

29. 脳内浸透圧調節ネットワーク・分子基盤解明

上田 陽一

産業医科大学 医学部 第1生理学

Key words : 遺伝子改変動物, *c-fos* 遺伝子, 浸透圧, バゾプレッシン, 光遺伝学

緒言

生体の約 60 % は水分で構成されており、水分および血漿浸透圧の恒常性は、飲水行動による能動的な水分摂取と腎臓での水分の再吸収・排尿や発汗などによる水分の排泄との出納のバランスで維持されている。

正常な体内の水分量および血漿浸透圧の中樞性調節は、主に脳室周囲器官および視床下部-下垂体後葉系を含む脳内浸透圧調節ネットワークで感知・維持されていることによる。

視床下部視索上核 (SON) および室傍核 (PVN) にその細胞体が局在する大細胞性神経分泌ニューロンでは神経性および液性情報を統合して、下垂体後葉に投射した軸索終末からのバゾプレッシン分泌を神経活動の増減により調節している。バゾプレッシン分泌は、“渇きの感覚 (口渇感)” が生じる前に血漿浸透圧の僅かな上昇に反応して急激に増加する。血中に分泌されたバゾプレッシンは腎臓の遠位尿細管の V2 受容体に作用してアクアポリン 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る。

我々は、これまでに神経活動の指標として汎用されている *c-fos* 遺伝子に蛍光タンパク (緑色蛍光タンパク (eGFP) および赤色蛍光タンパク (mRFP1)) 遺伝子を挿入した融合遺伝子を用いて作出したトランスジェニックラットを用いて急性・慢性浸透圧刺激後の脳内浸透圧調節ネットワークにおける Fos タンパクの発現パターンについて蛍光タンパクを指標に同定することに成功した¹⁻³⁾。

本研究では、発展著しい光遺伝学的手法を応用して脳内浸透圧調節ネットワークとバゾプレッシン分泌、さらには飲水行動との連関を明らかにすることを目標とし、そのために光興奮性イオンチャネルであるチャネルロドプシン 2 (ChR2) を発現する遺伝子改変動物の作出を試みた。

方法および結果

c-fos 遺伝子に *ChR2* 遺伝子を挿入した融合遺伝子を用いて、トランスジェニックラットを作出した。*ChR2* 遺伝子は *ChR2-2A-Halo* クローン (Addgene, Plasmid #22047) から *ChR2-eGFP* 構成部分を切り出して、BAC 法により *c-fos* 遺伝子に導入した¹⁻³⁾。ファウンダーから得られた F1 および F2 個体について PCR 法を用いて融合遺伝子の導入の有無を確認し、陽性の F1 および F2 個体について以下の検討を行った。

1. 脱水刺激による脳内 ChR2-eGFP 発現

c-fos-ChR2-eGFP トランスジェニックラットを用いて 2 日間の脱水を行った。この間、固形餌は自由摂取とした。自由飲水 (コントロール) ラットと脱水ラットを深麻酔下で開胸後、経心的に 4 % パラホルムアルデヒド固定液で灌流固定を行い、全脳を取り出した。2 日間の後固定ののちに、20 % シュクロース液に浸透した後にマイクロトームを用いて 30 μ m 厚さの切片を作製した。蛍光顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡を用いて eGFP 蛍光を観察した。

その結果、脱水ラットにおいて SON 腹側および PVN 大細胞群の部位に強い eGFP 蛍光が見られた (図 1C, D)。一方、コントロールラットでは、SON および PVN に eGFP 蛍光は見られなかった (図 1A, B)。

Fos タンパクは最初期遺伝子群の一つであり、発現した Fos タンパクはニューロンの核内に局在する。今回用いた *c-fos-ChR2-eGFP* 融合遺伝子は、発現後に ChR2-eGFP を細胞膜へ組み込む構造であり、ChR2 の発現を示唆する eGFP 蛍光は細胞膜に局限していると推測される。

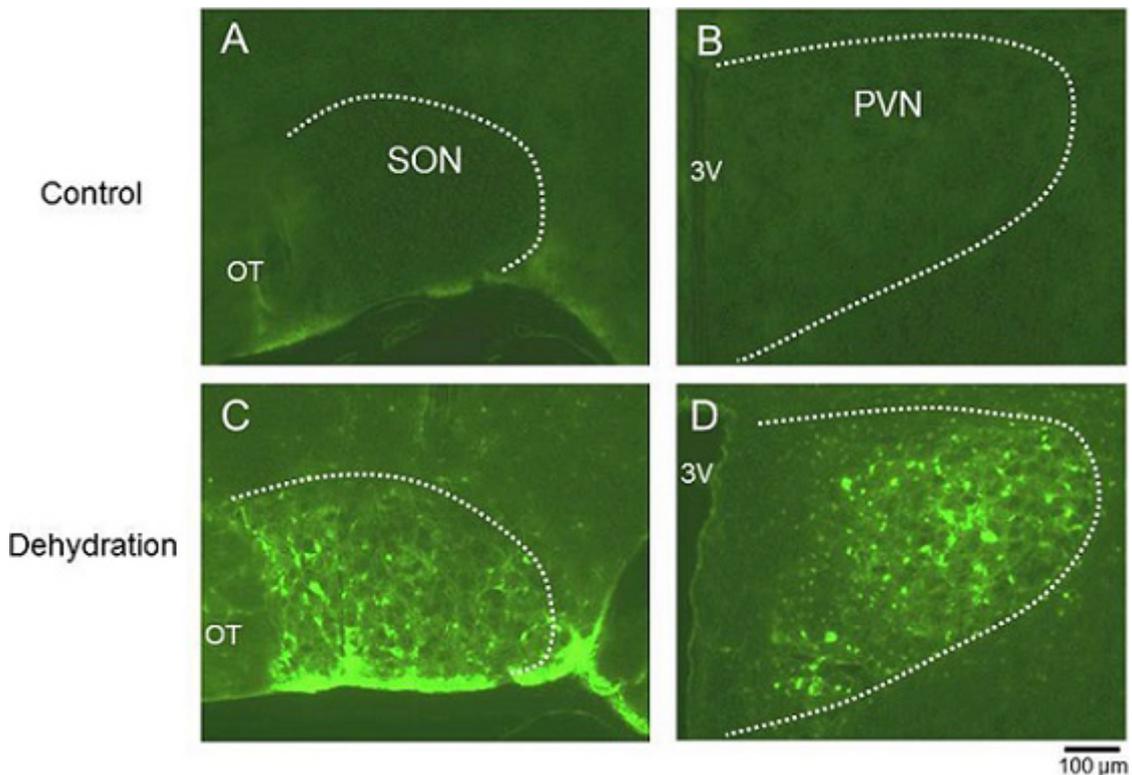


図1. 脱水（2日間）後の *c-fos*-ChR2-eGFP トランスジェニックラットにおける視索上核（SON）および室傍核（PVN）での ChR2-eGFP 発現
 視床下部視索上核（SON）（A、C）および室傍核（PVN）（B、D）において、脱水群（Dehydration）（C、D）では、コントロール群（Control）（A、B）と比較して eGFP の発現が著明に増加していた。Scale Bar: 100 μ m。
 OT: 視神経、3V: 第3脳室。

2. 高張食塩水の腹腔内投与による脳内 ChR2-eGFP 発現

c-fos-ChR2-eGFP トランスジェニックラットを用いて高張食塩水（9%食塩水）の腹腔内投与を行った。コントロールには0.9%生理食塩水を投与した。9%高張食塩水もしくは0.9%生理食塩水の腹腔内投与後、90分後および6時間後に深麻酔下で灌流固定を行った。前述と同様の方法で切片を作製後、eGFP 蛍光を観察した。

その結果、9%食塩水腹腔内投与90分後の eGFP 蛍光は、コントロールとあまり変化なかった（図2 A-D）。一方、9%食塩水腹腔内投与6時間後では、SON および PVN における eGFP 蛍光が増加した（図2 E、F）。

Fos タンパクの核内での検出は、適刺激後90~120分後に最大となりその後消退する。今回、高張食塩水刺激後の Fos タンパクの発現が最大に近いと考えられる90分後では eGFP 蛍光が観察されず、Fos タンパクが消退した後の時間である6時間後に ChR2 の発現を示唆する eGFP 蛍光が観察された。この時間差の原因は不明であるが、ChR2 が細胞膜へ組み込まれるまでに時間がかかるのかもしれない。

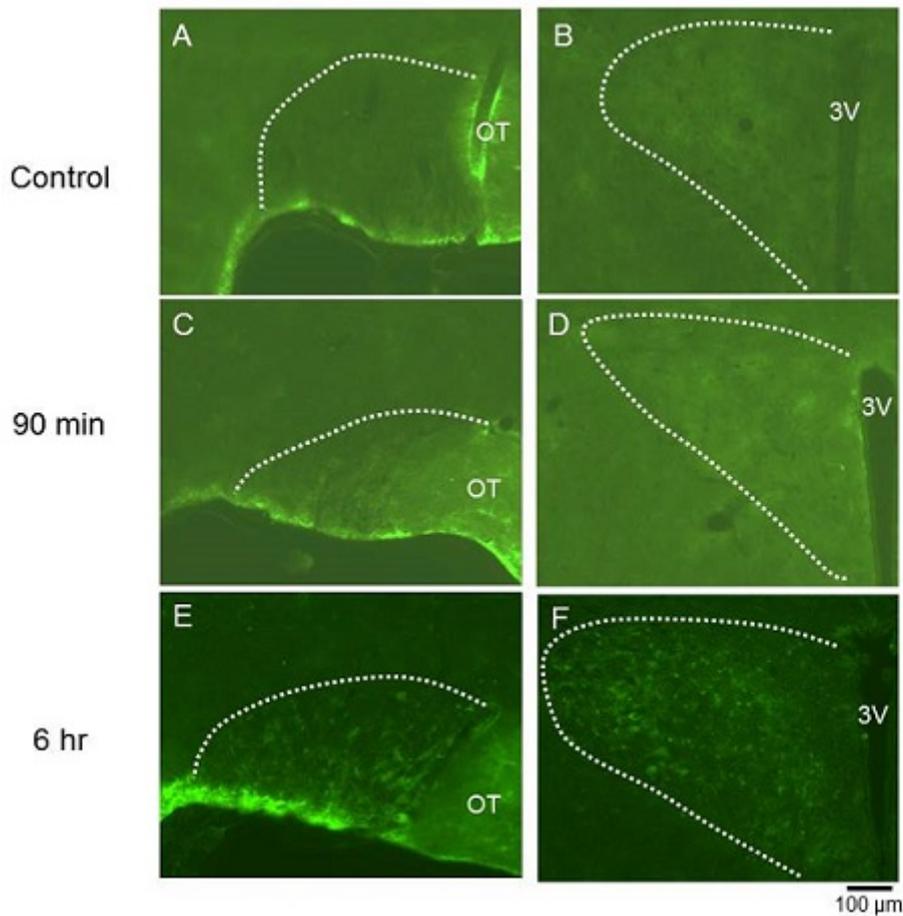


図2. 高張食塩水 (9 %) 腹腔内投与後の *c-fos*-ChR2-eGFP トランスジェニックラットにおける視索上核 (SON) および室傍核 (PVN) における ChR2-eGFP 発現

視床下部視索上核 (SON) (A、C、E) および室傍核 (PVN) (B、D、F) において、高張食塩水腹腔内投与 6 時間後 (6 hr) (E、F) では、生理食塩水腹腔内投与群 (Control) (A、B) および高張食塩水腹腔内投与 90 分後 (90 min) (C、D) と比較して eGFP の発現が著明に増加している。Scale Bar: 100 μ m。OT: 視神経、3V: 第3脳室。

3. *c-fos*-ChR2-eGFP トランスジェニックラットの皮膚症状

c-fos-ChR2-eGFP トランスジェニックラットの飼育中、脱毛および皮膚の硬化・出血が見られたため皮膚標本を作製して HE 染色後に観察した。その結果、肥厚した角質と毛包の一部に角化が見られた (図3)。

皮膚組織への *c-fos* 遺伝子の発現とともに ChR2 の発現が誘導された結果、動物研究センター実験室の照明の影響によって慢性的に ChR2 が活性化したためかもしれない。



図3. *c-fos*-ChR2-eGFP トランスジェニックラット皮膚病変部における組織像

c-fos-ChR2-eGFP トランスジェニックラットには全身性の脱毛および皮膚の硬化・出血が見られたため皮膚標本作製を行った (HE 染色)。肥厚した角質と毛包の一部に角化が見られた。Scale Bar: 200 μ m。

考 察

今回、我々は *c-fos*-ChR2-eGFP トランスジェニックラットの作出に成功し、脱水および急性浸透圧刺激により視床下部 SON および PVN に ChR2-eGFP の発現が誘導されることを確認した。これらの部位は、主にバゾプレッシンニューロンの細胞体が局在しているところである。

今後、これらの部位に ChR2 を活性化する青色光照射を行い、バゾプレッシン分泌を惹起できるかどうかを検討し、さらには血中バゾプレッシン濃度や飲水行動への影響について検討したい。

なお、このトランスジェニックラットの皮膚症状については ChR2 に影響を与える可能性のある光波長をカットして飼育するなどの工夫を講じる必要がある。

共同研究者

本研究の共同研究者は、産業医科大学医学部第1生理学の橋本弘史である。最後に、本研究にご支援いただきました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Fujihara H, Ueta Y, Suzuki H, Katoh A, Ohbuchi T, Otsubo H, Dayanithi G, Murphy D. 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*. 2009 Dec;150(12):5633-8. doi: 10.1210/en.2009-0796. Epub 2009 Oct 22. PMID: 19850746
- 2) Yoshimura M, Ohkubo J, Katoh A, Ohno M, Ishikura T, Kakuma T, Yoshimatsu H, Murphy D, Ueta Y. A *c-fos*-monomeric red fluorescent protein 1 fusion transgene is differentially expressed in rat forebrain and brainstem after chronic dehydration and rehydration. *J Neuroendocrinol*. 2013 May;25(5):478-87. doi: 10.1111/jne.12022. PMID: 23350545
- 3) Katoh A, Shoguchi K, Matsuoka H, Yoshimura M, Ohkubo JI, Matsuura T, Maruyama T, Ishikura T, Aritomi T, Fujihara H, Hashimoto H, Suzuki H, Murphy D, Ueta Y. Fluorescent visualisation of the

hypothalamic oxytocin neurones activated by cholecystokinin-8 in rats expressing c-fos-enhanced green fluorescent protein and oxytocin-monomeric red fluorescent protein 1 fusion transgenes. *J Neuroendocrinol.* 2014 May;26(5):341-7. doi: 10.1111/jne.12150. PMID: 24730419