

発表番号 65

## バゾプレッシン-eGFP 遺伝子導入ラットのナトリウム・体液調節機構解明への応用

助成研究者：上田 陽一 (産業医科大学 医学部)

共同研究者：藤原 広明 (産業医科大学 医学部)

バゾプレッシン産生ニューロンは、視床下部室傍核および視索上核に存在し、その軸索を下垂体後葉に投射している。血中に分泌されたバゾプレッシンは腎臓に作用して水の再吸収を行う。我々は最近、オワンクラゲから同定された蛍光タンパクの改変タンパクである enhanced green fluorescent protein (eGFP) をバゾプレッシン産生ニューロンに発現させることを試みた。その結果、バゾプレッシン-eGFP 融合タンパクを発現したトランスジェニックラットの作成に成功した。本研究では、バゾプレッシン産生ニューロンを eGFP 蛍光を指標に容易に同定できる本トランスジェニックラットをナトリウム・体液調節機構解明へ応用することを目的とした。

具体的には、本トランスジェニックラットの塩分負荷前後の飲水量、尿量などの変化およびバゾプレッシン産生ニューロンにおける eGFP 蛍光の動態、さらには *in vitro* における living cell での eGFP 蛍光の同定と神経活動の電気記録、および単離細胞標本の作成を試みた。その結果、(1) 2%高張食塩水飲水負荷(5日間)による飲水量、摂食量、尿量、尿浸透圧、尿中ナトリウム濃度および体重の変化にトランスジェニックラットとコントロールラットで有意な差はなかった。(2) 2%高張食塩水飲水負荷後の視索上核および室傍核における eGFP 蛍光を観察したところ、視索上核および室傍核大細胞群での細胞体および神経線維の eGFP 蛍光が著明に増加した。正中隆起における eGFP 陽性線維は内層において著明に増加していた。(3) 脳スライス標本においても蛍光顕微鏡下で視索上核の部位に eGFP 蛍光を容易に同定でき、その eGFP 蛍光陽性ニューロンからパッチクランプ法により膜電位および活動電位を記録することができた。(4) 視索上核から単離細胞標本を作成し、蛍光顕微鏡で観察したところ、神経線維を有する比較的大きな細胞に鮮明な eGFP 蛍光を認めた。下垂体は取り出した状態で、実体蛍光顕微鏡下で下垂体後葉の eGFP 蛍光が鮮明に観察でき、下垂体後葉のみを取り出し単離細胞標本を作成したところ、神経終末部は球状となり、その中に eGFP 蛍光が観察された。

本トランスジェニックラットでは外来遺伝子の導入による明らかな影響は見られず、生理的刺激に対してバゾプレッシン遺伝子と同様の転写調節を受けることから、今後、バゾプレッシンを主軸とした中枢性体液調節機構の解明に大いに役立つことが期待される。



2

助成番号 0429

## バゾプレッシン-eGFP 遺伝子導入ラットのナトリウム・体液調節機構解明への応用

助成研究者：上田 陽一（産業医科大学 医学部）

共同研究者：藤原 広明（産業医科大学 医学部）

## 1. 研究目的

食塩と水分は生命の維持にとって必要不可欠である。生体における体液の恒常性は、神経性・液性に調節されている。バゾプレッシン産生ニューロンは、視床下部室傍核および視索上核に存在し、その軸索を下垂体後葉に投射している。血中に分泌されたバゾプレッシンは腎臓 V2 レセプターに作用して水の再吸収を行う。バゾプレッシン分泌は、血中浸透圧、アンジオテンシン II (AII) や心房性ナトリウム利尿ホルモンを代表とする循環関連ペプチド、末梢臓器や脳内諸核からの神経性入力によるバゾプレッシン産生ニューロンの神経活動の変化によって調節されている。

我々はこれまで、バゾプレッシン分泌の調節機構を研究することにより、生体のナトリウム・水分調節機構について検討してきた<sup>[1,2]</sup>。特に、ニューロンレベルの解析を得意としている<sup>[3]</sup>。バゾプレッシン産生ニューロンの同定のためには *in vivo* の実験では、バゾプレッシン産生ニューロンが圧受容器から抑制性入力を受けていることを指標することができる。しかしながら、*in vitro* の実験では、バゾプレッシン産生ニューロンを同定するには実験終了後に免疫組織化学的染色法により細胞内のバゾプレッシンの存在を証明しなければならず、大変煩雑かつ時間がかかる。また、バゾプレッシン産生ニューロンの神経活動は間欠型放電を示すが、時にその放電パターンも持続型となるため、神経活動パターンを指標とした同定も困難である。

そこで、我々は、近年生命科学分野で汎用されているオワンクラゲから同定された蛍光タンパクの改変タンパクである enhanced green fluorescent protein (eGFP) をバゾプレッシン産生ニューロンに発現させることを試みた。その結果、ごく最近、バゾプレッシン-eGFP 融合タンパクを発現したトランスジェニックラットの作成に成功した<sup>[4]</sup>。本研究では、バゾプレッシン産生ニューロンを eGFP 蛍光を指標に容易に同定できる本トランスジェニックラットをナトリウム・体液調節機構解明へ応用することを目的とした。具体的には、本トランスジェニックラットの塩分負荷前後の飲水量、尿量などの変化およびバゾプレッシン産生ニューロンにおける eGFP 蛍光の動態、さらには *in vitro* における living cell (生細胞) での eGFP 蛍光の同定と神経活動の電気記録を行い、生理学的研究への応用の可能性について検討した。

## 2. 実験方法

### 2.1 トランスジェニックラットの作成

実験には、バゾプレッシン遺伝子のエクソン III に eGFP 遺伝子を挿入したバゾプレッシン-eGFP 融合遺伝子 (Fig. 1) を導入したトランスジェニックラットを用いた。本トランスジェニックラットはウイスター系ラットをもとに作成した。バゾプレッシン-eGFP 融合遺伝子導入の有無は、尾部組織から抽出した genomic DNA からの PCR により確認した。今回はすべて成熟雄性ラットを用いた。

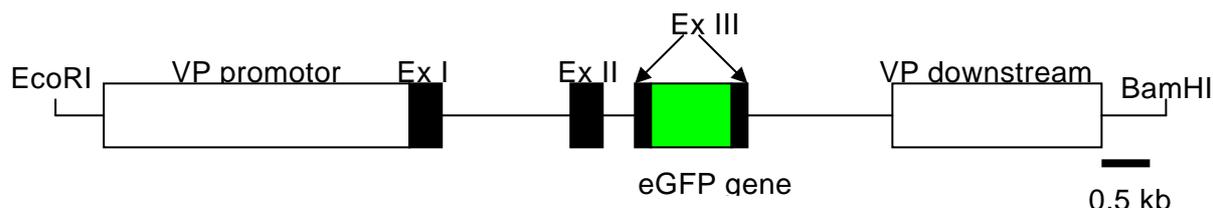


Fig. 1 Structure of the vasopressin (VP)-eGFP transegen. Ex, exon

### 2.2 トランスジェニックラットへの高張食塩水飲水負荷

実験には、同じ母ラットから生まれた仔ラットのうち雄ラット (eGFP(+) 4 匹、eGFP(-) 3 匹) を用いた。これらの仔ラットが成熟後、代謝ケージで 1 週間の飼育期間の後に飲水量、摂食量、尿量、尿浸透圧、尿中ナトリウム濃度および体重の変化を調べた。飲水量、摂食量、尿量、尿浸透圧及び尿中ナトリウム濃度は 12 時間毎 (明期(7:00-19:00)、暗期(19:00-7:00)) に、体重は 24 時間毎に測定した。高張食塩水飲水負荷は、2% 食塩水のみを 5 日間連続与えた。実験期間中、食餌は普通固形食の自由摂取とした。

### 2.3 トランスジェニックラットの視床下部 eGFP 蛍光の観察

2% 食塩水飲水負荷 5 日後にトランスジェニックラットをペントバルビタール麻酔 (50 mg/kg, ip) し、4% パラホルムアルデヒド溶液で灌流後、脳を取り出した。2 日間の後固定後、シュクロース化を行った。その後、視床下部を含むブロックから 40  $\mu$ m の切片を作成し、蛍光顕微鏡下で eGFP 蛍光を観察した。

### 2.4 脳スライス標本の作成と eGFP 蛍光陽性ニューロンからの活動電位の記録

トランスジェニックラットの脳を頸椎脱臼後に素早く取り出し、視床下部視索上核を含む 350  $\mu$ m の脳スライス切片を作成した。蛍光顕微鏡下で視索上核の部位に eGFP 蛍光陽性ニューロンを確認した上で、そのニューロンからパッチクランプ法により、膜電位および活動電位を記録した。

### 2.5 視床下部視索上核および下垂体後葉からの単離細胞標本作成

トランスジェニックラットの視索上核をプロテアーゼ処理後、軽くホモジネートして単離細胞標本作成し、蛍光顕微鏡で観察した。また、実体顕微鏡下で下垂体後葉を取り出し、軽くホモジネートして下垂体後葉の神経終末標本作成し、蛍光顕微鏡で観察した。

### 3. 研究結果

#### 3.1 トランスジェニックラットの作成

バゾプレッシン-eGFP 融合遺伝子を導入した成熟雄トランスジェニックラットとウイスター系雌ラットを交配後、得られた仔ラット(12~15匹)のうち、約半数がバゾプレッシン-eGFP 融合遺伝子陽性(eGFP(+))であった。

#### 3.2 トランスジェニックラットへの高張食塩水飲水負荷

同じ母親ラットから出生した雄のeGFP(+)(4匹)およびeGFP(-)(3匹)を用いて、水道水および固形食の自由摂取下での飲水量、摂食量、尿量、尿浸透圧、尿中ナトリウム濃度および体重の変化を測定した。代謝ケージにおいて測定した飲水量、摂食量、尿量、尿浸透圧、尿中ナトリウム濃度および体重の変化に有意な差はなかった(Fig. 2)。明期および暗期でのそれぞれの差も見られなかった(Fig. 2)。さらに、2%高張食塩水飲水負荷(5日間)による飲水量、摂食量、尿量、尿浸透圧、尿中ナトリウム濃度および体重の変化にも有意な差はなかった(Fig. 2)。

#### 3.3 トランスジェニックラットの視床下部eGFP 蛍光の観察

2%高張食塩水飲水負荷後の視床下部視索上核および室傍核におけるeGFP 蛍光を観察したところ、視索上核および室傍核大細胞群での細胞体および神経線維のeGFP 蛍光が著明に増加した(Fig. 3 A-B)。室傍核小細胞群の中にも細胞体および神経線維のeGFP 蛍光が増加するものもあった(Fig. 3 D)。正中隆起におけるeGFP 陽性線維は内層において著明に増加していた(Fig. 3 E, F)。

#### 3.4 脳スライス標本の作成とeGFP 蛍光陽性ニューロンからの活動電位の記録

脳スライス標本においても蛍光顕微鏡下で視索上核の部位にeGFP 蛍光を容易に同定することができた(Fig. 4 A-C)。さらに、eGFP 蛍光陽性ニューロンからパッチクランプ法により膜電位および活動電位を記録することができた(Fig. 4 D-F)。

#### 3.5 視床下部視索上核および下垂体後葉からの単離細胞標本作成

トランスジェニックラットの視索上核から単離細胞標本作成し、蛍光顕微鏡で観察したところ、神経線維を有する比較的大きな細胞に鮮明なeGFP 蛍光を認めた(Fig. 5 A,B)。下垂体は取り出した状態で、実体蛍光顕微鏡下で下垂体後葉のeGFP 蛍光が鮮明に観察できた(Fig. 5 C)。下垂体後葉のみを取り出し単離細胞標本作成したところ、神経終末部は球状となり、その中にeGFP 蛍光が観察された(Fig. 5 D)。

### 4. 考 察

本研究で用いたバゾプレッシン-eGFP 融合遺伝子を導入したeGFP(+)(トランスジェニックラットは、飲水量、摂食量、尿量、尿浸透圧、尿中ナトリウム濃度および体重の変化にeGFP(-)ラットとの間に明らかな差は認められなかった。したがって、eGFP がバゾプレッシン産生ニューロンに発現することによるバゾプレッシンの合成・分泌等への直接の影

響はないと考えられる。また、2%高張食塩水飲水負荷によるトランスジェニックラットの飲水量、摂食量、尿量、尿浸透圧、尿中ナトリウム濃度および体重の変化にも eGFP(-)ラットとの間に有意な差は見られなかったことから、eGFP(+)トランスジェニックラットにおいてバゾプレッシン分泌は浸透圧刺激に対しても正常に反応していると考えられる。これらの結果は、今後本トランスジェニックラットを生理学的研究に応用する上で重要な知見である。

次に、トランスジェニックラットの視床下部視索上核および室傍核大細胞群において、2%高張食塩水飲水負荷後に eGFP 蛍光が増加することを明らかにした。これはバゾプレッシン遺伝子と同じ転写調節を受けていることを裏付ける結果である。したがって、導入したバゾプレッシン-eGFP 融合遺伝子が浸透圧刺激という生理学的刺激に対して正常に反応することということである。この結果は、種々の生理学的刺激に対するバゾプレッシン合成の変化を eGFP 産生を指標として検討できることを示している。

さらに、トランスジェニックラットから作成した脳スライス標本において eGFP 蛍光が容易に同定できたこと、パッチクランプ法により膜電位および活動電位が記録できたことは、今後バゾプレッシン産生ニューロンの同定ならびに電気生理学的検討に有用であることを示している。また、トランスジェニックラットの視索上核から単離したニューロンおよび下垂体後葉から単離した神経終末部においても鮮明な eGFP 蛍光が見られたことから、電気生理学的検討のみならず細胞内カルシウム濃度を測定する画像解析などの種々の研究に用いることができる。

以上より、本トランスジェニックラットでは外来遺伝子の導入による明らかな影響は見られず、生理的刺激に対してバゾプレッシン遺伝子と同様の転写調節を受けることが明らかとなった。今後、バゾプレッシンを主軸とした中枢性体液調節機構の解明に大いに役立つことが期待される。

## 5. 今後の課題

本トランスジェニックラットに発現した eGFP 蛍光を *in vivo* において連続してモニターする測定系を開発することが急務であり、現在着手しているところである。今後、種々の生理学的刺激において生細胞で eGFP 蛍光のダイナミックな変動を観察することにより新たな体液調節機構を見出すことが必要である。

## 文 献

1. Yamashita, H. Ueta, Y. & Dyball, R.E.J. (2002) Electrophysiological and molecular properties of the oxytocin- and vasopressin-secreting systems in mammals. In *Hormones, Brain and Behavior* (Elsevier Science, USA) Volume 4

2. 芹野 良太、上田 陽一 (2002) バゾプレッシンの産生、分泌機構  
ホルモンと臨床 (医学の世界社、東京) 50(8): 3-8
3. Ozaki, Y. Soya, A. Nakamura, J. Matsumoto, T. & Ueta, Y. (2004) Potentiation by angiotensin II of spontaneous excitatory postsynaptic currents in rat supraoptic magnocellular neurons. *Journal of Neuroendocrinology* 16: 871-879
4. Ueta, Y. Fujihara, H. Serino, R. Dayanithi, G. Ozawa, H. Matsuda, K. Kawata, M. Yamada, J. Ueno, S. Fukuda, A. & Murphy, D. (2005) Transgenic expression of enhanced green fluorescent protein enables direct visualization for physiological studies of vasopressin neurons and isolated nerve terminals of the rat. *Endocrinology* 146(1):406-413

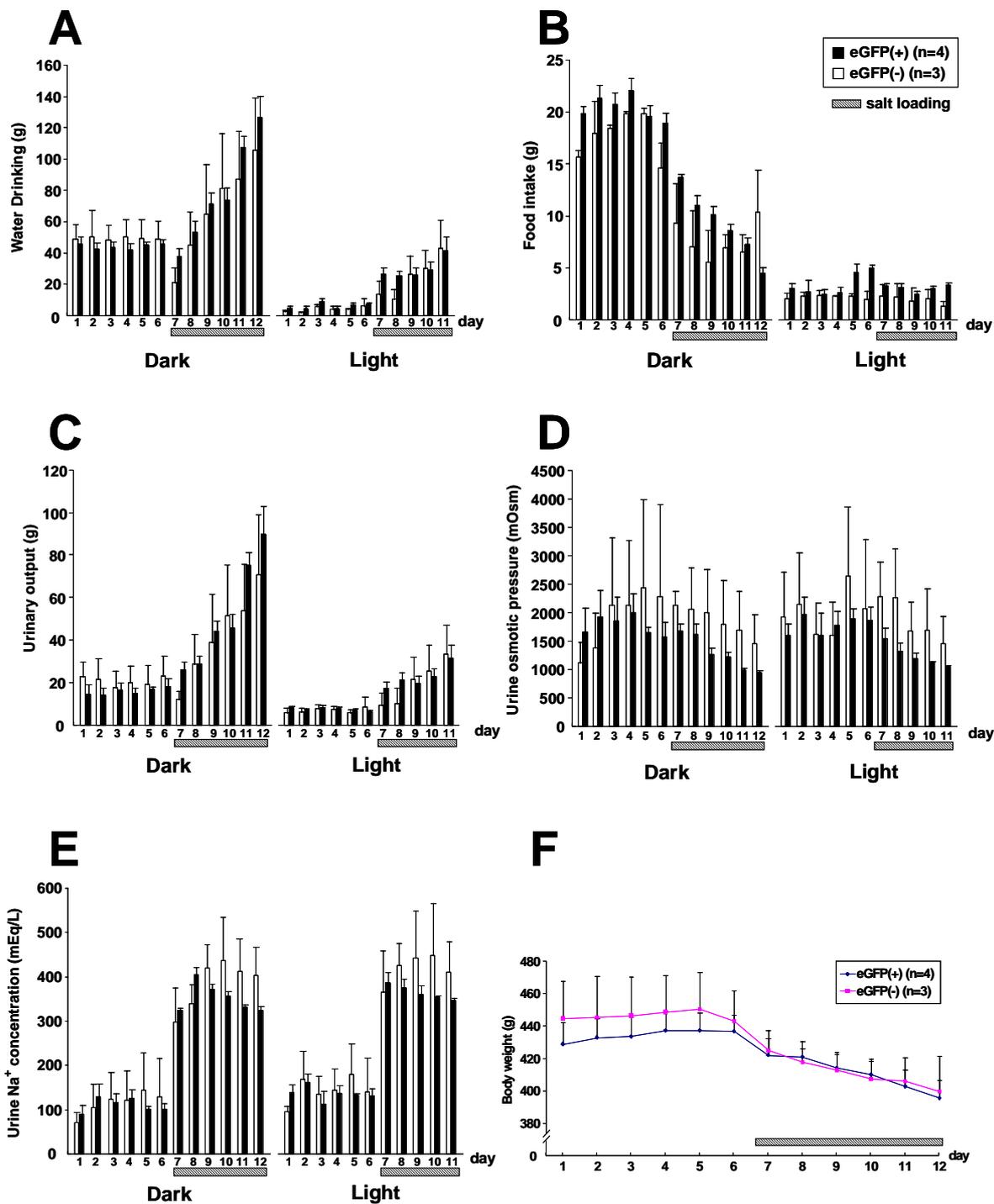


Fig. 2 Effects of salt loading on water drinking (A), food intake (B), urinary output (C), urinary osmotic pressure (D), urinary sodium concentration (E) and body weights (F) in transgenic rats.

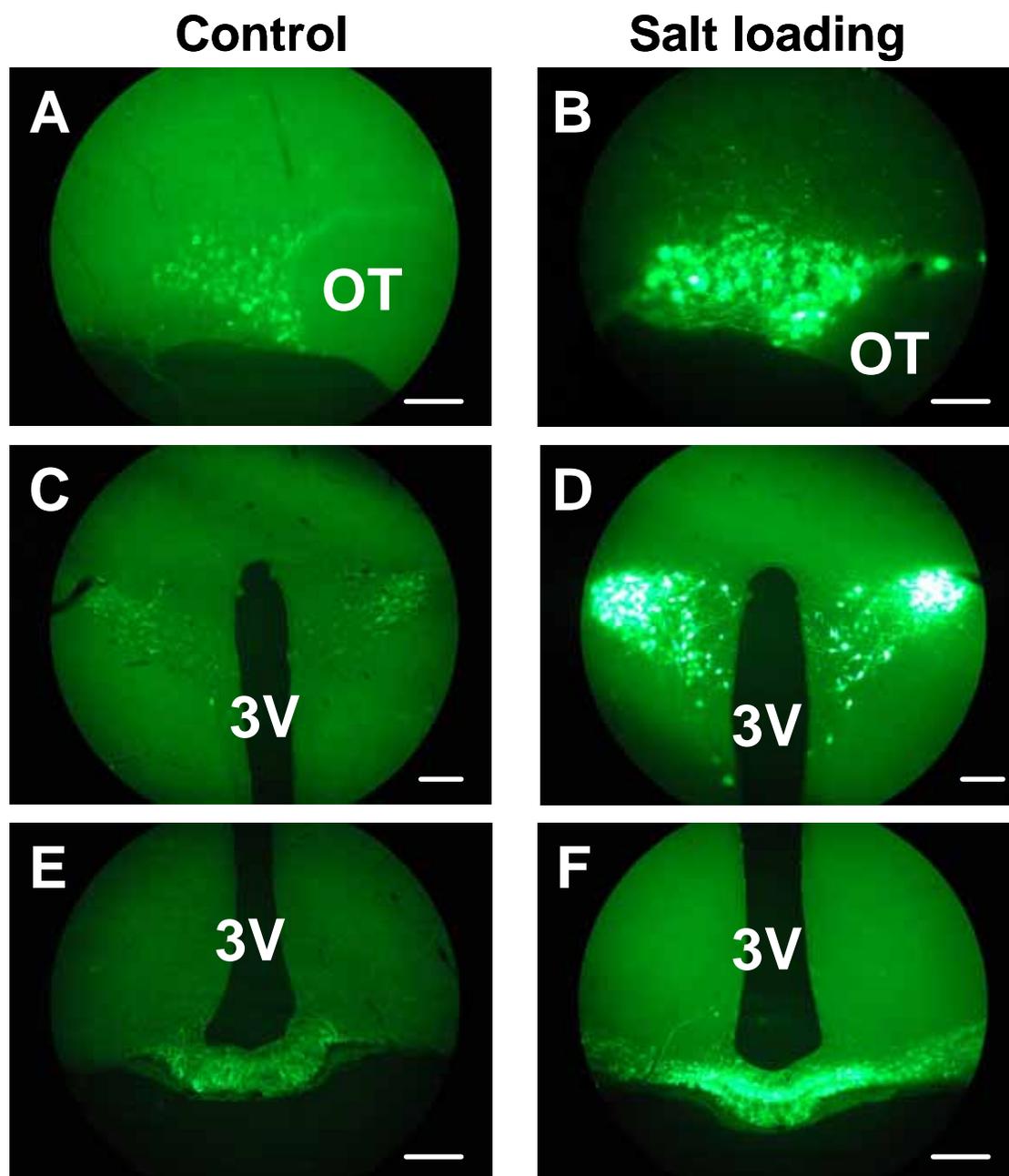


Fig. 3 Effects of chronic salt loading for 5 days on eGFP expression in the supraoptic nucleus (A, B), the paraventricular nucleus (C, D) and the median eminence (E, F). OT, optic chiasma; 3V, third ventricle. Scale bars indicate 100  $\mu$ m.

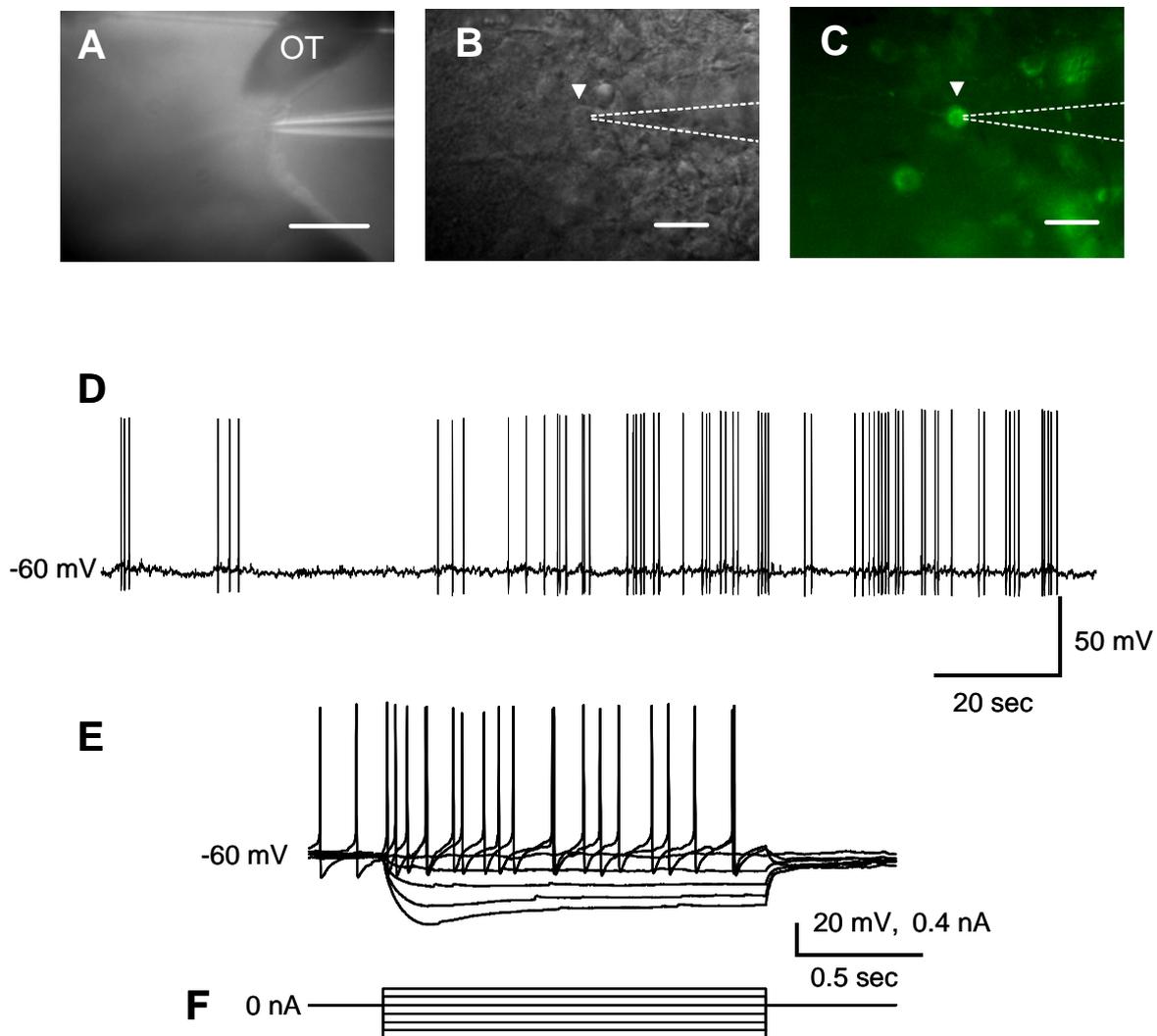


Fig. 4 Electrophysiological properties of visually identified eGFP-expressing neurons in the supraoptic nucleus from the *in vitro* slice preparation. A-C, The positioning of a recording electrode and eGFP-expressing cells. The dotted line indicates recording electrode. D-F, Typical firing pattern and voltage responses to current injections from  $-0.4$  nA to  $+0.2$  nA.

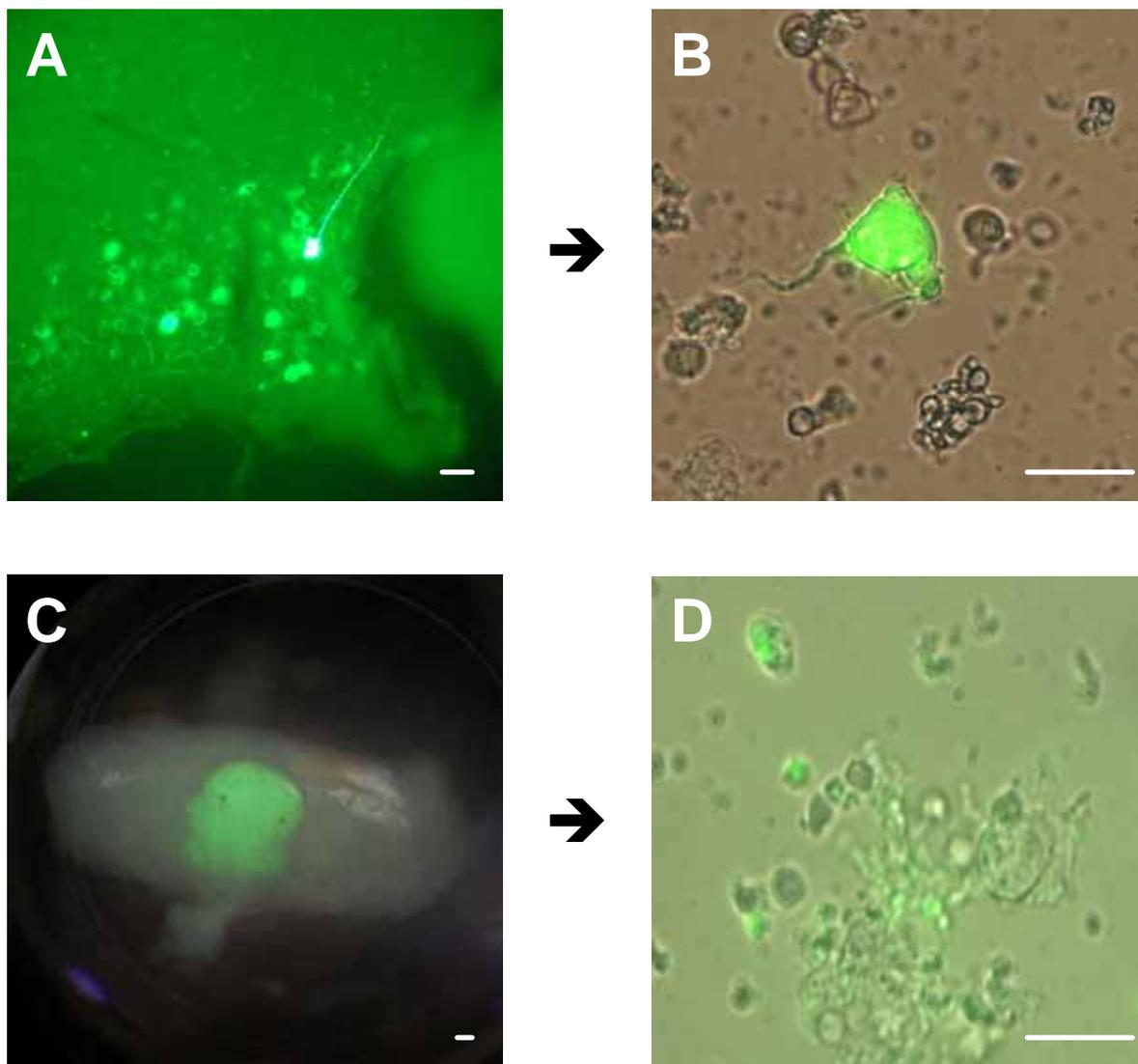


Fig. 5 Isolated neurons from the supraoptic nucleus (A, B) and the axon terminals from the posterior pituitary gland (C, D). Scale bar indicated 50  $\mu$ m.

## Applied physiology of vasopressin-eGFP transgenic rats to study regulation of sodium and body fluid balance

Yoichi Ueta and Hiroaki Fujihara

Department of Physiology, School of Medicine, University of Occupational and Environmental Health, Kitakyushu, Japan

### Summary

Vasopressin is well known to be an antidiuretic hormone in the kidney. The magnocellular neurosecretory cells (MNCs) in the supraoptic (SON) and the paraventricular nuclei (PVN) of the hypothalamus synthesize vasopressin in abundance. The MNCs terminate their axons to the posterior pituitary and secrete vasopressin in the systemic circulation. The neuronal activity of vasopressin-secreting neurons is controlled by synaptic inputs and humoral factors such as plasma osmolality, concentration of sodium and cardiovascular-related peptides.

We generated transgenic rats expressing vasopressin-enhanced green fluorescent protein (eGFP) fusion gene. The expression of the eGFP gene were clearly observed in the SON and the PVN in transgenic rats. In metabolic cage both transgenic rats and controls did not show any different consumption of drinking and feeding, urinary volume, urine osmolality and sodium concentration in urine under normal condition and after chronic salt loading (2% saline to drink) for 5 days. After chronic salt loading the expression of the eGFP gene and the fluorescence were marked increased in the SON and the magnocellular division of the PVN. The eGFP fibers were also increased in the internal layer of the median eminence after salt loading. In *in vitro* slice preparation the whole cell patch clamp technique was used to record the electrical activity from the identified eGFP-expressing neurons in the SON. In addition, isolated SON neurons and axon terminals in the posterior pituitary gland showed robust eGFP fluorescence.

The vasopressin-eGFP transgenic rat is a unique new tool to study the physiological role of vasopressin-secreting neurons in salt balance and water homeostasis and the dynamics of the regulation of vasopressin secretion in living neurons and their axon terminals.