

## 中枢神経系における浸透圧調節機構の解析

### Analysis of osmotic regulation in the central nervous system

代表研究者 大阪大学医学部解剖学第二講座助教授

島田昌一

Department of Anatomy & Neuroscience, Osaka University, Medical School

Shoichi SHIMADA

The osmoregulatory system is well developed in the brain. Osmolytes contribute to maintenance of cell volume and cellular functions without changing intracellular ionic composition. Myo-inositol is regarded as one of the major osmolytes in the brain. It is taken up into the cells by the Na<sup>+</sup>/myo-inositol cotransporter (SMIT). Focal cerebral ischemia resulted in a increase in Na<sup>+</sup>/myo-inositol cotransporter (SMIT) mRNA 12h after surgery in the cortex of the affected side. Vasogenic brain edema induced by cold injury also showed a similar change in SMIT mRNA expression. Acute hypertonic stress induced Na<sup>+</sup>/myo-inositol cotransporter (SMIT) expression in the brain and the retina, while chronic hypertonic stress resulted in a marked increase in taurine transporter (TauT) mRNA in the retina. We have also isolated a novel osmotic stress responsive peptide/histidine transporter cDNA and a novel osmotic stress responsive RNA helicase cDNA.

#### 研究目的

生物の細胞は外的及び内的な環境の変化によって脱水や浮腫などの様々な浸透圧の変化に曝されている。このような細胞外液の浸透圧の変化は、そのままの状態では細胞の形態や機能に強い影響を与えるため、いくつかの防御機構が存在している。その主なものの一つに有機浸透圧物質（オスモライト）を細胞内に取り込んだり放出したり、生産したり分解したりする系がある。オスモライトは細胞外の高浸透圧に対抗して、細胞内に蓄積することによって、細胞内外の浸透圧バランスを保つという有効浸透圧作用と、同時に細胞内の蛋白質や核酸の高次構造が高浸透圧により変化するのを防ぐ細胞機能保護作用があると考えられている。オスモライトの腎臓での機能につい

ては多くの解析が進められてきているが、中枢神経系においてはあまり研究が進んでいない。特に中枢神経系のような、細胞の形態が非常に複雑に入り組んで、かつ頭蓋骨に囲まれている占有体積の限られた領域では、細胞外液の浸透圧の変化に伴う細胞の体積や形態の変化は、その細胞に致命的な打撃を与える。そのため、神経系には特殊な鋭敏な浸透圧調節系が存在すると考えられる。

本研究では中枢神経系では浸透圧変化に対してどのタイプのオスモライトのトランスポーターが細胞防御機構に関与しているかを浸透圧負荷動物を用いて検討する。さらに、differential display法を用いて、浸透圧負荷の際に神経系において遺伝子発現誘導が生じる、新規の浸透圧関連遺伝子

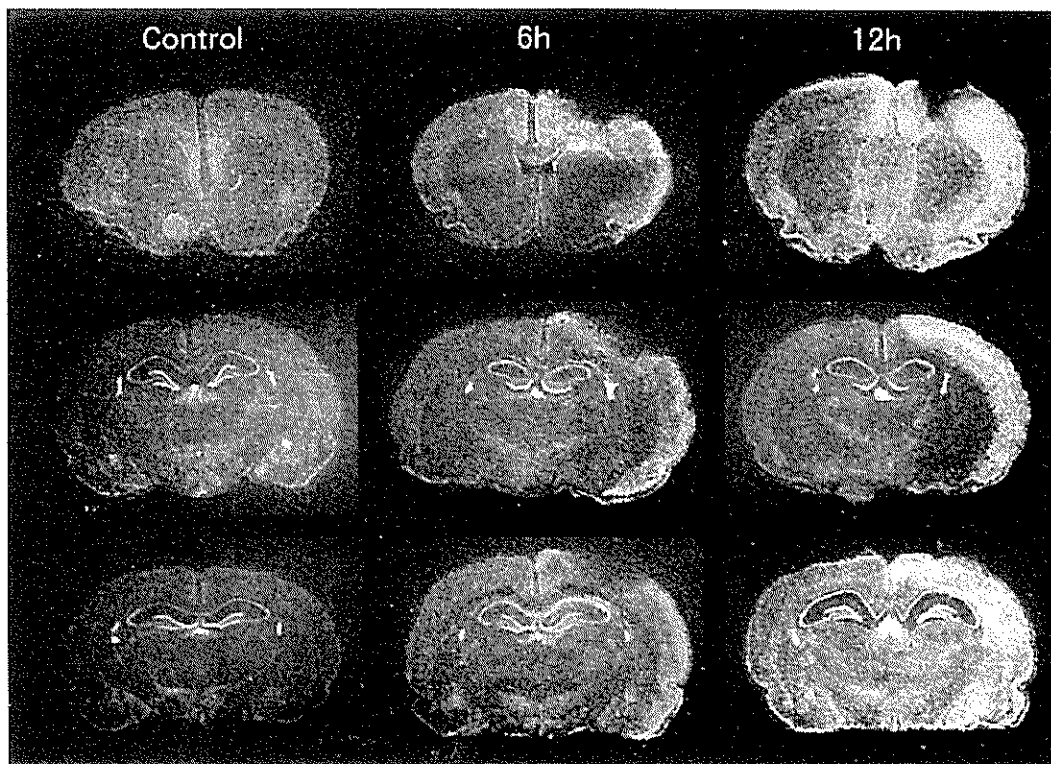


図1 凍結損傷による脳浮腫のモデルラットを用いたin situハイブリダイゼーション法によるミオイノシールトランスポーター(SMIT)の遺伝子発現変化。

を単離し、解析し、中枢神経系における脱水、高浸透圧ストレスに対する特殊な細胞保護機構のメカニズムの解明をめざす。

#### 研究経過

我々は、脱水、高張NaCl負荷などの高浸透圧負荷ラットにおいて、オスモライトのトランスポーターの遺伝子発現を検討した。

その中でも、中枢神経系においてはミオイノシールトランスポーター(SMIT)が最も鋭敏に細胞外の浸透圧変化に応じて、そのmRNAの発現量を変化させた。特に急性の高浸透圧負荷では腎臓のデータとは異なり、神経系ではSMITが時間単位で迅速な遺伝子発現量の増減を示すことを明かとし、神経系に特殊な浸透圧調節系が存在すると考えられた。

#### 研究成果

浸透圧変化時の蛋白レベルでのSMITの活性変化を調べるため、アストロサイト培養細胞を用いてSMIT蛋白のミオイノシール取り込み活性を検討したところ、浸透圧負荷によって取り込み活性は急激に上昇した。次に神経疾患モデル動物におけるSMITの発現変化を検討した。中大脳動脈閉塞ラットにおいて閉塞12時間後、梗塞周囲の領域及び同側の大脳皮質でSMIT遺伝子の発現の上昇が認められた。このSMITmRNAの増加は、24時間後ピークに達し反対側の帯状回にまで広がった。このようにSMITmRNAの上昇は梗塞部位から離れた領域まで広がっており、梗塞後の周辺領域の脳浮腫に伴った細胞外の浸透圧の上昇がSMITのinductionを引

MEGERAPLLGSRRAAAAAGVFAGRRAACGAVL  
 LAELLERAAFYGV TANLVFLNGAPFNWEGAQA  
 SQALLFMGLTYLGSPFGWLADARLGRARAIL  
 LSLALYLLGMLAFPLLAAPRSRSLCGDPHPELV  
 RWC SAPFPNGTAVCPDAAARRCAPATFAGLVL  
 VGLGVATVKANITPFGADQVKDRGPEATRREFN  
 WFWYSINLGAILSLGGIAYIQQNVSFLTGYLIPTV  
 CVAIAFLVFLCGQSVFITKPPDGSATDMFRILTY  
 SCCSORGGQRRSREGGLGVFQQSSKHSFLDSC  
 KMSRGGPFTEDEKVEDVKALVKIVPVFLALIPYWT  
 VYEQMOTTYVLQSLHLKIFEISSITTTHTLPAA  
 WLTMFDAVLILLIPLKDKLVDPVLRHGLLPSSL  
 KRIAVGMFFVTCSAFAAGILESKRLDLVKEKTIN  
 QTIGGVVYHAADLPWQIPQYVVLIGISEIFASIA  
 GLEFAYSAAPKSMQSAIMGLFFFSGIGSFVGS  
 GLLALVSLKAIGWMSSHTDFGNIN SCHLHYFFL  
 LAAIQGATLLLLFLIVSVKYDRQRARTDGGTASTR  
 †

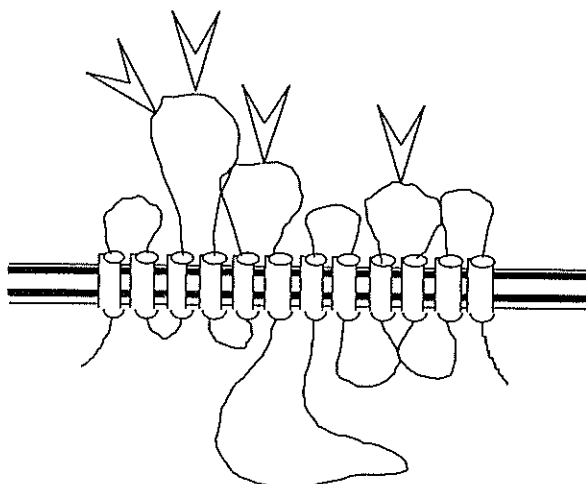


図2 浸透圧応答性の新規ペプチド/ヒスチジントランスポーターの amino 酸配列と構造

き起こしたと考えられた。そこで、脳浮腫モデルである凍結損傷ラットを用いて検索を行ったところ、同様にSMITmRNAの強い発現上昇が、損傷部位をはるかに上回った幅広い領域で認められた。

また、differential display法等を用いて、神経系に特異的な浸透圧応答性の新規のペプチド/ヒスチジントランスポーターのcDNAや、浸透圧応答性の新規のRNA helicaseのcDNAを単離した。これらの結果から、ペプチドもオスモライトとして機能している可能性や、神経系に特異的に発現しているオスモライトトランスポーターが存在している可能性を示唆した。また浸透圧応答性のRNA helicaseが、オスモライトのトランスポーターの翻訳に得お経を与えるかどうかを検討中である。

#### 今後の課題と発展

Differential Display法で得られた浸透圧応答性の新規RNA helicaseが、オスモライトのトランスポーターも含めて、どの様な蛋白の翻訳調節に関与しているかを検討する必要がある。橋中央ミエリン溶解や透析不均

衡症候群等の中枢神経系の浸透圧異常と関係する病気と我々が解析している遺伝子の関連性理解についても検討が必要である。  
 発表論文リスト

1. Minami, Y., S. Shimada, K. Inoue, H. Morimura, A. Miyai, A. Yamauchi, T. Matsunaga, and M. Tohyama, Expression of Na<sup>+</sup>/myo-inositol cotransporter mRNA in the inner ear of the rat. *Mol Brain Res*, 1996. 35: 319-324.
2. Fujita, M., S. Shimada, M. Tohyama, and T. Nishimura, Visualization of ischemic insult in caudate putamen with beta-CIT. *J Nuc Med*, 1996. 37, 1214-1218.
3. Inoue, K., K. Sato, M. Tohyama, S. Shimada, and G. Uhl, Widespread brain distribution of mRNA encoding the orphan neurotransmitter transporter v7-3. *Mol Brain Res*, 1996. 37, 217-223.
4. Morimura, H., S. Shimada, Y. Otori, A. Yamauchi, Y. Minami, K. Inoue, A. Miyai, I. Ishimoto, Y. Tano, and M. Tohyama, Expression of Na<sup>+</sup>/Myo-Inositol Cotransporter mRNA in the Normal and Hypertonic Stress Rat Eyes. *Mol Brain Res*, 1996. 35: 333-338.
5. Minami, Y., Inoue, K., Shimada, S., Morimura, H., Miyai, A., Yamauchi, A., Matunaga, T. and Tohyama, M. Rapid and transient up-regulation of Na<sup>+</sup>/myo-inositol

- cotransporter transcription in the brain of acute hypernatremic rats. *Mol Brain Res*, 1996, 40: 64-70.
6. Inoue, K., Shimada, S., Minami, Y., Morimura, H., Miyai, A., Yamauchi, A. and Tohyama, M. Cellular localization of Na<sup>+</sup>/myo-inositol cotransporter mRNA in the rat whole brain. *Neuroreport*, 1996, 7, 1195-1198.
  7. Yamashita, T., Kohmura, E., Yuguchi, T., Shimada, S., Tanaka, K., Hayakawa, T. and Tohyama, M. Changes in glutamate/aspartate transporter (GLAST/GluT-1) mRNA expression following facial nerve transection. *Mol Brain Res*, 1996, 38: 294-299.
  8. Yamashita, T., Kohmura, E., Yamauchi, A., Shimada, S., Yuguchi, T., Sakaki, T., Miyai, A., Tohyama, M. and Hayakawa, T. Induction of Na<sup>+</sup>/myo-inositol cotransporter mRNA after focal cerebral ischemia: evidence for extensive osmotic stress in remote areas. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1996, 16: 1203-1210.
  9. Miyai, A., Yamauchi, A., Moriyama, T., Kaneko, T., Takenaka, M., Sugiura, T., Kitamura, H., Ando, A., Tohyama, M., Shimada, S., Imai, E., and Kamada, T. Expression of betaine g-amino-n-butyric acid transporter: its unique localization and rapid regulation in rat kidney. *Kidney Int*, 1996: 50, 819-827.
  10. Masago, A. Shimada, S., Minami, Y., Inoue, K., Morimura, H., Otori, Y., Miyai, A., Tohyama, M., and Yamada, K., GLAST mRNA expression on the periventricular area of experimental hydrocephalus. *NeuroReport*, 1996: 7,2565-2570.
  11. Nishimura, M., Sato, K., Mizuno, M., Yoshiya, I., Shimada, S., Saito, N., and Tohyama, M., Differential expression patterns of GABA transporters (GAT1-3) in the rat olfactory bulb. *Mol Brain Res*, 1997, 45, 268-274.
  12. Yasumi, M., Sato, K., Shimada, S., Nishimura, M., and Tohyama, M. Regional distribution of GABA transporter1 (GAT1) mRNA in the rat brain: Comparison with Glutamic acid decarboxylase67 (GAD67) mRNA localization. *Mol Brain Res*, 1997: 44, 205-218.
  13. Morimura, H., Shimada, S., Otori, Y., Saishin, Y., Yamauchi, A., Minami, Y., Inoue, K., Ishimoto, I., Tano, Y. and Tohyama, M. The differential osmoregulation and localization of taurine transporter mRNA and Na<sup>+</sup>/myo-inositol cotransporter mRNA in rat eyes. *Mol Brain Res*, 1997: 44, 245-252.
  14. Yamashita, T., Shimada, S., Yamauchi, A., Guo, W., Kohmura, E., Hayakawa, T., and Tohyama, M. Induction of Na<sup>+</sup>/myo-inositol cotransporter mRNA after rat cryogenic injury. *Mol Brain Res* in press.
  15. Yamashita, T., Shimada, S., Guo, W., Sato, K., Kohmura, E., Hayakawa, T., Takagi, T. and Tohyama, M. Cloning and functional expression of a brain peptide/histidine transporter. *J Biol Chem*, 1997, 272, 10205-10211.
  16. Sakata, K., Soto, K., Schloss, P., Betz, H., Shimada, S. and Tohyama, M. Characterization of glycine release mediated by glycine transporter 1 stably expressed in HEK-293 cells. *Mol Brain Res* in press.
  17. Otori, Y., Shimada, S., Morimura, H., Ishimoto, I., Tohyama, M. and Tano, Y. Expression of c-fos and c-jun mRNA following transient retinal ischemia: An approach using ligation of the retinal central artery in the rat. *Surv Ophthalmol* in press.
  18. Yamauchi, A., Sugiura, T., Kitamura, H., Akagi, A., Hori, M., Tohyama, M., Shimada, S. and Imai, E. Effects of partial nephrectomy on the expression of osmolyte transporters. *Kidney Int*, 1997, 51, 1847-1854.
  19. Guo, W., Shimada, S., Tajiri, H., Yamauchi, A., Yamashita, T., Okada, S., Tohyama, M. Developmental regulation of Na<sup>+</sup>/myo-inositol cotransporter gene expression *Mol Brain Res* in press.