

## ミトコンドリア蛋白 SP-22の冬眠動物における脳内局在と概年リズムでの季節変化の免疫組織化学的研究

大友和夫\* 福原紅子\*\* 吉崎克明\*\*\*

### 要 旨

哺乳動物の冬眠現象は、概年リズムの一つで、心拍数、呼吸数、そして体温などの劇的な低下で特徴づけられる。このような変化は、脳の組織や細胞に少なからぬ影響をあたえる。その影響の一つに酸化ストレスがあげられる。

一方、ミトコンドリア蛋白のSP-22は、チオレドキシン依存の過酸化還元酵素ファミリーに属し、ミトコンドリア内の種々の酵素を酸化ダメージから保護するはたらきをもち、酸化ストレスで増加することが明らかになっている。

SP-22の抗体を用いた免疫組織化学で、脳内の免疫陽性部位の局在と季節による変化を観察し、酸化ストレスと脳内の特定部位の関係について検討した。免疫陽性部位は脳内の多くの部位で観察され、多くの部位で酸化ストレスを受けていることが示唆された。また、免疫陽性部位の季節変化についても観察し、特に、リズム発振部位の可能性の高い部位と考えられている室傍核や青斑核などで、酸化ストレスを受ける冬眠期に強い陽性反応が観察された。これらの結果から、酸化ストレスを冬眠、覚醒とリズムカルに受けている領域によって概年リズムを発振している可能性が示唆された。

### はじめに

生物は概日リズムをはじめ様々な種類のリズムを刻み生活している。その中で長期のリズムを刻むものは性ホルモンの分泌や毛衣の変化などを概年リズム(circannual rhythm)と呼ばれ、1年の周期でリズムを刻んでいる<sup>1-3)</sup>。概年リズムの一つである冬眠現象は、冬眠動物の厳しい自然環境の変化に対する適応である<sup>4-6)</sup>。このリズムは、特に、日長の短縮と気温低下によってもたらされる<sup>7)</sup>。その結果もたらされた食物の減少に対する適応は、エネルギーの消費を最小限にするための生理現象として現れ、心拍数、呼吸数、体温等が、低下する。心拍数と呼吸数は1/10に、体温は5 前後まで減少する<sup>8, 9)</sup>。その結果、組織、細胞

に大きな影響を与え、恒常性維持のために細胞内で様々な適応反応が起こる。しかし、この生理的状況は、冬眠期間中一定に持続するのではなく、周期的に正常の状態に戻り、一定の行動を行い、再び冬眠状態になる<sup>10-12)</sup>。覚醒に際しては、呼吸数、心拍数が30分から60分で急激に増加し、120分後には、体温も正常値にもどる。このような短時間での生理的变化は、酸化ストレスを生む<sup>13-15)</sup>。

一方、ミトコンドリアは細胞の中で様々なはたらきをしているが、その一つに活性酸素に対する防御システムに関与があげられる。ミトコンドリア蛋白SP-22は、ウシの副腎髄質から単離されたチオレドキシン依存の過酸化還元酵素ファミリー(ペルオキシレドキシン)に属し、ミトコンドリア内でラジカル感受性の

\* 秋田大学医学系研究科保健学専攻作業療法学講座

\*\* 秋田大学医学部解剖学第二講座(元)

\*\*\* 放送大学秋田学習センター

Key Words: 概年リズム

SP-22

脳

キクガシラコウモリ

シマリス

免疫組織化学

種々の酵素を酸化ダメージから保護するはたらきをもち、酸化ストレスで増加することが明らかになっている<sup>13, 14)</sup>。

本研究は、概年リズムにおいて、酸化ストレスを受ける脳の部位を明らかにするために、SP-22の抗体を用いた免疫組織化学でSP-22の免疫陽性部位の脳内での局在、と季節変化について観察、生体リズムとの関連部位について検討した、

## 方法と材料

### 1. 動物

雄のキクガシラコウモリ (*Rhinolophus ferrumequinum*) (体重: 19.0~23.0g, 8匹) は、環境省の許可を得て男鹿市門前の海蝕洞で採集した。雄シマリス (*Tamias sibiricus aciacicus*) (体重: 68.3~92.6g, 3匹) は、飼育したものを使用した。キクガシラコウモリの冬眠状態の個体は、自然環境下での冬眠期(10月~翌年4月)の動物が使用され、シマリスは、実験室の低温装置の中で、徐々に温度を下げ、日照時間を短くし、冬眠状態に導いた動物を使用した。

### 2. 生理的变化の計測

呼吸数は strain gauge (D-FAE-5-512, Minebea Co., Japan)。心拍数は electrocardiograph, 体表温度(口唇)は放射温度計 (SK-8100, Sato Keiryoki, Japan), 直腸温度は Termistor (PT-S1301, Shibaura Electronics, Japan) を用いて冬眠状態から覚醒するまでを計測した。

### 3. 固定, 切片作成

非冬眠の動物はネンブタール (sodium pentobarbital; 25mg/Kg) での腹腔内麻酔が施され、冬眠状態の動物は、覚醒を防ぐために無麻酔(低温麻酔状態)下で灌流固定で行われた。灌流固定はカニューレを左心室から上行大動脈に挿入し、心室部を鉗子で結紮し行われた。はじめに生理食塩水(10~15ml: 10~15ml/分), ついで固定液(100~150ml: 10~15ml/分)で灌流した。固定液は4% paraformaldehyde, 0.2% picric acidを0.1M リン酸緩衝液(pH 7.4)に溶解したものが用いられた。

1時間後、脳は取り出され、灌流固定液と同じ溶液で一晩浸漬固定が行われた。

切片は Vibratome で50  $\mu$ m 厚の冠状断の連続切片を作成した。

### 4. 免疫反応

免疫反応は全ての過程が Free flow で, peroxidase-antiperoxidase method (PAP 法) を用いて行った<sup>18)</sup>。はじめに, 0.01M リン酸緩衝食塩水 (PSA) で洗浄, 0.3%過酸化水素水で内在性の peroxidase をブロックした後に第1次抗体 (SP-22: 1000倍希釈に0.5% albumine bovine; Sigma, USA, normal goat serum; Vector, USA) を pH 7.4の0.01M PBS に溶解し, 4 で3日間反応を行った。0.01M PBS で洗浄後, 第2抗体 (goat anti-rabbit IgG; Jackson Immuno Research, USA) を PBS で200倍に希釈し, 室温で2時間反応が行われた。0.01M PBS で洗浄後, peroxidase-antiperoxidase complex (PAP) (Dacopatts, Denmark) を0.01M PBS で200倍に希釈し, 2時間反応が行われた。50mM トリス塩酸緩衝液で洗浄置換後, 0.05% diaminobenzidin (Sigma, USA) を50mM トリス塩酸緩衝液と0.01%過酸化水素水で5~8分反応し, 可視化された。切片は aminoalkylsilane でコーティングされたスライドガラスに貼付し, エタノール系列 (50~100%) で脱水後, Permunt (Fisher, USA) で封入され, Axiophoto (Zeiss, Germany) で観察した。

## 結果

### 1. 生理的变化

キクガシラコウモリで冬眠から覚醒までを経時的にそれぞれを計測した。心拍数は、冬眠状態での毎分50回程度であったが、呼吸数は、冬眠状態で、毎分40回前後、温度を室温(15 )に戻してから30分経過すると心拍数は毎分300回を越え、その後、10分で急激に非冬眠期の値に近づいた。呼吸数は、常温に戻してか

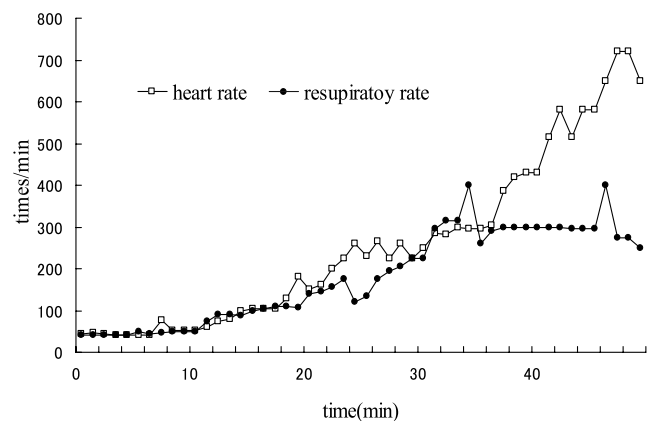


Figure.1 The transitions in heart rate and respiratory rate of horse shoe bat during arousal from hibernation.

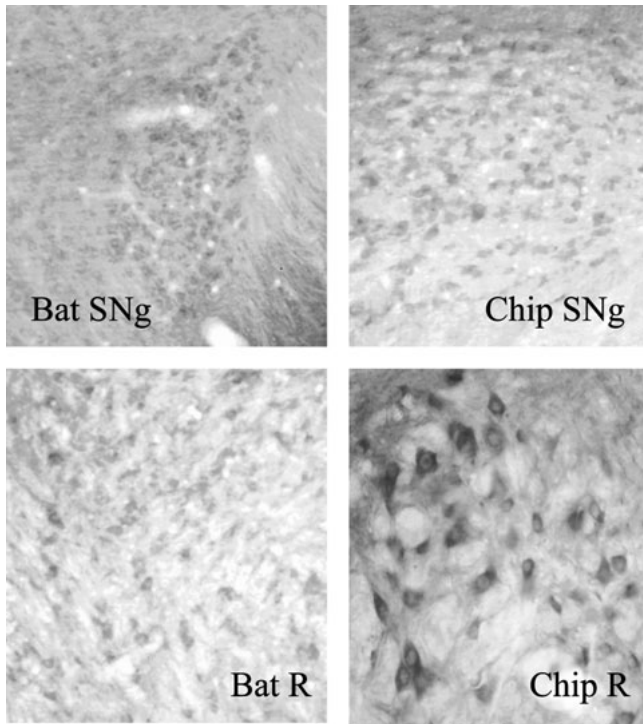


Figure.2 SP-22 immunoreactive elements in the subsubstantia nigra (SNg) and red nucleus (R) of horse shoe bat (Bat) and chipmunk (Chip). ×150

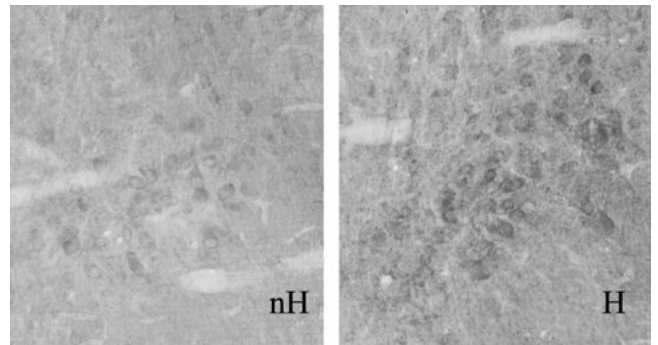


Figure.4 SP-22 immunoreactive elements in bat substantia nigra during non-hibernation state (nH) and hibernation state (H). ×150

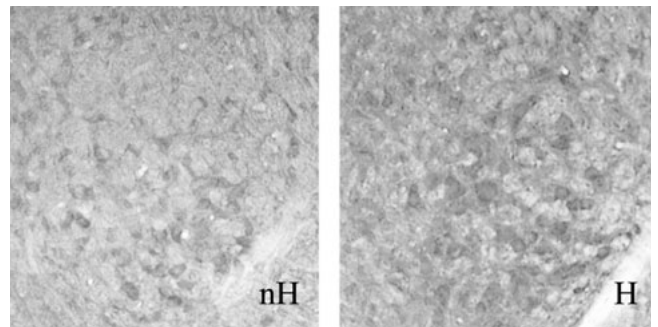


Figure.5 SP-22 immunoreactive elements in bat red nucleus during non-hibernation state (nH) and hibernation state (H). ×150

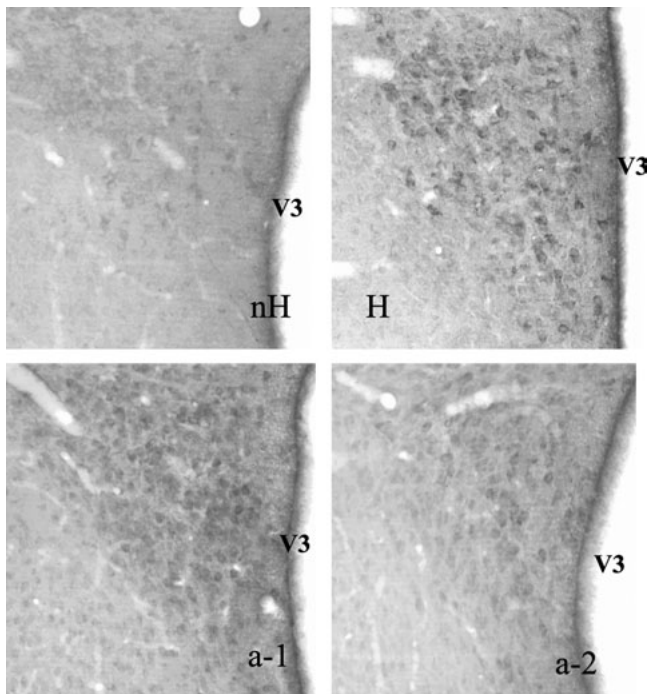


Figure.3 SP-22 immunoreactive elements in bat paraventricular hypothalamic nucleus during non-hibernating state (nH), hibernation state (H), and 1hour (a-1) or 2hour (a-2) after onset of arousal from hibernation. ×150 V3; third ventricle

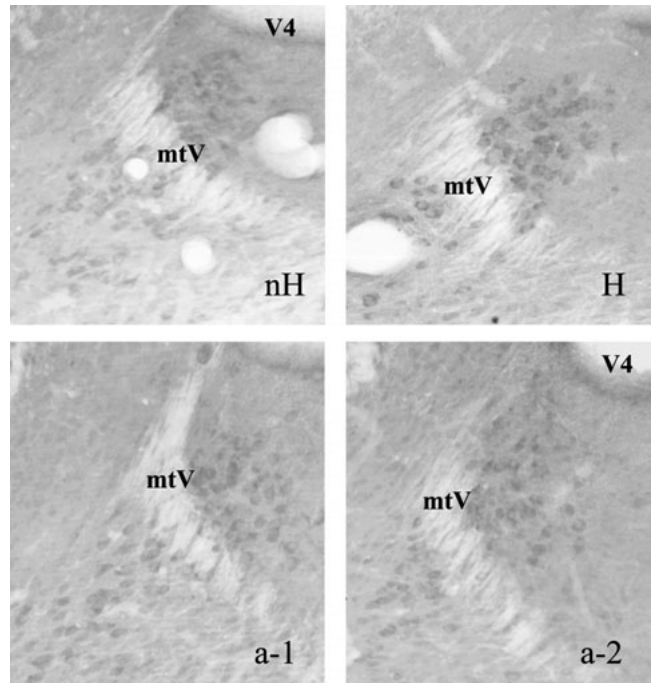


Figure.6 SP-22 immunoreactive element in bat locus coeruleus during non-hibernation state (nH), hibernation state (H), and 1hour (a-1) or 2 hour (a-2) after onset of arousal from hibernation. ×150 V4; fourth ventricle, mtV; mesencephalic tract of the trigeminal nerve



ら30分で非冬眠期の値に戻った。体表温度は室温が15  
の下で120分後に30.8 まで上昇し、直腸温度は  
35.9 まで上昇した (Fig.1)。

## 2. 免疫陽性神経細胞の脳内の局在

ミトコンドリア蛋白 SP-22の免疫陽性部位は、核以  
外の神経細胞体と神経線維に観察された (Figs.2

6)。キクガシラコウモリとシマリスで共通に顕著な  
陽性反応を示した部位は、淡蒼球 (GP), 室傍核  
(PaV) (Fig.3), 網様体視床核 (Rt), 弓状核 (Arc),  
そして青斑核 (LC) (Fig.6) の5部位であった。キ  
クガシラコウモリだけに顕著な反応を示した部位は、  
視索上核 (SO), 黒質 (SNg) (Fig.2, Bat SNg,  
Chip SNg), 内側小脳核 (Med), 上小脳核 (scp),

Table.1 Relative density of SP-22 immunoreactivity in various regions of  
the bat and chipmunk brain

Brain region		bat	chipmunk
Telencephalon			
Pir	piriform nucleus	+	+
Amy	amigdaloid nucleus	+	+
Hyp	hippocampus	+	+
GP	globus pallidus	++	++
Diencephalon			
Pe	periventricular hypothalamic nucleus	+	+
SO	supraoptic nucleus	++	+
PaV	paraventricular hypothalamic nucleus	++	++
Rt	reticular thalamic nucleus	++	++
LH	lateral hypothalamic nucleus	+	+
Hb	habenular nucleus	+	+
Arc	aruate hypothalamic nucleus	++	++
PM	premamillary nucleus	+	+
MG	medial geniculate nucleus	+	+
LG	lateral geniculate nucleus	+	+
Mesencephalon			
SNg	substanyia nigra	++	+
R	red nucleus	+	++
MeRF	mesencephalic reticular formation	+	+
RtTg	reticulotegmental nucleus of the pons	+	++
LDT	lateral dorsal tegmental nucleus	+	+
Cerebellum			
Lat	lateral cerebellar nucleus	+	+
Med	medial cerebellar nucleus	++	+
IntA	interposed cerebellar nucleus	+	+
Po			
LC	locus coeruleus	++	++
Mo5	moter trigeminal nucleus	+	+
7	facial nucleus	+	+
VC	ventral cochlear nucleus	+	+
scp	superior cerebellar nucleus	++	+
Medulla oblongata			
LSO	lateral superior olieve	++	+
SuVe	superior vestibular nucleus	+	++
Lve	lateral vestibular nucleus	+	+
PeRt	paravocellular reticular nucleus	+	+
GiA	gigantocellular reticular nucleus	+	+
RMg	raphe magnus nucleus	+	+
12	hypoglossal nucleus	++	+
LRt	lateral reticular nucleus	++	+

外側上オリブ (LSO), 舌下神経核 (12), そして外側網様体核 (LRt) の7部位であった。シマリスだけに顕著な反応を示したのは赤核 (R) (Fig. 2, Bat R, Chip R), 橋被蓋網様体 (RtTg), そして上前庭核 (SuVe) の3部位であった。両種で弱い反応を示したのは, 梨状核 (Pir), 扁桃核 (Amy), 海馬 (Hyp), 室周囲核 (Pe), 視床下部外側核 (LH), 手綱核 (Hb), 乳頭体前核 (PM), 内側膝状体核 (MG), 外側膝状体核 (LG), 中脳網様体 (MeRF), 背外側被蓋核 (LDT), 外側小脳核 (Lat), 小脳中位核 (IntA), 三叉神経運動核 (Mo5), 顔面神経核 (7), 蝸牛腹側核 (VC), 外側前庭核 (Lve), 網様体小細胞核 (PeRt), 網様態大細胞核 (GiA), そして大縫線核 (RMg) など20部位であった (Table. 1)。

### 3. 陽性反応部位の季節変化と覚醒期の経時変化

非冬眠期と冬眠期での SP-22免疫陽性部位での比較は, 室傍核 (PaV) (Fig. 2), 黒室 (SNG) (Fig. 3), 赤核 (R) (Fig. 5), そして青斑核 (LC) (Fig. 6) で観察された。いずれの部位でも冬眠期で非冬眠期に比べて強い陽性反応が観察された。また, 室傍核では, 覚醒後1時間と2時間での SP-22の免疫陽性反応は時間が経つにつれて弱くなった (Fig. 3, a-1, a-2)。青斑核においては, 覚醒後1時間と2時間で顕著な差はなかった (Fig. 6, a-1, a-2)。

## 考 察

冬眠期の心拍数や体温は, 動物種, 体重の差, あるいは冬眠する場所の外気温で異なり, アカコウモリ *Lasiurus borealis* で10 - 16回<sup>9)</sup> オオクビワコウモリ *Eptesicus fuscus* で42 - 62回/分<sup>8)</sup> と様々である。冬眠から覚醒する外気温は6 から11 と差がある<sup>19)</sup>。さらに覚醒の速度も外気温の影響を受けて差が出るが, オオホウヒゲコウモリで外気温17 で20分で正常の心拍に戻り, 体温も36 を越える<sup>20, 21)</sup>。キクガシラコウモリでは40回/分と比較的後者の種に近かった。覚醒開始から正常値までの時間は30分から40分要していた。これはオオホウヒゲコウモリの場合に比べて, 2室温が低いことも考えられるが, 温度差の比率から考えると, 種差による可能性が大きいと考えられる。これらの結果は, キクガシラコウモリが全てのコウモリの種類の中で中程度のものより小型の種に属するが, 大型の種に近い動きをしており, 種による差が, 体重の差に比べて大きな要因になることを示唆した。

多くの神経活性物質の免疫陽性部位の変化が生体リズム発信部位や, いわゆる第二の時計と考えられてい

る部位でそのリズムに対応するかたちで観察されてきた<sup>22-27)</sup>。ミトコンドリア蛋白 SP-22の免疫陽性部位は, 脳内で, 視床下部を中心に広範な部位に及んでいた。これらのことは, 自然環境に対応するための冬眠という生理的適応によって, 多くの部位の神経細胞が酸化ストレスを受けていることが示唆された。

季節変化が顕著な SP-22の免疫陽性部位は, 室傍核 (PaV), 赤核 (R), そして青斑核 (LC) であった。これらの部位は, 生体リズム発信部位の視交叉上核と密接な線維連絡があり, 第二のリズム発信部位と考えられている<sup>28, 29)</sup>。室傍核は, 特に, リズム発振系と考えられている視交叉上核と近い部位にあり, Wattsら<sup>13)</sup>らが, 視床下部の中でも部位特異部位と提唱する部位 (室傍核下部領域 subparaventricular zone) が含まれている。したがって, これらリズム発振に関係が深い部位は, 冬眠期において, 心拍数, 呼吸数, そして体温などの急激な変動により, 酸化ストレスが加わり<sup>14, 15)</sup>, 冬眠状態の維持や繰り返される中途覚醒において, ミトコンドリア蛋白である SP-22が, これらの部位でミトコンドリア内のラジカル感受性の種々の酵素を酸化的ダメージから保護していることが示唆された。

室傍核では, 覚醒過程の2時間経過時点で, ミトコンドリア蛋白 sp-22免疫陽性反応が, 顕著に減少した。しかし, 青斑核では, 2時間経過しても SP-22の免疫陽性反応は減少しなかった。このことは, 生理状態の変化により敏感に反応する室傍核の室傍核下部領域がよりリズムに関わるという Wattsら<sup>13)</sup>の考えを支持するものと考えられる。

## 謝 辞

本研究に用いたミトコンドリア蛋白 SP-22の抗体を提供していただきました, 西南女学院大学保健福祉学部栄養学科の南里宏樹教授に深く感謝いたします。

## 文 献

- 1) Gwinner E: Circannual rhythm in bird: Their interaction with circadian rhythm and environmental photoperiod. *J Reprod Fertil* 19: 51-65, 1973
- 2) Licht P, Zucker I, et al.: Circannual rhythms of plasma testosterone and luteinizing hormone levels in golden-mantled ground squirrels (*Spermophilus lateralis*). *Biol Reprod* 27: 411-418, 1982
- 3) Pengelly, ET Fisher, KC: The effect of