

9641 ミネラルコルチコイド受容体の神経細胞の生存と可塑性に対する作用機構

助成研究者：河田 光博(京都府立医科大学 第一解剖学教室)
 共同研究者：小澤 一史(京都府立医科大学 第一解剖学教室)
 森田 規之(京都府立医科大学 第一解剖学教室)
 横山 佳子(京都府立医科大学 第一解剖学教室)
 伊藤 隆雄(京都府立医科大学 第一解剖学教室)

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。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樞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。

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。

ミネラルコルチコイド受容体mRNAの分布の検討：

ラットミネラル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mRNAは主に海馬に多く認められた。とくにCA1, CA2の錐体細胞層に限局して分布していた。免疫組織化学法を用いても同様の所見が得られた。一方、グルココルチコイド受容体mRNAや免疫反応は同じ細胞層に認められ、共存していることが示唆されたが、グルココルチコイド受容体はミネラルコルチコイド受容体に比べてより広範な範囲に分布していた。これらの領域は生後も神経細胞が産生されている部位であり、ミネラルコルチコイドが神経細胞の生存や可塑性に深く関わっていることを示している。

9641 ミネラルコルチコイド受容体の神経細胞の生存と可塑性に対する作用機構

助成研究者：河田 光博(京都府立医科大学 第一解剖学教室)
共同研究者：小澤 一史(京都府立医科大学 第一解剖学教室)
森田 規之(京都府立医科大学 第一解剖学教室)
横山 佳子(京都府立医科大学 第一解剖学教室)
伊藤 隆雄(京都府立医科大学 第一解剖学教室)

研究目的

電解質調節を担うミネラルコルチコイドは核内受容体と結合してその生理作用が発揮されるが、近年、神経細胞の生存や可塑性に大きく関わっていることが示されてきている。本研究課題では、ミネラルコルチコイド受容体に対する抗体による免疫組織細胞化学法と、in situ ハイブリダイゼーション法を用いて、浸透圧変化やストレス負荷に伴う受容体蛋白の発現様態を細胞生物学的に解析し、ミネラルコルチコイド受容体を持つ神経細胞が時間・空間的にどのような形態変化を示すのか追究する。また、グルココルチコイド受容体抗体による免疫組織細胞化学法、in situ ハイブリダイゼーション法を用いて、神経系におけるミネラルコルチコイド受容体の発現調節機構とグルココルチコイド受容体との相関性について考察し、電解質の脳機能に対する作用を明らかにした。

研究方法

ミネラルコルチコイド受容体抗体の作製：

MRcDNAから一部の領域を選び、大腸菌でその遺伝子産物を大量に発現させ(GST Gene Fusion system)、得られたタンパク(可溶化されたもの)を抗原として用い、ウサギに免疫した。

本実験では、MRcDNAの中で、転写調節ドメインの制限酵素PstI-PstI;PPフラグメント(Seq.Pos.571-976:405bp)によって切り出されるDNAを用いた。

発現ベクターとしてpGEX-3Xを用い、挿入するDNA断片がインフレームになることを確認した。pGEX-3XベクターはSmaI切断(平滑末端; Blunt Ends)し、ライゲーション反応の時に自らつながらないようにフォスファターゼ処理をした。

PPフラグメントはともに接着末端(Sticky ends)であるため、ブランチング処理を行い平滑末端にした後、リン酸化処理をした。

リン酸化後のPPフラグメントのcDNAを1.5%アガロースゲル電気泳動で半定量的に調べた。pGEXベクター1(モル比)に対し、挿入フラグメントを3~10の割合でライゲーションを行い、大腸菌にトランスフォームした。コンピテントセルはHB101を使用した。

目的の遺伝子が導入されているか検査するため、無作為的にコロニーを選び、少量の培地中で個別に培養した(miniprep)。それぞれプラスミドDNAを抽出し、制限酵素

で切断し電気泳動によって調べた。目的遺伝子が組み込まれていれば、pGEX-3X 4900bp + PP fragment 405bp = 5300bpが検出できることになる。

Insert fragmentの数を調べた。EcoRI, BamHIにより切断し、Insert DNAには EcoRI, BamHI 認識部位はなく、insertの前後にしかない。Insertされていれば、DNA PAGEで (400+a)bpのバンドが検出されることになる。

Insert fragmentの方向を調べた。NcoI, BamHIにより切断し、正しい方向でInsertされていれば、(213+a)bpのバンドが検出されることになる。逆方向の時、(192+a)bpのバンドが検出される。

目的遺伝子が正しく組み込まれたベクターをリトランスフォームする。コンピテントセルは、DH5 α を使用した。DH5 α の方が一般に蛋白質の誘導がよいとされているからである。

少量の培養を行い、大腸菌からの導入タンパク抽出の条件を検討した。それぞれの結果はSDS PAGEにより確認した。

IPTG inductionによる Fusion Proteinの発現を確認した。目的タンパクは、GSTと融合タンパクを形成する。分子量は、GST 26K, PP 16K。コンピテントセルをHB101で行ったときについても調べ、タンパクの誘導がDH5 α の方がよいこともここで確認した。

Sonication bufferの検討も行った。Sonication bufferとして 1% Triton X-100 in PBS, 1% Triton X-100, 0.1% Sarcosyl in PBS, 1% Triton X-100, 0.5% Sarcosyl in PBS の三種類を用い、どの Buffer を用いても抽出できることを確認した。あまり大きな差がなかったため今後、1% Triton X-100 使用することとした。

Sonication の回数、G-Sepharose beads 吸着後のwashの回数、Beadsからの目的タンパクの単離 (Factor Xa digestion)に用いるBufferの検討を行った。

Sonication buffer.....1% Triton X-100 in PBS

Sonication.....0.5 sec ON/0.5 sec OFF \times 300 times

G-Sepharose wash.....3 times

Cleavage buffer.....1% Triton X-100 in Cleavage buffer

500ml 培養 (IPTG 0.1mM, Factor Xa 3hrs/5hrs) を行い、15% SDS PAGEにより収率を確認した。反応時間における差はそれほどなかった。(total 50mg/500ml culture)

1L 培養で同様に収率を確認した。(total 200mg/1 L)

第一回免疫を行う前 (3週間程度) に、採血 (耳介動脈から) を行い、正常血清を得た。

免疫には通常、50mg \sim 100mg/animalの抗原を用いた。本実験では、約100mg/animalのタンパクを使用した。アジュバンドは、complete型を用いタンパクと同量混ぜ、エマルジョンを作成した。ウサギ一羽あたり1mlぐらい用意した。

ウサギの背の毛をバリカンで刈り上げ、アルコールで消毒後、約0.05mlずつ皮内注射した (20箇所以上)。

一カ月後に第二回免疫を行った。免疫を行う一週間前に採血 (第一回採血)、抗体価をイムノブロットにより調べた。大腸菌より抽出したタンパク (抗原タンパク)

をSDS PAGEにより泳動後エレクトロブロットイングによりPVDF膜に転写した。その後ABC法、またはPAP法により染色した。一次抗体として、正常血清、及び血清(第一回採血)を100,500,1000倍で用いた。三羽すべてで免疫反応が起こっていることを確認(1000倍では三羽ともバンドは検出されなかった)した。二回目の免疫は筋注した。両後肢に0.5mlずつ、アジュバンドはincompleteを用いた。

約一月後に第三回免疫を行った。免疫を行う前に採血(第二回採血)、抗体価をイムノブロットにより調べた。一次抗体として、正常血清を500倍、血清(第二回採血)を100,500,1000倍で行った。前回とほとんど変化が見られなかった。三回目の免疫は皮下注した。0.1mlずつ背中に10箇所程度でアジュバンドはincompleteを用いた。

約一週間後に第三回採血(大量採血)。一羽あたり60ml。抗体価をイムノブロットにより調べた。一次抗体として、正常血清を500倍、血清を500,1000倍で行った。三羽すべてで抗体価が上がっていることを確認した。

第三回免疫より一か月後に第四回免疫を行った。四回目の免疫は筋注した。両後肢に0.5mlずつ、アジュバンドはincompleteを用いた。約一週間後に第四回採血(大量採血)した。一羽あたり60ml採血したが3番のウサギがうまく採血できなかった。抗体価をイムノブロットにより調べた。一次抗体として、正常血清を500倍、血清を2500,5000倍で行った。1番のウサギ血清が2500倍でバンドを検出した。

in situ ハイブリダイゼーションによるミネラルコルチコイド受容体mRNAの検出(Fig.1)

MRcDNAよりプローブとするcDNA断片をpGEM4ベクタープラスミドにサブクローニング、精製後、制限酵素により直鎖化し、*in vitro* transcriptionによって、フルオレセイン標識されたcRNAプローブを得た。

プローブA：転写調節ドメインをコードする領域に対するプローブであり、*EcoRI*,*BamHI*による長さ235bases(seq.pos.2024-2259)である。GRcDNAとのHomologyは50.0%となった。

プローブB：リガンド結合ドメインをコードする領域に対するプローブ。*AvaI*,*HindIII*による長さ393bases(seq.pos.2847-3240)である。GRcDNAとのHomologyは63.6%となった。

ベクタープラスミドにサブクローニングする過程は、抗体作成の手順とほぼ同じであった。ベクターはプローブA,Bとも同じ制限酵素で切断、すべて接着末端であるため、*phosphatase*処理、*Kination*処理は省略した。

mini prep.を行い、insertの個数、方向を調べた。プローブAを*EcoRI*,*SaII*により、プローブBを*SacI*,*HindIII*により切断した。

目的遺伝子が正しく組み込まれたベクターをリトランスフォームした。コンピテンセルは、HB101を使用した。

ベクタープラスミドを大量精製した(QIAGENを使用)。

センスプローブ、アンチセンスプローブ用にそれぞれ制限酵素により直鎖化した。

in vitro transcriptionにより、フルオレセイン標識cRNAプローブを作成した。アガロース電気泳動によりプローブの定量を行った。

組織化学法

MRmRNAのマッピング：16 μ m厚の切片を15枚毎にスライドガラスにマウントした。MRmRNA, GRmRNAの分布の比較をおこなった。10 μ m厚の隣接切片を海馬領域を中心にしてスライドガラスにマウントした。

切片の前処理としてプロテアーゼ処理 (20 μ g/ml, 37°C, 10min), アセチル化を行った。ハイブリダイゼーションのプローブ濃度は、750ng/mlで、反応は55°C, 16~18hrs 行った。

シグナルの検出についてはアルカリフォスファターゼ系により、NBT/BCIPを基質に発色 (O/N~2 O/N)した。

結果

MR mRNAの発現は異なるドメイン領域に対するプローブA, Bともにアンチセンスプローブを用いることにより細胞の細胞質にシグナルが検出された。センスプローブを用いたところ、シグナルはほとんど検出されなかった(Fig.2)。

プローブA, Bを比較したところ、プローブBの方がすべての領域において強いシグナルをもたらした。mRNAの分布する領域、各領域内でのシグナル強度の程度は、差を認めなかった(Fig.3)。

MR mRNAの発現は、

前嗅核 (AO), 外側縦条 (TT), 嗅結節 (Tu), 一次嗅皮質 (PO),
灰白層 (IG), 梨状内核 (En), 大脳皮質, 海馬体,
歯状回 (DG), 扁桃体外側核/基底核 (La/BL), 動眼神経核 (III),
青斑核 (LC), 三叉神経中脳路核 (Me5), 二丘傍体核 (PBg),
外転神経核 (VI), 顔面神経核 (VII), 舌下神経核 (XII), 赤核 (Rn)
において強いシグナルが観察された。

大脳皮質では、おもに第II/III, V層に強いシグナルが、また海馬では、錐体細胞層のCA1領域からCA4領域にかけて全体的にシグナルが観察されたが、CA3領域が最も強くシグナルが検出される傾向にあった。

GR mRNAの脳内の分布と比較したところ、GR mRNAは海馬、大脳皮質をはじめとして広範囲に強くシグナルが出たのに対して、MR mRNAは限られた領域においてのみ強いシグナルが検出された(Fig.4)。

大脳皮質において、MR mRNAはおもに第II/III, V層に、GR mRNAは第II/III~VI層にかけて強いシグナルが検出された(Fig.5)。

隣接切片による、海馬と大脳皮質のmRNA発現分布パターンを比較したところ、海馬では、GR mRNA, MR mRNAを共有するニューロンが多く認められる傾向であるのに対し、大脳皮質第II/III, V層では、あまり多くは認められず、GR mRNA, MR mRNA含有ニューロンはそれぞれ別のニューロンである傾向が認められた(Fig.6)。

考察と今後の課題

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脳内分布を見たが、両者を共存させているニューロンが多く認められたことは、従来の学説である血中コルチコステロンが低濃度であればミネラルコルチコイド受容体が、高濃度であればグルココルチコイド受容体が作用するということを支持するものである。今後、どのような時間的経緯でこれらの受容体が発現していくのか解析していきたいと考えている。

文献

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

Morimoto, M., Morita, N., Ozawa, H., Yokoyama, K. and Kawata, M. : Distribution of glucocorticoid receptor immunoreactivity and mRNA in the rat brain : an immunohistochemical and in situ hybridization study. *Neurosci. Res.*, 26, 235-269, 1996

Visser, D.T.M., Hu, Z., Pasterkamp, R.J., Morimoto, M. and Kawata, M. : The alteration of glucocorticoid receptor-immunoreactivity in the rat forebrain following short-term and long-term adrenalectomy. *Brain Res.*, 729, 216-222, 1996

Hu, Z., Yuri, K., Ozawa, H., Lu, H., Kawata, M. : The *in vivo* time course for elimination of adrenalectomy-induced apoptotic profiles from the granule cell layer of the rat. *J. Neurosci.*, 17(11), 3981-3989, 1997

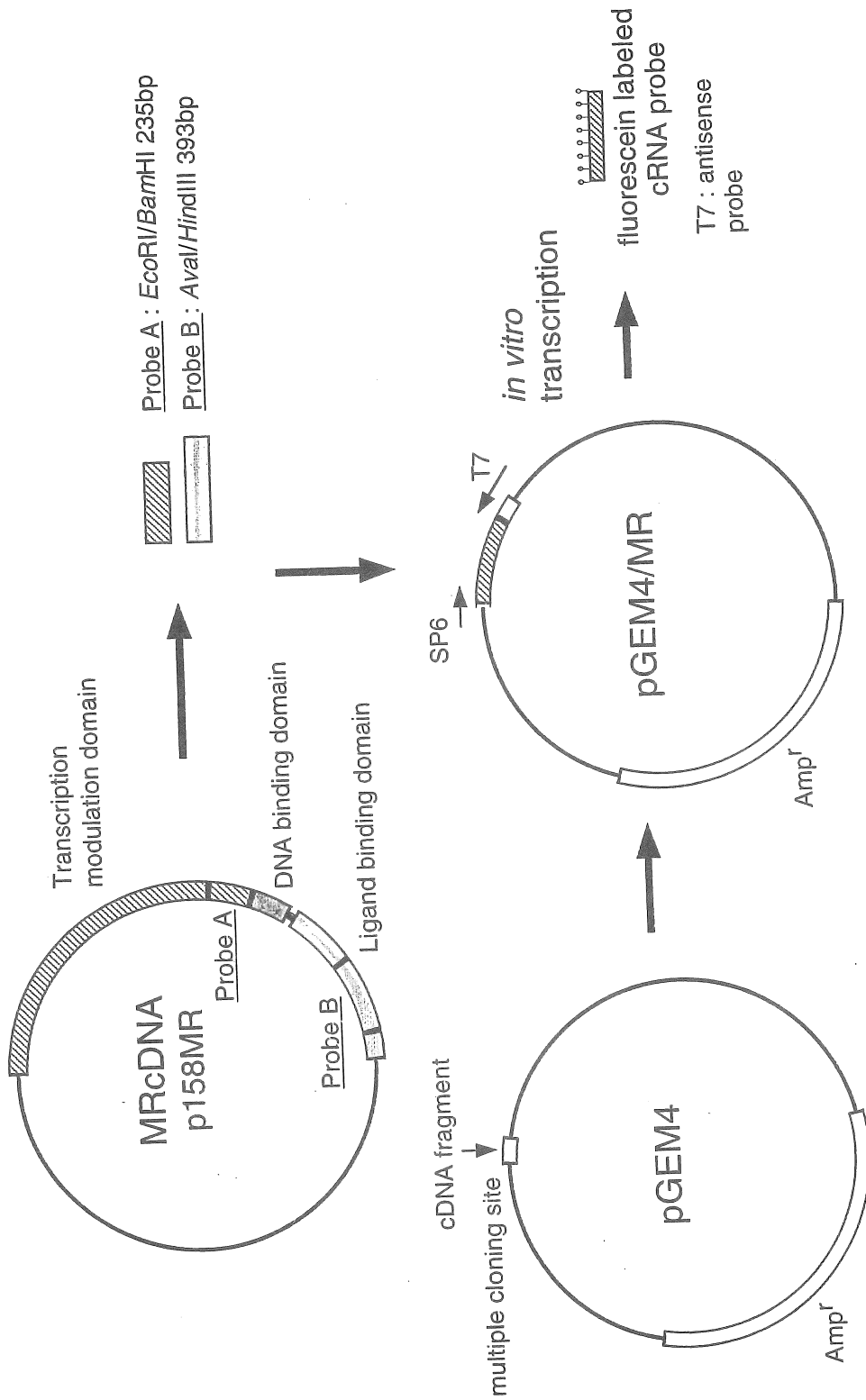


Fig.1

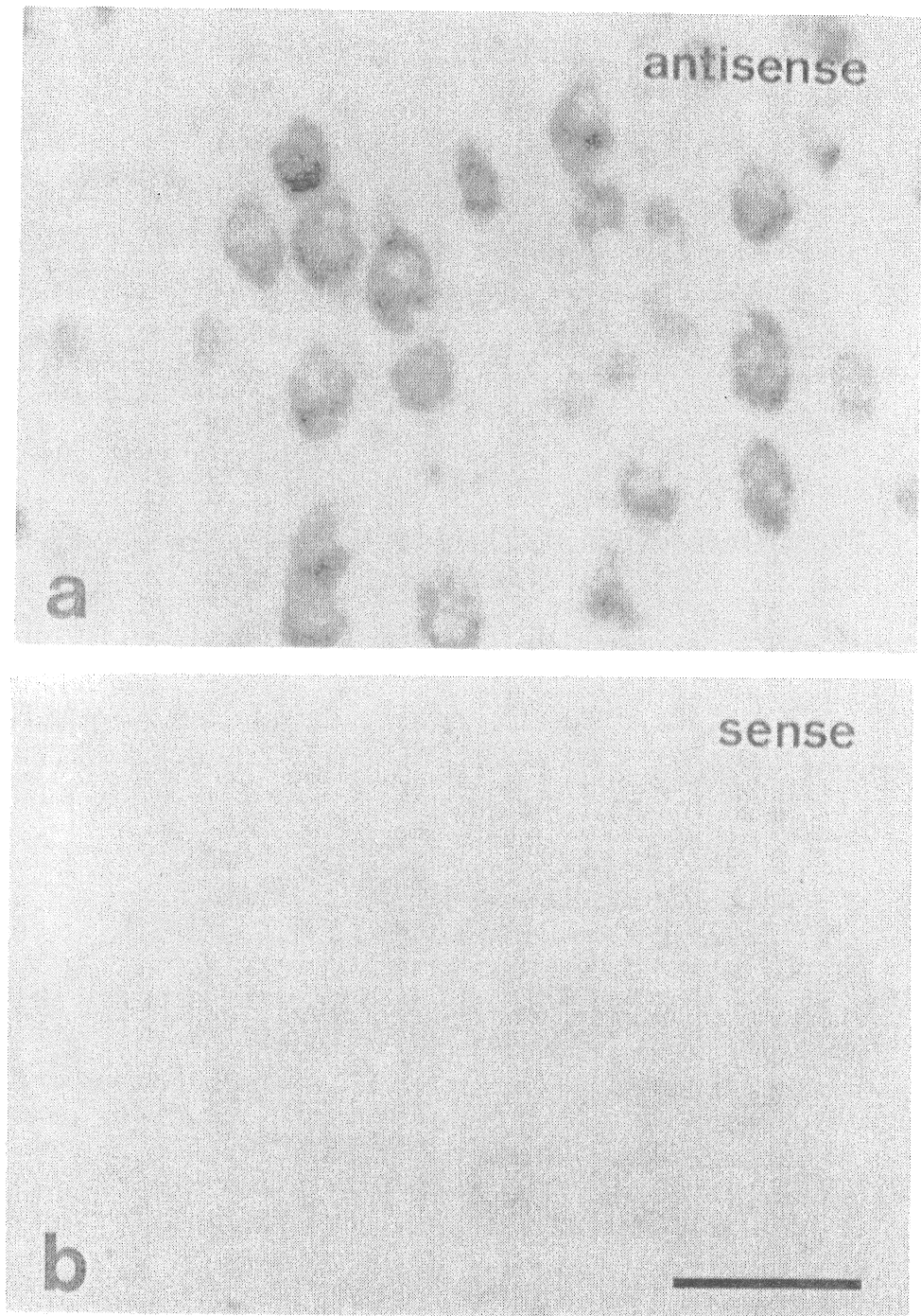


Fig.2

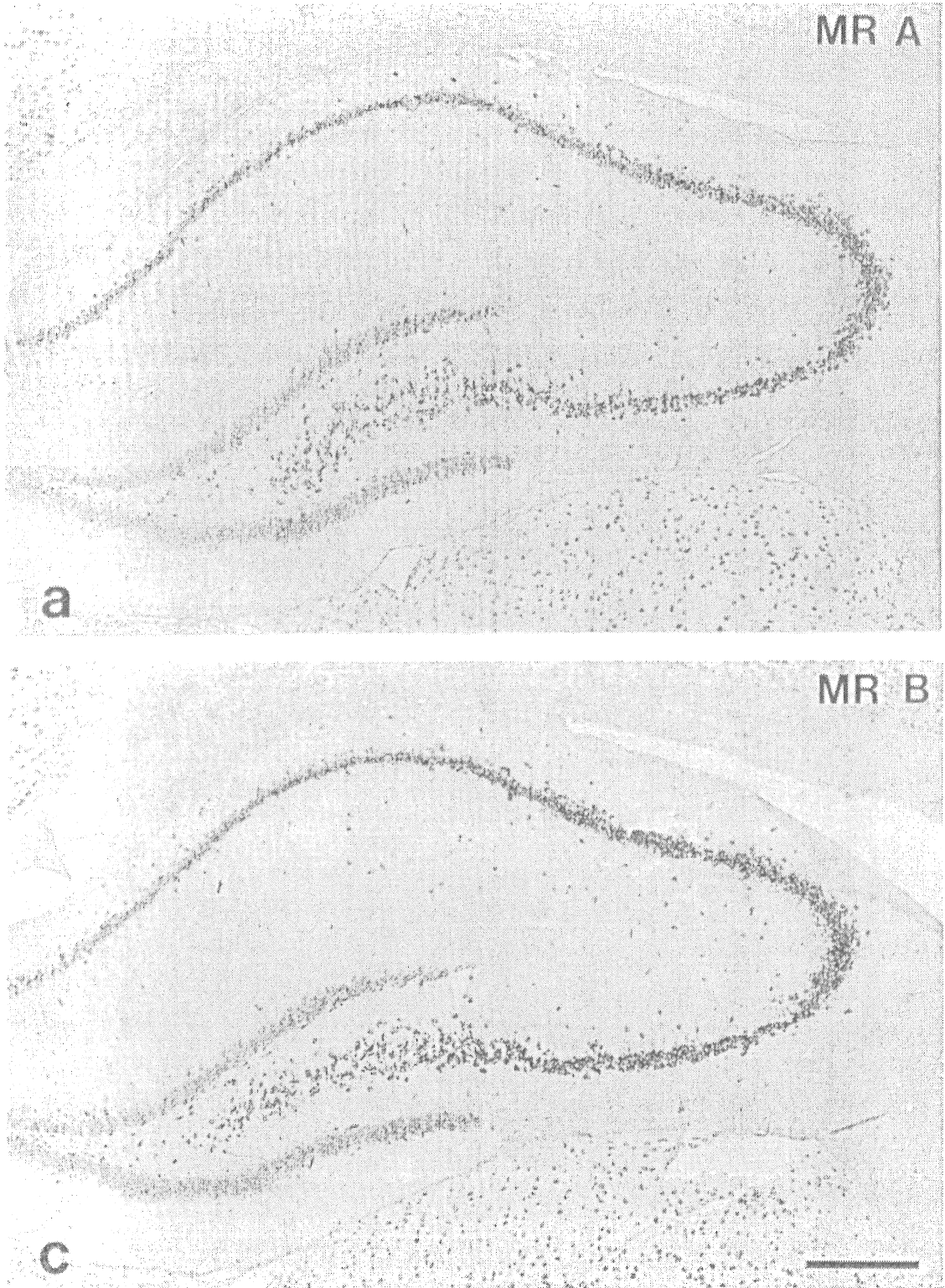


Fig.3

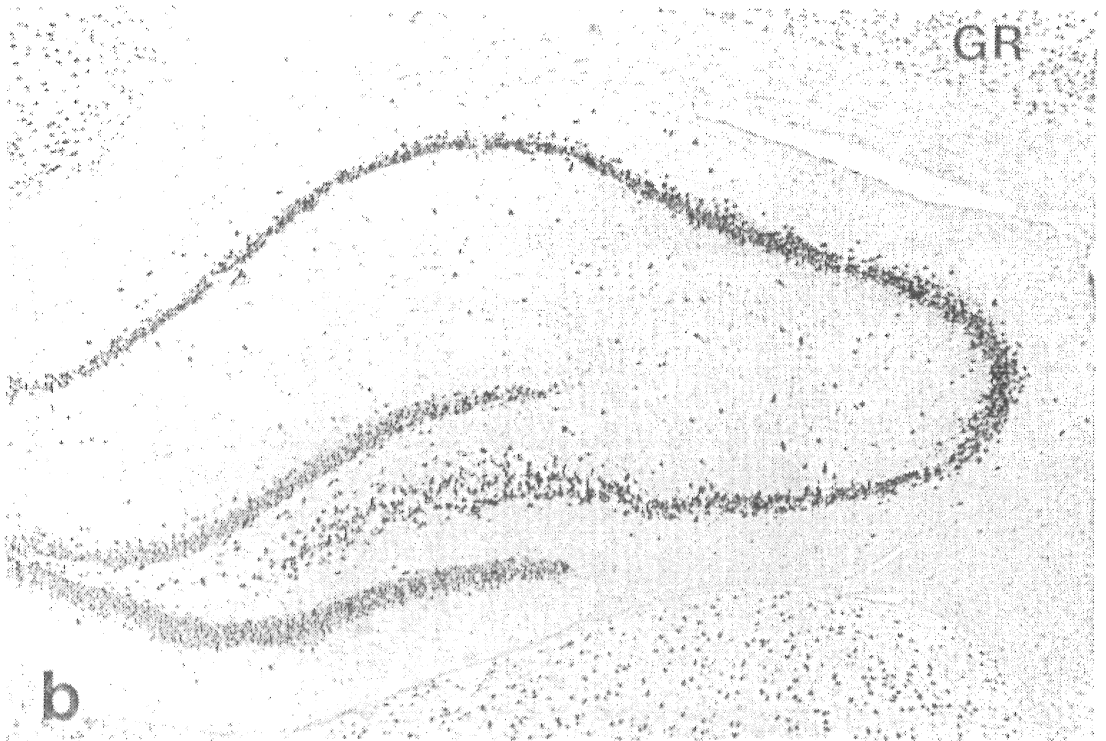


Fig.4

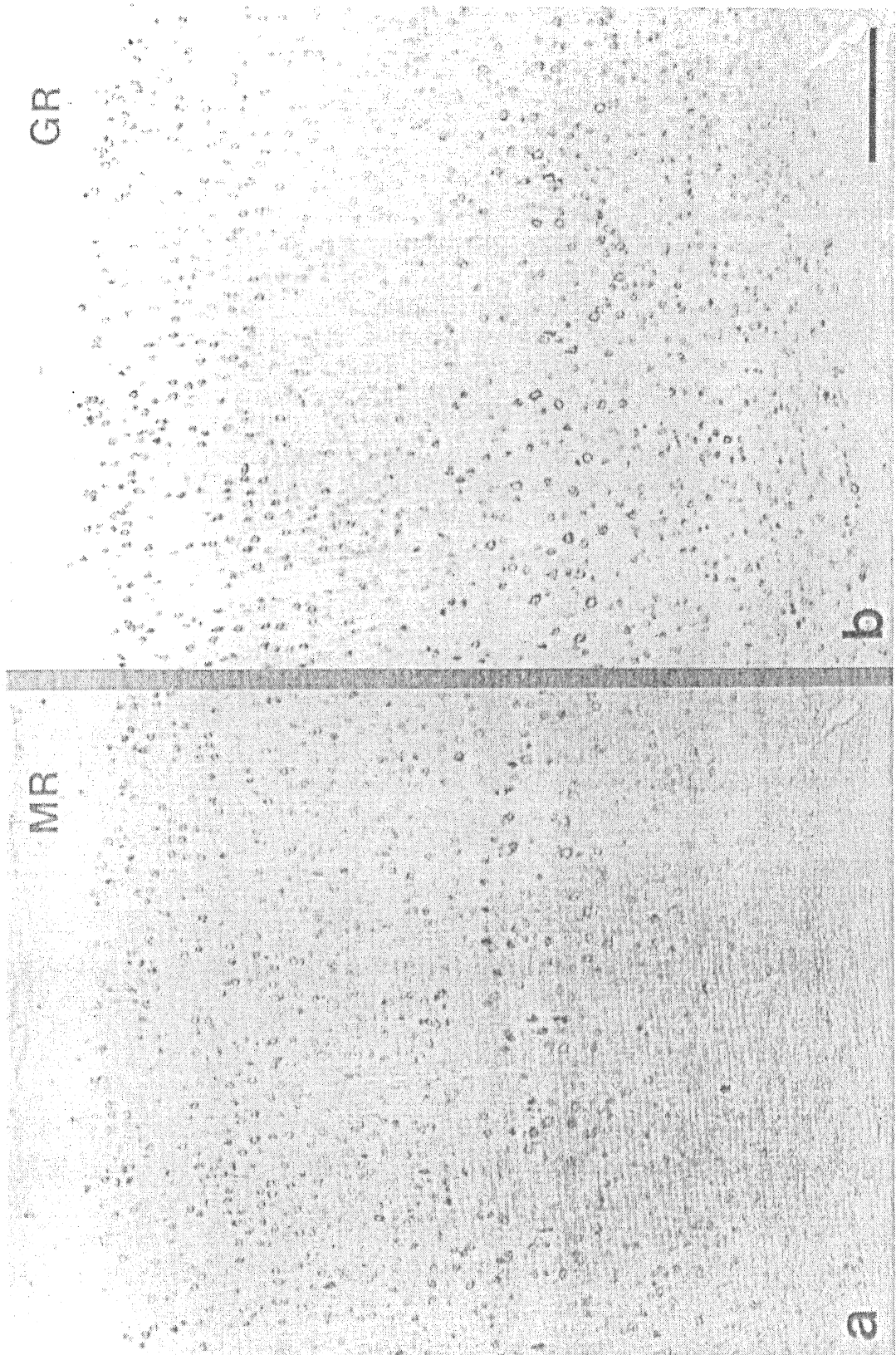


Fig.5

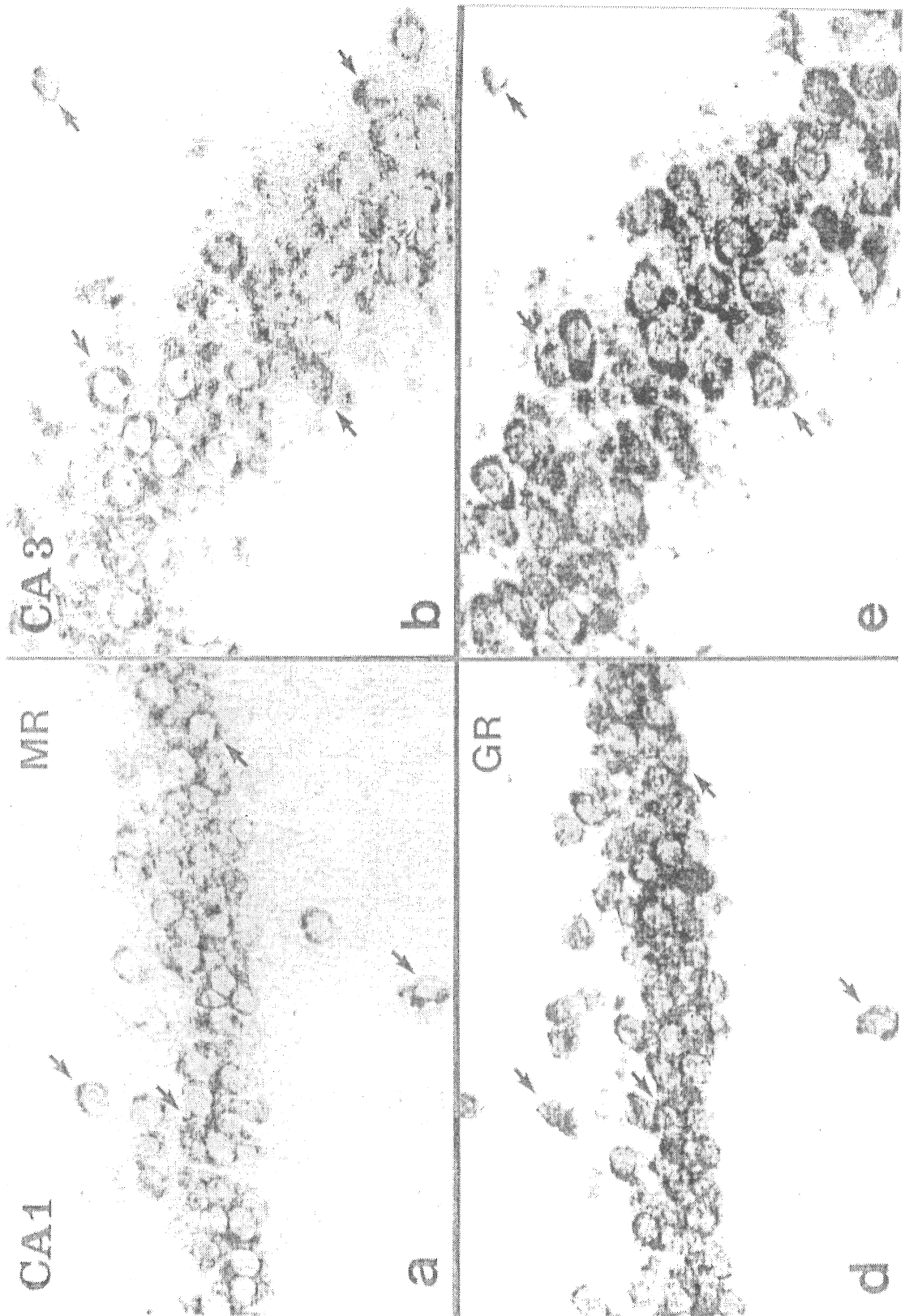


Fig.6

Mineralocorticoid receptor in the brain
Distribution and its significance

Mitsuhiro Kawata, Hitoshi Ozawa, Keiko Yokoyama, Noriyuki Morita and Takao Ito

Department of Anatomy and Neurobiology, Kyoto Prefectural University of Medicine

Summary

The localizations of mRNAs of mineralocorticoid receptor (MR) and glucocorticoid receptor (GR) in the rat brain were examined by *in situ* hybridization histochemistry.

Fluorescein-labeled RNA probes were synthesized from cDNA fragments for MR and GR. Probe for GR mRNA was complementary to the fragment in the transcription modulation (TM) domain. Probes for MR mRNA were complementary to the fragment in the TM domain and the ligand binding domain. These two MR probes showed the same distributional pattern of signals. The intensities of the signal detected by probe B were stronger than probe A.

The strong hybridization signals of MR and GR mRNAs were mainly detected in the cerebral cortex and the hippocampal formation. In addition, hybridization signals of MR and GR mRNAs were expressed in the brain stem.

In the cerebral cortex, high densities of MR mRNA-containing cells were distributed in layers II/III and layer V, while those of GR mRNA-containing cells were in layers II/III to layer VI. The cells containing both MR and GR mRNAs were observed in the pyramidal layer throughout Ammon's horn and the dentate gyrus. But, few cells expressing both mRNAs were detected in layers II/III and layer V of the cerebral cortex.

The production of MR antibody is now underway after the synthesis of MR-GST fusion protein.