

9542 中枢神経系におけるミネラルコルチコイド受容体の発現とその機能的意義

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：森田 規之（京都府立医科大学）

横山 佳子（京都府立医科大学）

森本 昌史（京都府立医科大学）

ミネラルコルチコイドの中枢神経系における作用機構を解明するために、ミネラルコルチコイド受容体蛋白を大腸菌に大量に作らせ、抗体を作成し、受容体蛋白の発現を免疫組織化学、in situ ハイブリダイゼーション法を用いて時間・空間的に追求することを最終目的とした。また、ミネラルコルチコイド受容体とグルココルチコイド受容体の違いを検討し、あわせて両者の生理的役割分担を考察した。

グルココルチコイド受容体蛋白質の生成：グルココルチコイド受容体cDNAを含んだ6RGRベクターから制限酵素で切り出し、5'側の転写調節ドメインを含む断片をpGEX-3Xベクターに組み込ませた。このプラスミッドベクターによってトランスフォームされた大腸菌を培養した。IPTGによって融合蛋白質を特異的に発現誘導させた。グルタチオンセファロース上で融合蛋白質からグルココルチコイド受容体のみを切り出した。

グルココルチコイド受容体抗体の作成：このグルココルチコイド受容体蛋白質を抗原としてNZWウサギを免疫した。抗血清の特異性を調べるために、成熟ラットの脳および肝臓のホモジェネートをイムノプロット法を行った。また、成熟ラットの脳の凍結切片を作成し、免疫組織化学法を行った。

グルココルチコイド受容体mRNAの局在の観察：ラットグルココルチコイド受容体の5'側を切り出し、pGEM-4のマルチクローニングサイトに組み込ませ、大腸菌にトランスフォームさせたのち、インビトロトランスクリプション法を行った。これによってフルオレセイン11UTPが組み込まれたRNAプローブができ、これに対する特異抗体を用いて免疫組織化学法を行った。

ミネラルコルチコイド受容体蛋白質の生成：ラットのミネラルコルチコイド受容体のNターミナルドメインをコードするcDNA領域をpGEX-3Xに組み込み、大腸菌に導入した。IPTGによって発現を誘導して得たミネラルコルチコイド受容体とGSTの融合蛋白質を精製し、ミネラルコルチコイド受容体の部分を切り出した。

ミネラルコルチコイド受容体抗体の作成：ミネラルコルチコイド受容体を抗原としてNZWウサギを免疫した。抗血清の特異性を調べるために、成熟ラットの脳のホモジェネートをイムノプロット法を行った。また、成熟ラットの脳の凍結切片を作成し、免疫組織化学法を行った。抗血清はイムノプロット法では1000倍、免疫組織化学法では10000倍希釈で行った。

ラットの脳および肝臓のホモジェネートを用いてイムノプロット法を行うと、97kDa領域に一本のバンドが認められた。グルココルチコイド受容体特異抗体を用いて免疫組織化学法を施し、陽性細胞の局在を確認した。

ミネラルコルチコイド受容体とGST融合蛋白質はグルココルチコイド受容体と同様にPTGを添加することによって、その発現が認められた。

9542 中枢神経系におけるミネラルコルチコイド受容体の発現とその機能的意義

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：森田 規之 (京都府立医科大学)

横山 佳子 (京都府立医科大学)

森本 昌史 (京都府立医科大学)

研究目的

脳がステロイドホルモンの標的器官として多様な作用を受けていることはよく知られている。近年、ステロイド受容体の分子構造が解明され、脳におけるステロイド研究は新たな局面を迎え、ステロイド作用は特異的な受容体を介してDNAと結合し、転写活性調節に大きく関わっていることが明らかにされている。

副腎皮質ホルモンはグルココルチコイドとミネラルコルチコイドの2種類がある。グルココルチコイドは糖質コルチコイドとも呼ばれるように蛋白や脂質を分解して血糖値をあげ、その結果細胞内での糖新生やグリコーゲンの生成に関与している。人ではコルチゾールであるが、齧歯類ではコルチコステロンが主なグルココルチコイドである。デキサメサゾン合成のグルココルチコイドであり、コルチゾールやコルチコステロンの30倍の作用を有する。グルココルチコイドは副腎皮質の束状帯、網状帯から分泌される。ミネラルコルチコイド主たるものはアルドステロンである。ミネラルコルチコイドはその名が示すように細胞外液の電解質を調節するホルモンであり、副腎皮質の球状帯から分泌される。ミネラルコルチコイドは腎臓の遠位尿細管に働きナトリウムの再吸収とカリウム水素イオンの排出を行う。その結果血圧上昇となる。

本研究課題では、電解質調節を担うミネラルコルチコイドの中枢神経系における作用機構を解明するために、ミネラルコルチコイド受容体蛋白を大腸菌に大量に作らせ、各ドメイン別のプローブと抗体を作成し、脳の発達過程と成熟期においてさまざまなレセプター蛋白のアイソフォームの発現を免疫組織化学、ハイブリダイゼーション法を用いて時間・空間的に追求することを最終目的とした。また、ミネラルコルチコイド受容体とグルココルチコイド受容体の違いを検討し、あわせて両者の生理的役割分担を考察した。

研究方法

グルココルチコイド受容体蛋白質の生成：

ラット肝臓からのグルココルチコイド受容体cDNAを含んだ6RGRベクター (Yamamoto博士より供与) からSalI-HindIIIの制限酵素で切り出し、5'側の転写調節ドメインを含む断片 (525bp) をpGEX-3Xベクターに組み込ませた。このベクターはグル

タチオンSトランスフェラーゼ（GST）を含んでおり、グルココルチコイド受容体との融合蛋白質を発現させるものである。このプラスミッドベクターによってトランスフォームされた大腸菌DH5 α を培養した。IPTGによって融合蛋白質を特異的に発現誘導させた。グルタチオンセファロース上でファクターXaを用いて融合蛋白質からグルココルチコイド受容体のみを切り出した。このグルココルチコイド受容体蛋白質のアミノ酸配列はシーケンサーで確認した。

グルココルチコイド受容体抗体の作成

このグルココルチコイド受容体蛋白質を抗原としてNZWウサギを免疫した。抗血清の特異性を調べるために、成熟ラットの脳および肝臓のホモジェネートをイムノブロット法を行った。また、成熟ラットの脳の凍結切片を作成し、免疫組織化学法を行った。抗血清はイムノブロット法では1000倍、免疫組織化学法では10000倍希釈で行った。

グルココルチコイド受容体mRNAの局在の観察：

ラットグルココルチコイド受容体の5'側500bpを切り出し、プラスミッドpGEM-4のマルチクローニングサイトに組み込ませ、大腸菌にトランスフォームさせたのち、SP6RNAポリメラーゼまたはT7RNAポリメラーゼによるインビトロトランスクリプション法を行った。これによってフルオレセイン11UTPが組み込まれたRNAプローブができ、これに対する特異抗体を用いて免疫組織化学法を行った。

ミネラルコルチコイド受容体蛋白質の生成：

ラットのミネラルコルチコイド受容体のNターミナルドメインをコードするcDNA領域を発現ベクターpGEX-3X（4900bp）に組み込み、大腸菌のDH5a株に導入した。IPTGによって発現を誘導して得たミネラルコルチコイド受容体とGSTの融合蛋白質をGST精製モジュールを用いて精製し、グルタチオンセファロース上でファクターXa処理してミネラルコルチコイド受容体の部分を切り出した。

ミネラルコルチコイド受容体抗体の作成：

ミネラルコルチコイド受容体を抗原としてNZWウサギを免疫した。抗血清の特異性を調べるために、成熟ラットの脳のホモジェネートをイムノブロット法を行った。また、成熟ラットの脳の凍結切片を作成し、免疫組織化学法を行った。抗血清はイムノブロット法では1000倍、免疫組織化学法では10000倍希釈で行った。

研究結果と考察

グルココルチコイド受容体が組み込まれた大腸菌ではIPTGを添加することによって、融合蛋白質が発現が認められた。特異的発現を示しているバンドは約50kDaであったファクターXaで切り出すとグルココルチコイド受容体の24kDa領域に一本のバンドが得られた。ラットの脳および肝臓のホモジェネートを用いてイムノブロット法を行うと、97kDa領域に一本のバンドが認められた。免疫前血清ではなにも認められなかった。

特異抗体を用いて免疫組織化学法を施した。免疫陽性細胞は脳の至る所に認められた。アフィニティカラムで吸収した抗血清では陽性細胞が認められず、この抗体の特異性が切片上でも確認された。また免疫反応は細胞の核に局限していることが電子顕微鏡的に

確認された。

in situ ハイブリダイゼーション法によってグルコルチコイド受容体mRNAの分布を検討した。脳のほぼすべての領域においてシグナルが認められた。これらの結果は免疫組織化学法の結果と同じであった。しかし、海馬CA3-4、視索上核ではハイブリダイゼーションシグナルは認められるのに対して、免疫陽性細胞は認められなかった。

ミネラルコルチコイド受容体とGST融合蛋白質はグルコルチコイド受容体と同様にPTGを添加することによって、その発現が認められた。

ラットのミネラルコルチコイド受容体cDNA断片が組み込まれた大腸菌において、IPTG添加した条件で培養すると融合蛋白質の発現が認められた。GST融合蛋白質として目的とする蛋白質を大腸菌に大量に産生させる方法は、可溶化しやすく精製も容易であり、今日多くのタンパク質の精製に用いられている。

グルコルチコイド受容体（タイプII型）はデキサメサゾンと強い親和性を持ち、コルチコステロンにはミネラルコルチコイド受容体に比べると10倍程弱い親和性を持つ。ミネラルコルチコイド受容体はコルチコステロンやアルドステロンに対して高い親和性を持つ。齧歯類では朝にコルチコステロンが低値であり、したがってこの時期にはミネラルコルチコイド受容体はコルチコステロンと結合して活性化されているが、グルコルチコイド受容体は結合しておらず活性化もされていない。日内変動でコルチコステロンが高値を示す時期あるいはストレス環境下にあるときにはミネラルコルチコイド受容体はコルチコステロンと結合して活性化され、かつグルコルチコイド受容体はコルチコステロンと結合して活性化される。

以上から、ミネラルコルチコイド受容体の局在を検索する上では、必ずグルコルチコイド受容体との比較検討をおこなっておく必要がある。

今後の課題

今後これらの抗体やプローブを用いて免疫細胞化学法、in situ ハイブリダイゼーション法によって、ラット胎性期、新生時期、成熟時での脳組織を検索し、どの時期のどの部位にどのような蛋白ならびにmRNAが発現しているのか詳細に観察し、さらに、高張性食塩水負荷を行い、蛋白ならびにmRNAの発現様相の変化を解析する予定である。

また、c-fos, c-jun 転写調節因子mRNAに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドを合成し、胎性期、新生時期、成熟期の脳実質内に投与し、どのような組織発育を呈するのか、またレセプター蛋白の発現とどのような関わりを持つのか検討したいと考えている。

文献

Ueda S., Matsumoto Y., Nishimura A., Azmitia E.C. and Kawata M.:
Role of neuropeptide Y projection on the development of serotonergic innervation in the suprachiasmatic nucleus of the rat, shown by triple intraocular grafts.
Brain Res., 673, 325-330, 1995

Ueta, Y., Yamashita, H., Kawata, M. and Koizumi, K.:

Water deprivation induces regional expression of c-fos protein in the brain of inbred polydipsic mice.

Brain Res., 677, 221-228, 1995

Kumamoto, K., Matsuura, T., Amagai, T. and Kawata, M. :

Oxytocin-producing and vasopressin-producing eosinophils in the mouse spleen: immunohistochemical, immuno-electron-microscopic and in situ hybridization studies.

Cell Tissue Res., 281, 1-10, 1995

Nishimura, A., Ueda, S., Takeuchi, Y., Sawada, T. and Kawata, M. :

Age-related decrease of serotonergic fibres and S-100b immunoreactivity in the rat dentate gyrus.

NeuroReport, 6, 1317-1320, 1995

Kawata, M.:

Glucocorticoid and apoptosis in the hippocampus.

J. UOEH, 17, 308-309, 1995

Kawata, M. and Kumamoto, K.:

Visualization and manipulation of gene expressions of vasopressin and oxytocin in brains and peripheral organs.

Recent Progress of Vasopressin and Oxytocin Research (Saito, T., Kurokawa, K. and Yoshida, S. eds) Elsevier, pp. 67-76, 1995

Kawata, M.:

Roles of steroid hormones and their receptors in structural organization in the nervous system. Neurosci. Res., 24, 1-46, 1995

Pasterkamp, R.J., Yuri, K., Visser, D.T.M., Hayashi, S. and Kawata, M.:

The perinatal ontogeny of estrogen receptor-immunoreactivity in the developing male and female rat hypothalamus. Dev Brain Res., 91, 300-303, 1996

Hu, Z., Yuri, K., Ichikawa, T., and Kawata, M. : Exposure of postnatal rats to glucocorticoids suppresses the development of choline acetyltransferase-immunoreactive neurons: role of adrenal steroids in the development of forebrain cholinergic neurons. J. Chem. Neuroanat., 10, 1-10, 1996

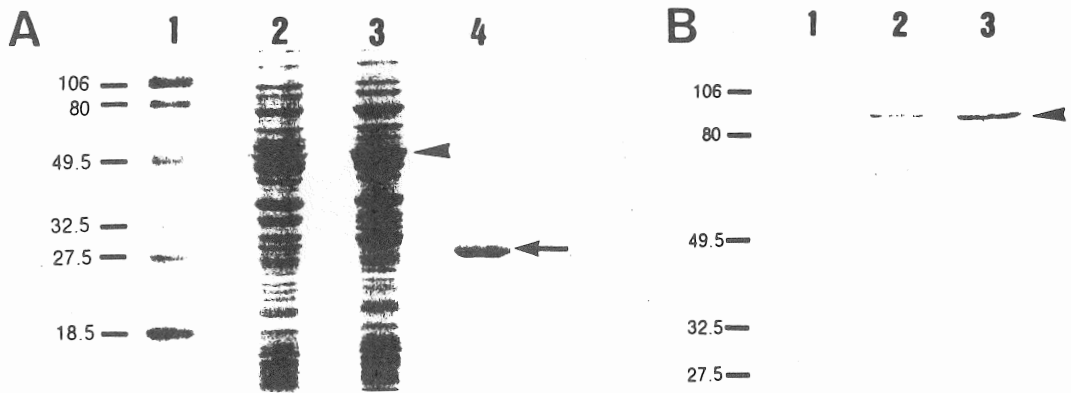


Fig. 1 A: Induction of the GST fusion protein by IPTG and isolation of the synthetic GR protein. Molecular weight marker (lane 1), total protein of *E. coli* treated with (lane 3) or without (lane 2) IPTG and the synthetic GR protein after purification (lane 4) were electrophoresed and stained with Coomassie brilliant blue. The fusion protein (*arrowhead*) appeared after IPTG induction, and the synthetic GR protein was detected as a single band (*arrow*). Molecular masses are indicated in kDa.

B: Immunoblotting for the homogenate of rat brain and liver tissues.

Proteins were transferred to a PVDF membrane and immunostained with the antiserum (diluted 1:1,000) and the preimmune serum (diluted 1:1,000). The antiserum revealed a single band (*arrowhead*) with a molecular weight identical to rat glucocorticoid receptor in both the brain homogenate (lane 2) and the liver homogenate (lane 3). The preimmune serum detected no specific protein bands in the brain homogenate (lane 1). Molecular masses are indicated in kDa.

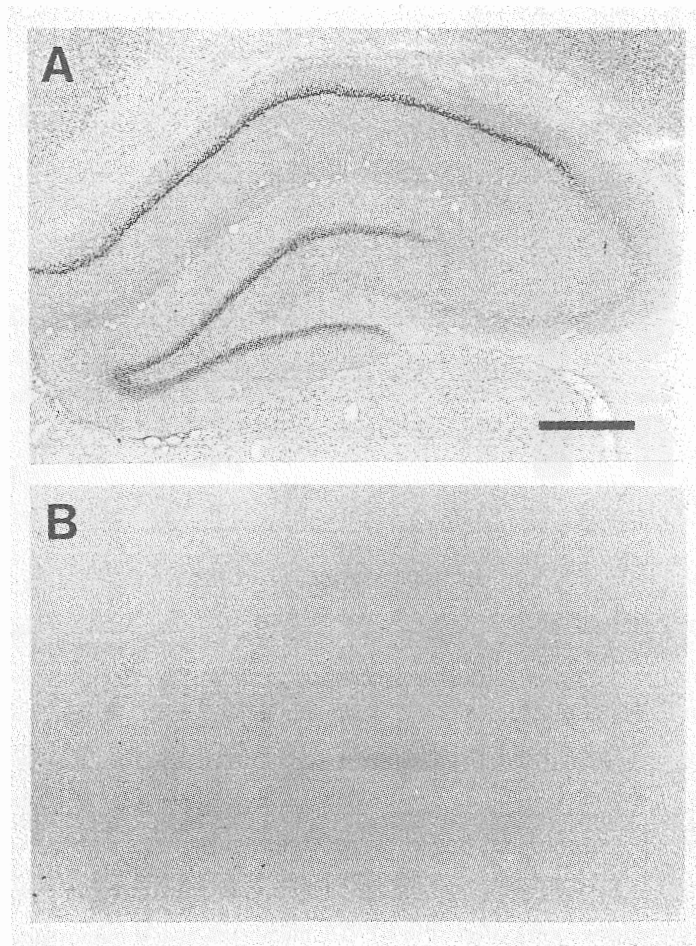


Fig. 2 Photomicrographs showing the specificity of the antibody. Immunohistochemistry with the antiserum (diluted 1:8,000) showed clear GR immunoreactivity without background (A), and the absorbed antiserum showed no specific staining (B) in the hippocampus. Bar = 500 μ m.

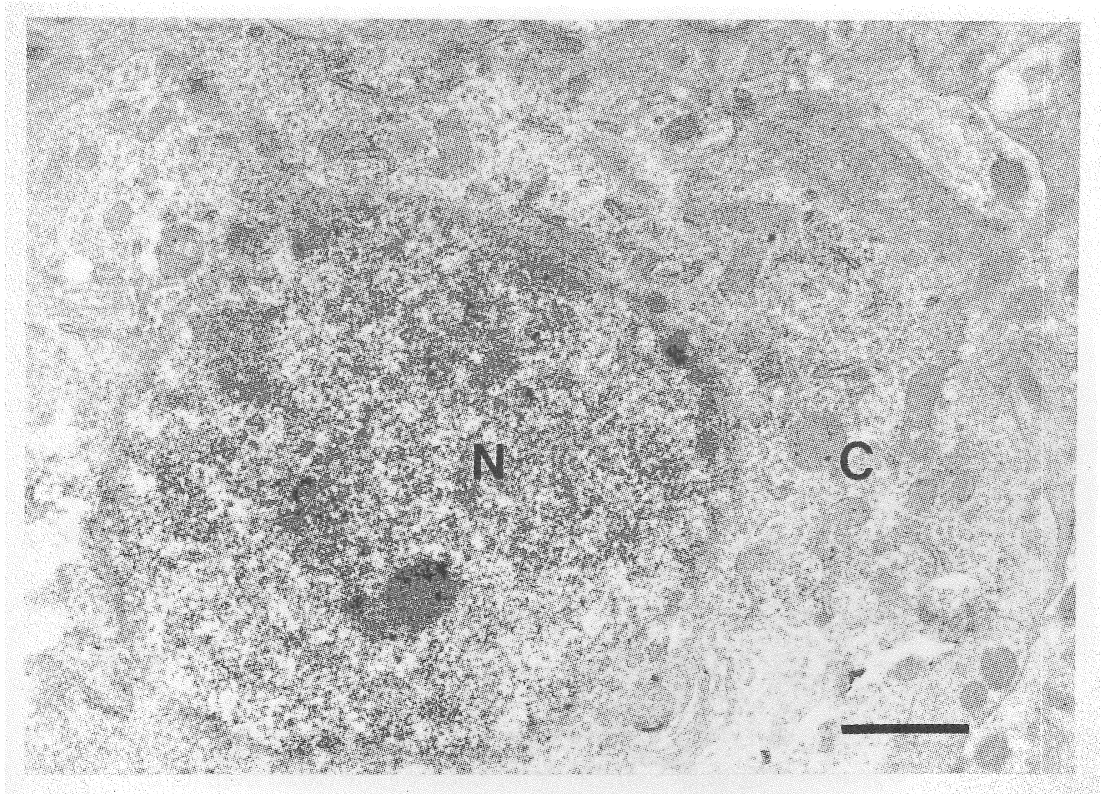


Fig. 3 Electron micrograph showing the localization of GR immunoreactivity in the nucleus. Pyramidal cell in the CA1 layer of the hippocampal formation. C, cytoplasm; N, nucleus. Bar = 1 μ m.

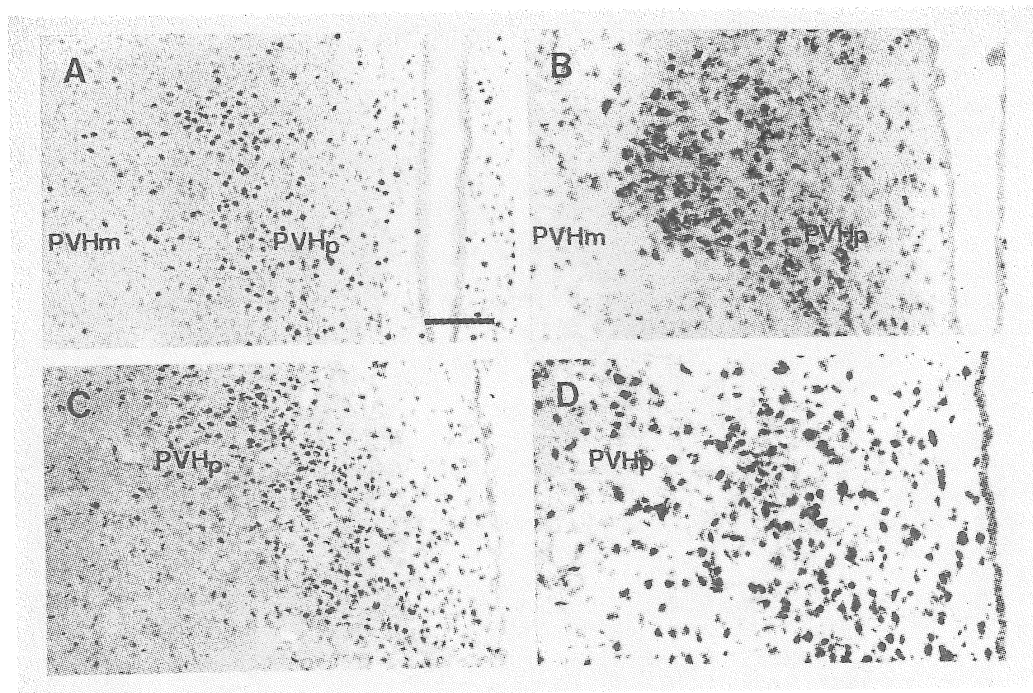


Fig. 4 Photomicrographs of GR immunoreactivity (A, C) and GR mRNA expression (B, D) at the rostral levels (A, B) and the mid-caudal levels (C, D) in the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVH). The parvocellular division (PVHp) showed high densities of GR-immunoreactive and mRNA-containing cells, while the magnocellular division (PVHm) had no GR-immunoreactivities but a small number of GR mRNA-containing cells. Bar = 100 μ m.

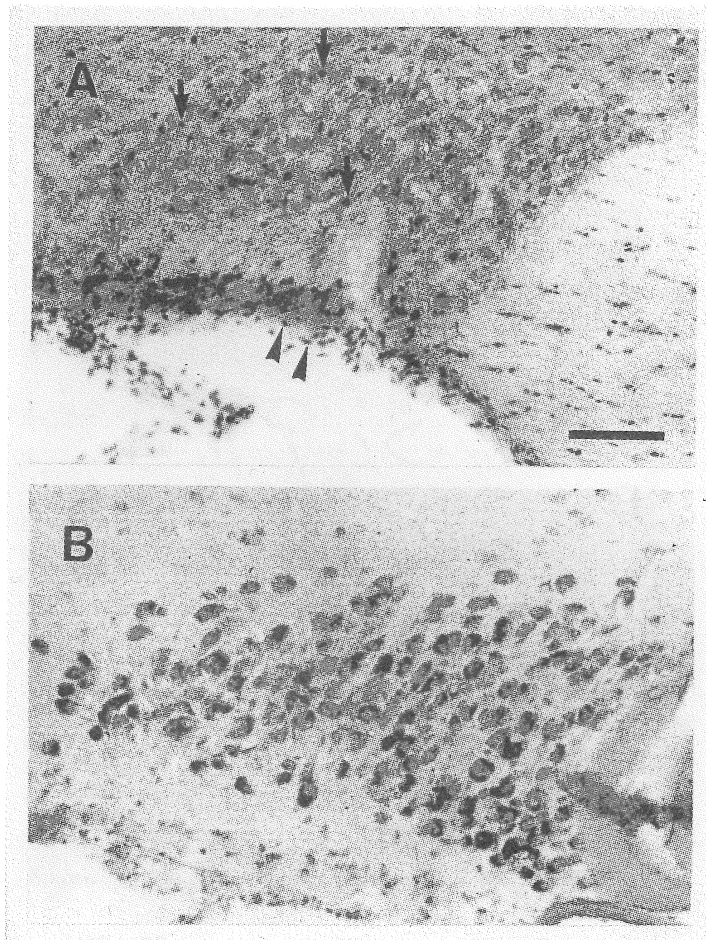


Fig. 5 Photomicrographs of GR immunoreactivity (A) and GR mRNA expression (B) in the supraoptic nucleus (SO). A moderate density of GR-immunoreactive cells was found and the weak immunoreactivity was predominantly localized in the cytoplasm. Strongly immunoreactive and small-sized cells (*arrow*, thought to be glial cells; *arrowhead*, pial cells) were observed. A large number of mRNA-containing cells were present in the supraoptic nucleus (SO). Bar = 100 μ m.

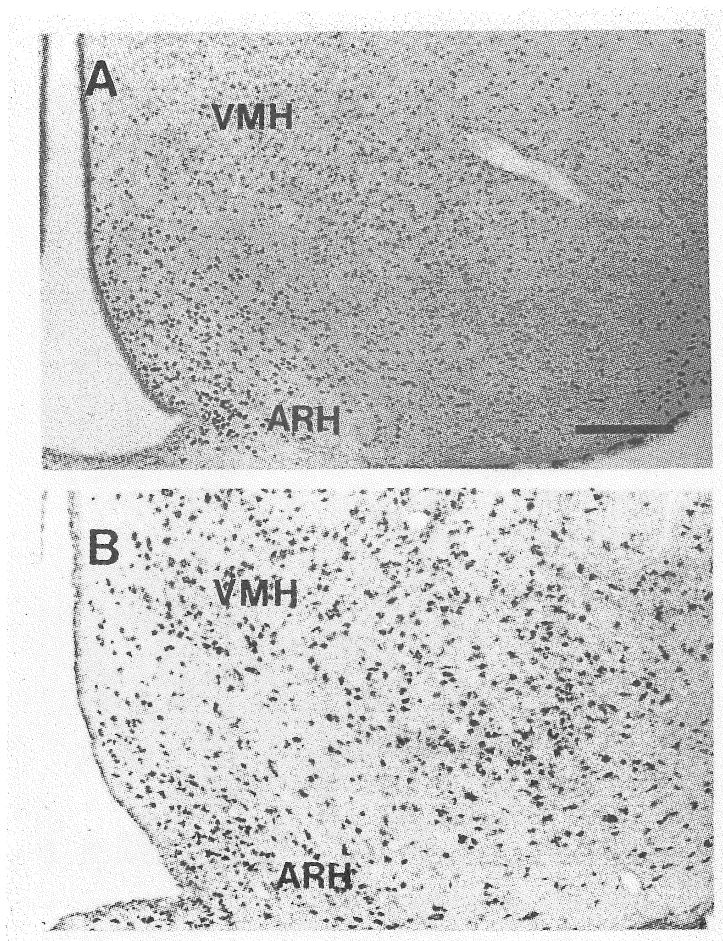


Fig. 6 Photomicrographs of GR immunoreactivity (A) and GR mRNA expression (B) in the arcuate nucleus (ARH) and ventromedial nucleus of the hypothalamus (VMH). Both nuclei had a large number of GR-immunoreactive and mRNA-containing cells. The nuclear GR immunoreactivity observed in the ARH was very strong, but that in the VMH was moderate. Bar = 200 μ m.

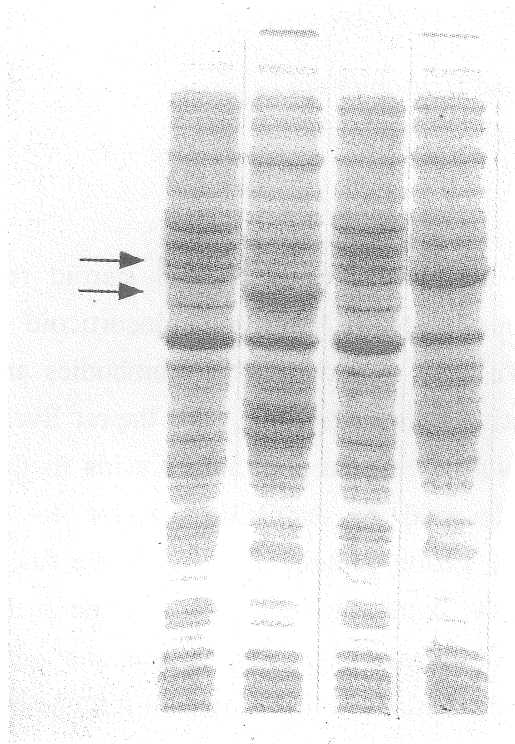


Fig. 7 Induction of GST fusion protein and isolation of the synthetic mineralocorticoid receptor. Fusion proteins (arrows) appeared after IPTG induction.

Mineralocorticoid receptor in the central nervous system

Mitsuhiro Kawata, Noriyuki Morita, Keiko Yokoyama and Masafumi Morimoto

Department of Anatomy and Neurobiology
Kyoto Prefectural University of Medicine

Summary

It was shown that there are two types of adrenal steroid receptors in the mammalian central nervous system(CNS): mineralocorticoid receptor and glucocorticoid receptor. We tried to produce both antibodies and examine the distribution of immunoreactive cells in the CNS. First the rat liver glucocorticoid receptor cDNA fragment which encodes 173 amino acids in the transcription modulation domain was inserted to the pGEX vector to express a rat glucocorticoid receptor-GST fusion protein in E.coli. The fusion protein was induced by IPTG specifically. After the purification of the fusion protein, the receptor protein domain was cleaved out. By immunizing with the purified protein, a polyclonal antibody was raised in a rabbit. In immunoblot analysis with the use of rat liver and brain homogenates, a single band of Mr 97kDa, the size deduced from the rat glucocorticoid receptor was detected by this antibody. In the hybridization study, fluorescein-labeled RNA probes, complementary to about 500 base pairs coding the 5' untranslated region and a part of transcription modulation domain in the rat glucocorticoid receptor cDNA were used. The expression of glucocorticoid receptor mRNA was detected in the cytoplasm and immunoreactivity was predominantly in the nucleus. The distributional pattern of mRNA in many regions of the rat brain was correlated with the distribution of immunoreactivity, but in the hippocampus and supraoptic nucleus of the hypothalamus different localization was found. Rat mineralocorticoid receptor cDNA fragment was also inserted to the pGEX vector. The fusion protein was induced by IPTG. We are now underway to produce specific antibody for mineralocorticoid receptor.