

脳のナトリウム受容における分子メカニズムの解明

渡邊栄治

岡崎国立共同研究機構・基礎生物学研究所

ヒトが塩分を摂取する場合、舌でその塩分濃度を感知する他に、脳内でも体液中のナトリウム濃度を受容し、適度な塩分摂取がコントロールされる。しかしながら、脳内でのナトリウム濃度を受容するメカニズムは全く不明であった。本研究では、Naxと呼ばれるナトリウムチャンネルが脳のナトリウム受容器であることの可能性を追求した。

Naxは永らく生理機能が不明のチャンネル分子であった。申請者はNax遺伝子ノックアウトマウスを作製し、①体液中の水と電解質レベルの受容器とされる脳室周囲器官に発現していること、②同マウスは塩分を過剰に摂取することを明らかにした。これらの結果から Na_x チャンネルは脳での体液ナトリウムレベル受容に深く関与していると考えられた。

今回、細胞外ナトリウム濃度を溶液灌流または微量薬物投与装置による噴射で変化させ、Naxチャンネルが流入させるナトリウムを Na^+ 感受性色素(SBFI)によるナトリウムイメージング法で観察した。結果、Naxは細胞外のナトリウムが生理的な濃度より上昇すると、細胞内にナトリウムイオンを流入させるチャンネルであることが判明した。よってNaxチャンネルは、脳室周囲器官で体液ナトリウム濃度を検出しているナトリウムセンサーであることが示唆された。

また、神経細胞以外でのNaxの発現分布を解析したところ、肺胞II型細胞と髄鞘非形成型シュワン細胞に発現を認めた。これらの細胞では、細胞外ナトリウムイオン濃度の恒常性に重要な役割があると考えられる。

14

助成番号 0245

脳のナトリウム受容における分子メカニズムの解明

渡邊栄治

岡崎国立共同研究機構・基礎生物学研究所

1. 研究目的

ヒトが塩分を摂取する場合、舌でその塩分濃度を感知する他に、脳内でも体液中のナトリウム濃度を受容し、適度な塩分摂取がコントロールされる。しかしながら、脳内でのナトリウム濃度を受容するメカニズムは全く不明であった。本研究では、 Na_x と呼ばれるナトリウムチャンネルに着目した。

Na_x は永らく生理機能が不明のチャンネル分子であった。申請者は、 Na_x 遺伝子ノックアウトマウスを作製し、①体液中の水と電解質レベルの受容器とされる脳室周囲器官に発現していること、②同マウスは塩分を過剰に摂取することを明らかにしてきた。これらの結果から申請者は、 Na_x チャンネルは脳で体液ナトリウムレベルを感知している濃度依存性ナトリウムチャンネルの可能性があると提唱している。本研究では、イオンイメージング法とパッチクランプ法によって、 Na_x チャンネルが細胞外液の Na^+ 濃度変化によって開閉することかどうかを検証した。また、神経細胞以外での Na_x チャンネルの発現パターンを抗体染色とX-gal染色によって調べた。

2. 研究方法

2.1 抗 Na_x 抗体

Na_x に特異的な抗体は、ラットの Na_x ペプチド (SVSETVPIASGESDIK) をヘモシアニンに結合させ白色ウサギに免疫して作製した。血清は抗原に使用したペプチドを結合させた Folmyl-Cellulofine カラムで精製した。特異性については、ウエスタンブロットと免疫組織染色で確認した。遺伝子欠損マウスの組織では陽性シグナルは観察されなかった。

2.1 イオンイメージング法

細胞内ナトリウムイオン濃度の測定には、sodium-binding benzofuran isophthalate (SBFI)を使用した。培養細胞に $4 \mu M$ の濃度でSBFIを導入した。蛍光比 (F340/F380) は、冷却型CCDカメラでモニターした。データはイメージングソフトウェア (AQUACOSMOS) で、30秒ごとに集めた。培養細胞は記録前に生理

的に等張液 (145 mMのナトリウムイオン濃度) で30分から60分インキュベートした。刺激溶液は、1 ml/分の流速で細胞上に流した。詳細は文献 (1) に記した。

2. 2 パッチクランプ法

電位クランプ記録は一般的なホールセルパッチクランプ法によって行った。パッチピペットの抵抗値は5から7 M Ω に設定した。直径20 μ m以下の神経細胞を-60 mVに電位クランプし、細胞に流れる全電流を測定した。データは7から20 M Ω のものを集めた。詳細は文献 (1) に記した。

2. 3 Na_x発現ベクター

6.1 kbのマウスNa_xc DNAフラグメントを使用した (Genbank# L36179)。同フラグメントを、pIRES2-EGFP(Clontech)のIRES-EGFP領域と入れ替える形でベクターを作製した。コントロールベクターとしては、オリジナルのpIRES2-EGFPを使用した。

2. 4 細胞培養、免疫染色、X-gal染色

一般的に用いられている方法で行った。詳細は文献 (1と2) を参考。

3. 研究結果

3. 1 脊髄後根神経節細胞

Na_x由来の細胞応答を、ナトリウム感受性色素を使用して検討した。SFO あるいは OVLТ の中では一部の神経細胞のみがNa_xを発現することから、実験には全ての細胞がNa_x陽性である後根神経節(DRG)細胞を用いた。NaCl 溶液の灌流により、細胞外ナトリウム濃度([Na⁺]_o)を145 mM(コントロール)から170 mM(高ナトリウム溶液)に増加させた時、野生型マウス由来の全ての単離 DRG 神経は、細胞内ナトリウム濃度([Na⁺]_i)の顕著な増加を示した。一方、この[Na⁺]_iの著しい増加は、Na_x遺伝子欠損マウスから単離した DRG 神経ではまったくみられなかった。野生型若しくはNa_x遺伝子欠損マウス由来のいずれの細胞も、「高ナトリウム溶液」に相当する浸透圧や塩化物イオン濃度([Cl⁻]_o)の上昇に対しては応答しなかった。しかしながら、メタンサルホン酸ナトリウムを用いてナトリウム濃度を上げた時にはこの応答が出現した。このように、神経細胞は浸透圧あるいは[Cl⁻]_oの上昇ではなく[Na⁺]_oの上昇に応答することが判明した。最大[Na⁺]_i増加速度の半値に相当する[Na⁺]_o、C_{1/2}は、159 mMであった。一方、[Na⁺]_oを145 mMから低下させた時には、[Na⁺]_i応答は観察されなかった。感受性電位依存性ナトリウムチャンネルの阻害剤であるテトロドトキシシン (TTX) は、この応答を阻害しなかった。(Fig.1)。

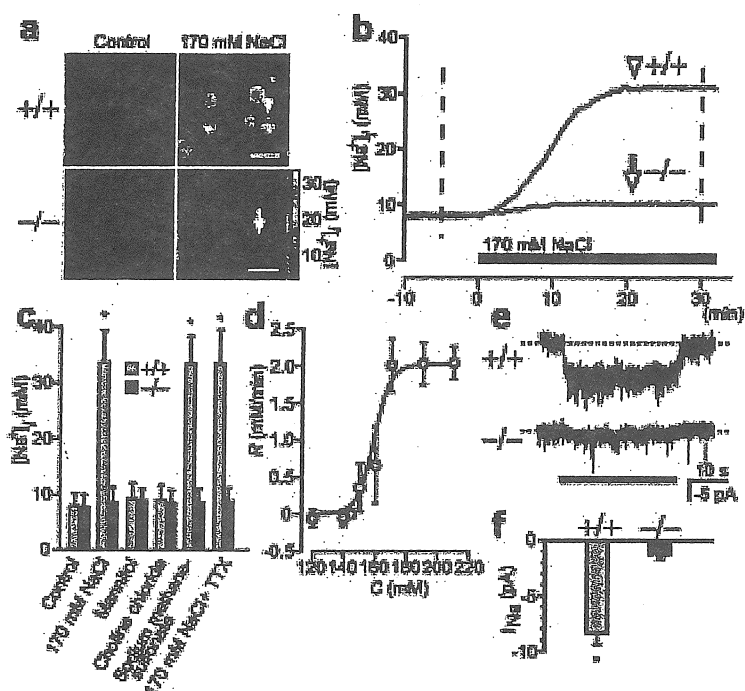


Fig. 1. Na_x is a sodium level-sensitive sodium channel. (a) Pseudocolor images showing [Na⁺]_i of the cells in the control solution ([Na⁺]_o = 145 mM) and high sodium solution ([Na⁺]_o = 170 mM) at the time indicated with vertical broken lines in (b), respectively. +/+ and -/- indicates neurons derived from the wild-type and Na_x-null mice, respectively. Scale bars, 50 μm. (b) Time course of [Na⁺]_i responses of the cells with an arrowhead and arrow in a. Time 0 indicates the time when the extracellular fluid was changed. (c) [Na⁺]_i response is dependent on [Na⁺]_o, but not on extracellular [Cl⁻]_o or osmotic pressure. Instead of NaCl, 50 mM mannitol, 25 mM choline chloride, or 25 mM sodium methanesulfonate was added to the control solution, respectively (asterisk, *p* < 0.01; paired t-test; *n* = 85). Data are shown as average [Na⁺]_i ± SD. (d) Relation between [Na⁺]_i-increase rate (*R*) and [Na⁺]_o. *R* was calculated from the slope between 20% and 80% of the maximum [Na⁺]_i. The solid line is the fit of the data to the equation $R = R_{\text{Max}} / (1 + \exp((C_{1/2} - C)/a))$, where $C = [\text{Na}^+]_o$ with values of $R_{\text{Max}} = 2.02$ mM/min, $C_{1/2} = 159$ mM, and $a = 5.21$ mM, respectively. *n* = 21. (e) Whole-cell current responses of DRG neuron to the increase of [Na⁺]_o from 145 to 170 mM (bar). (f) The mean amplitudes of the whole-cell currents observed in +/+ and -/- cells (asterisk, *p* < 0.05 by paired t-test; *n* = 10).

パッチクランプ技術を用いて野生型マウス由来の DRG 神経細胞のホールセル電流記録を行うと、「高ナトリウム溶液」の曝露に応答して内向き電流が観察された。この

電流の大きさはイオンイメージングの結果から推定された値と一致した。この電流は「高ナトリウム溶液」条件の下では不活性化されず、細胞外のナトリウム濃度が正常に戻った時、急速に消失した。「高ナトリウム溶液」を投与中の電流に電位依存性は観察されなかった (Fig.1)。

さらにマウス Na_x の cDNA を使用して Na_x 発現ベクターを構築し、 Na_x 遺伝子欠損マウスから分離した DRG 神経細胞に導入した。[Na⁺]_o を 145 mM から 170 mM に増加させた時、野生型由来の神経細胞と同様の [Na⁺]_i 応答が現われた。以上の知見から Na_x が細胞外のナトリウム濃度の増加に感受性のある、新しいタイプのナトリウムチャンネルであることが明らかとなった (Fig.2)。

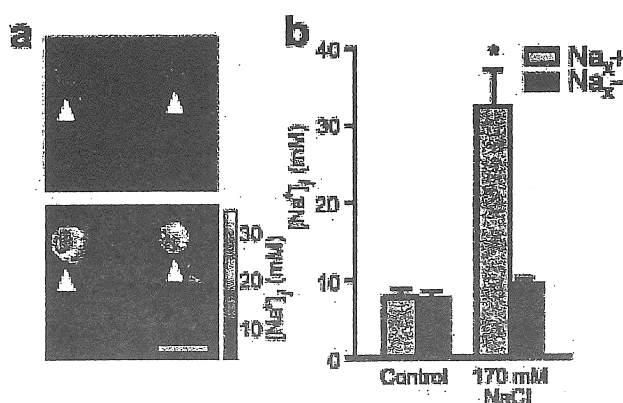


Fig. 2. Na_x cDNA transfection gave [Na⁺]_o sensitivity to Na_x -deficient cells. (a) GFP fluorescence image. The cell with arrowheads were transfected both with Na_x and EGFP expression vectors (top). Pseudocolor image showing [Na⁺]_i increase in the 170 mM solution (bottom). Scale bar, 50 μ m. (b) Bar histogram compares the response between cells cotransfected both with Na_x and EGFP expression vectors (Na_x ⁺) and cells transfected only with EGFP expression vector (Na_x ⁻). [Na⁺]_i was measured at 5 min after [Na⁺]_o reached to the plateau. (asterisk, $p < 0.05$ by paired t-test; $n = 30$).

3. 2 SFO細胞 (Fig.3)

同様の実験を SFO の細胞を用いて行った。同様の [Na⁺]_i 応答が野生型マウスの SFO から単離した神経細胞で観察され、[Na⁺]_i に応答する細胞はすべて Na_x 免疫陽性であった。一方、 Na_x 遺伝子欠損マウス由来の SFO 神経細胞はそのような応答を示さなかった。マウス Na_x cDNA 発現ベクターを Na_x 遺伝子欠損マウス由来の SFO 神経細胞に導入すると、DRG 細胞と同様に細胞のナトリウム感受性が回復した。

SFO において Na_x を発現する神経細胞を同定するため、SFO での Na_x の局

在を免疫染色によって調べた。免疫陽性の神経細胞は、ほとんど SFO の周辺部位で観察され、GABA 免疫陽性神経細胞と重複した。更に、SFO から分離された GABA 免疫陽性神経細胞はすべて細胞外のナトリウム濃度の増加に応答した (図には示していない)。

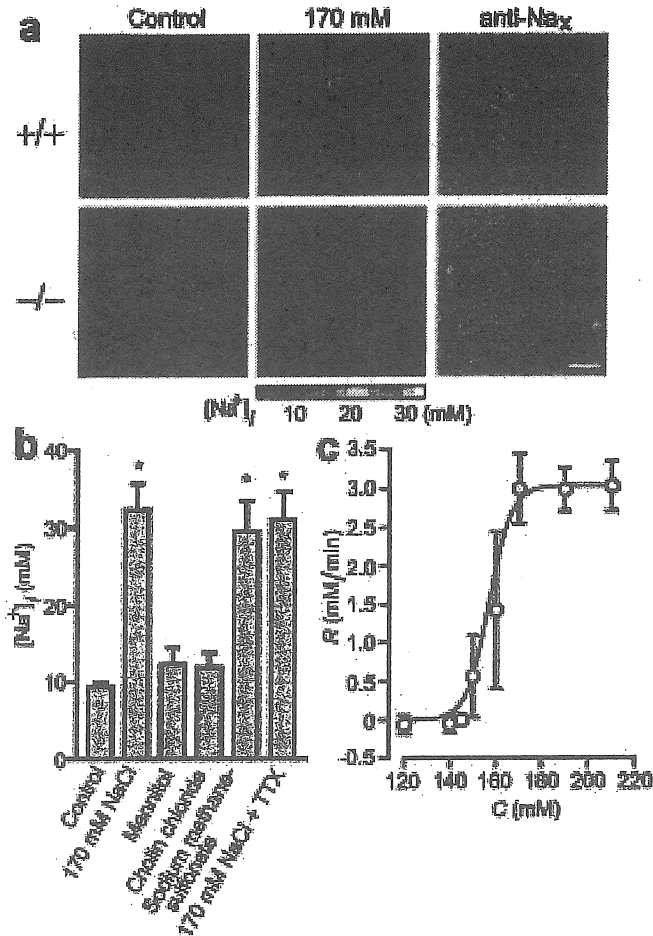


Fig. 3. Sodium-level sensitivity was lost in SFO neurons in the Na_x -null mutants. (a) Pseudocolor images showing $[Na^+]_i$ of the cells in the control solution and high sodium solution. Scale bar, 50 μ m. (b) $[Na^+]_i$ response is dependent on $[Na^+]_o$, but not on extracellular $[Cl^-]_o$ or osmotic pressure. Instead of NaCl, 50 mM mannitol, 25 mM choline chloride, or 25 mM sodium methanesulfonate was added to the control solution, respectively (asterisk, $p < 0.01$ by paired t-test; $n = 85$). (c) Relation between $[Na^+]_i$ -increase rate (R) and $[Na^+]_o$. $n = 20$. $R_{Max} = 3.04$ mM/min, $C_{1/2} = 157$ mM, and $a = 4.67$ mM.

3. 3 神経細胞以外での Na_x の発現分布

脳以外にも Na_x を発現する細胞があるかどうかを免疫染色及び X-gal 染色によ

って調べた。結果、肺胞Ⅱ型細胞が陽性であった (Fig.4)。肺胞を構成する主たる細胞は、肺胞Ⅰ型、肺胞Ⅱ型細胞、マクロファージなどである。肺胞Ⅰ型は扁平な形状をしており、肺胞構造を形成している細胞である。肺胞Ⅰ型細胞間にある丸く大型の細胞は肺胞Ⅱ型細胞と呼ばれる。肺胞Ⅱ型細胞は、サーファクタントと呼ばれる一種の界面活性剤を産出し、肺胞表面の表面張力を下げる役割をしている。肺胞Ⅱ型細胞はこれに加えて肺胞の表面から水分を取り除くのに重要な役割をしている。水を吸収しているのは水チャンネルアクアポリンを肺胞表面側に発現している肺胞Ⅰ型細胞であるが、この水の移動は肺胞内外の浸透圧の差によって駆動されている。この浸透圧差を生じさせているのが、肺胞Ⅱ型細胞に発現しているナトリウムチャンネルとNa/Kポンプであるとされる。すなわち、肺胞Ⅱ型細胞に発現するNa_xは浸透圧差を生じさせているナトリウムチャンネルの一つであることが考えられる。ただ、肺機能不全を示す表現型は遺伝子欠損マウスで観察されていない。肺胞Ⅱ型細胞はアミロイドに感受性の高いナトリウムチャンネルを発現しており、こちらが主たる役割を果たしていると考えられる。

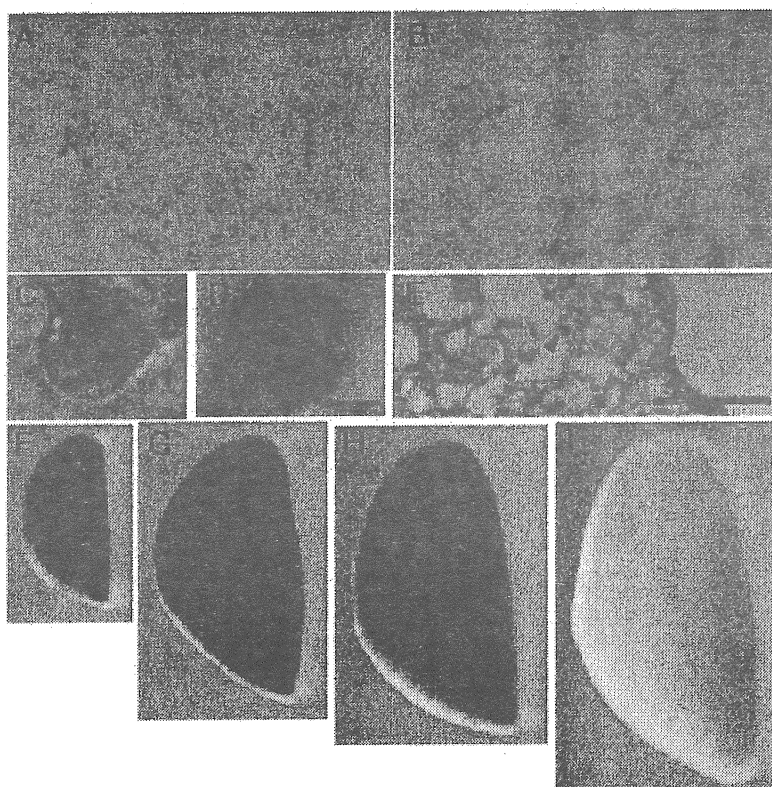


Fig. 4. Na_x expression in ATII cells in the lung. (A-E) Cryostat sections stained with X-gal (A), anti-Na_x antibody (B and C) and anti-SPB (D and E). Scale bars: 100 μ m in (E) for (A, B and E); 5 μ m in (D) for (C and D). (F-I) Whole mount lungs stained with X-gal. Tissues are from P0 (F), P7 (G), P14 (H) and adult (I).

肺胞Ⅱ型細胞以外では、非髄鞘形成型のシュワン細胞が陽性であった。ホールマウントしたサンプルを *lacZ* 染色して観察すると内臓の臓器にまわりつく神経束が強い陽性であることがよく分かる (Fig.5)。抗体で染色しても同様の染色像が観察される。電子顕微鏡を使って観察してみると、これはミエリンを巻いていないシュワン細胞である事が明らかとなった (Fig.6)。髄鞘形成されていない軸索が連続発火すると、細胞外のカリウム濃度が上昇することが知られる。この増加した細胞外カリウムイオンを吸収しているのが軸索周囲の非髄鞘形成型シュワン細胞である。シュワン細胞の $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ が効率よく細胞外のカリウムを吸収するためには、 $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ によって汲み出されたナトリウムイオンを再吸収する $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ の存在が必要なのかもしれない。

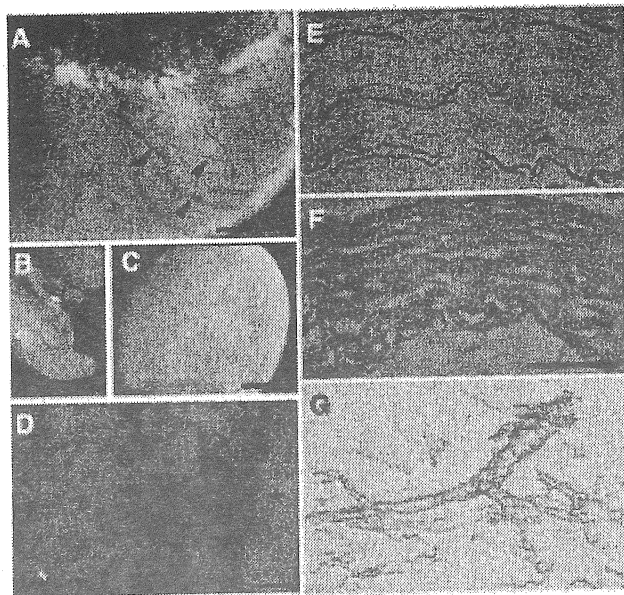


Fig. 5. Na_x in the visceral organs. The blue (A-D) and brown (E and G) signals represent expressions of *lacZ* and Na_x protein, respectively. Samples were derived from adult heterozygous mutant mice (A-D) and wild-type mice (E-G). (A) A whole-mount heart. Arrowheads indicate blood vessels in pale brown. The right ventricle is located to the left. (B) A whole-mount intestine (duodenum). (C) A whole-mount urinary bladder. The urethra is at the bottom. (D) The celiac plexus. An arrowhead points at the celiac ganglia and asterisks indicate the kidney. (E and F) Cryostat sections of lingual nerves stained with anti- Na_x (E) and anti-MBP (F). (G) A cryostat section of the body of tongue stained with anti- Na_x . Scale bars: 50 μm in (F) for (E) and (F), 100 μm for (G).

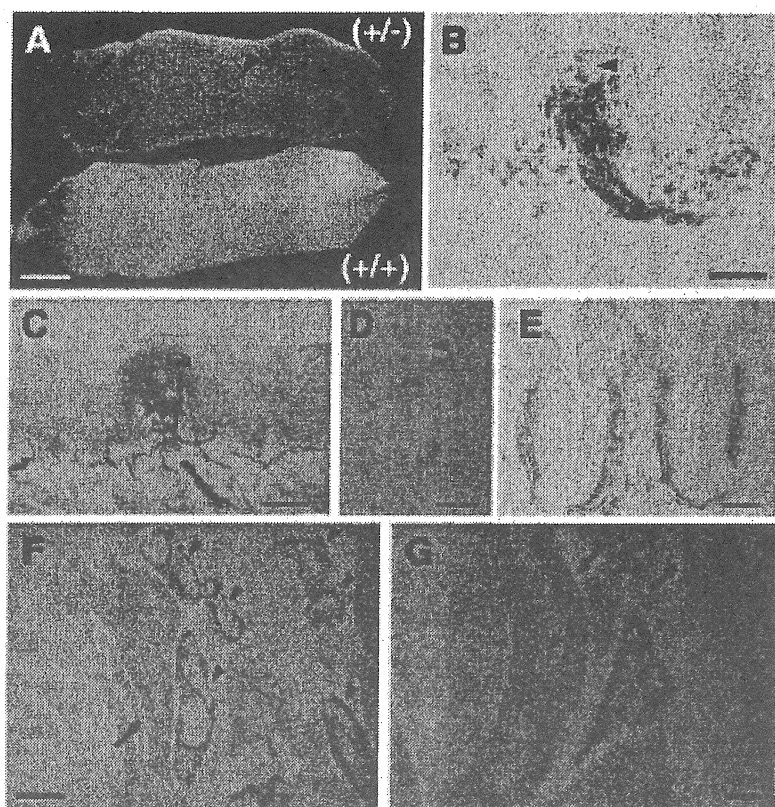


Fig. 6. Na_x expression in non-myelinating Schwann cells. (A) Whole-mount tongues stained with X-gal. An arrow indicates the vallate papilla and arrowhead points at a fungiform papilla. The tip of the tongue is towards the right. (+/-), heterozygous mouse; (+/+), wild-type mouse. (B and C) Vibratome sections (50 μ m thick) of fungiform papillae stained with X-gal (B) and anti- Na_x (C). (D) A cryostat section (8 μ m thick) of fungiform papillae stained with anti- Na_x . (E) A cryostat section of the vallate papilla stained with anti- Na_x . Arrowheads in (B)-(D) point at taste buds. (F and G) Immuno-electron micrographs of a region underneath fungiform taste buds stained with anti- Na_x . Arrowheads indicate immuno-positive non-myelinating Schwann cells. Arrows indicate the myelin sheath, and asterisks indicate myelinated axons. Scale bars: 100 μ m in (B, C and E); 50 μ m in (D); 1 μ m in (F) and 400 nm in (G), respectively.

4. 考察

DRGとSFO細胞を使用したイオンイメージングの結果から、 Na_x チャンネルが細胞外のナトリウムイオン濃度の上昇に応じて、細胞内にナトリウムイオンを流入

させるチャンネル分子であることが判明した。また、このことは遺伝子欠損マウスの細胞にNa_x発現ベクターを導入することによっても確認できた。またDRG細胞では電気生理学的手法によっても同様の電流を観測することができた。

脳の脳室周囲器官であるSFOにはNa_xチャンネルが特異的に発現しており、遺伝子欠損マウスは食塩摂取過剰という行動異常が観察されている。これらの知見に基き、SFOにおける塩分摂取行動制御機構について、ロッキング仮説を提案したい。体液のナトリウム濃度が上昇すると、Na_xを発現するGABA作動性抑制性神経細胞(確定的な結果ではないが、Na_xがGABA作動性細胞に発現していることを確認している)が活性化し、動物の塩分摂取行動を連続的に刺激している神経細胞の活動を停止するというものである。

今回、肺胞II型細胞や髄鞘非形成型シュワン細胞にも発現が明らかとなった。Na_xチャンネルは、中枢神経系だけでなく末梢器官中において、その特有の特性によってナトリウムバランスに関するいくつかの重要な生理作用に関係すると考えられる。

5. 今後の課題

今後の大きな課題として、Na_xチャンネルの開閉機構が挙げられる。これまで、ナトリウムイオンを受容して開閉するチャンネルは報告されていないため、その開閉機構は興味深い。Na_xナトリウムチャンネルの突然変異導入実験により知見が得られると考える。またNa_xがどのようにして動物の行動に影響を与えるのかも興味深い問題である。これにはSFO内部の神経回路を明らかにする必要があるだろう。

ナトリウムの過剰な摂取は、様々な生活習慣病を引き起こす可能性がある。Na_xチャンネルの研究を進めることによって、こうした疾病の予防を考える上で重要な知見を与えるものと期待できる。

6. 文献

- 1) Hiyama, T.Y., E. Watanabe, K. Ono, K. Inenaga, M.M. Tamkun, S. Yoshida and M. Noda: Na_x channel involved in CNS sodium-level sensing. *Nat. Neurosci.*, 5, 511-512, (2002)
- 2) Watanabe, E., T.Y. Hiyama, R. Kodama and M. Noda: Na_x sodium channel is expressed in non-myelinating Schwann cells and alveolar type II cells. *Neurosci. Lett.*, 330, 109-113, (2002)

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

Molecular mechanisms underlying sodium reception in the brain

Eiji Watanabe

Okazaki National Research Institutes, National Institute for Basic Biology

Summary

Mammals feel thirsty or salt appetite when the correct balance between water and sodium in the body fluid has been disrupted, but little is known about the sensing mechanism in the brain for the control of salt homeostasis. It has been postulated that the existence of both osmoreceptor and specific sodium receptor is essential to encompass the experimental data. In the osmoreception, stretch-sensitive channels and aquaporin-4 in the magnocellular neurosecretory cells, glial cells and ependymal cells in the supraoptic nucleus and subfornical organ (SFO) are thought to be involved. Here, we show that Na_x channel in the circumventricular organs (CVOs) is a candidate for the specific sodium receptor, using ion-imaging and whole-cell patch-clamp techniques. Na_x is a newly identified type of sodium channel that is sensitive to an increase in the extracellular sodium concentration, and is likely to be the sodium-level sensor of body fluids in the brain.

Furthermore, we examined the localization of Na_x throughout the visceral organs at the cellular level. In visceral organs including lung, heart, intestine, bladder, kidney and tongue, a subset of Schwann cells within the peripheral nerve trunks were highly positive for Na_x . An electron microscopic study indicated that these Na_x -positive cells were non-myelinating Schwann cells. In the lung, Na_x -positive signals were also observed in the alveolar type II cells, which actively absorb sodium and water to aid gas exchange through the alveolar surface. It was thus suggested that Na_x sodium channel is involved in controlling the local extracellular sodium level through sodium absorption activity.