

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19700296

研究課題名 (和文) 体液情報に基づく摂取行動制御を担う神経回路の解明

研究課題名 (英文) Studies on neural circuits for intake behaviors controlled on the basis of body-fluid condition.

研究代表者

檜山 武史 (HIYAMA TAKESHI)

基礎生物学研究所・統合神経生物学研究部門・助教

研究者番号：90360338

研究成果の概要：脱水時には体液の Na レベルが上昇する。生命を維持する上で体液の Na 恒常性は重要であり、水分と塩分の摂取の制御と、腎臓機能の制御による排出の制御によって維持されている。申請者は、このうち塩分摂取の制御に関わる脳内 Na レベルセンサー分子が電位依存性 Na チャンネルと相同性のある分子  $Na_x$  であることを明らかにしてきた。本研究では、体液 Na レベルの情報が神経活動に変換される情報伝達経路について調べた。まず、 $Na_x$  が感知した情報が伝達される経路を探った。その手がかりを得る目的で、 $Na_x$  チャンネルの細胞内領域に結合する分子を探索し、 $Na^+/K^+$ -ATPase の  $\alpha$  サブユニット ( $\alpha 1$  及び  $2$ ) が直接的に結合していることを明らかにした。この相互作用により、細胞外の Na レベル依存的に  $Na^+/K^+$ -ATPase が活性化し、その結果、グリア細胞の代謝活動が亢進し、乳酸の放出につながっていることが判明した。SFO において  $Na_x$  を発現するグリア細胞は、主に GABA ニューロンを取り巻いている。そこで、SFO の GABA ニューロンの活動を電気生理学的に調べたところ、野生型マウスでは Na レベルの増加により GABA ニューロンの活性化がみられたが、 $Na_x$ -KO マウスでは応答がみられなかった。ところが、乳酸を投与した場合には、野生型マウス、 $Na_x$ -KO マウスのいずれの GABA ニューロンも活性化した。以上の結果から、正常な SFO においては、グリア細胞の  $Na_x$  が体液 Na レベルの上昇を感知すると、その情報が乳酸を介して GABA ニューロンに伝達され、塩分摂取を促す神経活動の抑制が起きると考えられる。以上、脱水時の体液 Na レベルの増加が塩分摂取行動の制御につながる脳内機構の大筋が明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2007年度 | 2,000,000 | 0       | 2,000,000 |
| 2008年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 総計     | 3,200,000 | 360,000 | 3,560,000 |

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：神経科学、イオンチャンネル、ホメオスタシス、神経回路

1. 研究開始当初の背景

| 血液や脳脊髄液を始めとする体液中のナト

リウム (Na) 濃度は 145 mM 付近に厳密に保たれ、細胞内の Na 濃度は約 15 mM に保持されている。細胞内外の Na 濃度勾配は、種々のトランスポーターによる物質輸送の駆動力となるだけでなく、ニューロンにおける活動電位の発生にも重要である。このように生命維持に不可欠な Na レベル恒常性のため、哺乳動物の体は、塩分・水分の経口摂取と腎臓における排泄・再吸収の制御を統合的に行っている。例えば、長時間の絶水により体液中の Na 濃度が上昇した場合、我々は喉の渇きを覚えて水分の補給を行う一方、塩分摂取を回避する。

申請者は、 $Na_x$  チャンネルがそのセンサーであることを明らかにしてきた。このチャンネルは細胞外の Na 濃度が 150 mM を越えると開く性質があり、脳内の脳弓下器官 (SFO) や終板脈器官 (OVL) という感覚性脳室周囲器官に分布している。いずれの器官も、脳室壁に位置して脳脊髄液に接するとともに、血液脳関門を有しておらず、体液状態の監視に適している。我々が作成した  $Na_x$  遺伝子ノックアウトマウス ( $Na_x$ -KO マウス) は、脱水により体液中の Na レベルが上昇しても、それを感知できず塩分摂取を回避しない。

申請者は、 $Na_x$  チャンネル分子が感覚性脳室周囲器官のグリア細胞 (上皮細胞やアストロサイト) に発現していることを明らかにした。電子顕微鏡による観察から、両器官で  $Na_x$  を発現したグリア細胞の突起がニューロンを取り巻く構造が明らかとなった。しかし、塩分の摂取行動を直接制御するのはニューロンである。そこでグリア細胞からニューロンに情報が伝達される仕組みが存在すると考えられたが、解明は困難であろうと予想された。

## 2. 研究の目的

以上の背景を踏まえ、本研究では、体液 Na レベル検出中枢である脳弓下器官において、Na レベルセンサーである  $Na_x$  が感知した情報が神経情報として出力されるまでの神経情報伝達機構の解明を目指した。

## 3. 研究の方法

酵母ツーハイブリッド法を用いて  $Na_x$  に結合する分子を探索した。また、生化学的に  $Na_x$  の結合を確認した。 $Na_x$  と  $Na^+/K^+$ -ATPase との結合が明らかになったことから、ATP の消費に伴う解糖系の活性化を蛍光グルコース誘導体 (2-NBDG) の取り込みを指標に調べた。この結果を確認するため、SFO 組織からの乳酸放出量を測定した。最後に、SFO の急性スライスを用いて、パッチクランプ法により、乳酸が神経活動を制御していることを明ら

かにした。

## 4. 研究成果

申請者は、グリア細胞における  $Na_x$  の機能を探る手がかりを得るため、 $Na_x$  に結合する分子を探索し、 $Na_x$  の細胞内 C 末端領域に  $Na^+/K^+$ -ATPase の  $\alpha$  サブユニットが結合することを見出した。この結合が機能に及ぼす影響を検討するため、蛍光グルコース誘導体 (2-NBDG) の取り込みを指標に  $Na^+/K^+$ -ATPase の活性を調べた。 $Na_x$  を発現する細胞では、等張 Na 溶液 (145 mM) に比べ、高 Na 溶液 (170 mM) 中ではグルコース取り込みが 1.6 倍に増加し、その増加分は  $Na^+/K^+$ -ATPase の特異的機能阻害剤であるウワバインによって完全に抑えられた。SFO から単離した細胞で調べると、この活性化を示した細胞は全て  $Na_x$  を発現するグリア細胞であった。さらに、 $Na_x$  との結合を競合的に阻害することを目的として、 $Na^+/K^+$ -ATPase の  $Na_x$  との結合領域断片を過剰発現させると、高 Na 刺激による活性上昇は抑えられ、両分子間の結合が機能的カップリングにも必須であることが示された。

$Na^+/K^+$ -ATPase の活性は、細胞内外の Na バランスの影響を受ける。しかし、 $Na_x$  を発現させる代わりに Na イオノフォア (モネンシン) を用いて Na 流入を誘発しても、単独では  $Na^+/K^+$ -ATPase を活性化しなかった。一方、 $Na_x$  の C 末端断片を発現させた上でモネンシンを投与すると、 $Na^+/K^+$ -ATPase が活性化した。この結果は、 $Na_x$  の C 末端領域の結合と  $Na^+$  流入の両方が、 $Na^+/K^+$ -ATPase 活性化に不可欠であることを示している。

このように解糖系が活性化すれば、乳酸の産生が亢進するはずである。そこで SFO 組織からの乳酸放出量を測定すると、高 Na 溶液において、 $Na_x$ -KO マウスと比較して、野生型マウス SFO から多くの乳酸が分泌されることが判明した。分泌された乳酸の生理的役割を次に調べた。

脱水下の  $Na_x$ -KO マウスの SFO の神経活動レベルを調べると、野生型マウスに比べて上昇している。SFO には GABA 作動性の抑制性ニューロンが多数存在し、それらは  $Na_x$  陽性のグリア細胞によって囲まれている。そこで、脳の急性スライスを作成し、SFO における GABA 作動性ニューロンの活動を電気生理学的に調べた (図 1)。SFO の GABA 作動性ニューロンは、生理的 Na 濃度条件下で自発発火をしていることが判明した。細胞外 Na 濃度を 160 mM まで上げると、野生型マウスの発火頻度は徐々に増加し約 2 倍に達したが、 $Na_x$ -KO マウスでは変化がなかった。Na 濃度を上げる代わりに乳酸を加えると、野生型と  $Na_x$ -KO マウスいずれにおいても発火頻度が増加した。高 Na 条件における発火頻度上昇は、乳酸の輸送を

行なうモノカルボン酸輸送体の抑制剤  $\alpha$ -CHCA により抑制されたことから、Na シグナルの下流で乳酸が神経活動の制御に関与していることが明らかになった。さらなる解析の結果、乳酸を取り込んだニューロン内で産生された ATP が ATP 感受性 K チャンネル (Kir6.2/KATP チャンネル) に作用してチャンネルを閉じることが、膜電位上昇と発火頻度上昇の機序であることが示唆された。

これらの結果から、脳内の Na レベル感知に関わる細胞機構が明らかとなった (図 2)。これにより、体液 Na レベルの情報が神経活動に変換される仕組みが解明された。本知見は、これまで受動的役割しか想定されてこなかったグリア細胞が、実は主体的に自らのセンサーの情報に基づき神経活動を制御していることを示した最初の例である。本研究を契機として、グリア-ニューロン相関の新たな側面が切り開かれるよう期待している。

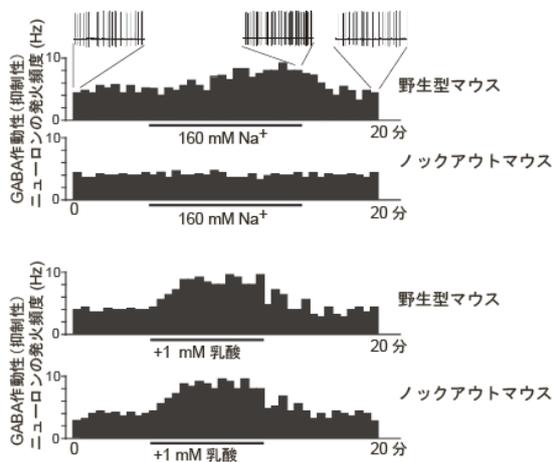


図 1  
脳弓下器官の GABA ニューロンは自発発火している。野生型マウスの脳弓下器官では、GABA ニューロンの発火頻度が細胞外液の Na 濃度の上昇あるいは乳酸のいずれによっても増加する。一方、 $Na_x$  遺伝子ノックアウトマウスでは Na 濃度上昇の検知が出来ず、GABA ニューロンの Na 濃度上昇に従う発火頻度の変化は見られない。本図は上衣細胞を表しているが、 $Na_x$  を発現するアストロサイトについても同様である。

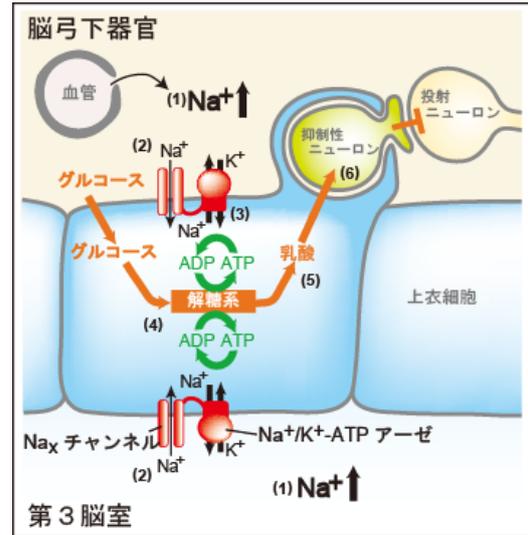


図 2  
Na レベル感知とニューロン制御の仕組みをあらわすモデル図。脱水状態の動物において体液 (細胞外液) の Na 濃度が上昇すると (1)、それを脳弓下器官のグリア細胞膜上の  $Na_x$  チャンネルが感知して開口し (2)、細胞内 Na 濃度を上昇させるとともに、直ちに  $Na^+/K^+$ -ATPase を活性化する (3)。 $Na^+/K^+$ -ATPase は Na を汲みだすために通常よりも多くの ATP を消費し、それを補うためにグリア細胞のグルコース (糖) 代謝が活性化される (4)。その結果、乳酸が産生・分泌され (5)、この乳酸が隣接する GABA ニューロン (抑制性ニューロン) の発火頻度を上昇させる (6)、という仕組みが明らかとなった。

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 4 件)

- ① 檀山武史, 野田昌晴, グリアによる乳酸を介したニューロン発火活動の制御, *Clinical Neuroscience*, 26(1), 6-7, 2008 査読なし
- ② Shimizu H\*, Watanabe E\*, Hiyama TY\* et al. (9 名中 3 番目; \*共同筆頭著者), Glial  $Na_x$  channels control lactate signaling to neurons for brain  $[Na^+]$  sensing, *Neuron*. 54(1), 59-72, 2007 査読あり
- ③ 檀山武史, 野田昌晴, 体液 Na レベルの脳内感知機構: グリアが乳酸シグナルによってニューロン活動を制御する, 細

胞工学, 26 (10), 1164-1169, 2007 査読なし

- ④ 檜山武史, 野田昌晴, 脳における体液 Na<sup>+</sup> レベル感知機構—グリア細胞が神経活動を制御するしくみの解明, 実験医学, 25(16), 2007 査読なし

[学会発表] (計 8 件)

- ① 渡辺英治、檜山武史、野田昌晴、脳のナトリウムセンサー、日本味と匂い学会第 42 大会、2008 年 9 月 19 日、富山市民プラザ (富山市)
- ② 檜山武史、体液 Na<sup>+</sup> レベルの脳内感知機構、日本内分泌学会 第 26 回内分泌代謝学サマーセミナー、2008 年 7 月 12 日、セントレアホール (常滑市)
- ③ 檜山武史、清水秀忠、長倉彩乃、藤川顕寛、渡辺英治、野田昌晴、Brain Na<sup>+</sup>-level sensing and control of salt-intake behavior mediated by lactate signaling、第 31 回日本神経科学大会、2008 年 7 月 11 日、東京国際フォーラム (東京都)
- ④ 長倉彩乃、檜山武史、渡辺英治、野田昌晴、Distribution analysis of FOS-positive neurons in the mouse subfornical organ、第 31 回日本神経科学大会、2008 年 7 月 10 日、東京国際フォーラム (東京都)
- ⑤ 檜山武史、清水秀忠、渡辺英治、長倉彩乃、藤川顕寛、岡戸晴生、柳川右千夫、小幡邦彦、野田昌晴 Glial Na<sub>x</sub> channels control lactate signaling to neurons for brain [Na<sup>+</sup>] sensing、北米神経科学会、2007 年 11 月 3-7 日、コンベンションセンター (アメリカ、サンディエゴ市)
- ⑥ 清水秀忠、檜山武史、長倉彩乃、藤川顕寛、渡辺英治、野田昌晴、Glial Na<sub>x</sub> channels control lactate signaling to neurons for brain [Na<sup>+</sup>] sensing、第 30 回日本神経科学大会、2007 年 9 月 10 日、パシフィコ横浜 (横浜市)
- ⑦ 長倉彩乃、檜山武史、渡辺英治、野田昌晴、Characterization of neurons in the mouse subfornical organ by retrograde labeling、日本神経科学大会、第 30 回日本神経科学大会、2007 年 9 月 10 日、パシフィコ横浜 (横浜市)

[その他]

基礎生物学研究所プレスリリース  
[http://www.nibb.ac.jp/press/070329/070307\\_open.html](http://www.nibb.ac.jp/press/070329/070307_open.html)  
2007/4/13 朝日新聞  
2007/4/13 科学新聞  
2007/4/10 Science's STKE(Editors' Choice)  
2007/4/5 中日新聞  
2007/4/5 日経産業新聞  
2007/4/5 読売新聞  
2007/4/4 Neuron(電子版: featured article)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

檜山 武史 (HIYAMA TAKESHI)  
基礎生物学研究所・統合神経生物学研究部門・助教  
研究者番号: 90360338

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

該当なし