

## 9333 培養神経細胞に対するNaチャンネルの発現とその形態形成に対する役割

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)

森本 昌史(京都府立医科大学)

興奮性細胞である神経細胞と筋細胞は、機能面においても形態面においても高度に分化した細胞である。これらの細胞は、細胞外液からのナトリウムイオンをナトリウムチャンネルを介して取り込み、活動電位を発生し興奮を伝搬させる。中枢神経系での高度な情報処理機構は、個々の神経細胞が持つ神経突起と神経突起の複雑な結合様相によってもたらされ、神経細胞に特有の形状が回路形成の基本的モジュールを形成していることは言うまでもない。本研究では、神経細胞を培養し、ナトリウムチャンネル蛋白の発現を抑さえることによってどのような細胞形態に変化が生じるのか組織細胞化学的に研究することを目的とした。

アンチセンスオリゴヌクレオチドの培養ニューロン系に対する影響をみるために、まずアンチセンスオリゴヌクレオチドの投与方法などのパラメーターについて検討をおこなった。オリゴヌクレオチドとしては、細胞学的検索に適している細胞骨格タンパクであるタウ、MAP-2、また情報伝達物質であるバゾプレッシンを用いた。また、ナトリウムチャンネル蛋白については、その $\alpha$ サブユニットのメッセンジャーRNAに対するオリゴヌクレオチドを作成した。これらのアンチセンスオリゴヌクレオチドの作成にあたっては、いずれもmRNAのイニシエーションコドンを含む領域の20-25merのものを使用した。タウ、MAP-2蛋白に対するアンチセンスオリゴマーの投与は容量依存的に、多くのニューロンの突起伸長を抑える結果となった。すなわち、元来そのニューロンの保持している形態が、細胞骨格蛋白に対するアンチセンスオリゴマーの投与によって失われ、ニューロンは突起を持たない、おおむね球状または楕円形の細胞形態を示した。一方、これらの処理によっても、ニューロン固有が持っている情報伝達物質および関連酵素の発現には変化がなかった。対照として、センスオリゴヌクレオチドの投与によっても、ニューロンの形態、伝達物質の発現はまったく変化は認められなかった。ナトリウムチャンネル蛋白の $\alpha$ サブユニットのメッセンジャーRNAに対するオリゴヌクレオチドを投与したが、少なくとも細胞形態、情報伝達物質および関連酵素の発現には変化がなかった。

神経細胞の形態、とくにどのような突起をどこへ伸ばすのかという解剖学的問題は神経結合様相、ならびに回路系連絡の基本的問題にほかならない。今回、アンチセンス法を用いて、合成蛋白発現の阻止を試み、それぞれに固有の蛋白がどのような神経細胞の形態に深く関わっているのか検索した。その結果、細胞骨格に対する蛋白は神経細胞の形状にきわめて重要な働きを有していることがわかった。しかし、ナトリウムチャンネル蛋白の発現は、基本的には少なくとも培養条件下での形態形成にはあまり影響がないことが判明した。しかしながら、この実験系は外来性の神経インプットを除外した環境下であり、電気活動が最も深く関与するナトリウムチャンネルには、さらに活動電位を発するような条件の設定が必要となった。



## 9333 培養神経細胞に対するNaチャンネルの発現とその形態形成に対する役割

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)

森本 昌史(京都府立医科大学)

## 研究目的

興奮性細胞である神経細胞と筋細胞は、機能面においても形態面においても高度に分化した細胞である。これらの細胞は、細胞外液からのナトリウムイオンをナトリウムチャンネルを介して取り込み、活動電位を発生し興奮を伝搬させる。近年、パッチクランプ法の導入によってイオンチャンネルの解析やその興奮伝導のメカニズムの研究が急速に進展しているが、イオンチャンネルの形態形成に及ぼす影響についてはほとんどなされていないのが現状である。中枢神経系での高度な情報処理機構は、個々の神経細胞が持つ神経突起と神経突起の複雑な結合様相によってもたらされ、神経細胞に特有の形状が回路形成の基本的モジュールを形成していることは言うまでもない。本研究では、神経細胞を培養し、ナトリウムチャンネル蛋白の発現がどのような培養環境のもとにどのような細胞突起に生じるのか組織細胞化学的に研究することを目的とした。神経系の細胞の培養実験は、この神経細胞の特徴とされる突起形成過程を直視でき、神経機能解明の基本的戦略としてきわめて有用な系であり、神経科学領域のなかでその重要性は増す一方である。本実験は、塩の生理作用、とくに神経系に対するナトリウムイオンの役割をそのチャンネル機構から明らかにするものである。

## 研究方法

アンチセンスオリゴヌクレオチドの培養ニューロン系に対する影響をみるために、まずアンチセンスオリゴヌクレオチドの投与方法などのパラメーターについて検討をおこなった。オリゴヌクレオチドとしては、細胞学的検索に適している細胞骨格タンパクであるタウ、情報伝達物質産生の酵素であるチロシン水酸化酵素 (TH) を用いた。また、ナトリウムチャンネル蛋白については、その $\alpha$ サブユニットのメッセンジャーRNAに対するオリゴヌクレオチドを作成した。これらのアンチセンス

オリゴヌクレオチドの作成にあたっては、いずれもmRNAのイニシエーションコドンを含む領域の20-25merのものを使用した。

SD系ラット胎生17日目および生後1日目の視床下部、海馬、脊髄神経節、副腎髄質の分散培養を行った。妊娠17日目のラットをエーテル麻酔下に胎仔を摘出し、あるいは生後1日目のラットは低体温麻酔下に脳を取りだし、実体顕微鏡下に視床下部、海馬、脊髄神経節、副腎髄質を摘出した。氷冷ハンクス液中にて細切した後、0.25%トリプシン、0.02%DNase溶液中にて37度15分間の処理を行い、牛胎仔血清を添加後800rpmにて遠沈し、上清を除去し、2mlの培養液を添加後、口径0.5mmのパスツールピペットにて機械的に細胞を分散させた。さらに、1100rpmにて5分間遠沈し、上清を除去し、培養液を2ml添加後、血球計算盤を用いて密度を計測した。細胞はポリエチレンイミン(1mg/ml)にてコートした、直径10mmの培養用カバーガラスに $5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>の密度にて播種した。培養の維持にはイーグルMEM(フェノールレッド不含)に10%牛胎仔血清を添加したものをを用い37度、5%CO<sub>2</sub>の条件下で培養した。牛胎仔血清はステロイドを除去するため、0.05%デキストランおよび0.5%活性炭を添加し、30分間静置した後、3000rpmにて遠沈し濾過滅菌したものをを用いた。更に1から数時間後、カバースリップを清潔な摂子等で取り出し、滅菌した濾紙でメディウムを除去した後、適当な濃度でアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む無血清のメディウムをカバースリップあたり50mlかけた。その後、12から24時間毎にメディウムを交換し、目的とする蛋白の合成を十分に阻害しうる期間培養を続行、形態の観察などした後、固定し、免疫組織化学法等で、阻害した蛋白の発現がないことを確認した。またアンチセンスオリゴヌクレオチドによる阻害は一般的には可逆的であるとされており、メディウムをアンチセンスを含まないものにすると、細胞の形態や蛋白の発現等は元に戻るかどうかを確認した。

培養細胞は培養後1、3、5および7日目に4%パラホルムアルデヒド、0.12Mショ糖溶液にて30分間固定し、免疫組織化学法を施行した。

## 研究結果

タウ蛋白に対するアンチセンスオリゴマーの投与は容量依存的に、多くのニューロンの突起伸長を抑える結果となった。すなわち、元来そのニューロンの保持している形態が、タウ蛋白に対するアンチセンスオリゴマーの投与によって失われ、ニューロンは突起を持たない、おおむね球状または楕円形の細胞形態を示した (Fig. A)。一方、これらの処理によっても、ニューロン固有が持っている情報伝達物質および関連酵素の発現には変化がなかった (Fig. B)。対照として、センスオリゴヌクレオチドの投与によっても、ニューロンの形態、伝達物質の発現はまったく変化は認められなかった。ナトリウムチャンネル蛋白の $\alpha$ サブユニットのメッセンジャーR

NAに対するオリゴヌクレオチドを投与したが、少なくとも細胞形態、情報伝達物質および関連酵素の発現には変化がなかった (Fig. C)。

### 考察

神経細胞の形態、とくにどのような突起をどこへ伸ばすのかという解剖学的問題は神経結合様相、ならびに回路系連絡の基本的問題にはかならない。今回、アンチセンス法を用いて、合成蛋白発現の阻止を試み、それぞれに固有の蛋白がどのような神経細胞の形態に深く関わっているのか検索した。その結果、細胞骨格に対する蛋白は神経細胞の形状にきわめて重要な働きを有していることがわかった。しかし、ナトリウムチャンネル蛋白に発現は、基本的には少なくとも培養条件下ではあまり影響がないことが判明した。

### 今後の課題

培養という特殊な環境下では、細胞形態が生体のものと同じであるのかどうかは、長い論議が繰り返されてきた。しかし、一般的にはその基本となる形態は培養条件下でも保持されているのが多くの研究で明らかにされてきている。今回の研究では、ナトリウムチャンネル蛋白に発現は、基本的には少なくとも培養条件下ではあまり影響がないことが判明したが、これらは外来性の神経インプットを除外した環境下であり、電気活動が最も深く関与するナトリウムチャンネルには、さらに活動電位を発するような条件の設定が必要となってきた。

### 文献

Y. Matsumoto, T. Tanabe, S. Ueda and M. Kawata : Immunohistochemical and enzyme-histochemical studies of peptidergic, aminergic and cholinergic innervation of the lacrimal gland of the monkey (*Macaca fuscata*). *J. Auto. Nerv. Syst.*, 37, 207-214 (1992)

M. Hirakawa, J.T. McCabe, and M. Kawata : Time-related changes in the labeling pattern of motor and sensory neurons innervating the gastrocnemius muscle, as revealed by the retrograde transport of the cholera toxin B subunit. *Cell Tissue Res*, 267, 419-427 (1992)

Y. Matsumoto, S. Ueda, and M. Kawata : Morphological characterization and distribution of indoleamine-accumulating cells in the rat retina. *Acta Histochem. Cytochem*, 25, 45-51 (1992)

K. Yuri and M. Kawata : Semi-quantitative analysis of the effects of estrogen on CGRP-

and methionine-enkephalin-immunoreactivity in the periventricular preoptic nucleus and the medial preoptic area of female rats. *Brain Res.*, 578, 282-288 (1992)

K. Yuri and M. Kawata : Nuclear localization of estrogen receptor--receptor-immunoreactivity and its reduction by intraventricular colchicine treatment in the preoptic area of female rat. *Neurosci. Lett.* 142;135-138 (1992)

M. Hirakawa and M.Kawata : Changes of chemoarchitectural organization of the rat spinal cord following ventral and dorsal root transection. *J. Comp. Neurol.*, 320, 339-352 (1992)

K. Kumamoto, S. Ebara, T. Matsuura, and M.Kawata : Distribution of oxytocin and vasopressin neurons in the diencephalon of the Japanese horseshoe bat, *Rhinolophus ferrumequinum*. *Acta Anatomica (Basel)*, 144, 80-92 (1992)

Y. Matsumoto, S.Ueda, and M. Kawata : Development of peptide- and tyrosine hydroxylase-containing neurons in the fetal spinal cord transplanted into the anterior chamber of the eye of adult rats. *Dev. Brain Res.*, 69, 153-165 (1992)

平川 誠, 河田光博 : 末梢神経切断による脊髄の形態学的変化 —MAP 2 免疫組織化学法による画像解析— *解剖誌*, 67, 44-48, 1992

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

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

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

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

Ueda, S., Matsumoto, Y., Azmitia, E.C., and Kawata, M.: Intraocular co-grafts of fetal

dorsal raphe nucleus and suprachiasmatic nucleus. *Brain Res.*, 605, 181-186, 1993

河田光博、森本昌史、由利和也、森田規之：合成DNAによる細胞内mRNAの同定と発現阻止、*組織細胞化学*1993, pp76-85

河田光博、上田秀一：下垂体の分子細胞化学、*日本臨床*51, 2530-2535,1993

Koizumi, K., Zeballos, M., Kawata, M., Kannan, H., and Yamashita, H.: The hypothalamic vasopressinergic neurons of inbred polydipsic mouse. *Ann. New York Acad. Sci.*, 689, 612-615, 1993.

Kawata, M.: An application of in situ hybridization and antisense oligonucleotide method to visualize and manipulate gene expression of specific proteins in the nervous system. *Chin. J. Histochem. Cytochem.*, vol 2 Suppl., 69-70, 1993.

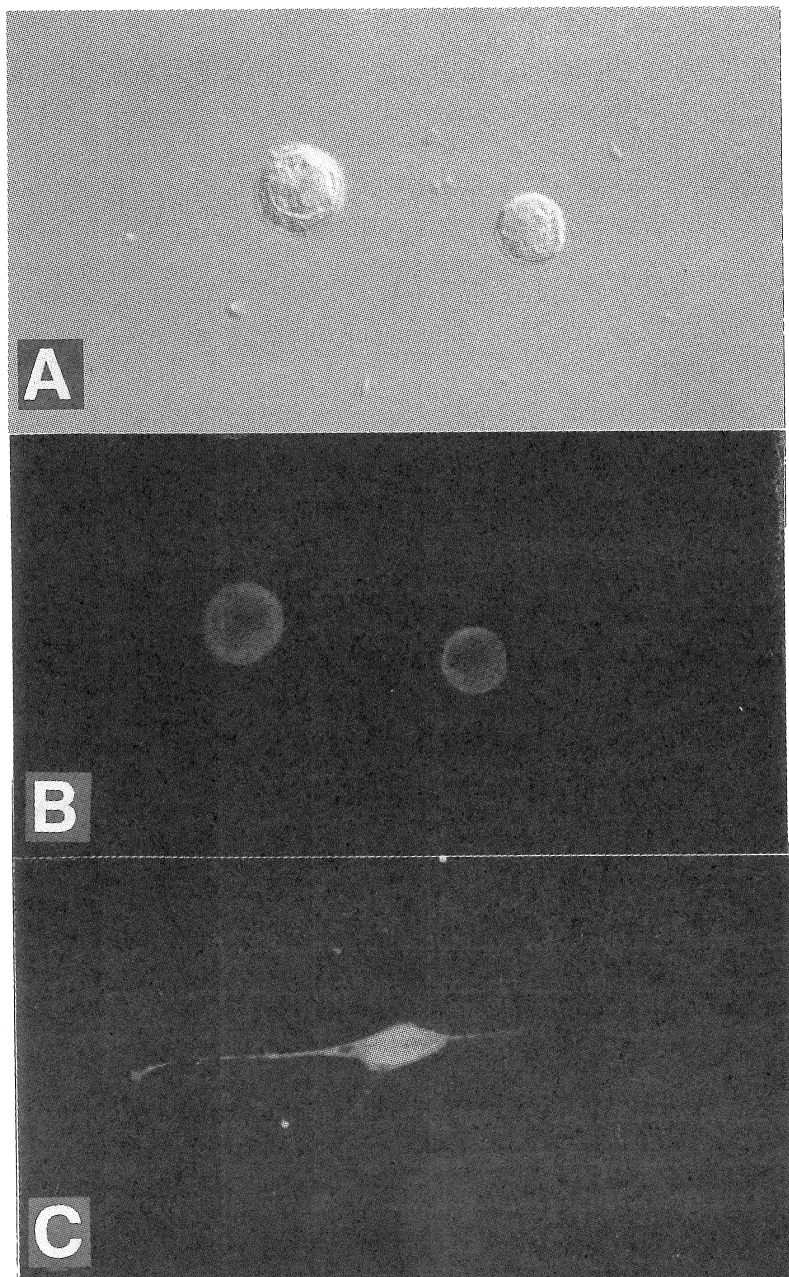
Yuri, K. and Kawata, M.: Time-course analysis of changes in calcitonin gene-related peptide- and methionine-enkephalin-immunoreactivity in the female rat preoptic area after estrogen treatment. *Neuroscience* 55, 1067-1074, 1993.

高橋謙治、熊本賢三、久保俊一、河田光博：ジゴキシゲニン標識DNAプローブを用いたin situハイブリダイゼーション法、*細胞*、25,466-469, 1993

Kawata, M., Yuri, K., Morita, N., and Morimoto, M.: Steroid hormone effect on the neuronal configuration-in vivo and in vitro studies. In *Neuronal Cytoskeleton* (ed. by Hirokawa, N.) pp193-203, JSSP, CRC Press, Tokyo, 1993

Hirakawa, M. and Kawata, M.: Distribution pattern of c-fos expression induced by sciatic nerve sectioning in the rat central nervous system. *J. Hirnforsch.*,34, 433-446, 1993

河田光博、由利和也、森田規之：ホルモンの標的組織としての視床下部 内分泌学の進歩、11,44-51, 1993



図の説明

Fig. A: Dissociated neurons treated by antisense oligonucleotide for the mRNA of MAP-2 (microtubules-associated protein-2). Neurons lost cellular processes.

Fig. B: The above neurons still expressed vasopressin-immunoreactivity in their cytoplasm.

Fig. C: Dissociated neuron treated by antisense oligonucleotide for the mRNA of  $\alpha$  subunit of sodium channel protein. Neuron showed vasopressin-immunoreactivity with several distinct processes.



## The role of sodium channel protein for the involvement of cytological features of dissociated neurons

Mitsuhiro Kawata, and

Kazunari Yuri, Noriyuki Morita, Masafumi Morimoto

Kyoto Prefectural University of Medicine, Department of Anatomy

### Summary

The present study was undertaken to investigate the role of sodium channel protein for the maintenance of cytological features of dissociated neurons. Application of antisense oligonucleotides for cytoskeletal proteins, such as microtubules-associated protein (MAPs) and tau into the culture medium induced significant process retraction of neurons, while these neurons still expressed neuropeptide phenotypes, vasopressin or oxytocin. On the contrary, an addition of antisense oligonucleotide for  $\alpha$  subunit of sodium channel protein into the culture medium did not cause any morphological changes of dissociated neurons.

These findings suggested that neuronal shape is determined mainly by cytoskeletal proteins and at least in part sodium channel is not necessary for the maintenance of cytological features in vitro environment.