

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 2 5 年 5 月 3 0 日現在

機関番号：6 3 9 0 5

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：2 3 6 5 9 1 1 8

研究課題名（和文） 視索上核低浸透圧センサー同定によるバソプレッシン分泌抑制メカニズムの解明

研究課題名（英文） Elucidation of hypotonicity-induced suppression mechanism of vasopressin secretion through identification of hypoosmolarity sensor

研究代表者

岡田 泰伸（OKADA YASUNOBU）

生理学研究所・所長

研究者番号：1 0 0 2 5 6 6 1

研究成果の概要（和文）：アルギニンバソプレッシン（AVP）は、これを産成する AVP ニューロンから体液浸透圧依存的に分泌される。低浸透圧時には、AVP ニューロンに発現する膜伸展不活性化カチオンチャネル（SIC）の不活性化と、周囲の細胞膨張したグリアから放出されたタウリンによる AVP ニューロンのグリシンレセプター（GlyR）活性化との両方によってもたらされる過分極が AVP 分泌を抑制するというのが現在の教科書的学説であるが、今回、AVP ニューロンに SIC 活性は見られず、放出タウリンによる GlyR 活性化はむしろ脱分極をもたらすこと、低浸透圧センサーはタウリン放出をもたらすアニオンチャネルであることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Arginine-vasopressin (AVP), an antidiuretic hormone, is secreted from AVP neurons in a manner sensitive to body fluid osmolarity. The current view for the hypotonicity-induced suppression mechanism consists of following two hypotheses: Reduced depolarization due to inactivation of stretch-inactivated cation channel (SIC) in osmotically swollen AVP neurons, and increased hyperpolarization due to glycine receptor (GlyR) activation in AVP neurons in response to taurine released from osmotically swollen glial cells. In rat AVP neurons, in the present study, the SIC activity was not observed, and taurine-induced activation of GlyR brought about depolarization but not hyperpolarization under hypotonic conditions. Also, the present study showed that taurine-releasing anion channel activated by cell swelling serves as a sensor for hypoosmolarity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：浸透圧センサー、バソプレッシン視索上核、アニオンチャネル、タウリン、グリシンレセプター

## 1. 研究開始当初の背景

アルギニンバソプレッシン（AVP）は体液の浸透圧の調整に主役を果たす抗利尿ホルモンである。AVP は視床下部の視索上核（SON）と室傍核（PVN）に存在する AVP ニューロンで産成され、その投射先の下垂体後葉の軸索終末から体液浸透圧依存的に分泌（エキソサ

イトーシス）される。この分泌は、AVP ニューロンの脱分極による電位作動性 Na<sup>+</sup>チャネル（Nav）や Ca<sup>2+</sup>チャネル（Cav）の開口によってもたらされる。AVP は正常な等浸透圧条件においてもたえず少量分泌されていて、高浸透圧になるに従って分泌量が増えるのに対し、低浸透圧条件下では分泌が抑制される。

そのメカニズムとしては、まず第1に等(～高)浸透圧時には開いている Stretch-Inactivated cation Channel (SIC) が低浸透圧時の細胞膨張性膜ストレッチで閉じることによってこのチャンネル開口による AVP ニューロンの脱分極が失われることによるとする Bourque らの「SIC 不活性化仮説」(Oilet & Bourque 1993 Nature; Voisin et al. 2002 TINS)と、第2に低浸透圧時に AVP ニューロン近傍のアストロサイトが細胞膨張時に活性化されるアニオンチャンネル Volume-Sensitive Outwardly Rectifying anion channel (VSOR) を介してタウリンを放出し、そのタウリンが AVP ニューロンのグリシンレセプターアニオンチャンネル (GlyR) を活性化して(Cl<sup>-</sup>流入による)過分極をもたらすとする Hussey らの「タウリン過分極刺激仮説」(Hussey et al. 2000 Prog Neurobiol)の両者が教科書的通説となっている。しかし、第1の SIC 不活性化仮説を示すデータについては、私達を含めて世界の多くの研究室で追試されたが再現されていない。また、第2のタウリン過分極刺激仮説に対しては、最近、上田らが AVP ニューロンでは GABA による GABA<sub>A</sub> レセプターアニオンチャンネル (GABA<sub>A</sub>R) の活性化が抑制性の過分極応答ではなく興奮性の脱分極応答をもたらすことを明らかにした (Haam et al. 2012 J Neurosci) ので、GlyR 活性化も脱分極応答をもたらす可能性が提起され、再検討が必要となっている。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、SON における低浸透圧センサーを同定し、低浸透圧時のバソプレシン分泌の抑制メカニズムを解明することである。そのために、まず第1に AVP ニューロンにおいて Bourque らの「SIC 不活性化仮説」が成立するかどうかを検討する。その具体的内容としては、SON から単離した AVP ニューロンに SIC が機能的に発現しているのかどうか、Bourque が SIC の分子実体として提唱した TRPV1 のカプサイシン非感受性ヴァリアントが本当に関与するのかどうか、の2点を調べることである。第2に Hussey らの「タウリン過分極刺激仮説」が AVP ニューロンにおいて成立するかどうかを検討する。その具体的内容としては、SON から単離したアストロサイトからタウリンが低浸透圧刺激時に実際に放出されるかどうか、その経路は VSOR によって与えられるのかどうか、タウリンは GlyR 刺激を介して AVP ニューロンを過分極させるのかどうか、タウリンは AVP ニューロンの興奮性を抑制するのかどうか、の3点を調べることである。そして、第3にこれらの結果を総合して、SON における低浸透圧センサーは何かを明らかにする。

## 3. 研究の方法

実験には、連携研究者の上田より提供を受けた AVP-eGFP-TG ラットの SON 領野より分離採取した AVP ニューロンとアストロサイトを供した。AVP ニューロンの同定は、GFP 蛍光発現によって行った。細胞内電位測定は、ナスタチン、又はグラミシジンによる穿孔パッチ電流固定実験によって行った。電流測定は、通常のパッチクランプ全細胞電流記録法によって行った。タウリン放出の測定は nano-UPLC Q-TOF 質量分析法によって行った。TRPV1 遺伝子発現の確認には、SON 領野スライス標本に対する RT-PCR 法と、AVP ニューロンよりパッチピペットで吸引採取した細胞質標本に対する RT-PCR 法を適用した。

## 4. 研究成果

(1) AVP ニューロンには SIC 活性が確認されない

SIC は高浸透圧条件下で細胞が縮小化して細胞膜の進展度が減少した時により多く開口する非選択性カチオンチャンネルであるが、図1に示すように、AVP ニューロンにおいてはその存在が確認されなかった。即ち、細胞内外から Cl<sup>-</sup>を取り除いて Cl<sup>-</sup>チャンネル電流の発生を抑え、細胞外に Ni を 3 mM 加えて Ca<sup>2+</sup>チャンネル電流の発生を抑えた状態で、パッチクランプ全細胞電流記録をしたところ、AVP ニューロンは等浸透圧時に外向整流性の電流を示し、この電流は高浸透圧条件下でも変化しなかった。なお、このカチオン電流はカプサイシン受容体アンタゴニストのカプサゼピンによって抑制されるので、主として TRPV1 電流であると考えられた。

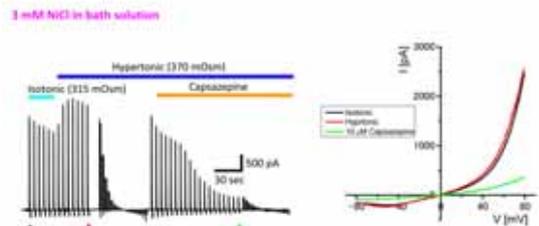


図1 AVPニューロンにおける等/高浸透圧条件下でのカプサイシン感受性カチオンチャンネル電流

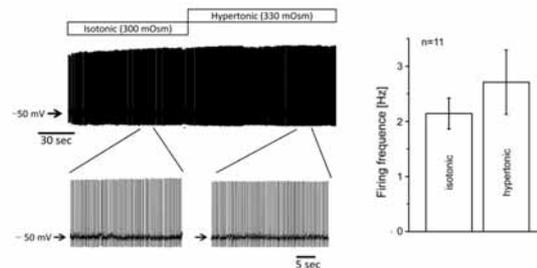


図2 AVPニューロンにおける等/高浸透圧条件下での自発的興奮性

AVP ニューロンの興奮性を、ナスタチン穿孔パッチ電流固定法で観察したところ、図2に示すように、その発火頻度は、高浸透圧

によって大きく影響を受けず、「SIC 活性増による発火頻度増」という Bourque らの結果を再現することはできなかった。

(2) AVP ニューロンにおけるカプサイシン感受性 TRPV1 の発現

Bourque らは、SON ニューロンにはカプサイシン結合領域を持った TRPV1 は発現していないこと、そのかわりにカプサイシン結合領域がカプサイシン非感受性の TRPV4 当該領域に置き換わったカプサイシン非感受性 TRPV1 ヴァリエントが発現している、これが SIC の分子実体であると主張した (Naeini et al. 2006 Nature Neurosci)。しかし、私達の電気生理実験結果 (図 1) は、カプサイシン感受性を示す正常の TRPV1 が発現している可能性を示唆している。そこで、TRPV1 カプサイシン結合領域に対する RT-PCR を行ったところ、図 3 に示すように、この遺伝子が SON 領野のみならず、その中に存在する AVP ニューロンにも発現していることが明らかになった。

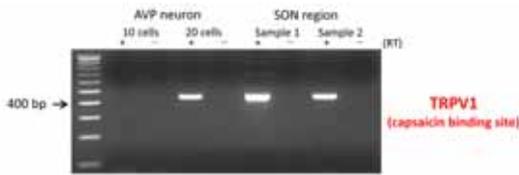


図3 AVPニューロンおよびSON領野におけるカプサイシン感受性 TRPV1遺伝子の発現のRT-PCRによる確認

(3) SON 領野アストロサイトからの低浸透圧応答性タウリン放出

SON 領野から単離・培養したアストロサイトに低浸透圧刺激を与えたところ、図 4 に示すように、実際にタウリンが放出されることが明らかとなった。このタウリン放出は、テタヌス毒素で影響を受けないが、VSOR ブロッカーである DCPiB で抑制を受けるところから、エキソサイトーシスによってではなく VSOR アニオンチャネルを介して放出されることが示唆された。

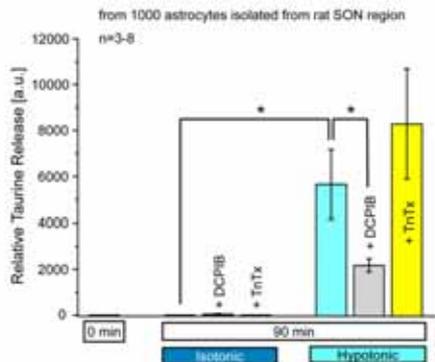


図4 SON領野アストロサイトからの低浸透圧条件下におけるタウリンの放出とそのVSORブロッカー感受性

(4) タウリンに対する AVP ニューロンの脱分極応答

細胞内 Cl<sup>-</sup> 濃度を正常のまま維持した上でタウリンによる AVP ニューロン膜電位変化を測定するために、グラミシジン穿孔パッチ電流固定法を適用したところ、図 5 に示すように、低浸透圧刺激そのものは静止膜電位レベルに変化をもたらさないが、タウリンによって (過分極ではなく) 著しい脱分極が引き起こされることが明らかになった。この脱分極応答は、GlyR アンタゴニストであるストリキニンで消失したので、タウリンは GlyR を刺激していることが示唆された。

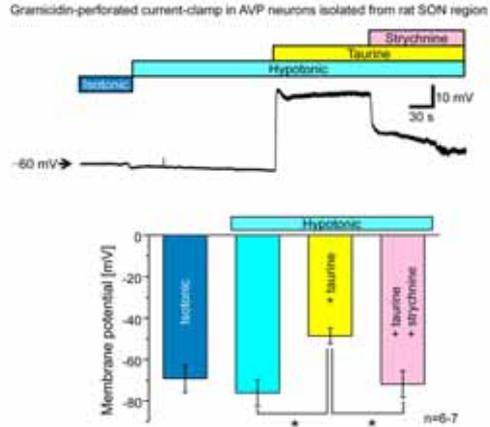


図5 AVPニューロンのタウリンに対する脱分極応答とそのストリキニン感受性

(5) タウリンの GlyR 刺激による AVP ニューロンの興奮性の抑制

細胞内の Cl<sup>-</sup> 濃度を正常濃度に近い 41 mM に (ピペット内液を介して) 保った上で、ナイスチン穿孔パッチ電流固定法によって AVP ニューロンの自発的興奮性を観察したところ、図 6 に示すように、等浸透圧下でも低浸透圧下でも発火頻度に差は見られなかった。このデータはまた、等浸透圧条件下で活性化されている SIC が低浸透圧条件下での細胞膨張による膜伸展によって不活性化されて興奮性を抑制するという「SIC 不活性化仮説」が成立しないことを更に裏付けている。

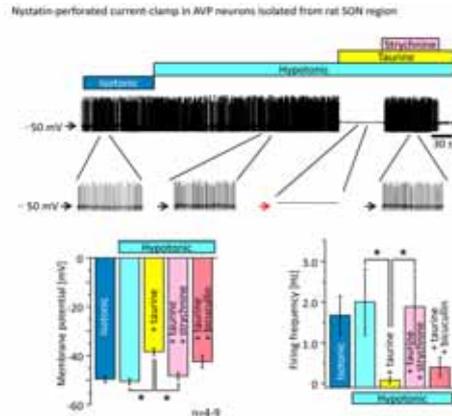


図6 AVPニューロンにおける等/低浸透圧条件下での自発的興奮性とそのタウリン感受性

図6はまた、この自発的興奮性は、タウリン投与によって完全に抑制され、その抑制は(GABA<sub>A</sub>R ブロッカーであるピキュキュリンではなく)GlyR ブロッカーのストリキニンで完全にキャンセルされることを示している。即ち、タウリンによる GlyR 刺激は、過分極ではなく脱分極をもたらすにも拘わらず、AVP ニューロンの興奮性を阻止する役割を果たすことが明らかとなった。

これらの今回の結果は、教科書的通説となっている SIC 不活性化説とタウリン過分極刺激説のいずれもが正しいものではないことを示している。また今回の結果は、SOC における AVP 分泌の調節に關する低浸透圧センサーは、AVP ニューロンの SIC ではなく、アストロサイトのタウリン透過性の VSOR であることを示している。

#### 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)

- (1) R.Z. Sabirov, R.S. Kurbannazarova, N.R. Melanova, Y. Okada (2013) Volume-sensitive anion channels mediate osmosensitive glutathione release from rat thymocytes. *PLoS One* 8(1), e55646, 査読有  
DOI: 10.1371/journal.pone.0055646
- (2) Y. Ando-Akatsuka, T. Shimizu, T. Numata & Y. Okada (2012) Involvements of the ABC protein ABCF2 and  $\alpha$ -actinin-4 in regulation of cell volume and anion channels in human epithelial cells. *Journal of Cellular Physiology* 227, 3498-3510, 査読有  
DOI: 10.1002/jcp.24050
- (3) K. Sato, T. Numata, T. Saito, Y. Ueta & Y. Okada (2011) V2 receptor-mediated autocrine role of somatodendritic release of AVP in rat vasopressin neurons under hypo-osmotic conditions. *Science Signaling* 4 (157), ra5, 査読有  
DOI: 10.1126/scisignal.2001279

[学会発表](計4件)

- (1) K. Sato-Numata, Y. Ueta, Y. Okada (2013) Study on the hypoosmolarity sensing mechanism in arginine-vasopressin neurons: Reexamination on the taurine hypothesis. 第90回日本生理学会大会、2013年3月28日、東京
- (2) Y. Okada (2012) Multiple activation and regulation mechanisms of the

- volume-sensitive outwardly rectifying anion channel. 2012 International Ion Channel Conference "The New World of Anion and Cation Channels"(招待講演)、Jeju Island (Korea)、2012年08月24日
- (3) T. Ohbuchi, K. Sato, Y. Okada, H. Suzuki, Y. Ueta (2012) Acid-sensing ion channels in body fluid homeostasis. 第89回日本生理学会大会、2012年3月30日、松本
  - (4) K. Sato, T. Numata, T. Saito, Y. Ueta, Y. Okada (2011) Volume-regulatory autocrine action of vasopressin released from somato and dendrites in vasopressin neurons is mediated by the V<sub>2</sub> receptor and cAMP. Cell Volume regulation Meeting 2011, September 6, Tübingen, Germany (招待講演)

[図書](計2件)

- (1) 岡田泰伸(編著)(2012) "Patch Clamp Techniques - From Beginning to Advanced Protocols", Springer、総ページ数 439
- (2) 岡田泰伸(編著)(2011) 最新パッチクランプ実験技術法、吉岡書店、総ページ数 274

[その他]

ホームページ等

ホームページ情報:

1. 生理学研究所 HP & 機能協働研究部門  
HP: 公開日 2013.01.31  
抗酸化物質グルタチオンが細胞から放出される「通り道」を発見: Sabirov RZ, Kurbannazarova RS, Melanova NR, Okada Y. Volume-sensitive anion channels mediate osmosensitive glutathione release from rat thymocytes. *PLoS One*, 2013
2. 生理学研究所 HP & 機能協働研究部門  
HP: 公開日 2012.01.24  
細胞容積調節における ABCF2 と  $\alpha$ -アクチニン-4 の分子間相互作用の役割: Ando-Akatsuka Y, Shimizu T, Numata T, Okada Y. Involvements of the ABC protein ABCF2 and  $\alpha$ -actinin-4 in regulation of cell volume and anion channels in human epithelial cells. *J Cell Physiol*, 2012.

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡田 泰伸 (OKADA YASUNOBU)  
生理学研究所・所長  
研究者番号: 10025661

(2)研究分担者

佐藤(沼田)かお理(SATO (NUMATA) KAORI)  
生理学研究所・細胞器官研究系・NIPS リサ  
ーチフェロー  
研究者番号：60614196

(3)連携研究者

上田 陽一(UETA YOICHI)  
産業医科大学・医学部・教授  
研究者番号：10232745