

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18380175

研究課題名（和文） 浸透圧受容、飲水量、体液量調節機構の分子・細胞・行動レベルでの解析

研究課題名（英文） Analysis of the system for osmosensation, drinking, and body fluid regulation at the cellular, molecular and whole-body levels.

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

研究成果の概要：

動物の体液浸透圧・体液量の維持機構において、中心的な役割を果たす「浸透圧受容器」ならびに、「浸透圧受容ニューロン」の性質について分子生物学的、細胞生理学的な解析を行い、①浸透圧受容器として想定されている TRPV1 受容体がバゾプレシンニューロンの細胞体が存在する視索上核(SON)に局在すること②SON ニューロンの細胞体には神経終末に比し遙かに多様な Ca<sup>2+</sup>クリアランス機構が存在すること③SFO ニューロンが GABA、ANP、Galanin の 3 種の抑制性伝達物質により直接抑制されること④NGF 投与が TRPV1 受容体の選択的アゴニストであるカプサイシン感受性の背根神経節（DRG）ニューロンに自発性 Ca<sup>2+</sup>振動を引き起こすことが明らかとなった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	10,300,000	3,090,000	13,390,000
2007 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2008 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
年度			
年度			
総計	15,400,000	4,620,000	20,020,000

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：浸透圧受容、視索上核、脳弓下器官、背根神経節、バゾプレシン、カプサイシン、TRP、NGF

## 1. 研究開始当初の背景

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 60-70% を占める大量の水を ±0.5%

以内で制御している。

## 2. 研究の目的

体液浸透圧・体液量調節機構の維持に最も重要な役割を果たす中枢機構は飲水中枢とそれによって駆動される飲水行動、ならびに視床下部-下垂体後葉系から分泌される抗利尿ホルモンすなわちバゾプレシンとその制御系によって調節される体液調節機構である。

本申請は飲水中枢の本体を解明する目的で、飲水行動に重要な役割を果たしていることが知られる視床下部視索上核 (SON) ならびに脳室周囲器官である脳弓下器官 (SFO) ニューロンに注目し、これらニューロンの細胞・分子レベルの機能解析を行う。この結果と飲水・摂食行動解析の結果を総合的に解析する。

### 3. 研究の方法

本申請採択とほぼ同時期にカナダのグループから視索上核 (SON) ニューロンの浸透圧受容が傷み受容体である TRPV1 のノックアウトマウスで完全に消失することが報告された (Nature Neurosci 9:93-98.)。しかしながら、この論文では浸透圧受容体の分子の特定には至らず、TRPV1 分子そのものではない、N 端が変異した、おそらくは TRPV1 gene の Alternative splicing の産物らしいと結論されるに留まった。現在においてもその分子本体は同定されていない。

これを受けて本実験の実験計画を(1)TRPV1 受容体類似蛋白の SON での探策(2)SON ニューロンの特性の解析(3)SFO ニューロン特性の解析(4)TRPV1 受容体を有する背根神経節 (DRG) ニューロン特性の解析とした。実験動物としてはラットおよびマウスを用い、具体的な手法としては、

①TRPV1 類似蛋白検索は、SON および DRG の組織から既知の TRPV1 分子の配列に対する種々のプライマーを設計し、RT-PCR 法により行った。さらに、TRPV1 分子に対する抗体を用いて免疫組織化学により SON および DRG での蛋白分子検出を試みた。

②ニューロン機能の解析は急性単離ニューロン、あるいは単離の後に短期間培養したニューロンに  $Ca^{2+}$  蛍光指示薬 Fura-2 を負荷して  $Ca^{2+}$  画像解析法を用いて行う、あるいは Whole-cell-patch-clamp 法による電流解析により行った。

### 4. 研究成果

#### (1)TRPV1 受容体類似蛋白の SON での探索

5 種類のプライマーセットを設計し、C 端、N 端、全長をターゲットとした TRPV1 分子の RT-PCR を SON および DRG の組織を用いて行った。その結果、図 1 A,B に示すように SON, DRG の両方で TRPV1 分子のみが検出された。N 端の変異体は検出されなかった。また、N 端の配列をエピトープとする抗体を用いて免疫組織染色を試みたところ、SON, DRG の両方で陽性の信号が検出された (図 2)。しかしながら、単離ニューロンは TRPV1 の選択的リガンドであるカプサイシンには応答しなかった。これらの結果から、SON には TRPV1 分子自身が存在するが、な

んらかの機構によりカプサイシン応答をしない分子として機能している可能性が示唆された。

A:DRG B:SON

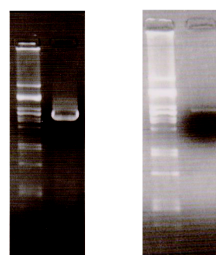


図 1

A:DRG

B:SON

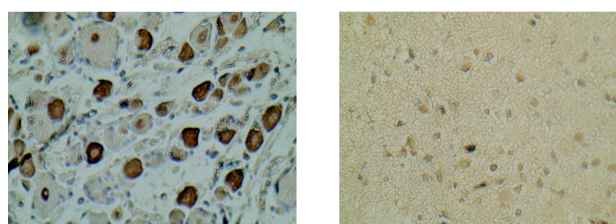


図 2

#### (2)SON ニューロンの特性の解析

SON ニューロンの浸透圧受容体は  $Ca^{2+}$  透過性であることが報告されているが、 $Ca^{2+}$  濃度上昇がどのような機構で処理されるか、すなわち SON ニューロンの  $Ca^{2+}$  クリアランス機構は不明である。本研究では SON ニューロンの細胞内画像解析により、細胞内  $Ca^{2+}$  クリアランス機構を解析した。50mM  $K^+$  の 30 秒間刺激により生じる急激な細胞内  $Ca^{2+}$  濃度上昇の後の回復過程に対して、細胞外の  $Na^+$  濃度低下、細胞膜  $Ca^{2+}$  ポンプ阻害剤である  $La^{3+}$ 、細胞内  $Ca^{2+}$  ストア阻害剤である thapsigargin、リアノジン感受性  $Ca^{2+}$  ストアを枯渇させる Caffeine と ryanodine の同時投与、ミトコンドリアの Uncoupler である CCCP の全てが著明な遅延作用を示した。しかしながら、上記の全ての処置を組み合わせても 50mM  $K^+$  による急激な細胞内  $Ca^{2+}$  濃度上昇の後に有意な  $Ca^{2+}$  濃度の減少が見られた。これらの結果は、SON ニューロンの細胞体における  $Ca^{2+}$  クリアランス機構は少なくとも、細胞膜の  $Na^+/Ca^{2+}$  交換と  $Ca^{2+}$  ポンプ、細胞内  $Ca^{2+}$  ストアの  $Ca^{2+}$  ポンプ、ミトコンドリアの呼吸に共役した  $Ca^{2+}$  取り込みの全て、とそれら以外のなんらかの  $Ca^{2+}$  緩衝機構が存在することが示唆された。さらに、今回判明した機構は、同じニューロンの神経終末における細胞膜  $Ca^{2+}$  ポンプを中心とした  $Ca^{2+}$  クリアランス機構とは大きく異なることが明らかとなった。(図 3)。

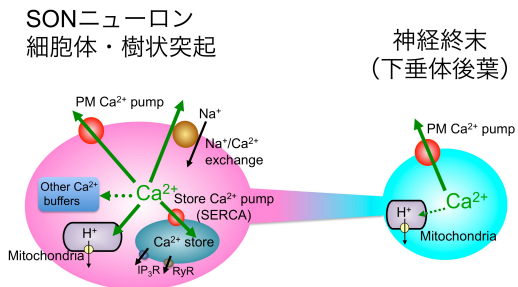


図3

(3) SFO ニューロン特性の解析

SFOは脳室周囲器官の一つであり、特に血液内の物理・化学情報、すなわち血漿浸透圧や血流中のアンジオテンシン II (AII) などのホルモンを感知し、興奮性信号を視床下部の飲水中枢や抗利尿ホルモン産生バゾプレシンニューロンに送ることが知られる部位である。本研究では、急性単離 SFO ニューロンの細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度測定により、AII の作用と、AII に拮抗する作用を有することが飲水行動等で知られる 3 種の抑制性伝達物質、GABA, ANP, Galanin の作用を解析した。AII は 10<sup>-12</sup>~10<sup>-7</sup> M で濃度依存性に細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度を上昇させた。GABA, ANP, Galanin の 3 者は AII により上昇した細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度を可逆的に低下させた。中でも GABA の作用は最も多くの細胞で観察された(図 4)。

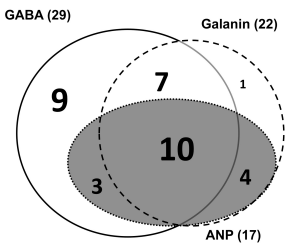


図4 AII反応の抑制数

また、GABA の作用は GABA<sub>A</sub> 受容体のアンタゴニストである Bicuculline と GABA<sub>B</sub> 受容体のアンタゴニストである CGP 35348 で解除されなかったが、その両者の同時投与で解除された。これらの結果は、SFO ニューロンにおいて、この 3 種の抑制性伝達物質が AII の興奮作用に拮抗する直接作用を有していること、さらには GABA の作用は GABA<sub>A</sub> と GABA<sub>B</sub> の 2 種の受容体を介していることを示している(図 5)。

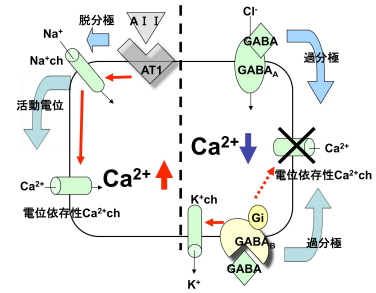


図5 GABAによる抑制機序

(4) DRG ニューロン特性の解析

TRPV1 は DRG から機能的クローニング法により単離、構造同定された分子であり、DRG の中でも小型のカプサイシン感受性侵害受容ニューロンに TRPV1 が高密度に発現することが報告されている。本研究では、培養ラット DRG ニューロンに NGF を数日間処置することで生じる自発性活動電位の発生がどのような性質のニューロンで起こるのかを同定する目的で、NGF 投与、あるいは未投与の DRG ニューロンで細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度と膜電流の測定を行った。NGF 投与群では自発性の Ca<sup>2+</sup>濃度の周期的な振動 (Ca<sup>2+</sup>振動) を生じる細胞が存在し、対象群ではそのような細胞は観察されなかった。自発性 Ca<sup>2+</sup>振動は細胞外 Na<sup>+</sup>濃度の低下や Na<sup>+</sup>チャンネルブロッカーで消失したこと、また Ca<sup>2+</sup>振動を示す細胞の多くはカプサイシン投与で Ca<sup>2+</sup>振動を示したことから、NGF 投与がなんらかのメカニズムで侵害受容ニューロンに自発性活動電位を生じ、Ca<sup>2+</sup>振動を起こしたと考えられた。しかしながら、TRPV1 のアンタゴニストであるルテニウムレッド、カプサゼピンは自発性活動電位に影響を与えなかったことから、TRPV1 の発現が Ca<sup>2+</sup>振動の原因ではないことが示唆された。また、今回明らかとなった NFG 誘発性の自発性活動のメカニズムが神経因性疼痛のメカニズムである可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等  
[雑誌論文] (計 16 件)

- ① Fukumoto N, Obama Y, Kitamura N, Niimi K, Takahashi E, Itakura C, Shibuya I. Hypoalgesic behaviors of P/Q-type voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channel mutant mouse, rolling mouse Nagoya. *Neuroscience*. 160:165-73. (2009) 査読有
- ② Ozaki Y, Kitamura N, Tsutsumi A, Dayanithi G, Shibuya I. NGF-induced hyperexcitability causes spontaneous fluctuations of intracellular Ca<sup>2+</sup> in rat nociceptive dorsal root ganglion neurons. *Cell Calcium*. 45:209-15. (2008) 査読有
- ③ The role of calcium in the action and release of vasopressin and oxytocin from the CNS neurons/terminals to the heart.

- Dayanithi G, Viero C, Shibuya I. J Physiol Pharmacol. 59 Suppl 8:7-26. (2008) 査読有
- ④ Uddin MI, Qi Y, Yamada S, Shibuya I, Deng XP, Kwak SS, Kaminaka H, Tanaka K. Overexpression of a new rice vacuolar antiporter regulating protein OsARP improves salt tolerance in tobacco. Plant Cell Physiol. 49:880-90. (2008) 査読有
- ⑤ Yamanaka Y, Kitamura N, Shibuya I. Chick spinal accessory lobes contain functional neurons expressing voltage-gated sodium channels generating action potentials. Biomed Res. 29: 205-211. (2008) 査読有
- ⑥ Hashimoto K, Yamano Y, Morishima I. Cloning and expression of a gene encoding gallerimycin, a cysteine-rich antifungal peptide, from eri-silkworm, *Samia cynthia ricini*. Comp, Biochem, Physiol, B Biochem, Mol, Biol. 150:229-232. (2008) 査読有
- ⑦ Kariwa H, Noda H, Nakauchi M, Ishizuka M, Hashiguchi K, Hashimoto S, Yoshii K, Asano A, Agui T, Kogaki H, Kurano Y, Uchida Y, Fujii N, Okada M, Takashima I. Characterization and epitope mapping of monoclonal antibodies to the nucleocapsid protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus. Jpn. J. Vet. Res. 55:115-127 (2008) 査読有
- ⑧ Yamano Y, Asano A, Ohyama K, Ohta M, Nishio R, Morishima I. Expression of Ha-ras suppressor family member 5 gene in the maturing rat testis. Biosci. Biotech. Biochem. 72:1360-1363 (2008) 査読有
- ⑨ K. Hashimoto K, Mega Y, Matsumoto Y, Bao Y, Yamano Y, Morishima I. Three peptidoglycan recognition protein (PGRP) genes encoding potential amidase from eri-silkworm, *Samia cynthia ricini*. Comp, Biochem, Physiol, B Biochem, Mol, Biol., 148:322-328 (2007) 査読有
- ⑩ Onoe H, Matsumoto A, Hashimoto K, Yamano Y, Morishima I. Peptidoglycan recognition protein (PGRP) from eri-silkworm, *Samia cynthia ricini*; protein purification and induction of the gene expression. Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol., 147:512-519 (2007) 査読有
- ⑪ Sasaki N, Hosoda Y, Nagata A, Ding M, Cheng J-M, Miyamoto T, Okano S, Asano A, Miyoshi I, Agui T. A mutation in *Tpst2* encoding tyrosylprotein sulfotransferase causes dwarfism associated with hypothyroidism. Mol. Endocrinol. 21: 1713-1721 (2007) 査読有
- ⑫ Asano A, Tsubomatsu K, Jung C-G, Sasaki N, Agui T. A deletion mutation of the protein tyrosine phosphatase kappa (*Ptpk*) gene is responsible for T-helper immunodeficiency (*thid*) in the LEC rat. Mammal. Genome 18: 779-786 (2007) 査読有
- ⑬ Ohyama K, Ohta M, Sano T, Sato K, Nakagomi T, Shimura Y, Yamano Y. Maternal exposure of low dose of TCDD modulates the expression of estrogen receptor subunits of male gonads in offspring. J. Vet. Med. Sci., 69:619-625 (2007) 査読有
- ⑭ Bao Y, Yamano Y, Morishima I.  $\beta$ -1,3-glucan inducible expression of prophenoloxidase-activating proteinase from eri-silkworm, *Samia cynthia ricini*. Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol., 147: 45-48 (2007) 査読有
- ⑮ Kow L-M, Devidze N, Pataky S, Shibuya I, Pfaff DW. Acute estradiol application increases inward and decreases outward whole-cell currents of neurons in rat hypothalamic ventromedial nucleus. Brain Res. 1116: 1-11. (2006) 査読有
- ⑯ Cho A-R, Uchio-Yamada K, Torigai T, Miyamoto T, Miyoshi I, Matsuda J, Kurosawa T, Kon Y, Asano A, Sasaki N, Agui T. Deficiency of the *tsen2* gene in the ICGN mouse, an animal model for congenital nephrotic syndrome. Mamm. Genome 17: 407-416 (2006) 査読有
- [学会発表] (計 13 件)
- ① 北村直樹, 山中祐子, 篠原光, 澁谷泉 鳥類特有の平衡感覚器官に存在するニューロンの細胞生理学的機能の解明 第19回日本病態生理学会 2009. 1. 24 所沢
- ② 山野好章, 大山 建司, 太田 正法, 利谷 明繁 精子形成期ラット精巣における精子鞭毛関連遺伝子の発現, 第31回日本分子生物学会年会, 第81回日本生化学会大会合同大会 2008. 12. 11 神戸
- ③ 太田 正法, 佐野 友昭, 小林 基章, 矢ヶ崎 英晃, 田辺 良子, 山野好章, 大山建司 ラット精巣におけるNYD-SP14遺伝子発現調節機構に関する検討, 第42回日本小児内分泌学会 2008. 10. 2 米子
- ④ Asano, A. Host-cell-intrinsic antiviral defense induced by type I interferons. The 5th International Symposium of Agricultural Science between Japan and Korea 2008. 11. 13 Chungnam National University, Korea
- ⑤ 篠原光, 山中祐子, 北村直樹, 澁谷泉 鶏脊髄 accessory lobe ニューロンに発現す

る新規陽イオンチャネルの同定 第 146 回  
日本獣医学会 2008. 9. 25 宮崎

- ⑥小浜陽子、福本奈央、北村直樹、高橋英機、澁谷泉 運動失調変異マウス Rolling Nagoya で見られる侵害刺激感受性の低下 第 146 回日本獣医学会 2008. 9. 25 宮崎
- ⑦神尾高志、浅野淳、大山建司、山野好章：精子形成ラット精巣に発現する癌抗原遺伝子の解析、第 146 回日本獣医学会 2008. 9. 24 宮崎
- ⑧増田康充、浅野淳、神尾高志、北村直樹、澁谷泉、山野好章：組換えニワトリインターフェロンλ タンパク質の精製、第 146 回日本獣医学会 2008. 9. 24 宮崎
- ⑨浅野 淳、鳥越大輔、高倉 彰、佐々木宣哉、安居院高志：Mycoplasma pulmonis 感染の高感度血清学的モニタリングのための組換え P46-like lipoprotein を用いた ELISA 法の開発、第 55 回日本実験動物学会 2008. 5. 16 仙台
- ⑩北村直樹、山中祐子、澁谷泉 ニワトリ脊髄 accessory lobe ニューロンの機能解明 第 145 回日本獣医学会 2008. 3. 30 相模原
- ⑪尾崎結、北村直樹、澁谷泉 ラット背根神経節ニューロンの NGF による自発性細胞内カルシウム濃度変動第 144 回日本獣医学会 2007. 9. 4 江別
- ⑫山中祐子、北村直樹、澁谷泉 ニワトリ脊髄 Accessory Lobe 内に存在するニューロンの機能的な研究第 144 回日本獣医学会 2007. 9. 4 江別
- ⑬浅野 淳、坪松耕太、Cha-Gyun Jung、佐々木宣哉、安居院高志：LEC ラットのヘルパー T 細胞欠損変異 (thid) の原因は Ptpkr 遺伝子の欠失である、第 144 回日本獣医学会 2007. 9. 4 江別

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

## 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

#### (3) 連携研究者

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

山野 好章 (YAMANO YOSHIAKI)  
鳥取大学・農学部・教授  
研究者番号：00182593

浅野 淳 (ASANO ATSUSHI)  
鳥取大学・農学部・准教授  
研究者番号：90312404