

平成 22 年 5 月 28 日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2007 ～ 2009

課題番号：19380166

研究課題名 (和文) 動脈性化学受容器における二酸化炭素受容機構の解明

研究課題名 (英文) Mechanism for CO<sub>2</sub> perception in the arterial chemoreceptors.

研究代表者

山本 欣郎 (YAMAMOTO YOSHIO)

岩手大学・農学部・教授

研究者番号：10252123

研究成果の概要 (和文)：動脈性化学受容器である頸動脈小体や大動脈小体は低酸素に加えて二酸化炭素を受容することが知られている。本研究では、ラットに高二酸化炭素暴露、低酸素暴露、高二酸化炭素・低酸素同時暴露実験を行い、頸動脈小体の化学受容細胞における二酸化炭素受容機構を分子発現の面から検討した。その結果、高二酸化炭素暴露群では発現変化する分子が少ないこと、二酸化炭素によって低酸素で発現増強する遺伝子は増強開始時間が遅延することがわかった。

研究成果の概要 (英文)：Arterial chemoreceptors, carotid and aortic bodies, sense arterial CO<sub>2</sub> as well as low oxygen. In the present study, rats exposed to hypercapnia, hypoxia and hypercapnic-hypoxia in order to analyze hypercapnic modulation of molecular expression in the carotid body. As a result, alteration of molecular expression in rats exposed hypercapnia shows lower effect than hypoxia. Furthermore, carbon dioxide delay the expression of some molecules that increased by hypoxia.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,400,000	2,220,000	9,620,000
2008年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2009年度	2,800,000	840,000	3,640,000
年度			
年度			
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：①生体分子, ②マイクロアレイ, ③生理学, ④シグナル伝達, ⑤獣医学

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 頸動脈小体化学受容細胞は二酸化炭素刺激において細胞膜電位を生成するカリウムチャンネルに直接働きかけることから細胞が脱分極すると考えるイオンチャンネル説によって細胞興奮に至ると報告されている。この説によれば細胞膜のカリウム電流を抑制するのは二酸化炭素分子そのものではなく炭酸脱水素酵素により分解されて生じた水素イオンであるとされるが、その本態は不明である。

(2) 二酸化炭素ガス分子の直接作用があるか否かは全く解っていない。低酸素時には、ミトコンドリアの呼吸鎖に作用しミトコンドリア電位の変化が細胞膜に波及して細胞膜電位が興奮状態になるという代謝説が存在するが、二酸化炭素が細胞内の代謝を変化させることによって化学受容細胞が興奮するという代謝説に類似した学説は存在しない。

## 2. 研究の目的

(1) 頸動脈小体化学受容細胞に存在する細胞膜チャンネル、細胞内信号伝達経路に関わる分子に注目し、頸動脈小体組織や生体に二酸化炭素刺激をした際に変動する mRNA を網羅的に検索する。

(2) マイクロアレイ解析、及び既知の二酸化炭素受容分子および低酸素受容分子が頸動脈小体内に存在するか否か、存在する場合にはその局在を免疫組織化学的に検討する。

(3) 頸動脈小体化学受容細胞で二酸化炭素刺激によって発現変化する遺伝子群について、刺激の種類や刺激後の経過時間によってどの様に発現量が変わるかをリアルタイム

RT-PCR によって解析する。さらに、遺伝子の転写産物であるタンパク分子を免疫組織化学法によって組織内局在を検討するとともに、染色強度の変化を観察する。

(4) 当初の計画ではカルシウムイメージングによる機能解析、遺伝子をノックダウンした際の機能変化に関しても明らかにする予定であった。しかしながら、実験進行に伴い、二酸化炭素による遺伝子の反応が予想以上に鈍いことがわかり予想通りの結果を得ることができず計画を変更した。実験計画には低酸素暴露による遺伝子発現変化の検討と、低酸素暴露に対する二酸化炭素暴露の影響を加えることとした。

## 3. 研究の方法

(1) 二酸化炭素および低酸素暴露による遺伝子変動の網羅的解析

ラットを4群に分けて無処置コントロールの他 10% CO<sub>2</sub>, 10% O<sub>2</sub>, 10%CO<sub>2</sub>-10%O<sub>2</sub> のガス環境に6時間暴露群を用意した。暴露後にラットから頸動脈小体を採取し、磁気ビーズ法で total RNA を抽出し、アジレント社マイクロアナライザにより抽出精度の良いものを選択してマイクロアレイに用いた。マイクロアレイは2回増幅法によってラベルし、2色法により検出を行った。

(2) 二酸化炭素受容関連分子、低酸素受容関連分子の局在

材料には Wistar ラット (8-10 週齢オス) を用いた。上行大動脈から Zamboni 液による還流固定を行い、頸動脈分岐部を採取した。組織はコンパウンド包埋を行い 8-10 μm の凍結切片を作製した。組織切片は内向き整流性カリウムチャンネル、two pore domain カリウムチャンネル等の高二酸化炭素反応分子、tyrosine

hydroxylase 等の環境ガスに反応性を示すと考えられる分子に対する抗体を用いて間接蛍光抗体法によって染色した。

(3) 生体への二酸化炭素および二酸化炭素暴露による特定分子の変動

ラットを3群に分けて 10% CO<sub>2</sub>, 10% O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>-10%O<sub>2</sub> のガス環境に 0-24 時間暴露群した。暴露後にラットから頸動脈小体を採取し、磁気ビーズ法で total RNA を抽出した。これらの RNA 中に含まれる carbonic anhydrase アイソザイム, tyrosine hydroxylase, vascular endothelial growth factor の mRNA 量を SYBR green を検出試薬とし、StepOne (ABI 社)を用いて、リアルタイム RT-PCR 法によって定量し、ガスの違いによる発現変化の影響及び経時変化を解析した。また、酵素タンパクの発現変化は免疫組織化学によって半定量した。

#### 4. 研究成果

(1) 二酸化炭素および低酸素暴露による遺伝子変動の解析

高二酸化炭素暴露, 低酸素暴露および低酸素と高二酸化炭素の同時暴露によって発現変化を示す分子の網羅的解析を行った結果、様々な分子の発現変化が観察された。それらの内、頸動脈小体において二酸化炭素受容時に重要な働きを示すと考えられている H<sup>+</sup>の

細胞内濃度を調節している NHE や CA などのサブタイプの一部, そしてドーパミンに関連する分子群に変化が認められた (表 1)。しかしながら, 高二酸化炭素暴露単独で発現変動する遺伝子の数は低酸素暴露で発現変動が観察される遺伝子に比べて少ないことがわかった。

(2) ラット頸動脈小体における内向き整流性カリウムチャネルの分布

内向き整流性カリウムチャネルは H<sup>+</sup>感受性を有しており, 二酸化炭素受容の際にカリウム電流を変化させて化学受容細胞を脱分極に導いている可能性がある。本研究では, ラット頸動脈小体と舌咽神経遠位神経節における内向き整流性カリウムチャネルサブユニット (Kir1.1, Kir2.3, Kir4.1, Kir4.2, Kir5.1) の分布を検索した。免疫組織化学的検索によって, 頸動脈小体主細胞には Kir4.1 および Kir5.1 陽性反応が認められた (図 1)。また, Kir1.1, Kir4.1, Kir5.1 陽性神経線維が観察された。頸動脈小体主細胞の Kir4.1 および Kir5.1 はヘテロダイマーを形成して酸受容に関わっている可能性がある。これらのチャネルは延髄化学受容野の化学受容細胞においても発現していることがわかった。

図 1. 頸動脈小体における Kir4.1 および Kir5.1 の局在。

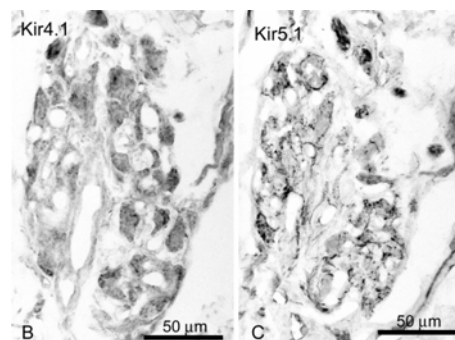


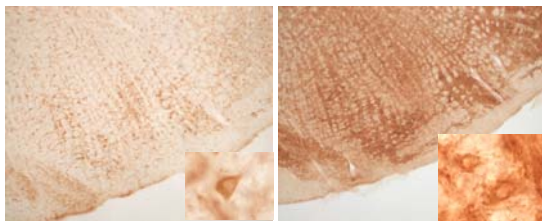
表 1. DNA マイクロアレイの結果の一部。

Gene title	Fold		
	10%CO <sub>2</sub>	10%O <sub>2</sub>	10%CO <sub>2</sub> · 10%O <sub>2</sub>
CA2	1.6	3.4	1.9
CA9	1.7	3.7	0.7
CA11	3.9	1.7	1.0
NHE1	2.7	4.6	1.7
NHE2	4.9	0.9	1.0
TH	37.5	120.8	26.8
DBH	1.1	16.8	7.7
DR2	8.7	7.8	5.0
DR4	1.7	4.4	1.2

### (3) ラットの延髄における TASK-1 および TASK-3 の免疫組織化学的検索

TASK-1 および TASK-3 は two pore domain  $K^+$ チャンネルであり、頸動脈小体主細胞に存在することは既に報告した。そこで、TASK-1 と TASK-3 の延髄の酸感受性細胞でも発現するかを検索した。その結果、TASK-1 と TASK-3 の分布は異なり、TASK-1 は主に神経細胞に、TASK-3 は主にニューロピルに分布することがわかった(図 2)。この成績は、先立って論文で発表した頸動脈小体主細胞における TASK-1 および TASK-3 の分布に類似するもので、二酸化炭素受容細胞において広範に同チャンネルが分布することがわかった。

図 2. 延髄における TASK-1(左)および TASK-3 (右) の局在。



### (4) ラット頸動脈小体に発現する二酸化炭素・低酸素受容関連分子

マイクロアレイ法の成績により、短時間の環境ガス濃度変化によって反応する分子である tyrosine hydroxylase や dopamine beta-hydroxylase の分布を免疫組織化学的に検討し、主細胞に局在することを確認した。

頸動脈小体における頸動脈小体の他に知覚神経節における two pore domain カリウムチャンネルのうち、低酸素に反応性を示す可能性がある TREK-1, TREK-2, TRAAK が、三叉神経節では小型の神経細胞に特異的に発現していることがわかった。

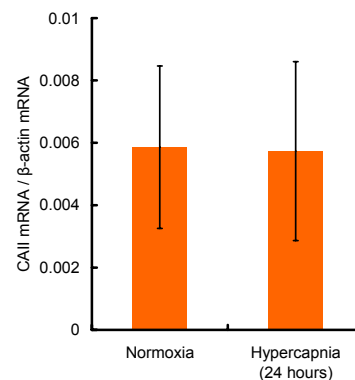
低酸素の暴露状況は中枢化学受容野を含む中枢神経内で eythropoietin の発現増強を引

き起こしていることを確認した。

### (5) 高 $CO_2$ 刺激によるラット頸動脈小体における炭酸脱水素酵素 mRNA の発現変化

炭酸脱水素酵素 (CA) は  $CO_2$  から  $H^+$  を生成し、この反応が頸動脈小体での  $CO_2$  受容に関与していると考えられている。頸動脈小体における CA アイソザイム I-IV の発現と高  $CO_2$  刺激による mRNA の発現変化を調べた。RT-PCR で頸動脈小体において CAI は弱い発現を、CAII と CAIII は強い発現を示したが CAIV に関しては発現がみられなかった。さらに、免疫組織化学によって、頸動脈小体の化学受容細胞における CAII と CAIII の陽性反応が認められた。しかし、 $CO_2$  刺激しても mRNA の発現増強は確認されなかった。CA は定常状態においても、 $H^+$  生成反応に十分量の発現を有すると考えられる。

図 3. 高二酸化炭素暴露による CAII mRNA の発現変化。

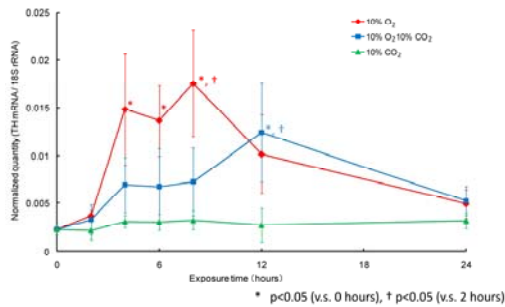


### (6) 短時間の低酸素・高二酸化炭素・低酸素と高二酸化炭素の同時暴露による TH および VEGF mRNA の発現変化

TH mRNA は 10%  $O_2$  暴露群で発現増強し、無暴露コントロールの発現量に比較して 6 時間では約 8 倍、12 時間では約 5 倍、24 時間では約 2.5 倍の発現を示した(図 4)。10%  $O_2$ ・10%  $CO_2$  暴露群では 12 時間で最も強い発現増

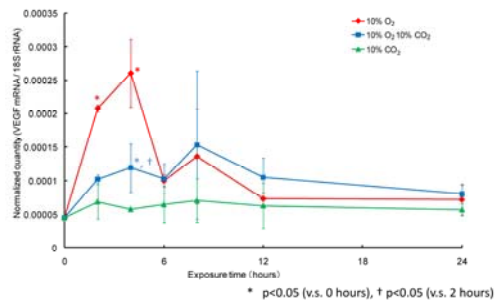
強が認められ、コントロールに比較して約5倍の発現量を示した。10%CO<sub>2</sub>暴露群ではTH mRNAの発現増強は認められなかった。

図4. 環境ガスの変化によるTHmRNAの発現変化



VEGF mRNAにおいても10%O<sub>2</sub>暴露群の2, 4時間および10%O<sub>2</sub>・10%CO<sub>2</sub>暴露群の4時間発現増強が認められたが、10%CO<sub>2</sub>暴露群では発現増強は認められなかった(図5)。

図5. 環境ガスの変化によるTHmRNAの発現変化

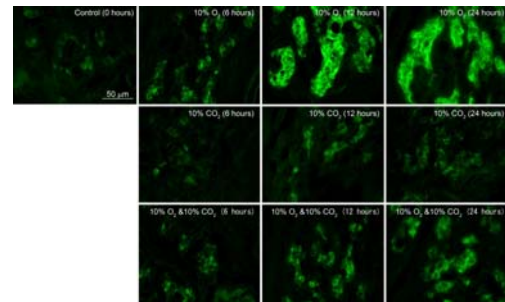


以上の結果から、二酸化炭素は低酸素暴露によるTH mRNAの発現増強を抑制する働きがあると考えられた。これらのことから、高二酸化炭素暴露ではTHが合成するドーパミンによる頸動脈小体の興奮抑制作用がないばかりでなく、低酸素によるドーパミン合成作用も抑制あるいは遅延させる可能性が高い。

(7) 短時間の低酸素・高二酸化炭素暴露・低酸素と高二酸化炭素の同時暴露によるタンパク発現量の変化

主細胞におけるTH陽性反応の蛍光強度は、低酸素群ではコントロール群と比較して暴露後6時間では変化は認められなかったが、12時間および24時間で約1.4倍に増強した。低酸素と高二酸化炭素の同時暴露群では、主細胞における蛍光強度は6時間では変化が認められなかったが、12時間では約1.2倍、24時間では約1.4倍に増強した。また、高二酸化炭素暴露群による主細胞におけるTH陽性反応の蛍光強度はほとんど変化が認められなかった。以上のことから、二酸化炭素は単独では頸動脈小体主細胞におけるTHタンパクの発現に影響を与えないが、低酸素暴露による発現増強を抑制あるいは遅延する作用を持つことが示唆された。

図6. 頸動脈小体におけるTH免疫陽性反応の変化



## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

①Kato K., Yamaguchi-Yamada, M. and Yamamoto Y. (2010)

Short-term hypoxia increases tyrosine hydroxylase immunoreactivity in rat carotid body. *Histochemistry and Cell Biology*, in press (査読あり)

② Yamamoto, Y., Hatakeyama, T. and Taniguchi, K. (2009)

Immunohistochemical colocalization of TREK-1, TREK-2 and TRAAK with TRP channels in the trigeminal ganglion cells. *Neurosci. Lett.* 454: 129-133. (査読あり)

③ Yamamoto, Y., Ishikawa, R., Omoe, K. and Taniguchi, K. (2008)

Expression of inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels in the carotid body of rat. *Histol. Histopathol.* 23: 799-806. (査読あり)

[学会発表] (計9件)

① 若井淳, 山田美鈴, 山本欣郎 (2010) 低酸素および高二酸化炭素暴露によるラット頸動脈小体における tyrosine hydroxylase の免疫組織化学的变化. 第149回日本獣医学会学術集会, (3月28日, 日本獣医生命科学大学, 東京).

② 加藤弘毅, 山田美鈴, 山本欣郎 (2010) 低酸素暴露によるラット頸動脈小体におけるドーパミン-β-水酸化酵素の発現増強. 第115回日本解剖学会総会・全国学術集会 (3月28日, 岩手県民会館, 盛岡).

③ 若井淳, 木崎景一郎, 山田美鈴, 山本欣郎 (2009) 低酸素暴露によるラット頸動脈小体の低酸素適応関連分子の初期発現変化と二酸化炭素の影響. 第148回日本獣医学会学術集会, (9月25日, 鳥取市民会館, 鳥取).

④ 山田美鈴, 若井淳, 山本欣郎 (2009) ラット中枢神経系における低酸素刺激によるエリスロポイエチン-mRNA 発現亢進. 第148回日本獣医学会学術集会, (9月25日, 鳥取市民会館, 鳥取).

⑤ Wakai, J., Yamaguchi-Yamada, M., Yamamoto, Y. (2009) Carbon dioxide suppresses hypoxia-enhanced expression of TH and VEGF mRNA in the rat carotid body. 6th Congress of the International Society for Autonomic Neuroscience (9月4日, Sydney, Australia).

⑥ Yamada, M., Yamamoto, Y., Wakai, J., Kato, K. (2009) Altered expression of erythropoietin mRNA in the central nervous system of hypoxic

rats. 36th International Congress of Physiological Sciences, August (8月1日, Kyoto, Japan).

⑦ 若井淳, 加藤弘毅, 木崎景一郎, 山田美鈴, 山本欣郎 (2009) 低酸素および高二酸化炭素暴露によるラット頸動脈小体の vascular endothelial growth factor および tyrosine hydroxylase mRNA の発現変化. 第147回日本獣医学会学術集会, (4月3日, 栃木県総合文化センター, 宇都宮).

⑧ 山田美鈴, 若井淳, 加藤弘毅, 山本欣郎 (2008) 低酸素刺激によるラット中枢神経系でのエリスロポイエチン-mRNA発現変化. 第146回日本獣医学会学術集会, (9月24日, ワールドコンベンションセンター・サミット, 宮崎).

⑨ 若井淳, 山田美鈴, 西田利穂, 山本欣郎 (2008) 高CO<sub>2</sub>刺激によるラット頸動脈小体における炭酸脱水素酵素 mRNA の発現変化. 第145回日本獣医学会学術集会, (3月30日, 麻布大学, 相模原)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山本 欣郎 (YAMAMOTO YOSHIO)  
岩手大学・農学部・教授  
研究者番号：10252123

### (2) 研究分担者

木崎 景一郎 (KIZAKI KEIICHIRO)  
岩手大学・農学部・准教授  
研究者番号：40337994

吉崎 克明 (YOSHIZAKI KATSUAKI)  
秋田大学・医学部・教授  
研究者番号：90108936  
(H19：研究分担者)

山田 美鈴 (YAMAGUCHI-YAMADA MISUZU)  
岩手大学・農学部・准教授  
研究者番号：10414012  
(H20～H21：研究分担者)