殖が可能であった。体重増は認めなかった。一般行動科学的解析を現在遂行中である。

2) NTR2遺伝子の単離

マウスNTR2遺伝子を単離し、エクソン・イントロン境界など遺伝子構造を決定した。

D. 考察

生活習慣病の克服をめざして各研究機関、製薬企業等で盛んに研究が行われている

がまだ対症療法の域を出ていないといっても過言でなく課題も多い。血圧、エネルギー収支、など生体の恒常性の維持に生理活性ペプチドが重要な役割を担っていることは周知でペプチドを題材にした研究も数多く展開されている。その中でボンベシンやニューロテンシン及びその受容体については特異的アンタゴニストの不足や生理作用の多様性のために研究が遅れていた。しかし分担研究者の和田は遺伝子欠損マウスの作製を通してBRS-3がエネルギー収支、血圧維持において実は極めて重要な分子であることを世界に先駆けて示した。BRS-3の内在性リガンドは未だ不明であるがその同定は抗肥満薬の開発に直結する成果を生み出す可能性が高い。今年度の研究ではBRS-3リガンドの同定には至らなかったが次年度以降も引き続き精力的にその探索を行う予定である。他方、BRS-3機能と関連し肥満と負の関係にある遺伝子が単離出来た意義は大きい。今後の研究の展開により予防・治療の指標として臨床応用をめざしていきたい。また、その分子の実体は不明であるが新規ボンベシン受容体の可能性が遺伝子スクリーニングで示された。新たに作製されたNMBR欠損マウスの解析と合わせ生活習慣病におけるボンベシンシステムの全容解明に迫りたい。

ニューロテンシン受容体についてはその生理作用は不明の点が多い。NTR2遺伝子が単離出来たことでNTR2欠損マウス作製も展望できるようになった。既に作製されたNTR1欠損マウスの解析を継続するとともに中枢機能におけるニューロテンシンシステムの役割の解明に向け研究を進展させる予定である。

E. 結論

BRS-3欠損マウスの解析を通して肥満と

関連の深い遺伝子を新たに見出した。NMBR欠損マウス、NTR1欠損マウスの作製を行い解析を開始した。新たなボンベシン受容体遺伝子の可能性が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Wada K, Wada E, Watase K, Yamada K, Ohki-Hamazaki H: Bombesin, obesity and social behavior. *Mol Psychiat* 3: 204-206, 1998

Ohki-Hamazaki, H., Sakai, Y., Kamata, K., Ogura, H., Okuyama, S., Watase, K., Yamada, K. and Wada, K. Functional properties of two bombesin-like peptide receptors revealed by the analysis of mice lacking neuromedin B receptor. *J. Neurosci.*, 19, 948-954, 1999

山田一之, 浜崎浩子, 和田恵津子, 関口正幸, 和田圭司: 嗅覚系におけるニューロメジンB受容体 (NMB-R) の機能について. *日本味と匂学会誌* 5: 561-564, 1998

和田圭司: 太らない遺伝子: BRS-3. *Isotope News*, 528, 10-11, 1998

和田圭司: 新しい薬理的・生物学的ツールを利用した精神・神経疾患克服への挑戦. *脳の科学*, 20, 800-804, 1998

和田圭司: ボンベシン受容体遺伝子と肥満. *遺伝子医学*, 2, 447-449, 1998

和田圭司: ボンベシン・ボンベシン受容体系と肥満. *臨床科学*, 34, 1049-1055, 1998

和田圭司: ボンベシン受容体と肥満. *内分泌・糖尿病科*, 7, 229-236, 1998

和田圭司: 遺伝子と脳機能. *遺伝子医学*, 2, 550-554, 1998

和田圭司: 肥満の新しい分子機構. *化学と生物*, 36, 758-759, 1998

2. 学会発表

和田圭司: ボンベシン受容体と肥満. 第3回アディポサイエンス研究会「肥満の分子機構と脂肪細胞機能」, 大阪, 8. 8, 1998

和田圭司: 神経伝達物質受容体・トランスポーターの発生工学的機能解析と疾患モデルの作製. 第126回日本獣医学会ワークショップ「動物モデル—発生原理に基づいた神経疾患モデル研究の新しい展開」, 江別, 8. 23, 1998

和田圭司, 山田一之, 渡瀬 啓, 前野浩巳, 浜崎浩子, 和田恵津子: 遺伝子操作動物を用いたアプローチ. 第21回日本神経科学第41回日本神経化学合同大会シンポジウム「精神疾患の分子メカニズム」, 東京, 9. 21, 1998

和田圭司: ボンベシン受容体と肥満. 第19回日本肥満学会ワークショップ「肥満バイオサイエンスのトピックス」, 松山, 12. 3, 1998

Wada, K: Generation and characterization of a new obese model mouse: The bombesin receptor subtype-3 deficient mouse. *Japan-US Cooperative Medical Science Program International Symposium on "Diabetes, Obesity and Carbohydrate Metabolism"*. Kisarazu, 12. 12, 1998

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし