

視交叉上核における aromatic L-amino acid decarboxylase の発現

—免疫組織化学および in situ hybridization による検索—

稲 富 勉

京都府立医科大学眼科学教室

要 約

視交叉上核は、サーカディアンリズムをつかさどる中枢であり、この核で生み出されたリズムは、網膜からこの核への神経入力による明暗情報により同調作用を受ける。今回我々は、ラット視交叉上核における aromatic L-amino acid decarboxylase (AADC) 含有ニューロンの分布、AADC mRNA の明暗条件下での日内変動、および個体発生について、免疫組織学と in situ hybridization の手法によって検討した。AADC 免疫陽性かつ mRNA を発現するニューロンは、視交叉上核の背内側部から背外側部に分布し、その多くは vasopressin を含んでいた。AADC mRNA シグナルは日内変動を示し、vasopressin mRNA の変動と同じく、明期のものが暗期

のものより高い傾向を示した。胎仔視交叉上核においては、AADC 免疫活性および mRNA は、サーカディアンリズムが出現する胎生 18 日に vasopressin より早く発現していることが検出された。以上の結果から、AADC がサーカディアンリズムの形成に何らかの役割を果たしている可能性が示唆された。(日眼会誌 98:749—759, 1994)

キーワード: Aromatic L-amino acid decarboxylase, 視交叉上核, 日内変動, In situ hybridization, 免疫組織化学

Expression of Aromatic L-amino Acid Decarboxylase in the Rat Suprachiasmatic Nucleus

—Immunocytochemistry and In Situ Hybridization Study—

Tsutomu Inatomi

Department of Ophthalmology, Kyoto Prefectural University of Medicine

Abstract

We investigated the distribution, diurnal variation, and time of expression of aromatic L-amino acid decarboxylase (AADC), a second-step enzyme of the monoamine synthetic pathway, in the rat suprachiasmatic nucleus (SCN), by immunocytochemistry and in situ hybridization. AADC immunoreactive and mRNA expressing cells were observed in the dorsomedial and dorsolateral portions of the SCN. Double labeling immunofluorescence demonstrated that about 70% of AADC neuron in the dorsomedial portion contained vasopressin immunoreactivity. AADC mRNA expression in the SCN showed day-night variation, with higher

signals in the daytime than at night. Developmental study demonstrated that AADC immunoreactivity and mRNA in the SCN were expressed at embryonic day 18, the onset time for fetal circadian rhythm. These findings suggest that AADC neurons in the SCN may play some role in the generation and entrainment of circadian rhythm. (J Jpn Ophthalmol Soc 98:749—759, 1994)

Key words: Aromatic L-amino acid decarboxylase, Suprachiasmatic nucleus, Diurnal variation, In situ hybridization, Immunocytochemistry

別刷請求先: 602 京都府京都市上京区河原町広小路 京都府立医科大学眼科学教室 稲富 勉
(平成5年12月14日受付, 平成6年3月29日改訂受理)

Reprint requests to: Tsutomu Inatomi, M.D. Department of Ophthalmology, Kyoto Prefectural University of Medicine, Kawaramachi-Hirokoji, Kamigyo-ku, Kyoto-shi, Kyoto-fu 602, Japan

(Received December 14, 1993 and accepted in revised form March 29, 1994)

I 緒 言

視交叉上核 (suprachiasmatic nucleus) は視床下部の腹側部, 視交叉背側に位置する直径 0.4~0.8 mm の小さい神経核¹⁾であるが, 哺乳類においては, サーカディアンリズム (概日リズム) の唯一の中核と考えられている。すなわち, 睡眠, 覚醒, 行動量, ホルモン分泌, 眼圧などの体内でみられるさまざまな生理的日内リズムは, 視交叉上核のニューロン活動により生み出されていることが, 電気生理実験, 破壊実験, 移植実験などにより今日ではほぼ明らかとなっている^{2)~6)}。生体内リズムの一つである眼圧の日内変動も, 現在その機序として上頸神経節由来の交感神経により, 毛様体での房水流量が調節されていると考えられているが, 上頸神経節が視交叉上核から中枢性の制御を受けていることを考えると, 視交叉上核が眼圧調節に重要な役割を果たしていると考えられる。

視交叉上核は, 主に形態学的視点により大きく腹外側部と背内側部の2つの部位に分けられる。これらの2部位は構成するニューロンの神経伝達物質の違い, 細胞密度および細胞の大きさ, 網膜や他の脳部位からの入力の有無などが大きく異なる⁷⁾⁸⁾。腹外側を構成する主要ニューロンである vasoactive intestinal peptide (VIP) 含有ニューロンには網膜からの神経線維, 縫線核セロトニン線維などが入力している^{9)~11)}。このうち, 網膜からの明暗情報はVIP産生を転写レベルで調節しており, VIPが個体固有のサーカディアンリズムを外界の明暗周期に対して同調させる働きを担っている可能性が示唆されている¹²⁾¹³⁾。一方, 背内側部を構成するニューロンは主に vasopressin を神経伝達物質とする¹⁴⁾。この物質の視交叉上核からの分泌は明暗条件下に左右されず, 個体固有のリズムを保つことが知られている^{15)~17)}。したがって, この背内側部はサーカディアンリズムの主中枢であろうと推測されている。これら2つの中心的なニューロン系の他に, 視交叉上核には somatostatin, gastrin releasing peptide (GRP), substance Pなどを神経伝達物質とするニューロンの存在が知られているが, これらはVIPおよび vasopressin 含有ニューロンに比して数が非常に少ない¹⁸⁾。背内側に局在する以外の生理活性物質は現在までほとんど知られていないが, 唯一アミン合成の第2段階の酵素である aromatic L-amino acid decarboxylase (AADC) が多量に存在することが注目される¹⁹⁾。AADCは, カテコールアミンニューロン内では L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) をドーパミンに, またセロトニンニューロン内では 5-hydroxytryptophan をセロトニンに変換する酵素であるが, これらのモノアミン系ニューロン以外にも脳内には AADC のみを含有し, 他のモノアミン系の代謝酵素を含まないニューロンが存在することが知られている。視交叉上核は, こ

れらの非アミン性 AADC ニューロンが脳内で最も密に分布する部位の一つであり, この AADC とサーカディアンリズムとの関係が注目される。今回我々は, 視交叉上核内の AADC 含有ニューロンの機能的役割を明らかにする第一歩として, 背内側部にある vasopressin 含有ニューロンと比較しながら, 個体発生, 酵素発現の日内変動について免疫組織化学および in situ hybridization の手法を用いて検討した。

II 実験方法

1. 実験動物

実験動物には Wistar 系ラットを使用し, AADC および vasopressin の視交叉上核における分布の検索および明暗実験には総計 25 匹の雄成熟ラット (200~250 g), また, 個体発生の検索においては胎生 18 日, 胎生 20 日, 出生後 1 日, 出生後 3 日, 出生後 7 日の各時期 3 匹のラットを使用した。また, 明暗実験においては 6 匹のラットを自由給餌, 明期 12 時間, 暗期 12 時間の明暗条件下 (午前 6 時点灯, 午後 6 時消灯) に 2 週間飼育し, 日内周期に順応させた後, 明条件として午前 10 時, また, 暗条件として午後 10 時にエーテル麻酔下において本実験に使用した。

2. 免疫組織化学

ペントバルビタールナトリウム (ネプタール®) 深麻酔下, 氷冷 0.1 M リン酸緩衝液 (PBS) で, 左心室から還流脱血し, その後, 4% paraformaldehyde, 0.2% ピクリン酸を含む 0.1 M リン酸緩衝液で還流固定し, 脳を摘出後, 同液中で 24 時間の浸漬固定を行った。続いて, 20% ショ糖を含むリン酸緩衝液で一晩浸漬した後, 炭酸ガスによって急速凍結し, 20~50 μm の切片を作成し, 免疫組織化学を行った。抗血清はウサギで作成した抗 vasopressin 血清 (1:5000, Immunonuclear Co)²⁰⁾, 抗 ADDC 血清 (1:5000, Prof. Raynaud から供与)²¹⁾, 抗 tyrosine hydroxylase (TH) 血清 (1:10000, 藤田保健衛生大学, 永津教授から供与)²²⁾ を用い, ABC (avidin-biotin peroxidase complex) 法で免疫組織化学反応を行った。反応後, 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) による呈色反応を行い, 一部には nickel ammonium sulfate によって DAB 反応を増強させた。

また, 二重染色としては, 25 μm の凍結切片を作成した後, 一次抗体として AADC 検出には上記のウサギで作成した抗血清を, また, vasopressin 検出にはモルモットで作成した抗血清 (Peninsula Lab) を使用し, それぞれの二次抗体として, texas red 標識抗ウサギ IgG および fluorescein 標識抗モルモット IgG を用いて発色させ, 蛍光顕微鏡で観察した。各々の抗血清の免疫組織化学反応の特異性の検定は, 各々の抗原による吸収試験により確認した。

3. In situ hybridization

1) Probe

Vasopressin はコーディングリージョン²³⁾内の 34 bp に相補的なオリゴヌクレオチドプローブを合成し、ターミナルトランスフェラーゼで 3'末端を³⁵S-dATP (New England nuclear) で標識し使用した。また、AADC は cDNA (大阪大学、福井助教授から供与) のコーディングリージョン²⁴⁾内で EcoR 1, Hind 3 により切り出される 531 bp の fragment (13~544) を pSPT 18 ベクター内にサブクローンし、SP 6, T 7 RNA ポリメラーゼにより、³⁵S-CTP で標識した RNA プローブを作成し使用した。

2) In situ hybridization の手技

エーテル深麻酔下、氷冷生理食塩水で灌流脱血し、その後 4% パラホルムアルデヒドを含むリン酸緩衝液で灌流固定し、脳を摘出後、後固定を 6 時間行った。クリオスタットで 20~50 μ m の凍結切片を作成し、proteinase K による脱タンパク処理を行い、0.1 M triethanolamine を含む生理食塩水で 10 分間室温でアセチル化を行い使用した。

³⁵S-dATP で標識したオリゴヌクレオチドプローブを用いた hybridization には、50% vol/vol formamide, 4 \times SSC, 1 \times Denhart's solution, 1% sarcosyl, 0.25 mg/ml salmon sperm DNA, 0.25 mg/ml tRNA, 100 μ M DTT, 10% dextran sulfate をそれぞれ含む溶液²⁵⁾を、また、cRNA プローブにおいては Simmons ら²⁶⁾のプロトコルに従って作成した溶液を用いた。Hybridization は、それぞれ 2.5 \times 10⁶dpm/ml, 5 \times 10⁶dpm/ml のプローブ濃度で 42 $^{\circ}$ C と 57 $^{\circ}$ C, 12 時間で反応させた。オリゴプローブによる hybridization 後の洗浄は、42 $^{\circ}$ C で 50% formamide/2 \times SSC, 1 \times SSC, の順に各々 60 分間行った。また、RNA プローブの hybridization 後の洗浄は、50% formamide/2 \times SSC で 30 分間の洗浄後、20 μ g/ml RNase A で 37 $^{\circ}$ C, 30 分間処理し、さらに 57 $^{\circ}$ C で 50% formamide/2 \times SSC, 1 \times SSC, 0.1 \times SSC の順に洗浄した。これらの切片は同一容器内において反応させた後、クロムゼラチン処理したスライドガラスにマウントし、アルコール系列で脱水後、X 線フィルム (Hyperfilm β max, Amersham) に露出後、乳剤 (Ilford, K 5) を用いてオートラジオグラフィーを行った。

4. Northern blotting

成熟ラットを断頭後、速やかに脳を摘出し、視床下部および中脳を 5 \times 5 mm 断片に細分化し、液体窒素で急速凍結を行った。その後、acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction (AGPC) 法で RNA を抽出し、それぞれを吸光度で 10 μ g に定量し、1% アガロースで電気泳動した。メンブランに転写した後、5 \times SSPE, 1 \times Denhart's solution, 50% formamide, 1% SDS, 100 μ g salmon sperm DNA を含む hybridization 溶液内で in situ hybridization と同様の RNA プローブ

を使用し、57 $^{\circ}$ C で 12 時間反応させ、洗浄後、X 線フィルムによるオートラジオグラフィーを行った。

III 結 果

1. AADC, vasopressin 含有ニューロンの成熟ラットにおける分布

1) 免疫組織化学

AADC 含有ニューロンは前視床下部野に広く認められたが、特に視交叉上核およびその背方の第三脳室周囲に集積して存在していた。視交叉上核内においては背外側部から背内側部に小型 (長径 8~11 μ m) の免疫陽性ニューロンが密に認められたが、腹外側部には少数のニューロンが散在するのみであった (図 1A)。また、vasopressin 含有ニューロンは背内側部に密集して存在したが背外側部には少なく、腹外側部および視交叉上核背方にはほとんど認められなかった (図 1B)。TH 含有ニューロンは第三脳室周囲に少数認められたが、視交叉上核内には認められなかった (図 1C)。次に、蛍光二重免疫染色法を用いて、AADC と vasopressin の同一細胞内共存を検索した。各々の物質は ABC 免疫組織化学と同様の分布パターンを示した。両者の共存は視交叉上核背内側部に認められ、AADC 陽性細胞の約 70% が vasopressin 免疫陽性を示した (図 2)。しかし、背外側部の AADC 陽性細胞のうち、vasopressin 免疫陽性を示すものは約 10% あり、背側の第三脳室周辺領域では両者の共存は認められなかった。

2) In situ hybridization

AADC の cRNA プローブの特異性について、① ノザンプロット、② ドーパミンニューロンの存在する中脳黒質での in situ hybridization、③ センスプローブによる in situ hybridization で検討した。ノザンプロットにおいては、約 2 kb の位置に視床下部、中脳ともに single band が認められ (図 3A)、このサイズではすでに報告されている AADC mRNA のサイズとほぼ一致²⁴⁾、また、他にバンドを認めないことから、このプローブに非特異的吸着がないことを示している。また、両部位における AADC mRNA 量を比較すると、非アミン性 AADC ニューロンの多い視床下部では、ドーパミンニューロンが存在する中脳と比較し、少量しか検出されなかった。中脳黒質での in situ hybridization では、ドーパミンニューロンの存在する黒質緻密部の中型~大型細胞に強いシグナルが認められ (図 3B)、また、センスプローブにおいては視床下部および中脳ともに陽性所見は認められなかった。また、vasopressin のオリゴヌクレオチドプローブを用いた in situ hybridization については、vasopressin mRNA の脳内における分布が vasopressin ニューロンの免疫組織化学における分布と完全に一致しており、今回の vasopressin オリゴヌクレオチドプローブで特異的に十分な感度で vasopressin ニューロンを検

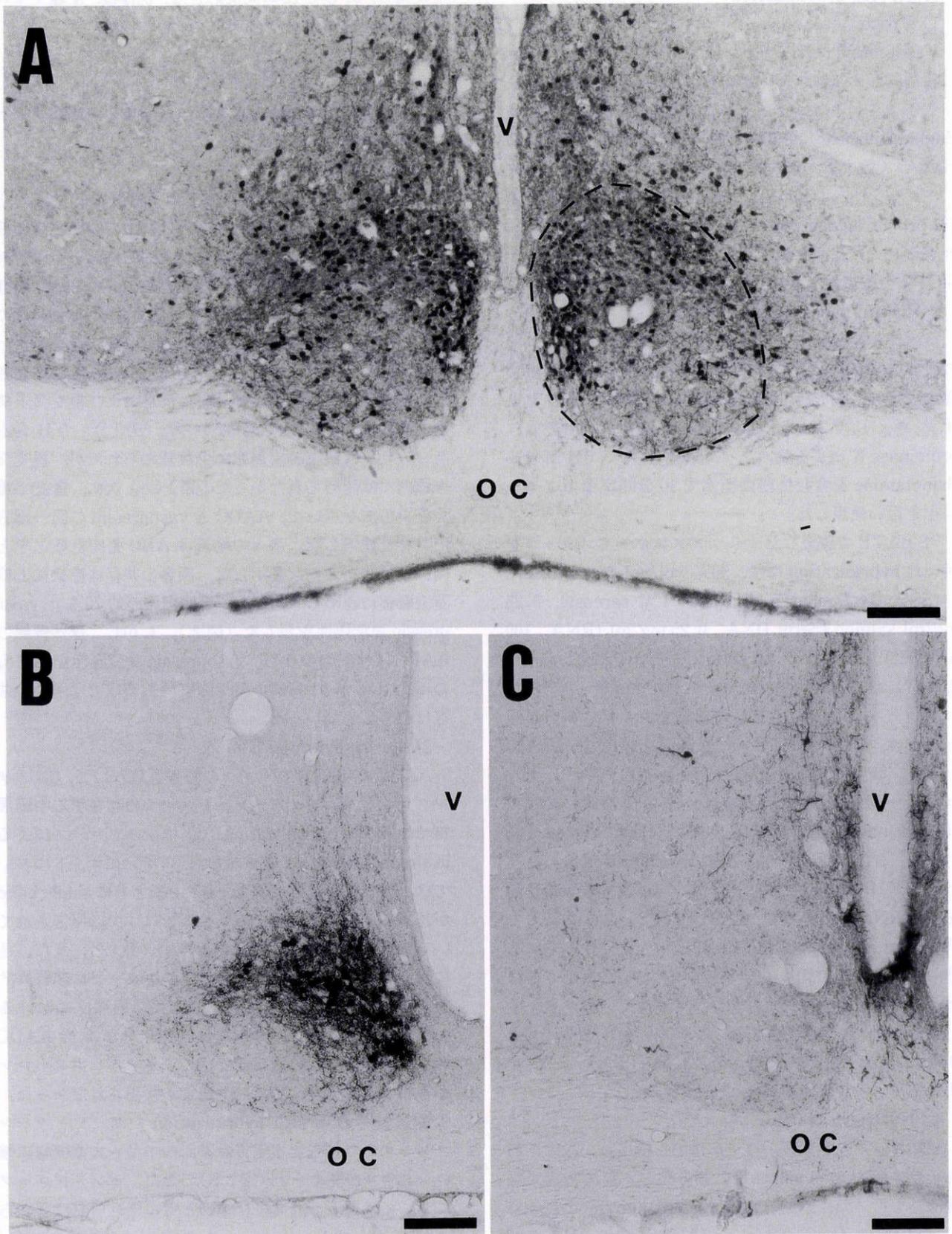


図1 視交叉上核における aromatic L-amino acid decarboxylase (AADC) (A), vasopressin (B), および tyrosine hydroxylase (TH) (C) の免疫組織化学.

AADC 陽性細胞は、視交叉上核の背外側部、背内側部から背側の第3脳室周囲にかけて認められるのに比し、vasopressin 免疫陽性細胞は、背内側部に限局した分布が見られる。TH の免疫活性は視交叉上核内の細胞には認められず、少数の神経線維のみに認められる。図 A の破線は一侧の視交叉上核の境界を示す。v: 第3脳室, oc: 視交叉, バーは 200 μm

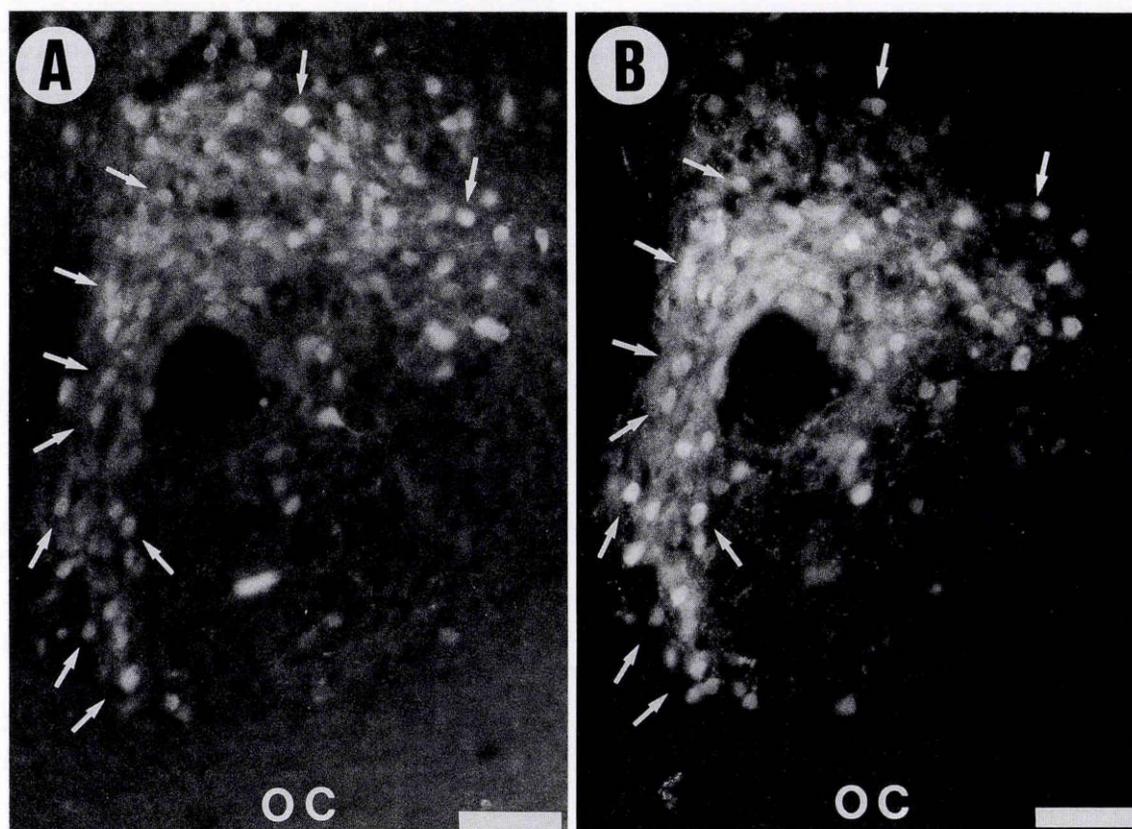


図2 Texas red で標識された AADC (A), fluorescein で標識された vasopressin (B) の同一切片における蛍光二重染色像。
背内側部の AADC 含有ニューロンの約 70% に両者の共存関係が認められた。矢印は代表例を示す。oc: 視交叉, バーは 400 μm

出していると考えた。

AADC mRNA の視交叉上核における分布は、先の免疫組織化学の結果と一致し、その分布は背外側部、背内側部および背側の第 3 脳室周囲に認められた (図 4 A)。また、vasopressin mRNA は、視交叉上核背内側部に限局して分布していた (図 4 B, C)。

2) AADC および vasopressin の視交叉上核における個体発生

免疫組織化学的検索では、胎生 18 日にすでに視交叉上核の背外側部に強い AADC 免疫陽性ニューロンが認められた (図 5 A, B)。出生後 3 日では、背外側部の強い免疫陽性を示す細胞のみならず、内側部に弱い免疫細胞を示す細胞が多数出現した (図 5 C)。背内側部の細胞は経時的に急速に免疫染色性を増加し、出生後 7 日では成熟ラットと同様の染色性および分布パターンを示した。Vasopressin ニューロンに関しては、強い vasopressin 免疫活性が胎生 18 日にすでに室傍核および視索上核の大細胞性ニューロンおよびそれらの線維終末に認められるものの、視交叉上核内の小細胞性ニューロンには vasopressin 免疫活性は認められなかった (図 5 D)。出生後 3 日で初めて視交叉上核の背内側部に弱い vasopressin 免疫陽性細胞が数個認められたが、成熟ラットと同

程度の免疫活性を示すのは生後 7 日以降であった。

AADC mRNA については、免疫組織化学と同様に胎生 18 日で背外側部に強い陽性シグナルを認めたが背内側部では弱かった (図 6 A)。また、出生後 1 日では背内側部の陽性シグナルの増強を認めた (図 6 B)。vasopressin mRNA については胎生 18 日では認められず、出生後 1 日で背内側部に弱い陽性所見が認められた。

3) AADC および vasopressin mRNA の日内変動

AADC および vasopressin mRNA の日内変動を明暗条件下において検索した。In situ hybridization の反応にあたっては、明期 (10:00) と暗期 (22:00) の各 1 個体のラットを 1 群として反応し、3 群の結果を検討した。いずれの群においても vasopressin mRNA は視交叉上核においては、暗期よりも明期に強いシグナルが認められたが、視索上核においては明瞭なシグナル強度の変動は認められなかった (図 7 A, C)。視交叉上核の AADC mRNA シグナルも vasopressin mRNA と同様、明期に高く、暗期に低いという傾向が認められた (図 7 B, D)。

IV 考 按

視床下部の腹側部、視交叉の直上に位置する視交叉上核は、ラットにおいては、吻尾径 700 μm 、縦横径 400 μm

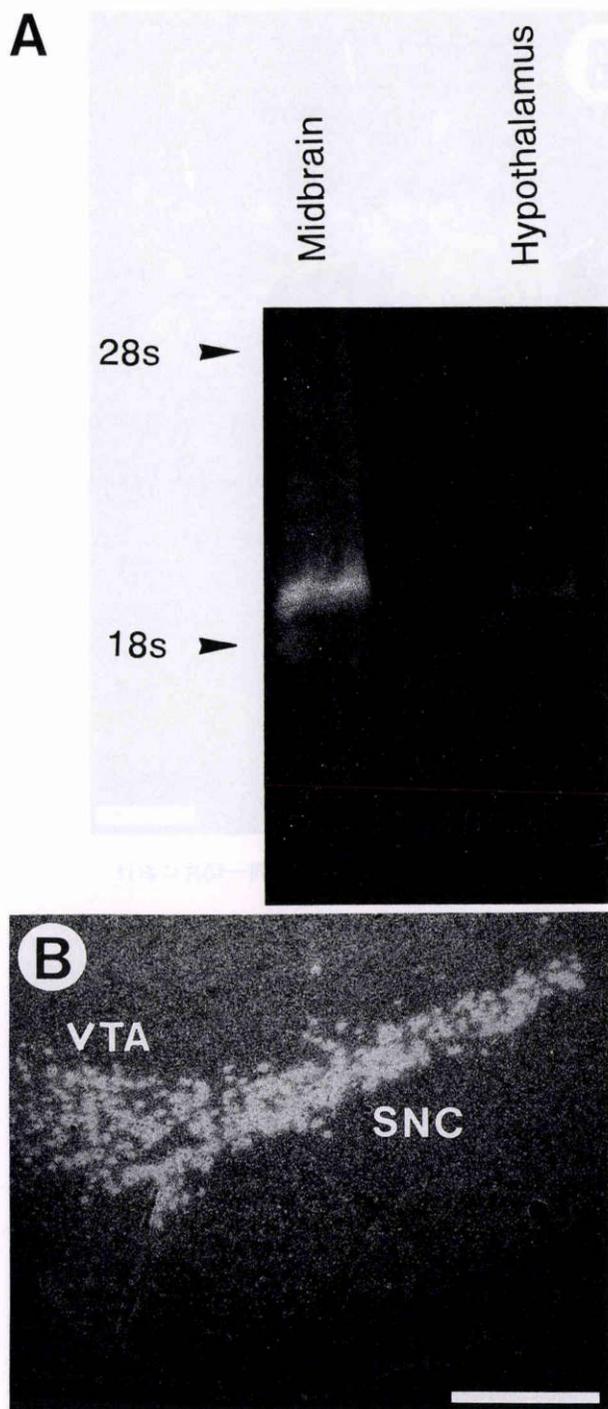


図3 AADC cRNAによるノザンプロテイング (A) と in situ hybridization (B).

ノザンプロテイングでは中脳 (midbrain) および視床下部 (hypothalamus) とともに約 2 kb のサイズに単一バンドが認められた。中脳における In situ hybridization では黒質緻密部 (SNC) および腹側被蓋野 (VTA) のドーパミン神経細胞に強いシグナルが認められた。バーは 200 μm

の小神経核であり¹⁾、一側の核は 8,000 個のニューロンで構成される⁷⁾。この核がサーカディアンリズムと強く関係することは、① 電気的な両側視交叉上核の破壊実験に伴う、生体リズム (睡眠-覚醒, 摂食, 血中ホルモン

分泌, 活動量) の消失²⁾⁻⁴⁾、生体内において視交叉上核内のニューロンのみが、著明な電気的および代謝活動のサーカディアンリズムを示すこと⁵⁾²⁷⁾、② 生体外に単離された視交叉上核のニューロンもサーカディアンリズムを保持すること²⁸⁾²⁹⁾、③ 視交叉上核破壊ラットの視交叉上核の移植に伴うリズムの回復⁶⁾³⁰⁾、などの観察により明らかであり、現在、視交叉上核がサーカディアンリズムの中核 (primary oscillator) であると広く考えられるに至っている。

眼科領域においても、眼圧に日内リズムが存在していることが知られており、このリズムは、ヒトでは明期に高く、暗期に低く、また、ウサギでは逆に明期に低く、暗期に高い³¹⁾。このリズムは恒暗条件下においても存在することから、内因性に制御され、房水産生量の調節により規定されていると考えられている³²⁾。さらに眼圧リズムの成因に関しては、上頸部神経節摘除あるいは上頸部神経節前線維切断によるリズムの消失³³⁾、前房水内のエピネフリン変動とのリズムの一致などから、上頸部神経節のノルアドレナリンニューロンを介した視交叉上核からの中枢性調節とされている。したがって、生理的な眼圧変動および緑内障などの眼圧異常を考えるには、視交叉上核などの中枢性の制御機構をも解明する必要がある。

近年、免疫組織化学および分子生物学の発達により、この視交叉上核を構成するニューロンの神経伝達物質およびそれらの受容体によるサーカディアンリズムの調節機構については様々な研究成果が報告されているが、現在までのところサーカディアンリズム発現の機序については未だ推測の域を出ていない。その中の物質として注目すべきは、この核における vasopressin が生体内および単離された条件において明暗条件に関係なく生体固有の日内変動を示すことである¹⁵⁾⁻¹⁷⁾²⁹⁾。我々は、vasopressin ニューロンが限局して分布している視交叉上核背内側部がリズム形成に中心的役割を果たしていると考え、背内側部に多数存在し、vasopressin と同じ分布パターンを示す AADC ニューロンについて着目し、詳細な検討を行った。

AADC は 1970 年代に単離精製が行われたが³⁴⁾、その脳内における局在は 1984 年の Jaeger ら¹⁹⁾による抗 AADC 血清を用いた免疫組織化学法を待たねばならなかった¹⁹⁾。今回の我々の抗血清による視交叉上核における AADC 含有ニューロンの分布の結果は彼らとほぼ同様であった。すなわち、AADC 含有ニューロンは背内側部に主に存在し、背外側部および視交叉上核背側の第 3 脳室周辺にも存在した。これら AADC 含有ニューロンにおいて注目すべきことは、Jaeger ら¹⁹⁾も指摘するように他のアミン合成酵素を含まない、非アミン性ニューロンであることである。図 1C に示すように、カテコラミン合成の律速酵素である第 1 段階を司る tyrosine hydroxy-

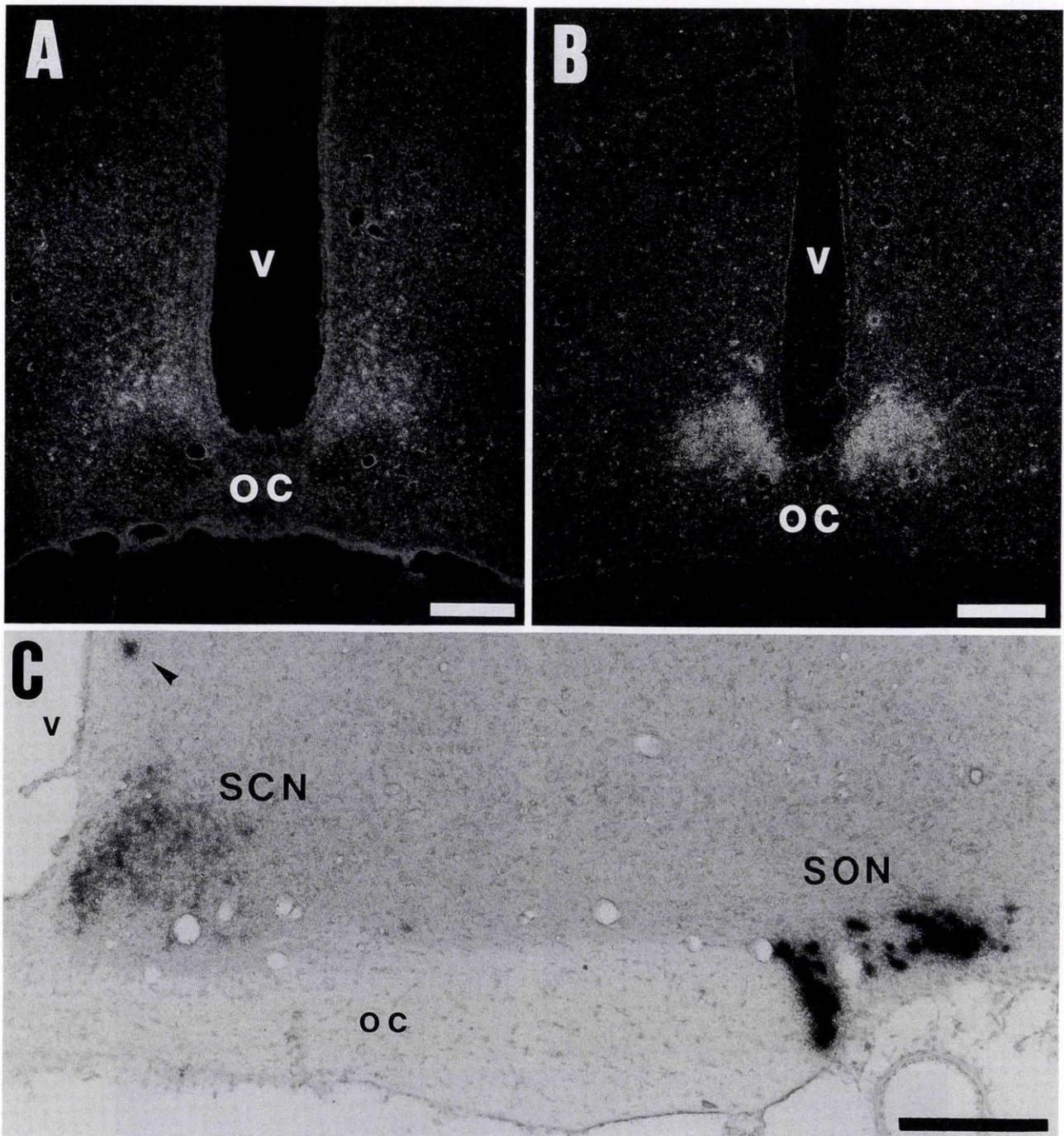


図4 AADC mRNA (A) および vasopressin mRNA (B, C) の in situ hybridization.

(A), (B)は隣接切片の暗視野像, (C)は(B)と同一切片のクレシルエヒト紫で対比染色を施した明視野像. 視交叉上核 (SCN) においては中等度のシグナル強度を示す. Vasopressin mRNA が背内側部に分布する. 視索上核 (SON) および第3脳室周囲に散在する大細胞性ニューロン (矢印) にはさらに強いシグナルが認められる. v: 第3脳室, oc: 視交叉, バーは 200 μm

lase 免疫陽性細胞は視交叉上核には認められない. また, セロトニン合成の律速酵素であり, 第1段階の酵素である tryptophan hydroxylase の免疫陽性細胞も認められていない³⁵⁾. これらの事実は, 視交叉上核に存在する AADC 含有ニューロンは古典的なモノアミンニューロンではない非アミン性ニューロンであることを示唆する. しかし, この非アミン性 AADC ニューロンに関して

は, Jaeger ら¹⁹⁾の免疫組織学的検索しかなく, その生化学的な性質については現在も未知である. 我々は今回初めて, northern blot hybridization でこの視床下部に存在する非アミン性ニューロンの AADC mRNA が黒質ドパーミンニューロン内の AADC mRNA と同一であることを示唆する所見を得た. さらに, 黒質ドパーミンニューロン内の AADC mRNA に特異的に hybridize す

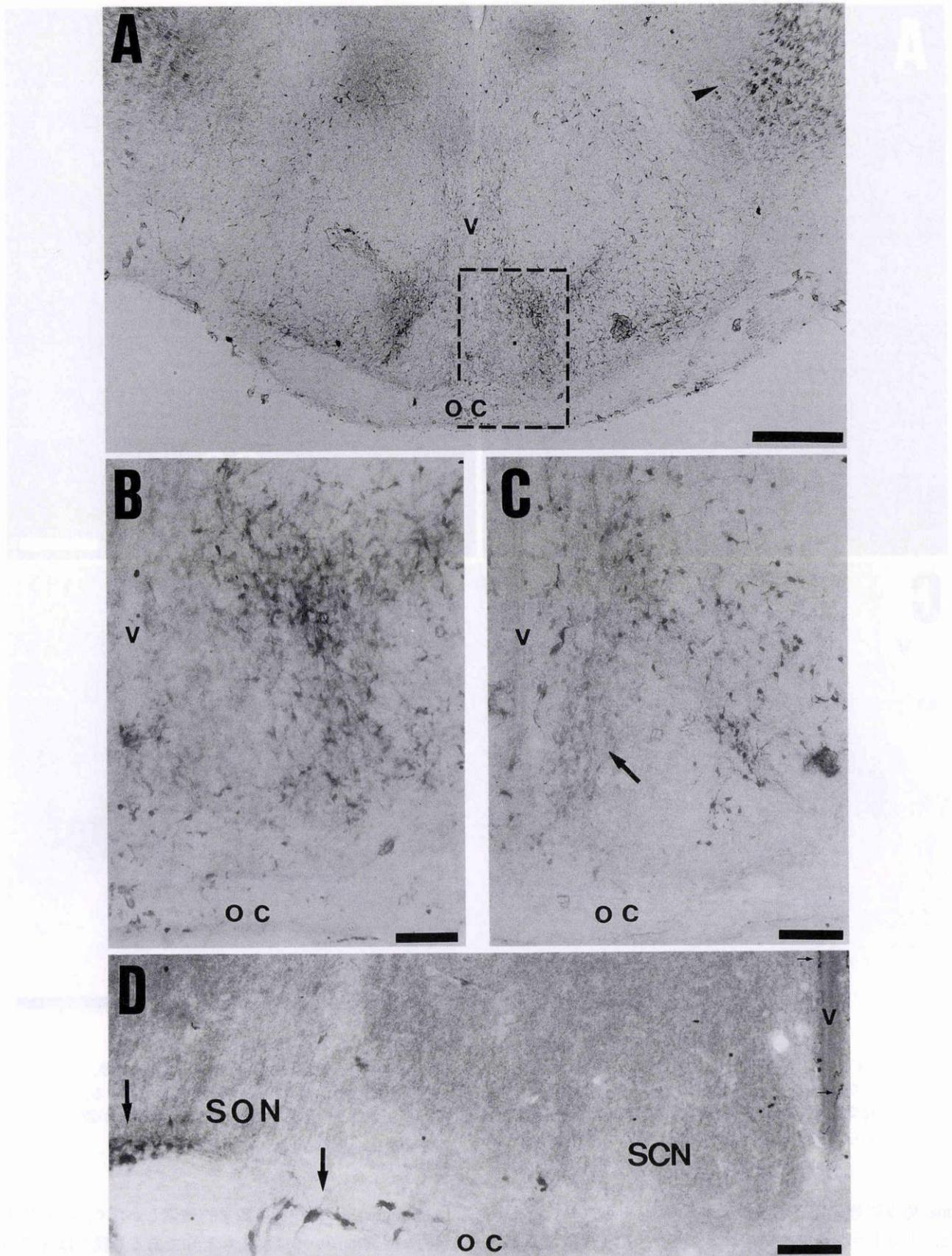


図5 AADC免疫陽性ニューロン(A, B, C)とvasopressin免疫陽性ニューロン(D)の個体発生。胎生18日(A, B)において、すでにAADC免疫活性は黒質線条体路(図Aの矢じり)の線維のみではなく、視交叉上核背外側部の細胞に強く発現している。出生後3日においては(C)、背内側部の細胞にも免疫活性の発現が認められる(矢印)。胎生18日におけるvasopressin免疫活性は(D)、視索上核(SON)および視交叉(oc)内の細胞体および第3脳室周囲の線維(矢印)のみに認められ、視交叉上核(SCN)には発現していない。v: 第3脳室、バーは100 μ m

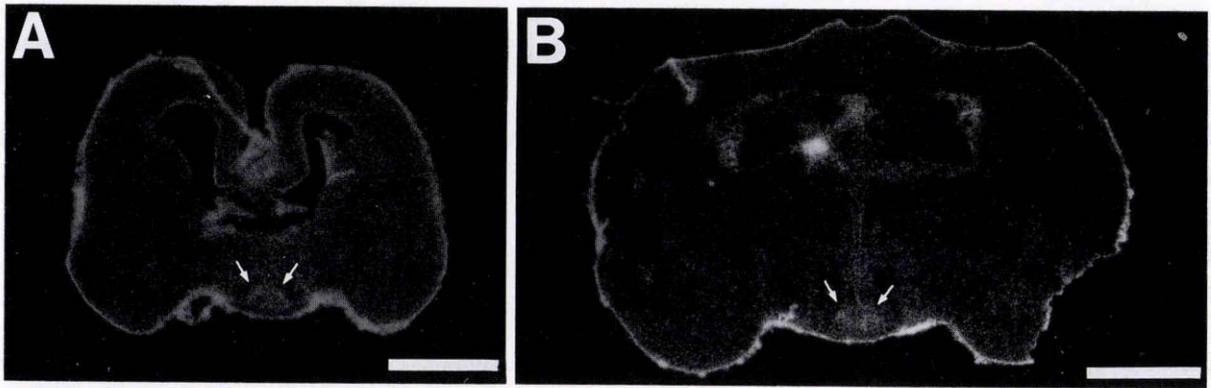


図6 フィルムオートグラフィー像で示した *in situ hybridization* による AADC mRNA の視交叉上核における個体発生。

胎生 18 日 (A) では背外側部に強い発現を認め (A, 矢印), 出生後 1 日においては背内側部にも陽性反応が拡大する (B, 矢印). バーは 2 mm

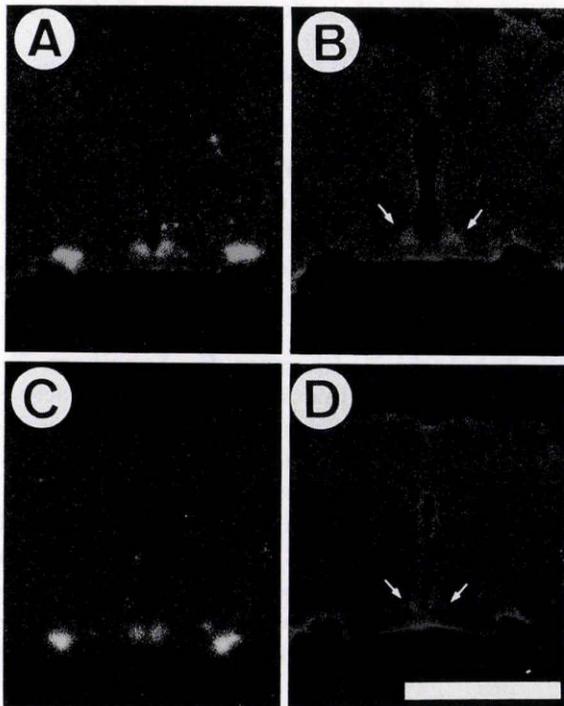


図7 Vasopressin mRNA (A, C) および AADC mRNA (B, D 矢印) の昼夜変動。

AADC mRNA および vasopressin mRNA のシグナルは昼期 (A, B) には暗期 (C, D) に比べ強く認められる。バーは 2 mm

るプローブを用いて、視交叉上核に存在する非アミン性 AADC ニューロンが発現する AADC mRNA を形態学的に検出できた。しかも、これら mRNA の分布は AADC の免疫活性と同一パターンを示していた。以上の結果は、ドーパミンニューロン内の AADC と非アミン性ニューロン内の AADC が免疫活性および mRNA において同一物質であることを強く示唆するものである。

では、このような非アミン性ニューロンに含まれる AADC はどのような物質の産生に関与しているのだろうか。一つには脳内において、脱炭酸されることによ

り微量産生される微量アミン (trace amine) 類の産生に関わっている可能性が想定される。Zhu ら³⁶⁾は、ドーパミンニューロン内で AADC がカテコールアミン代謝経路とは別に phenylalanine を直接脱炭酸することにより 2-phenylethylamine (PE) を生み出すことを線条体で報告した。この産生された PE は線条体においてドーパミン D1, D2 受容体の活性を変化させることによりドーパミン活性を調節していると報告している。現在までのところ、このような微量アミンの検索は視交叉上核ではなされていない。もし、AADC が微量アミン類を産生するならば、生じた PE などが視交叉上核に比較的多く認められる D1 受容体を介して³⁷⁾、リズム産生機構に何らかの影響を与えている可能性は十分に考えられる。

また、それ以外の可能性として、外因性の L-dopa などの hydroxylated amine の取り込みによるドーパミン産生の可能性も想定されている³⁸⁾³⁹⁾。すなわち、末梢の AADC 含有細胞で指摘されているような、amine precursor uptake and decarboxylation theory⁴⁰⁾が中枢神経系の非アミン性 AADC ニューロンにおいても適用できるのではないかという可能性である。しかし、実際に脳内において生理的にこのような現象が起こっているかは現在のところ不明である。

また、以前から vasopressin が視交叉上核背内側部のニューロンに含有されていることが明らかにされており、事実、Jaeger ら⁴¹⁾は vasopressin が AADC の一部のニューロンと共存することを報告している。我々は今回、特異性が高く、また、高感度の二重蛍光免疫組織化学法を用い、約 70% の AADC ニューロンが vasopressin を含むことを証明した。Vasopressin の視交叉上核内での産生分泌が光非依存性の日内変動を示す現象と考え合わせると、この両者の高率な共存関係は、AADC の酵素活性にも日内変動の存在を想起させる。今回実際に、*in situ hybridization* を用いた X 線フィルムオートラジオグラフィにより視交叉上核の AADC mRNA の日内変動

を明暗条件下で検索すると, vasopressin mRNA の昼夜変動に一致した明期に高く, 暗期に低いという AADC mRNA の変動が認められた。ただし, この解析による AADC mRNA のシグナル変化が, 背内側部での vasopressin と共存している AADC ニューロン内の mRNA の変化をとらえているのか, もしくは, 共存しない AADC ニューロン内の変化をとらえているのかは判断できない。将来, 写真乳剤を用いたオートラジオグラフィによる各細胞レベルでの解析により明らかになるであろう。一般に AADC はアミン合成の律速酵素ではないため, 酵素活性の調節については, 従来はあまり注目されてこなかった。しかし, 最近では, 網膜のアマクリン細胞における, 明暗変化に対する短時間ドーパミン合成の調節は, 律速酵素である tyrosine hydroxylase を介さず, AADC の酵素活性により調節されることが明らかになった⁴²⁾。今回の我々の AADC mRNA の昼夜変動の検出は, AADC 酵素活性の調節が網膜における短時間調節と同様な機構により視交叉上核でも行われている可能性も示唆している。

また, AADC の個体発生を検索すると, 胎仔視交叉上核で, ¹⁴C 標識 deoxyglucose の取り込みのサーカディアンリズムの出現する時期⁴³⁾にはほぼ一致して AADC 免疫活性および mRNA の発現が認められることは注目される。AADC に比し, vasopressin の免疫活性および mRNA の発現は非常に遅れ, 生後にしか検出されない。AADC は胎生期において胎生期のサーカディアンリズムの発振や, 母親から放出される同調因子の受容体として注目されている D1 ドーパミン受容体を介して³⁴⁾、前述の機構により活性が調節され, 胎生期のサーカディアンリズムに関与しているのかも知れない。今後, サーカディアンリズムと AADC との関わりをさらに探求することにより明らかにされるであろう。

稿を終えるにあたり, 御指導と御校閲を賜りました京都府立医科大学第二解剖学教室井端泰彦教授, 岡村 均助教授, 同眼科学教室木下 茂教授に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Lydic R, Alber HE, Tepper B, Moore MC: Three dimensional structure of the mammalian suprachiasmatic nuclei. A comparative study of five species. *J Comp Neurol* 204: 225-237, 1982.
- 2) Stephan FK, Zucker I: Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc Natl Acad Sci USA* 69: 1583-1586, 1972.
- 3) Moore RY, Eichler VB: Loss of circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res* 42: 201-206, 1972.
- 4) Ibuka N, Kawamura H: Loss of a circadian sleep-wakefulness cycle in rat by suprachiasmatic nucleus lesion. *Brain Res* 42: 201-206, 1972.
- 5) Inouye SIT, Kawamura H: Persistence of circadian rhythmicity in a hypothalamic "island" containing the suprachiasmatic nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 5962-5966, 1979.
- 6) Sawaki Y, Nihonmatsu I, Kawamura H: Transplantation of the neonatal suprachiasmatic nuclei into rats with complete bilateral suprachiasmatic lesions. *Neurosci Res* 1: 67-72, 1984.
- 7) Van den Pol AN: The hypothalamic suprachiasmatic nucleus of rat: Intrinsic anatomy. *J Comp Neurol* 191: 661-702, 1980.
- 8) Okamura H, Takahashi Y, Terubayashi H, Hamada S, Yanaihara N, Ibata Y: VIP-like immunoreactive neurons and retinal projections in the rat suprachiasmatic nucleus. *Biomed Res* 8: 253-262, 1987.
- 9) Hendrikson AE, Wagoner N, Cowan WM: An autoradiographic and electron microscopic study of retino-hypothalamic connections. *Z Zellforsch Mikroskop Anat* 135: 1-26, 1972.
- 10) Moore RY, Lenn NJ: A retino-hypothalamic projection in the rat. *J Comp Neurol* 146: 206-210, 1972.
- 11) Ibata Y, Takahashi Y, Okamura H, Kawakami F, Terubayashi H, Kubo T, et al: Vasoactive intestinal peptide (VIP)-like immunoreactive neurons located in the rat suprachiasmatic nucleus receive a direct retinal projection. *Neurosci Lett* 98: 1-5, 1989.
- 12) Takahashi Y, Okamura H, Yanaihara N, Hamada S, Fujita S, Ibata Y: Vasoactive intestinal peptide immunoreactive neurons in the suprachiasmatic nucleus demonstrate diurnal variation. *Brain Res* 497: 374-377, 1989.
- 13) Okamoto S, Okamura H, Miyake M, Takahashi Y, Takagi S, Akagi Y, et al: A diurnal variation of vasoactive intestinal peptide (VIP) mRNA under a daily light-dark cycle in the rat suprachiasmatic nucleus. *Histochemistry* 95: 525-528, 1991.
- 14) Vandesande F, Dierckx K, De Mey J: Identification of the vasopressin-neurophysin producing neurons of the rat suprachiasmatic nuclei. *Cell Tissue Res* 156: 377-380, 1975.
- 15) Schwartz WJ, Reppert SM: Neural regulation of the circadian vasopressin rhythm in cerebrospinal fluid: A pre-eminent role for the suprachiasmatic nuclei. *J Neurosci* 5: 2771-2778, 1985.
- 16) Uhr GR, Reppert SM: Suprachiasmatic nucleus vasopressin messenger RNA: Circadian variation in normal and Brattleboro rats. *Science* 232: 390-394, 1986.
- 17) Tominaga K, Shinohara K, Otori Y, Fukuhara C, Inouye SIT: Circadian rhythms of vasopressin content in the suprachiasmatic nucleus of the rat. *Neuro Report* 3: 809-812, 1992.
- 18) Okamura H, Inatomi T, Kanemasa K, Nagatsu I, Inouye SIT, Ibata Y: Topography of chemi-

- cally characterized neurons in the suprachiasmatic nucleus. *Bio Systems* (in press).
- 19) **Jaeger CB, Ruggiero DA, Albert VR, Joh TH, Reis DJ**: Immunocytochemical localization of aromatic L-amino acid decarboxylase. *Handbook of Chemical Neuroanatomy*, Elsevier, Amsterdam, 387-408, 1984.
 - 20) **Okamura H, Fukui K, Koyama E, Tsuto HLO, Tsuto T, Terubayashi H, et al**: Time of vasopressin neuron origin in mouse hypothalamus; examination by combined technique of immunocytochemistry and [³H] thymidine autoradiography. *Dev Brain Res* 9: 223-226, 1983.
 - 21) **Okamura H, Kitahama K, Raynaud B, Borri-Valtattorni C, Nagatsu I, Weber M**: Immunocytochemistry of aromatic-L-amino acid decarboxylase in the rat preoptic area and anterior hypothalamus, with special reference to tyrosine hydroxylase immunocytochemistry. *Biogenic Amines* 7: 351-361, 1990.
 - 22) **Moji M, Kojima K, Nagatsu T**: Detection of inactive or less active forms of tyrosine hydroxylase in human adrenals by sandwich enzyme immunoassay. *Anal Biochem* 138: 125-132, 1984.
 - 23) **Schmale H, Heinsohn S, Richter D**: Structural organization of the rat gene for the arginine vasopressin-neurophysin precursor. *EMBO J* 2: 763-767, 1983.
 - 24) **Tanaka T, Horio Y, Taketoshi M, Imamura I, Yamamoto MA, Kangawa K, et al**: Molecular cloning and sequencing of a cDNA of rat dopa decarboxylase. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 8142-8146, 1989.
 - 25) **Okamura H, Abitbol M, Julien JF, Dumas S, Berod A, Geffard M, et al**: Neuron containing messenger RNA encoding glutamic acid decarboxylase (GAD) in rat hypothalamus demonstrated by *in situ* hybridization, with special emphasis on cell groups in medial preoptic area and dorsomedial hypothalamic nucleus. *Neuroscience* 39: 675-699, 1990.
 - 26) **Simmons DM, Arriza JL, Swanson LW**: A complete protocol for *in situ* hybridization of messenger RNAs in brain and other tissues with radio-labeled single-stranded RNA probes. *J Histochem* 12: 169-181, 1989.
 - 27) **Schwartz WJ, Davidsen L, Smith C**: *In vivo* metabolic activity of a putative circadian oscillator, the suprachiasmatic nucleus. *J Comp Neurol* 189: 157-167, 1980.
 - 28) **Green DJ, Gillette R**: Circadian rhythm of firing rate recorded from single units in the rat suprachiasmatic brain slice. *Brain Res* 245: 198-200, 1982.
 - 29) **Tominaga K, Inouye ST, Okamura H**: Organotypic slice culture of the rat suprachiasmatic nucleus: Sustainment of cellular architecture and circadian rhythm. *Neuroscience*, (in press).
 - 30) **Ralph MR, Foster RG, Davis FC, Menaker M**: Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science* 247: 975-978, 1990.
 - 31) **Rowland JM, Potter DE, Reiter RJ**: Circadian rhythm in intraocular pressure. *Curr Eye Res* 1: 169-173, 1981.
 - 32) 吉富健志, 木内良明, 森 直幹, Gregory DS, 山田英智: 眼内の日内変動と自律神経の役割. *眼科* 35: 239-247, 1993.
 - 33) **Gregory DS, Avido D, Sears ML**: Cervical ganglionectomy alters the circadian rhythm of intraocular pressure in New Zealand White rabbits. *Curr Eye Res* 12: 1273-1279, 1985.
 - 34) **Borri-Valtattorni C, Minella C, Vecchini P**: Purification and characterization of K-3, 4-dihydroxy-phenylalanine decarboxylase from pig kidney. *Eur J Biochem* 93: 181-188, 1979.
 - 35) **Weissmann D, Belin MF, Aguera M, Meunier C, Maitre M, Cash CD, et al**: Immunohistochemistry of tryptophan hydroxylase in the rat brain. *Neuroscience* 23: 291-304, 1987.
 - 36) **Zhu MY, Juorio AV, Paterson IA, Boulton AA**: Regulation of aromatic L-amino acid decarboxylase by dopamine receptors in the rat brain. *J Neurochem* 58: 636-641, 1992.
 - 37) **Weaver DR, Rivkees SA, Reppert SM**: D1-dopamine receptors activate c-fos expression in the fetal suprachiasmatic nuclei. *Proc Natl Acad Sci* 89: 9201-9204, 1992.
 - 38) **Butcher LL, Engel J, Fuxe K**: Behavioral, biochemical, and histochemical analysis of the central effects of monoamine precursors after peripheral decarboxylase inhibition. *Brain Res* 41: 387-411, 1972.
 - 39) **Lidbrink P, Jonsson G, Fuxe K**: Selective reserpine-resistant accumulation of catecholamine in central dopamine neurons after dopa administration. *Brain Res* 67: 439-456, 1974.
 - 40) **Pearse AGE**: The cytochemistry and ultrastructure of polypeptide hormone producing cells of the APUD series and the embryologic and pathologic implications of the concept. *J Histochem Cytochem* 17: 303-313, 1963.
 - 41) **Jaeger CB, Albert VR, Joh TH, Reis DJ**: Aromatic L-amino acid decarboxylase in the rat brain: Coexistence with vasopressin in small neurons of the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res* 276: 362-366, 1983.
 - 42) **Rossetti ZL, Silvia CP, Krajnc D, Neff NH, Hadjiconstantinou M**: Aromatic L-amino acid decarboxylase is modulated by D1 dopamine receptors in rat retina. *J Neurochem* 54: 787-791, 1990.
 - 43) **Reppert SM, Schwartz WJ**: The suprachiasmatic nuclei of the fetal rat: Characterization of a functional circadian clock using ¹⁴C-labeled deoxyglucose. *J Neurosci* 4: 1677-1682, 1984.