

平成17年度自治医科大学医学部 研究奨励金研究成果報告

嗅覚系と視床下部—下垂体—副腎皮質系のイン
タラクションの実態解明—ラット下垂体前葉細
胞における c-Fos の一過性発現の解析—

自治医科大学医学部解剖学講座組織学部門
瀧上 周

プロトオンコジーン c-fos は、最初期遺伝子
の一つであり、その産物の c-Fos は、興奮した
神経細胞において一過性に発現が高まることか
ら、脳の活性化領域のマッピングに用いられて
いる。下垂体前葉では、ストレスによって発現
が高まるなどの報告があるが、視床下部ホルモ
ンによる前葉細胞への刺激と c-Fos 発現の詳細
な関連は不明瞭である。本研究では、この関連
を明らかにするために、ACTH 放出促進刺激時
の下垂体前葉における c-Fos 発現を免疫組織化
学的に調べた。

全ての実験は、右外頸静脈にカテーテルを留
置した覚醒下のラット (SD, 8-10週齢, 雄)
を用いて行った。ACTH 放出促進刺激は、CRH
静脈投与 (2 $\mu\text{g}/\text{kg}$) と拘束ストレス (1.5時間)
を用いた。ACTH 放出促進刺激を加え始めてか
ら90分後に、ネブタールの静脈投与により深
麻酔し心臓より固定液を5分間灌流後、下垂体
を取り出し4°Cで一晩浸漬固定した。凍結切片
(前頭断) は、厚さ8 μm のものを作成し、c-
Fos 陽性細胞の検出は、抗 c-Fos 抗体 (1:
40,000, CALBIOCHEM) を用いた免疫組織化
学により行った。前葉細胞の同定には、各ホル
モンに対する抗体を用いた。また、各群の c-Fos
陽性細胞数の比較には、前葉の中央部分から200
 μm の間隔において前頭断切片を5枚作製し
た。c-Fos の免疫染色を施した後、切片から0.5
mm四方の4つの領域を無作為に抽出し、Scion
Image によって c-Fos 陽性細胞数の定量を
行った。各実験群における単位面積あたりの c-
Fos 陽性細胞数を計測し、クラスカルウォーリ
ス順位検定とボンフェローニ補正マンホイット

ニー検定によって解析した。

c-Fos の免疫陽性反応は前葉細胞の核におい
て明瞭に観察され、ストレス負荷ラットで多数
みられた。CRH 投与ラットにおいては、ストレ
ス負荷ラットに比べて検出される c-Fos 陽性細
胞の数は少なくなり、生理食塩水投与ラット (対
照群) では、さらに数は減少した。対照群に比
べ拘束ストレス群では、c-Fos 陽性細胞の数は
約17倍に増加していた。一方、CRH 投与群では
対照群に比べて6.3倍と、拘束ストレス群の約3
分の1程度の増加であった。また、CRH 投与群
では、c-Fos 陽性反応は主に ACTH 産生細胞に
観察されたが、c-Fos 陽性反応を示さない
ACTH 産生細胞も多数みられた。一方、拘束ス
トレス群では、ほとんどの ACTH 産生細胞が
c-Fos 陽性反応を示すようになったが、一部の
PRL 産生細胞や極少数の TSH 産生細胞も c-
Fos 陽性であった。

ACTH 放出促進刺激によって特異的に
ACTH 産生細胞において c-Fos の発現が高ま
ることは、視床下部ホルモンによって活性化さ
れた ACTH 産生細胞のマーカーとしての c-
Fos の有用性を示唆するものである。c-Fos を
活性マーカーとして用いた前葉内のストレス応
答反応の解析からは、複雑なストレス応答機構
を解明していく上で有意義な基礎的知見を得ら
れることが期待される。また、CRH 単独刺激時
にみられる c-Fos 陽性反応を示さない ACTH
産生細胞は、1) ストレスの強度や種類に依存
した前葉への入力刺激の違い、2) ACTH 産生
細胞の heterogeneity, 3) 細胞周囲環境による
影響、などによって生じている可能性が考えら
れた。

ヘリコバクター・ピロリにおけるフラボドキシ
ン代謝経路の解明

感染・免疫学講座細菌学部門 下村 裕史

【目的】フラボドキシン (FldA) は、フラビンモノヌクレオチド (FMN) を結合したフラボ蛋白質である。FldA は生理学的に重要な化合物の生合成経路における酸化・還元反応において、電子受容体として機能する細菌の生存にとって必須のホロ酵素である。ヘリコバクター・ピロリ (HP) において FldA は、アセチル CoA の生合成に関与する脱水素酵素 (PFOR) の電子受容体として機能することが報告されている。しかしながら、この FldA そのものがどのように代謝されるのかについては他菌種同様、HP においても全く解明されていない。そこで本研究は、FldA の代謝経路の解明を目的とした。

【材料と方法】HP の NCTC 11638 株を本実験に用いた。0.2% ジメチル-β-サイクロデキストリン加 PPLO 培地を用いて微好気環境下で HP の培養を行った。適当な緩衝液中で超音波処理を行い、得られた HP 細胞融解液を陰イオン交換クロマトグラフィーに供し holo-FldA の精製を行った。精製した holo-FldA をトリクロロ酢酸 (TCA) で処理し apo-FldA 標品を調製した。Apo-FldA と FMN の結合試験は、市販の FMN の存在下で apo-FldA を 25℃、2 時間放置し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (Native-PAGE) 後のクーマシーブリアントブルー (CBB) 染色によって行った。HP 菌体を PBS で一回洗浄し、さらに PBS 中で一夜放置して得られた PBS 上清を適当な緩衝液で置換し陽イオン交換クロマトグラフィーに供し FMN 解離活性の精製を行った。精製した FMN 解離活性の純度検定は、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 後の銀染色によって行った。FMN 解離活性の検出は、精製 holo-FldA を活性画分の存在下で 37℃、一夜放置し、Native-PAGE 後の CBB 染色によって行った。FMN 解離活性の同定は、ペプチドマスフィンガープリンティング (PMF) による質量分析によって得られたペプチドマススペクトルをマスショットサーチによってアルゴリズム的に解析することで行った。FMN およびリボフラビンの検出は MALDI-TOF MASS による質量分析によって行った。

【結果】微好気培養における HP の形態学的

な変化に伴う菌体蛋白質像の変化を Native-PAGE 後の CBB 染色によって解析した結果、FldA の質的变化が観察された。即ち、FMN を結合したホロ酵素 (holo-FldA) が減少・消失し、FMN を解離したアポ酵素 (apo-FldA) が増加・蓄積した。Apo-FldA は FMN と互いの親和性によって結合し holo-FldA に変換されたが、holo-FldA からの FMN の解離は自然には惹起されず、何らかの因子 (FMN 解離活性) の関与が必要であった。FMN 解離活性の認められた画分を SDS-PAGE 後の銀染色によって解析した結果、分子量およそ 28 kDa の蛋白質バンドのみが検出された。精製した FMN 解離活性を同定した結果、本活性の本体である 28 kDa 蛋白質は、クラス C 酸性ホスファターゼ (HppA) であることが判明した。HppA の存在下で、holo-FldA は apo-FldA に変換され、その反応液中において FMN の代わりにリボフラビンが検出された。

【考察】以上の結果から HP における FldA の代謝経路が明らかとなった。即ち、(1)リボフラビンのリン酸化によって生じる FMN は、FldA 蛋白質 (apo-FldA) と互いの親和性によって結合し holo-FldA に変換される。(2) Holo-FldA は、アセチル CoA の生合成を触媒することによって還元された PFOR から電子を受け取る電子転移酵素として機能する。(3)その後、holo-FldA に結合している FMN は、HppA のリン酸モノエステラーゼ活性による加水分解を受け、リボフラビンを次々と生じる。(4) FMN の加水分解によって生じたりボフラビンは、FldA 蛋白質との親和性の低下によって holo-FldA から解離し、その結果 apo-FldA が菌体内に蓄積する。本研究は、FldA におけるホロ酵素からアポ酵素への変換に HppA の酵素活性が要求されることを解明した初めての報告である。

心血管系疾患における ST2 (IL-1レセプターファミリー) の発現とその機能に関する研究

循環器センター病院助手 新保 昌久