

オキシトシン-mRFP1 トランスジェニックラットを用いた 新たなナトリウム・体液調節機構の解明

上田 陽一, 石倉 透

産業医科大学医学部

概要 下垂体後葉ホルモンとして知られるオキシトシンおよびバゾプレッシンは、視床下部視索上核および室傍核に限局する大細胞性神経分泌ニューロンの細胞体で産生され、下垂体後葉に投射した軸索終末から循環血液中に分泌される。

オキシトシンは性差に関わらずナトリウム利尿を引き起こすこと、オキシトシンが心臓に作用して心房性ナトリウム利尿ペプチド分泌を刺激すること、ラット脳室内にオキシトシンを投与すると食塩嗜好性が抑制されること、食塩水飲水負荷によりオキシトシンの合成・分泌が増加することなどが報告されている。したがって、オキシトシンが性差に関わらず、ナトリウム・体液調節機構に関与していることが示唆されるが、その詳細は不明である。

最近、我々はオキシトシン遺伝子に単量体赤色蛍光タンパク(monomeric red fluorescent protein 1: mRFP1) 遺伝子を挿入した融合遺伝子を用いてオキシトシン-mRFP1 トランスジェニックラットを作成した。このトランスジェニックラットを用いて得られた結果は以下の通りである。1) オキシトシンを mRFP1 赤色蛍光タンパクで標識することにより塩分負荷に対するオキシトシンの動態を赤色蛍光のダイナミックな変化として捉えることができた、2) 単離したオキシトシンニューロンに発現した mRFP1 赤色蛍光を指標に生細胞のまま同定し、ホールセルパッチクランプ法を用いて活動電位を記録することができた、3) オキシトシン-mRFP1 トランスジェニックラットと *c-fos-eGFP* トランスジェニックラットを交配したダブルトランスジェニックラットを作成することによりオキシトシンニューロン(赤色蛍光)の活動を *c-fos-eGFP*(緑色蛍光)の発現により可視化することができた。

今後、これらのトランスジェニックラットはオキシトシンとナトリウム・体液調節機構との関連を解明する上で非常に有用な動物モデルになることが期待される。

1. 研究目的

下垂体後葉ホルモンとして知られるオキシトシンおよびバゾプレッシンは、視床下部視索上核および室傍核に限局する大細胞性神経分泌ニューロンの細胞体で産生され、下垂体後葉に投射した軸索終末から循環血液中に分泌される。オキシトシンは、女性では子宮筋の収縮による分娩の促進や授乳時の射乳を引き起こすことがよく知られている。一方、バゾプレッシンは、腎臓の集合管の V2 受容体に結合してアクアポリン2を介して水の再吸収を促進することから抗利尿ホルモンとも呼ばれている。

オキシトシンは、女性のみならず男性の視床下部でも

同様に産生されて血中にも同程度の濃度で存在している。これまでに、オキシトシンは性差に関わらずナトリウム利尿を引き起こすこと^[1,2]、オキシトシンが心臓に作用して心房性ナトリウム利尿ペプチド分泌を刺激すること^[3]、ラット脳室内にオキシトシンを投与すると食塩嗜好性が抑制されること^[4]、食塩水飲水負荷によりオキシトシンの合成・分泌が増加すること^[5] などが報告されている。したがって、オキシトシンが性差に関わらず、ナトリウム・体液調節機構に関与していることが示唆されるが、その詳細は不明である。

我々は、これまでにバゾプレッシン遺伝子に改変緑色蛍光タンパク(enhanced green fluorescent protein:eGFP)

遺伝子を挿入した融合遺伝子を用いて作出したバゾプレッシン-eGFP トランスジェニックラットの視床下部視索上核、室傍核、視交叉上核および下垂体後葉においてバゾプレッシンニューロンとその軸索に緑色蛍光 (eGFP) を蛍光顕微鏡下で観察することに成功し、高張食塩水負荷を始め種々の生理的刺激によって緑色蛍光が敏感に変動することを明らかにしてきた^[6,7,8]。

最近、同様の手法を用いてオキシトシン遺伝子に単量体赤色蛍光タンパク (monomeric red fluorescent protein 1: mRFP1) 遺伝子を挿入した融合遺伝子を用いてオキシトシン-mRFP1 トランスジェニックラットを作出した^[9]。このトランスジェニックラットでは、視床下部視索上核、室傍核および下垂体後葉においてオキシトシンニューロンとその軸索に赤色蛍光 (mRFP1) が蛍光顕微鏡下で観察できた^[9]。

さらに、ニューロン活動の指標として汎用されている *c-fos* 遺伝子発現を可視化するために mRFP1 遺伝子もしくは eGFP 遺伝子を *c-fos* 遺伝子に挿入したトランスジェニックラットを作出した。我々は、これまでにバゾプレッシン-eGFP トランスジェニックラットと *c-fos*-mRFP1 トランスジェニックラットを交配することにより得られたダブルトランスジェニックラットを用いて 9% 高張食塩水の腹腔内投与後に視床下部視索上核および室傍核のバゾプレッシン-eGFP ニューロンの核内に *c-fos*-mRFP1 の赤色蛍光が発現することを確認した^[10]。

今回我々は、オキシトシン-mRFP1 トランスジェニックラットを用いて、(1) 2% 高張食塩水の飲水負荷後の視床下部視索上核および室傍核におけるオキシトシン-mRFP1 ニューロンの赤色蛍光の変動、(2) 視索上核から急性単離した大細胞性神経分泌ニューロンの mRFP1 赤色蛍光による同定とホールセルパッチクランプ法による活動電位の記録、(3) *c-fos*-eGFP トランスジェニックラットの脳内浸透圧感受性部位における 9% 高張食塩水の腹腔内投与後の eGFP 緑色蛍光の発現動態、(4) オキシトシン-mRFP1 トランスジェニックラットと *c-fos*-eGFP トランスジェニックラットを交配することにより得られたダブルトランスジェニックラットを用いてオキシトシン-mRFP1 ニューロンの神経活動の可視化 (*c-fos*-eGFP 緑色蛍光の核内への発現) が可能かどうかについて検討した。

2. 実験方法

2. 1 オキシトシン-mRFP1 トランスジェニックラットにおける 2% 高張食塩水の飲水負荷後の視床下部 mRFP1 赤色蛍光の変動

実験には、成熟雄性オキシトシン-mRFP1 トランスジェニックラットを用いた。コントロール群には水道水、高張食塩水負荷群には 2% 高張食塩水を飲料水として 5 日間与えた。両群ともに固形餌は自由摂取とした。5 日後にペントバルビタール投与による深麻酔下で開胸して 4% パラホルムアルデヒド溶液で灌流固定後、脳および下垂体を取り出した。2 日間の後固定後、視床下部を含む薄切切片 (30 μm) を作成して蛍光顕微鏡下で観察した。下垂体後葉は切片にせずにそのままの状態に蛍光顕微鏡下で観察した。

2. 2 オキシトシン-mRFP1 トランスジェニックラットの視索上核から急性単離したオキシトシン-mRFP1 ニューロンからの活動電位の記録

実験には、幼若雄性 (もしくは雌性) オキシトシン-mRFP1 トランスジェニックラットを用いた。頸椎脱臼後、すばやく断頭して脳を取り出し、視床下部を含むブロック標本を作成した。電動スライサーを用いてさらにトリミングして視索上核を含む切片をパンチアウトした。この切片を酵素処理後、大細胞性神経分泌ニューロンを単離して初代培養を行った。蛍光顕微鏡下で mRFP1 の赤色蛍光を指標に同定したオキシトシン-mRFP1 ニューロンからホールセルパッチクランプ法 (電流固定モード) により活動電位を記録した。

2. 3 *c-fos*-eGFP トランスジェニックラットの脳内における高浸透圧負荷後の eGFP 緑色蛍光の発現動態

実験には、成熟雄性 *c-fos*-eGFP トランスジェニックラットを用いた。コントロール群には 0.9% 生理食塩水 (2% 体重)、高浸透圧負荷群には 9% 高張食塩水 (2% 体重) を腹腔内に投与した。オキシトシン刺激群にはコレシストキニン (CCK) -8 (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重) を腹腔内に投与した。CCK-8 の末梢投与によりオキシトシンニューロンが選択的に興奮することが知られている。90 分後にペントバルビタール投与による深麻酔下で開胸して 4% パラホルムアルデヒド溶液で灌流固定後、脳を取り出した。2 日間の後固定後、脳内浸透圧感受性部位として知られている正中視索前野、脳弓下器官、視索上核および室傍核を含む薄切切片 (30 μm) を作成して蛍光顕微鏡下で観察した。

2. 4 オキシトシン-mRFP1 ニューロンの神経活動の可視化の試み

実験には、オキシトシン-mRFP1 トランスジェニックラットと *c-fos*-eGFP トランスジェニックラットを交配することにより得られたオキシトシン-mRFP1×*c-fos*-eGFP ダブルトランスジェニックラットを用いた。コントロール群には 0.9% 生理食塩水、オキシトシン刺激群にはコレシストキニン (CCK)-8 (50 µg/kg 体重) を腹腔内に投与した。90 分後にペントバルビタール投与による深麻酔下で開胸して 4% パラホルムアルデヒド溶液で灌流固定後、脳を取り出した。2 日間の後固定後、視索上核および室傍核を含む薄切切片 (30 µm) を作成して共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

3. 研究結果

3. 1 オキシトシン-mRFP1 トランスジェニックラットにおける 2% 高張食塩水の飲水負荷後の視床下部 mRFP1 赤色蛍光の変動

コントロール群において視床下部視索上核および室傍核に局在する大細胞性神経分泌ニューロンの細胞体および軸索に mRFP1 赤色蛍光が観察された (Fig. 1A, C)。さ

らに正中隆起内層および下垂体後葉に mRFP1 赤色蛍光が観察された。2% 高張食塩水を飲料水として与えた高張食塩水負荷群では、視索上核および室傍核に局在するオキシトシンニューロンの細胞体および軸索に著明な mRFP1 赤色蛍光の増加が観察された (Fig. 1B, D)。また、正中隆起内層および下垂体後葉に mRFP1 赤色蛍光の著明な増加も観察された。

3. 2 オキシトシン-mRFP1 トランスジェニックラットの視索上核から急性単離したオキシトシン-mRFP1 ニューロンからの活動電位の記録

オキシトシン-mRFP1 トランスジェニックラットの視索上核から急性単離した大細胞性神経分泌ニューロンから蛍光顕微鏡下で mRFP1 赤色蛍光を指標にオキシトシンニューロンを同定することができた (Fig. 2A, B)。同定したオキシトシン-mRFP1 ニューロンからホールセルパッチクランプ記録法 (電流固定モード) を用いて活動電位を記録することができた (Fig. 2C, D)。

3. 3 *c-fos*-eGFP トランスジェニックラットの脳内における高浸透圧負荷後の eGFP 緑色蛍光の発現動態

0.9% 生理食塩水を腹腔内に投与したコントロール群では、観察したすべての部位において *c-fos*-eGFP 緑色蛍光

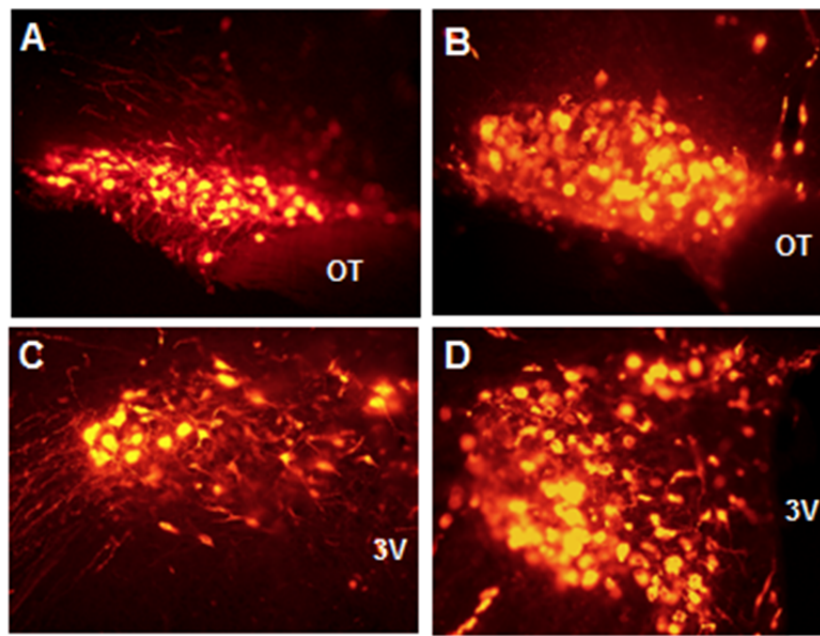


Fig. 1. Effects of chronic salt loading (2% saline to drink for 5 days) on mRFP1 fluorescence in the supraoptic nucleus (SON) (A, B) and the paraventricular nucleus (PVN) (C, D) in oxytocin-mRFP1 transgenic rats. Sections are obtained from control (A, C) and salt loaded rats (B, D). Scale bar, 100 µm. OT, optic tract; 3V, third ventricle.

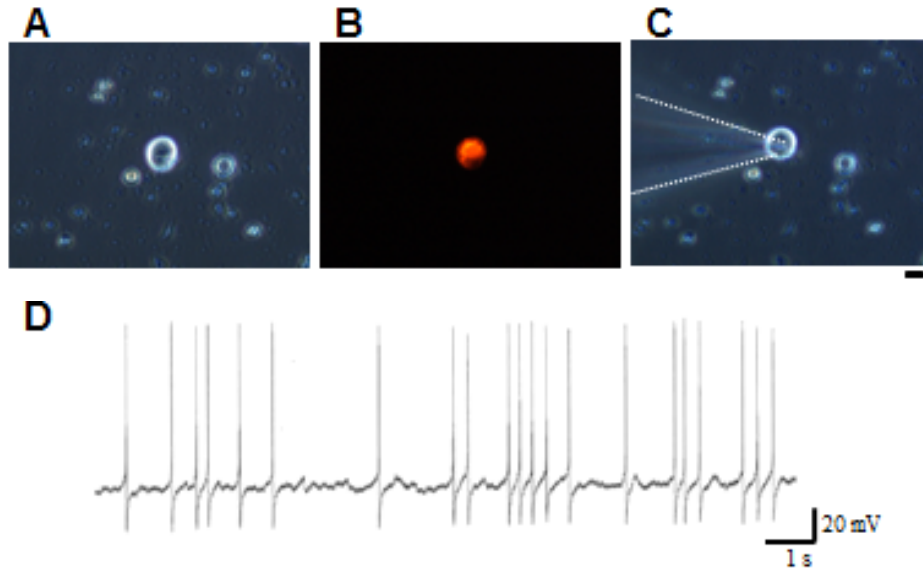


Fig. 2. Identification of an oxytocin-mRFP1 (red fluorescent) neuron (A, B) isolated from the supraoptic nucleus (SON) of oxytocin-mRFP1 transgenic rat and whole-cell patch clamp recording in the current clamp mode (C, D). Scale bar, 10 μ m.

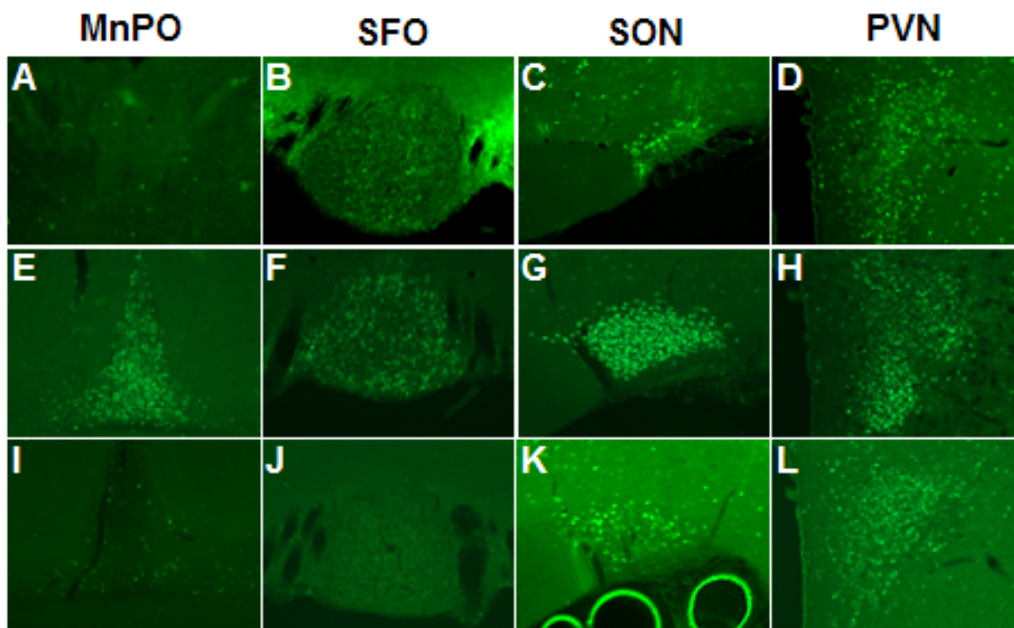


Fig. 3. Nuclear *c-fos*-eGFP expression in the central osmosensitive sites 90 min after intraperitoneal (ip) administration of 0.9% saline (A, B, C, D), 9% saline (2% body weight) (E, F, G, H) and cholecystokinin (CCK)-8 (50 μ g/kg body weight) (I, J, K, L) in *c-fos*-eGFP transgenic rat. MnPO, median preoptic nucleus; SFO, subfornical organ; SON, supraoptic nucleus; PVN, paraventricular nucleus. Scale bar, 100 μ m.

はほとんど見られなかった (**Fig. 3A, B, C, D**)。一方、9%高張食塩水を腹腔内に投与した高浸透圧負荷群では、正中視索前野、脳弓下器官、視索上核および室傍核におけるニューロンの核内に数多くの eGFP 緑色蛍光が観察された (**Fig. 3E, F, G, H**)。また、CCK-8 を腹腔内に投

与したオキシトシン刺激群では、正中視索前野および脳弓器官で eGFP 緑色蛍光は観察されず (**Fig. 3I, J**)、視索上核および室傍核のニューロンの核内に eGFP 緑色蛍光が観察された (**Fig. 3K, L**)。

3. 4 オキシトシン-mRFP1 ニューロンの神経活動の可視化の試み

実験には、オキシトシン-mRFP1×*c-fos*-eGFP ダブルトランスジェニックラットを用いた。コントロール群では、視索上核および室傍核に局在するオキシトシン-mRFP1 の赤色蛍光のみが観察された(Fig. 4 上段)。一方、CCK-8 を腹腔内に投与したオキシトシン刺激群においては、視索上核および室傍核のオキシトシン-mRFP1 赤色蛍光ニューロンの核内に eGFP 緑色蛍光が発現していることが確認された(Fig. 4 下段および拡大図)。

4. 考 察

本研究では、新たに開発した動物モデルであるオキシトシン-mRFP1 トランスジェニックラットを用いてオキシトシンとナトリウム・体液調節機構との関連について明らかにすることを目的とした。

その結果、1)オキシトシン-mRFP1 トランスジェニックラッ

トでは、オキシトシンを mRFP1 赤色蛍光タンパクで標識することにより塩分負荷に対するオキシトシンの動態を赤色蛍光のダイナミックな変化として捉えることができた、2) 単離したオキシトシンニューロンに発現した mRFP1 赤色蛍光を指標に生細胞のまま同定し、ホールセルパッチクランプ法を用いて活動電位を記録することができた、3) オキシトシン-mRFP1 トランスジェニックラットと *c-fos*-eGFP トランスジェニックラットを交配したダブルトランスジェニックラットを作成することによりオキシトシンニューロン(赤色蛍光)の活動を *c-fos*-eGFP(緑色蛍光)の発現により可視化することができた。

このトランスジェニックラットを用いて、視床下部視索上核および室傍核に局在するオキシトシンニューロンにおいてナトリウム負荷後にオキシトシン産生が増加することが確認できた。今後、オキシトシンとナトリウム・体液調節機構との関連を解明する上で非常に有用な動物モデルになることが期待される。

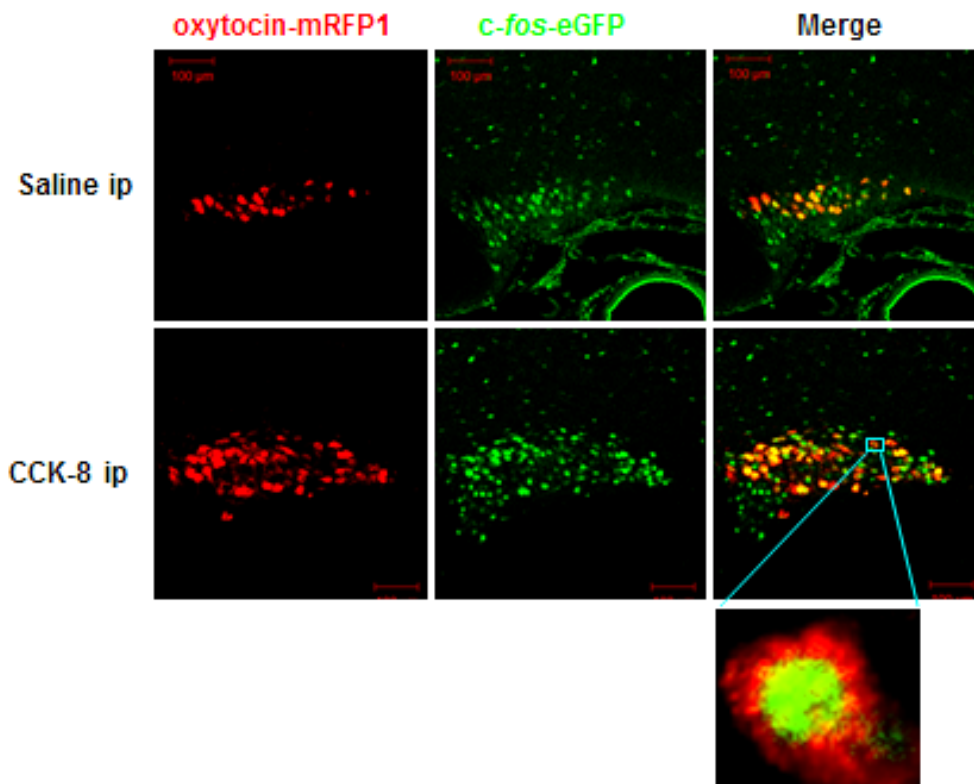


Fig. 4. Effects of intraperitoneal (ip) administration of 0.9% saline (upper panels) and cholecystokinin (CCK)-8 (50 µg/kg body weight) (lower panels) on nuclear *c-fos*-eGFP (green fluorescence) and cytoplasmic oxytocin-mRFP1 (red fluorescence) expression in the supraoptic nucleus (SON) of double transgenic rat. Enlarged neuron shows a nuclear green fluorescence in a cytoplasmic red fluorescence. Scale bars, 100 µm.

5. 今後の課題

今回我々は、オキシトシン-mRFP1トランスジェニックラットおよび *c-fos*-eGFP トランスジェニックラットにおける塩分負荷後の蛍光タンパクの脳内における動態を明らかにした。また、単離したオキシトシンニューロンを mRFP1 赤色蛍光で同定することができた。今後、ナトリウム負荷や種々の体液変化に対してオキシトシンニューロンがどのように活動するかについて *in vivo* の状態で検討するための工夫が必要である。

文 献

1. Forsling ML, Judah JM, Windle RJ. (1994) The effect of vasopressin and oxytocin on glomerular filtration rate in the conscious rat: contribution to the natriuretic response. *J Endocrinol.* 141(1): 59-67.
2. Walter MF, Forsling ML, Shirley DG. (2000) Contribution of endogenous oxytocin to sodium excretion in anaesthetized, surgically operated rats. *J Endocrinol.* 165(1): 19-24.
3. Gutkowska J, Jankowski M, Lambert C, Mukaddam-Daher S, Zingg HH, McCann SM. (1997) Oxytocin releases atrial natriuretic peptide by combining with oxytocin receptors in the heart. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(21): 11704-11709.
4. Blackburn RE, Samson WK, Fulton RJ, Stricker EM, Verbalis JG. (1993) Central oxytocin inhibition of salt appetite in rats: evidence for differential sensing of plasma sodium and osmolality. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90(21): 10380-10384.
5. Yue C, Mutsuga N, Sugimura Y, Verbalis J, Gainer H. (2008) Differential kinetics of oxytocin and vasopressin heteronuclear RNA expression in the rat supraoptic nucleus in response to chronic salt loading *in vivo*. *J Neuroendocrinol.* 20(2): 227-232.
6. 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.
7. Fujio T, Fujihara H, Shibata M, Yamada S, Onaka T, Tanaka K, Morita H, Dayanithi G, Kawata M, Murphy D, Ueta Y. (2006) Exaggerated response of arginine vasopressin-enhanced green fluorescent protein fusion gene to salt loading without disturbance of body fluid homeostasis in rats. *J Neuroendocrinol.* 18(10): 776-785.
8. Ueta Y, Dayanithi G, Fujihara H. (2011) Hypothalamic vasopressin response to stress and various physiological stimuli: visualization in transgenic animal models. *Horm Behav.* 59(2): 221-226.
9. Katoh A, Fujihara H, Ohbuchi T, Onaka T, Hashimoto T, Kawata M, Suzuki H, Ueta Y. (2011) Highly visible expression of an oxytocin-monomeric red fluorescent protein 1 fusion gene in the hypothalamus and posterior pituitary of transgenic rats. *Endocrinology* 152(7): 2768-2774.
10. Fujihara H, Ueta Y, Suzuki H, Katoh A, Ohbuchi T, Otsubo H, Dayanithi G, Murphy D. (2009) Robust up-regulation of nuclear red fluorescent-tagged *fos* marks neuronal activation in green fluorescent vasopressin neurons after osmotic stimulation in a double-transgenic rat. *Endocrinology* 150(12): 5633-5638.

Novel Regulation of Sodium and Body Fluid Balance in Oxytocin-mRFP Transgenic Rats

Yoichi Ueta and Toru Ishikura

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

Summary

Oxytocin as well as vasopressin is synthesized in the magnocellular neurosecretory cells (MNCs) in the supraoptic nucleus (SON) and the paraventricular nucleus (PVN) of the hypothalamus. The MNCs project their axon terminals to the posterior pituitary gland and secrete oxytocin and vasopressin into the systemic circulation. Oxytocin is well known to facilitate the birth and cause milk ejection reflex. On the other hand, previous studies demonstrated that oxytocin caused natriuresis in kidney, oxytocin stimulated the secretion of atrial natriuretic peptide from the heart and central administration of oxytocin suppressed sodium appetite in rats. In addition, chronic salt loading caused an increase of the synthesis and secretion of oxytocin. The accumulating evidence has suggested that oxytocin may be involved in the regulation of sodium and body fluid balance.

Recently, we generated a transgenic rat that expresses the oxytocin-monomeric red fluorescent protein 1 (mRFP1) fusion gene in the hypothalamo-neurohypophysial system. Chronic salt loading (2% saline to drink for 5 days) caused marked increase of mRFP1 fluorescence in the SON and the PVN. A single MNC isolated from the SON of an oxytocin-mRFP1 transgenic rat was identified by red fluorescence and action potentials were recorded by whole-cell patch clamp technique in current clamp mode. We generated another transgenic rat that expresses the *c-fos*-enhanced green fluorescent protein (eGFP) fusion gene after adequate stimuli such as osmotic challenge. The double transgenic rat that expresses both the oxytocin-mRFP1 fusion gene and the *c-fos*-eGFP fusion gene showed a nuclear green fluorescence in red fluorescent cytoplasm in the SON and the PVN after systemic administration of cholecystokinin-8.

The oxytocin-mRFP1 transgenic rats as well as the *c-fos*-eGFP transgenic rats are useful animal models to examine the relationship between oxytocin and sodium and body fluid balance in *in vitro* and *in vivo* preparations.