

発表番号 57 (0328)

食塩摂取により神経分泌細胞上での発現が低下する 新規ステロイド結合膜タンパク質の機能に関する研究

助成研究者：浮穴和義（広島大学総合科学部）

共同研究者：筒井和義（広島大学総合科学部）

これまで我々は、末梢内分泌腺とは独立して脳が自らステロイドを合成することを見出し、この脳がつくる「ニューロステロイド」の合成と作用を解析してきた。哺乳類においてステロイド膜受容体の候補物質として報告されたタンパク質(Membrane Steroid Binding Protein; 以下、MSBP と呼ぶ)をニューロステロイドの標的物質と考えて解析している途中で、鳥類のウズラの脳ではこの MSBP が、脳下垂体後葉ホルモンを合成している神経分泌細胞に発現していることを見出した。さらに、この発現が食塩摂取により低下することも発見したので、本研究では MSBP の生理的変動を明らかにすることを目的とした。

MSBP の発現部位と発現量は、MSBP に対する抗体を用いた免疫組織化学的解析により検討した。まず、急性浸透圧ストレスによる MSBP の発現様式を解析するために、200 マイクロリットルの 9% NaCl を腹腔内投与し、投与して 1、3、6、10 時間後における脳内の発現量を解析した。その結果、MSBP は、約 60% の神経分泌細胞に発現していたが、その発現量は、いずれの処理時間にかかわらず 0.9% NaCl 処理したコントロール群と変化が見られなかった。次に、慢性浸透圧ストレスを与えて MSBP の発現量を解析するために、2% NaCl を飲水させた。その結果、2% NaCl を 4 日間飲水させると水のみを飲水させたコントロール群と比較して顕著に免疫陽性反応を示す神経分泌細胞数が減少した。鳥類の神経分泌細胞は、哺乳類と同様に視索上核(SON)と室傍核(PVN)に局在しているが、各々の神経核上の免疫陽性細胞数をカウントしたところ、どちらの神経核においても免疫陽性細胞数が減っていた。さらに、4 日間絶水処理を施した個体群でも 2% NaCl を 4 日間飲水させた個体群と同様に免疫陽性反応が低下した。そこで、経時的变化を調べるために、2 日間絶水処理群や 4 日間絶水処理後に飲水を再開して 12 時間及び 24 時間後にサンプリングした個体群を用い MSBP の発現様式を解析した。その結果、2 日間の絶水処理では免疫陽性細胞数の減少は認められなかった。一方、4 日間絶水処理により低下していた免疫陽性反応は、飲水再開後 12 時間ではまだ低下したままであったが、24 時間後ではコントロールと同様の免疫反応へ回復していた。この経時的变化は、血漿中の脳下垂体後葉ホルモンの濃度と負の相関を示していた。一方、絶食ストレスや、副腎皮質ホルモンであるアルドステロン of 皮下投与によっては MSBP の発現量は全く影響を受けなかった。

以上の結果から、神経分泌細胞上に発現している MSBP は、慢性浸透圧ストレスに応答するタンパク質であり、脳下垂体後葉ホルモンの合成量を制御している可能性が示唆された。

2

助成番号 0328

食塩摂取により神経分泌細胞上での発現が低下する新規ステロイド結合膜タンパク質の機能に関する研究

助成研究者：浮穴和義（広島大学総合科学部）

共同研究者：筒井和義（広島大学総合科学部）

1. 研究目的

高次情報処理中枢である脳は、これまで内分泌学的には末梢内分泌腺がつくるステロイドホルモンの標的器官として捉えられていた。しかし、最近の我々の研究から、脳が独自にステロイドを合成することを見出した。この脳がつくるステロイドは「ニューロステロイド」と呼ばれており、我々はニューロステロイドの合成と作用を解析してきた(Tsutsui et al., 1999, 2000, 2003 総説)。最近、哺乳類においてステロイド膜受容体の候補物質として報告されたタンパク質(Membrane Steroid Binding Protein; 以下、MSBP と呼ぶ)をニューロステロイドの標的物質と考えて解析している途中で、鳥類のウズラの脳において、この MSBP は脳下垂体後葉ホルモンであるアルギニンバソトシンを合成している神経分泌細胞に特異的に発現していることを見出した。さらに、この発現が食塩摂取により低下することも発見したので、MSBP の機能を明らかにする目的で、急性及び慢性浸透圧ストレス処理による MSBP の発現の生理的変動を解析した。さらに、浸透圧ストレス以外のストレスを与えるために絶食ストレス処理を行い、同様に解析した。また、MSBP のステロイド結合能を検討するとともに、ステロイドのフィードバック機構を調べるために副腎皮質ホルモンによる MSBP の発現制御の可能性も併せて解析した。

2. 研究方法

2.1 材料

3 ヶ月齢の成熟雄ウズラを東海有機より購入し実験に用いた。個別にケージに入れて飼育し、エサは鳥類用の動物飼料を自由に摂食させた。

2.2 免疫組織化学的解析

ラットでクローニングされた MSBP の cDNA 配列をもとに大腸菌で組み換えタンパク質を合成し、組み換えタンパク質に対する抗体を作製した。この抗体は、ウズラの MSBP を認識することをウェスタンブロット法により確認した。

ウズラの脳をブアン固定液に一晩沈めて固定した後、クリオスタットにて 50 マイクロメートルの脳切片を作製し、ABC 法にて免疫染色を行った。免疫陽性細胞は、顕微鏡にて観察し、神経分泌細胞が局在している視索上核 (SON) と室傍核 (PVN) に分けて各々の神経核内の免疫陽性細胞

胞数をカウントした。

2.3 急性浸透圧ストレス処理

急性浸透圧ストレス処理のために、200 マイクロリットルの 9% NaCl を腹腔内投与し、投与して 1、3、6、10 時間後に脳をサンプリングし、脳内の MSBP の発現量を解析した。9% NaCl を腹腔内投与した後は、絶水した。また、コントロール群には、200 マイクロリットルの 0.9% NaCl を腹腔内投与した。

2.4 慢性浸透圧ストレス処理と飲水再開処理

慢性浸透圧ストレスを与えて MSBP の発現量の変化を解析するために、2% NaCl を 4 日間飲水させた。また、4 日間絶水処理を施した個体でも同様に解析した。さらに、経時的变化を調べるために、2 日間絶水処理群と 4 日間絶水処理後に飲水を再開して 12 時間及び 24 時間後にサンプリングした個体群を用いて MSBP の発現量を解析した。

2.5 絶食ストレス処理

浸透圧ストレスではなく、絶食ストレスを与えて MSBP の発現様式を解析した。4 日間絶食させたが、その間、飲水は自由にさせた。

2.6 副腎皮質ホルモン処理

ステロイドホルモンによる MSBP のフィードバック現象があるかどうかを検討するために、浸透圧ストレス時に変動する副腎皮質ホルモンであるアルドステロンを投与し、MSBP の発現量を解析した。アルドステロンはサイラスティックチューブに入れて 1mg/個体となるように皮下に埋め込み、1 週間後に脳をサンプリングし解析した。

2.7 MSBP のステロイド結合能の検討

MSBP は、もともと哺乳類において膜に局在するプロゲステロンの結合タンパク質として報告されたので、実際に鳥類のウズラにおいてもプロゲステロンと結合するかどうかをウズラの MSBP をクローニングした後、組み換えタンパク質を作製して結合能を解析した。トレーサー物質として ^3H プロゲステロンを用いた。

さらに、哺乳類では MSBP は、二量体分子として組織内に存在してプロゲステロンと結合することが知られている。そこで、ウズラの脳内においても二量体分子で存在しているかどうかを非還元条件下での SDS-PAGE 及びウェスタンブロット法にて存在様式を解析した。

3. 研究結果

3.1 急性浸透圧ストレスの効果

まず、MSBPは視索上核（SON）と室傍核（PVN）に局在している神経分泌細胞に発現していることがわかっている（Fig. 1）。さらに、脳下垂体後葉ホルモンであるアルギニンバソトシンニューロンの約60%の細胞に共存していることも明らかにしている（Fig. 2）。

急性浸透圧ストレスによるMSBPの発現様式を解析するために、200マイクロリットルの9% NaClを腹腔内投与し、投与して1、3、6、10時間後の脳内の発現を解析した。その結果、MSBPの発現量は、いずれの処理時間にかかわらず0.9% NaCl処理したコントロール群と変化がないことがわかった。

3.2 慢性浸透圧ストレスとストレス解除の効果

2% NaClを4日間飲水させて慢性浸透圧ストレスを与えた。その結果、2% NaClを4日間飲水させると水のみを飲水させたコントロール群と比較して顕著に免疫陽性反応を示す神経分泌細胞数が減少した（Fig. 3）。視索上核（SON）と室傍核（PVN）のどちらの神経核においてもMSBPの免疫陽性細胞数が減少していた（Fig. 3）。

さらに、4日間絶水処理を施した個体でも2% NaClを4日間飲水させた個体と同様に免疫陽性反応は低下した（Fig. 4）。そこで、経時的变化を調べるために、2日間絶水処理群と4日間絶水処理後に飲水を再開して12時間及び24時間後にサンプリングした個体群を用いてMSBPの発現様式を解析した。その結果、2日間絶水処理では、コントロール群と同様に免疫陽性反応の低下は認められなかった（Fig. 5）。一方、4日間絶水処理により低下していた免疫陽性反応は、飲水再開後12時間ではまだ低下したままであったが、24時間後ではコントロール群と同様の免疫陽性反応へ回復していた（Fig. 5）。この経時的变化は、血漿中の脳下垂体後葉ホルモンの濃度と負の相関を示していた（Fig. 6）。また、体重と血漿浸透圧も浸透圧ストレス負荷により有意に変化した（Fig. 6）。

3.3 絶食ストレスの効果

2% NaCl飲水処理や絶水処理により体重が減少するが、この体重の減少とMSBPとの関係を検討するために、浸透圧ストレスは与えずに4日間絶食させてMSBPの発現量を解析した。その結果、MSBPの免疫陽性反応はコントロール群と比べて全く差が認められなかった（Fig. 7）。

3.4 副腎皮質ホルモンの効果

浸透圧ストレス負荷状態では、副腎から副腎皮質ホルモンのアルドステロンの分泌が高まり、Naイオンや水分保持がなされることが知られている。そこで、アルドステロンによるMSBPの発現量へのフィードバック効果が見られるかどうかを検討した。アルドステロンを1週間皮下投与し、MSBPの発現量を解析したが、コントロール群と免疫陽性反応に変化は見られなかった（Fig. 8）。

3.5 MSBP のステロイド結合能

もともと哺乳類のMSBPは、プロゲステロンに結合する膜内在性タンパク質として報告された。そこで、ウズラのMSBPをクローニングし、プロゲステロン結合能があるかどうかを組み換えタンパク質を作製して結合実験を行った。まず、ウズラのMSBPは、哺乳類のヒト、ブタ、ラット及びマウスと約70%のホモロジーを示した (Fig. 9)。さらに、結合実験の結果、ウズラのMSBPにはプロゲステロン結合能がないことが明らかとなった。

一方、哺乳類のMSBPは、二量体分子として存在することで初めてプロゲステロン結合能が見られることが報告されているので、ウズラでの存在様式を非還元条件下でのSDS-PAGE及びウェスタンブロット法により解析した。その結果、ウズラのMSBPは、単量体として脳内に存在していることが明らかとなった。

4. 考察

本研究により、MSBPはアルギニンバソトシンを合成している神経分泌細胞の約60%の細胞に局在していることが明らかとなった。アルギニンバソトシンは、哺乳類のアルギニンバソプレッシンの鳥類におけるカウンターパートであり、鳥類においても抗利尿ホルモンとして働くことが知られている。

また、MSBPの発現は急性の浸透圧ストレスでは影響は見られないが、慢性の浸透圧ストレスで発現が低下することが明らかになった。この慢性浸透圧ストレスがかかった際の生体反応としては、脱水による体重の減少、浸透圧上昇、神経分泌細胞からのアルギニンバソトシンの合成と分泌の亢進が起こることが本実験結果からも示された。神経分泌細胞でのMSBPの発現量の低下は、アルギニンバソトシンの合成・分泌との関係が示唆される。つまり、慢性浸透圧ストレス条件下でのMSBPの発現低下とアルギニンバソトシンの合成・分泌亢進の負の相関から、MSBPはアルギニンバソトシン合成の負のレギュレーターとして働いている可能性が考えられる。また、別の慢性ストレスである絶食ストレスをかけてもMSBPの発現には何ら影響が見られなかったことから、このMSBPは、浸透圧応答タンパク質であると言える。

本来、MSBPは、哺乳類のブタの肝臓からプロゲステロンと結合する膜タンパク質として同定されたものである (Meyer et al., 1996; Falkenstein et al., 1996)。ウズラのMSBPをクローニングした結果、その配列のホモロジーは哺乳類と高いにもかかわらず、組み換えウズラMSBPにプロゲステロン結合能は認められなかった。さらに、脳内において単量体として存在しているという結果から、ウズラにおいてMSBPはプロゲステロン結合タンパク質としては働いていないと思われる。実際、哺乳類においてもMSBPは軸索ガイダンス因子として働き、プロゲステロン結合タンパク質として働いていないのではないかと主張するグループもあり、このタンパク質の多機能な働きが考えられる (Runko et al., 1999)。

また、今回用いたMSBPに対する抗体で哺乳類のラット及びマウスの脳内でのMSBPの発現を検討したところ、神経分泌細胞に免疫陽性反応は認められず、他の神経細胞が染色された。具体

的に述べると、同じ抗体を用いてラットの小脳を解析したところ、MSBP は、小脳皮質に存在するプルキンエ細胞に発現しており、その発現は新生期に高まることが明らかになった(Sakamoto et al., 2004)。一方、鳥類のウズラでは、小脳プルキンエ細胞を含めた神経分泌細胞以外の細胞には免疫陽性反応は認められなかった。これらの結果から、同族タンパク質でも種によって機能が異なっていることが考えられる。

本研究では、浸透圧変化により副腎皮質から分泌されるアルドステロンが MSBP と相互作用するかどうかを検討するために、MSBP の発現量へのフィードバック効果を更に検討した。その結果、MSBP の発現には、アルドステロンは全く影響を与えないというものであった。しかし、それでは慢性浸透圧ストレスのシグナルはどのようにして神経分泌細胞上の MSBP の発現制御に伝わるのであろうか。脳弓下器官などの浸透圧受容体がある部位からの信号がどのように MSBP の発現制御に伝わるかを解析していくことは、脳下垂体後葉ホルモンの合成と放出のメカニズムを理解する上でも重要な課題であると思われる。

5. 今後の課題

上述の通り、我々が鳥類のウズラで解析している MSBP は、哺乳類で報告されているようなステロイド結合タンパク質として機能しているタンパク質ではないと思われる。今回の一連の解析によりこの MSBP は、慢性浸透圧ストレス応答タンパク質であることは間違いないが、このタンパク質が神経分泌細胞内でどのような機能を持っているかは未だ不明である。今後は、このタンパク質の発現を RNA 干渉などの手法によりノックダウンし、脳下垂体後葉ホルモンの合成と分泌にどのような影響があるかを明らかにしていく必要がある。

6. 文献

Falkenstein E, Meyer C, Eisen C, Scriba PC, Wehling M. Full-length cDNA sequence of a progesterone membrane-binding protein from porcine vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 229:86-89 (1996)

Meyer C, Schmid R, Scriba PC, Wehling M. Purification and partial sequencing of high-affinity progesterone-binding site(s) from porcine liver membranes. *Eur. J. Biochem.* 239:726-731 (1996)

Runko E, Wideman C, Kaprielian Z. Cloning and expression of VEMA: a novel ventral midline antigen in the rat CNS. *Mol. Cell. Neurosci.* 14:428-443 (1999)

Sakamoto H, Ukena K, Takemori H, Okamoto M, Kawata M, Tsutsui K. Expression and localization of 25-Dx, a membrane-associated putative progesterone-binding protein, in the developent Purkinje cell. *Neuroscience* (2004, in press)

Tsutsui K, Ukena K, Takase M, Kohchi C, Lea RW. Neurosteroid biosynthesis in vertebrate brains (review). *Comp. Biochem. Physiol. C* 124:121-129 (1999)

Tsutsui K, Ukena K, Usui M, Sakamoto H, Takase M. Novel brain function: biosynthesis and actions of neurosteroids in neurons (review). *Neurosci. Res.* 36:261-273 (2000)

Tsutsui K, Matsunaga M, Ukena K. Biosynthesis and biological actions of neurosteroids in the avian brain (review). *Avian Poult. Biol. Rev.* 14:63-78 (2003)

MSBP-like immunoreactivity

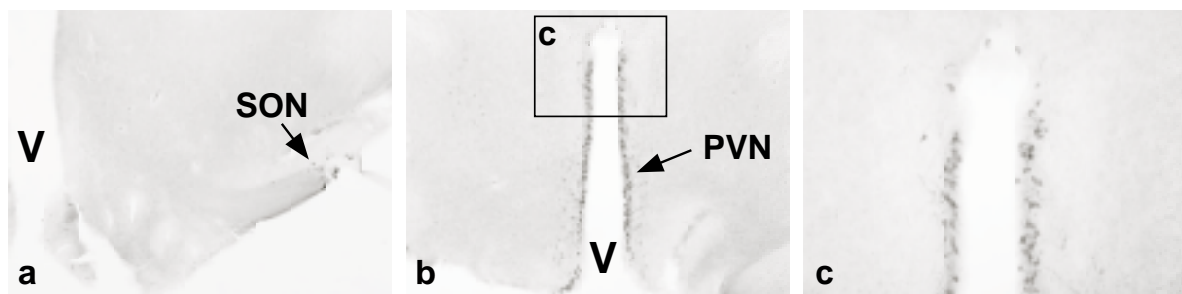


Fig. 1 Localization of the membrane steroid binding protein (MSBP)-like immunoreactivity in the neurosecretory cells. SON; Supraoptic nucleus, PVN; Paraventricular nucleus, V; Third ventricle.

Mirror image

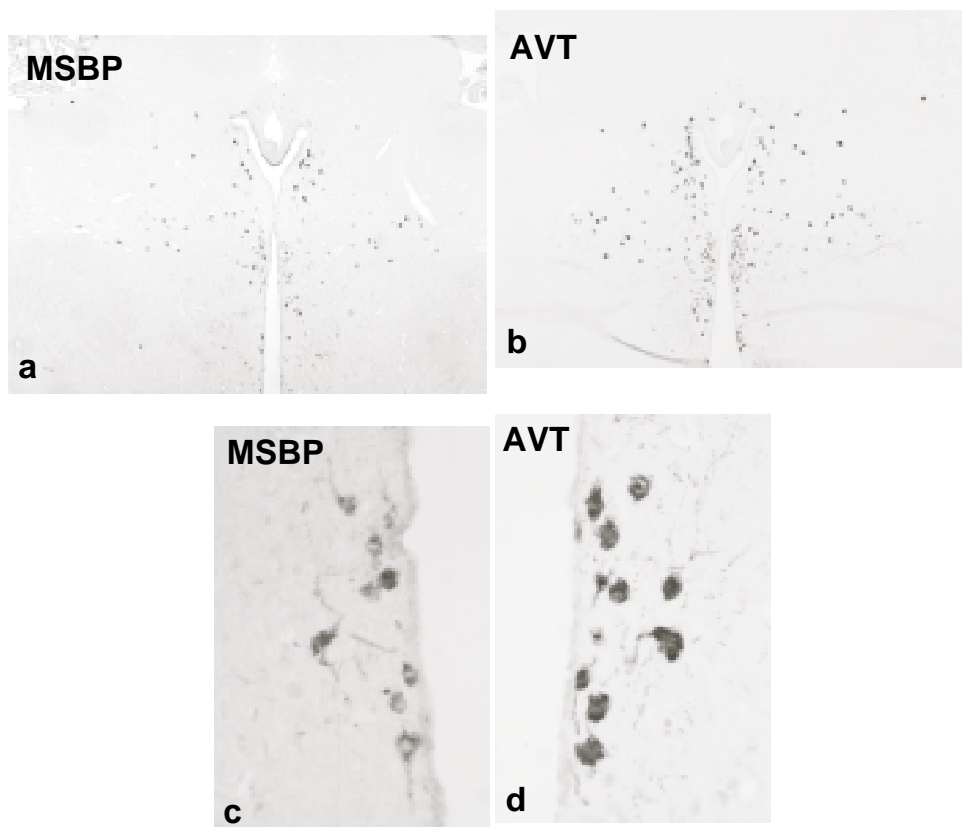


Fig. 2 Mirror image analysis of co-localization of the membrane steroid binding protein (MSBP) and arginine vasotocin (AVT)-like immunoreactivity in the neurosecretory cells. (a) and (b) are lower magnifications. (c) and (d) are higher magnifications.

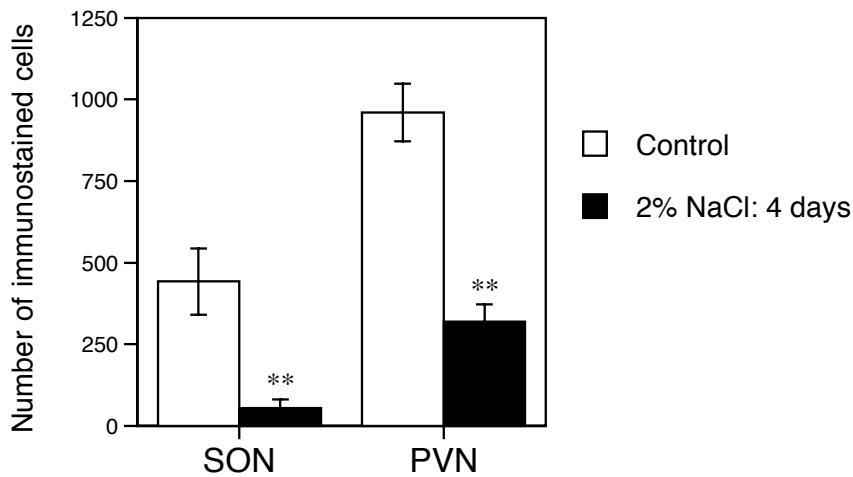


Fig. 3 Effect of 2% NaCl loading for 4 days on the membrane steroid binding protein (MSBP)-like immunostained cell numbers in the supraoptic (SON) and paraventricular nucleus (PVN). ** $P<0.01$ vs Control ($n=5$).

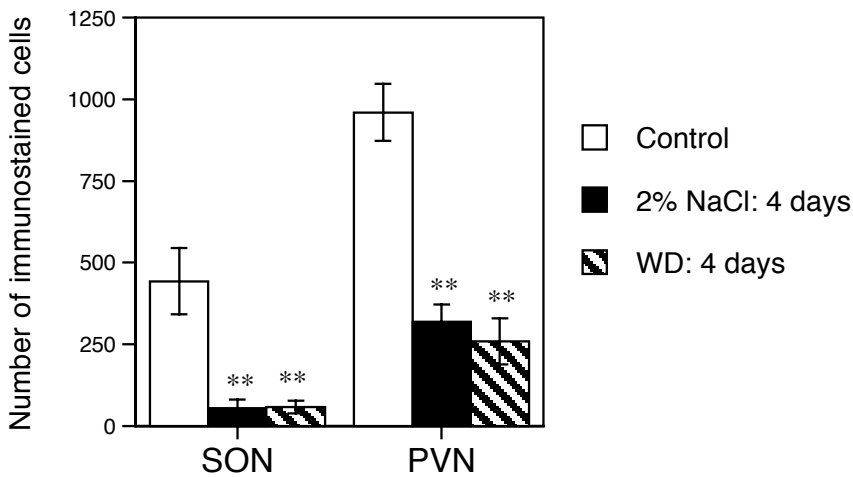


Fig. 4 Effect of water deprivation (WD) for 4 days on the membrane steroid binding protein (MSBP)-like immunostained cell numbers in the supraoptic (SON) and paraventricular nucleus (PVN). ** $P<0.01$ vs Control ($n=5$).

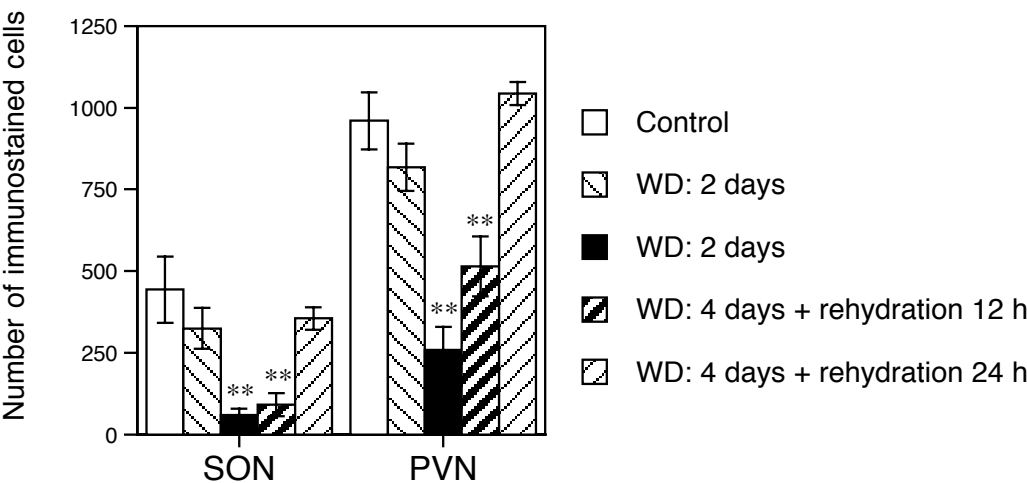


Fig. 5 Effect of water deprivation (WD) and rehydration on the membrane steroid binding protein (MSBP)-like immunostained cell numbers in the supraoptic (SON) and paraventricular nucleus (PVN). ** $P<0.01$ vs Control ($n=5$).

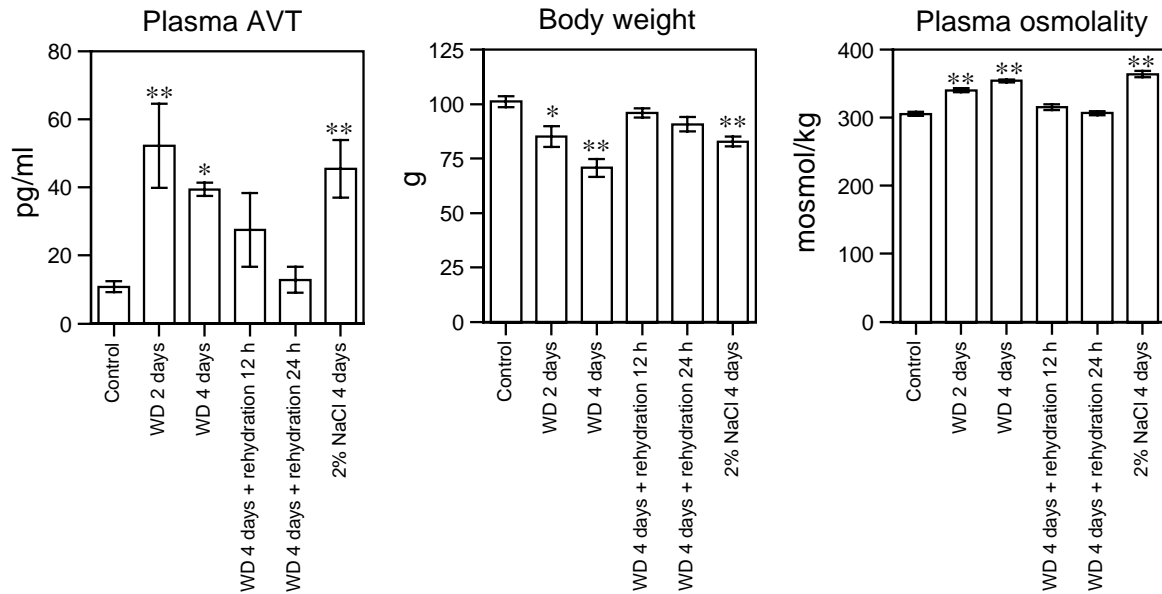


Fig. 6 Effects of water deprivation (WD) and rehydration on plasma arginine vasotocin (AVT) level, body weight and plasma osmolality. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Control ($n=5$).

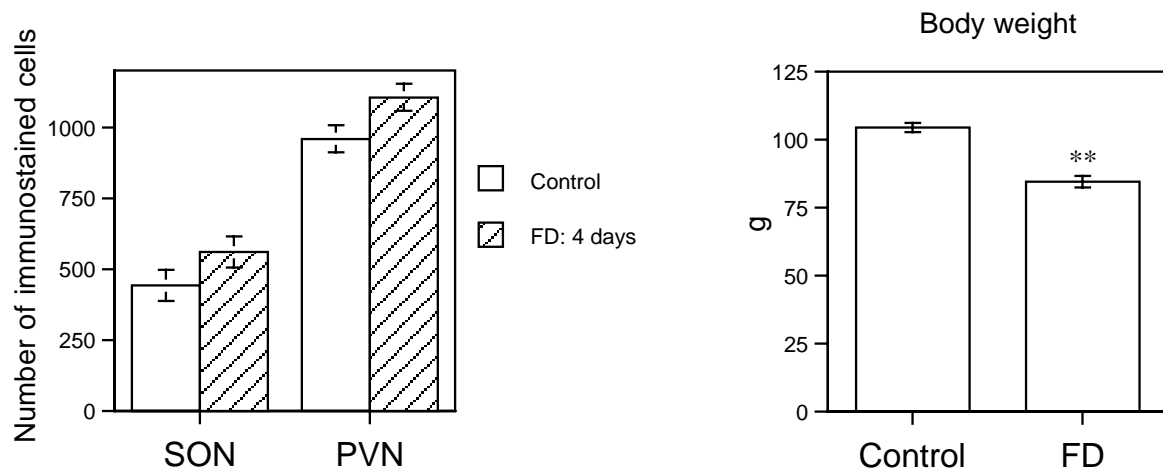


Fig. 7 Effect of food deprivation (FD) for 4 days on the membrane steroid binding protein (MSBP)-like immunostained cell numbers (left) in the supraoptic (SON) and paraventricular nucleus (PVN) and body weight (right). ** $P < 0.01$ vs Control ($n=5$).

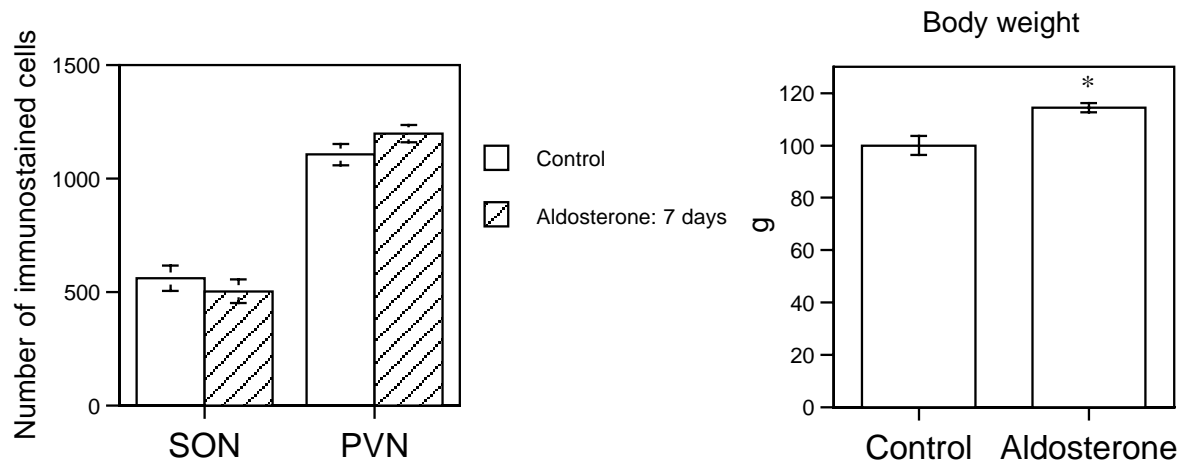


Fig. 8 Effect of aldosterone for 7 days on the membrane steroid binding protein (MSBP)-like immunostained cell numbers (left) in the supraoptic (SON) and paraventricular nucleus (PVN) and body weight (right). * $P < 0.05$ vs Control ($n=5$).

Human	MAAEDVVAATGADPSDLES	GGLLHEIFT	SPLNLL	LLGLCIFLLYKIVRGDQPAAS	-GDSDD	59
Porcine	MAAEDVAATGADPSELE	GGLLHEIFT	SPLNLL	LLGLCIFLLYKIVRGDQPAAS	--DSDD	58
Rat	MAAEDVVAATGADPSELE	GGLLQEIFT	SPLNLL	LLGLCIFLLYKIVRGDQPGAS	-GDNDD	59
Mouse	MAAEDVVAATGADPSELE	GGLLHEIFT	SPLNLL	LLGLCIFLLYKIVRGDQPGAS	-GDNDD	59
Quail	MAAEEPVMAGEEAAGTD	GGLLLEIVGSPLNLS	LLGLCLFLLYQILRGERPAAQPGESG-			59
Human	DEPPPLPRLKRRDFTPAELRRFDGVQDPRILMAI	NGKVFDVTKGRKFYGP	EGPYGVFAGR			119
Porcine	DEPPPLPRLKRRDFTPAELRRFDGVQDPRILMAI	NGKVFDVTKGRKFYGP	EGPYGVFAGR			118
Rat	DEPPPLPRLKPRDFTPAELRRYDGVQDPRILMAI	NGKVFDVTKGRKFYGP	EGPYGVFAGR			119
Mouse	DEPPPLPRLKRRDFTPAELRRFDGVQDSRILMAI	NGKVFDVTKGRKFYGP	EGPYGVFAGR			119
Quail	--PPPLPKMKRRDFTLEQLRPYDGVDRPRILMAV	NGKVFDVTRASKFYGPDGPYGFAGR				117
Human	DASRGLATFCLDKEAL	KDEYDDLSDLTAAQ	QETLSDWESQFTFKYHHVGKLLKE	GEEPTV		179
Porcine	DASRGLATFCLDKEAL	KDEYDDLSDLTPAQ	QETLNDWDSQFTFKYHHVGKLLKE	GEEPTV		178
Rat	DASRGLATFCLDKEAL	KDEYDDLSDLTPAQ	QETLNDWDSQFTFKYHHVGKLLKE	GEEPTV		179
Mouse	DASRGLATFCLDKEAL	KDEYDDLSDLTPAQ	QETLSDWDSQFTFKYHHVGKLLKE	GEEPTV		179
Quail	DASRGLATFCLDKEALRDEYDDLSDLNATQ	QETLRDWESQFTFKYHHVGKLLKD	GEEPTV			177
Human	YSDEEPPKDES	-ARKND				195
Porcine	YSDEEPPKDES	-ARKND				194
Rat	YSDDDEPPKDEA	-ARKSD				195
Mouse	YSDDDEPPKDET	-ARKNE				195
Quail	YSDEEE-KDAQDAKK	-E				192

Fig. 9 Alignment of amino acid sequences of the membrane steroid binding protein (MSBP) in the human, porcine, rat, mouse and quail. The residues printed white on black are the same amino acids as those of quail MSBP. A hyphen is inserted to obtain optimal homology.

A novel membrane steroid binding protein in the neurosecretory cells is reduced by salt loading

Kazuyoshi Ukena and Kazuyoshi Tsutsui

Laboratory of Brain Science, Faculty of Integrated Arts and Sciences, Hiroshima University,
Higashi-Hiroshima, Japan

Summary

Steroid hormones, which possess lipid soluble properties, act on several tissues through intracellular receptors that regulate the transcription of specific genes. In addition, it was known that some steroids interact with membrane receptors and evoke acute actions. Recently, it has been demonstrated that in mammals a membrane steroid binding protein, MSBP, might be a putative progesterone membrane receptor. Based on our studies concerning neurosteroids, we attempted to identify MSBP in the quail brain. We found that MSBP was expressed in neurosecretory cells that produced an antidiuretic hormone, arginine vasotocin (AVT), and its expression was affected by osmotic stress such as salt loading. In the present study, we investigated the physiological changes on the expression of MSBP by immunohistochemistry using an antiserum against mammalian MSBP.

To assess the acute osmotic stress on the expression of MSBP, 9% NaCl was intraperitoneally injected into quails and analyzed the expressions at 1, 3, 6, 10 hours of post-injection. The results showed no significant changes compared with 0.9% NaCl injected control birds. On the other hand, a chronic osmotic stress of 2% NaCl loading for 4 days was examined. The effect of 2% NaCl drinking significantly reduced the number of MSBP-like immunostained neurosecretory cells. In addition to the salt loading, the treatment of water deprivation for 4 days caused the similar result. Furthermore, the effect of rehydration followed by the 4 days-water deprivation was also investigated. Although the immunoreactivity in the quails that were rehydrated for 12 hours showed the same results as that of water deprived birds for 4 days, the immunoreactivity recovered in the 24 hours-rehydrated birds when compared with control birds. It was observed that when the reduction of MSBP-like immunoreactivity occurred under the chronic osmotic stress, then the AVT plasma level increased. In contrast with the osmotic stress, the food deprivation stress for 4 days did not produce any significant change on the immunoreactivity. In addition, the subcutaneous injection of aldosterone for 7 days did not effect on the expression of MSBP.

Taken together, our observations suggest that MSBP is a chronic osmotic stress-responsible protein and its expression may be involved in the production of AVT in the avian brain.