

発表番号 58 (0527)

バゾプレッシン-eGFP ニューロン活動の *in vivo* モニタリングシステムの開発と ナトリウム・体液調節機構解明への応用

上田 陽一 (産業医科大学 医学部)

藤原 広明 (産業医科大学 医学部)

抗利尿ホルモンとして知られるバゾプレッシンは、視床下部室傍核および視索上核に局在する大細胞性の神経分泌ニューロンで産生される。これらのバゾプレッシン産生ニューロンはその軸索を下垂体後葉に投射しており、神経終末から開口放出によりバゾプレッシンを循環血液中に分泌する。神経終末におけるバゾプレッシン分泌は、バゾプレッシン産生ニューロンに生じる活動電位の増減によって制御されている。

我々は最近、トランスジェニック技術を用いて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)** をラットのバゾプレッシン産生ニューロンに発現させることに成功した。本研究では、バゾプレッシン産生ニューロン活動とバゾプレッシン分泌を **eGFP** 蛍光の変化を指標に *in vivo* で経時的にモニターするシステムを開発すること、および下垂体後葉での新たなバゾプレッシン分泌制御機構を明らかにすることを目的とした。具体的には、光ファイバーを2本束ねて作成したプローブを組織に刺入して、励起光をレーザー照射して励起された **eGFP** 蛍光をもう一方のファイバーを通して光電管に集めて光信号を電気信号に変換

後、コンピュータで経時的にモニターするシステムを開発した。トランスジェニックラットから取り出した下垂体を灌流液中に置き、下垂体後葉にプローブを刺入すると強い蛍光シグナルが検出された。灌流液を高カリウム溶液に変えるとその蛍光シグナルが経時的に減少することが観察された。この変化は、下垂体後葉における神経終末からのバゾプレッシン分泌が生じた結果、神経終末における **eGFP** 含量が減少したことを示している。最近、**galanin** 受容体2型の特異的リガンドとして **galanin-like peptide (GALP)** が同定され、下垂体後葉においては後葉細胞が産生していることが明らかとなった。脱水や2%高張食塩水飲水負荷によりこの **GALP** 産生が著明に増加することから、バゾプレッシン分泌およびナトリウム・体液調節に関与している可能性がある。そこで、**GALP** を灌流液中に投与すると高カリウム溶液刺激と同様に下垂体後葉における蛍光シグナルが経時的に減少することが観察された。

今後、本トランスジェニックラットおよび **eGFP** 蛍光の *in vivo* モニタリングシステムを用いることにより新たなナトリウム・体液調節機構が解明されることが期待できる。

助成番号 0527

バゾプレッシン-eGFP ニューロン活動の *in vivo* モニタリングシステムの開発と ナトリウム・体液調節機構解明への応用

上田 陽一 (産業医科大学医学部)

藤原 広明 (産業医科大学医学部)

1. 研究目的

原始生命が誕生した海から淡水へ、そして陸上生活へ生命体が適応するためには水分と塩分の保持が最重要課題であった。生体における水分・塩分バランスは、能動的な飲水行動はもとより、生体内において神経性・液性調節によって維持されている。水分調節の最も基本的かつ重要なホルモンは、抗利尿ホルモンと呼ばれるバゾプレッシンである。

バゾプレッシンは、視床下部室傍核および視索上核に局在する大細胞性の神経分泌ニューロンで産生される。これらのバゾプレッシン産生ニューロンはその軸索を下垂体後葉に投射しており、神経終末から開口放出によりバゾプレッシンを循環血液中に分泌する。血中に分泌されたバゾプレッシンは腎臓の集合管における V2 受容体に作用して水の再吸収を行う。神経終末におけるバゾプレッシン分泌は、通常はバゾプレッシン産生ニューロンに生じる活動電位の増減によって制御されている。バゾプレッシン産生ニューロンの活動性は、血中浸透圧や種々のホルモンによる液性調節および末梢臓器や脳内諸核からの神経性入力によって調節されている。

我々は長年バゾプレッシン分泌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[1,2]。最近我々は、トランスジェニック技術を用いて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) をラットのバゾプレッシン産生ニューロンに発現させることに成功した[3,4]。このトランスジェニックラットでは、視床下部に存在するバゾプレッシン産生ニューロンに特異的に eGFP タンパクが発現しており、蛍光顕微鏡で容易に同定することができる。また、視床下部から下垂体後葉へ投射している軸索および神経終末にも鮮明な eGFP 蛍光が観察できる。これらの、eGFP 蛍光は、脱水、2%高張食塩水飲水負荷により著明に増加する。さらには、この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等についてもコントロールラットと何ら差異はなかった。したがって、本トランスジェニックラットではバゾプレッシン-eGFP 融合遺伝子を導入したことによる

影響は見られず、浸透圧刺激等の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、種々の生理学的研究に応用することができる。

本研究では、バゾプレッシン産生ニューロン活動とバゾプレッシン分泌を eGFP 蛍光の変化を指標に *in vivo* で経時的にモニターするシステムを開発すること、および下垂体後葉での新たなバゾプレッシン分泌制御機構を明らかにすることを目的とした。具体的には、光ファイバーを2本束ねて作成したプローブを組織に刺入して、励起光をレーザー照射して励起された eGFP 蛍光をもう一方のファイバーを通して光電管に集めて光信号を電気信号に変換後、コンピュータで経時的にモニターするシステムを開発した。

最近、galanin 受容体2型の特異的リガンドとして galanin-like peptide (GALP) が同定され、下垂体後葉においては後葉細胞が産生していることが明らかとなった。脱水や2%高張食塩水飲水負荷によりこの GALP 産生が著明に増加することから、バゾプレッシン分泌およびナトリウム・体液調節に関与している可能性がある。そこで、本研究において開発した eGFP 蛍光の変化を *in vivo* で経時的にモニターするシステムを用いて、バゾプレッシン-eGFP トランスジェニックラットの下垂体後葉における GALP の作用を検討した。

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、ヘテロ接合体で継代・繁殖を行っている。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または雌性ラットのヘテロ接合体を用いた。

2.2 eGFP 蛍光の *in vivo* モニタリングシステムの開発

光ファイバーを2本束ねて作成したプローブを eGFP

蛍光を発する組織に刺入して、励起光(488 nm)をレーザー照射して励起された eGFP 蛍光(545 nm)をもう一方のファイバーを通して光電管に集めて光信号を電気信号に変換後増幅して、コンピュータで経時的にモニターするシステムを開発した(Fig. 2)。

2. 3 下垂体後葉での eGFP 蛍光の *in vivo* モニタリングシステムを用いた経時的測定

トランスジェニックラットから取り出した下垂体を灌流液中に置き、下垂体後葉にプローブを刺入する。灌流液を高カリウム溶液に変えてその蛍光シグナルの経時変化を測定する。

2. 4 GALP 投与後の下垂体後葉での eGFP 蛍光の *in vivo* モニタリングシステムを用いた経時的測定

GALP(1 および 10 μ M)を灌流液中に投与し、高カリウム溶液刺激と同様に下垂体後葉における蛍光シグナルの経時変化を測定する。

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、PCR の結果、約半数がバゾプレッシン-eGFP 融合遺伝子陽性であった。

3. 2 eGFP 蛍光の *in vivo* モニタリングシステムの開発

開発したモニタリングシステムを用いて、eGFP 原液をもとに希釈液を作成し、それらの eGFP 蛍光が電気信号に変換・増幅されることを確認した(Fig. 2)

3. 3 下垂体後葉での eGFP 蛍光の *in vivo* モニタリングシステムを用いた経時的測定

トランスジェニックラットから取り出した下垂体を人工脳脊髄液を灌流している灌流装置内におき、下垂体後葉にプローブを刺入すると強い蛍光シグナルが検出された(Fig. 3)。灌流液を高カリウム溶液(55 mM)に変えるとその蛍光シグナルが経時的に減少することが観察された(Fig. 3)。

3. 4 GALP 投与後の下垂体後葉での eGFP 蛍光の *in vivo* モニタリングシステムを用いた経時的測定

GALP(1 および 10 μ M)を灌流液中に投与すると高カリウム溶液刺激と同様に下垂体後葉における蛍光シグナルが経時的に減少することが観察された(Fig. 4)。

4. 考察

本研究で、eGFP 蛍光の変化を経時的に測定する *in vivo* モニタリングシステムを開発した。本システムを用いて、高感度で組織中の eGFP 蛍光の変化を連続測定す

ることが可能となった。

我々が作成したバゾプレッシン-eGFP トランスジェニックラットは、視床下部に局在するバゾプレッシン産生ニューロンおよび下垂体後葉に投射する軸索ならびに下垂体後葉の神経終末において eGFP 蛍光が観察される。このトランスジェニックラットの eGFP 蛍光は、浸透圧刺激等により著明に増加することから、生理的刺激にバゾプレッシン遺伝子と同様に反応することが示唆された。

このトランスジェニックラットを用いて、eGFP 蛍光の変化を *in vivo* にてモニターするシステムを確立することを試みた。トランスジェニックラットから下垂体を取り出し、人工脳脊髄液で灌流しながら eGFP 蛍光を測定するためのプローブを刺入したところ、経時的に電気信号を記録することができた。高カリウム液にて刺激したところ、eGFP 蛍光による電気信号(シグナル)が減少することが観察された。この変化は、下垂体後葉の神経終末からのバゾプレッシン分泌が生じた結果、バゾプレッシンと同じ小胞内に含有していると思われる eGFP が同時に分泌され、神経終末における eGFP 含量が減少したことを示している。したがって、神経終末からのバゾプレッシン分泌を高感度で経時的に測定することが可能と思われる。

Galanin 受容体2型の特異的内因性リガンドとして発見された GALP は、下垂体後葉の後葉細胞で産生され、浸透圧刺激によってその産生が著明に増加する。下垂体後葉においてバゾプレッシン分泌に何らかの関与が考えられるが、これまでに報告はない。そこで、本研究において開発した *in vivo* モニタリングシステムを用いて、GALP の下垂体後葉での eGFP 蛍光に対する効果を検討したところ、高カリウム液刺激と同様に eGFP 蛍光による電気信号(シグナル)が減少することが観察された。したがって、GALP が下垂体後葉の神経終末に作用してバゾプレッシン分泌を引き起こすことが示唆された。

5. 今後の課題

今回我々は、eGFP 蛍光を高感度に連続測定するシステムの開発に成功した。今後は、麻酔下もしくは覚醒下のトランスジェニックラットを用いて、下垂体後葉のみならず eGFP 蛍光が発現している室傍核、視索上核および視交叉上核内に測定用プローブを刺入することにより、eGFP 蛍光の変化を経時的に測定するシステムを確立したい。また、測定系の感度向上のための改良および測定用プローブの小型化にも取り組む必要がある。

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. 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
 4. 上田陽一 (2005) トランスジェニック技術によるバゾプレッシンニューロンの可視化 化学と生物 (学会出版センター、東京) 43(11): 734-738

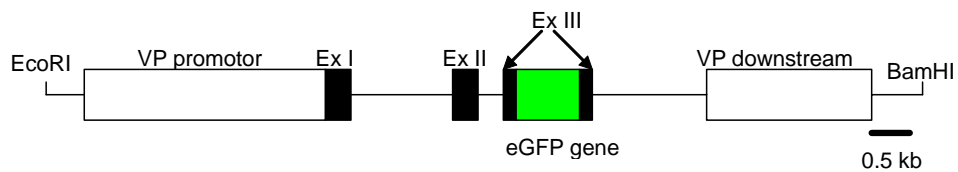


Fig. 1 Structure of the vasopressin (VP)-eGFP transgen. Ex, exon

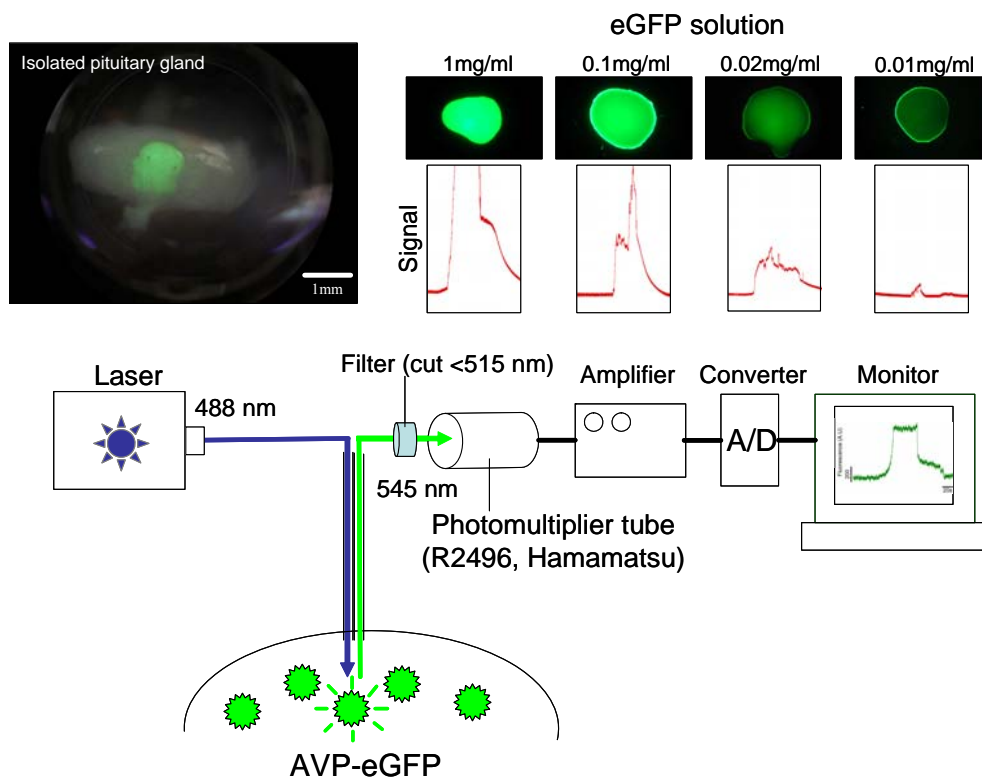


Fig. 2 *In vivo* monitoring system to measure eGFP fluorescence

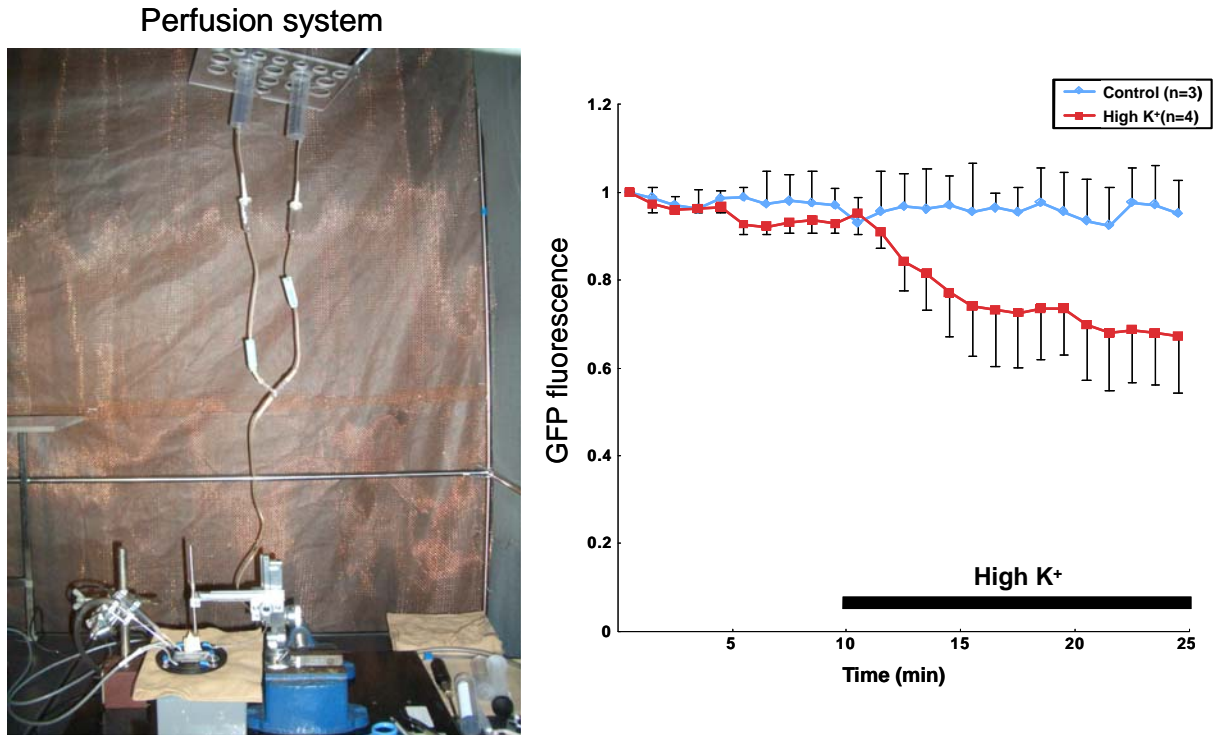


Fig. 3 Perfusion system and effects of high K⁺ (55 mM) solution on eGFP fluorescence in the posterior pituitary gland isolated from vasopressin-eGFP transgenic rat

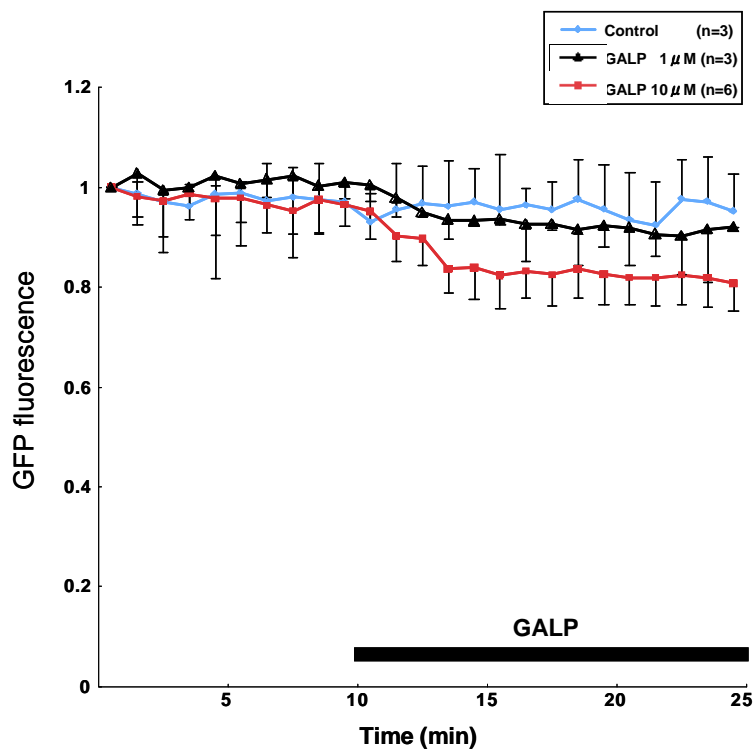


Fig. 4 Effects of galanin-like peptide (GALP) on eGFP fluorescence in the posterior pituitary gland isolated from vasopressin-eGFP transgenic rat

0527

Development of *in vivo* monitoring system to measure AVP-eGFP neuron activity and application for examination 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, which is well known to be an antidiuretic hormone, is synthesized in the magnocellular neurosecretory cells (MNCs) in the paraventricular (PVN) and supraoptic nuclei (SON) of the hypothalamus. The MNCs terminate their axons to the posterior pituitary gland and secrete vasopressin into the systemic circulation from the axon terminals. Vasopressin release is mainly controlled by neuronal activity of the MNCs.

We generated transgenic rats expressing vasopressin-enhanced green fluorescent protein (eGFP) fusion gene. The eGFP fluorescence was clearly observed in the PVN and SON and axon terminals in the posterior pituitary gland in transgenic rats. The purpose of the present study was to establish the *in vivo* monitoring system to measure eGFP expressed in the tissue of transgenic rats. The probe for measurements of eGFP fluorescence was inserted in the posterior pituitary region of the isolated whole pituitary gland from the transgenic rats. The signal of eGFP fluorescence in the posterior pituitary gland was detected and decreased after perfusion of high potassium solution (55 mM). This means that vasopressin-eGFP was secreted from the axon terminals in the posterior pituitary by stimulation of high potassium solution. Next, we examined the effects of galanin-like peptide (GALP), which is synthesized in the pituicytes and upregulated by osmotic challenge, on eGFP fluorescence in the posterior pituitary gland by *in vivo* monitoring system. The signal of eGFP fluorescence in the posterior pituitary gland was also decreased after application of GALP in dose-related manner.

The *in vivo* monitoring system of eGFP fluorescence is a powerful tool to examine dynamic change of vasopressin release from the axon terminals in the posterior pituitary gland in vasopressin-eGFP transgenic rats. This system should be applied to the eGFP fluorescence in the hypothalamic areas under anesthetized and conscious transgenic rats.