

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440164

研究課題名(和文)両生類の中枢神経系における体液変動感知とアンギオテンシンによる体液調節

研究課題名(英文) Osmotic stress sensing and angiotensin II in body fluids homeostasis in amphibian CNS

研究代表者

内山 実 (UCHIYAMA, Minoru)

富山大学・大学院理工学研究部(理学)・客員教授

研究者番号：50095072

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：両生類の体液恒常性に関わる脳部位と脳内アンギオテンシンの役割を調べた。中枢神経系において、第3脳室周囲部は血液脳関門を欠いており、細胞外液の状態を感知する役割をもつ。クローニングしたアマガエルTRPV1とTRPV4はリアルタイムPCRによる各体組織における発現解析では体液変動による影響は無かった。c-Fos免疫陽性ニューロンは終脳視索前野の小細胞性視索前核、室傍核、視交叉上核、間脳視床下部の前結節において観察された。脱水処理によりこれら全ての神経核でc-Fos活性が高まった。アンギオテンシン1型受容体は、脳室前壁背側の中隔核に局在し、中隔核と室傍核の機能的な連絡の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The present study aimed to investigate forebrain areas and role of angiotensin II in body fluid homeostasis in amphibian brain. Circumventricular organs lack blood-brain barrier and probably function to detect changes of extracellular fluid. Although we cloned amphibian transient receptor potential vanilloid (TRPV) 1 and TRPV4 activated Ca⁺⁺ permeability in response to osmotic stress in vitro, there was no significant change of TRPV-4 mRNA expression in dehydrated frogs using real-time quantitative PCR. C-Fos immunoreactive neurons were observed in several nuclei including the paraventricular nucleus (PVN) in forebrain of Japanese tree frog. The number of c-Fos immunoreactive cells increased in these nuclei of frogs under dehydrated condition. Angiotensin II type 1 receptor was immunohistochemically located in the medial septal nucleus (MSN). There may be physiological relationship between MSN and paraventricular nucleus according to analysis of the expression of c-Fos protein.

研究分野：比較内分泌学

キーワード：両生類 体液恒常性 脳室周囲器官 c-Fos アンギオテンシン受容体

1. 研究開始当初の背景

体液恒常性は、体液浸透圧と体液量調節によって維持され、神経系と内分泌系が関与する。この生理機構については、哺乳類を中心に研究が進んできている。体水分の減少、体液塩濃度や浸透圧上昇によって生じる「渇きの感覚」や視床下部「飲水中枢」についての研究から、体液変動に感受性をもつニューロンや神経内分泌系による脳内ネットワークが明らかになりつつある。また、前脳の脳室周囲には血液脳関門が欠如している部位(脳室周囲器官)があり、細胞外液の容積や浸透圧の状態を監視する機構が存在することも示されている。さらに近年の分子生物学の発展により、細胞膜に存在して細胞内外の体液環境変化を感知する細胞センサーの分子実態の研究が開始された。線虫やげっ歯類を用いた研究から、体液量や浸透圧の変化を受容する細胞膜チャネルとして Transient Receptor Potential Vanilloid receptor (TRPV; パニロイド型一過性受容体)ファミリーが注目されている。

両生類は脊椎動物が水生から陸生へ進化した際の生理機構を探る上で重要な動物群である。しかしながら、両生類の中樞神経系における体液調節に関わる部位や各ホルモンの役割については、幾つかの研究が散見されるのみである。我々は先にアマガエルの脳室内に高張溶液あるいはアンギオテンシン (Angiotensin) を投与すると吸水行動が促進されることを報告した。次の研究段階として、中樞神経系における体液調節に関わる脳領域と機能的な受容細胞の局在、また吸水を誘起する Angiotensin の脳内作用部位や神経ネットワークの解明が待たれていた。

2. 研究の目的

両生類の体液恒常性に関わる脳部位と Angiotensin の役割について明らかにすることを目的として、体液環境状態を感知する細胞センサーの局在と Angiotensin による中枢性制御について、個体・器官ならびに細胞・分子レベルにおいて解析する。

(1) 個体レベルにおける体液量と体液浸透圧の変化に対する恒常性の維持を調べる。

多様な環境に生息する無尾両生類数種について、体液変動処理後の行動を観察して、生息環境と「渇き」に対する行動様式の違いを明らかにする。

アマガエルにおける体液量と浸透圧の変化から回復に要する時間経過と生理機構を調べる。

(2) 組織・細胞レベルによる研究から、脳内における細胞外液の容積や浸透圧の状態を監視する機構の存在部位を明らかにする。

血液脳関門を欠く脳領域の観察を行なう。
c-Fos 発現部位を探索することにより活発に活動している脳神経細胞を観察し、体液

変動により活性化する脳部位と特徴を明らかにする。

(3) 分子生物学的手法により、体液環境を感知する細胞膜タンパク分子群 (TRPV1、TRPV4) をクローニングして、分子、細胞レベルでの発現を調べ、体液変動時に生じる当該タンパク分子の中樞神経系と体液調節器官での発現動態についても明らかにする。

(4) 体液恒常性において、Angiotensin が中樞神経系において果たしている役割を明らかにする。

索水・吸水行動に関する作用を観察する。
Angiotensin 受容体の脳内局在を探索して、Angiotensin が作用する脳領域ならびに関連部位の探索する。

3. 研究の方法

(1) 個体レベルの研究

被験動物を濃度の異なる各種溶液 (NaCl、尿素、マンニトール等) に浸漬あるいは瀉血や乾燥環境に暴露するなどの処理を行い、その後の行動をビデオ撮影により観察する。

アマガエルに瀉血処理あるいは濃度の異なる NaCl 溶液を投与して水中に浸漬し、経時的な体重変化を記録する。

(2) 体液変動に関わる脳領域・細胞レベルにおける探索

血液変動を監視する脳領域を探索するため循環系にエバンスブルー溶液を注入した後、中樞神経系を摘出して固定液により固定後、実顕微鏡あるいは顕微鏡下で観察する。

アマガエル脳の連続切片を作成して、本研究で作成した抗ウサギ c-Fos 抗血清を用いて、体液変動に起因して活性化する脳部位を顕微鏡下で探索する。

上記、で同定した脳室周囲器官を人為的に破壊して、体液変動時の行動観察を行ない、脳領域の欠損が体液恒常性に与える影響を見る。

(3) 体液環境センサーのクローニングと中樞神経系および末梢の体液調節に関わる諸器官の細胞における発現分布ならびに体液変動時の発現変化を解析する。

TRPV ファミリーのクローニングを行う。
クローニングした細胞膜タンパクを培養細胞に強制発現させて、機能解析を行う。

体液変動処理を施した被験動物の体組織における TRPV 1 と TRPV 4 発現について、リアルタイム PCR 法により解析する。

(4) 体液調節における脳内 Angiotensin の作用と Angiotensin 受容体の局在を調べる。

被験動物の脳室内に Angiotensin を投与して、水場滞在時間を測定する。Angiotensin 受容体拮抗剤を投与後に Angiotensin を投与して抑制効果を観察する。

抗ウサギ Angiotensin 受容体 (AT1R と AT2R) 抗体を作成して、脳連続切片における Angiotensin 受容体の脳内局在を観察する。免疫組織化学的手法により、脳内の c-Fos 陽性細胞と Angiotensin 受容体陽性細胞の共局在の有無と分布を観察する。

4. 研究成果

(1) 個体レベルにおける体液恒常性の観察 索水行動と吸水行動の観察

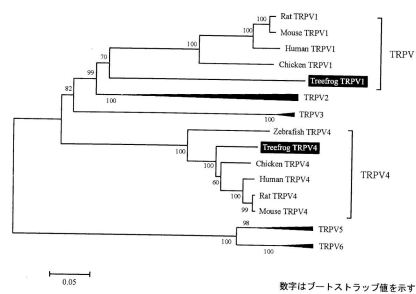
多様な環境に適応している無尾両生類の環境選択性について行動観察した。活動は昼夜を問わずに見られ、体液よりも低張な吸水源に留まって経皮吸水を行なった。経皮吸水は下腹部全体を水源に浸して、皮膚を通して浸透圧性に体内に水を取り込む行動である。今回の観察では、夜間にも視覚に基づいて索水が行われているのかは明らかではない。水源となる水質の適不適の判断は、皮膚などの末梢組織の情報が重要であることが示された。いずれの種においても、脱水処理後には盛んな吸水が行われた。長期絶水により索水行動は陸生種と樹上生種で不活発になるが、半水生種は脱水が進むにつれ活発化し、その後衰弱した。吸水については、低張液環境への滞在時間が半水生種で最も長く、陸生種、汽水生種、樹上生種では陸地での滞在時間が長かった。両生類における環境適応と適応放散において、索水・吸水行動が役割を果たしていることが示された。

アマガエルにおいて、瀉血や脱水処理による体液量の減少は、吸水によって10分以内に回復した。一方、高張あるいは低張溶液投与による体液浸透圧の変動からの回復にはより長時間(40分以上)を費やした。体液量調節は浸透圧調節よりも速やかに行われ、薬理学的研究から受容体を介する神経系の関与が示唆された。

(2) エバンスブルー溶液で青染された部位は第3脳室周囲部、延髄後部、下垂体であった。これらの部位は血液脳関門を欠いており、体液恒常性において血液の状態を感知する役割をもつ可能性がある。

脳室内に高張溶液を投与することで、水場滞在時間が有意に増加した。また、外科的に脳室周囲部を破壊することによって、脱水処理後の水場滞在時間は大きく変動した。

(3) 体液環境センサーのクローニング
TRPVファミリーはげっ歯類において、浸透圧を受容すると報告されている。アマガエルのTRPV1とTRPV4をクローニングして系統樹を作成したところ、それぞれが脊椎動物の既知のグループに属していた(図1)。HEK293細胞を用いた強制発現系において、FLIPR解析により機能解析した。げっ歯類のTRPV1あるいはTRPV4と同様に温度と浸透圧変化について調べたところ、TRPV1発現細胞は浸透刺激あるいはTRPV1アゴニスト刺激に対



アマガエルのTRPVの分子系統樹

て有意な変化を示さなかった。一方、TRPV4発現細胞は低浸透圧刺激時にTRPV4アゴニストによって活性化し、TRPV4アンタゴニストによって抑制された。これらの結果は、両生類のTRPV4は浸透圧の変化に対して反応する可能性を示した。リアルタイムPCRによるアマガエル各体組織におけるTRPV1とTRPV4の発現解析では、脳、腎臓、肝臓を含む多くの組織で観察された。しがしながら、脳を含む各体組織において体液変動による有意な影響は観察されなかった。このためTRPV1とTRPV4が両生類の浸透圧受容器として機能している可能性は低いと考えられる。

(4) 体液調節における脳内 Angiotensin の作用と Angiotensin 受容体の局在

アマガエル脳室内への Angiotensin 投与により、水場滞在時間は投与用量依存的に延長した。Angiotensin 1型受容体(AT1R)拮抗薬あるいは同2型受容体(AT2R)拮抗薬を投与した後に Angiotensin を投与したところ、AT1R拮抗薬は Angiotensin による水場滞在時間を抑制した。Angiotensin はAT1Rを介して効果を現わすことが示された。

免疫組織化学的手法により、アマガエル脳連続切片における脳内の c-Fos 陽性細胞と Angiotensin 受容体陽性細胞の共局在の有無と分布を観察した。第三脳室腹側を取り囲む前脳の神経核は、吻側から小細胞性視索前核、室傍核、視交叉上核および前結節核の順に局在している。

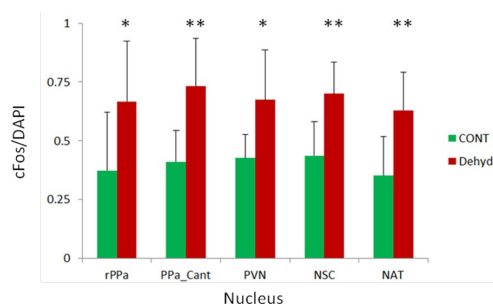


図2 第三脳室腹側周囲の各神経核のニューロン数(DAPI陽性細胞数)に対するc-Fos免疫陽性細胞数の割合の比較。緑色はコントロール群(CONT7)、赤色は脱水処理群(Dehyd)の平均値を標準偏差とともに示す。*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ vs. CONT

c-Fos 陽性ニューロンは様々な脳部位で発現しており、終脳視索前野の小細胞性視索前核、視交叉上核、間脳視床下部の前結節において観察された。これらの神経核では、コントロール群でも脱水処理群においても c-Fos 免疫陽性ニューロンが観察された。両群間で c-Fos 発現率を比較すると、これらすべての神経核において、コントロール群 (0.35 ~ 0.44; n=7) よりも脱水処理群 (0.62 ~ 0.73; n = 8) のほうが高かった (図 2)。

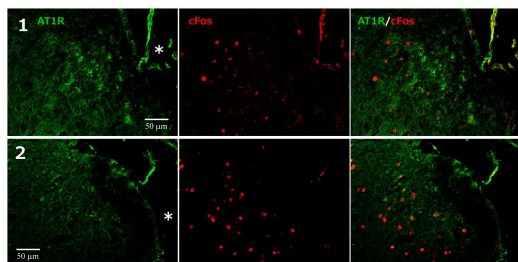


図3 アマガエル中隔核におけるAT1Rとc-Fos免疫陽性ニューロンの脳内局在 1上段はコントロール群、2下段は脱水処理群を示す。緑はAT1R免疫陽性ニューロン、赤はc-Fos陽性ニューロンを示す。

アンジオテンシン 1型受容体(AT1R)mRNAは間脳領域で高発現し、AT1R免疫陽性反応は脳室腹側の細胞核には発現が低く、脳室前壁背側の中隔核(MSN)に局在していた(図3)。脱水処理のMSNにおいてAT1R免疫陽性反応が認められたが、AT1R陽性反応とc-Fos発現率には脱水による影響は認められなかった。一方、各神経核における細胞数に対するc-Fos免疫陽性細胞の発現率はMSNと室傍核の間で強い正の相関が有り、両部位における機能相関が存在することが示唆された。

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)

M. Uchiyama, N. Konno, S. Shibuya and S. Nogami. Cloning and expression of the epithelial sodium channel and its role in osmoregulation of aquatic and estivating African lungfish *Protopterus annectens*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 査読有, Vol. 183, 1-8, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2014.12.028>

S. Tomiyama, T. Nakamachi, M. Uchiyama, K. Matsuda and N. Konno. Urotensin II upregulates migration and cytokine gene expression in leukocytes of the African clawed frog, *Xenopus laevis*. *General and Comparative Endocrinology*, 査読有, Vol. 216, 54-63, 2015. <https://doi.org/10.1016/>

j.ygcn. 2015.04.009

[学会発表](計 11件)

内山 実. アマガエルの体液調節に関わる中枢神経系の解析、日本比較内分泌学会、2016年12月10日、北里大学(神奈川県・相模原市)

内山 実. 水陸両生魚ヨダレカケの陸生適応機構、日本動物学会、2015年9月19日、新潟コンベンションセンター朱鷺メッセ(新潟県・新潟市)

S. Maejima and M. Uchiyama. Hormonal and Osmotic regulation of absorption behavior of Japanese tree frog, *Hyla japonica*, 8th International Symposium on Amphibian and Reptilian Endocrinology and Neurobiology. 2014年11月9日、基礎生物学研究所(愛知県・岡崎市)

内山 実. カニクイガエルの汽水環境順化における体液浸透圧調節、日本動物学会、2014年9月13日、東北大学川内キャンパス(宮城県・仙台市)

内山 実. アマガエルの雨鳴きを科学する、日本両生類研究会、2014年8月30日、川の博物館(埼玉県・寄居町)

[図書](計 4件)

内山 実 他、ホルモンから見た生命現象と進化シリーズ「ホメオスタシスと適応恒」, 第1章(15)、第3章(20)、第6章(18)、裳華房、2016、総ページ数230

M. Uchiyama. Angiotensin II and water balance in Amphibians. In: Sodium and Water Homeostasis. Springer New York, 2015, pp. 73-99

[その他]

ホームページ等

https://www.youtube.com/watch?v=vHx2eiaL1mk&list=PL81ldJF6ek7IhpZa9YuAf_BBZJeR4ITC6&index=21

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内山 実 (UCHIYAMA, Minoru)
富山大学・大学院理工学研究部(理学)・
客員教授
研究者番号: 50095072

(2) 研究分担者

今野紀文 (KONNO Norifumi)
富山大学・大学院理工学研究部(理学)・
講師
研究者番号: 50507051

(3) 研究協力者

棕田 崇生 (MUKUDA, Takao)
春見 達郎 (HARUMI, Tatsuo)