

## 神経分泌細胞におけるホルモンの合成, 輸送, 分泌活動の分子内分泌学的研究

Molecular endocrinological study on regulations of hormone synthesis, transport and secretion in neurosecretory neurons

代表研究者 東京大学教養学部助手 兵藤 晋  
Assist. Prof., College of Arts and Sciences, The Univ. of Tokyo  
Susumu Hyodo

1. Expression of genes encoding neurohypophysial hormones and structural proteins was studied to investigate mechanisms regulating hormonal synthesis, transport and release in hypothalamic neurosecretory neurons. Effects of hyper-osmotic stimulation and lesion of noradrenergic inputs were examined in the neurohypophysial hormone producing neurons of the rat with *in situ* hybridization and Northern blot analysis.

2. The mRNA levels of neurohypophysial hormones, vasopressin (AVP) and oxytocin (OXT), were significantly increased in the magnocellular neurons of the supraoptic nucleus (SON) after oral intake of hypertonic saline. Significant increase in the AVP mRNA level was observed 4 days after the onset of sodium loading. Signals for OXT mRNA was rapidly increased by the 2nd day. On the other hand, immunoreactivity for AVP was significantly decreased in the SON, indicating that hyper-osmotic stimulation increased synthesis and a rapid transport of newly synthesized AVP to the neurohypophysis.

The length of both AVP and OXT mRNAs was conspicuously elongated by osmotic stimulation, presumably due to elongation of poly(A) tail. These results suggest that there was a rapid destruction of preexisting AVP and OXT mRNAs and their replacement with new transcripts bearing longer poly(A) tails, which may be involved in mRNA stability and/or translational efficiency.

3. Structural proteins,  $\beta$ -actin and  $\beta$ -tubulin, are involved in mechanisms for axonal transport and release of hormones. However, no significant change was observed in the  $\beta$ -actin and  $\beta$ -tubulin mRNA levels in the supraoptic neurons after osmotic stimulation. On the other hand, in the androgen-sensitive motoneurons of the spinal nucleus of the bulbocavernosus, removal of androgen by castration significantly reduced the levels of  $\beta$ -actin and  $\beta$ -tubulin mRNAs. These changes were rescued by testosterone treatment. The present results suggest that androgen regulates the expression of  $\beta$ -actin and  $\beta$ -tubulin genes in the androgen-sensitive motoneurons, and that the mechanisms regulating the expression of  $\beta$ -actin and  $\beta$ -tubulin genes may be involved in hormonally-induced neuronal plasticity.

4. Both the magnocellular supraoptic and paraventricular (PVN) neurons are richly innervated by noradrenergic nerve fibers, most of which arise from the A1 region of the ventrolateral medulla and terminate on vasopressinergic neurons. Electrical lesion of the A1 region decreased the AVP mRNA levels in both the SON and the PVN. Significant change was not observed in the OXT mRNA level, although the OXT mRNA levels were slightly decreased by A1 lesion. This system, which is composed of A1 noradrenergic neurons and hypothalamic AVP and OXT neurons, may provide a good model for investigation of mechanisms regulating hormonal synthesis, transport and release in neurosecretory neurons.

---

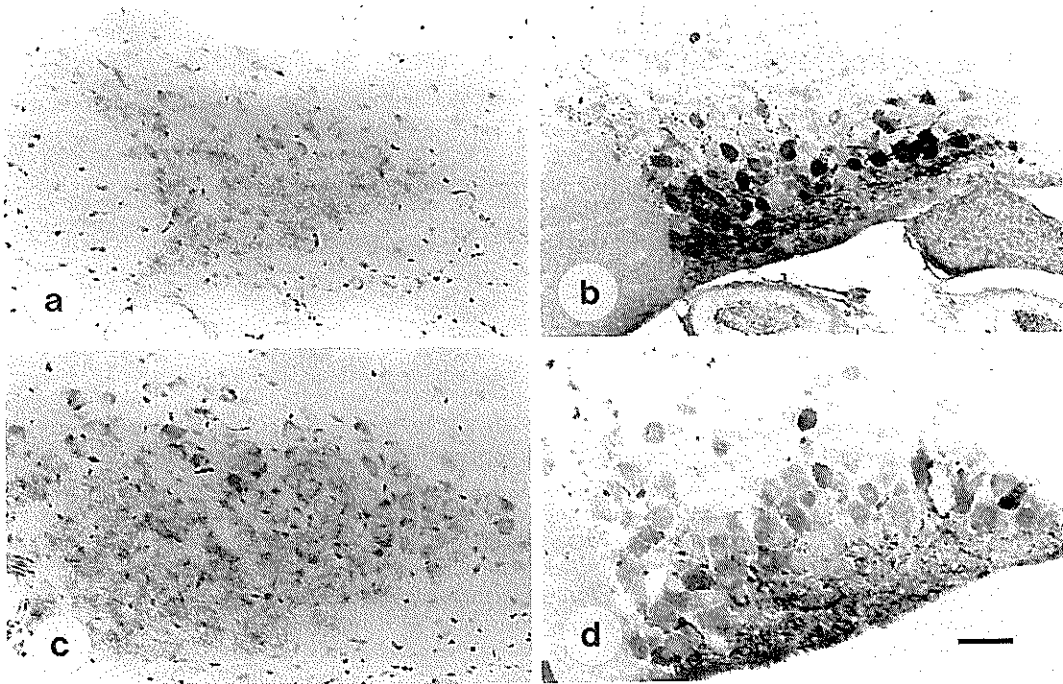


図1. 2%食塩水飲水のAVP mRNA (a, c), AVP免疫反応 (b, d) に対する影響。mRNA は黒い銀粒子として検出される。視索上核のAVPニューロンで、aとbはコントロール、cとdは4日間処理したもの。AVP mRNA レベルの上昇と免疫反応の減少がみられる。クレシルバイオレットによる対比染色。スケールは50  $\mu$ m。

## 研究目的

間脳の視床下部は、脊椎動物が生存し、繁殖する上での中枢をなしている。視床下部の神経分泌細胞で産生されるさまざまな視床下部ホルモンが、それらにとって重要な役割を果たしている。したがって、神経分泌細胞の活動がどのように調節され、変動するかを知ることは非常に重要である。神経分泌細胞の活動は、ホルモンの合成・輸送・放出の各段階に分けて表現できる。これらがそれぞれ、どのような因子によりどのような調節を受けているか、さらに合成・輸送・放出の間のバランスがいかに制御されているかは重要な問題である。

哺乳類において、視床下部ホルモンの一つである下垂体神経葉ホルモン（バソプレシン (AVP) とオキシトシン (OXT)) は、水・電解質代謝や生殖行動などに必須の役割を果たしている。高張食塩水飲水や絶水などに伴う体液浸透圧の上昇や体

液量の減少により、AVPとOXTの放出が高まることはよく知られている。本研究では、高浸透圧刺激にさらした神経葉ホルモン産生ニューロンにおいて、ホルモンの合成と輸送・分泌系の調節、およびその調節に関与している因子について、分子内分泌学的手法を用いて調べた。

## 研究の経過および成果

### 1. 高浸透圧刺激に対する神経分泌細胞の活動の変動

2%食塩水を飲ませたラットにおいて、神経葉ホルモン遺伝子の発現および、輸送・放出に関わると考えられる細胞骨格タンパク質遺伝子の発現の変動を調べた。

動物は、断頭後脳を取り出し、視床下部を4%パラホルムアルデヒド溶液で固定、あるいは液体窒素で凍結した。固定したものは、パラフィン切片を作製したのち、*in situ* hybridization を行った。凍結した脳からはmRNAを抽出し、ノーザ

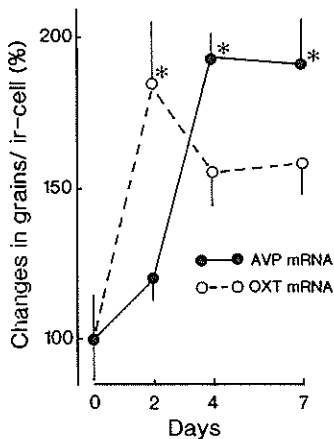


図2. 2%食塩水飲水に伴う視索上核のAVP mRNAとOXT mRNAレベルの変動。

ンプロットを行った。用いたプローブは次の4種類である。AVPとOXTについては、DNA合成機により44塩基の特異的な1本鎖のプローブを合成した。チューブリンはマウスのcDNAを、アクチンはニワトリのcDNAを用いた。それぞれのプローブの特異性はノーザンプロットにより確認した。

#### (1) ホルモン遺伝子の発現の変動

神経葉ホルモン産生ニューロンは、脳内のさまざまな領域に存在するが、水・電解質代謝の調節には、視床下部の視索上核と室傍核に存在し、下垂体神経葉へ投射している大型ニューロンが関与している(Dierickx, 1980)。食塩水飲水によりAVP遺伝子とOXT遺伝子の発現量は、視索上核のニューロンで顕著に上昇した(図1, 2; Hyodo *et al.*, 1988; Sherman *et al.*, 1986)。高浸透圧刺激により、AVPとOXTの放出量は1時間以内に増加することが知られているが(Cheng and North, 1986)、遺伝子の発現量の上昇は食塩水飲水2日目以後から顕著な差となって現れた。

高浸透圧刺激により、mRNA量の上昇とともに、mRNAの長さが長くなる傾向がみられた(図3)。AVP遺伝子についてはすでに知られている現象で、刺激開始後1日目からすでにみられる(Carrazana *et al.*, 1988)。この長さの変化はpoly(A)鎖の長さによるもので、mRNAの安定性や翻訳効率の上昇を伴うと考えられている

(Bernstein *et al.*, 1989)。このこととmRNA量の変動の結果を考えあわせると、刺激により新しい(長い)AVP mRNAが転写されるとともに、古い(短い)mRNAが代謝される速度も上昇する。ここではmRNA量の増加はほとんど見られないが、AVPの合成量は増加していると思われる。やがてmRNA量も増加し、AVPの合成はさらに増加すると考えられる。

一方、OXT mRNAの長さが変化するかどうかは明らかにされていなかった。今回の実験で、OXT mRNAの長さも高浸透圧刺激により長くなり、AVP mRNAにおける変化と同じ傾向を示した(図3)。この時、アクチンmRNAの長さに変化はみられなかった。高浸透圧刺激により、AVPとOXTの両方のニューロンで転写調節因子の一つであるc-fosタンパクが発現することが知られており(Hamamura *et al.*, 1992)、AVPとOXTの両方の遺伝子の発現がFos/Junタンパクなどにより、同じように調節されているのかも知れない。

#### (2) 細胞骨格タンパク質遺伝子の発現

上述のように、神経葉ホルモン遺伝子の発現は高浸透圧刺激により増加するが、放出量の上昇に比べて時間がかかる。免疫組織化学的にホルモンの存在量を調べると、細胞体、終末ともに、染色性の顕著な減少がみられた(図1)。おそらく、合成量を上回るようなホルモンの軸索輸送ならびに放出が起こっていると考えられる。そこで、輸送や分泌に関わっていると考えられる細胞骨格タンパク(チューブリンとアクチン)遺伝子の発現を調べた。しかしながら、視索上核、室傍核のニューロンともに、浸透圧刺激によって上記遺伝子の発現に有意な変化はみられなかった。

細胞骨格タンパク質遺伝子の発現について、他の要因による影響を調べ、上記の結果と比較することを行った。ラット脊髄の球海綿体脊髄核(SNB)の運動ニューロンは性ホルモン感受性で、生殖腺摘出や性ホルモン投与により投射やシナプスの数に変化が起こることが知られている(Matsumoto, 1992)。そこでこの脊髄運動ニューロンにおいて、生殖腺摘出や性ホルモン投与に伴う遺

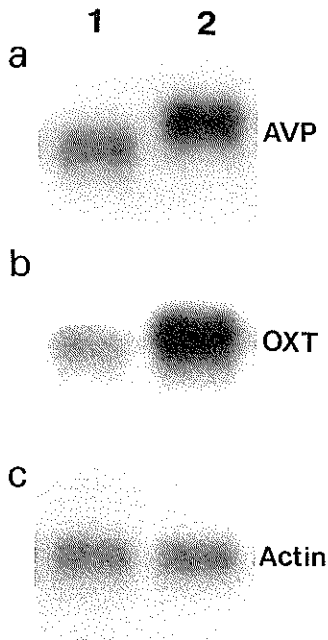


図3. 2% 食塩水飲水に伴う mRNA の長さの変化。a は AVP mRNA, b は OXT mRNA, c は  $\beta$ -actin mRNA. レーン1 はコントロール, レーン2 は4日間処理したもの. いずれも上側が泳動の起点.

伝子の発現の変動を調べた。生殖腺摘出により, SNB のニューロンでは, チューブリン, アクチン両方の遺伝子の発現量が有意に減少し, テストステロン投与により発現量が回復した(図4)。性ホルモンに非感受性の背外側核のニューロンではこのような変化はみられなかった。

以上の結果から, SNB ニューロンにおいてチューブリンやアクチンといった構造タンパク質遺伝子の発現は性ホルモンなどの調節下にあり, この調節機構が神経系の可塑性に重要な役割を果たしていると考えられる。一方, 近年, 順行性の軸索輸送には, 微小管上をすべるキネシンというモータータンパク質が重要であることがわかってきた(Bloom, 1992)。ホルモンの輸送を分子内分泌学的に解析し, 合成活動との関わりなどを解析するためには, キネシンのようなモータータンパク質遺伝子の発現を解析する必要があると思われる。

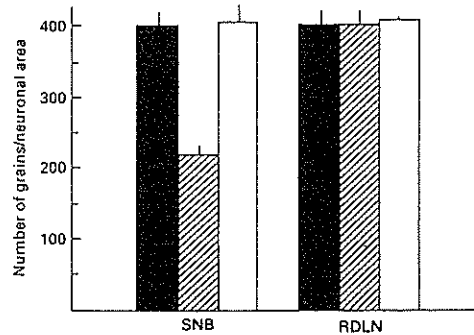


図4. 雄ラットの脊髄運動ニューロンにおける, 生殖腺摘出とテストステロン投与のチューブリン mRNA レベルに対する影響. 球海綿体脊椎核 (SNB) と背外側核 (RDLN). 黒いカラム, コントロール群; 斜線カラム, 生殖腺摘出群; 白ぬきカラム, 生殖腺摘出後テストステロン投与群.

## 2. 神経葉ホルモンの合成, 分泌を調節する因子

AVP や OXT の放出を調節している要因としては, ノルアドレナリン (NA), セロトニン, ドーパミンなどの伝達物質から体液浸透圧の変化そのものまで多くのものが知られており, 脳内の調節経路についても研究が進められている。一方, 合成活動を調節する因子に関しては, 阻害剤を用いた実験からセロトニンの効果が調べられているが (Carter and Murphy, 1989), まだほとんどわかっていない。

体液量や血圧などの変化は, 心房や動脈壁の容量および圧受容体で感知される。この情報は, 主として延髄腹外側部 A1 領域に伝わり, NA 性の A1 ニューロンが直接視索上核や室傍核の神経葉ホルモン産生ニューロンに投射してその活動を調節していると考えられている。A1 領域を刺激あるいは抑制することにより, 視索上核と室傍核の AVP ニューロンの電気活動 (ホルモンの放出) が活性化あるいは抑制される (Day and Renaud, 1984)。そこで, A1 領域を電氣的に破壊し, AVP 遺伝子の発現に及ぼす影響を調べた。

ラットを麻酔したのち, タングステン電極を両側の A1 領域に挿入し, 直流電流を流すことにより破壊処理を行った。10 日後, 脳を取り出し, 視

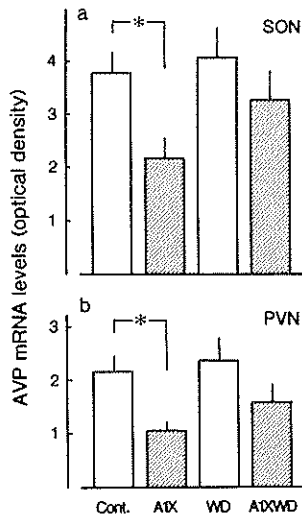


図5. 延髄A1領域破壊に伴うAVP mRNAレベルの変動。aは視索上核、bは室傍核。Cont., コントロール群; A1X, A1領域破壊群; WD, 脱水群; WDA1X, A1領域破壊プラス脱水群。

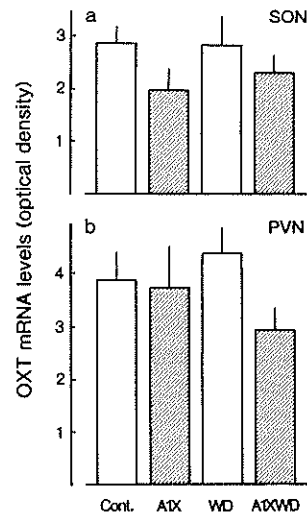


図6. 延髄A1領域破壊に伴うOXT mRNAレベルの変動。図中の文字などは図5と同じ。

索上核と室傍核をそれぞれパンチアウトし、AVPとOXTのmRNAレベルを解析した。

両側性のA1領域破壊により、AVP遺伝子の発現は視索上核、室傍核ともに有意に減少した(図5)。また、それぞれ脱水刺激を与えたA1破壊群と非破壊群の間でも、有意な差こそなかったが、破壊群では発現量が減少していた。ただ、本実験では、脱水群とコントロール群の間に発現量の顕著な差がみられなかった。脱水刺激により体液中のNaイオン濃度が増加していること、またAVPとOXTのmRNAの長さが長くなっていることから、脱水の効果は現れていると考えられるが、発現量に顕著な差がみられなかった原因についてはよくわからない。一方、OXT遺伝子の発現量には有意な変化はみられなかったが、A1破壊群でやや減少傾向がみられた(図6)。

#### 今後の課題と発展

形態学的、電気生理学的研究から、視索上核と室傍核両方のAVPニューロンがA1ニューロンの直接支配を受けていると考えられている(Sawchenko and Swanson, 1982)。今回の結果はAVPの放出だけでなく、合成活動もNA性のA1ニューロンによる調節を受けていることを示唆し

ている。今後、さらに例数を増やして、A1領域と神経葉ホルモン合成活動の関係を明らかにしていくつもりである。また、室傍核に存在し、その電気活動がA1ニューロンによる影響を受けないとされている副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン(CRF)産生ニューロンにおいて、CRFの合成のA1破壊による影響を調べているところである。この実験系でホルモン遺伝子やモータータンパク質遺伝子の発現を調べることは、今後、神経分泌細胞におけるホルモンの合成・輸送・放出活動の調節機構を明らかにしていくためのよいモデルシステムとなると考えている。

謝辞 着任したばかりの当時、本助成によって研究を軌道にのせることができたといっても過言ではなく、日産科学振興財団関係各位に心から感謝致します。本研究の遂行に当たっては、順天堂大学の松本明博士、昭和大学の内藤延子博士、塩田清二博士、中井康光博士、北海道大学の浦野明央博士のご協力を得ましたことを感謝致します。

#### 文献

- 1) Bernstein, P., Peltz, S. W. and Ross, J. (1989): *Mol. Cell. Biol.*, 9, 659-670.
- 2) Bloom, G. S. (1992): *Curr. Opinion Cell Biol.*, 4,

66-73.

- 3) Carrazana, E. J., Pasioka, K. B. and Majzoub, J. A. (1988): *Mol. Cell. Biol.*, 8, 2267-2274.
- 4) Carter, D. A. and Murphy, D. (1989): *J. Biol. Chem.*, 264, 6601-6603.
- 5) Cheng, S. W. T. and North, W. G. (1986): *Neuroendocrinology*, 42, 174-180.
- 6) Day, T. A. and Renaud, L. P. (1984): *Brain Res.*, 303, 233-240.
- 7) Dierickx, K. (1980): *Int. Rev. Cytol.*, 62, 119-185.
- 8) Hamamura, M., Nunez, D. J. R., Leng, G., Emson, P. C. and Kiyama, H. (1992): *Brain Res.*, 572, 42-51.
- 9) Hyodo, S., Fujiwara, M., Sato, M. and Urano, A. (1988): *Zool. Sci.*, 5, 1033-1042.
- 10) Matsumoto, A. (1992): *Rev. Neurosci.*, 3, 287-306.
- 11) Sawchenko, P. E. and Swanson, L. W. (1982): *Brain Res. Rev.*, 4, 275-325.
- 12) Sherman, T. G., McKelvy, J. F. and Watson, S. J. (1986): *J. Neurosci.*, 6, 1685-1694.

#### 発表論文リスト

- 1) Matsumoto, A., Arai, Y., Urano, A. and Hyodo, S. (1992): Androgen regulates  $\beta$ -actin mRNA expression in the motoneurons of lumbar spinal cords in adult male rats. *Zool. Sci.*, 9, 1267 (第 63 回 日本動物学会大会, 仙台).
- 2) Matsumoto, A., Arai, Y., Urano, A. and Hyodo, S. (1992): Effect of androgen on  $\beta$ -actin mRNA expression in the motoneurons of lumbar spinal cords in adult male rats. *Neurosci. Res.*, Suppl. 17, S301 (第 16 回日本神経科学学会, 大阪).
- 3) Hyodo, S. (1992): Analysis of hormonal gene expression using synthetic oligonucleotide probes. *J. Clin. Electron Microscopy*, 25, 334-335 (日本臨床電子顕微鏡学会, 岡山).
- 4) Matsumoto, A., Arai, Y. and Hyodo, S. (1993): Androgen regulates  $\beta$ -tubulin expression in the motoneurons of lumbar spinal cords in adult male rats. Society for Neuroscience 23rd Annual Meeting (Washington D. C., USA).
- 5) 内藤延子, 塩田清二, 兵藤 晋, 中井康光 (1993): 脱水処理ラットの視床下部バソプレシン産生に及ぼす延髄 A1/C1 ニューロンの影響 (第 98 回日本解剖学会総会, 札幌).
- 6) 内藤延子, 兵藤 晋, 塩田清二, 中井康光 (1993): 延髄 A1 破壊による視床下部バソプレシン産生への影響 (第 17 回日本神経科学学会, 名古屋).
- 7) Matsumoto, A., Arai, Y. and Hyodo, S. (1993): Androgenic regulation of expression of  $\beta$ -tubulin messenger ribonucleic acid in motoneurons of the spinal nucleus of the bulbocavernosus. *J. Neuroendocrinology*, in press.
- 8) 松本 明, 新井康允, 兵藤 晋 (1993): アンドロゲンによる脊髄運動ニューロンの  $\beta$ -チューブリンの mRNA の発現調節 (第 64 回日本動物学会大会, 沖縄).