

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450464

研究課題名(和文) 視床下部視索上核ニューロンの浸透圧感知に関わる分子実体の解析

研究課題名(英文) Analysis of osmoreceptor molecules in the supraoptic nucleus of the hypothalamus

研究代表者

澁谷 泉 (Shibuya, Izumi)

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号：50162649

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：体液浸透圧の恒常性の維持機構は、極めて精巧であり、大量の体液をわずか数%以内の精度で制御している。この制御には体液の浸透圧変化を感知する分子が不可欠であり、中でも中枢性浸透圧感知分子は現時点でもその分子実体が不明であったため、本研究はその解明をめざした。本研究の成果から中枢性浸透圧感知分子は、TRPV1がその関連分子と形成するヘテロテトラマー(異分子による4量体)である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The regulatory mechanism for the body fluid osmolality is known to be precise and enable to control the large volume of the body water at a level of a few percent accuracy. The osmoreceptor is the molecule to sense changes in the body osmolality and the central osmoreceptor has not been elucidated to date. The purpose of the present study was to study the molecular identity of the central osmoreceptor. Our results suggest that the central osmoreceptor may be a heterotetramer comprised of the transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) and its related molecules.

研究分野：獣医生理学

キーワード：浸透圧受容 バゾプレシン 視索上核 パッチクランプ 細胞内Ca²⁺ TRPV1

1. 研究開始当初の背景

(1) 体液浸透圧、ならびに体液量の恒常性の維持機構は、水中から陸に上がって生活する劇的な進化の過程で、地球上の生命体が獲得してきた生命維持に必須な極めて重要な機構である。実際、獣医学領域において重要な位置を占めるほ乳類、鳥類における体液浸透圧、体液量調節機構は極めて精巧であり、全体重の約 70%を占める大量の水を±数%以内の精度で制御している。この制御に最も重要な役割を果たす機構が視床下部下垂体後葉系から分泌される抗利尿ホルモンであるアルギニン-バソプレシン (AVP) とその制御系である。AVP は視床下部の室傍核(PVN)と視索上核(SON)で合成され、下垂体後葉で分泌されて、全身循環へと入る。AVP は腎・集合管の受容体に作用し、水チャネル(AQP) の尿細管上皮細胞・細胞膜への動員を促進することにより、水再吸収促進、体液量保持を起こす。これに加えて、AVP 分泌刺激が生じる状況下においては飲水行動が誘発されることが知られており、これらの一連の過程を統合制御する視床下部の PVN や SON、さらにはその 2 つの神経核にシナプス入力を送る視床下部の部位を一般に「飲水中枢」と呼ぶ。飲水中枢はその本体が不明だけでなく、浸透圧感知機構の分子・細胞レベルでの解明は現時点でもなされていない。体性感覚や視覚、嗅覚、味覚、あるいはグルコース濃度感知などの生命機能維持に重要な感知機構に関与する分子の多くが分子同定されている現在において、生命維持に不可欠な浸透圧感知分子の本体が不明であることは驚くべきことと言わざるを得ない。浸透圧感知分子の解明は、浸透圧変化に対して開口する非選択性陽イオンチャネル (Stretch-inactivated cation channel 以下、SIC チャネル) が SON ニューロン自身に存在するという報告(Oliet&Bourque, Nature 1993)以来、多くの研究室で行われてきたものの、今日までその分子実体の解明は成功していない。

浸透圧感知分子実体に関する唯一の情報、SON ニューロンによる浸透圧感知機構が TRPV1 分子のノックアウトマウスで失われていること(Sharif ら、Nature Neurosci 2006)である。この報告では、TRPV1 の N 端をエピトープとする抗体では、SON ニューロンに免疫陽性がみられなかったことから、浸透圧感知分子(ストレッチ抑制型陽イオンチャネル: SIC チャネル)は TRPV1 分子そのものではなく、TRPV1 分子の N 端が変異した分子であると推測した。我々は、この推測を基に、SIC チャネル分子の実体解明をすべく、TPRV1 の変異分子に関する情報が多いラットで TRPV1 関連分子を SON を含む脳底ブロックから作成した cDNA ライブラリーを用いて RT-PCR

法で解析したところ、これまで報告のある 4 種の変異分子に対する特異的プライマーではいずれも信号の検出ができなかった。しかし、我々は予想外にも、SON において変異のない TRPV1 分子の全長と等しいサイズの信号を検出し、シーケンス解析により、この分子が TRPV1 全長分子そのものであることを見出した。

しかしながら、浸透圧感知分子は TPRV1 だけで構成される分子(TRP 属の分子は 4 量体を形成してイオンチャネル機能を有することが知られる)ではないことはすでに報告されている以下の二つの事実から明らかである。

1)SON ニューロンは TPPV1 アゴニストであるカプサイシンに感受性がない

2)SON ニューロンはストレッチ(低浸透圧刺激など)により抑制されるのに対し、TRPV1 にはそのような性質はない

これらの結果を総合的に考察した結果、我々は浸透圧感知分子が TRPV1 関連分子ではあるが、複数の異なる分子が会合して形成される分子である可能性を想定し、その分子機構の解明をめざすこととした。

(2) 視索上核ニューロンは豊富な G 蛋白共役型受容体 (GPCR) を発現していることが知られるが、その他の多くの中枢神経系ニューロンとは異なり Gi 共役型 GPCR によって開口する内向き整流性 K⁺ (IRK) チャネルに関する報告は皆無である。浸透圧感知分子が非選択性陽イオンチャネルであり、体液浸透圧の変化を直接感知して興奮性を制御するメカニズムであると推定される。このような SON ニューロンにとって GIRK を介したシナプス後電位の調節は極めて重要と考えられる。このような状況から我々は GIRK を制御することが広く知られているだけでなく、SON ニューロンにおいてシナプス後膜に豊富に存在することが報告されている GABA_B 受容体に着目し、GABA_B 受容体アゴニストによる GIRK 電流活性化機構を解析することとした。

2. 研究の目的

本研究では、TRPV1 関連分子による浸透圧感知機構とそれに関わる分子を同定するために、分子生物学的、細胞生理学、電気生理学的手法を用いて詳細な解析を行う。

3. 研究の方法

SON に発現する TRPV1 関連分子を RT-PCR によって解析すると共に関連蛋白の発現を免疫組織化学で証明する。

また、SON ニューロンの浸透圧応答に対して、TRPV1 関連分子に作用することが知られる薬物を作用させて、効果を観察する。浸透圧感知分子の候補分子の同定ができた場合には、HEK293 細胞に発現させて、パッチクランプ法を用いて SIC チャネル電

流を観察して SIC チャンネル分子と同一であることを証明する。

4. 研究成果

<平成 25 年度>

①ラット視索上核 (SON) の組織から cDNA ライブラリーを作成し、詳細な RT-PCR 解析をおこなったところ、SON には全長 TRPV1 の他に N 端変異分子らしき分子が含まれていることが判明した (図 1)。また、N 端変異分子の cDNA 解析の結果、N 端を一部欠く新規分子であることが判明し、TRPV1_SON と命名した。

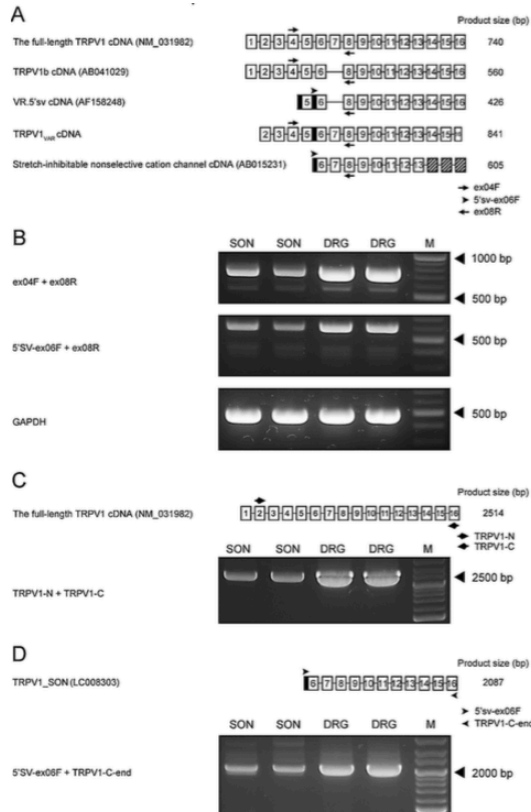


図 1 SON に発現する TRPV1 関連分子

②TRPV1 の N 端を認識する抗体を用いて SON 領域の免疫染色を行ったところ、AVP 陽性細胞と TRPV1 陽性細胞が同一であることが明らかとなった。この結果より、SON 内において AVP ニューロンのみが特異的に TRPV1 を発現することが明らかとなった。

③SON から急性単離ニューロンを得て、細胞内 Ca^{2+} 濃度 (以下 $[Ca^{2+}]_i$) の指示薬である Fura-2 を負荷し、 $[Ca^{2+}]_i$ を測定したところ、生理的な浸透圧変動域である 50 mM のマンニトールにより $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が観察された。しかし、SON ニューロンは TRPV1 アゴニストであるカプサイシンには応答しなかった。一方、マンニトールによる $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は TRPV1 の選択的アンタゴニストであるカプサゼピンや、TRP の非選択的アンタゴニストであるルテニウムレッドで可逆的にブロックされた (図 2, 3)。

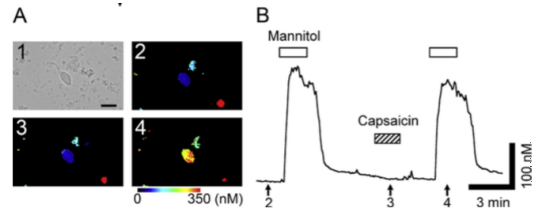


図 2 SON ニューロンの浸透圧による $[Ca^{2+}]_i$ 応答

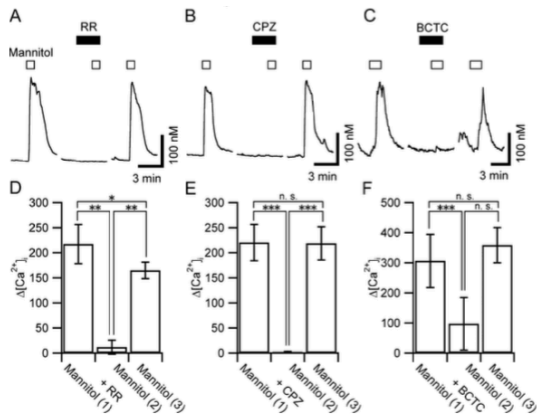


図 3 SON ニューロンの浸透圧に対する $[Ca^{2+}]_i$ 応答への TRPV1 阻害薬の効果

④灌流液の温度を室温から 36°C に上昇させてカプサイシン刺激をしたところ、SON ニューロンはカプサイシン刺激に対して $[Ca^{2+}]_i$ 上昇と活動電位発生頻度増加を示した (図 4)。

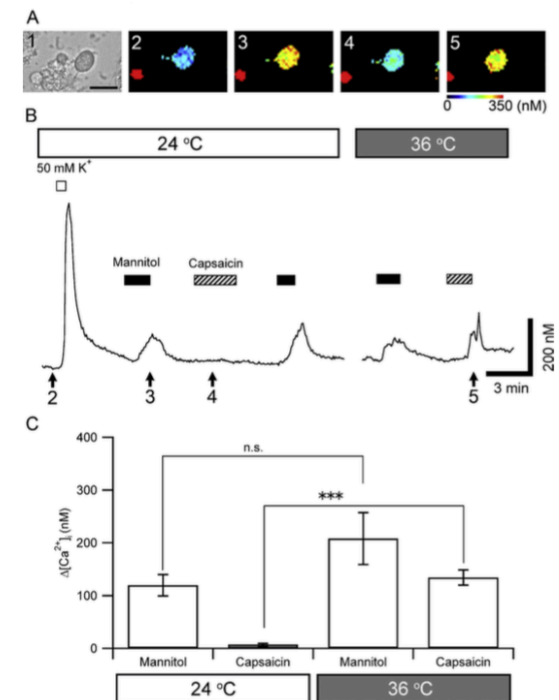


図 4 SON ニューロンのカプサイシン応答への温度上昇の効果

⑤ AVP ニューロンが GFP 蛍光を発する

eGFP-AVP トランスジェニックラットとオキシトシン (OT) ニューロンが RFP 蛍光を発する RFP-OT トランスジェニックラットを用いて、単離 SON ニューロンの $[Ca^{2+}]_i$ を解析したところ、浸透圧刺激による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は AVP ニューロンでのみ観察された (図 5)。

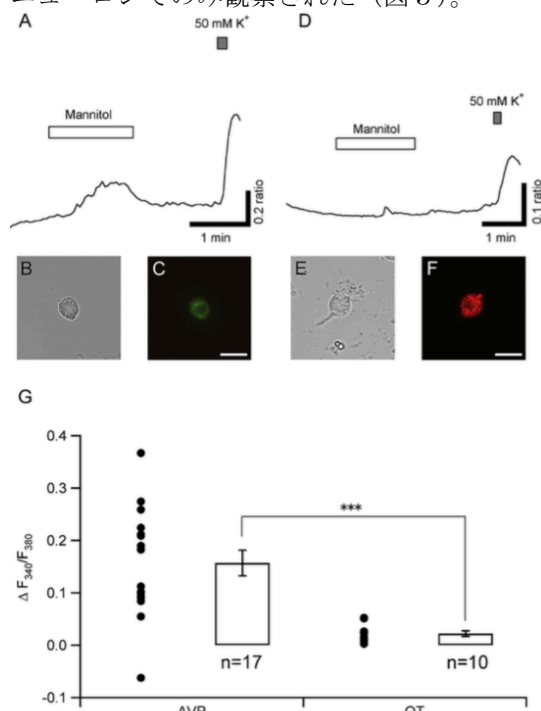


図 5 トランスジェニックラットを用いた浸透圧応答の解析

<平成 26 年度>

①単離 SON ニューロンで 36°C で観察されたカプサイシン誘発電流をパッチクランプ法で解析したところ、電流-電圧関係はほぼ直線であり、逆転電位は約 -46mV であった。この値はすでに報告されている SON ニューロンの浸透圧誘発電流の逆転電位とよく一致していた。

②ラット SON に発現していた TRPV1 分子の塩基配列解析の結果、従来報告されていた TRPV1 の配列と一部異なっていたものの、アミノ酸変位のある相違点は 2 点であり、いずれも機能に大きな影響はない変位と確認された。

③ラット SON から得られた全長 TRPV1 の配列と GFP 配列を含む発現ベクターを作成し、HEK293 細胞に発現させ、GFP 蛍光を指標に TRPV1 発現細胞でのイオン電流解析を行ったところ、安定したカプサイシン応答が観察され、カプサイシン誘発電流の逆転電位は約 0 mV であった。

④SON 組織には GIRK1-4 の 4 種の GIRK が発現していた。また、GABA_B 受容体の選択的アゴニストであるバクロフェンは単離 SON ニューロンに対して GIRK 電流を活性化した。しかしながら、GIRK 電流活性化を生じるバクロフェンの EC50 は膜電位依存性 Ca²⁺チャンネル抑制を生じる EC50 の約 100 倍であり、SON ニュー

ロンは GPCR を介した GIRK 活性化が生じにくいニューロンであることが判明した (図 6)。

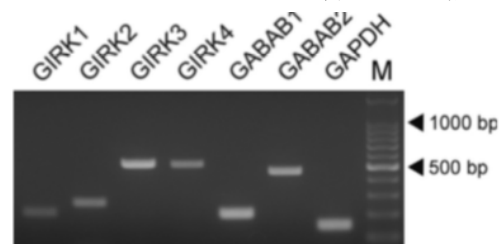


図 6-1 SON における GIRK の発現

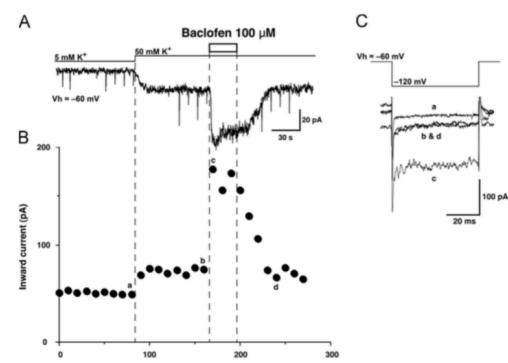


図 6-2 バクロフェンによる SON ニューロンの GIRK 活性化

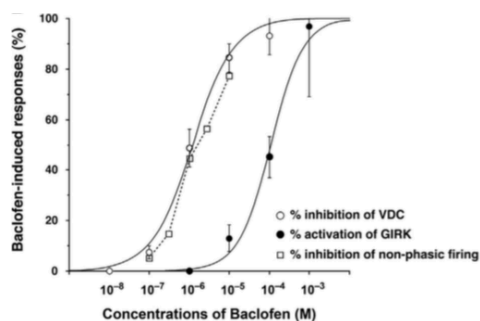


図 6-3 バクロフェンによる GIRK 活性化と膜電位依存性 Ca²⁺電流抑制の相違

<平成 27 年度>

①ラット SON 組織に発現する 2 種の TRPV1 関連分子 (TRPV1, TRPV1_{SON}) をそれぞれ GFP と RFP を含む発現ベクターに組み込み、HEK293 細胞に発現させる系を確立した。

②TRPV1 発現細胞において、カプサイシン、低 pH、40°C 以上の温度刺激によって $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が観察された。加えて、マンニトール 50 mM も $[Ca^{2+}]_i$ を上昇させた。

③TRPV1 発現細胞で観察されたマンニトール刺激に対して生じる $[Ca^{2+}]_i$ 濃度上昇も陽イオン電流もカプサゼピンで可逆的に抑制された。

④TRPV1_{SON} を発現した細胞では、カプサイシン、低 pH、40°C 以上の温度刺激、マンニトールのいずれも $[Ca^{2+}]_i$ 濃度上昇も陽イオン電流応答も生じなかった。さらに灌流液の温

度を 36°C に上昇させても、カプサイシン、マンニトール応用は観察されなかった。

⑤ TRPV1、TRPV1_SON を発現させた HEK293 細胞を用いて、TRPV1 の C 端をエピトープとする抗体による Western ブロットを行ったところ、明瞭な信号が観察された。さらに、細胞をビオチン化してから破碎し、アビジンカラムで回収したサンプル (Surface labeling) を用いた Western ブロットにおいても同様の結果が得られた。

以上の結果から以下の結論を得た。

① SON の AVP ニューロンには TRPV1 と TRPV1_SON の 2 種の分子が発現している。

② TRPV1 はストレッチによって抑制される SIC チャネルの性質を有し、単独で浸透圧感知機能を発現しうる。

③ 浸透圧受容器は TRPV1 を含むヘテロテトラマー分子か、TRPV1 のホモテトラマーだとしても、機能を修飾する他分子と会合した分子である。

④ 新規分子である TRPV1_SON は細胞膜に発現するがカプサイシンにも浸透圧にも反応せず、その機能は不明である。

⑤ SON ニューロンには多種の GIRK チャネルが発現するが、GABA_B 受容体を含む GPCR を介して活性化しにくい細胞内機構が存在する。

5. 主な発表論文等

(研究代表者及び研究分担者は下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

① T. Mashita, H. Kamishina, Y. Nakamoto, Y. Akagi, A. Nakanishi, Y. Harasaki, T. Ozawa, T. Uemura, Y. Kobatake, S. Shimamura, **N. Kitamura**, S. Maeda, Y. Uzuka, J. Yasuda. Combination of Serum Phosphorylated Neurofilament Heavy Subunit and Hyperintensity of Intramedullary T2W on Magnetic Resonance Imaging Provides Better Prognostic Value of Canine Thoracolumbar Intervertebral Disc Herniation. *The Journal of Veterinary Medical Science* **77(4)**: 433–438 (2015.4) 査読有

② K. Takahashi, **N. Kitamura**, Y. Suzuki, Y. Yamanaka, H. Shinohara, **I. Shibuya**. Activation of muscarinic acetylcholine receptors elevates intracellular Ca²⁺ concentrations in accessory lobe neurons of

the chick. *Journal of Comparative*

Physiology A **201**: 385–394 (2015.4) 査読有

③ T. Moriya, R. Shibazaki, T. Kayano, N. Takebuchi, M. Ichimura, **N. Kitamura**, A. Asano, Y. Z. Hosaka, O. Forostyak, A. Verkhatsky, G. Dayanithi, **I. Shibuya**. Full-length transient receptor potential vanilloid 1 channels mediate calcium signals and possibly contribute to osmoreception in vasopressin neurones in the rat supraoptic nucleus. *Cell Calcium* **57(1)**: 25–37 (2015.1) 査読有

④ Y. Yoshida, S. Sugimura, S. Nakano, Q. Gao, **N. Kitamura**, T. Ichiyanagi, T. Aimi, N. Shimomura. Nuclear behavior during basidiospore formation in the edible and medicinal mushroom *Mycoleptodonoides aitchisonii*. *Journal of Electron Microscopy Technology for Medicine and Biology* **28 (1)**: 20–24 (2014.12) 査読有

⑤ N. Harayama, T. Kayano, T. Moriya, **N. Kitamura**, **I. Shibuya**, K. Tanaka-Yamamoto, Y. Uezono, Y. Ueta, T. Sata. Analysis of G-protein-activated inward rectifying K⁺ (GIRK) channel currents upon GABA_B receptor activation in rat supraoptic neurons. *Brain Research* **1591**: 1–13 (2014.11) 査読有

⑥ T. Imada, S. Nakamura, **N. Kitamura**, **I. Shibuya**, K. Tsubota. Oral administration of royal jelly restores tear secretion capacity in rat blink-suppressed dry eye model by modulating lacrimal gland function. *PLoS ONE* **9(9)**: e106338 (2014.9) 査読有

⑦ S. Nakamura, R. Hisamura, S. Shimoda, **I.**

Shibuya, K. Tsubota. Fasting mitigates immediate hypersensitivity: a pivotal role of endogenous D-beta-hydroxybutyrate. *Nutrition and Metabolism* 10:40 (2014.8) 査読有

⑧Y. Suzuki, **N. Kitamura**, Y. Yamanaka, **I. Shibuya**. Voltage-gated Ca²⁺ channels in accessory lobe neurons of the chick. *Journal of Comparative Physiology A* 200(8): 739–748 (2014.8) 査読有

⑨T. Kayano, **N. Kitamura**, S. Miyazaki, T. Ichianagi, N. Shimomura, **I. Shibuya**, T. Aimi. Gymnopilins, a product of a hallucinogenic mushroom, inhibit the nicotinic acetylcholine receptor. *Toxicon* 81: 23–31 (2014.4) 査読有

⑩T. Kayano, **N. Kitamura**, T. Moriya, T. Kuwahara, Y. Komagiri, E. C. Toescu, **I. Shibuya**. Chronic NGF treatment induces somatic hyperexcitability in cultured dorsal root ganglion neurons of the rat. *Biomedical Research* 34(6): 329–342 (2013.12) 査読有

[学会発表] (計 9 件)

①中島純一, 守屋大樹, 柴崎梨奈, **北村直樹**, 浅野淳, 澁谷泉. ラット視索上核ニューロンに発現する中枢性浸透圧感知分子の解明. 第 67 回日本生理学会中国四国地方会, 米子, 米子コンベンションセンター, 2015 年 10 月 25 日

②松下有美, 坂本恵, **北村直樹**, 澁谷泉. 体性感覚ニューロンの capsaicin 応答に対する noradrenaline の抑制作用. 第 67 回日本生理学会中国四国地方会, 米子, 米子コンベンションセンター, 2015 年 10 月 25 日

③中島純一, 守屋大樹, 柴崎梨奈, **北村直樹**, 浅野淳, 澁谷泉. ラット視索上核ニューロンに発現する TRPV1 関連分子の探索及び機能解析. 第 158 回日本獣医学会学術集会, 十和田, 北里大学, 2015 年 9 月 7 日

④松下有美, 坂本恵, **北村直樹**, 澁谷泉. ラット背根神経節ニューロンの capsaicin 応答に対する noradrenaline の抑制作用. 第 158 回日本獣医学会学術集会, 十和田, 北里大学, 2015 年 9 月 7 日

⑤Taiki Moriya, Rina Shibasaki, Tomohiko Kayano, Nami Takebuchi, Momoko Ichimura, **Naoki Kitamura**, **Atsushi Asano**, Yoshinao Z. Hosaka, Oksana Forostyak, Alexej Verkhratsky, Govindan Dayanithi, **Izumi Shibuya**. RT-PCR and Ca²⁺ imaging analyses of osmoreceptor molecules in the rat SON. Neuroscience 2014, ワシントン DC (米国), Walter E. Washington Convention Center, 2014 年 11 月 16 日

⑥萱野智彦, 永見英利香, **北村直樹**, 澁谷泉. 神経成長因子により誘発された感覚ニューロンの異常興奮性への TRPV1 の関与. 第 157 回日本獣医学会学術集会, 札幌, 北海道大学, 2014 年 9 月 9 日

⑦守屋大樹, 柴崎梨奈, 萱野智彦, 竹渕奈美, 市村桃子, **北村直樹**, 浅野淳, 保坂善真, Govindan Dayanithi, 澁谷泉. ラット視索上核ニューロンに発現する TRPV1 の機能解析および浸透圧受容器発現細胞の解析. 第 157 回日本獣医学会学術集会, 札幌, 北海道大学, 2014 年 9 月 9 日

⑧柴崎梨奈, 竹渕奈美, **北村直樹**, 澁谷泉. ラット視索上核ニューロンの浸透圧感知機構への TRPV1 の機能的な関与について. 第 156 回日本獣医学会学術集会, 岐阜, 岐阜大学, 2013 年 9 月 20 日

⑨鈴木夕貴, **北村直樹**, 澁谷泉. 鶏 accessory lobe ニューロンの電位依存性 Ca²⁺チャネル電流. 第 156 回日本獣医学会学術集会, 岐阜, 岐阜大学, 2013 年 9 月 20 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

澁谷 泉 (SHIBUYA, Izumi)
鳥取大学・農学部・教授
研究者番号: 50162649

(2) 研究分担者

北村 直樹 (KITAMURA, Naoki)
鳥取大学・農学部・准教授
研究者番号: 80301951

浅野 淳 (ASANO, Atsushi)
鹿児島大学・共同獣医学部・教授
研究者番号: 90312404