

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：63905

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790229

研究課題名(和文) バソプレシンニューロンに発現する高浸透圧センサーの同定と生理的役割の解明

研究課題名(英文) Identification of the sensor for hypertonicity expressed in AVP neurons and its physiological role

研究代表者

沼田 かのり(佐藤かのり)(Kaori, Sato-Numata)

生理学研究所・細胞器官研究系・研究員

研究者番号：60614196

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：多くの細胞は、高浸透圧刺激により容積が縮小した後、元の大きさに戻るといった調節性容積増加(RVI)能を示すことが知られている。一方、体液の浸透圧調節に重要な役割を担っているアルギニンバソプレシン(AVP)ニューロンは、容積調節能がなく、収縮したままであるというのが現在の教科書の学説である。しかし、今回、AVPニューロンも適切な条件下においては、他の細胞と同様にRVIを示す事、そして、高浸透圧条件下で活性化するカチオンチャネルが高浸透圧センサーとして働き、このRVIをむしろ抑制する役割を果たしていると共に、AVP分泌促進にも関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：It is well known that many types of mammalian cell sense the change of plasma osmolarity and regulate their cell volume to keep cell volume homeostasis under hyperosmolarity. On the other hand, it was reported that osmosensory SON neurons, including arginine-vasopressin (AVP) neurons which are necessary for regulation of body fluid osmolarity, failed to exhibit cell volume regulation under hypeseosmotic conditions. In the present study, in contrast, we find that AVP neurons also have the mechanism of cell volume regulation called regulatory volume increase (RVI). Also, it is suggested that a cation channel activated by hyperosmolarity is involved not only in inhibition of the RVI mechanism but also in the promotion of AVP release from AVP neurons.

研究分野：細胞生理学

キーワード：高浸透圧センサー バソプレシン分泌 容積調節能 バソプレシンニューロン

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) AVP ニューロンによる低浸透圧条件下での容積調節メカニズムの有無

これまで、低浸透圧条件下においてアルギニンバソプレシン(AVP)ニューロンは容積調節メカニズムがないと信じられていた(Zhang et al. 2003, Nature Neurosci)。しかし、研究代表者は、低浸透圧条件下においてAVPニューロンにも容積調節メカニズムがある事を明らかにし、これまでの定説を覆した。さらに、低浸透圧条件下でAVPニューロンの細胞体・樹状突起からのAVP分泌が亢進し、それと同時に同ニューロンの容積感受性外向整流性Cl<sup>-</sup>チャンネル(VSOR)が著しく活性化されることを見出し、この分泌されたAVPがV<sub>2</sub>型AVPレセプター(V<sub>2</sub>R)をオートクリンのように刺激してVSOR活性を更に亢進し、浸透圧性膨張後の容積調節(調節性容積減少: RVD)を促進することを明らかにした(Sato et al. 2011, Science Signaling)。

### (2) 高浸透圧条件下における AVP ニューロンの定説とその問題点

今日、世界中で広く信じられている体液高浸透圧条件下における AVP ニューロンから血中への AVP 放出メカニズムは、Bourque 博士らの説である。その内容は、高浸透圧刺激により AVP ニューロンの細胞容積が縮小すると膜の伸展度が減少し、stretch-inactivated cation channel (SIC)が活性化され、その結果として膜が脱分極して電位作動性Ca<sup>2+</sup>チャンネルを開口させて、エキソサイトーシスの誘導をもたらすというものである(Voisin et al. 2002, Trend Neurosci)。さらに、SIC が TRP チャンネルファミリーメンバーの1つである、TRPV1 チャンネルのカプサイシン非感受性パリアントであると報告している(Naeini et al. 2005, Nature Neurosci)。しかし、他の研究室からはこの説を積極的に支持する論文は発表されておらず、更には研究代表者を含め複数の研究室での実験で、この SIC の存在に否定的な結果が得られていた。

高浸透圧条件下において、動物細胞は容積が縮小した後、元の容積に戻る調節性容積増加(RVI)という容積調節能を示す事が知られている(Hoffmann et al. 2009, Physiol Rev)が、AVP ニューロンにはこの容積調節能がなく、浸透圧性縮小が持続するとの報告があった(Zhang et al. 2003, Nature Neurosci)。しかし、細胞容積の恒常性維持は、多くの細胞が生存する上で非常に重要な要件であり、本当に調節能がないのか疑問が残っていた。

### (3) AVP ニューロンの高浸透圧条件下における研究代表者の予備実験の結果と更なる問題点

AVP ニューロンにおいて、高浸透圧条件下におかれると、浸透圧性細胞縮小の後にそれが持続する現象が確認された。この現象はNa<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>アンチポータ(NHE)、Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>アンチポータ(AE)のブロッカーである amiloride、

DIDS を投与すると、細胞がさらに縮小し(図 1A 参照)、一方、カチオンチャンネルの非特異性ブロッカーであるエコナゾル、フルフェナミン酸 (FFA)、2-APB を投与すると細胞容積が回復する RVI 現象を見出した(図 1B 参照)。

これらの予備実験結果より、AVP ニューロンには高浸透圧条件下においても容積調節能があり、そのメカニズムに NHE や AE やカチオンチャンネルが関与している可能性が示唆された。しかし、高浸透圧条件下で活性化される(SIC とは異なる)カチオンチャンネルの本体は何か?、なぜ高浸透圧刺激による容積縮小後にこれが持続するのか?、その現象に関わる膜タンパク質は何か?、そしてその生理的意義は何か?などの疑問が未解明のままであった。

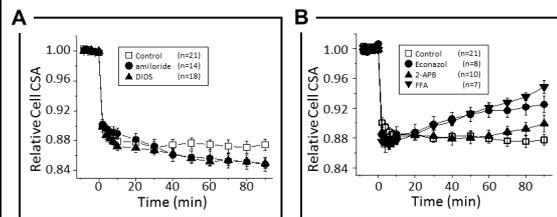


図1 AVPニューロンの高浸透圧刺激応答に対する細胞容積応答へのNHE・AE阻害薬とカチオンチャンネル阻害薬の影響

## 2. 研究の目的

研究代表者は、AVP ニューロンにおいて、低浸透圧条件下では、AVP ニューロンの細胞体・樹状突起からの分泌が亢進された AVP が、同ニューロンにオートクリンのように作用し、浸透圧性膨張後の容積回復を促進する事を最近報告した(Sato et al. 2011, Science Signaling)。一方、高浸透圧条件下では、容積調節機構は欠落しており(Zhang et al. 2003, Nature Neurosci)、その結果持続する細胞容積減によってSICの不活性状態が解除され、その結果生じた脱分極が血中への AVP 分泌を促進させるという報告 (Bourque 2008, Nature Rev Neurosci)が、現在の教科書的通説であった。しかし、研究代表者を含めた複数の研究室でこれらが再現されなかった。本研究では、高浸透圧応答における従来の通説に挑み、AVP ニューロンの新しい高浸透圧センサーチャンネルの同定及び生理的役割を解明する事を目的とした。

## 3. 研究の方法

実験には、産業医科大学の上田陽一博士が開発した AVP-eGFP-TG ラットの視索上核 (SON) 領野を単離した AVP ニューロンを使用した AVP ニューロンは、GFP 発現の有無によって他と区別した。細胞内電位測定、及び自発的発火活動の測定は、ナスタチンによる穿孔パッチ電流固定法を用いて行った。電流測定は、パッチクランプ全細胞電圧固定法を用いて行った。遺伝子発現の確認は、SON 領野のスライス標本に対する RT-PCR 法と、GFP 陽性 AVP ニューロンをパッチピペットで回収した細胞標本に対する RT-PCR 法を適用した。細胞容積の変化は、断面積測定法を

用いて行った。AVPニューロンの細胞体/樹状突起からのAVP分泌量の測定は、ELISA法を適用した。

#### 4. 研究成果

(1)高浸透圧条件下で活性化する安定したカチオン電流を測定する方法の確立

AVPタグGFP発現トランスジェニックラットのSONより急性単離したAVPニューロンを用い、パッチクランプ電圧固定法でカチオン電流を測定する。高浸透圧刺激により活性化されるカチオン電流は予備実験によりwhole-cell法で記録できているが、run-downが激しく安定した記録を取るまでに至っていなかった。そこで、run-downを食い止めてより安定して再現できる条件を、液組成や電圧の刺激強度・時間を変える事により確立すべく実験を行った。その結果、ロイペプチンをピペット液に充填するとrun-downが比較的落ち着き、安定した電流が取れる事がわかり、実験系の確立という点において一定の成果が得られた。

(2)高浸透圧刺激下においてAVPニューロンの容積回復に参与するトランスポータの同定

他の多くの細胞のRVIメカニズムには、NHE、AEが関与している事が報告されている(Lang et al. 1998, *Physiol Rev*)。研究代表者の細胞体断面積測定法を用いた予備実験において、高浸透圧条件下におけるAVPニューロンの断面積は、細胞が縮小した後、それが持続したが、NHEのブロック-DIDS、AEのブロック-amilorideをそれぞれ投与すると、細胞がさらに縮小する結果が得られた(図1A)。しかしながら、AVPニューロンにNHEやAEが発現しているのかについては未だ不明であった。そこで、AVPニューロンが局在しているSONサンプルと、パッチピペットでGFP陽性AVPニューロン20個から吸引して回収した細胞質サンプルを用いてRT-PCRを行った。その結果、AE、NHE共にSON、AVPニューロンに発現していることが明らかになった(図2参照)。これらの結果より、AVPニューロンは、高浸透圧刺激により細胞が収縮した後、見かけ上容積が回復しないように見えるが、実際は、AVPニューロンの膜に発現するAEとNHEが活性化されて容積回復的に働いていることが示唆された。

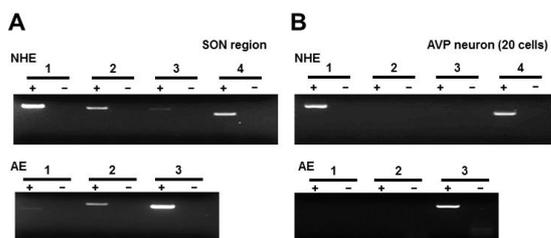


図2 SON領域およびAVPニューロンにおけるNHEとAEの発現のRT-PCRによる確認

(3)高浸透圧刺激下においてAVPニューロンの容積回復を抑制するカチオンチャンネルの

#### 生理的役割

これまでの研究により、非選択性カチオンチャンネルブロッカーを作用させると高浸透圧刺激により縮小した細胞が、元の大きさへ回復している事が明らかになった(図1B)。これらの結果より、AVPニューロンでは高浸透圧性細胞縮小後の容積回復(RVI)を、高浸透圧刺激によって活性化されるカチオンチャンネルが抑制している可能性が示唆された。次にこのカチオンチャンネルがAVP分泌に関与しているのかを調べるために、高浸透圧条件下における細胞体/樹状突起からのAVP分泌量をELISA法により測定した。その結果、カチオンチャンネル阻害薬は、AVP分泌を抑制していることが明らかになった(図3参照)。これらの結果より、高浸透圧条件下においてAVPニューロンの容積回復を抑制するカチオンチャンネルは、AVP分泌を促進することが示唆された。

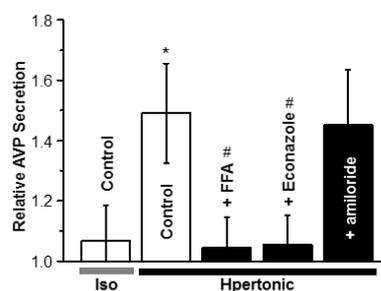


図3 AVPニューロンからの高浸透圧誘起性AVP分泌へのカチオンチャンネル阻害薬とNHE阻害薬の影響

#### 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 5 件)

Kaori Sato-Numata, Tomohiro Numata, Yasunobu Okada, Temperature sensitivity of acid-sensitive outwardly rectifying (ASOR) anion channels in cortical neurons is involved in hypothermic neuroprotection against acidotoxic necrosis, *Channels*, 8 (3), 査読有, (2014), 278-283 (2014)

DOI: 10.4161/chan.27748

Takahiro Shimizu, Takahiro Iehara, Kaori Sato, Takuto Fujii, Hideki Sakai, and Yasunobu Okada, TMEM16F is a component of a  $Ca^{2+}$ -activated  $Cl^{-}$  channel but not a volume-sensitive outwardly-rectifying  $Cl^{-}$  channel, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 査読有, 304, (2013), C748-C759

DOI: 10.1152/ajpcell.00228.2012

Kaori Sato-Numata, Tomohiro Numata, Toshiaki Okada, Yasunobu Okada, Acid-sensitive outwardly rectifying (ASOR) anion channels in human epithelial cells are highly sensitive to

temperature and independent of CIC-3, *Pflügers Archiv- European Journal of Physiology*, 査読有, 465, (2013), 1535-1543  
DOI: 10.1007/s00424-013-1296-y

Katsuya Dezaki, Emi Maeno, Kaori Sato, Tenpei Akita, Yasunobu Okada, Early-phase occurrence of  $K^+$  and  $Cl^-$  efflux in addition to  $Ca^{2+}$  mobilization is a prerequisite to apoptosis in HeLa cells, *Apoptosis*, 査読有, 17, (2012), 821-831  
DOI: 10.1007/s10495-012-0716-3

Tomohiro Numata, Kaori Sato, Jens Christemann, Romy Marx, Yasuo Mori, Yasunobu Okada, The  $\Delta C$  splice-variant of TRPM2 is the hypertonicity-induced cation channel (HICC) in HeLa cells, and the ecto-enzyme CD38 mediates its activation, *The Journal of Physiology (London)*, 査読有, 590, (2012), 1121-1138 (2012)  
DOI: 10.1113/jphysiol.2011.220947

〔学会発表〕(計 5 件)

Kaori Sato-Numata, Tomohiro Numata, Yasunobu Okada, Exploration of temperature sensitivity and new antagonists of acid-sensitive outwardly rectifying anion channel (ASOR), *The Journal of Physiological Sciences*, 64, Supplement1, S117 (2015.3.21-23, 神戸コンベンションセンター (神戸国際会議場・神戸国際展示場), 神戸, 兵庫)

岡田泰伸, 佐藤(沼田)かお理, 細胞容積調節機構と体液浸透圧調節機構の相関的研究, 第 91 回日本生理学会大会, *The Journal of Physiological Sciences*, 63, Supplement1, S66 (2014.3.16-18, 鹿児島大学 郡元キャンパス, 鹿児島, 鹿児島)

Yasunobu Okada, Kaori Sato-Numata, Tomohiro Numata, Frank Wehner, Takahiro Shimizu, Hideki Sakai, Tenpei Akita, Toshiaki Okada, Volume-Regulatory Ion Channels Involved in Cell Survival-Death Switching, Cell Volume Regulation Meeting 2013, (2013.8.26-29, Moscow, Russia)

佐藤(沼田)かお理, 沼田朋大, 岡田泰伸, 細胞外アシドーシスがもたらす脳神経細胞障害へのアニオンチャネルの関与と、それらへの温度変動の影響, 「脳神経情報の階層的研究」と「機能生命科学における揺らぎと決定」の合同シンポジウム 2013 (2013.3.5, 岡崎コンファレンスセンター, 岡崎, 愛知)

Toyoaki Ohbuchi, Kaori Sato, Yasunobu Okada, Hideaki Suzuki, Yoichi Ueta, Acid-sensing ion channels in body fluid homeostasis, 第 89 回日本生理学会大会, *The*

*Journal of Physiological Sciences*, 62, Supplement1, S.50 (2012.3.29-31, 松本総合体育館・信州大学松本キャンパス, 松本, 長野)

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

沼田 かお理 (佐藤 かお理) (Kaori, Sato-Numata)

生理学研究所・細胞器官研究系・研究員

研究者番号 : 60614196

### (2)研究協力者

岡田 泰伸 (OKADA, Yasunobu)

総合研究大学院大学・学長

研究者番号 : 10025661