

9249 中枢神経系における情報伝達機構遺伝子発現に対するナトリウムイオンの影響

助成研究者:河田 光博(京都府立医科大学 医学部)

共同研究者:由利 和也(京都府立医科大学)

:森田 規之(京都府立医科大学)

:平川 誠(京都府立医科大学)

生体にとって不可欠なナトリウムイオンは、さまざまな形で内部環境の維持に働いているが、神経系組織に対してどのような遺伝子発現調節を行っているのかについては不明な点が多い。ある特定の遺伝子のスイッチがONされたかどうかを細胞レベルで観察するには、その遺伝子のメッセンジャーRNAが作られたかどうかを調べればよい。中枢神経系にはさまざまな機能を持つ、多様な神経細胞が極めて不均一に分布しているため、脳の特定部位をホモジェネイトし、抽出したmRNAの量的変化を検索するといった生化学的方法よりも、組織構築を保持したままの解剖学的なアプローチがより生理的意味を持つものと思われる。このような観点から、生体内でのナトリウムイオン濃度の変化に伴って中枢神経系内での情報伝達物質、とくにバゾプレッシンやオキシトシンなどの下垂体後葉ホルモンがどのように変動するのか、in situハイブリダイゼーション法と免疫組織細胞化学法を用いて解析した。

バゾプレッシンとオキシトシン抗体を用いた免疫組織細胞化学法によって、脳内にはおもに視索上核と室傍核に細胞体が存在しており、これらから出る突起は視床下部下垂体系を形成して、正中隆起を通過して下垂体後葉に至ることを確認した。

さまざまな配列の合成プローブを作成し、陽性シグナルの分布とそのプローブのシーケンスを比較した。視索上核の背側部はオキシトシンニューロンが、また腹側部にはバゾプレッシンニューロンが局在している。合成プローブ#25を用いた場合には、ハイブリダイゼーション陽性シグナルは視索上核の腹側部に、合成プローブ#27を用いた場合は視索上核の背腹側の全域にわたって認められた。オキシトシンmRNAに対する特異的なプローブを用いると視索上核の背側に、室傍核では周辺部に限極して陽性シグナルが認められた。動物に高張性の食塩水を負荷すると、室傍核や視索上核での神経細胞体内でのバゾプレッシン免疫陽性反応産物は減少した。また下垂体後葉でも同様に神経終末におけるバゾプレッシン免疫陽性反応産物の減少を認めた。一方、in situハイブリダイゼーション法を用いてバゾプレッシンmRNAの動態を観察すると、高張性の食塩水負荷によって、著しいハイブリダイゼーション陽性シグナルの増加が視索上核と室傍核に認められた。

これらの刺激に対して、室傍核や視索上核でのそれぞれの細胞レベルでの反応様態について観察した。各細胞における陽性シグナルの銀粒子数をプロットし、バックグラウンドを差し引いてそれぞれのニューロンにおける増加をヒストグラム上で解析した。浸透圧刺激によって、バゾプレッシンmRNAの産生を増加させるニューロンがほとんどであったが、ある特定のニューロン群は顕著な増加を示さなかった。

免疫組織細胞化学法とin situハイブリダイゼーション法の両者を用いることによって、情報伝達物質のよりダイナミックな動態が明かとなった。つまり、細胞外へ放出されるような情報伝達物質は産生が亢進したとしても、終末部より放出が上回れば産生部位での物質の減少として捉えられることになった。

9249 中枢神経系における情報伝達機構遺伝子発現に対するナトリウムイオンの影響

助成研究者:河田 光博(京都府立医科大学 医学部)

共同研究者:由利 和也(京都府立医科大学)

:森田 規之(京都府立医科大学)

:平川 誠(京都府立医科大学)

研究目的

生体にとって不可欠なナトリウムイオンは、さまざまな形で内部環境の維持に働いているが、神経系組織に対してどのような遺伝子発現調節が行われ、特有の機能発現にいたる蛋白が産生され、情報伝達機構の統御がなされているのかについては不明な点が多い。ある特定の遺伝子のスイッチがONされたかどうかを細胞レベルで観察するには、その遺伝子のメッセンジャーRNAが作られたかどうかを調べればよい。われわれの生体において中心となるべき物質は蛋白である。細胞間情報伝達において直接的にも間接的にも蛋白が作られこそさまざまな機能が発現されている。しかしながら、中枢神経系にはさまざまな機能を持つ、多様な神経細胞が極めて不均一に分布しているため、脳の特定部位をホモジェネイトし、抽出したmRNAの量的変化を検索するといった生化学的方法よりも、組織構築を保持したままの解剖学的なアプローチがより生理的意味を持つものと思われる。このような観点から、生体内でのナトリウムイオン濃度の変化に伴って中枢神経系内での情報伝達物質、とくにバズプレッシンやオキシトシンなどの下垂体後葉ホルモンがどのように産生、輸送、放出されているのかについてホルモンレベルとmRNAレベルの両側面から検討するために、in situハイブリダイゼーション法と免疫組織細胞化学法を用いて解析した。

研究方法

実験動物(ラット)に高張性の食塩水を2週間にわたって与え、血液中のナトリウム濃度を変化させた。特定の時期に動物を灌流固定(4%パラホルムアルデヒド溶液)したのち、脳を摘出し、再び同じ固定液内に浸漬した。凍結切片をクリオスタットを用いて作成し、免疫組織化学法とin situハイブリダイゼーション法を施した。

合成オリゴヌクレオチドの作成:バズプレッシンとオキシトシンのmRNAの配列から両者のホモロジーのもっとも少ない部分を選び出し、コンピュータ解析によってその特異的配列部分を決定した。これらの配列に相補的シーケンスをもつものをそれぞれのmRNA検出のためのプローブとした。合成オリゴヌクレオチドの5'または3'側に放射性同位元素あるいは非放射性同位元素(ジゴキシゲニンなど)を標識した。標識オリゴヌクレオチドと非標識オリゴヌクレオチドはゲル濾過法によって分離した。

in situハイブリダイゼーション法:プレハイブリダイゼーションののち、切片に標識

プローブを作用させ、ハイブリダイゼーションを行った。放射性同位元素で標識したプローブを用いた場合は、オートラジオグラフィ法を施し、生じた銀粒子の存在をコンピュータ画像解析装置によって処理し、その銀粒子数の変化を定量的に解析した。非放射性同位元素を用いて標識されたプローブを用いた場合は、その反応染色濃度を対照例と比較検討した。

免疫組織細胞化学法：それぞれの第一抗体を用いて凍結切片を浮遊のまま浸漬し、アピジンビオチン反応を利用するABC法を施した。なお発色にはジアミノベンチジン溶液を使用した。

研究結果

バゾプレッシンとオキシトシン抗体を用いた免疫組織細胞化学法によって、脳内にはおもに視索上核と室傍核にこれらのホルモンを産生する細胞体が存在しており、これらから出る軸索突起は視床下部下垂体系を形成して、正中隆起を通過して下垂体後葉に至ることを確認した。また、下垂体後葉では、免疫陽性線維は毛細血管に近接して終末していた。バゾプレッシンとオキシトシン陽性ニューロンは視索上核と室傍核に不規則に分布しているのではなく、視索上核の背側にはオキシトシンが、腹側にはバゾプレッシンニューロンが、また室傍核の中心部にはバゾプレッシンが、周辺部にはオキシトシンニューロンが分布していた。。

合成プローブの特異性の確認：さまざまな配列を案出し、それぞれのプローブによるシグナル陽性細胞の分布とそのプローブのシーケンスとを比較した。合成プローブ#25を用いた場合には、ハイブリダイゼーション陽性シグナルは視索上核の腹側部に、合成プローブ#27を用いた場合は視索上核の背腹側の全域にわたって認められた。合成プローブ#25はオキシトシンとバゾプレッシンmRNAの塩基配列がちょうど生理活性をもつペプチドの部分であり、プローブ#27はオキシトシンとバゾプレッシンmRNAの塩基配列が全く同じものの部位である。一方、オキシトシンmRNAに対する特異的なプローブを用いると視索上核の背側に、室傍核では周辺部に限極して陽性シグナルが認められた。またバゾプレッシンmRNAに特異的なシグナルは視索上核の腹側部に、室傍核では中心部に、さらに視交叉上核腹内側部にも認められた。

動物に高張性の食塩水を負荷すると、視床下部の後葉ホルモンの産生部位である室傍核や視索上核でのバゾプレッシン免疫陽性反応産物は減少した。これらの減少はその細胞体において最も強く確認された。また高張性食塩水の負荷によっても、下垂体後葉でも同様にバゾプレッシン免疫陽性反応産物の減少を認めた。一方、in situハイブリダイゼーション法を用いてバゾプレッシンmRNAの動態を観察すると、高張性の食塩水負荷によって、ハイブリダイゼーション陽性シグナルの著しい増加が上記の部位において特異的に認められた。

これらの刺激に対して、室傍核や視索上核でのそれぞれの細胞レベルでの反応様態について観察した。各細胞における陽性シグナルの銀粒子数をプロットし、バックグラウンドを差し引いてそれぞれのニューロンにおける増加をヒストグラム上で解析した。浸透圧刺激によって、バゾプレッシンmRNAの産生を増加させるニューロンがほとんどであったが、ある特定のニューロン群は顕著な増加を示さなかった。

考察

免疫組織細胞化学法とin situハイブリダイゼーション法の両者を用いることによって、情報伝達物質のよりダイナミックな動態が明かとなった。つまり、細胞外へ放出されるような情報伝達物質は産生が亢進したとしても、終末部より放出が上回れば産生部位での物質の減少として捉えられることになる。今回の実験で得られたものは、まさにこの産生と放出のバランスを蛋白とそのmRNAの両者を比べることで、物質の動きが形態学的にとらえられるようになったことであろう。一般的に、神経細胞において細胞外に分泌放出される情報伝達物質は、終末部からの放出がなかば引き金になって産生が高まる訳である。神経細胞の特徴のひとつに多数の突起を有していることが挙げられるが、産生場と放出場が長い突起によって隔てられていることから、このような物質の動きのdiscrepancyが理解されることになる。

ハイブリダイゼーション法における定量的解析については、現在さまざまな試みがなされつつある。プローブの標識に関しては、放射性同位元素を用いる方が非放射性同位元素を用いるものより感度が数倍から数十倍良好であるので、いろいろな制約はあるものの、トリチウムを用いて分解能の優れた標識物質を使用することが定量的解析の成績を向上させると考えられた。細胞レベルでの解析は非常に生物学的意味をもっており、増加や減少といった変化を示す細胞と、変化を示さない細胞があり、これらがどのような意味づけをもつのかさらなる検討が必要であろう。

今後の課題

細胞間質に存在する細胞外液の浸透圧変化がどのような形で細胞膜を介して細胞内に伝わり、細胞内メッセンジャー物質によって特定の遺伝子発現がなされるメカニズムはいまだ不明な点が多い。最近、酵母でのこのような浸透圧感受性シグナルトランスダクションに関与する遺伝子がクローニングされた。これとあいまって、バゾプレッシン感受性水チャンネルのクローニングも相次いでなされるようになった。今後はこれらの遺伝子発現と浸透圧変化の相関性に基づいた研究の展開が必要となった。

参考文献

1. Kawata, M., Yuri, K., Kato, E., and Kumamoto, K.: Semi-quantitative analysis of mRNAs of in situ hybridization histochemistry with the use of oligonucleotide probe. *J. Clin. Microscopy* 25, 336-337, 1992.
2. 河田光博, 森田規之, 熊本賢三, 由利和也: オリゴヌクレオチドプローブを用いた in situ hybridization. *病理と臨床*, 10, 581-584, 1992
3. 河田光博: 脳の形態学的研究の進歩 -In situ hybridization- *日本医学会総会誌* [1], 294-295, 1992
4. 河田光博, 佐野豊: 自律神経系の形態と機能、自律神経疾患、基礎と臨床 宇尾野公義、入来正躬編. 金原出版、16-26、1992
5. 河田光博: 古典的染色法からin situハイブリダイゼーション組織化学法へ -機能形態学の変遷. *Proceedings of Clinical Electron Microscopy* 14, 7-12, 1992
6. Ison, A., Yuri, K., Ueta, Y., Leng, G., Koizumi, Ko., Yamashita, H., and Kawata, M. : Vasopressin and oxytocin-immunoreactive hypothalamic neurons of inbred polydipsic mice. *Brain Res. Bull.* 31, 405-414, 1993

学会発表

1. Koizumi, K., Zeballos, Kawata, M., Kannan, H., and Yamashita, H. : The hypothalamic vasopressinergic neurons of the inbred polydipsic mice. *The Neurohypophysis: A Window on Brain Function* (Hanover, New Hampshire) 1992. 7. 16. - 7. 20.
2. 武呂誠司, 深田順一, 村上典彦, 福島光夫, 小林宏正, 戎井 理, 瀬川 一, 中井義勝, 河田光博, 井村裕夫: LPS投与下におけるラット脳内c-Fosの発現. 第65回日本内分泌学会総会 (徳島) 1992. 5. 29.
3. 小笠貴司, 景山甚郷, 太田善介, 末丸修三, 橋本浩三, 河田光博: ラット下垂体前葉細胞におけるバゾプレッシンmRNAの検出及び絶水または絶食の及ぼす影響. 第65回日本内分泌学会総会 (徳島) 1992. 5. 30.
4. 河田光博: 古典的染色法からin situ ハイブリダイゼーション組織細胞化学法へ-機能形態学の変遷. 第31回東北大学医学部臨床超微形態懇話会 (仙台) 1992. 7. 1.
5. 河田光博: mRNAの動態-画像解析による半定量化への試み [in situ ハイブリダイゼーション 1992] 第24回日本臨床電子顕微鏡学会総会 (岡山) 1992. 9.17.

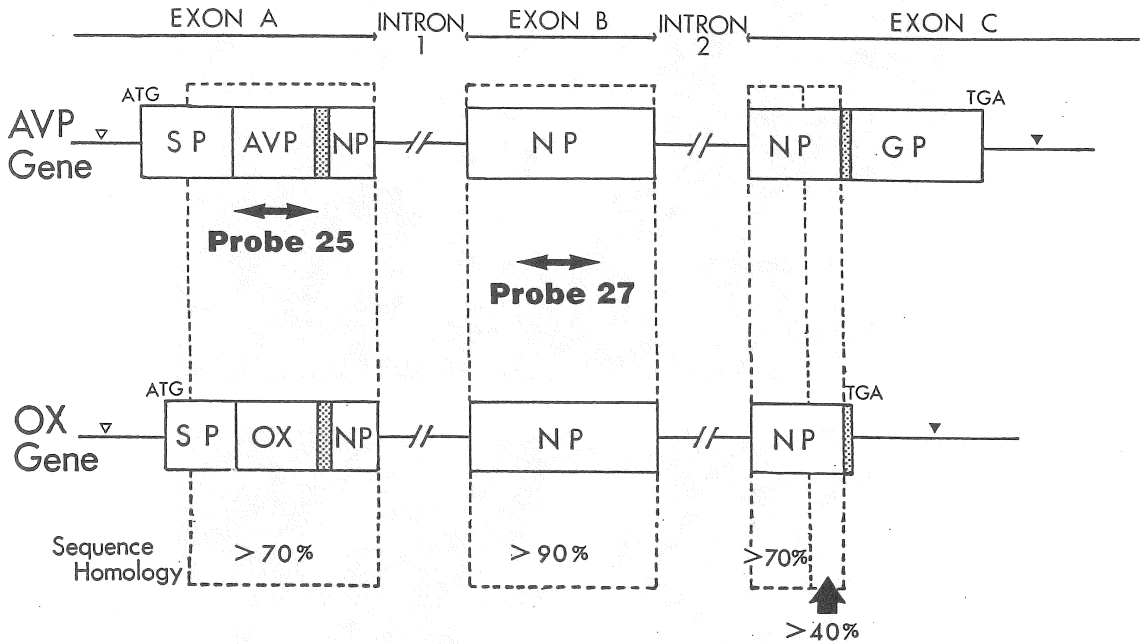


図1.バゾプレッシンとオキシトシンのmRNAの核酸構成図。各%は核酸の相同性を示す。プローブ#25はバゾプレッシンとオキシトシンのノナペプチドにおけるバゾプレッシンmRNAに対するものである。プローブ#27はバゾプレッシンとオキシトシンのニューロフィジンに対するもので、両者に100%相同なものである。

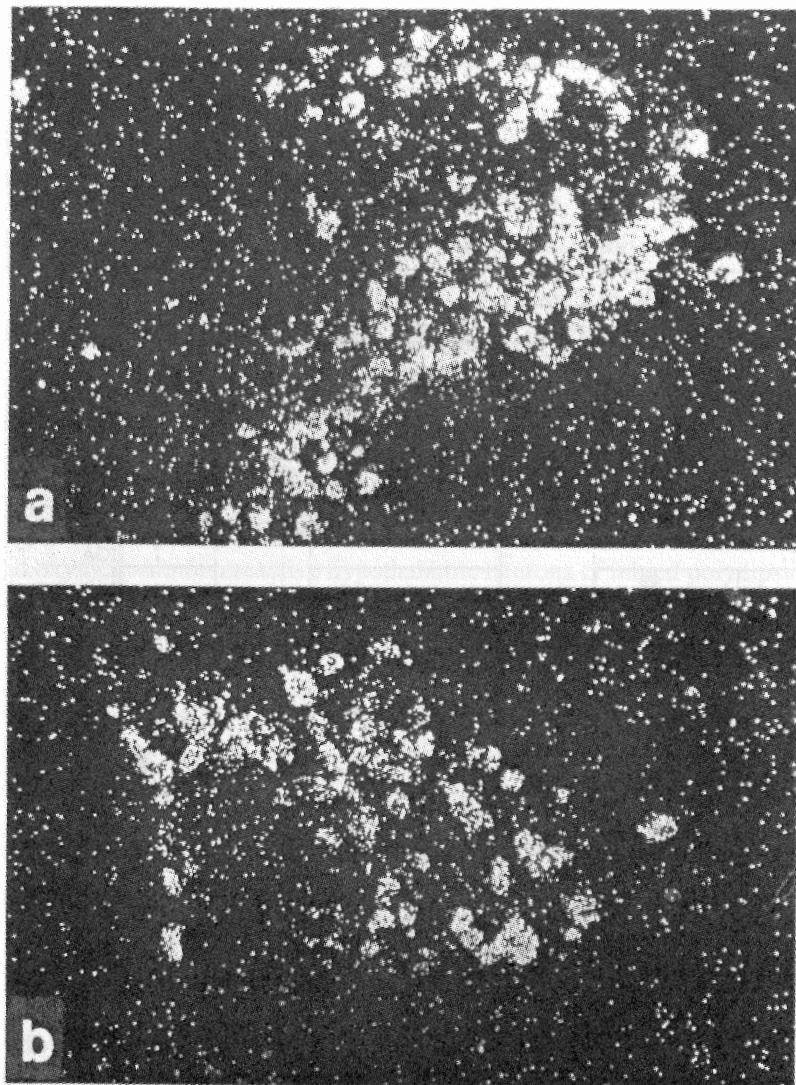


図2. オキシトシンmRNAの分布を示す。室傍核 (a) では核の周辺部に、視索上核 (b) ではその背側部に陽性シグナルが認められる。トリチウム標識プローブを使用。暗視野像。

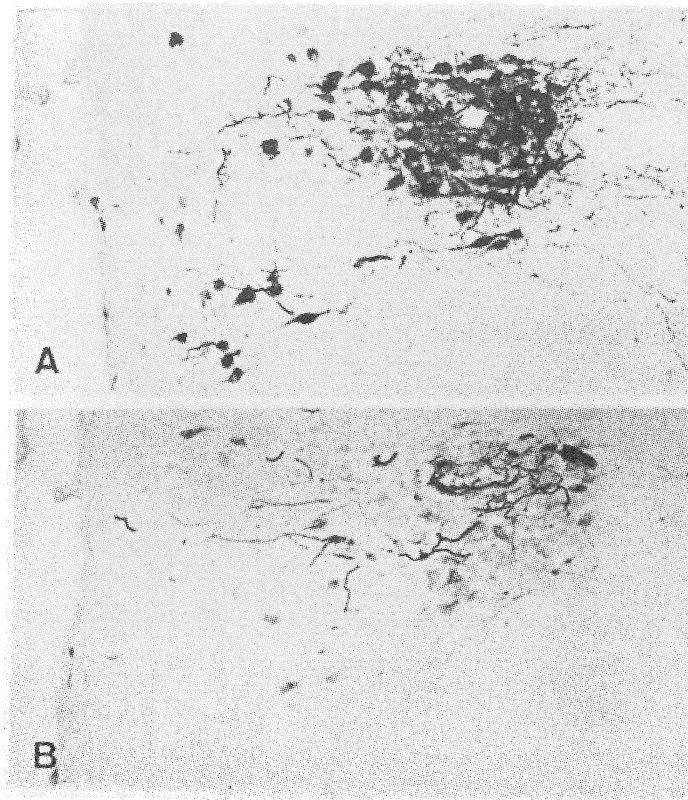


図3.高張性の食塩水を負荷した動物でのバゾプレッシン免疫陽性物質の変化。上の図(A)は対照例の室傍核。下の図(B)は食塩水負荷のもの。細胞体での免疫陽性物質の著しい減少が認められる。

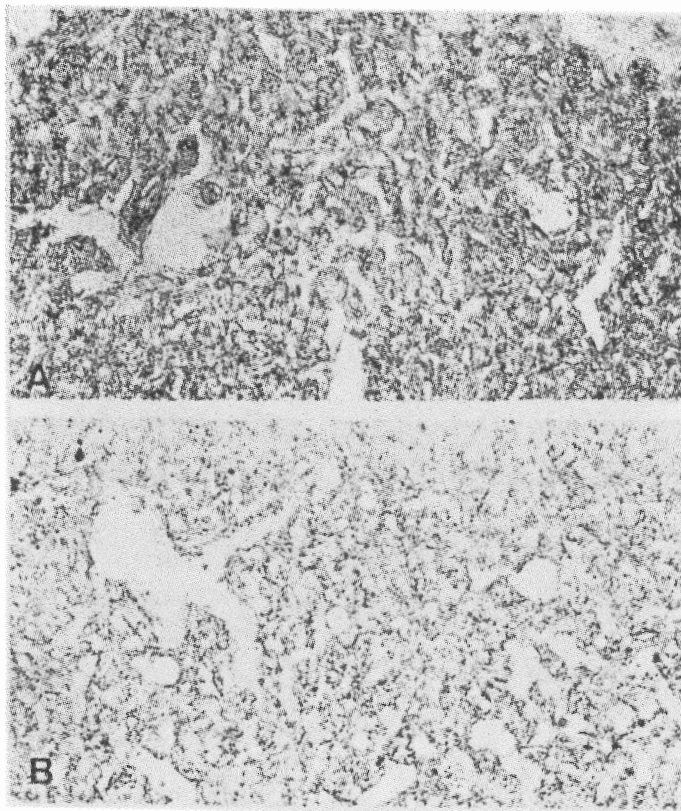


図4.高張性の食塩水を負荷した動物でのバゾプレッシン免疫陽性物質の変化。上の図(A)は対照例の下垂体後葉。下の図(B)は高張性食塩水を負荷したもの。神経終末でのバゾプレッシン免疫陽性物質の明瞭な減少が認められる。

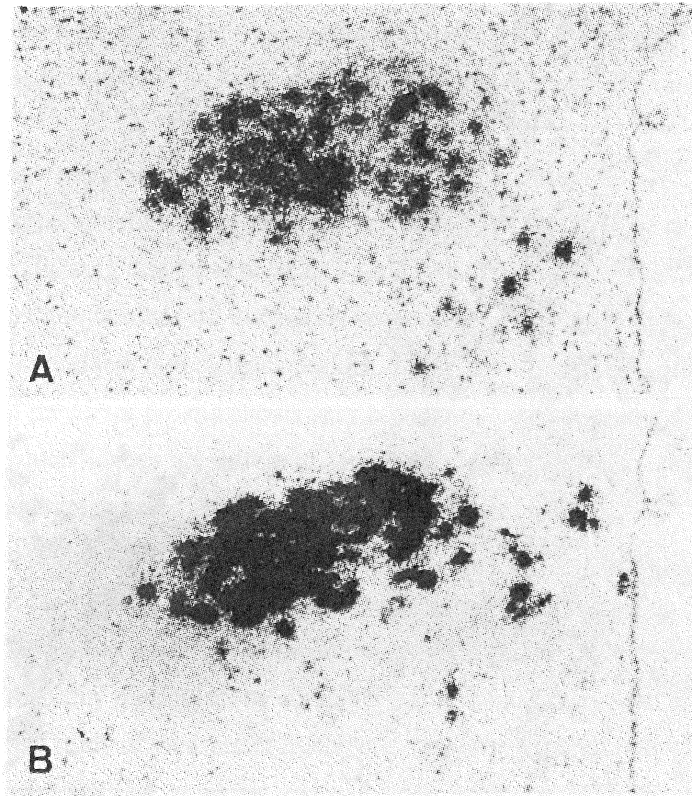


図5.高張性の食塩水を負荷した動物でのバゾプレッシンmRNAの変化。上の図(A)は対照例の室傍核。下の図(B)は食塩水負荷のもの。細胞体での著しいバゾプレッシンmRNAの増加が認められる。 ^{35}S 標識プローブを使用。

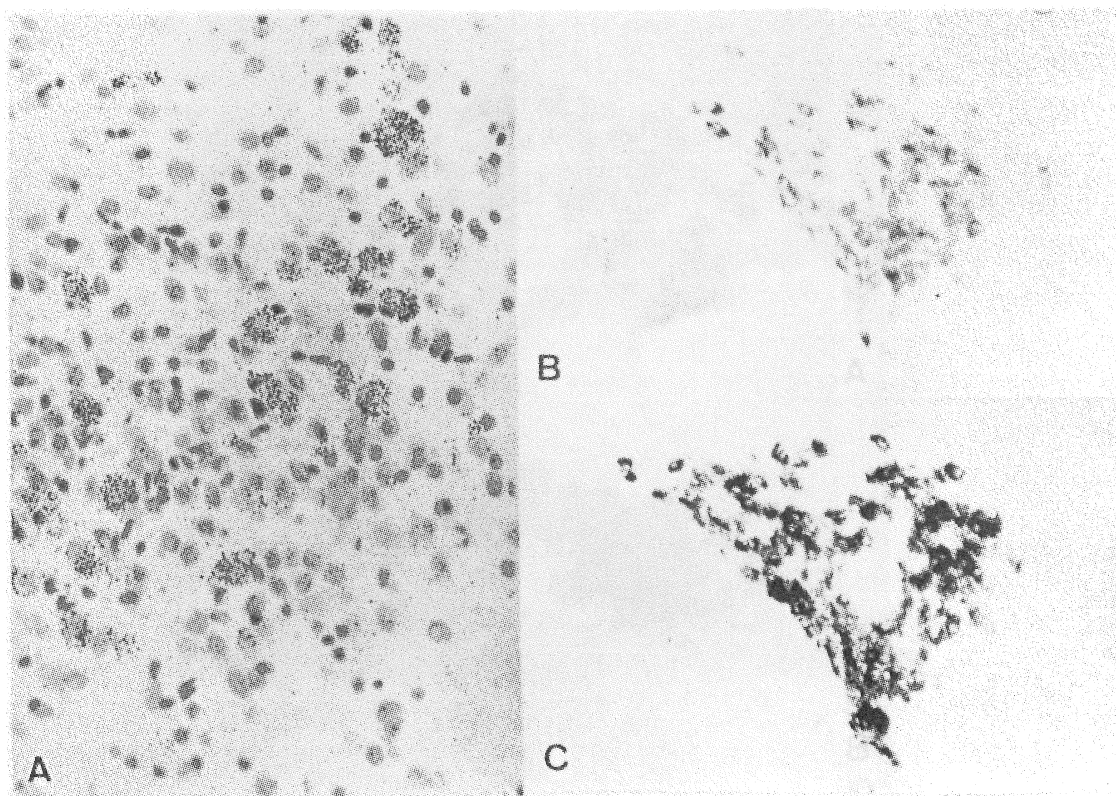


図6.トリチウム標識のオキシトシンプローブによる室傍核でのmRNA陽性シグナルの明視野像 (A)。右上図(B)は対照例での視索上核でのバゾプレッシンmRNAの局在をジゴキシゲニン標識プローブで観察したもの。右下図(C)は高張性食塩水を負荷したもの。アルカリフォスファターゼ陽性反応の著しい増加が認められる。

The Effect of Sodium Ion on the Gene Expression of Biochemical Messengers in the Central Nervous System

Mitsuhiro Kawata

Kyoto Prefectural University of Medicine, Department of Anatomy

Summary

The effect of sodium ion on the gene expression of biochemical messengers in the central nervous system was investigated by using the in situ hybridization and immunocytochemical methods.

Choice of targets and design of the probe for in situ hybridization:

Many functional and structural proteins in the cell have been shown to be categorized as subsets of a superfamily, indicating that these proteins would be originated from certain prototype proteins. This means that in these families the nucleotide sequence of the genes is composed of high homologous regions and low homologous regions. In the case of oxytocin and vasopressin genes, a central portion of precursor protein shows very high homology between them. In our experience, 30mer probes, in which 4 bases are different, specifically hybridized with each mRNA, showing that a well- designed probe could detect selected target sites of mRNA.

Labeling of the probe and analysis of the data:

Usual labeling of the oligonucleotide probe is undertaken by tailing of the 3' end with an isotope or an enzyme substrate. Once labeled, the specificity of the probe might decrease. Therefore one has to check the specificity once again by computer-assisted homology search after labeling. For the semi- quantitative study of measure of mRNAs in response to certain physiological and pharmacological manipulations, graphical and statistical analyses could guarantee the most reliable data processing of the hybridization signals overlying the cell.

Salt-loaded experiment :

2% salt was applied to rats and the effect of such high salt challenge on the immunoreactivity and mRNA of vasopressin and oxytocin in the hypothalamus was analyzed. In the hypothalamus and posterior pituitary the immunoreactivity of vasopressin of salt-loaded animals was significantly decreased. On the other hand such manipulation did cause the increase of mRNA of vasopressin in the supraoptic and paraventricular nuclei.

In conclusion, the dynamic of biochemical messengers should be analyzed from the points of immunological and hybridizational view, because these techniques detect different molecules in the cells.