

## 過重力刺激による c-Fos タンパク質の脳内出現部位：マウスからメダカへ

東京大学アイソトープ総合センター 井尻憲一・水野利恵

Emergence of c-Fos protein in the brain after hypergravity stimulation  
: From mouse to medaka

Kenichi Ijiri and Rie Mizuno

Radioisotope center, University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-0032, Japan  
E-mail: ijiri@ric.u-tokyo.ac.jp

**Abstract:** In rodents, the immediate-early genes serve as useful neurobiological tools for mapping brain activity induced by gravity changes. In this study, we have examined brain activity related to gravity perception of medaka (*Oryzias latipes*) by use of *c-fos* expression. Fish were continuously exposed to 3G hypergravity by centrifugation. The distribution of its transcripts within brains was analyzed by an *in situ* hybridization method. The 3G-treated medakas displayed *c-fos* mRNA positive cells in their brain regions, which are related to vestibular function. Using the immunohistochemistry technique, the distribution and number of cells positive for c-Fos proteins were studied. The results showed that wild-type and mutant strain (*ha*) respond differently to 3G exposure both quantitatively and qualitatively.

**Key words;** c-fos, mutant medaka, microgravity, hypergravity, otoliths

## 序論

即初期遺伝子 (Immediate early genes) の一種である *c-fos* は様々な外的刺激により急速かつ一過的に誘導されることから、神経細胞の反応のマーカーとしてよく使われており<sup>1,2)</sup>、重力感受の仕組みを調べる研究においても使われてきた<sup>3-5)</sup>。*c-fos* 遺伝子は従来原癌遺伝子 (protooncogene) の一つとされてきたが、様々な刺激により神経細胞核内で発現誘導されることから、細胞内情報伝達系に関わる重要な転写因子をコードする遺伝子であることが明らかにされた。

*c-fos* がコードする c-Fos 蛋白は、やはり同じような刺激により発現する *junB* や *c-jun* などがコードする Jun ファミリー蛋白とヘテロ二量体を形成し、AP-1 (activating protein-1) と呼ばれる転写調節複合体となる。AP-1 は、DNA の特定の AP-1 結合領域に結合し、ターゲット遺伝子の転写を調節する。これらの遺伝子群は刺激提示後比較的早く発現することから immediate early genes と呼ばれる。この急速かつ一過的な発現から *c-fos* 遺伝子の発現は刺激に対し反応する部位の検索に有効とされており、細胞レベルでの神経活性のマッピングに用いられている<sup>6,7)</sup>。

齧歯類 (マウス、ラット) を用いて、微小重力や過重力によって活性化される脳内部位を *c-fos* 遺伝子

の発現を指標として調べた研究がいくつか報告されている。ニューロラボ (STS-90, 1998 年) において実施されたラット成体の宇宙実験では、微小重力でのラット脳内での c-Fos タンパク質の出現が研究された<sup>8)</sup>。打ち上げ後 1 日 (微小重力に曝されて 24 時間後) には c-Fos タンパク質の存在する細胞の数が多かった。しかしその後、長期間 (打ち上げ後 12 日間) 微小重力で飼育されたラットの脳では、微小重力に順応したのか、c-Fos を発現した細胞数はかなり減少していた。地球に帰還後の c-Fos タンパク質の分布についても同様に、帰還後 1 日 (1G に 24 時間) のラット脳では多くの細胞に c-Fos タンパク質が認められるのに対し、帰還後 14 日経過したラットの脳では c-Fos タンパク質を誘導している細胞数はまばらになっていた<sup>8)</sup>。

過重力刺激によって起こる脳の活性化を野生型マウスと突然変異体マウスとで比べた研究もある。2G に 2 時間曝露した野生型マウスではいくつかの脳内部位で c-Fos タンパク質を誘導している細胞が多数認められた。これに対して、耳石を欠損している突然変異体マウス (*het* マウス) では c-Fos タンパク質が存在する細胞はほんの少しであった<sup>9)</sup>。

このようにマウス、ラットで *c-fos* 遺伝子の脳内での発現について興味ある現象が見つかっている。

しかし、今後の宇宙実験を考えると、国際宇宙ステーション (ISS) での大型セントリフュージの使用は難しく、これらの動物で宇宙での 1G 対照群を実現するのは不可能と言える。この点、小型魚類であるメダカは宇宙での遠心操作も可能である。本研究はマウスやラットで期待されていた宇宙実験をメダカで出来る限り実現することを目指し、そのための技法の確立を目指している。

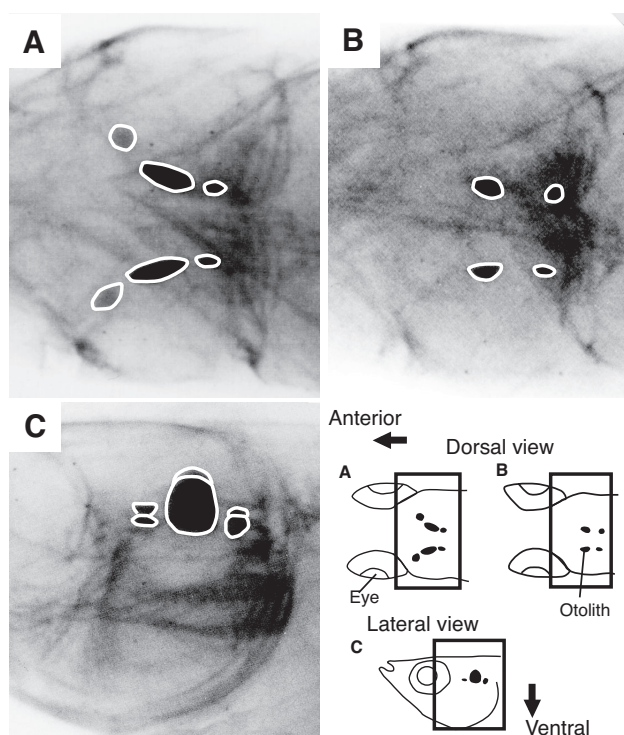
## 材料と方法

### メダカ

野生型メダカ (ヒメダカ wild-type) と突然変異体メダカ (*ha*) とを用いた。*ha* メダカは重力感受を担うとされる卵形嚢 (utricle) を欠損している (Fig. 1)。

### 遠心機による重力負荷

重力負荷には回転刺激により 3G の遠心力を発生する大型遠心機を用いた。コントロール地上群としては遠心機の中心軸の横に水槽をおいた個体を用いた。視覚的影響を減らすため実験は暗条件でおこなわれた。30 分の遠心後それぞれの個体から脳を取り出し mRNA 抽出、あるいは 4%PFA in PBT による固定をおこなった。



**Fig. 1.** X-ray photographs of otoliths in wild-type (**A, C**) and mutant *ha* medaka (**B**). Note that lapilli (a pair of utricular otoliths) are missing in the mutant medaka (*ha*, **B**).

### *in situ* hybridization

メダカ *c-fos* の全長を TA クローニングしたものを制限酵素によって直鎖化して鋳型とし、T7/SP6 RNA polymerase によって digoxigenin 標識されたアンチセンス / センスプローブを得た。摘出した脳は 4% PFA in PBT で固定後、使用までメタノール中で -20°C で保存した。ビブラトームにより 100μm 厚に薄切した脳を PBT 置換し ProK 処理、後固定したのちプローブを 65°C オーバーナイトでハイブリダイズさせ、さらに抗 Dig-AP 抗体で処理し BM パープルによって検出した。4% PFA in PBT にて固定し観察した。神経核の同定には Ishikawa らの brain atlas を用いた。<sup>10)</sup>

### immunohistochemistry

メダカ *c-fos* 抗体を作成し、この抗体を用いて ABC 法で染色を行った。過重力処理群あるいはそのコントロール群を、過重力曝露後に断頭し、4% PFA in PBS で 1 晩以上、4°C で固定し、固定後、脳を延髄の下部まで摘出した。

その後パラフィンで包埋し、厚さ 14μm の連続切片を作成した。得られた連続切片は、脱パラ後、抗原賦活化剤で処理し、H<sub>2</sub>O で洗浄後、0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> で 30 分間クエンチングした。PBS で洗浄後、1 時間、0.1% Triton X-100 を含む 10% ヤギ血清 in PBS (10% gs in PBS-TX) でブロッキングを行った。PBS-TX で洗浄した後、10% gs in PBS-TX で 1:1000 に希釈した 1 次抗体で 1 晩、4°C でインキュベートした。1 次抗体でのインキュベート終了後、Vectastain ABC Rabbit IgG を用いて、ビオチン標識二次抗体でのインキュベート (1 時間)、Abitin-biotin conjugated でのインキュベート (30 分) ののち、ペルオキシダーゼ基質 DAB で抗原を検出し、切片をエンタランで封入した。

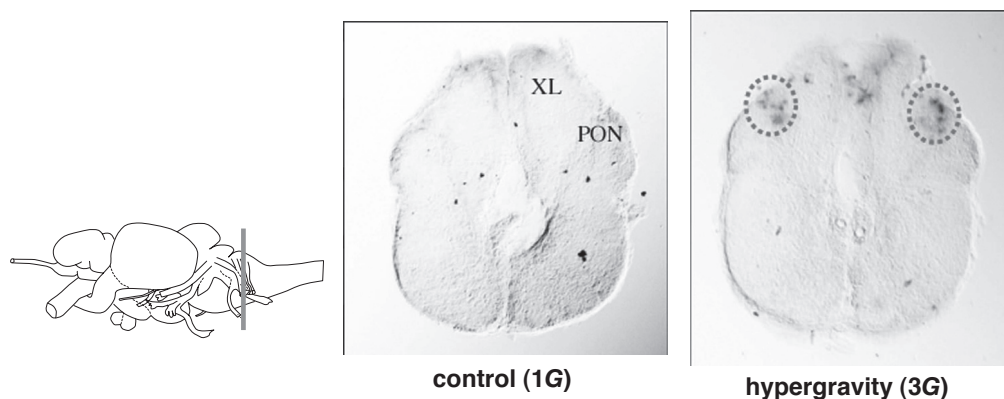
## 結果と考察

### *in situ* hybridization

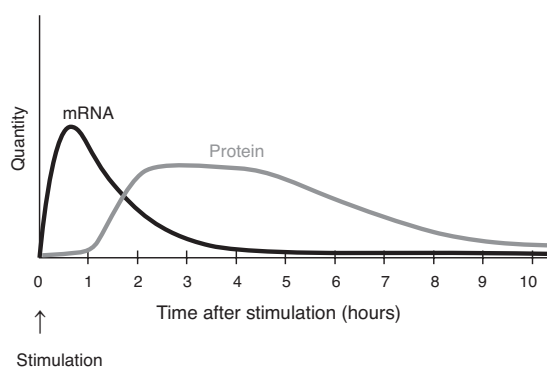
#### 重力負荷したメダカにおける *c-fos* 発現の分布

3G の過重力を 30 分間負荷したメダカの脳を取り出し、*in situ* hybridization によって *c-fos* 遺伝子の局在を調べた。センス鎖をプローブとしたものでは特異的なシグナルは見られなかった。

その結果、過重力負荷群のみにおいて、torus semicircularis (TS), nucleus tangentialis (NTA), posterior octaval nucleus (PON), inferior olive (IO) といった前庭神経からの投射部位にシグナルがみられた。Fig. 2 に 30 分の 3G 負荷で PON に出現した mRNA 分布を示す。



**Fig. 2.** *c-fos* mRNA signals appeared at the posterior octaval nucleus (PON) in medaka brain at 30 min after the start of 3G exposure.



**Fig. 3.** Schematic time-course pattern of *c-fos* mRNA and c-Fos protein after the stimulation.

#### immunohistochemistry

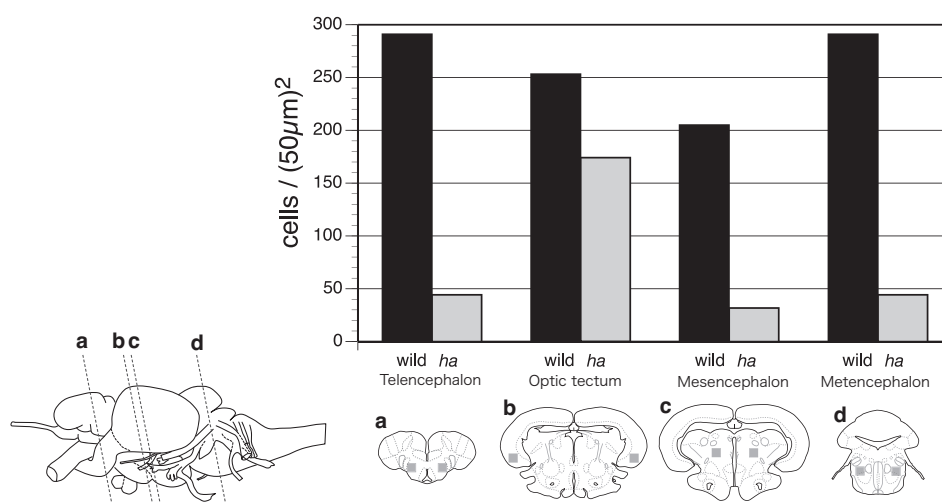
宇宙実験の実施を考えると、*c-fos* mRNA の検出よりも c-Fos タンパク質の検出の方が適している。検出の時間パターンが Fig. 3 のようになり、c-Fos タンパク質の方がはるかに検出ウィンドウが幅広いからである。

#### c-Fos のシグナルが検出された細胞の数

過重力曝露を施した wild-type メダカの脳内には、ほぼ全域に弱いシグナルが検出された (Fig. 4)。これに対し、*ha* メダカの脳では殆どシグナルは検出されなかった。ただし視蓋 (optic tectum) では、*ha* においても比較的多くのシグナルが認められた。

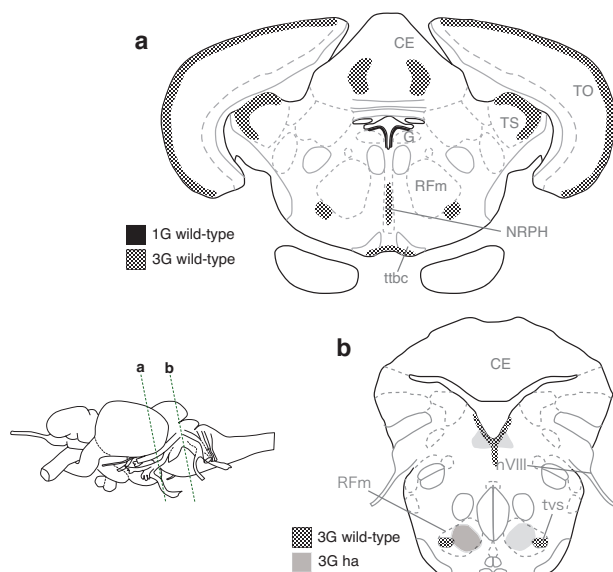
#### c-Fos タンパク質の局在

特徴的なシグナルの発現部位を Fig. 4 と Fig.5 に示す。野生型 (wild-type) メダカにおいて 1G (遠心なし) と 3G (遠心) の場合では、c-Fos シグナルの出現場所および出現細胞数が異なっていた。3G の方が、広域に渡って出現していた (Fig. 4)。また、ともに 3G を暴露したメダカであっても、wild-type と *ha* メダカでは 1) に示したシグナル出現細胞数の量的な差だけでなく、脳内の *c-fos* シグナル出現部位にも違いが見られた (Fig. 5)。



**Fig. 4.** Number of c-Fos positive cells in different regions of medaka brain.





**Fig. 5.** Quantitative differences in the emergence pattern of c-Fos positive cells observed in brain sections. (a) Differences between 1G sample and 3G sample of wild-type medaka. (b) Differences between wild-type and ha mutant after 3G exposure.

#### 重力変化に対する応答

1974 年に実施された宇宙実験において、メダカは微小重力から 1G 環境への移行によって、しばらく水槽の底に沈んで動かないという現象を示した<sup>11)</sup>。今回の実験においても 1G から 3G への移行によってしばらくは水槽の下部で動きが少なかった。しかし宇宙実験後は 6 時間以上沈んでいたのに対し、本実験においては負荷の大きい環境への移行にも関わらず 15 分程で適応していた。これは微小重力から重力のある環境への変化と、重力ある環境からある環境への変化といった違いが大きく関わっていると考えられる。

脳内における分子的な変化は *c-fos* mRNA を用いて検証した。その結果過重力負荷後 30 分で *c-fos* mRNA の発現量が増えており、メダカは過重力という刺激を *c-fos* を介した情報伝達系によっても感受していると言える。重力感受には前庭器官が重要とされておりメダカにおいては耳石器官のうちの卵形嚢 (utricle) が重力感受に主に関わっていると考えられている。今回の実験において過重力という刺激から 30 分後では torus semicircularis (TS), nucleus tangentialis (NTA), posterior octaval nucleus (PON), inferior olive (IO) などにおいて *c-fos* の mRNA のシグナルが検出された。これは重力変化への応答に前庭 - オリーブ核 - 小脳といった経路が重要な役割を果たしていることを示唆している。

#### 謝辞

本研究は日本宇宙フォーラムの公募地上研究の一環として行われた。

#### 引用文献

- 1) Guthrie, K.M., Anderson, A.J., Leon, M. and Gall, C. (1993) Odor-induced increases in *c-fos* mRNA expression reveal an anatomical "unit" for odor processing in olfactory bulb. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**, 3329-3333.
- 2) Bing, G., Wilson, B., Hudson, P., Jin, L., Feng, Z., Zhang, W., Bing, R. and Hong, J.S. (1997) A single dose of kainic acid elevates the levels of enkephalins and activator protein-1 transcription factors in the hippocampus for up to 1 year. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **94**, 9422-9427.
- 3) Kaufman G.D. (1996) Activation of immediate early genes by vestibular stimulation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **781**, 437-442.
- 4) Boonstra, J. (1999) Growth factor-induced signal transduction in adherent mammalian cells is sensitive to gravity. *Faseb J.*, **13** Suppl, S35-42.
- 5) Balaban, E., Centini, C., Pompeiano, O. (2002) Tonic gravity changes alter gene expression in the efferent vestibular nucleus. *Neuroreport*, **13**, 187-190.
- 6) Tulchinsky, E. (2000) Fos family members: regulation, structure and role in oncogenic transformation. *Histol. Histopathol.*, **15**, 921-928.
- 7) Fort, P., Rech, J., Vie, A., Piechaczyk, M., Bonniieu, A., Jeanteur, P., Blanchard, J.M. (1987) Regulation of *c-fos* gene expression in hamster fibroblasts: initiation and elongation of transcription and mRNA degradation. *Nucleic Acids Res.*, **15**, 5657-5667.
- 8) Pompeiano, O., D'Ascanio, P., Centini, C., Pompeiano, M., Cirelli, C. and Tononi, G. (2001) Immediate early gene expression in the vestibular nuclei and related vegetative areas in rats during space flight. *Acta Otolaryngol. Suppl.*, **545**, 120-126.
- 9) Fuller, P.M., Jones, T.A., Jones, S.M. and Fuller, C.A. (2004) Evidence for macular gravity receptor modulation of hypothalamic, limbic and autonomic nuclei. *Neuroscience*, **129**, 461-471.
- 10) Ishikawa, Y., Yoshimoto, M., Ito, H. (1999) A brain atlas of a wild-type inbred strain of the medaka, *Oryzias latipes*. *The Fish Biology Journal MEDAKA*, **10**, 1-26.
- 11) Ijiri K. (1995) The First Vertebrate Mating in Space – A Fish Story, RICUT, Tokyo, Japan