

9 8 4 6 体液塩濃度変化による下垂体後葉神経系の形態的变化

助成研究者：宮田 清司 (京都工芸繊維大学 応用生物学科)

共同研究者：清原 壽一 (京都工芸繊維大学 応用生物学科)

下垂体後葉ホルモンであるバソプレッシンやオキシトシンは、視床下部の視索上核や室傍核で合成される神経ペプチドホルモンである。これらのホルモンは、体液の塩濃度(浸透圧)上昇に応答して、下垂体後葉の神経終末部で血液中循環へ放出される。血液中に放出された下垂体後葉ホルモンは、主に腎臓に作用して水分の再吸収を促進、これにより体液の水分を保持する抗利尿作用を示す。さらに、下垂体後葉神経系は、体液塩濃度上昇(高浸透圧状態)により、可塑的に細胞体、樹状突起、及び神経終末部の形態変化を生じ、ホルモン放出を亢進させる。体液の浸透圧、水分の維持機構は、生体にとって正に生死を左右する重要なホメオスタシス機構であり、脳の形態変化さえ引き起こす。

本研究において、下垂体後葉グリア細胞が、可塑的に微細構造レベルでの形態変化を起こすことができる理由として、低分子型 MAP2 などの“幼若的”性質を有する蛋白が発現しているためであることが証明された。さらに、MAP2 免疫染色を指標として、成熟した個体のグリア細胞が生理的刺激により、劇的な形態変化が生じることが証明された。培養グリア細胞を用いた実験より、このような形態変化が高浸透圧の直接作用というよりは、神経終末部より放出された神経伝達物質が重要であることを証明された。形態変化は、神経伝達物質受容体を介した細胞内 dBcAMP によって制御されていた。グリア細胞の形態変化には細胞内骨格である、微小管やアクチン繊維の分布変化を伴うことも判明した。このように、グリア細胞の退縮は、神経終末部が直接血管系へ露出する機会を増加させ、結果的にホルモン放出の頻度が増加するものと考えられている。本研究では、形態変化には関与しないが、Ca²⁺上昇に繋がる数多くの神経伝達物質受容体の存在が確認された。よって、下垂体後葉においては、神経とグリア細胞の間に密接な情報交換があることがわかる。一方、グリア細胞だけでなく神経終末部においても、ホルモン放出のために蛋白レベルでの調節が存在する。カルシウム結合蛋白は Ca²⁺緩衝作用を持った蛋白で、この蛋白の発現増加は、高浸透圧刺激により増加した Ca²⁺濃度をすみやかに正常レベルまで戻す作用があると考えられる。これにより、一定の放出パターンでホルモンが放出されている可能性がある。

以上のように、慢性的な体液塩濃度(浸透圧)上昇に対し、生体は下垂体後葉神経系に形態レベルでの構築変化を生じ、ホルモン放出を促進する機構を備えている。

9 8 4 6 体液塩濃度変化による下垂体後葉神経系の形態的变化

助成研究者：宮田 清司 (京都工芸繊維大学 応用生物学科)

共同研究者：清原 壽一 (京都工芸繊維大学 応用生物学科)

1. 研究目的

下垂体後葉ホルモンである、バソプレッシンやオキシトシンは視床下部の視索上核や室傍核で合成される神経ペプチドホルモンである。これらのホルモンは、体液の塩濃度（浸透圧）上昇に対応して下垂体後葉の終末部で循環血液中へ放出される。血液中に放出された下垂体後葉ホルモンは、主に腎臓に作用して水分の再吸収を促進することで、体液の水分を保持する抗利尿作用を示す。下垂体後葉神経系は、成体においても“幼若的”性質を残し、脳の中では究めて柔軟な性質を保持している。つまり下垂体後葉神経系は、体液塩濃度上昇（高浸透圧状態）刺激により、可塑的に細胞体、樹状突起、及び神経終末部の微細構造レベルでの変化を生じ、ホルモン放出を昂進させる。しかし、この形態変化は刺激の休止とともにもとの状態に戻りうることから形態学的可塑性と言われている。体液の浸透圧、水分の維持機構は、生体にとって、正に生死を左右する重要なホメオスタシス機構であり、脳の一部形態にも再構築が起こり、適応しようとする。近年、このような可塑的形態変化はグリア細胞と神経の相互作用によることが明らかになりつつある。また、下垂体後葉神経系は、発生の初期に発現しているが成熟個体ではほとんど消失している“幼若的”蛋白を依然として発現していることで、可塑的性質を保持することが可能である。

本研究においては、体液塩濃度（浸透圧）上昇と下垂体後葉神経系の形態学的可塑性について、神経とグリア細胞の両面から検討を行った。

2. 研究材料

2. 1 実験動物

実験には、Wistar系雄成熟ラット（8～12週齢）を用いた。ラットは、14時間（明）：10時間（暗）の照明サイクル、自由節食下で飼育した。慢性高浸透圧状態のラットは、2%食塩水を飲水させるか、あるいは飲み水を与えないことで作製した。コントロールラットとしては、通常の水を自由飲水しているラットを用いた。

2. 2 免疫組織化学

慢性高浸透圧状態（あるいはコントロール）のラットは、pentobarbitalによる麻酔後、4% paraformaldehydeにて灌流固定して脳を取り出した。脳はさらに、4℃、24時間、後固定を行い、vibratomeにて25～30 μm厚の切片を作製した。切片は、過酸化水素水、ホウ

素化水素ナトリウム、正常血清前処理を行い、適当な濃度に希釈した1次抗体*にインキベーションした。1次抗体は、ABC法あるいはHRP法を用い、DABを最終産物として観察した。電子顕微鏡レベルの観察のためには、DAB反応後、オスmium酸でさらに後固定を行い、Epon樹脂に包埋して、ウルトラミクロームにて超薄切片を作製した。超薄切片は、鉛とウラン染色を施し電子顕微鏡にて観察した。

*1次抗体： 微小管結合蛋白 (MAP2)、EF-hand Ca²⁺結合蛋白 (calbindin, calretinin)

2. 3 ウェスタンブロット

脳あるいは下垂体後葉組織は、蛋白分解阻害剤を含んだ緩衝液にてホモジェネイトした。SDS-page電気泳動にて展開したゲルは、PVDF膜に転写し、スキムミルク液でブロッキングした。さらにPVDF膜を、1次抗体、HRP標識2次抗体でインキベーションし、ECL法にて化学発光させた後、X線フィルムでシグナルを検出した。

2. 4 培養グリア細胞の形態変化

成熟したラットの下垂体を取り出し、顕微鏡下で中葉と前葉を除去した後、後葉を数個の断片に細切した。後葉の断片は、Dulbecco's Eagle NEM培養液にて培養して、10~14日後に遊走してきたグリア細胞を実験に使用した。下垂体後葉由来のグリア細胞は、種々の神経伝達物質にて処理して、扁平型から星型への形態変化が生じないか調べた。さらに、形態変化に伴う、細胞内骨格の分布変化を、チューブリン抗体(微小管)やphalloidin-FITC(アクチン)にて標識して、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。一方、Ca²⁺依存的受容体の存在は、Fura2を用いたCa²⁺イメージ測光法にて調べた。

3. 研究結果

3. 1 慢性高浸透圧刺激によるグリア細胞の形態変化と微小管関連蛋白(MAP2)

下垂体後葉のグリア細胞が柔軟な性質を持つ理由として、発生途上の未熟な脳の性質を、生体になっても持ち続けているためである。微小管関連蛋白は、神経系の形態形成や維持に重要な働きを果たしているが、その中でもMAP2は脳内で最も多く存在する蛋白である。MAP2には、高分子型のMAP2aとMAP2b、低分子型のMAP2cとMAP2dの4種類のアイソフォームがある。低分子型のMAP2cとMAP2dは未成熟な脳に多く発現しており、生体ではほとんど痕跡的にしか存在しない。しかし、Fig. 1に示すように、下垂体後葉においては、未熟な胎児脳と同様に低分子型MAP2が存在することが明らかになった。電子顕微鏡レベルの免疫組織化学にて、MAP2の分布を調べたところ、グリア細胞への特異的局在が観察された(Fig. 2)。この事実は、グリア細胞に特異的に発現しているグリア酸性繊維蛋白との2重染色で確認することができた。電子顕微鏡レベルでの観察からもわかるように、MAP2はグリア細胞の細胞質突起のかなり細い部分まで分布し、グリア細胞の形態を強く反映している。そこで、慢性高浸透圧刺激による、MAP2染色グリア細胞の形態変化を調べた。正常な飲水をしたラットでは、下垂体後葉のグリア細胞は幾つにも分枝した細い細胞質突起を持

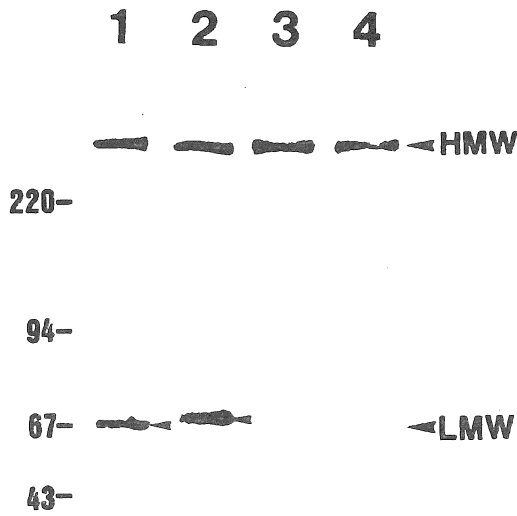


Fig. 1 Western blots of MAP2 expression in whole embryonic brains (lane 1 and 3) and the adult neurohypophysis (lane 2 and 4) of rats. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gradient (4-18%) electrophoresis gels were transferred to a PVDF membrane and immunostained with monoclonal antibody C (lane 1 and 2) and AP20 (lane 3 and 4). The band of LMW MAP2 (mol. wt 70,000) of adult neurohypophysis (lane 2) is at higher position than those of the embryonic rat brain (lane 1). Antibody AP20 detected only HMW MAP2 (mol. wt 280,000) in whole embryonic brains (lane 3) and the neurohypophysis (lane 4).

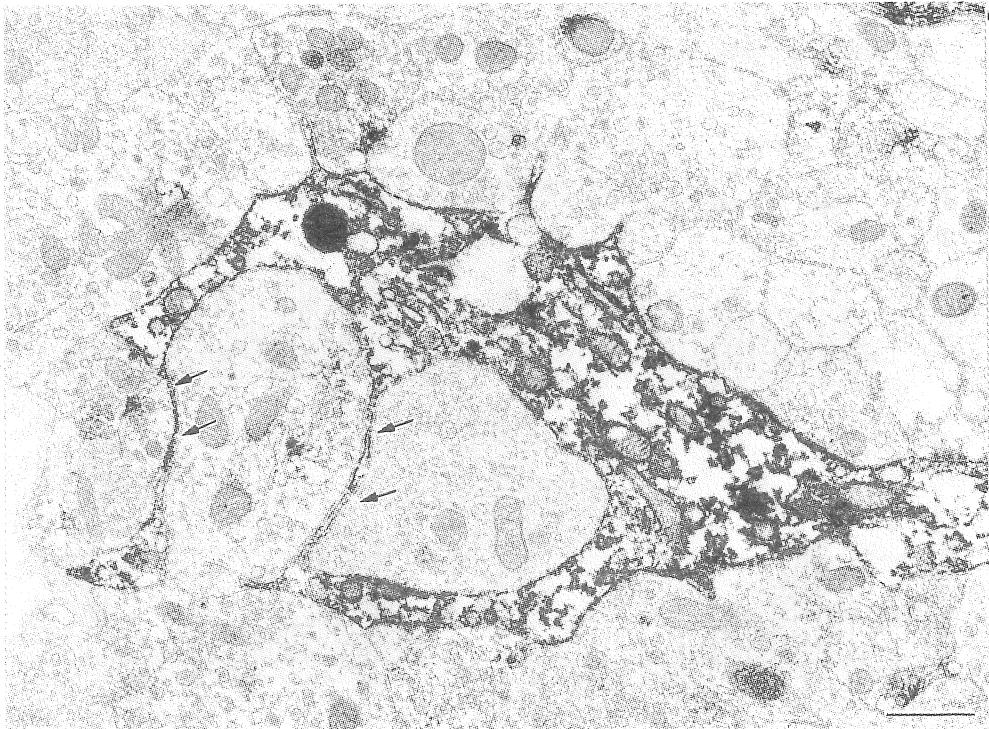


Fig. 2 An electron micrograph showing MAP2 immunoreactivity in the neurohypophysis of well-hydrated control rats. Electron-dense reaction products of MAP2 immunoreactivity in the pituitary cell cytoplasm and the absence of reaction products in the axonal terminals. Note that fine processes (arrows) labeled with electron-dense MAP2 immunoreactivity surround and enclose the axonal terminals containing neurosecretory vesicles. T, axonal terminal; P, pituitary cell. Scale bar = 1 μ m.

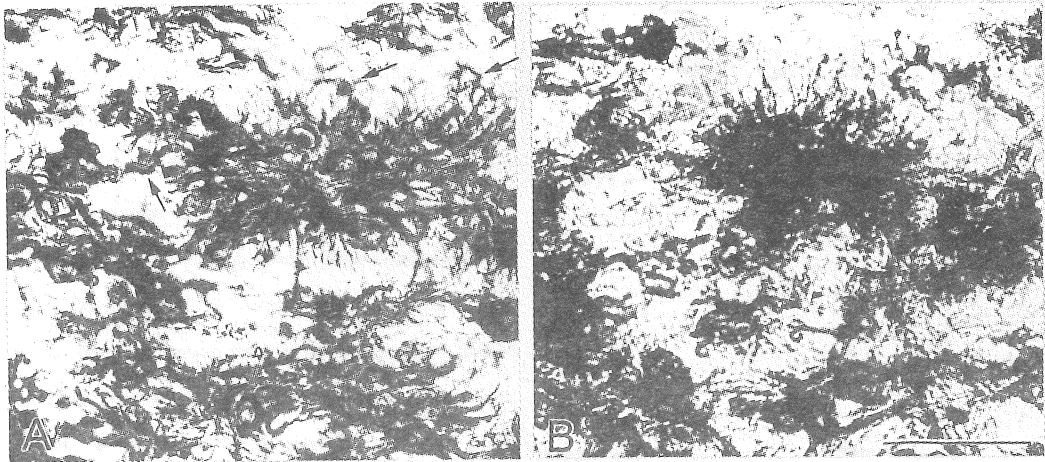


Fig. 3 Light micrographs showing MAP2 immunoreactivity in the neurohypophysis on horizontal sections of well-hydrated control (A) and dehydrated (B) animals. (A) Control rats, showing strong MAP2 immunoreactivity in long and well-branched cellular processes (arrows) and cell body of the pituicytes. (B) Water-deprived rats, showing intense MAP2 immunoreactivity in the thick processes and cell body of the pituicytes. Note the disappearance of fine processes in MAP2-stained pituicytes. Scale bar = 50 μ m.

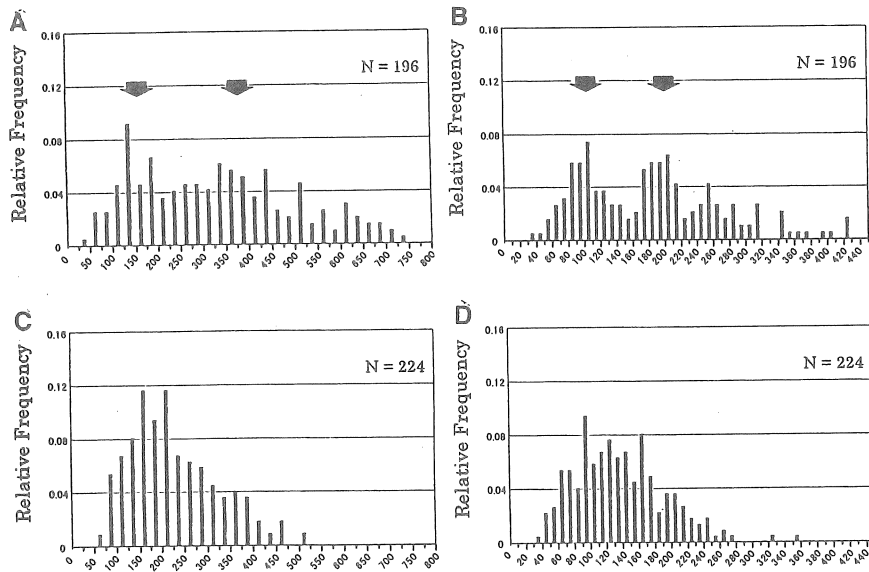


Fig. 4 Frequency histograms of the cell size (A and C) and perimeter (B and D) in MAP2-stained pituicytes. The data are represented as relative frequency of MAP2-stained pituicyte population composing in each cell size and perimeter. There are two populations (arrows) of cell size and perimeter in MAP2-stained pituicytes. Dehydration decreases the frequency of more than 325 μ m² of cell size population and more than 170 μ m of perimeter population. Statistically significant ($P < 0.01$) between A and C, or B and D, using χ^2 test.

っているのに対し、慢性高浸透圧刺激を受けたラットでは、細胞質突起が縮み、短く、かつ太くなっていることがわかった (Fig. 3)。さらに、グリア細胞の断面積や周長を画像解析にて解析したところ、慢性高浸透圧刺激により有意にグリア細胞が小さくなっていた (Fig. 4)。

3. 2 培養グリア細胞の形態と細胞内骨格の変化

下垂体後葉由来グリア細胞の形態は、通常扁平型であるが、アドレナリン性 β アゴニストやアデノシン処理により30~60分で、星型に形態を変える (Fig. 5)。さらに、このような形態変化は、細胞内セカンドメッセンジャーであるcAMPの透過型であるdBcAMP処理によっても引き起こされた。一方、エンドセリンの作用としては、星型から扁平型に形態を戻すことが確認された。グリア細胞における細胞骨格の分布を共焦点レーザー顕微鏡にて観察したところ、扁平型の通常の状態では微小管が放射状に分布し、アクチン繊維が幾つか束になって(ストレスファイバー)分布していた (Fig. 5)。しかし、dBcAMP処理により星型になったグリア細胞では、微小管が束状になり、かつストレスファイバーが脱重合しているのが観察された。

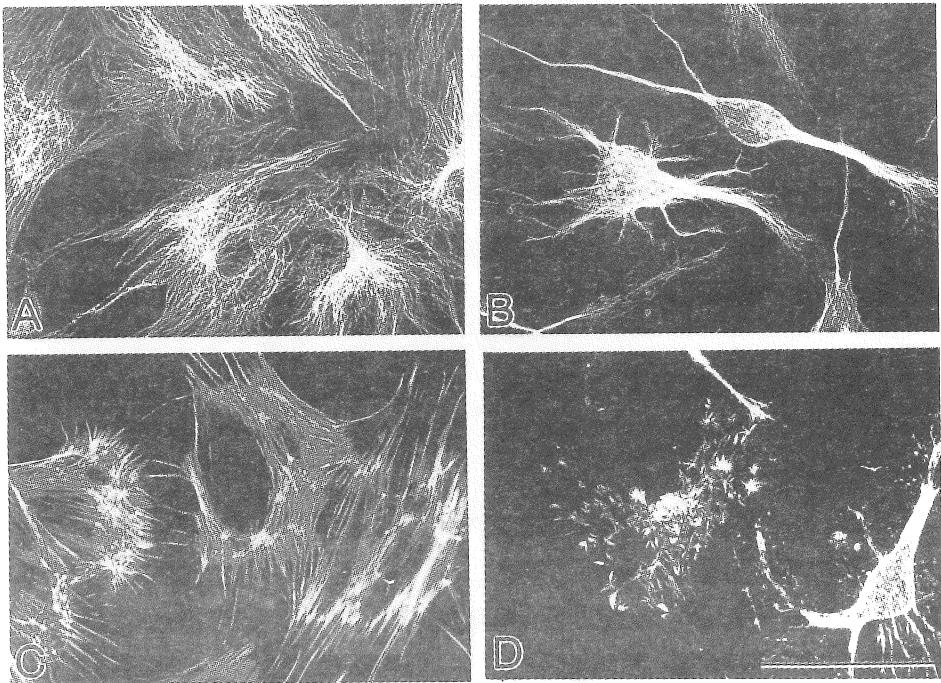


Fig. 5 Confocal images showing localization of microtubule and microfilament (stress fiber) in pituitary cells cultured from the neurohypophysis explants of adult rat. The images were obtained by projection of optical sections along the 2-axis. Numerous fine fibers of microtubule in control pituitary cells (A). Assembled microtubule fibers in the stellate pituitary cells treated with 1 mM dBcAMP for 60 min (B). Intense stress fibers in control pituitary cells (C). Disappearance of stress fibers in the stellate pituitary cells treated with 1 mM dBcAMP for 60 min (D). Scale bar = 50 μ m.

3. 2 神経終末部におけるカルシウム結合蛋白の局在と調節

EF-hand に属するカルシウム結合蛋白である calbindin と calretinin の下垂体後葉における局在を調べたところ、両者とも神経終末部に特異的に存在することがわかった (Fig. 6)。さらに、電子顕微鏡レベルでの局在を検討したところ、終末部のなかでも活性帯と呼ばれる部位に集中していることがわかった (Fig. 7)。活性帯には、小型シナプス小胞が多く存在していることが知られている。興味深いことに、慢性高浸透圧刺激を与えたラットにおいては、下垂体後葉神経終末部の calretinin 含有量が増加していることがわかった (Fig. 8)。しかし、calbindin 含有量はまったく変化がなかった。

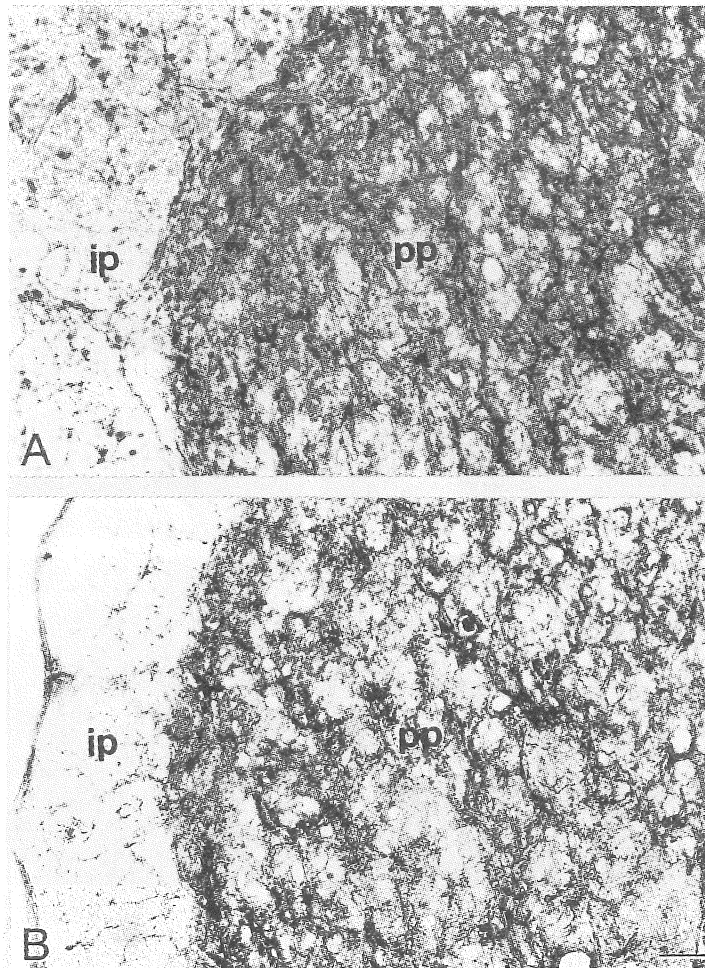


Fig. 6 Light micrographs showing the localization of calbindin-ir (A) and calretinin-ir (B) in horizontal sections of the rat pituitary. Strong calbindin and calretinin immunoreactivity are visible throughout the posterior pituitary (pp) while scarcely any is seen in adjacent intermediate pituitary (ip). Scale bars = 100 μ m.

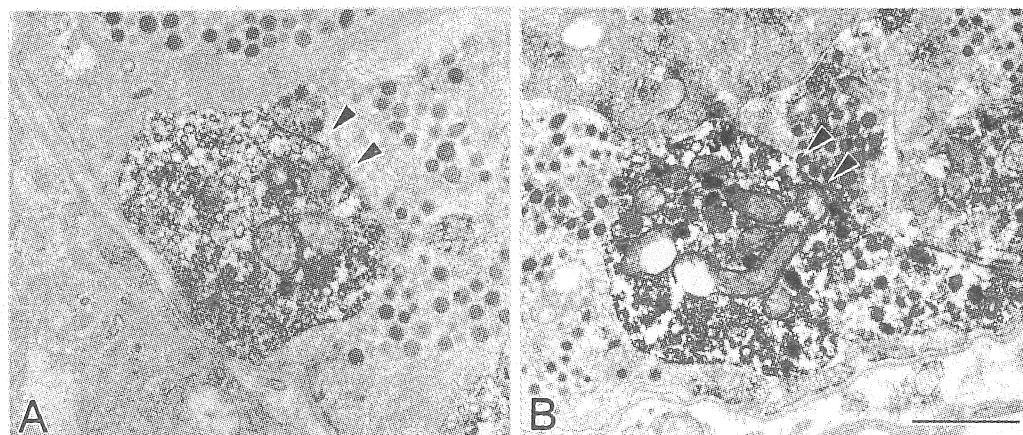


Fig. 7 Electron micrographs showing localization of calbindin (A) and calretinin (B) immunoreactivity in the posterior pituitary. (A) Electron-dense calbindin immunoreactivity is seen in the nerve terminals (arrowheads) that contain many MVs along with NSGs. These nerve terminals facing the endothelial walls of the capillary are considered to be "active releasing" nerve terminals. (B) Electron-dense calretinin immunoreactivity is seen in the axons and nerve terminals (arrowheads) containing numerous MVs. No apparent calretinin immunoreactivity was observed in the pituicytes (p) or nerve terminals (t) containing NSGs. bl, basal lamina. Scale bar = 1 μ m.

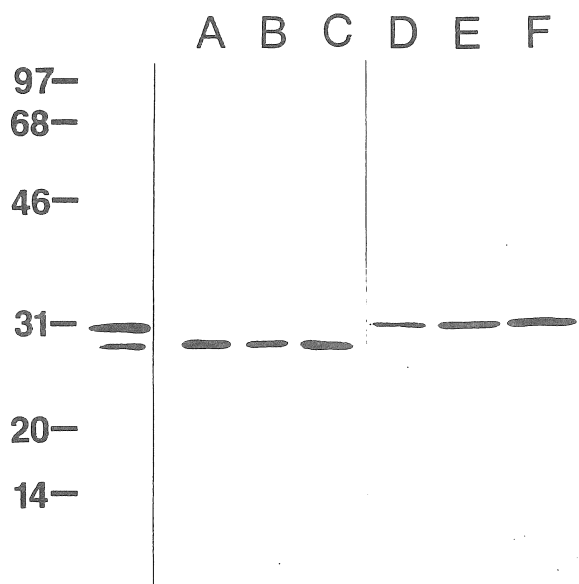


Fig. 8 Western blots of calbindin and calretinin in the posterior pituitaries obtained from well-hydrated control, NaCl-treated, and water-deprived rats. An identical amount of protein (10 μ g/lane) was separated on a 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide electrophoresis gel. Left lane shows that calbindin and calretinin of water-deprived animals are detected at the positions of 28k and 30k of molecular weight, respectively. The content of calbindin was similar among well-hydrated control (lane A), water-deprived (lane B) and NaCl-treated animals (lane C). However, the content of calretinin in water-deprived (lane E) and NaCl-treated (lane F) rats was increased compared with well-hydrated control (lane D). The tissue homogenates loaded into lane A, B, and C were same samples as loaded into lane D, E, and F, respectively.

4. 考察

下垂体後葉ホルモンは体液の塩（浸透圧）濃度上昇に应答して、下垂体後葉より血液中へ放出される。これらの抗利尿ホルモンは腎臓などに作用して、体液の水分を保持することで浸透圧を正常レベルに戻そうとする、体液組成のバランスを一定に保つ、重要なホメオスタシス機構である。しかし、慢性的に浸透圧が上昇した状態においては、より多くのホルモン生産、放出が必要となり、下垂体後葉神経は形態レベルでの劇的な変化を生じホルモンの放出が促進される。

本研究においては、下垂体後葉のグリア細胞は、低分子型 MAP2 などの“幼若的”性質を有する蛋白を発現することで、発生途上の脳と同じように微細構造レベルでの構築変化を生じることが可能であると考えられる。さらに、MAP2 染色を指標として、成熟した個体のグリア細胞が生理的刺激により、劇的な形態変化が生じることが証明された。さらに、培養グリア細胞を用いた実験より、このような形態変化が高浸透圧の直接作用というよりは、神経終末部より放出された神経伝達物質が重要であることを証明された。形態変化は、神経伝達物質受容体を介した細胞内 dBcAMP によって制御されていることが示唆された。グリア細胞の形態変化には細胞内骨格である、微小管やアクチン繊維の分布変化を伴うことも判明した。このように、グリア細胞の退縮は、神経終末部が直接血管系へ露出する機会を増加させ、結果的にホルモン放出の頻度が増加するものと考えられている。本研究では、形態変化には関与しないが、 Ca^{2+} 上昇を生じる数多くの神経伝達物質受容体の存在が確認されている。このように、神経とグリア細胞の間には密接な情報交換があることがわかる。一方、グリア細胞だけでなく神経終末部においても、ホルモン放出のために蛋白レベルでの調節が存在する。カルシウム結合蛋白は Ca^{2+} な緩衝作用を持った蛋白で、この蛋白の発現増加は、高浸透圧刺激により増加した Ca^{2+} 濃度をすみやかに正常レベルまで戻す作用があると考えられる。これにより、ホルモンは一定の放出パターンでホルモンを放出している可能性がある。

5. 今後の課題

下垂体後葉ニューロンにおける、微細構造レベルの形態学的可塑性は、グリア細胞の細胞骨格系に特殊性があり、これにより柔軟な組織再構築を生じることが可能である。一方、ニューロンとグリア細胞の相互作用には、細胞間認識機構が必要で細胞膜の接着因子などが強く関与する可能性がある。実際、IgLON 接着因子のひとつである、Kilon や OB-CAM が下垂体後葉ニューロンの樹状突起に存在することを観察している（未発表）。このように、下垂体後葉ニューロン系には、特殊な接着因子が存在する可能性がある。今後、体液塩（浸透圧）濃度調節における、下垂体後葉ニューロン系の形態レベルにおける可塑的適応機構を解明する予定である。

6. 文献

- 1) Miyata, S., Matsushima, O. and Hatton, G.I. (1997) Taurine in rat posterior pituitary; localization in astrocytes and selective release by hypoosmotic stimulation. *Journal of Comparative Neurology*, 381: 513-523.
- 2) Miyata, S., Khan, A. and Hatton, G.I. (1998) Colocalization of calretinin and calbindin-D28k with oxytocin and vasopressin in rat supraoptic nucleus neurons: A quantitative study. *Brain Research*, 785: 178-182.
- 3) Lin, S-H., Miyata, S., Kawarabayashi, T., Nakashima, T. and Kiyohara, T. (1998) Metabolic map of the rat brains in pregnant, parturient and lactating females using Fos immunohistochemistry. *Brain Research*, 787: 226-236.
- 4) Matsunaga, W., Miyata, S., Hashimoto, Y., Lin, S-H., Nakashima, T., Kiyohara, T. and Matsumoto, T. (1999) Microtubule-associated protein2 (MAP2) in hypothalamo-neurohypophysial system: low molecular weight MAP2 in pituitary astrocytes. *Neuroscience*, 88: 1289-1297.
- 5) Funatsu, N., Miyata, S., Kumanogoh, H., Shigeta, M., Hamada, K., Endo, Y., Sokawa, Y. and Maekawa, S. (1999) Characterization of a novel rat brain GPI-anchored protein (kilon), a member of the IgLON cell adhesion molecule family. *Journal of Biological Chemistry*, 274: 8224-8230.
- 6) Matsunaga, W., Miyata, S. and Kiyohara, T. (1999) Redistribution of MAP2 immunoreactivity in the neurohypophysial astrocytes of adult rats during dehydration. *Brain Research*, 829: 7-17.
- 7) Miyata, S., Furuya, K., Nakai, S., Bun, H. and Kiyohara, T. (1999) Receptor-mediated morphological plasticity and rearrangement of cytoskeletons in pituicytes cultured from adult rat neurohypophysis. *Neuroscience Research*, (in press)
- 8) Nakai, S., Furuya, K., Miyata, S., Kiyohara, T. (1999) Intracellular Ca²⁺ response to nucleotides, amines, amino acid and prostaglandins in cultured pituicytes from the neurohypophysis of adult rats. *Neuroscience Letters*, (in press)
- 9) Li, Z., Miyata, S., Hatton, G.I. (1999) Inositol 1,4,5-triphosphate-sensitive Ca²⁺ stores in rat supraoptic neurons: involvement in histamine-induced enhancement of depolarizing afterpotentials. *Neuroscience*, (in press).
- 10) Miyata, S., Nakai, S., Kiyohara, T., Hatton, G.I. Calbindin-D_{28k} and calretinin in the rat neurohypophysis; light and electron microscopic localization and up regulation with dehydration. *Brain Research*, (in press)

Structural Plasticity of Hypothalamo-Neurohypophysial System with Chronic Salt Loading

SEIJI MIYATA and TOSHIKAZU KIYOHARA

Department of Applied Biology, Kyoto Institute of Technology

The neurohypophysial hormones, oxytocin and arginine vasopressin mainly locate in the magnocellular neurons of the supraoptic and paraventricular nucleus in the hypothalamus. In the hypothalamic magnocellular neurons, reversible morphological changes are seen under chronic osmotic elevation such as dehydration. In the hypothalamic nuclei, this structural reorganization is postulated to be caused by retraction of glial cells from their usual positions between adjacent cell bodies and/or neighboring dendrites. In a similar fashion to the hypothalamic nuclei, the pituicytes in the neurohypophysis generally surround or enclose the axonal terminals of neurohypophysial hormones under basal conditions. 1) The low-molecular-weight microtubule-associated protein-2 (LMW MAP2) is expressed in immature and developing brains. When the rats were dehydrated with chronic osmotic stimulation, the process of MAP2-stained pituicytes was less branched due to retracting their cellular processes as compared with those of well-hydrated control. The quantitative analysis further demonstrated that water deprivation significantly reduced the cell size, perimeter and length of cellular processes of MAP2-stained pituicytes as compared with those of control. This finding that hydration states significantly and reversibly alter *in vivo* pituicyte shape. 2) When pituicytes were treated with adenosine, isoproterenol (β -agonist), and dibutyryl cyclic AMP (dBcAMP), the pituicyte morphology changed from flat to stellate shape. Upon treatment with dBcAMP, stress fibers within pituicyte cytoplasm disappeared, and microtubule assembled in the cellular processes and cytoplasm surrounding the nucleus. The present results reveal that pituicyte shape conversion is mediated via β -adrenergic, adenosine and endotheline and depend on rearrangement of stress fibers and microtubules. 3) Light microscopic immunohistochemistry revealed that the immunoreactivity of calbindin and calretinin was contained in axonal varicose fibers in the posterior pituitary. The immunoelectron microscopic observation showed that both calbindin and calretinin localize preferentially in "active" nerve terminals. In spite of similar localization of calbindin and calretinin within the posterior pituitary, western analysis showed that moreover, dehydration with drinking of 2% NaCl solution and deprivation of drinking water increased calretinin level in the posterior pituitary as compared with well-hydrated control, but calbindin level was not changed. The present immunohistochemical findings demonstrate that both calbindin and calretinin localize in the "active" nerve terminals. However, only calretinin is up regulated with osmotic stimulation, suggesting different physiological role of calbindin and calretinin in the nerve terminals.