シリーズ 新しい内分泌現象

ニューロメジンSとその多様な機能

森 健二¹、森 美和¹、宮里 幹也¹、寒川 賢治²¹国立循環器病研究センター研究所生化学部、²国立循環器病研究センター研究所)

E-mail: moriken@ri.ncvc.go.jp

1. はじめに

生理活性ペプチドは、生体を制御するための主要な情報伝達物質の1つであり、これは幅広い生物種で保存された重要な情報伝達システムである。著者らの研究グループでは、主に哺乳類の生体機能制御機構の理解を目的として新しい生理活性ペプチドの探索研究を精力的に行っており、これまでに心房性ナトリウム利尿ペプチドをはじめとするナトリウム利尿ペプチドファミリー、アドレノメデュリンやグレリンといったペプチドホルモンの発見に成功してきた。一方で、神経ペプチドであるニューロメジン類も各種同定してきた(表1)。本稿では、これらの中で最も新しく発見されたニューロメジンS(neuromedin S: NMS)について紹介する。

2. NMSの発見

2.1. ニューロメジンとは

1977年にSchallyとGuilleminが「脳のペプチドホルモン産生に関する発見」にてノーベル医学生理学賞を受賞したことを受けて、世界中の数多くの研究グループにより中枢神経系で機能する新しい神経ペプチドの探索が試みられたが、当時は中枢神経の機能を再現性を持って効率よく評価する方法が存在しなかったため、その探索は困難を極めた。著者らのグループでは、それまでに発見されていたサブスタンスPやオピオイドペプチドが本来の特異的な生理機能に加えて、平滑筋や血圧に対して非特異的な薬理学的作用を示すことから、モルモット回腸やラット子宮の平滑筋収

表1 ニューロメジンの分類

分 類	ペプチド
タキキニン類	ニューロメジンK ¹⁾ ニューロメジンL ²⁾
ボンベシン類	ニューロメジンB ³⁾ ニューロメジンC ⁴⁾
ニューロテンシン類	ニューロメジンN ⁵⁾
ニューロメジンU類	ニューロメジンU ⁶⁾ ニューロメジンS ⁷⁾

ニューロメジンS以外は全て平滑筋収縮アッセイにて同定された。

縮活性を指標とした探索を試みた。この結果、ブタ脊髄から抽出したペプチド画分に含まれる6種類の新たな神経ペプチドを見出し、本来の生理機能は不明だが広く神経系の伝達・調節に関与する可能性を持つ物質(neuronal mediator)という意味をこめてニューロメジンと命名した。これらのうち5種類は、構造的特徴からタキキニン類、ボンベシン類、ニューロテンシン類に分類できたが、名前の由来となった子宮平滑筋を強力に収縮させるニューロメジンU(neuromedin U: NMU)だけは構造的に全く新規な神経ペプチドであったため、ニューロメジンU類と分類された(表1)。

2.2. NMSはNMU受容体のもう1つの内因性リガンドとして発見された

NMUは1985年に発見されたにもかかわらず⁶⁾、それまでに同定されていたペプチドと構造的相関が全く無かったこともあり、機能解析はほとんど行われてこなかった。しかし、そのような状況は受容体の同定により一変

し、そしてNMSの発見につながった⁷⁾。1990年代中頃から結合するリガンドが不明なオファン受容体のリガンド探索が行われ、オレキシンやグレリンなど興味深い新しい生理活性ペプチドが次々に発見された^{8, 9)}。そして、2000年には著者らを含めた8つもの研究グループがほぼ同時に、オファン受容体であったFM-3/GPR66とFM-4/TGR-1の内因性リガンドがNMUであることを報告した^{10, 11)}。このとき、著者らのグループだけは脳から抽出したペプチド画分からの精製を試みたため、NMUに加えてもう1つの内因性アゴニスト活性が存在することを突き止めたが、他の研究グループでは受容体が不明だった合成生理活性ペプチド・ライブラリーの中からNMUをリガンドとして同定したため、もう1つのアゴニスト活性を見つけ出すことはできなかった。この未知の内因性アゴニスト活性の構造解析により、著者らのグループだけがNMSを同定することができた⁷⁾。

3. NMSと受容体

3.1. NMSの構造と分布

NMSは、ラットでは36アミノ酸残基により構成されるペプチドであり、ラット脳よりはじめて精製および構造解析がなされた⁷⁾。現在ではクローニングによりヒト、チンパンジー、サル、イヌ、ウシ、ブタ、マウス、カ

エルでも同定されている^{7, 12, 13)} (図1)。動物種間でアミノ酸配列を比較すると、C末端側は高度に保存されているがN末端側は比較的に変化に富んでいる。C末端7アミノ酸残基とC末アミド化修飾が活性に重要な構造とされ、この部位はNMUと完全に一致する。しかし、NMSとNMUの構造を同じ動物種間で比較すると、N末側のアミノ酸配列は全く保存されていない。

NMSとNMUの前駆体タンパク質は、ヒトではそれぞれ2番、4番染色体上に位置する別々の遺伝子にコードされている⁷⁾。また、一般的に生理活性ペプチドが前駆体タンパク質より切り出される際、両端に位置する塩基性アミノ酸残基を認識して切断するサチライシン様プロセシングプロテアーゼファミリーが機能するが¹⁴⁾、NMSとNMUではC末端側の切断部位の配列が異なっている (図2)。NMUでは典型的な塩基性アミノ酸対になっているが、NMSでは周辺に点在する塩基性アミノ酸残基との組み合わせにより認識配列が構成されているため、両者は別々のプロセシングプロテアーゼにより切断されていると思われる。ゆえに、NMSとNMUは同一の活性部位をもつが、異なった転写制御と翻訳後修飾により制御されることにより、別々の生理機能を担っていると推測される。

ラットにおいて、NMSの遺伝子発現は主

ILQRGSGTAAVDFTKKDHTATWGRPF	FLFRPRN-NH2	ヒトNMS
ILQRGSGTAAVDFTKKDHTATWGRPF	FLFRPRN-NH2	チンパンジーNMS
FLQRGSGTAAVDFTKKDHTATWGRPF	FLFRPRN-NH2	サルNMS
FLQPRDRTAAVDFTKKDHTATWGRPF	FLFRPRN-NH2	イヌNMS
MKTFWRRDSRATAADFTKKDYTATLGRPF	FLFRPRN-NH2	ウシNMS
MKTFWRRDSRATAVDFTKKDYTATLGRPF	FLFRPRN-NH2	ブタNMS
LPRLLLHTDSRMATIDFPKKDP T TSLGRPF	FLFRPRN-NH2	ラットNMS
LPRLLLRLDSRMATVDFPKKDP T TSLGRPF	FLFRPRN-NH2	マウスNMS
	DSSGIVGRPF	カエルNMS
FRVDEEFQSPFASQSRGY	FLFRPRN-NH2	ヒトNMU
YKV-NEYQGPVA-PSGGF	FLFRPRN-NH2	ラットNMU
FK--AEYQSPSVGQSKGY	FLFRPRN-NH2	マウスNMU

図1 NMSの構造

NMSとNMUの構造を比較した。網がけは両ペプチド間で保存されているアミノ酸残基とC末アミド構造を示す。実線で囲んだ部分は活性に重要な構造で、NMSとNMUでは完全に一致している。

図2 NMSおよびNMU前駆体タンパク質におけるC末側プロセシング部位の構造
ヒトNMSおよびNMUが翻訳後修飾により前駆体タンパク質から切り出される際の、C末側プロセシング部位周辺のアミノ酸配列。矢印は切断部位を表し、NMSおよびNMUのC末端配列は実線で囲む。星印はC末端アミド化修飾の際に必要なグリシン残基を示す。NMS前駆体タンパク質では、P1、P4、P6位の塩基性アミノ酸残基でプロセシングシグナル(Arg-X-Arg-X-X-Arg↓)を構成する。一方、NMU前駆体タンパク質ではP1およびP2位(Arg-Arg↓)で構成される。プロセシングシグナルとしては、後者の方がより一般的で切断されやすいが、前者はプロセシングプロテアーゼの選択肢が少なくなる。

として中枢神経系、脾臓、精巣で観察され、なかでも視床下部で最も強く発現している⁷⁾(図3A)。*in situ*ハイブリダイゼーション法による解析では脳においては視床下部視交叉上核に限局したシグナルが検出される(図3B)。また、リアルタイムPCR法による解析では、室傍核、弓状核、視索上核でも発現が認められるが、視交叉上核での発現量が突出していた(図3C)。ちなみに、NMSは視交叉上核(suprachiasmatic nuclei)の頭文字に因んで命名されている。

3.2. NMSの受容体とその分布

上述したように、NMSはNMU受容体のもう1つの内因性リガンドとして同定された。オーファン受容体としてクローニングされたFM-3/GPR66とFM-4/TGR-1は、共にGタンパク質共役型受容体に分類され、現在ではそれぞれNMU/NMS受容体1型および2型とされている¹¹⁾ (図4)。両者の間でアミノ酸配列を比較すると、ヒトでは56%もの高い相同性を有し、グレリン、モチリン、ニューロテンシンの受容体とも一定の相同性を示す。1型および2型のリコンビナント受容体それぞれに対して、NMSとNMUのアゴニスト活性を薬理学的に比較すると、どちらも同じ強度でそれぞれの受容体を活性化する⁷⁾。また、両者はGタンパク質サブクラスのうちGqおよびGiに共役しているが、1型はGqを、2型はGiを主に選択する¹⁵⁾。

それぞれの遺伝子発現パターンは大きく異なっており、1型受容体は主に消化管など末梢組織で発現している¹⁶⁾。一方、2型受容体は主として中枢神経系で発現している¹⁷⁾。視床下部では、弓状核、室傍核、第三脳室上衣層、腹内側核周辺で2型受容体の強い発現が認められる¹⁸⁾。

4. NMSの多様な機能

4.1. NMSとサーカディアンリズム

視交叉上核は片側約1万個の小型神経細胞が密集した左右一対の神経核で、視交叉の真上に位置する。この神経核を破壊もしくは入出力線維を切断すると、外的要因にかかわらず約24時間の固有の周期で生理現象を変動させるサーカディアンリズムが消失するため、視交叉上核は生体時計中枢として良く知られている¹⁹⁾。この神経核にNMS mRNAが発現しており⁷⁾、更には1型および2型受容体も発現しているため²⁰⁾、NMSがサーカディアンリズムの発振もしくは調節において何らかの役割を果たしていることは容易に推測できる。

視交叉上核でのNMS遺伝子の発現パターンは特徴的である⁷⁾。視交叉上核は、機能形態的に背内側部と腹外側部に分けられるが、NMS mRNAの発現は腹外側部で観察される。また、12時間ずつの明暗サイクルで飼育したラットでは、明期に高く暗期に低いNMS mRNAの発現リズムが観察されるが、外部環境から隔離して常に消灯した真っ暗な条件

図3 ラットにおけるNMS mRNAの発現分布

(A) 各種組織におけるNMS mRNAの発現量。(B) *in situ*ハイブリダイゼーション法によって確認されたNMS mRNAの視交叉上核特異的な発現。(C) 視床下部の各種神経核におけるNMS mRNAの発現量。(文献7より改変引用)

図4 NMSの受容体

NMSとNMUの受容体は共通であり、1型および2型が存在する。

(連続暗条件)で飼育するとこの発現リズムは消失する。このため、NMSの遺伝子発現は生体時計中枢の支配を受けておらず、明暗サイクルの影響を受けていることが示唆され

る。視交叉上核の腹外側部は、網膜、縫線核、膝間小葉から神経繊維投射を受け、サーカディアンリズムのリセットに必要な刺激を外部環境より受容していることとあわせて考察すると¹⁹⁾、NMSは生体時計の上流で機能しており、サーカディアンリズムの調節に関与していることが考えられる。対照的に、NMU mRNAは背内側部で発現しており¹⁸⁾、連続暗飼育でも発現リズムが維持されているため²⁰⁾、NMUはサーカディアンリズムの発振・調節においてNMSとは異なった役割を担っていると考えられる。

サーカディアンリズムの調節における役割を推測するために、連続暗条件で飼育したラットへNMSを脳室内投与したところ、ラットが休息している主観的昼に投与した場合にサーカディアンリズムの位相が用量依存的に

変位した⁷⁾。一方、行動期である主観的夜に投与してもサーカディアンリズムに変化は観察されなかった。外部環境からの様々な刺激がサーカディアンリズムの位相を変位させるが、光刺激が最も強力であり主観的夜に作用する。一方、制限給餌、強制運動などの非光刺激は主観的昼に位相を変位させる²¹⁾。主観的昼のNMS脳室内投与がサーカディアンリズムに影響するため、NMSは非光刺激による生体時計のリセットに関わっている可能性が示唆される。

4.2. NMSと摂食調節

視床下部の弓状核と室傍核は中枢性摂食調節において中心的役割を担うが²²⁾、これらの神経核にNMUと2型受容体が発現していたため、中枢性摂食調節におけるNMUの関与が示唆された。このため、多くの研究者の興味を引き付け、1985年に発見されながらも停滞していたNMUの機能解析が爆発的に進められた。NMUをラットへ脳室内投与すると、用量依存的に摂餌量が抑制されるとともに体重が減少する^{10, 23)}。このNMUによる摂食抑制は、ニワトリ、ウズラ、金魚でも観察されていることから^{24~26)}、幅広い動物種で共通な機能と思われる。摂食抑制作用に加えて、NMUの中枢投与により行動量と酸素消費量の増加と深部体温の上昇が観察され、エネルギー代謝が亢進する²³⁾。また、中枢のNMUによる摂食抑制とエネルギー代謝の亢進は2型受容体を介して誘引される²⁷⁾。脳室内投与実験とは対照的に、NMUのノックアウトマウスは過食とエネルギー代謝の低下に起因する顕著な肥満を発症する²⁸⁾。

NMSは、中枢性摂食・エネルギー代謝調節におけるNMUの生理的役割が明らかになった後に発見されたため、同様に摂食調節における作用を検討したところ、脳室内へ投与すると意外にもNMUと比較して約10倍強力に摂餌量を減少させた^{29, 30)}。NMSとNMUは、弓状核と室傍核を活性化するとともに、それぞれで産生されている摂食抑制

ペプチドである α メラニン細胞刺激ホルモン(α -MSH)と副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン(CRH)を介して摂食を抑制するが³⁰⁾、脳室内投与実験での結果と一致して、NMSはスライス培養した視床下部からの α -MSH分泌をNMUよりも10倍強く誘導する³⁰⁾。

レプチンは、脂肪細胞から分泌されるホルモンであり、視床下部に作用して強力に摂食を抑制し、エネルギー代謝を亢進する³¹⁾。レプチンによる強力な摂食抑制作用は、NMSまたはNMUを中枢投与したときに観察される現象と同一なため、レプチンが視床下部を介して機能する際にNMSもしくはNMUが下流シグナルとして機能するかは非常に興味深い。NMUノックアウトマウスではレプチンが有効に機能するため、NMUはレプチンとは別経路で摂食を抑制する²⁸⁾。一方で、抗NMU抗体を用いた実験により、レプチンが視床下部からのNMU分泌を促進することや³²⁾、中枢の内在性NMU活性を中和するとレプチンの摂食抑制作用が減弱されるなど³³⁾、ノックアウトマウスを用いた解析とは矛盾する報告が存在する。しかしながら、後者の実験ではNMSとNMUを区別できない抗体が使われている可能性が高いため、NMUではなくNMSがレプチンの下流シグナルとして機能している可能性も考えられる。そこで著者らのグループは、NMSとNMUの活性をそれぞれ特異的に中和する抗体をラットへ脳室内投与し、レプチンによる摂食抑制における影響を検討した³⁰⁾。その結果、NMSに特異的な抗体だけがレプチンの摂食抑制作用を減弱させたことから、レプチンが視床下部を介して機能する際の下流シグナルとして内在性NMSが機能している可能性が示唆された。しかしながら、視床下部のどの部位で産生されるNMSがレプチンによる摂食抑制機構に関与しているかは未だ不明であり、更なる検討が必要である。

4.3. NMSによる視床下部—下垂体—副腎軸の活性化と異常行動

ラットの脳室内へNMSを投与すると室傍核が活性化されるとともに血中コルチコステロン濃度も用量依存的に上昇する³⁴⁾。この反応はCRH受容体1型アンタゴニストであるアンタルミンの前投与により消失することから、CRH受容体1型を介して視床下部—下垂体—副腎軸が活性化されていることを示す。また、アンタルミンもしくはドーパミンD2遮断薬であるハロペリドールによる前処理で消失する過剰なグルーミングも誘導する³⁴⁾。オープンフィールド試験ではNMS中枢投与による異常行動は認められないが、高架型十字迷路試験では、抗不安薬であるジアゼパムもしくはアンタルミンの前投与により改善される不安行動が観察される³⁴⁾。また、スライス培養による評価では、NMSは扁桃体からのドーパミン分泌を増強した³⁴⁾。これらは、NMSが中脳辺縁系のドーパミンとCRH分泌を介して常同行動や不安症を惹起することを示唆している。

4.4. NMSと生殖機能制御

現在では、レプチンやグレリンなど末梢で産生される摂食調節因子がgonadotropic axisを調節することが報告され^{35, 36)}、エネルギー代謝と生殖機能制御が密接に関連していることが示されている。さらに、生殖機能制御は光周性や生体リズムの影響を受けやすい^{37, 38)}。しかしながら、エネルギー代謝状態と光周期や生体リズムを視床下部の生殖中枢へ伝達する因子は未だ不明である。このような背景のもと、強力な摂食抑制活性を持ち、なお且つ、サーカディアンリズムと密接に関連しているNMSが、生殖系の調節因子として機能するかを検討することは興味深い。

雌ラットの視床下部におけるNMSと2型受容体の遺伝子発現量は、生殖器の発育段階や発情周期によって変動する³⁹⁾。発育段階における両者の発現パターンは酷似しており、誕生後10日まで非常に低レベルである

が、その後一貫して増加し幼若期に最大となる。その後、思春期前後で発現量がはつきりと減少し、性成熟期には幼若期のレベルまで回復する。また、成熟した雌ラットの視床下部では、発情周期の全ての段階でNMSと2型受容体の遺伝子発現が観察される。これらの発現量は発情前期で最大となり、発情期に有意に減少する。その後、発情休止期に発現量は徐々に増加し、発情前期に再度最大となる。視交叉上核に限定した場合でも、NMS mRNAの発現量は発情前期に高く、発情休止期では低下している。また、発情周期に依存したNMSと2型受容体の遺伝子発現量の同様の変動は、ブタ視床下部でも示されている¹³⁾。次に、卵巣摘出ラットでは、視床下部でのNMSと2型受容体の発現は低下する。エストラジオールを補充すると、受容体発現量は変わらないが、不思議なことにNMS mRNAの発現量は更に低下する。一方、プロゲステロンの補充により両者の発現量は発情前期のレベルにまで回復する。

雌ラットにNMSを脳室内投与すると、黄体形成ホルモン分泌を促すが、発育段階、発情周期や代謝性負荷により分泌の度合いが全く異なる³⁹⁾。思春期前後や発情休止期では、黄体形成ホルモンの分泌を穏やかに誘導するが、発情期や48時間絶食条件では過度に分泌させる。一方、卵巣摘出ラットでは血中黄体形成ホルモン濃度の継続的な上昇が観察されるが、NMSの中枢投与により減少する。

以上の結果は、NMSが生殖機能制御に関与することを示唆しており、生殖、エネルギー代謝と生体リズムの統合に寄与している可能性を示している。

4.5. NMSによる下垂体後葉ホルモン分泌

下垂体後葉ホルモンであるバソプレシンとオキシトシンは、視床下部の室傍核と視索上核で産生されるが、これらの神経核ではNMSの2型受容体が発現している⁴⁰⁾。また、NMSをラットの脳室内へ投与すると、室傍核の大細胞部内側、視索上核の大細胞部背側

に存在する神経細胞でcFosタンパク質の発現が誘導され、部分的にバソプレシン産生細胞と一致する⁴⁰⁾。また、NMSの中枢投与は用量依存的に血漿バソプレシン濃度を上昇させ、投与後5分で最大値となる⁴⁰⁾。これに伴い暗期12時間の尿量も有意に減少する。NMUもバソプレシン分泌を促進することにより尿量を抑制するが、NMSと同程度の効果を得るには10倍以上の用量が必要であり⁴⁰⁾、効果も比較的緩やかに現れる⁴¹⁾。以上の結果は、中枢のNMSは、室傍核と視索上核からのバソプレシン分泌を介して生理的に尿量を調節する可能性を示唆している。

NMSの脳室内投与は、室傍核の大細胞部内側と視索上核の大細胞部背側に局在するオキシトシン産生細胞の一部を活性化するとともに、用量依存的かつ速やかに血漿オキシトシン濃度を上昇させる⁴²⁾。また、この効果はバソプレシンの場合と同様にNMUと比較して10倍近く強力である。加えて、哺乳期の雌ラットへNMSを中枢投与すると、ミルクの分泌量が増加する⁴²⁾。一方、興味深いことに哺乳期の雌ラットにあらかじめ抗NMS抗体を脳室内投与することにより内在性NMS活性を中和すると、哺乳刺激により誘発される射乳が有意に抑制される⁴²⁾。これらは、哺乳刺激に応答したオキシトシン分泌の制御に内在性NMSが関与していることを示唆している。

4.6. NMSによる循環制御

NMUを覚醒ラットの脳室内へ投与すると動脈圧と心拍数が上昇することから⁴³⁾、循環調節におけるNMS中枢投与の影響も検討されている⁴⁴⁾。脳室内へNMSを投与された覚醒マウスの心拍数と血圧を非侵襲的に測定すると、用量依存的な心拍数の増加が認められたが、意外にも血圧は変化しない。NMSノックアウトマウスでは、野生型に比べて血圧には差が認められないが、心拍数は有意に低下している。また、イソフルランによる麻酔下での心電図解析では、NMSノックアウ

トマウスでQRS間隔とRR間隔の延長が観察される。無麻酔下の野生型とNMSノックアウトマウスはともに副交感神経遮断薬であるスコポラミン、または交感神経遮断薬であるチモロールによる処置により、それぞれ心拍数が上昇もしくは低下するが、野生型に比べてNMSノックアウトマウスはスコポラミンがより強く作用するが、チモロールによる影響を受けにくい。これに加え、チモロールによる前処置だけがNMS中枢投与が誘引する心拍数の増加を完全にブロックする。心臓ではNMSおよびその受容体が発現していないこととあわせて考察すると、内在性NMSは交感神経系を介して循環調節に寄与していると推測される。

5. おわりに

2005年にNMSの発見を報告して以来、中枢神経系での興味深い機能が次々に明らかになってきた。特に、中枢投与により機能の評価した場合、NMSとNMUは同一の活性部位を持つにもかかわらず、いずれの実験でもNMSの方が約10倍強い活性を示す。これは、NMUよりもNMSが中枢での生体機能調節においてより重要な役割を果たしている可能性を示唆している。しかしながら、脳内のどこで産生されたNMSが、どの部分に作用しているかという形態学的な情報があまりにも乏しいため、生理的なNMSの機能は未だ完全には確立されていない。最近、著者らは視床下部(特に視交叉上核)で産生されるNMSが脳の他の領域に輸送されていることを示唆する興味深い知見を得ているため(投稿準備中)、今後この事実に即したNMSの機能解明が期待される。

最後に、著者らの共同研究者としてNMSの機能解析を強力に推進してくださった宮崎大学農学部獣医学科獣医生理学講座の村上昇先生に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Kangawa K, Minamino N, Fukuda A, Matsuo

- H, 1983. Neuromedin K: a novel mammalian tachykinin identified in porcine spinal cord. *Biochem Biophys Res Commun.* **114**, 533-540.
- 2) Minamino N, Kangawa K, Fukuda A, Matsuo H, 1984. Neuromedin L: a novel mammalian tachykinin identified in porcine spinal cord. *Neuropeptides.* **4**, 157-166.
 - 3) Minamino N, Kangawa K, Matsuo H, 1983. Neuromedin B: a novel bombesin-like peptide identified in porcine spinal cord. *Biochem Biophys Res Commun.* **114**, 541-548.
 - 4) Minamino N, Kangawa K, Matsuo H, 1984. Neuromedin C: a novel bombesin-like peptide identified in porcine spinal cord. *Biochem Biophys Res Commun.* **119**, 14-20.
 - 5) Minamino N, Kangawa K, Matsuo H, 1984. Neuromedin N: a novel neurotensin-like peptide identified in porcine spinal cord. *Biochem Biophys Res Commun.* **122**, 542-549.
 - 6) Minamino N, Kangawa K, Matsuo H, 1985. Neuromedin U-8 and U-25: novel uterus stimulating and hypertensive peptides identified in porcine spinal cord. *Biochem Biophys Res Commun.* **130**, 1078-1085.
 - 7) Mori K, Miyazato M, Ida T, Murakami N, Serino R, Ueta Y, Kojima M, Kangawa K, 2005. Identification of neuromedin S and its possible role in the mammalian circadian oscillator system. *EMBO J.* **24**, 325-335.
 - 8) Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, Williams SC, Richardson JA, Kozlowski GP, Wilson S, Arch JR, Buckingham RE, Haynes AC, Carr SA, Annan RS, McNulty DE, Liu WS, Terrett JA, Elshourbagy NA, Bergsma DJ, Yanagisawa M, 1998. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell.* **92**, 573-585.
 - 9) Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K, 1999. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature.* **402**, 656-660.
 - 10) Kojima M, Haruno R, Nakazato M, Date Y, Murakami N, Hanada R, Matsuo H, Kangawa K, 2000. Purification and identification of neuromedin U as an endogenous ligand for an orphan receptor GPR66 (FM3). *Biochem Biophys Res Commun.* **276**, 435-438.
 - 11) Brighton PJ, Szekeres PG, Willars GB, 2004. Neuromedin U and its receptors: structure, function, and physiological roles. *Pharmacol Rev.* **56**, 231-248.
 - 12) Chen T, Zhou M, Walker B, Harriot P, Mori K, Miyazato M, Kangawa K, Shaw C, 2006. Structural and functional analogs of the mammalian neuropeptide, neuromedin S (NmS), in the dermal venoms of Eurasian bombinid toads. *Biochem Biophys Res Commun.* **345**, 377-384.
 - 13) Yang G, Su J, Li X, Yao Y, Lei Z, Yang X, Kou R, Liu Y, 2009. Expression of NMS and NMU2R in the pig reproductive axis during the estrus cycle and the effect of NMS on the reproductive axis in vitro. *Peptides.* **30**, 2206-2212.
 - 14) Rouillé Y, Duguay SJ, Lund K, Furuta M, Gong Q, Lipkind G, Oliva AA Jr, Chan SJ, Steiner DF, 1995. Proteolytic processing mechanisms in the biosynthesis of neuroendocrine peptides: the subtilisin-like proprotein convertases. *Front Neuroendocrinol.* **16**, 322-361.
 - 15) Hsu SH, Luo CW, 2007. Molecular dissection of G protein reference using G α chimeras reveals novel ligand signaling of GPCRs. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **293**, E1021-E1029.
 - 16) Fujii R, Hosoya M, Fukusumi S, Kawamata Y, Habata Y, Hinuma S, Onda H, Nishimura O, Fujino M, 2000. Identification of neuromedin U as the cognate ligand of the orphan G protein-coupled receptor FM-3. *J Biol Chem.* **275**, 21068-21074.
 - 17) Hosoya M, Moriya T, Kawamata Y, Ohkubo S, Fujii R, Matsui H, Shintani Y, Fukusumi S, Habata Y, Hinuma S, Onda H, Nishimura O, Fujino M, 2000. Identification and functional characterization of a novel subtype of neuromedin U receptor. *J Biol Chem.* **275**, 29528-29532.
 - 18) Graham ES, Turnbull Y, Fotheringham P, Nilaweera K, Mercer JG, Morgan PJ, Barrett P, 2003. Neuromedin U and Neuromedin U receptor-2 expression in the mouse and rat hypothalamus: effects of nutritional status. *J Neurochem.* **87**, 1165-1173.
 - 19) Reppert SM, Weaver DR, 2001. Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Annu Rev Physiol.* **63**, 647-676.
 - 20) Nakahara K, Hanada R, Murakami N, Teranishi H, Ohgusu H, Fukushima N, Moriyama M, Ida T, Kangawa K, Kojima M, 2004. The gut-

- brain peptide neuromedin U is involved in the mammalian circadian oscillator system. *Biochem Biophys Res Commun.* **318**, 156-161.
- 21) Mrosovsky N, 1996. Locomotor activity and non-photic influences circadian clocks. *Biol Rev.* **71**, 343-372.
 - 22) Schwartz MW, Woods SC, Porte D Jr, Seeley RJ, Baskin DG, 2000. Central nervous control of food intake. *Nature.* **404**, 661-671.
 - 23) Nakazato M, Hanada R, Murakami N, Date Y, Mondal MS, Kojima M, Yoshimatsu H, Kangawa K, Matsukura S, 2000. Central effects of neuromedin U in the regulation of energy homeostasis. *Biochem Biophys Res Commun.* **277**, 191-194.
 - 24) Shousha S, Nakahara K, Miyazato M, Kangawa K, Murakami N, 2005. Endogenous neuromedin U has anorectic effects in the Japanese quail. *Gen Comp Endocrinol.* **140**, 156-163.
 - 25) Kamisoyama H, Honda K, Saneyasu T, Sugahara K, Hasegawa S, 2007. Central administration of neuromedin U suppresses food intake in chicks. *Neurosci Lett.* **420**, 1-5.
 - 26) Maruyama K, Konno N, Ishiguro K, Wakasugi T, Uchiyama M, Shioda S, Matsuda K, 2008. Isolation and characterization of four cDNAs encoding neuromedin U (NMU) from the brain and gut of goldfish, and the inhibitory effect of a deduced NMU on food intake and locomotor activity. *J Neuroendocrinol.* **20**, 71-78.
 - 27) Peier A, Kosinski J, Kimberly CY, Qian Y, Desai K, Feng Y, Trivedi P, Hastings N, Marsh DJ, 2009. The antiobesity effects of centrally administered neuromedin U and neuromedin S are mediated predominantly by the neuromedin U receptor 2 (NMUR2). *Endocrinology.* **150**, 3101-3109.
 - 28) Hanada R, Teranishi H, Pearson JT, Kurokawa M, Hosoda H, Fukushima N, Fukue Y, Serino R, Fujihara H, Ueta Y, Ikawa M, Okabe M, Murakami N, Shirai M, Yoshimatsu H, Kangawa K, Kojima M, 2004. Neuromedin U has a novel anorexigenic effect independent of the leptin signaling pathway. *Nat Med.* **10**, 1067-1073.
 - 29) Ida T, Mori K, Miyazato M, Egi Y, Abe S, Nakahara K, Nishihara M, Kangawa K, Murakami N, 2005. Neuromedin S is a novel anorexigenic hormone. *Endocrinology.* **146**, 4217-4223.
 - 30) Nakahara K, Katayama T, Maruyama K, Ida T, Mori K, Miyazato M, Kangawa K, Murakami N, 2010. Comparison of feeding suppression by the anorexigenic hormones neuromedin U and neuromedin S in rats. *J Endocrinol.* **207**, 185-193.
 - 31) Campfield LA, Smith FJ, Burn P, 1996. The OB protein (leptin) pathway-a link between adipose tissue mass and central neural networks. *Horm Metab Res.* **28**, 619-632.
 - 32) Wren AM, Small CJ, Abbott CR, Jethwa PH, Kennedy AR, Murphy KG, Stanley SA, Zolner AN, Ghatei MA, Bloom SR, 2002. Neuromedin S is a novel anorexigenic hormone. *Endocrinology.* **143**, 4227-4234.
 - 33) Jethwa PH, Small CJ, Smith KL, Seth A, Darch SJ, Abbott CR, Murphy KG, Todd JF, Ghatei MA, Bloom SR, 2005. Neuromedin U has a physiological role in the regulation of food intake and partially mediates the effects of leptin. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **289**, E301-E305.
 - 34) Jászberényi M, Bagosi Z, Thurzó B, Földesi I, Telegdy G, 2007. Endocrine and behavioral effects of neuromedin S. *Horm Behav.* **52**, 631-639.
 - 35) Cunningham MJ, Clifton DK, Steiner RA, 1999. Leptin's actions on the reproductive axis: perspectives and mechanisms. *Biol Reprod.* **60**, 616-622.
 - 36) Barreiro ML, Tena-Sempere M, 2004. Ghrelin and reproduction: a novel signal linking energy status and fertility? *Mol Cell Endocrinol.* **226**, 1-9.
 - 37) Chappell PE, 2005. Clocks and the black box: circadian influences on gonadotropin-releasing hormone secretion. *J Neuroendocrinol.* **17**, 119-130.
 - 38) de la Iglesia HO, Schwartz WJ, 2006. Timely ovulation: circadian regulation of the female hypothalamo-pituitary-gonadal axis. *Endocrinology.* **147**, 1148-1153.
 - 39) Vigo E, Roa J, López M, Castellano JM, Fernandez-Fernandez R, Navarro VM, Pineda R, Aguilar E, Diéguez C, Pinilla L, Tena-Sempere M, 2007. Neuromedin S as novel putative regulator of luteinizing hormone secretion. *Endocrinology.* **148**, 813-823.
 - 40) Sakamoto T, Mori K, Nakahara K, Miyazato M, Kangawa K, Sameshima H, Murakami N, 2007. Neuromedin S exerts an antidiuretic action in rats. *Biochem Biophys Res Commun.*

- 361**, 457-461.
- 41) Ozaki Y, Onaka T, Nakazato M, Saito J, Kanemoto K, Matsumoto T, Ueta Y, 2002. Centrally administered neuromedin U activates neurosecretion and induction of c-fos messenger ribonucleic acid in the paraventricular and supraoptic nuclei of rat. *Endocrinology*. **143**, 4320-4329.
 - 42) Sakamoto T, Mori K, Miyazato M, Kangawa K, Sameshima H, Nakahara K, Murakami N, 2008. Involvement of neuromedin S in the oxytocin release response to suckling stimulus. *Biochem Biophys Res Commun*. **375**, 49-53.
 - 43) Chu C, Jin Q, Kunitake T, Kato K, Nabekura T, Nakazato M, Kangawa K, Kannan H, 2002. Cardiovascular actions of central neuromedin U in conscious rats. *Regul Pept*. **105**, 29-34.
 - 44) Sakamoto T, Nakahara K, Maruyama K, Katayama T, Mori K, Miyazato M, Kangawa K, Murakami N, 2011. Neuromedin S regulates cardiovascular function through the sympathetic nervous system in mice. *Peptides*. **32**, 1020-1026.