

日本財団補助金による

1998 年度日中医学協力事業報告書

—在留中国人研究者研究助成—

1999年 3月 10日

財団法人 日中医学協会

理事長 中島章殿

研究室で撮影した本人のスナップ写真、及び発表論文のコピーを添付

1. 研究者氏名 荆萍

研究機関 愛知医科大学 第四内科 研究指導者 蒲隈照典 職名 教授

所在地 〒460-1103 愛知県愛知郡長久手町大字岩作字雁又 電話 0566-62-3311 内線 2409

研究テーマ 生理活性物質とその受容体発現調節の遺伝子解析

2. 本年度の研究業績

(1) 学会・研究会等における口頭発表 有 ・ 無 (学会名・内容)

(2) 学会誌等に発表した論文 有 ・ 無 (雑誌名・論文名)

研究テーマ

生理活性物質とその受容体発現調節の 遺伝子解析

--副題--

TRH投与によるラット下垂体、視床下部、大脳
におけるTRHおよびTRH-Receptor
messenger RNA発現量の変動

研究者氏名 荆 萍

中国での所属・役職

中国衛生部北京生物製品研究所・助理研究員

日本での指導者氏名・所属・役職

満間 照典・愛知医科大学 第四内科・教授

要 旨

TRH (Thyrotropin releasing hormone) の視床下部-下垂体-甲状腺系以外における役割、機能を明らかにする目的で、ラットにTRHを負荷し、下垂体、視床下部、大脳におけるTRHおよびTRH-Receptor (TRH-R) messenger RNA (mRNA) 発現量の経時的変化をRT-PCR法およびCompetitive RT-PCR法により検討した。

TRH mRNAの基礎値は視床下部、大脳、下垂体の順に高く、TRH負荷では、下垂体において1日後に3.8倍に著増した。視床下部では一過性の軽度の増加、大脳では漸減傾向を示した。TRH-R mRNAの基礎値は視床下部、下垂体に高く、大脳は低かった。TRH負荷では、下垂体、大脳では著変はなく、視床下部において1日後より減少を示した。下垂体、視床下部、大脳の各組織にTRHおよびTRH-R mRNA が発現し、TRHにより異なった変動を示したことから、組織における発現制御の多様性が示され、新たな機能の存在の可能性が示唆された。

Key words

TRH	thyrotropin-releasing-hormone,
TRH-R	thyrotropin-releasing-hormone receptor
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
Competitive RT-PCR	Competitive reverse transcription polymerase chain reaction

目 的

TRH (Thyrotropin releasing hormone) は視床下部-下垂体-甲状腺系において、甲状腺機能の恒常性に重要な役割を果たしているホルモンである。視床下部殊にPVN(Periventricular Nucleus) におけるTRH遺伝子の発現、つまりprepro TRH messenger RNA (mRNA) の転写は甲状腺ホルモンにより負に制御されている (1, 2)。TRHはprepro TRH 前駆体より、酵素的あるいは非酵素的に順次分解修飾され生成される (3)。

TRHとprepro TRH mRNA の発現はPVNに限らず、その他の視床下部、大脳、下垂体、胃腸など消化管、睾丸など多くの臓器に分布している。またTRHの受容体であるTRH-R (TRH- Receptor) も下垂体だけでなく広く検出されている (4)。

しかしながらTRHの作用については甲状腺系に関与しているPVNでの機能以外はほとんど知られていない。そしてTRHの発現調節機構についても、Dexamethasone、 β estradiol などの関与が検討されているのみである (5, 6, 7)。そこで、TRHの機能を知る目的で、ラットにTRHを投与し、脳の種々の部位におけるTRHおよびTRH-R の遺伝子発現を RT-PCR法およびCompetitive RT-PCR法を用いて検討した。

対象と方法

1. 動物の処置とtotal RNAの抽出

Wistar 系雄ラット (体重約 200 gm) を各群 5 匹の 6 群に分け、コントロール群以外の 5 群に 50 mg/kgのTRHを連日の午前中に腹腔内投与し、各々 1、2、3、5、12 日後に断頭し、下垂体、視床下部、大脳の各組織を摘出し、直ちに液体窒素に入れて凍結させ、RNAの抽出まで -80 °Cで保存した。

total RNAの抽出は acid guanidine phenol chloroform 法により行った。

2. オリゴDNAの設計とCompetitorの作成

TRH、TRH-R、 β actinを増幅するために、TRH-F (forward)、TRH-R (reverse)、TRH-R-F、TRH-R-R、 β actin-F、 β actin-Rの各々20merから成る6本のオリゴDNAを設計した(表1)。

Competitorの作成はTakaraのCompetitive DNA Construction Kitにより作成した。

3. RT-PCR法およびCompetitive RT-PCR法

逆転写反応は、各群の5匹からの各0.5 μ gの合計2.5 μ gのtotal RNA 2.5 μ gを鋳型にしてオリゴ dT (18mer) 50 pMとSuperScript™ II RT 100単位 (GIBCO BRL) を加え、20 μ Lの容量で、42 °Cで60分を行った。

RT-PCR法は、RT産物 2 μ L (0.25 μ g total RNA相当) を鋳型として、1組のオリゴDNA各10 pM、0.5 単位の Taq DNAポリメラーゼを添加し、GeneAmp PCR System 2400 (Applied Biosystems) を用いて、94 °C 60秒 58 °C 60秒 72 °C 90秒の変性、アニール、伸長反応をTRHでは35回、TRH-Rでは45回、 β actinでは25回繰り返し目的とするDNAを増幅した。PCR産物は2~3 % の Agarose に添加し、電気泳動の後、Ethidium bromideで染色した。DNA量の定量は蛍光 Image analyser (FM BIO-100、HITACHI) により行った。

Competitive RT-PCR法は、段階希釈したCompetitorを用いる以外は基本的には上記のRT-PCR法と同じ条件を用いた。増幅DNAのコピー数の定量は、目的の遺伝子由来のDNA量をCompetitor 由来のDNA量で除し、この値のlog値を片対数グラフにプロットすることにより算定した(8)。

結 果

1. RT-PCR法によるTRH mRNA の定量

コントロール群において、視床下部、大脳、下垂体のいずれのRNAからの RT-PCR産物のアガロース電気泳動像は、期待通りの687 bp に対応する位置に1本の増幅バンドが得られた。RTを各群 triplicate で行い、各 RT 産物から monoplicate で PCRを行った。バンドの強度は視床下部が強く、下垂体では最も弱かった。β actinで補正したTRH mRNA量は視床下部ではTRH負荷1日後に低下した後、軽度の上昇を示し、その後再び減少した(表2)。大脳では漸次減る傾向を示した。下垂体ではTRH負荷翌日に382.7+89.3% (triplicateの平均+標準偏差)と著明な増加を示し、2日目には224.8+8.4と漸減を示し、12日後まで減少し続けた。

2. RT-PCR法によるTRH-R mRNA の定量

全ての試料から45回の増幅回数にて明瞭な464 bpの単一バンドが検出された。コントロール群においては、視床下部、下垂体に比較して大脳からの増幅量が少なかった。β actinで補正したTRH-R mRNA量は、TRH負荷後の視床下部において翌日から著明な減少を示した(表2)。大脳では軽度の低下を示したが、下垂体ではほとんど変動を示さなかった。

3. Competitive RT-PCR法によるTRH mRNA の定量

定量性を高める目的で、Competitive RT-PCR法により、TRH mRNA、TRH-R mRNAおよびβ actin mRNAの定量を試みた。TRH-Rは、転写産物が微量であるためか、competitorの存在下において標的遺伝子の明瞭な増幅が得られず定量不可能であった。TRHのCompetitive PCRでは、段階希釈したcompetitorを 10^3 から 10^7 コピー/tubeをRT産物2μLに加え、β actinのCompetitive PCRでは、段階希釈したcompetitorを 10^7 から 10^9 コピー/tubeをRT産物2μLに加えることにより良好な結果が得られた。Competitive PCRで定量したβ actin量は表3に示した如く 5.6×10^8 から 1.1×10^9 /μg total RNAとほぼ一定の値を示した。基

礎値、すなわちコントロール群において、 β actin量で補正した視床下部、大脳、下垂体の TRH mRNA量は、各々 6.0×10^6 、 1.7×10^5 、 3.1×10^4 コピー/ μg total RNA であった (表 3)。TRH負荷 2 日後の下垂体では 7.0×10^4 コピーと負荷前の 2.2 倍となり、RT-PCR法で得られた値にほぼ一致した。

考 察

mRNAの定量は従来からのノーザンブロット法が正確と考えられる。しかしながら、微量な転写産物あるいは試料が充分得られない時は検出が困難である。近年、PCR法が遺伝子工学に導入され多くの領域で多大の成果が出ると共に定量性に関してもCompetitive法により改善されつつある。ラットから得られるRNAは極微量であるので、今回我々は、TRH mRNA、TRH-R mRNAの定量にRT-PCR法と一部 Competitive RT-PCR法を用いた。試料間の純度の違いを補正するために、内部コントロールとして β actinを用いた。また転写産物からの特異的増幅のため、3 遺伝子を増幅するオリゴ DNAは全てイントロンを挟むように設計した。ラットgenomic DNAからの増幅は3 遺伝子とも全く無く、RT産物からのPCR産物が設計通りのDNA長の単一バンドと成ったことは、mRNAからの特異的増幅と考えられた。Competitorを用いないRT-PCR法では、増幅回数が少ない場合、ある程度定量性が維持されるが、増幅回数の増加に伴いプラトー現象など定量性が失われる可能性が指摘されている。しかしながら、下垂体におけるTRH mRNAのTRH負荷 2 日後のコントロールに対する増加度が、RT-PCR法とCompetitive RT-PCR法で一致したことは、今回のRT-PCR法がある程度定量性を持つこと示していると思われた。

TRH、TRH-Rが全身の臓器に広く分布していることが、TRHのRIA (Radioimmuno Assay) あるいは各々のmRNAの検出により証明されている。今回の検討でも両mRNAが下垂体、視床下部、大脳の各組織で認められた。下垂体におけるTRHの意義は大脳におけるものと同じく不明であるが、TRH負荷により著明に増加した。その発現レベルは増加後においても大脳での基礎値と同程度で視床下部の1/10と量的には少量である。下垂体におけるTRHの存在あるいは種々の条件下における変動については、Jacksonらの研究がある (9, 10)。彼らは、生体においては下垂体におけるTRHの発現は何らかの機構により抑制されていて、脱制御によりTRHの発現が亢進することを報告している。今回の結果を考え併せ

ると、TRHが何らかの機構を介して抑制の解除に作用していることが推測されるが、詳細は不明である。

RT-PCR法および Competitive RT-PCR法は微量のmRNAを定量するうえで有用な実験手段と考えられた。また、本実験系はTRHを初めとした種々の生理活性物質の発現制御および生理作用を検討するのに有用なものと思われる。今後更に実験を進め、TRHの役割を明らかにしたい。

結 語

本研究により、ラットの下垂体、視床下部、大脳にTRH および TRH-R mRNAの存在していることが示された。またTRHによりTRH および TRH-R mRNAの発現制御の異なることが判明したことにより、TRHの機能の多様性が示唆された。

参考文献

- 1) Yamada M, et al. Influences of hypothyroidism on TRH concentrations and prepro TRH mRNA levels in rat hypothalamus: a simple and reliable method to detect prepro TRH mRNA level. *Neuroendocrinology*. 1992 Mar; 55(3): 317-20.
- 2) Hollenberg AN, et al: The human thyrotropin-releasing hormone gene is regulated by thyroid hormone through two distinct classes of negative thyroid hormone response elements. *Mol Endocrinol*. 1995 May; 9(5): 540-50.
- 3) Lechhan RM, Wu P, Jacson IMD, et al: Thyrotropin-releasing hormone precursor: characterization in rat brain. *Science*. 1986 Jan 10; 231(4734): 159-61.
- 4) Fukusumi S, et al: Distribution of thyrotropin-releasing hormone receptor mRNA in rat peripheral tissues. *Regul Pept*. 1995 May 30; 57(2): 115-21.
- 5) Thomas O, et al: Thyropin-releasing hormone gene expression in the anterior pituitary. II stimulation by glucocorticoids. *Endocrinology* .1994; 134(2): 821-5
- 6) Ildiko K, et al: Changes in adrenal status affect hypothalamic thyropin-releasing hormone gene expression in parallel with corticotropin-releasing hormone. *Endocrinology*. 1995 Jul; 136(2): 2795-802.
- 7) Croissandeau G, et al: Evidence of thyrotropin-releasing hormone (TRH) gene expression in rat anterior pituitaries and modulation by estrogens of TRH-like immunoreactivity and TRH- elongated peptide contents. *J Endocrinol*. 1996 Oct; 151(1): 87-96.
- 8) 川上文清、高橋慎博、井上浩明、河村良久 (1996) 増幅産物の定量 2. 定量的PCR. *蛋白質 核酸 酵素* 41(5)、503-509
- 9) Rondeel JM, et al. Onset of pro-thyrotropin-releasing hormone gene expression in cultured rat anterior pituitary cells is expedited by dexamethasone. *Mol Cell Neurosci*. 1994 Dec; 5(6): 678-83.
- 10) Jackson IM, et al. Antidepressants inhibit the glucocorticoid stimulation of thyrotropin releasing hormone expression in cultured hypothalamic neurons. *J Invest Med*. 1998 Dec; 46(9): 470-4.

表1. オリゴ DNAの配列と増幅DNAの断片長

オリゴ DNA	配列 (5' -----3')	増幅DNA断片長
TRH-F	cttggttgctgctggctctg	687 bp
TRH-R	tgctgtcgtttgtggagtct	
TRHR-F	ccaccaacagatgtttcaac	
TRHR-R	atatccatatgtacaagaac	464 bp
β actin-F	cattgccgatagtgatgacc	632 bp
β actin-R	tacacagaagcaatgctgtc	

表2. 下垂体、視床下部、大脳におけるTRH-R TRH mRNA量の変動

	負荷前	負荷後 1 日	負荷後 2 日	負荷後 3 日	負荷後 5 日	負荷後 1 2 日
下垂体 TRH-R	100.0 \pm 0.74	103.1 \pm 9.6	100.5 \pm 6.7	120.4 \pm 17.1	113.6 \pm 19.7	106.0 \pm 25.9
下垂体 TRH	100.0 \pm 17.4	382.7 \pm 89.3	224.8 \pm 8.4	163.0 \pm 53.7	77.4 \pm 14.7	67.7 \pm 5.3
視床下部 TRH-R	100.0 \pm 29.3	28.5 \pm 5.7	27.5 \pm 11.5	49.6 \pm 2.3	26.1 \pm 5.3	25.5 \pm 9.5
視床下部 TRH	100.0 \pm 10.2	60.3 \pm 7.7	179.5 \pm 16.0	195.7 \pm 14.4	35.3 \pm 3.8	70.2 \pm 31.2
大脳 TRH-R	100.0 \pm 13.1	80.5 \pm 3.1	81.6 \pm 12.2	140.3 \pm 54.0	73.7 \pm 20.4	82.5 \pm 20.2
大脳 TRH	100.0 \pm 33.4	85.3 \pm 13.7	91.3 \pm 2.5	79.0 \pm 5.2	50.3 \pm 8.7	52.9 \pm 17.5

(負荷前の値を基準に%で、平均 \pm SDで表した。RTをtriplicate、PCRをmonoplicateで行い、 β actin量で補正した。)

表3. Competitive RT-PCR法により定量したTRH mRNA

	TRH mRNA コピー数 (/ μg total RNA)	β actin mRNA コピー数 (/ μg total RNA)	補正後TRH mRNA コピー数 (/ μg total RNA)
視床下部	6.0×10^6	1.1×10^9	6.0×10^6
大脳	8.4×10^4	5.6×10^8	1.7×10^5
下垂体 (負荷前)	2.6×10^4	9.2×10^8	3.1×10^4
下垂体 (負荷後 2 日)	6.4×10^4	1.0×10^9	7.0×10^4

(β actin補正は視床下部のTRH mRNA コピー数を基準に、それ以外のものに対しおこなった)