

発表番号 50

## 食塩摂取に適応するバソプレッシンニューロンのグルタミン酸

### トランスポーター (DNPI) 遺伝子発現

#### 内在性グルタミン酸によるホルモン分泌の自己制御

助成研究者：久野節二（筑波大学 基礎医学系）

グルタミン酸は最も主要な神経伝達物質として脳の随所で働く興奮性アミノ酸である。我々はヒト脳の新規脳特異的無機リン酸トランスポーター (DNPI) を発見したが、このタンパク質は現在小胞性グルタミン酸トランスポーターの1種 (VGLUT2) としてグルタミン酸作動性ニューロンの研究分野で大いに注目されている。ラット脳においてはこの遺伝子は体内の恒常性維持機構である視床下部の後葉ホルモン分泌神経核に発現している。この遺伝子は松果体にも発現しており、光環境依存性に発現レベルが変化する。松果体ではグルタミン酸によりメラトニン分泌が自己制御されることから、後葉ホルモン分泌に対しても内在性グルタミン酸の作用が考えられる。この考えは後葉ホルモン分泌神経終末におけるグルタミン酸と NMDA 型グルタミン酸受容体の存在からも支持される。本研究では体浸透圧調節機構、特にバソプレッシン分泌と VGLUT2 の発現動態の連関を動物実験により分子形態的および分子生物学的に調べ、内在性グルタミン酸による下垂体後葉ホルモン分泌の自己制御機構の存在を検討した。

ラットを用いて浸透圧刺激負荷実験（水制限実験と高張食塩水投与実験）を行い、VGLUT2 遺伝子発現を *in situ* ハイブリダイゼーション、BAS5000、NIH イメージにより解析した。正常動物の視床下部では、VGLUT2 遺伝子発現は室傍核、視索上核、視床下部外側野などに認められた。水制限実験の BAS5000 解析では、発現が室傍核と視索上核で特異的に増加すること示された。NIH イメージ解析においてもこの変化が確認されたが、室傍核内の領域差は認められなかった。高張塩水投与実験では、BAS5000 解析により室傍核及び視索上核で発現の増加が確認された。NIH イメージ解析では、水制限の結果と同様に発現の増加が室傍核と視索上核の両方で確かめられた。しかし、室傍核においては発現に明瞭な領域差が認められ、バソプレッシンニューロンが集中する領域だけで発現の増加が確かめられた。

本研究によりバソプレッシン分泌ニューロンにおける VGLUT2 の存在が証明され、その発現レベルが体浸透圧の状況に応じて変動することが判った。このことは、浸透圧調節ホルモンであるバソプレッシンの分泌に連動した VGLUT2 発現の変化を反映しており、バソプレッシンニューロンにおけるホルモン分泌亢進に関連して細胞内グルタミン酸輸送活性が上昇することを示唆している。下垂体後葉ホルモン分泌終末におけるグルタミン酸受容体の存在を考慮すると、グルタミン酸が後葉内でホルモンと一緒に放出され、自己の又は近傍のホルモン分泌終末に何らかの神経作用を及ぼす可能性が示唆される。



9

助成番号 0240

## 食塩摂取に適応するバソプレッシンニューロンのグルタミン酸 トランスポーター (DNPI) 遺伝子発現

### —内在性グルタミン酸によるホルモン分泌の自己制御—

助成研究者：久野節二 (筑波大学 基礎医学系)

#### 1. 研究目的

グルタミン酸は最も主要な神経伝達物質として脳の至る所で働く興奮性アミノ酸である。ニューロンにおいてグルタミン酸はシナプスから放出されるが、前シナプス終末においてはシナプス小胞と呼ばれる膜構造内に貯められており、ニューロンの興奮時に放出されて後シナプスニューロンの細胞膜受容体と結合して、神経情報を伝達する。これまでに多種類のグルタミン酸受容体が同定され、その神経伝達物質としての作用機序はよく知られてきた反面、シナプス小胞の中へグルタミン酸を運び、蓄積させる細胞機構についてはその解明が始まったばかりである。最近、我々はヒト脳において新規脳特異的無機リン酸トランスポーター (DNPI) を発見した (Aihara et al, 2000)。その後、DNPIのシナプス小胞へのグルタミン酸輸送活性が報告され、この膜タンパク質が長い間探索されていた小胞性グルタミン酸トランスポーターの1種 (VGLUT2) として強い関心が寄せられている。ラット脳に関して我々は、VGLUT2遺伝子が間脳領域、特に体内環境の恒常性維持機構の中枢である視床下部において下垂体後葉ホルモン分泌神経核 (室傍核と視索上核) の全域に発現することを見出し (Hisano et al, 2000)、VGLUT2が後葉ホルモン分泌ニューロン内のグルタミン酸輸送に関わると考えた (Hisano & Nogami, 2002)。さらに我々はこの遺伝子が松果体にも発現しており、その発現レベルが光環境依存性に変化することを突き止めた (Mogi et al, 未発表)。松果体細胞によるメラトニン分泌は、この細胞自身が放出するグルタミン酸により自己制御されるという報告があり、我々の観察結果はVGLUT2がこの制御過程 (おそらく輸送) に関わることを強く示唆している。以上のことから後葉ホルモン分泌についても内在性グルタミン酸による自己制御機構が考えられ、後葉ホルモン分泌神経終末におけるグルタミン酸の存在やNMDA型グルタミン酸受容体の局在は、この可能性を強く示唆している。本研究では塩濃度変化に応答する体浸透圧調節機構、特にバソプレッシン分泌とVGLUT2の発現動態の連関を動物実験により分子形態的及び分子生物学的に調べ、食塩摂取に対する生体適応反応としての下垂体後葉系ニューロンの新規機能 (内在性グルタミン酸によるホルモン分泌の自己制御) を探索する。

## 2. 研究方法

### 2. 1 実験動物

ラット (SD 系成熟オス、8 週齢、体重 250-300 g、日本クレア) を購入し、実験開始前 2 週間は明暗 14 : 10 時間、自由摂餌及び自由飲水の条件下で飼育した。正常状態の観察に用いた標本は、この条件で飼育した動物から午前中に採取した。

### 2. 2 実験操作

#### 2. 2. 1 水制限実験

動物を以下の 3 群 (各群 n = 5) に分けて、異なる水分摂取条件下で飼育し、実験終了日の午前中に後述の固定操作を行い、視床下部と下垂体を標本として採取した。

①水制限 1 日間 (D 1 群)、②水制限 7 日間 (D 7 群) 及び③自由飲水 (C 群)

#### 2. 2. 2 高張食塩水投与実験

動物を以下の 3 群 (各群 n = 5) に分け、高張 (2%) 食塩水又は水道水で飼育し、実験終了日の午前中に組織固定を行い、視床下部と下垂体を採取した。

①食塩水摂取 4 日間 (S 4 群)、②食塩水摂取 7 日間 (S 7 群)、③水道水摂取 (C 群)

### 2. 3 組織化学的操作

#### 2. 3. 1 組織固定と標本作製

動物をペントバルビタール麻酔下 (50 mg/kg 体重、腹腔内投与) に生理食塩水に引き続き固定液 (4%パラフォルムアルデヒド 0.2%ピクリン酸 0.1%グルタルアルデヒド 0.1 M リン酸緩衝混合液) を経心性に灌流し、固定した。断頭後、視床下部と下垂体を採取し、同液で 15 時間浸漬固定した。組織はエタノール脱水後、パラフィンに包埋した。5 µm 厚の連続した視床下部前頭断切片と下垂体矢状断切片を作成し、解析に用いた。

#### 2. 3. 2 免疫組織化学

バソプレッシン及び VGLUT2 の局在をアビジン ビオチン ペルオキダーゼ複合体法により免疫染色した。特異抗体にはバソプレッシン単体タンパク質 (ニューロフィジン II) に対するマウスモノクローナル抗体 (5,000 倍希釈、Dr Harold Gainer, Laboratory of Neurochemistry, NINDS, NIH) とモルモット抗ラット VGLUT2 抗体を使用した。抗体の特異性は過去の研究で確認されている (Sakata-Haga et al, 2001; Rusnak et al, 2002)。

#### 2. 3. 3 電顕免疫組織化学

下垂体後葉組織をエタノール脱水後、低温条件で Lwicyl K4M に紫外線重合法により包埋して超薄切片を作成した。抗 VGLUT2 抗体 (100-1000 倍希釈) により 4°C で 15 時間処理後、金コロイド標識二次抗体で免疫反応を可視化し、電子顕微鏡で観察した。

#### 2. 3. 4 遺伝子発現解析

<sup>35</sup>S 標識 cRNA プローブを用いた in situ ハイブリダイゼーション (ISH) によりパラフィン切片上で VGLUT2 及びバソプレッシン遺伝子発現を検出した。プローブ作成にはラット VGLUT2 cDNA (Aihara et al, 2000) 及びバソプレッシン前駆体の糖タンパク質をコードする領域の cDNA をテンプレートに、<sup>35</sup>S 標識-UTP の存在下でア

ンチセンス鎖及びセンス鎖 cRNA を *in vitro* 転写により作成した。センス鎖 cRNA はネガティブコントロールとして ISH シグナルの特異性の検討に用いた (Hisano et al, 2000)。プローブを含むバッファーで切片を 50°C で 15 時間ハイブリダイズさせ、洗浄後、風乾した。イメージングプレート処理した後で、オートラジオグラフィによりシグナルの可視化を 2-3 週間の露光、通常の現像・定着操作により行った。一部の切片は、オートラジオグラフィに先だてて免疫染色を上記の方法で行い、バソプレッシンニューロンにおける VGLUT2 遺伝子発現を調べた。

## 2. 4 データ解析と統計

イメージングプレート画像の BAS5000 解析及びオートラジオグラフィ標本の NIH イメージ解析により VGLUT2 遺伝子発現レベルを定量化し、統計解析した。バソプレッシン遺伝子発現については代表個体に関して定性的に発現レベルを検討した。

### 2. 4. 1 BAS5000 による遺伝子発現解析

VGLUT2 遺伝子発現の定量評価には各実験群を構成する全個体の切片を同時に ISH 処理し、解析した。ハイブリダイズが終わった切片をイメージングプレートに圧着させて置いた後、BAS5000 により結合放射活性パターンを画像化した。画像上で室傍核、視索上核及び視床についてそれぞれ全領域の結合放射活性を数値化し、総シグナル量とした。

### 2. 4. 2 NIH イメージによる遺伝子発現解析

BAS5000 解析後、オートラジオグラフィによりシグナルを可視化して顕微鏡でデジタル画像化し、NIH イメージ解析で室傍核及び視索上核の全域の総シグナルレベル、室傍核の 3 亜核（後部大細胞性亜核背側部、PMd、バソプレッシンニューロンが局在；後部大細胞性亜核腹側部、PMv、オキシトシンニューロンが局在；内側小細胞性亜核、MP、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン (CRH) ニューロンが局在）及び視索上核腹側部（バソプレッシンニューロンが局在）と背側部（オキシトシンニューロンが局在）のシグナルレベルをそれぞれ測定し、光学密度として数値化した。

### 2. 4. 3 統計解析

BAS5000 解析及び ISH 解析データの有意検定は *post hoc* テストにより行った。

## 3. 研究結果

### 3. 1 正常動物における VGLUT2 遺伝子発現

正常動物の視床下部における VGLUT2 遺伝子発現の ISH 解析では、高レベルのシグナルを示すニューロンが視床下部外側野、腹内側核、背内側核及び弓状核に認められ、室傍核 (Fig. 1A、G) と視索上核 (Fig. 1D、J) の発現は中程度であった。ただし、室傍核においては、シグナルレベルに明瞭な核内の領域差が認められ、バソプレッシンニューロンが集中する PMd (Fig. 1A と G の矢印で示した部位) では低く、オキシトシンニューロンが存在する PMv と CRH ニューロンが局在する MP では中程度であった (Fig. 1A、G)。

バソプレッシンの免疫染色を併用した ISH 解析では、少数のバソプレッシン陽性ニ

ニューロンの細胞体に VGLUT2 遺伝子発現を示す ISH シグナルが観察できた。下垂体後葉に関する免疫組織化学的解析では、光学顕微鏡レベルで VGLUT2 陽性反応が神経終末に認められた。電顕免疫組織化学による VGLUT2 の下垂体後葉神経線維内局在の解析を金コロイド法により試みたが、非特異反応が強く明確な結果が得られなかった。

### 3. 2 下垂体後葉神経内分泌系における VGLUT2 遺伝子発現に及ぼす水制限の影響

VGLUT2 遺伝子発現に関する BAS5000 解析では、室傍核において D 7 群で有意な発現の増加 ( $P<0.05$ ) が認められた (Fig. 2A)。D 1 群については統計学的有意差は認められないが、発現レベルの増加傾向 ( $P=0.06$ ) が観察できた。視索上核における発現についても同様の結果が得られ、D 7 群で有意な増加 ( $P<0.05$ ) と D 1 群での増加傾向が観察できた (Fig. 2B)。これらの下垂体後葉神経内分泌核における結果と対照的に、視床では実験群間で有意な発現の違いは認められなかった (Fig. 2A、B)。このことは、VGLUT2 遺伝子発現の変化が室傍核や視索上核に特異的であることを示している。

水制限実験について ISH データの NIH イメージ解析を行い、BAS5000 解析結果をさらに検証した。VGLUT2 の解析に先行して本研究での水制限実験の有効性を確かめる目的でバソプレッシン遺伝子発現の ISH 解析を行った。本来は全動物について解析を行うべきではあるが標本数に限りがあるため、各動物群から無作為に 2 個体の切片を選択して解析し、室傍核及び視索上核のいずれにおいても明瞭なバソプレッシン遺伝子発現の増加を定性的に確認した。この結果から本実験の有効性が確認されたと判断して、各実験群の室傍核及び視索上核における VGLUT2 遺伝子発現を解析した。ISH 標本の顕微鏡による組織学的観察では、D 1 群でシグナルの増加傾向 (Fig. 1B、E) が、さらに D 7 群でシグナルの増強 (Fig. 1C、F) が室傍核と視索上核の両方で確認された。特に、室傍核大細胞性垂核のうち PMd (矢印で示された部位) においてこの変化が明瞭であった。

定量解析では、室傍核の総シグナルレベルは C 群と比較して D 7 群において高い ( $P<0.01$ ) が、D 1 群では有意差は認められなかった (Fig. 3A)。さらに、VGLUT2 遺伝子発現の室傍核内の領域的差異を調べるために室傍核垂核についてそれぞれ核動物群でシグナルレベルを比較した。いずれの垂核においても群間の相違は総シグナルと同じパターンを示し、室傍核内における VGLUT2 遺伝子発現の明瞭な領域的相違は認められなかった (Fig. 3B)。つまり、水制限による室傍核での VGLUT2 遺伝子発現の増加は 3 垂核に共通した変化であることが示された。視索上核の解析では、核の総シグナルレベルは C 群と比較して D 7 群で高く (Fig. 3C)、D 1 群では有意差はないものの増加傾向 ( $P=0.06$ ) を示した。腹側部では総シグナルのパターンとほぼ同様に D 7 群で高く、背側部では D 1 群と D 7 群で有意に高いシグナルが認められ (Fig. 3D)、水制限による VGLUT2 遺伝子発現の増加が確認された。

### 3. 3 下垂体後葉神経内分泌系における VGLUT2 遺伝子発現に及ぼす食塩摂取の影響

高張食塩水投与実験において各実験群の VGLUT2 遺伝子発現を BAS5000 により解析した結果、室傍核において C 群と比べて有意な発現レベルの増加 ( $P<0.05$ ) が S 7 群で認められ (Fig. 2C)、S 4 群では有意差はないが増加傾向が認められた。視索上核においては、S 4 群と S 7 群の両者が有意な発現増加 ( $P<0.05$ ) を示した (Fig. 2D)。水制限実験の結果と同様に視床のシグナルには動物群間で有意差は認められなかった。

この実験操作の有効性を確かめる目的で室傍核と視索上核におけるバソプレッシン遺伝子発現を前述のように ISH 解析により定性的に検討した。C 群と比較して S 4 群と S 7 群においてバソプレッシン遺伝子発現の増加を示す高いシグナルが検出できた。この結果を高張食塩水投与実験の有効性を示すものと判断して、ISH 標本の組織学的及び定量解析を行い、BAS5000 解析の結果を検証した。組織学的観察では、室傍核と視索上核の両方に関して S 4 群 (Fig. 1H、K) と S 7 群 (Fig. 1I、L) で明瞭なシグナルの増加が観察された。この変化は室傍核の PMd (Fig. 1G L の矢印で示された部位) において特に顕著であった。

シグナルを定量した結果は、この組織学的観察結果とよく一致して室傍核の総シグナルレベルは C 群と比較して D 7 群において明らかに高く ( $P<0.01$ )、D 1 群では有意差はないが増加傾向が認められた ( $P=0.06$ ) (Fig. 3E)。室傍核における領域的相違についての解析では、水制限実験とは明らかに異なる結果が得られた。シグナルレベルは S 7 群の PMd で有意に高く ( $P<0.01$ ) (Fig. 3F)、S 4 群で有意差はないが増加傾向が認められた。しかし、水制限実験でシグナルの増加が観察された他の 2 つの垂核 (PMv と MP) では S 4 群と S 7 群のいずれにおいてもシグナルレベルに変化は認められなかった。視索上核全体に関する定量解析では、室傍核と異なり D 4 群と D 7 群において C 群より高い総シグナルレベル ( $P<0.01$ ) が確認され (Fig. 3G)、同様の結果が核の腹側部と背側部のいずれにおいても得られた (Fig. 3H)。

## 4. 考察

本研究により視床下部下垂体後葉系のバソプレッシン分泌ニューロンにおけるシナプス小胞性グルタミン酸トランスポーター (VGLUT2) の存在が分子細胞化学的方法により証明され、その遺伝子発現レベルは体浸透圧刺激負荷によって変化することが示された。我々は、ラット松果体で VGLUT2 遺伝子発現が明暗環境に依存して変化することを既に見出しているが、今回の結果はこの遺伝子が下垂体後葉ホルモン分泌ニューロンにおいては、松果体に関する刺激とは全く異なった内的生理刺激によって変化することを示している。これとは別に我々は、数種類の下垂体前葉培養細胞株においてもこのトランスポーター遺伝子が発現することを突き止めており、現在、ホルモン分泌刺激操作による発現動態を解析している。これらの結果は、生体において VGLUT2 がグルタミン酸作動性ニューロンにだけ存在するのではなく、神経内分泌ニューロンを含めて種々のホルモン分泌細胞に広汎に発現していること、おそらく

これらのホルモン分泌細胞に共通した分泌プロセスに関するグルタミン酸の作用に VGLUT2 が関わること、そして VGLUT2 により輸送が制御される内在性グルタミン酸が各種ホルモン分泌を自己調節する可能性を示唆している。

松果体初代培養細胞を用いたグルタミン酸の生理作用に関する先行研究では、メラトニンの分泌は上頸神経節由来の交感神経節後ニューロンにより支配され、その神経伝達物質であるノルアドレナリンにより亢進することが報告されている。この実験系では、松果体細胞からメラトニンが分泌される際に、同時にグルタミン酸も放出され、自己分泌されたグルタミン酸はメラトニン分泌を自己抑制することが示されている。ところで、下垂体後葉に関する過去の研究は、後葉の神経内分泌終末におけるグルタミン酸の作用を示唆するいくつかの興味ある知見を示している。電顕免疫組織化学的解析からグルタミン酸免疫陽性反応がシナプス様小胞に局在し、ホルモン分泌顆粒には観察されないことが報告されている。この観察所見と VGLUT2 遺伝子と免疫活性がそれぞれ下垂体後葉ホルモン分泌ニューロンと下垂体後葉に発現することを示した本研究の結果とを合わせて考えた場合、後葉ホルモン分泌終末のシナプス様小胞に存在するグルタミン酸を輸送するトランスポーターとして VGLUT2 が機能することが強く示唆される。さらに、下垂体後葉におけるグルタミン酸受容体の研究では、NMDA 型受容体がホルモン分泌神経終末に局在することが報告されている。したがって、VGLUT2 により小胞内へ輸送されたグルタミン酸はホルモン分泌ニューロンの興奮に応じてホルモンと一緒に放出され、自己及び近傍のホルモン分泌終末に存在する NMDA 型受容体に結合して、何らかの神経作用を及ぼすという図式が考えられ、それに必要な条件（つまりグルタミン酸トランスポーター、グルタミン酸、そしてグルタミン酸受容体）の全てを下垂体後葉ホルモンニューロンが満たしていることになる。今回の体浸透圧負荷実験により示された VGLUT2 遺伝子発現の増加は、バソプレッシン分泌が亢進した状況においてグルタミン酸の同期的分泌が増加し、それに伴って起こる輸送タンパク質の合成の増加を反映した結果と考えられる。

本研究では水制限実験と高張食塩水投与実験の結果、いずれの実験条件においても VGLUT2 遺伝子発現の増加が認められた。ただ、長期水制限と長期高張食塩水投与の効果には違いがあり、室傍核の3つの亜核における VGLUT2 遺伝子発現は明瞭な相違を示した。長期脱水動物では、PMd、PMv 及び MP の全亜核において遺伝子発現の増加が認められたのに対し、高張食塩水摂取動物では、PMd においてのみ発現の増加が確認された。この相違は、高張食塩水摂取ではバソプレッシンニューロンだけが応答し、長期脱水ではバソプレッシンニューロンに加えて、オキシトシンニューロンや CRH ニューロンがストレス性応答を現すことを示唆している。

## 5. 今後の課題

今回の研究により、下垂体後葉ホルモン分泌系において VGLUT2 遺伝子発現が体浸透圧を実験的に高める操作により増加することが示され、調節ホルモンとしてのバソプレッシン分泌に関連した VGLUT2 の生理的役割が強く示唆された。この結果、本研究の目標の第1段階をクリアすることができたが、当初計画に上げたいいくつかの



課題が残されている。浸透圧負荷状況からの回復過程における室傍核や視索上核における VGLUT2 遺伝子発現の推移、下垂体後葉神経終末における VGLUT2 タンパク質の局在部位、神経終末におけるバソプレッシン分泌に対するグルタミン酸の作用などの問題を解決する必要がある。

## 6. 文献

- Aihara Y, Mashima H, Onda H, Hisano S, Kasuya H, Hori T, Yamada S, Tomura H, Yamada Y, Inoue I, Kojima I, Takeda J (2000) Molecular cloning of a novel brain-type  $\text{Na}^+$ -dependent inorganic phosphate cotransporter. *J Neurochem* 74: 2622-2625.
- Hisano S, Nogami H (2002) Transporters in the neurohypophysial neuroendocrine system, with special reference to vesicular glutamate transporters (BNPI and DNPI): a review. *Microsc Res Tech* 56: 122-131.
- Hisano S, Hoshi K, Ikeda Y, Maruyama D, Kanemoto M, Ichijo H, Kojima I, Takeda J, Nogami H (2000) Regional expression of a gene encoding a neuron-specific  $\text{Na}^+$ -dependent inorganic phosphate cotransporter (DNPI) in the rat forebrain. *Mol Brain Res* 83: 34-43.
- Rusnak M, House SB, Arima H, Gainer H (2002) Ciliary neurotrophic factor increases the survival of magnocellular vasopressin and oxytocin neurons in rat supraoptic nucleus in organotypic cultures. *Microsc Res Tech* 56: 101-112.
- Sakata-Haga M, Kanemoto M, Maruyama D, Hoshi K, Mogi K, Narita M, Okado N, Ikeda Y, Nogami H, Fukui Y, Kojima I, Takeda J, Hisano S (2001) Differential localization and colocalization of two neuron-types of sodium-dependent inorganic phosphate cotransporters in rat forebrain. *Brain Res* 902: 143-155.

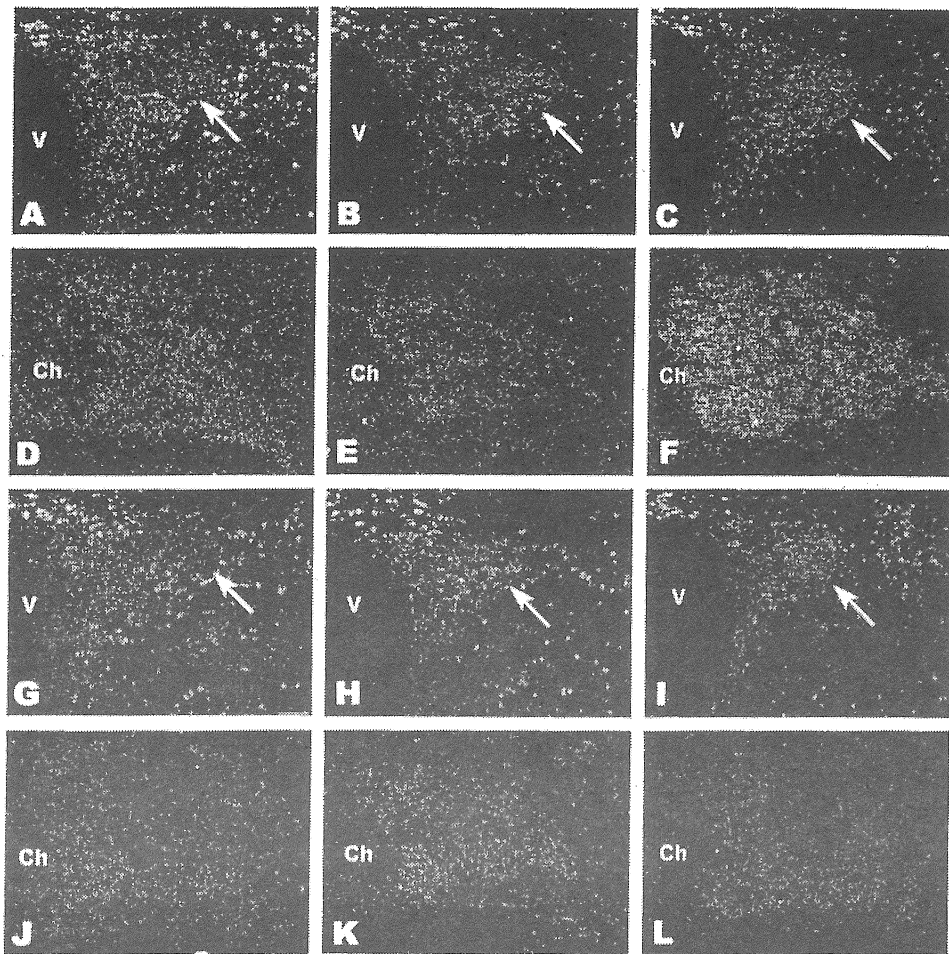
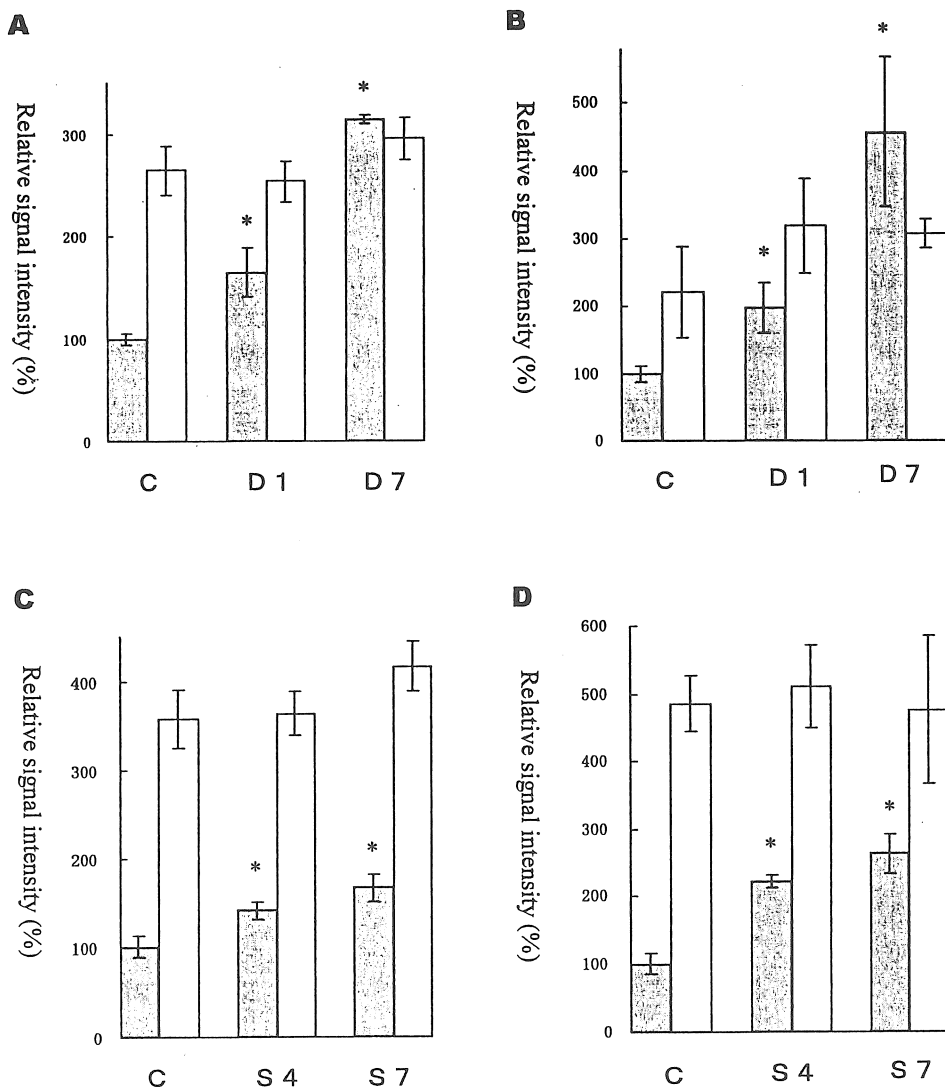
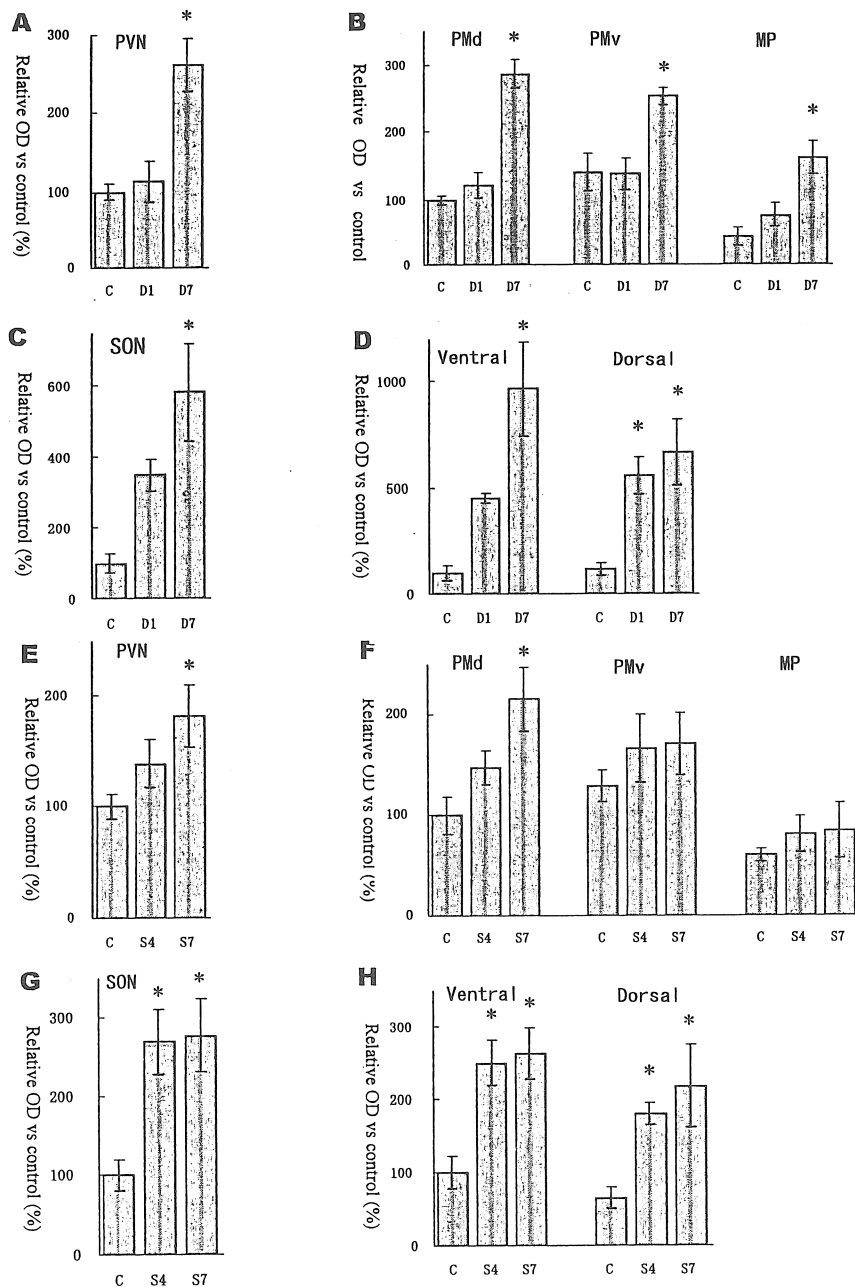


Fig. 1. Representative photographs showing in situ hybridization signals in the paraventricular (PVN) and supraoptic nuclei (SON) of rats. **A**, control PVN; **B**, D4 PVN; **C**, D7 PVN; **D**, control SON; **E**, D4 SON; **F**, D7 SON; **G**, control PVN; **H**, S4 PVN; **I**, S7 PVN; **J**, control SON; **K**, S4 SON and **L**, S7 SON. Arrows indicate dorsal parts of posterior magnocellular subdivisions. Ch, optic chiasm; V, third ventricle.



**Fig. 2.** Quantification of in situ hybridization signals by BAS 5000. **A**, the paraventricular nucleus (PVN) of dehydrated rats; **B**, the supraoptic nucleus (SON) of dehydrated rats; **C**, PVN of salt-loaded rats and **D**, SON of salt-loaded rats. Closed columns represent values of the PVN or the SON, while open columns show that of the thalamus (as an internal control). The average intensity of signals in each animal group is shown as the relative value (%) to that of control animals. Asterisks indicate the significant difference vs control. C, control; D1, dehydration for 1 day; D7, dehydration for 7 days; S4, salt loading for 4 days, and S7, salt loading for 7 days.



**Fig. 3.** Semi-quantitative analysis of in situ hybridization signals with NIH image. **A-D**, dehydration experiment. **E-H**, salt loading experiment. The average intensity of signals in each animal group is shown as the relative value (%) to that of control animals. Asterisks indicate the significant difference vs control. PMd, posterior magnocellular subdivision, dorsal part; PMv, posterior magnocellular subdivision, ventral part; MP, medial parvocellular subdivision; PVN, paraventricular nucleus; SON, supraoptic nucleus

## **Adaptive regulation of vesicular glutamate transporter (DNPI) gene expression in vasopressinergic neurons to salt intake—the self-regulation of hormone secretion by intrinsic glutamate**

Setsuji Hisano

Laboratory of Neuroendocrinology, Institute of Basic Medical Sciences,  
University of Tsukuba

### **Summary**

Glutamate is an excitatory amino acid that acts as a major neurotransmitter throughout the brain. Recently, we discovered a novel inorganic phosphate cotransporter (DNPI), which attracts particular attention of neuroscientists as one of vesicular glutamate transporters (VGLUT2). In the rat brain, expression of VGLUT2 gene has been found in hypothalamic neurohypophysial neuroendocrine nuclei. This gene is also expressed in the pineal gland and the expression level depends on the environmental light condition. Glutamate in the gland is reported to regulate melatonin secretion in an autocrine fashion. Taken altogether, it is possible that intrinsic glutamate in the neurohypophysial neuroendocrine neurons regulates the hormone release at their terminal level, as supported by the presence of glutamate and NMDA receptors in the neuroendocrine terminals. The aim of this study is to explore experimentally the glutamatergic self-regulation of the hormone release by examining a correlation between vasopressin secretion and VGLUT2 expression. To this end, we evaluated expression levels of VGLUT2 gene in rats, which were dehydrated by water-deprivation or salt-loaded by drinking hypertonic saline, with *in situ* hybridization followed by BAS5000 and NIH image analyses. Under the normal condition, the gene expression was demonstrated in the paraventricular nucleus (PVN), supraoptic nucleus (SON) and lateral hypothalamic area. The BAS analysis on the dehydrated rats revealed that expression levels of VGLUT2 gene are specifically increased in the PVN and SON, and this was confirmed by NIH image analysis. However, no subregional difference within the PVN was observed in any dehydrated rats. In the salt-loading experiment, an increase of the gene expression levels was verified in both the PVN and SON. In contrast to the dehydrated rats, however, the increase of gene expression in the PVN was detectable only in the dorsal part of posterior magnocellular subdivision, a vasopressinergic neuron-dominant subregion. This study demonstrates that vasopressinergic neurons contain VGLUT2 whose gene expression is dynamically altered depending on the internal osmotic condition, suggesting an involvement of VGLUT2 in the self-regulation of vasopressin release by neurohypophysial glutamate.