

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：63904

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25830021

研究課題名(和文) 脳弓下器官・終板脈管器官に特異的に発現する分子群の同定

研究課題名(英文) Analysis of proteins expressed in the circumventricular organs

研究代表者

松本 匡史 (Matsumoto, Masahito)

基礎生物学研究所・統合神経生物学研究部門・研究員

研究者番号：30625728

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：動物は、体液中の浸透圧やNa⁺濃度を一定に保つために、脳室周囲器官(CVOs)において体液状態のモニタリングを行っている。CVOsが司る体液恒常性制御機構の解明のために、CVOsに特異的に発現している分子の同定を試み、CVOsに特異的に発現していると考えられる蛋白質を同定した。また、既にCVOsで発現が確認されているNaxについて、発現している領域や細胞についての解析を行ったところ、Naxは、大脳皮質や扁桃体の神経細胞にも発現しており、シナプス後部の足場タンパク質PSD95により細胞膜での安定性が制御されていることがわかった。

研究成果の概要(英文)：In animals, osmolality and sodium concentration in body fluids are continuously monitored in the circumventricular organs (CVOs) to keep it. In this study, to figure out the mechanism for the body-fluid homeostasis, we identified the proteins that specifically expressed in CVOs by transcriptome analysis. We also analyzed the expression pattern of Nax, which is known to express in CVOs, in mouse brain. We herein verified that Nax was expressed in neurons in the lateral amygdala of mice, and the interaction between Nax and PSD95 may be involved in promoting the surface expression of Nax channels in neurons.

研究分野：神経科学

キーワード：脳室周囲器官 脳弓下器官 ナトリウムチャンネル

1. 研究開始当初の背景

動物が生きていく上で体液 Na^+ 濃度や浸透圧の恒常性を維持することは不可欠である。しかしながら、その機構には、まだ不明な点が多い。かつて、脳の部分破壊が飲水や塩分摂取行動に及ぼす影響が解析され、適切な塩分摂取や飲水行動には脳弓下器官 (SFO) や終盤脈管器官 (OVL) と呼ばれる脳室周囲器官 (CVOs) が重要であることが明らかにされた (図1) (引用文献)。脳組織には一般的に血液脳関門が存在するが CVOs には存在しない。また、CVOs は第3脳室前壁にあり、脳室に面して脳脊髄液と接していることから、血液や脳脊髄液の状態のモニターに適していた組織である。このような特異的な構造から、体液中の Na^+ 濃度や浸透圧などを感知するセンサー機構が CVOs に存在する可能性が古くから示唆されてきた。



申請者の所属研究室では、脳組織において CVOs のグリア細胞に発現しているチャンネル分子 Na_x が、体液 Na^+ レベルの上昇を感知するセンサー分子であることを見いだした。 Na_x は電位依存性ナトリウムチャンネルのファミリー分子であり構造的に近いが電位依存性は持たず、細胞外 Na 濃度の上昇にตอบสนองして開口する特性を有していた。正常な動物は、絶水状態が続いて体液の Na^+ レベルが上昇すると塩分摂取を回避する行動をとる。しかし、 Na_x 遺伝子を欠損した Na_x ノックアウトマウスは絶水によって血中 Na^+ レベルが上昇しても塩分摂取をやめない行動異常を示した (引用文献)。このように体液 Na^+ レベルの上昇を感知するセンサー分子の実体は Na_x であることが明らかになった。 Na_x はグリア細胞だけでなく、ニューロンにも発現しているが、その機能についてはよくわかっていない。

行動学的な解析などから、脳には体液 Na^+ レベルを感知するセンサー以外に、浸透圧の上昇や低下を感知するセンサー分子が存在すると考えられるが、それらは、まだ同定されていない。申請者らは、体液状態の監視に適した脳組織である CVOs に特異的に発現する分子の中に、そうしたセンサー分子が含まれると考えた。

近年、申請者らは、血中 Na^+ レベルが恒常的に高くなる本態性高 Na 血症を発症した一人の患者を調べ、その体内で Na_x を認識する自己抗体が産生されていることを見つけた (引用文献)。この患者は自発的な飲水量が減少し、抗利尿ホルモン (バソプレッシン) の分泌能も低下していた。この患者の血清を用いて免疫組織染色を行うと CVOs が特異的に染色された。その後の詳細な解析の結果、自己抗体によって CVOs の機能不全が起きたことが発症の原因と推定された。最近、この患者と同様に自己抗体の産生が原因と疑われる高 Na 血症が新たに数例見つかった。患者血清を用いてマウス脳組織の免疫染色を行うと SFO や OVL が特異的に染色され、CVOs に特異的に発現している分子に対する自己抗体が患者体内で産生されていることが示唆された。しかし、 Na_x は認識せず、他の CVOs 特異的分子を認識している物と考えられた。

2. 研究の目的

浸透圧等を感知する未知の体液センサー分子の同定を目指し、CVOs に特異的に発現している分子を探索する。次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析を行うと共に、高 Na 血症患者から見つかった自己抗体が認識する分子の同定を目指す。また、 Na_x を発現している細胞について詳細に解析する。

3. 研究の方法

(1) CVOs に特異的に発現している分子の解析
次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析により、CVOs である SFO 及び OVL に特異的に発現している分子を同定する。また、高 Na 血症患者の体内で産生された CVOs を特異的に標識する抗体が認識するタンパク質を探索する。以上の2つの手法により、見出した分子の内、CVOs への特異性が高く、発現量も多い分子の中で、体液センサーとしての機能が特に期待されるチャンネル分子やトランスポーターを選んで解析を進める。それらの分子について、*in situ* ハイブリダイゼ

ーション法や免疫組織染色法により、マウス脳組織における発現パターンの解析を行う。

また、各分子の cDNA 全長をクローニングし、発現ベクターにサブクローニングして株化細胞に発現させる。タグを付けたクローンも並行して用意し、ウエスタンブロット法と免疫細胞染色法により、蛋白質の発現を確認する。対象遺伝子を発現した細胞が浸透圧変化等に対する刺激に反応するか、Na⁺イメージングやCa²⁺イメージング法により解析する。

トランスクリプトーム解析を用いた分子の探索については、ラットの SFO と OVLТ、さらに、対照とする脳室周辺組織、大脳皮質を取り出す。それぞれからトータル RNA を抽出し、cDNA を合成して次世代シーケンサーにより、全 cDNA の配列を決定する。各組織に発現している cDNA を比較することにより、SFO 及び OVLТ に特異的に発現する分子を決定する。

患者血清を用いた分子の同定については、これまでに申請者が解析した高 Na 血症血症の患者血清のうち、免疫組織染色実験の結果から CVOs の一つ SFO を特異的に染色することがわかっている血清を用いて、以下の実験を行う。まず、マウス脳から SFO 及び大脳皮質を切り出して蛋白質を抽出し、高 Na 血症患者の血清を用いて、それら抽出物のウエスタンブロット解析を行う。SFO サンプルに見られ対照組織である大脳皮質サンプルには無いバンドを探し、ゲルを切り出し、ゲルに含まれる蛋白質を質量分析法により同定する。この際、例えばバンド部分のゲルを選択的に切り出したとしても、そのゲルには複数の蛋白質が含まれると考えられる。そこで、それら同定された蛋白質の cDNA から発現ベクターを作成し、それを用いて蛋白質を細胞に発現し、患者血清を用いて細胞の免疫染色を行う。これによって、最終的に患者血清が認識する蛋白質の同定を試みる。

(2) ニューロンに発現している Na_x の機能解析

新たにマウス Na_x の部分配列を抗原とする抗体を作成し、免疫組織染色法によりマウス脳組織における Na_x の発現分布を調べる。ニューロンに発現した Na_x の機能を解析するため、ニューロン由来の株化細胞に発現する安定発現細胞を作成し、Na⁺イメージングや電気生理学的手法を用いて Na_x の機能解析を行う。また、Na_x と相互作用する蛋白質を同定し、Na_x の制御機構についても解析を行う。

4. 研究成果

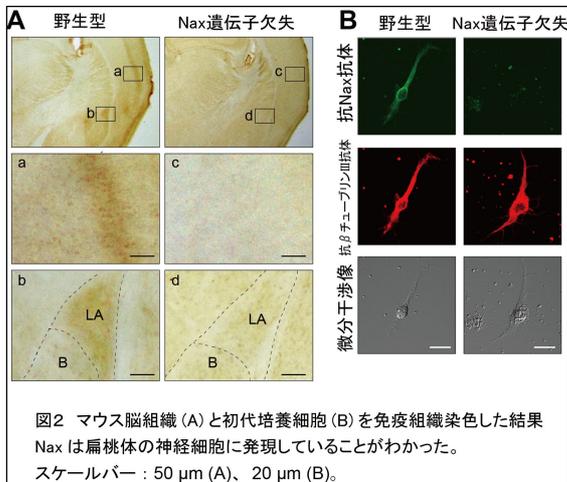
(1) CVOs に特異的に発現している分子の解析

次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析により、CVOs に特異的に発現している分子を同定することに成功した。その中からチャンネル分子やトランスポーターを選び、*in situ* ハイブリダイゼーション法や免疫組織染色法により、マウス脳組織切片における発現解析を行った。その結果、CVOs において特異的に発現していることが確認された。発現が確認された分子について、cDNA をクローニングして、株化細胞に発現させ、免疫染色により、発現を確認した。現在、イオンイメージングにより、その機能を解析している。

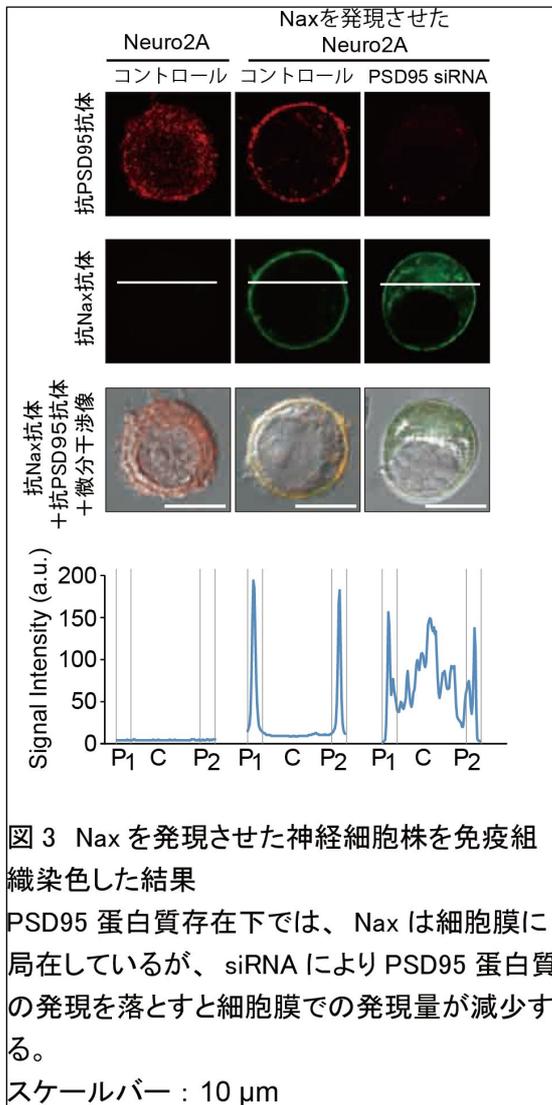
マウスの脳から SFO と大脳皮質を取り出してタンパク質抽出液を作成し、高 Na 血症患者の血清を用いたウエスタンブロット解析を行った。複数のバンドが検出されたが、SFO のサンプルにのみ存在するバンドはなかった。そこで、セファロースビーズに患者血清に含まれる抗体を結合し、患者血清に特異的に反応する抗原蛋白質を吸着・濃縮することを試みた。患者血清から、硫酸沈殿を行ってイムノグロブリン画分を取得し、精製した抗体をセファロースビーズ共有結合させた。作製したビーズに SFO の抽出液を加えて蛋白質を特異的に結合させ、その後ビーズから溶出したものを SDS-PAGE により分離し、銀染色により蛋白質の検出を行った。しかしながら、患者血清とコントロール血清を比較しても、結合した蛋白質に差がみられず、患者血清中の抗体に特異的に結合する蛋白質を見出すことはできなかった。結果として、今回おこなった方法では、高 Na 血症患者の血清に含まれる CVOs を特異的に認識する自己抗体の抗原分子を同定することはできなかった。

(2) ニューロンに発現している Na_x の機能解析

抗 Na_x 抗体と神経細胞のマーカーであるチューブリン III 抗体を用いて、マウスの脳組織や初代培養細胞を染色した結果、Na_x は大脳皮質や扁桃体の一部のニューロンに発現していることがわかった(図2)。さらに、大脳皮質抽出液を用いて Na_x の C 末端側細胞内領域に結合する分子を探索したところ、PSD95 が Na_x の C 末端にある PDZ 結合ドメインに結合するタンパク質として同定された。また、マウスニューロン由来の株化細胞



である Neuro2A に Na_x を発現させる実験から、Na_x と PSD95 蛋白質との相互作用が、Na_x の細胞膜における安定性に寄与していることがわかった (図3)。



Na_x を発現させた Neuro2A 細胞を用いて、Na⁺ イメージング及び電気生理学的解析を行った結果、グリア細胞由来の C6 グリオーマ細胞に発現させた場合と同様の Na⁺ 依存性を示し、ニューロンにおいても、Na_x は Na⁺ レベル

センサーとしての機能を保持していることが明らかになった。

<引用文献>

- Andersson et al., Annu. Rev. Nutr. (1982) 2:73-89.
 Noda, Exp. Physiol. (2007) 92:513-522.
 Hiyama et al., Neuron (2010) 66:508-522.

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2件)

- Matsumoto M, Hiyama TY, Kuboyama K, Suzuki R, Fujikawa A, Noda M. Channel Properties of Na_x Expressed in Neurons. (2015) PLOS ONE. 10: e0126109. (査読有り)
 Hiyama TY, Yoshida M, Matsumoto M, Suzuki R, Matsuda T, Watanabe E, Noda M. Endothelin-3 expression in the subfornical organ enhances the sensitivity of Na_x, the brain sodium-level sensor, to suppress salt intake. (2013) Cell Metab. 17: 507-519. (査読有り)

6. 研究組織

(1)研究代表者

- 松本 匡史 (Matsumoto, Masahito)
 基礎生物学研究所・統合神経生物学研究部門・研究員
 研究者番号：30625728