

機関番号：16101

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21790232

研究課題名 (和文) 多色蛍光蛋白遺伝子導入ラットの神経内分泌系でのストレス反応の可視化と生理機能解明

研究課題名 (英文) Visualization of stress reaction in neuroendocrine system using multiple fluorescent protein transgenic rats.

研究代表者

藤原 広明 (FUJIHARA HIROAKI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：10369051

研究成果の概要 (和文)：

c-fos-mRFP トランスジェニックラット、c-fos-mRFP とバゾプレッシン-eGFP のダブルトランスジェニックラットおよびオキシトシン-mRFP トランスジェニックラットに浸透圧刺激を与え、蛍光タンパクおよび遺伝子発現の反応性を検討した。その結果、各蛍光の強度と遺伝子発現は増強していた。また、蛍光タンパクの発現が生体に及ぼす影響は観察されなかった。緑色蛍光および赤色蛍光を指標として神経内分泌系のストレス反応の可視化に成功した。

研究成果の概要 (英文)：

I examined the effect of osmotic stimulus using c-fos-mRFP transgenic rats, c-fos-mRFP / arginine vasopressin-eGFP double transgenic rats and oxytocin-mRFP transgenic rats. In all transgenic rats, fluorescence and mRNA levels of the c-fos-mRFP, arginine vasopressin-eGFP and oxytocin-mRFP were increased after osmotic stimulus. I succeeded in visualization of stress reaction in neuroendocrine system as index of green fluorescence and red fluorescence.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：環境生理学(含体力医学・栄養生理学)

科研費の分科・細目：環境生理学

キーワード：トランスジェニック、ラット、RFP、ストレス

1. 研究開始当初の背景

生体にストレスが加わると、神経細胞の活性化やホルモン分泌など様々な反応が惹起される。最初期遺伝子群(immediate early genes: IEGs)は中枢神経系における神経活動の指標として広く動物実験に用いられている。これまでに拘束ストレス、局所炎症ストレスなど、様々なストレスに対する神経内分泌系における脳内 IEGs 発現についての数多くの研究が報告されている。我々は、IEGs の

中でも c-fos 遺伝子発現が高浸透圧ストレス刺激に対して最も有用な神経活動の指標となることを明らかにした (Expression of immediate early genes and vasopressin heteronuclear RNA in the paraventricular and supraoptic nuclei of rats after acute osmotic stimulus. Kawasaki M, Fujihara H (11人中7番目) et al., *Neuroendocrinology* 17:227-237, 2005)。しかし、一般に c-fos 遺伝子発現の測定には免疫組織化学的染色

法や *in situ* ハイブリダイゼーション法を用いており、*in vivo* でのリアルタイムでの発現変化を捉えることはできない。そこで我々は *c-fos* 遺伝子に赤色蛍光蛋白 (mRFP) 遺伝子を挿入した *c-fos*-mRFP トランスジェニックラットの作成に着手した。本トランスジェニックラットではストレス刺激などによる神経細胞の活性化に伴い *c-fos* が発現すると同時に RFP を産生する。よって、活性化した神経細胞の核を、蛍光顕微鏡下で赤色蛍光としてリアルタイムで観察することが可能となる。これまでの研究により、バゾプレッシン遺伝子に enhanced GFP (eGFP) 遺伝子を挿入したバゾプレッシン-eGFP トランスジェニックラット (Transgenic expression of enhanced green fluorescent protein enables direct visualization for physiological studies of vasopressin neurons and isolated nerve terminals of the rat. Ueta Y, Fujihara H (11 人中 2 番目) et al., *Endocrinology* 146:406-413, 2005) およびオキシトシン遺伝子に青色蛍光蛋白 (eCFP) 遺伝子を挿入したオキシトシン-eCFP トランスジェニックラットの作成に成功した。これらのトランスジェニックラットでもそれぞれ特異的にバゾプレッシンおよびオキシトシン産生ニューロンに蛍光蛋白が発現する。バゾプレッシンは抗利尿ホルモンとしてよく知られているが、同時に重要なストレス応答ホルモンとしても脳内で機能している。バゾプレッシン-eGFP トランスジェニックラットに高浸透圧ストレス刺激を与えると、視床下部室傍核および視索上核の eGFP mRNA レベルが増加し、蛍光強度も顕著に上昇することから、eGFP 蛍光強度の変化がバゾプレッシン産生の指標となることが明らかとなっている (Exaggerated response of arginine vasopressin-enhanced green fluorescent protein fusion gene to salt loading without disturbance of body fluid homeostasis in rats. Fujio T, Fujihara H (11 人中 2 番目) et al., *Journal of Neuroendocrinology* 18:776-785, 2006)。この時、*c-fos* 蛋白の産生が増加することから、*c-fos*-RFP トランスジェニックラットで同様の実験を行った場合、赤色蛍光強度が上昇していることが予想される。

2. 研究の目的

本研究課題では *c-fos*-mRFP トランスジェニックラットに様々なストレス刺激、具体的には浸透圧刺激や疼痛刺激を与え、活性化する細胞の RFP 発現の変化を指標として本トランスジェニックラットの基礎的性質の検討を行うことを第一の目的とした。また、*c-fos*-mRFP トランスジェニックラットをバゾプレッシン-eGFP トランスジェニックラッ

トおよびオキシトシン-eCFP トランスジェニックラットとかけ合わせダブルトランスジェニックラットを作成し、ストレスに関与する神経分泌細胞における神経興奮と蛋白産生・分泌動態との関連に蛍光蛋白を用いた新たな手法でアプローチすることを第二の目的とした。現在 *c-fos* を用いて神経興奮とホルモン分泌などとの機能関連を調べた研究は数多く報告されている。本研究の成果は神経生理学および神経内分泌学の分野でストレスに関与した研究を行うにあたって新たなモデル動物を提供し、ストレスと神経内分泌調節機構の解明の一助となることが期待される。

3. 研究の方法

PCR 法により mRFP, eGFP および eCFP 遺伝子導入の確認を行う。具体的には動物センターSPF エリア内で繁殖・飼育している各トランスジェニックラットの交配後、出産した仔ラットに短時間のエーテル麻酔を施し、イヤーパーチを行う。耳部組織より抽出した DNA を用いて PCR 法にて各遺伝子導入の有無 (ジェノタイプング) を調べる。この判定作業は繁殖毎に随時行う。

平成 21 年度

(1) *c-fos*-mRFP トランスジェニックラットの基礎的性質の検討を行う。

c-fos-mRFP トランスジェニックラットの成長に伴う体重、飲水量、摂食量等の基礎的データの変化を代謝ケージを用いて測定する。また、浸透圧刺激 (腹腔内への高張食塩水投与) および疼痛刺激 (足底部へのホルマリン注射) 時のデータを測定し、野生型と比較検討する。浸透圧刺激および疼痛刺激後、視床下部視索上核および室傍核において、*c-fos* mRNA および RFP mRNA を *in situ* ハイブリダイゼーション法にて、*c-fos* および RFP を免疫組織化学的染色法で測定し、定量化する。RFP については蛍光顕微鏡で測定し、定量化する。

(2) *c-fos*-mRFP, バゾプレッシン-eGFP ダブルトランスジェニックラットの作成を行う。

c-fos-mRFP トランスジェニックラットとバゾプレッシン-eGFP トランスジェニックラットの交配を行い、ダブルトランスジェニックラットの作成を行う。出産した仔ラットに短時間のエーテル麻酔を施し、イヤーパーチを行う。耳部組織より抽出した DNA を用いて PCR 法にて *c-fos*-mRFP およびバゾプレッシン-eGFP 遺伝子導入の有無を調べる。両方の遺伝子導入が認められた個体を

継続して飼育する。

(3) *c-fos*-mRFP/オキシトシン-eCFP ダブルトランスジェニックラットの作成を行う。

c-fos-mRFP トランスジェニックラットとオキシトシン-eCFP トランスジェニックラットの交配を行い、ダブルトランスジェニックラットの作成を行う。出産した仔ラットに短時間のエーテル麻酔を施し、イヤーパーチを行う。耳部組織より抽出した DNA を用いて PCR 法にて *c-fos*-mRFP およびオキシトシン-eCFP 遺伝子導入の有無を調べる。両方の遺伝子導入が認められた個体を継続して飼育する。

平成 22 年度

(4) 各ダブルトランスジェニックラットに浸透圧刺激および疼痛刺激を行い視索上核および室傍核における mRFP, eGFP および eCFP 遺伝子発現の変化を測定し比較検討する。

浸透圧刺激（腹腔内への高張食塩水投与）および疼痛刺激（足底部へのホルマリン注射）後、脳を採取し、視床下部視索上核および室傍核における *c-fos* mRNA、RFP mRNA、バゾプレッシン mRNA、eGFP mRNA、オキシトシン mRNA、eCFP mRNA を *in situ* ハイブリダイゼーション法で測定し、定量化する。各遺伝子発現の変化をコントロール群と比較する。

(5) 各ダブルトランスジェニックラットに浸透圧刺激および疼痛刺激を行い視索上核および室傍核における mRFP, eGFP および eCFP タンパク産生の変化を測定し比較検討する。

浸透圧刺激（腹腔内への高張食塩水投与）および疼痛刺激（足底部へのホルマリン注射）後、ラットをペントバルビタール麻酔下で灌流固定して視床下部視索上核および室傍核における *c-fos*、mRFP、バゾプレッシン、eGFP、オキシトシン、eCFP を免疫組織化学的染色法で mRFP、eGFP、eCFP を蛍光顕微鏡で測定し、定量化する。各蛋白産生の変化をコントロール群と比較する。

4. 研究成果

平成 21 年度は、*c-fos*-mRFP トランスジェニックラット、バゾプレッシン-eGFP トランスジェニックラット融合遺伝子および *c-fos*-mRFP 融合遺伝子をもつダブルトランスジェニックラットを用いて、浸透圧刺激に対する視床下部の Fos タンパク、eGFP および mRFP 発現動態を検討した。*c-fos*-mRFP トラ

ンスジェニックラットもしくは *c-fos*-mRFP/バゾプレッシン-eGFP プルトランスジェニックラットの腹腔内に体重の 2% の生理食塩水（コントロール）および 9% 高張食塩水を投与し、90 分後に灌流固定を行った。脳を採取後、薄切切片を作成し、蛍光顕微鏡ならびに共焦点レーザー顕微鏡を用いて蛍光像を撮影した。また、免疫組織化学的染色法により Fos タンパク免疫陽性細胞の発現を確認した。その結果、9% 高張食塩水投与群では浸透圧感受性部位である正中視索前野、終板器官、視索上核、室傍核および脳弓下器官において mRFP の赤色蛍光が多数観察された。同部位に Fos タンパクの発現も観察された。また、ダブルトランスジェニックラットでは視索上核および室傍核に局在する eGFP の緑色蛍光を細胞質に持つニューロンの核内に mRFP の赤色蛍光が観察され、さらに eGFP の緑色蛍光が増強していることも観察された。コントロール群では mRFP の赤色蛍光および Fos タンパクはどの部位にもほとんど見られなかった。以上より、緑色蛍光（バゾプレッシンニューロン）および赤色蛍光（Fos タンパク）を指標として神経内分泌系（下垂体後葉系）のストレス反応（浸透圧負荷）の可視化に成功した。

平成 22 年度は *c-fos*-mRFP トランスジェニックラットをオキシトシン-eCFP トランスジェニックラットと交配することによりダブルトランスジェニックラットを作成し、研究に使用する計画であったが、オキシトシン-eCFP トランスジェニックラットにおける eCFP の発現が個体によって安定せず実験に使用できなかったため、代わりにオキシトシン-mRFP トランスジェニックラットを作成し、浸透圧刺激に対する視床下部のオキシトシンおよび mRFP 発現動態を検討した。オキシトシン-mRFP トランスジェニックラットに 5 日間の 2% 高張食塩水飲水負荷を行い、灌流固定を行った。脳を採取後、薄切切片を作成し、蛍光顕微鏡を用いて mRFP 蛍光の観察を行った。また、*in situ* hybridization 法にて、mRFP mRNA、オキシトシン mRNA およびバゾプレッシン mRNA の評価を行った。体幹血を採取し、血漿浸透圧、血中ナトリウム濃度、血中オキシトシン濃度、血中バゾプレッシン濃度を測定した。コントロール群には水道水飲水群を用いた。その結果、2% 高張食塩水飲水負荷群ではコントロール群と比してオキシトシン産生細胞が存在する視索上核および室傍核において mRFP の赤色蛍光および mRNA が著明に増加した。オキシトシン mRNA およびバゾプレッシン mRNA も著明に増加し野生型ラットと同様の变化を示すことが明らかとなった。血漿浸透圧、血中ナトリウム濃度、血中オキシトシン濃度、血中バ

ゾプレッシン濃度も野生型ラットと同様の变化を示し、mRFPの発現が生体の浸透圧刺激に対する反応に影響を及ぼさないことが示唆された。以上より、赤色蛍光（オキシトシンニューロン）を指標として神経内分泌系（下垂体後葉系）のストレス反応（浸透圧負荷）の可視化に成功した。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計6件）

①Katoh A, Fujihara H, Ohbuchi T, Onaka T, Young WS 3rd, Dayanithi G, Yamasaki, Kawata M, Suzuki H, Otsubo H, Suzuki H, Murphy D, Ueta Y.

論文名 Specific expression of an oxytocin-enhanced cyan fluorescent protein fusion transgene in the rat hypothalamus and posterior pituitary.

掲載誌名 Journal of Endocrinology
巻、最初と最後の頁 204(3): 275-285.
発行年 2010
査読 有

②Todoroki M, Ueta Y, Fujihara H, Otsubo H, Shibata M, Hashimoto H, Kobayashi M, Sakamoto H, Kawata M, Dayanithi G, Murphy D, Hiro H, Takahashi K, Nagata S.

論文名 Induction of the arginine vasopressin-enhanced green fluorescent protein fusion transgene in the rat locus coeruleus.

掲載誌名 Stress
巻、最初と最後の頁 13:281-291.
発行年 2010
査読 有

③Maruyama T, Ohbuchi T, Fujihara H, Shibata M, Mori K, Murphy D, Dayanithi G, Ueta Y.

論文名 Diurnal changes of arginine vasopressin-enhanced green fluorescent protein fusion transgene expression in the rat suprachiasmatic nucleus.

掲載誌名 Peptides
巻、最初と最後の頁 31(11):2089-2093.

発行年 2010

査読 有

④Katoh A, Fujihara H, Ohbuchi T, Onaka T, Hashimoto T, Kawata M, Suzuki H, Ueta Y.
論文名 Highly Visible Expression of an Oxytocin-Monomeric Red Fluorescent Protein 1 Fusion Gene in the Hypothalamus and Posterior Pituitary of Transgenic Rats.

掲載誌名 Endocrinology
巻、最初と最後の頁 May 3. [Epub ahead of print]

発行年 2010

査読 有

⑤Suzuki H, Kawasaki M, Ohnishi H, Otsubo H, Ohbuchi T, Katoh A, Hashimoto H, Yokoyama T, Fujihara H, Dayanithi G, Murphy D, Nakamura T, Ueta Y.

論文名 Exaggerated response of a vasopressin-enhanced green fluorescent protein transgene to nociceptive stimulation in the rat.

掲載誌名 The Journal of Neuroscience
巻、最初と最後の頁 29(42):13182-13189.
発行年 2009
査読 有

⑥Fujihara H, Ueta Y, Suzuki H, Katoh A, Ohbuchi T, Otsubo H, Dayanithi G, Murphy D.

論文名 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.

掲載誌名 Endocrinology
巻、最初と最後の頁 150:5633-5638.
発行年 2009
査読 有

〔学会発表〕（計2件）

①発表者名 藤原広明
発表標題 c-fos-RFPとAVP-eGFPのダブルトランスジェニックラットの作出と浸透圧刺激に対する反応

学会等名 第20回日本病態生理学会大会
発表年月日 平成22年1月24日
発表場所 奈良県橿原市

②発表者名 藤原広明
発表標題 オキシトシンニューロンにおける赤色蛍光タンパク遺伝子発現
学会等名 第2回日本病態生理学会 サテラ

イトセミナー

発表年月日 平成 23 年 1 月 22 日

発表場所 神戸市北区

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

なし

○出願状況 (計 0 件)

なし

○取得状況 (計 0 件)

なし

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤原 広明 (FUJIHARA HIROAKI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス

研究部・助教

研究者番号：10369051

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし