

研究報告書

脳のナトリウムレベルセンサーの解明と
生活習慣病克服への応用

研究者氏名: 渡辺 英治

(研究期間: 平成 14 年 11 月 1 日 ~ 平成 18 年 3 月 31 日)

脳のナトリウムレベルセンサーの解明と生活習慣病克服への応用

渡辺 英治

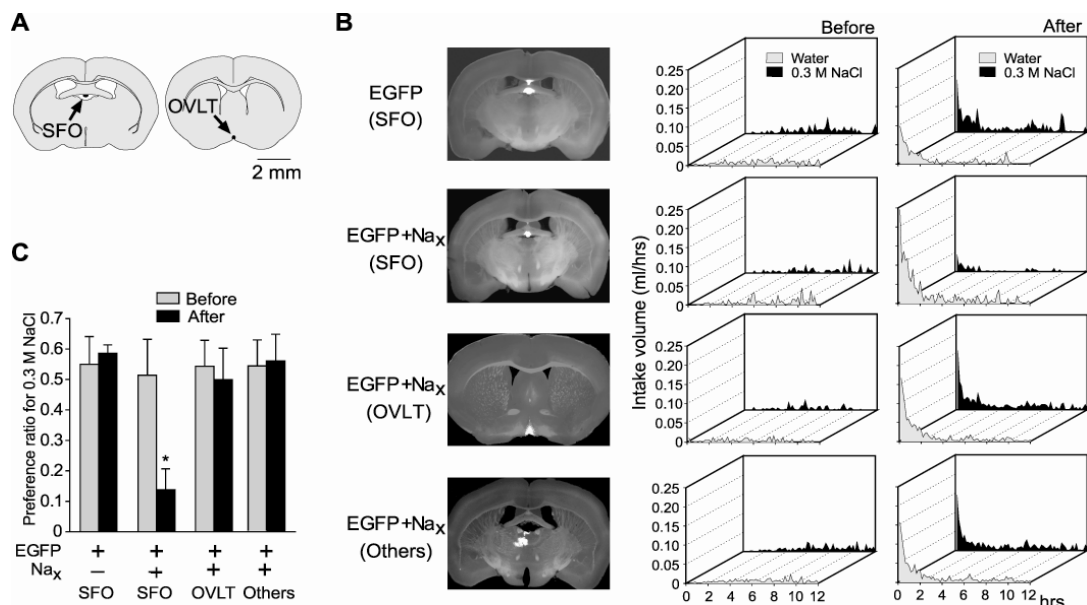
研究のねらい

塩分の慢性的な過剰摂取は、高血圧など成人病の一因になると考えられている。ヒトをはじめとする高等動物はこうした過剰な塩分摂取を避けるために、体液中のナトリウムレベルを検出する神経機構を持つ。これまで、脳におけるナトリウムレベルセンサーの実体については全く不明であったが、一連の遺伝子欠損マウスによる研究から、私たちの研究グループはナトリウムチャンネルの一種であるNaxが、ナトリウム濃度依存性ナトリウムチャンネルであり、脳のナトリウムレベルセンサーの実体であることを明らかにしてきた。本研究プロジェクトでは、Naxが細胞外ナトリウム濃度の変化を検出する分子機構について研究を進めていく。同時に脳のナトリウムレベルセンサーによって行動が制御されるメカニズムの解明についても研究を進める。本研究の成果は、タンパク質が電解質の絶対濃度を検出する機構を解明した世界で初めての例になる可能性を秘める。また、適度な塩分摂取をコントロールするための高血圧予防薬開発の第一歩にもなると考える。

研究成果

マウスの塩分摂取行動をリアルタイムで記録するために飲水量自動計測装置の開発を行った。本装置は1分間隔で自動的にマウスの飲水量を記録することができる。本装置を利用して脳のナトリウムセンシング機構について解析を行った。動物は脱水状態になると体内のナトリウム濃度が上昇し、新たな塩分摂取は回避する。以前の研究から、遺伝子欠損マウスは脱水時でも塩分摂取回避行動をとらないことがすでに判明している。今回は、脳室内にカニューレを挿入し高張ナトリウム溶液によってNaxが発現している脳室周囲器官を直接刺激した。その結果、野生型マウスは脳室内のナトリウム濃度の上昇に伴って塩分摂取行動が抑制されたが、遺伝子欠損マウスでは抑制反応が全く見られなかった。さらに、Naxを発現することのできるアデノウイルス発現ベクターを遺伝子欠損マウスの脳弓下器官に投与したところ、野生型マウスに近い行動を示すようになった(図1参照)。外来性Naxを発現させることで遺伝子欠損マウスの行動異常を改善することのできた領域は、脳の中でも脳弓下器官だけであった。このことは脳弓下器官で発現しているNaxが体液中のナトリウム濃度検出に必須であることを示している。また同時に動物の体内中のナトリウム濃度検出機構が脳内にあることを直接的に証明することが

できた。以上の結果は Journal of Neuroscience 誌に報告した。また本成果は、NATURE REVIEWS NEUROSCIENCE 誌(vol.5 (12): 897-897 DEC 2004)の記事として紹介された。

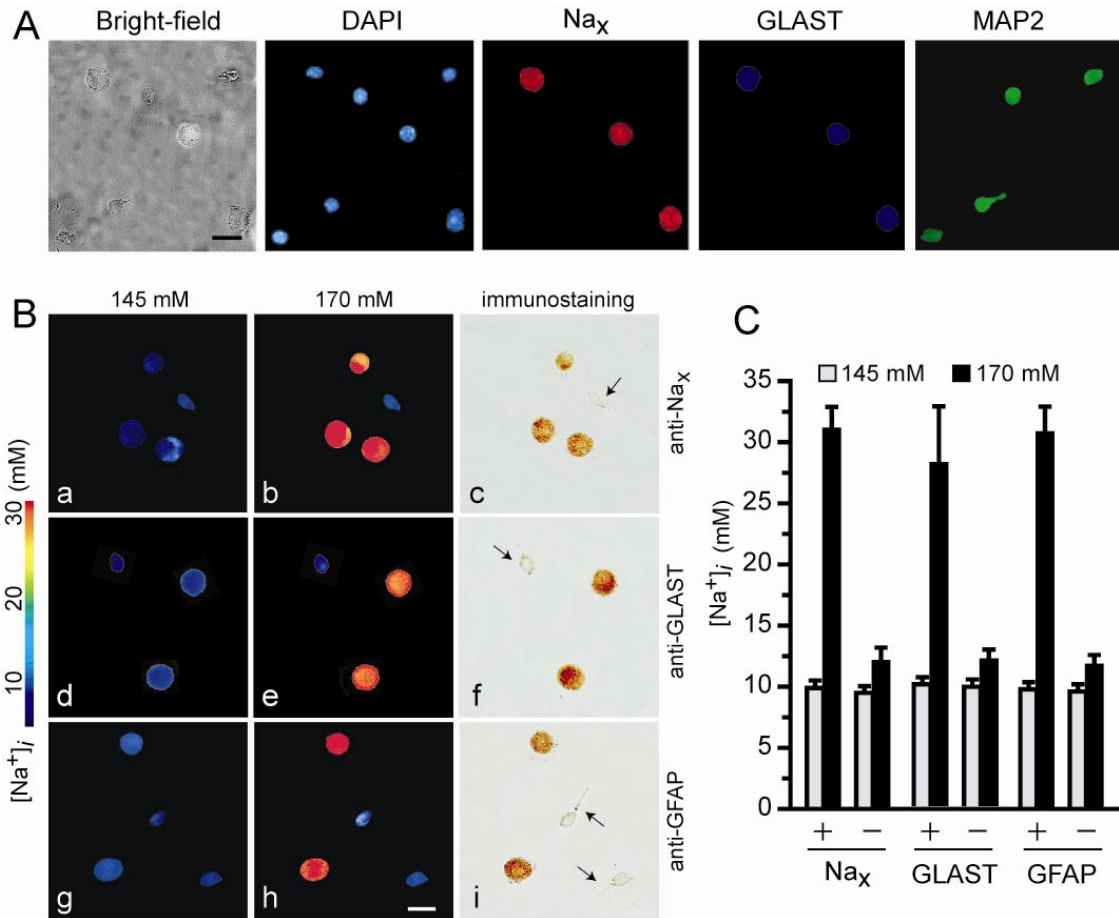


【図1】 Na_x遺伝子欠損マウスのレスキュー実験。Na_x発現ベクターをNa_x遺伝子欠損マウスの脳に感染させ、その後48時間の絶水を行い、絶水前(Before)と絶水後(After)の飲水行動テストを行った。飲水行動テストではマウスに水と0.3MのNaCl水の二瓶を提示し、その飲水量を比較する。(A)では、Na_xが元来発現している脳弓下器官(SFO)と終盤脈管器官(OVLT)の位置を示す。Na_x発現ベクターは蛍光タンパク質(EGFP)発現ベクターと共に打ち込むため、その感染部位を同定することができる(B)。(B)のグラフでは絶水直前(左)と直後(右)の飲水量の時間経過を示す。いずれのマウスも絶水直後に強い飲水行動を示すが、SFOにNa_xチャンネルを戻したマウスだけが野生型マウスのような食塩水摂取を避けるような行動を示した。(C)では、(食塩水摂取量)/(総飲水量)の比で示した。

大阪大学人間科学研究科の山本隆教授らとの共同研究により、Na_x遺伝子欠損マウスの行動異常が中枢性であるか、末梢性であるかを確かめる研究を行った。実験は、野生型マウスとNa_x遺伝子欠損型マウスの味覚性の感覚神経を切断し、Na_x遺伝子欠損マウスの行動異常に変化が起こるかどうかを調べた。結果として、遺伝子欠損マウスの行動異常は、中枢性であることが強く示唆された。以上の研究結果は、Brain Research 誌に報告した。

次にNa_xチャンネルの機能を細胞レベルで解明することを目的として、Na_xチャンネルが機能している細胞の同定を行った。方法としては、抗Na_x特異抗体による免疫電子顕微鏡法及び細胞種マーカーとの蛍光2重染色法である。結果、Na_xチャンネルは、脳弓下器官の神経細胞に巻き付いているグリア細胞性薄膜に特異的に発現していることが明らかとなった。また、脳弓下器官から単離したグリア細胞を使用してナトリウムイメージング解析を行ったところ、細胞マーカーで同定された単離グリア細胞に細胞外ナトリウムに応答す

るナトリウム感受性があることが判明した（図2参照）。以上のことから、脳弓下器官ではグリア細胞が細胞外のナトリウム濃度の上昇を感受しており、このグリア細胞の情報が神経細胞に伝えられると考えられる。すなわち、脳におけるナトリウム濃度の検出には神経細胞とグリア細胞の新しいコミュニケーションが必須であることを示唆している。以上の結果は American Journal of Physiology 誌に報告した。



【図2】 脳弓下器官の単離細胞でナトリウムイメージングを行った。(A)では単離細胞を各種マーカーで多重ラベルした。DAPIは核染色、Na_xは抗Na_x抗体、GLASTはグリア性の抗グルタミン酸トランスポーター抗体、MAP2は神経性のチューブリン修飾タンパク質に対する抗体で染色した。Na_x陽性細胞は、グリア性マーカー分子を共発現している。(B)や(C)では、細胞外ナトリウム濃度を145mMから170mMに上昇させたときに細胞内に流入するナトリウムイオンをイメージング法によって解析した。結果、170mMの細胞外ナトリウム濃度に反応して細胞内にナトリウムを流入させている細胞はNa_xチャンネルを発現させていると同時に、グリア性マーカー（GLASTとGFAP：GFAPは、グリア特異的な中間径フィラメント）も発現させていることが判明した。

最後にNaxの発現誘導ができるグリア細胞株を樹立した。本細胞にNaxの発現を誘導すると、微弱な応答ではあるがNax由来の細胞内へのナトリウムイオン流入が観察することができた。さらに、Nax誘導細胞を特定のホルモンで刺激しておくこととNax由来のナトリウムイオン流入が増強された。すなわちNaxは、細胞外のナトリウム濃度だけではなく、循環性ホルモンによっても活性が制御されていることが示唆された。また、グルコースイメージング法によって解析したところ、Naxチャンネルはグリア細胞へのグルコース取り込み能を格段に上昇させることが明らかとなった。また、酵母ツーハイブリッド法によってNa-KポンプとNaxチャンネルとの結合が明らかとなった。これらの実験結果は、Naxチャンネルがグリア細胞の代謝経路を刺激して、神経細胞に何らかのシグナルを伝達している可能性を示唆するものである。以上の結果は、論文投稿の準備中である。

今後の展開

当初の目標は、主として二つに分けられる。一つは、脳のナトリウムセンサーの存在を動物個体レベルで証明することにある。この課題に関しては、新たに開発したマウス用の飲水量自動測定装置とアデノウイルス発現ベクターを使った実験によってほぼ目標を達成したと考える。本研究成果によって、Naxが脳の中でも脳弓下器官でナトリウムレベルセンサーとして働いていることを立証することができた。もう一つの課題は、Naxナトリウムチャンネルがどのようにしてナトリウムイオン濃度の微小な変化を検出しているか、その分子メカニズムについて明らかにすることである。本課題については、Naxと相互作用する分子としてNa-Kポンプを明らかにし、これらがグリア細胞中で相互作用することによって代謝経路を制御していることを明らかにした。Naxチャンネルが電氣的にサイレントなグリア細胞に発現しているということは意外な新発見であった。しかしながら、Naxチャンネルがどのようにして細胞外のナトリウム濃度変化を検出しているかについて、具体的な分子機構は相変わらずとして大きな疑問として残したままである。今後は、今回開発したC6発現細胞系とNaxと相互作用する分子との関連から、Naxチャンネルの分子機構について明らかにしていきたい。

研究成果リスト

論文(原著論文)発表

1. Watanabe, U., Shimura, T., Sako, N., Kitagawa, J., Shingai, T. Watanabe, E., Noda, M. and Yamamoto, T., A comparison of voluntary salt-intake behavior in Nax-gene deficient and wild-type mice with reference to peripheral taste inputs, Brain Research 967, 247-256 (2003)

2. Hiyama, T.Y., Watanabe, E., Okado, H. and Noda, M., The subfornical organ is the primary locus of sodium-level sensing by Nax sodium channels for the control of salt-intake behavior, *Journal of Neuroscience* 24, 9276–9281 (2004)
3. Niisato, K., Fujikawa, A., Komai, S., Shintani, T., Watanabe, E., Sakaguchi, G., Katsuura, G., Manabe, T. and Noda, M., Age-dependent enhancement of hippocampal LTP and impairment of spatial learning through the ROCK pathway in protein tyrosine phosphatase receptor type Z-deficient mice, *Journal of Neuroscience* 25, 1081–1088 (2005)
4. Watanabe, E., Hiyama, T.Y., Shimizu, H., Kodama, R., Hayashi, N., Miyata, S., Yanagawa, Y., Obata, K., and Noda, M., Sodium-level-sensitive sodium channel Nax is expressed in glial laminate processes in the sensory circumventricular organs, *American Journal of Physiology* 290, R568–R576 (2006)

特許出願 なし

【総説】

1. 渡辺英治、野田昌晴
ナトリウムチャネルの構造と機能
神経研究の進歩 Vol. 47: 159–168 (2003)
2. 渡辺英治
脳のナトリウムレベルセンサー
神経化学 Vol. 42: 75–87 (2003)
3. 渡辺英治
中枢神経系による塩分摂取制御機構
日本味と匂学会誌 Vol.10: 207–216 (2003)

【学会発表】

1. T. Y. Hiyama, E. Watanabe and M. Noda
Control mechanism of sodium intake behavior by CNS
Society for Neuroscience (32nd Annual Meeting, 2002; Orland, USA)

2. E. Watanabe, T. Y. Hiyama, K. Ono, K. Inenaga, M. M. Tamkun, S. Yoshida and M. Noda
Nax sodium channel involved in CNS sodium-level sensing
Society for Neuroscience (32nd Annual Meeting, 2002; Orlando, USA)
3. E. Watanabe, T. Y. Hiyama, R. Kodama and M. Noda
Cellular localization and distribution of Nax sodium channel
日本神経化学会(第46回;新潟)
4. 檜山武史、渡辺英治、野田昌晴
塩分摂取行動の制御は脳弓下器官の Nax ナトリウムチャンネルが担う
日本神経化学会(第46回;新潟)
5. 檜山武史、渡辺英治、野田昌晴
脳内 Na⁺センサー: Nax チャンネルの生理的役割。
生理学研究所「バイオセンサー研究会」
6. 渡辺英治、檜山武史、児玉隆治、岡戸晴生、野田昌晴
グリア細胞における Nax チャンネルの局在と機能。
日本神経科学会大会(第27回)・日本神経化学会大会(第47回)合同大会(大阪)
7. 檜山武史、渡辺英治、岡戸晴生、野田昌晴
塩分摂取行動の制御は脳弓下器官の Nax チャンネルが担う。
日本神経科学会大会(第27回)・日本神経化学会大会(第47回)合同大会(大阪)
8. E. Watanabe, T. Y. Hiyama, H. Shimizu, R. Kodama, N. Hayashi, S. Miyata, Y. Yanagawa, K. Obata
and M. Noda
Sodium-level-sensitive sodium channel Nax in glial cells ensheathing GABAergic interneurons in
the subfornical organ.
日本神経科学大会(第28回;横浜)
9. H. Shimizu, T. Y. Hiyama, E. Watanabe and M. Noda
Screening of binding proteins to mouse Nax channel.
日本神経科学大会(第28回;横浜)