

塩・浸透圧調節分子を介した母体高塩分食の胎仔脳発達過程への影響

福田 敦夫¹, 秋田 天平¹, 渡部 美穂¹, 武藤 弘樹¹, 秦 健一郎²

¹ 浜松医科大学医学部神経生理学講座, ² 国立成育医療研究センター周産期病態研究部

概要

1. 研究目的

食餌塩分量や浸透圧の変化に対して WNK-SPAK/OSR1 のリン酸化カスケードが応答し、その下流の NKCC1/KCC2 の活性変化により細胞内 Cl⁻濃度を調節し、Cl⁻チャネルである GABA_A 受容体のアゴニストに対する応答を変化させ血压や浸透圧の調節に関わる。そこで、これら浸透圧-Cl⁻ 調節系遺伝子の改変マウスを用い、脳の構造と機能の変化を解析する。

2. 研究方法

遺伝子改変マウス(WNK3-KO, KCC2 持続リン酸化, TauT-KO)の脳組織の発達への影響を解析し、その結果をもとに、母体高塩分食がタウリン, WNK, KCC2などを介して、胎仔脳の発達に重要な GABA 作用に摂動を与える可能性を示す。

3. 研究結果

TauT^{-/-}ではGABA_A受容体電流の最大振幅とシナプス後膜のGABA_A受容体が減少し、β3サブユニットのリン酸化も減少していた。KCC2の持続的疑似リン酸化マウス(KCC2 T906E/T1007E)では、神経細胞の配置に異常が見られ、静止的細胞内Cl⁻濃度は正常でもCl⁻汲出し能が低下しており、第4頸神経の自発性呼吸リズムが消失し、第2腰神経の歩行リズムも遷延していた。接触・痛覚・固有感覚など生理的感覚刺激でも全般けいれんを示す異常もみられた。WNK3-KOマウスでは静止膜電位が深く、膜抵抗と時定数の減少、発火閾値上昇、活動電位の立上り・立下り時間の延長とそれに伴う活動電位の持続時間延長、発火間膜電位上昇等により、連続発火など神経興奮性が著しく低下しており、内向き整流性K電流増大(K_{ir})が原因であった。また、WNK3-KOマウス母体への塩分負荷モデルを作製した。

4. 考察

TauT^{-/-}ではGABA_A受容体β3サブユニットのリン酸化の減少によりシナプス後膜への移行が減少している可能性が示唆された。また、脳の発達の時期にKCC2のThr906とThr1007のリン酸化が適切に制御されることが、KCC2の機能発現、発達期の神経回路形成、生後の神経機能の発達に重要な役割を持つことも示唆された。WNK3はK_{ir}を抑制し、かつ抑制性シナプス活動を低下させることで大脳皮質錐体細胞の興奮性を上昇させていることが示唆された。以上より、塩分調節や浸透圧調節に関わるTauT, WNK-SPAK/OSR1, KCC2などの分子が脳発達に関わるGABAシステム恒常性維持に必須であることが明らかとなった。

1. 研究目的

最近、高食塩食による高血圧発症メカニズムにおいて、視索上核のバゾプレッシンニューロンのKCC2(外向きK⁺-Cl⁻トランスポーター)⁽¹⁾発現が低下し、その結果、抑制

性神経伝達物質であるGABAによる抑制が減弱し、バゾプレッシン分泌が上昇することに起因することが報告された。しかしながら、申請者らはバゾプレッシンニューロンではもともとKCC2発現が弱く、細胞内Cl⁻濃度が高いため

GABAが抑制作用を持たない可能性を示しており、実際に証明もされている。さらに、高血圧自然発症ラット室傍核ではNKCC1(内向き Na^+ , K^+ - Cl^- トランスポーター)⁽²⁾の機能・発現が亢進しているためGABA抑制が減弱していることが示されている。したがって、食塩負荷によるバンプレッシンニューロンでのKCC2発現減少だけでは高血圧発症を説明しきれない。特に、塩分感受性遺伝性高血圧症の原因遺伝子として同定されたリン酸化酵素WNK^(1,3)は、単一の遺伝子異常でヒトにおいて塩分感受性高血圧を引き起こす分子であり、しかもKCC2とNKCC1の上流にあるので考慮されなければならない。事実、塩分負荷はwith-no-lysine protein kinase (WNK)のリン酸化を低下させ、その下流の、やはりセリンスレオニンキナーゼであるOSR1とSPAKのリン酸化を抑制し、更にその下流の基質である Cl^- トランスポーターのNKCC1活性の低下と、KCC2活性の上昇をもたらす塩分貯留を調節する。

海で誕生した最初の生命が、細胞機能を維持するため、海水の塩による浸透圧から生体を守る必要があり、タウリンを浸透圧調節物質として利用していたと考えられている。さらに進化の過程で陸上に上がった生物や魚類は腎臓や鰓といった体内の水と塩類の恒常性維持に重要な器官を発達させたが、タウリンなどの浸透圧調節物質も体内の浸透圧を維持するために働いている。興味深いことに胎児はタウリン合成能を持たないにも関わらず、母体から経胎盤的に胎児にタウリンが移行し、タウリントランスポーター(TauT)で細胞内に取り込まれ、浸透圧調節物質としての作用に加え高塩分食とは逆にWNK-SPAK/OSR1-NKCC1/KCC2のリン酸化カスケードを活性化してNKCC1機能を促進しKCC2機能を抑制する^(3,4)。つまり、細胞内のタウリンはWNKの作用を介して塩分調節にも寄与している。さらに、タウリンはGABA_A受容体に作用する内在性アゴニストでもあることから、塩分変化とタウリンおよびWNK-SPAK/OSR1-NKCC1/KCC2カスケードのGABAシステムに対する役割に着目した。

高塩分食は、脳内 Na^+ センサーNaxや Cl^- センサーWNKで感知され、前者は乳酸の供給により、後者はKCC2抑制とNKCC1の活性化により細胞内 Cl^- 濃度を変化させ、いずれもGABAニューロンを介して室傍核の Na^+ - Cl^- 代謝を調節する。つまり、GABAは塩分・浸透圧に対する室傍核の反応を制御する鍵分子である。また、発達期においてはタウ

リンがGABA以上に高濃度に脳に存在し、浸透圧変化に応答して容積感受性陰イオンチャネル(VSOR)からオスモライトとして放出され、GABA_A受容体を刺激して錐体細胞の移動を調節したり、TauTにより細胞内に能動的に取り込まれてWNKを活性化する⁽⁴⁾。つまり、浸透圧調節物質のタウリンは Cl^- センサー/浸透圧調節因子のWNKとつながっており、さらにGABA_A受容体の内因性アゴニストとして重要な生理活性を持つ。特に注目すべきは、神経系発生時における脳脊髄液は羊水そのものであり、タウリンが濃縮されていることである。そして、その脳脊髄液に接する脳室周囲の視床下部は神経系の中で最も早くKCC2が発現する部位でもある。

脳の形成・発達は神経細胞の発生・移動・シナプス形成の各段階を経るが、これらの諸段階で遺伝的因子と環境的因子により正常発達からの軽微な逸脱が生じうる。統合失調症や自閉症スペクトラム障害など、脳機能の広汎な発達の障害が基盤にあると考えられる精神疾患では、胎児期の脳発達は極めて重要な意味を持ち、遺伝的プログラミングの過程でダイナミックに環境の影響をうける(遺伝-環境相互作用)。つまり、環境因子は遺伝子発現を修飾、あるいはその異常を増幅し、病態形成に影響する。妊娠中の高血圧はその結果でもある低出生体重とともに統合失調症や自閉症などの精神疾患のリスクを高めるというエビデンスがある。一方で、これらの疾患ではWNK-SPAK/OSR1-NKCC1/KCC2カスケードの何らかの異常が示唆されており、GABAの機能不全との関連にも多くのエビデンスがある。そこで母体の塩分ストレスに反応する胎児について、浸透圧- Cl^- 調節系とGABA-視床下部反応に着目し、遺伝子改変マウス(WNK3-KO, KCC2 持続リン酸化, TauT-KO)を用いて、脳組織の発生・分化・シナプス形成にどのような生理的役割を持っているのかを解析する。その結果をもとに、母体食餌中の塩分やタウリン、WNK, NKCC1/KCC2などの因子に働き、胎児脳の発達に重要な役割を持つGABA作用^(2,4,5)のモーダルシフトに摂動を与え、胎児脳の発達に影響することを示す。

2. 研究方法

塩分-血圧調節機構において食餌塩分量の変化や浸透圧の変化に対して浸透圧- Cl^- 調節系のWNK-SPAK/OSR1のリン酸化カスケードが応答し、その

下流の NKCC1/KCC2 の活性を変化させることにより細胞内 Cl⁻濃度を調節し、その結果 Cl⁻チャネルである GABA_A 受容体のアゴニスト(GABA やタウリン)に対する応答を変化させ血圧や浸透圧の調節に関わる。そこで、この経路の分子による影響を明らかにするため、浸透圧-Cl⁻ 調節系遺伝子の改変マウスを用い、その脳の構造と機能の変化に対する解析を行った。

2. 1 TauT-KO マウス脳の解析:

タウリンは中枢神経系に豊富に存在する含硫アミノ酸である。細胞外では GABA_A 受容体、グリシン受容体の部分的アゴニストとして機能し、細胞内には TauT により取り込まれ、WNK1シグナル経路を活性化することが知られている⁽³⁾。本研究では、生後 21±2 日の TauT-KO (TauT^{-/-}, TauT^{+/-}) および野生型マウスを用いて、大脳皮質性感覚野II/III層の錐体細胞について、パッチクランプ法を用いた電気生理学的膜特性の解析、蛍光免疫染色を行い、さらにウェスタンブロット法を用いて大脳の GABA_A 受容体リン酸化状態の解析を行った。また、生後 8 週齢で行動の解析を行った。

2. 2 KCC2 リン酸化部位特異的変異マウス脳の解析:

WNK による KCC2 のリン酸化部位特異的変異による持

続的疑似リン酸化マウス(KCC2 T906E/T1007E)を用いた (Fig. 1)。EdU による細胞分裂アッセイで導入当日に発生した細胞 (EdU 陽性) を同定し錐体細胞などの発生と移動⁽⁴⁾ を解析した。KCC2 機能や神経回路活動の解析をパッチクランプ法で電気生理学的におこなった。

2. 3 WNK3-KO マウス脳の解析:

WNK3 は X 染色体上にあるので、ヘテロ型メス WNK3 (X-X⁺)とノックアウトオス WNK3 (X-Y)を交配し、出生したオスの野生型 WNK3 (X⁺Y)とノックアウト WNK3 (X-Y)を比較した。WNK-SPAK/OSR1-NKCC1/KCC2 のリン酸化カスケードは Cl⁻ ホメオスタシスを変化させ GABA 作動性抑制のトーンを変化させるので⁽¹⁻³⁾、WNK3 KO マウスの神経細胞の全般的な電気生理学的特性の変化および微小抑制性シナプス後電流 (mIPSC) を大脳皮質内側前頭前野の第 5 層の錐体細胞からパッチクランプで解析した。

2. 4 WNK3-KO マウス母体への塩分負荷モデル作製:

ヘテロ型メス WNK3 (X-X⁺)とノックアウトオス WNK3 (X-Y)を交配し、母獣の食餌中塩分(0.5% wt/wt)を妊娠 10.5-19.5 日に 4% wt/wt に増加させ、食塩水(1%)を飲ませたモデルを作製した。

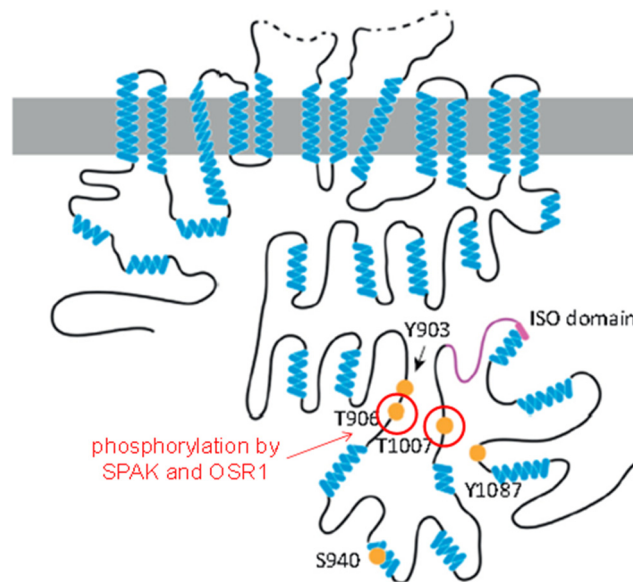


Fig. 1. Schematic illustration of important regulatory phosphoresidues of KCC2

Orange dots indicate the positions of phosphoresidues in the cytoplasmic C terminus of KCC2, that are critical for functional regulation. Of these, threonine 906 (T906) and threonine 1007 (T1007) are phosphorylation site (red circles) for SPAK/OSR1 downstream of WNK1-4. Taurine increases phosphorylation these sites by inducing phosphorylation of their upstream kinases, e.g., SPAK/OSR1 and WNK1. (adapted fromm Kahle et al.)⁽¹⁾

3. 研究結果

3.1 TauT-KO マウス脳の解析:

微小抑制性シナプス後電流 (mIPSC) の解析では, TauT^{+/+}および TauT^{-/-}は野生型マウスと比較して mIPSC の振幅が低下していた。TauT^{-/-}マウスの細胞内にタウリンを加えることで mIPSC の振幅は増加した。一方で, GABA_A 受容体, グリシン受容体を介したトニック電流は genotype 間で差がみられなかった。GABA の濃度応答曲線による解析では, GABA_A 受容体の感受性自体は genotype 間で差はみられないが, TauT^{+/+}および TauT^{-/-}では野生型と比較して GABA_A 受容体電流の最大振幅の低下がみられた。蛍光免疫染色では, genotype 間で抑制性シナプス前終末の数に差はみられなかった。一方, 野生型マウスと比較して TauT^{+/+}および TauT^{-/-}ではシナプス後膜の GABA_A 受容体の蛍光強度が低下していた。ウェスタンブロット法で TauT^{-/-}は野生型と比較して GABA_A 受容体 $\beta 3$ サブユニットのリン酸化が減少していることが示された。生後 8 週齢で行動の解析では体重に有意な低下が認められたが, オープンフィールドでの総移動距離に異常は見られなかった。

3.2 KCC2 リン酸化部位特異的変異マウス脳の解析:

WNK による KCC2 のリン酸化部位特異的変異による持続的疑似リン酸化マウス (KCC2 T906E/T1007E) を作製した (Fig. 1)。KCC2 T906E/T1007E マウスでは KCC2 の 906 番目 (Thr906) と 1007 番目 (Thr1007) のスレオニン残基をグルタミン酸に置換するミスセンス変異を導入することにより, この部位が恒常的にリン酸化されている。このマウスを用いて以下の結果を得た。EdU による細胞分裂アッセイで導入当日 (胎生 14.5 日) に発生した細胞 (EdU 陽性) を同定し, 錐体細胞などの発生と移動を解析した。中隔核, 海馬, 大脳皮質では EdU 陽性細胞数が減少しており, 視床下部では増加していた。スパイン形成は正常に認められた。また, これらのマウス脳の発達過程の異常を, パッチクランプを用いて電気生理学的に明らかにした。細胞内 Cl⁻濃度に変化は認められなかったが, KCC2 の Cl⁻くみ出し能が低下しており, 脊髄第 4 頸神経より記録される自発性の呼吸リズムがみられず, 第 2 腰神経より記録される歩行リズムが遷延していた。生後数時間しか生存しないが, 感覚刺激に対する反応を解析した。接触刺激 (筆でなでる), 痛覚刺激 (しっぽをピンセットで軽くつまむ), テールサスペンション (しっぽから逆さに吊す) により, 全般けい

れんが認められ, 死亡前には自発発作の頻度の増加がみられた。

3.3 WNK3-KO マウス脳の解析:

静止膜電位が深く, 膜抵抗と時定数の減少, 発火閾値上昇, 活動電位の立上り・立下り時間の延長とそれに伴う活動電位の持続時間延長 (Fig. 2), 発火間膜電位上昇等により, 連続発火など神経興奮性が著しく低下していた。上記の所見は電位依存性 K 電流の増大を示唆していたので, active WNK3 kinase によるレスキュー, Ba²⁺ 感受性の検討, GABA_B 受容体関与の検討の結果, 内向き整流性 K 電流 (Kir) が活性化していると結論した。また抑制性シナプス活動頻度が上昇し興奮性シナプス活動頻度は逆に減少していた。

3.4 WNK3-KO マウス母体への塩分負荷モデル作製:

WNK3 (X-X⁺) と WNK3 (X-Y) を交配し, 妊娠 WNK3 (X-X⁺) の食餌中塩分でコントロール群と高食塩食群に分けて作製した。出生仔の脳スライス標本を作成し, 錐体細胞の膜特性および GABA 作動性シナプス入力特性を解析比較した。

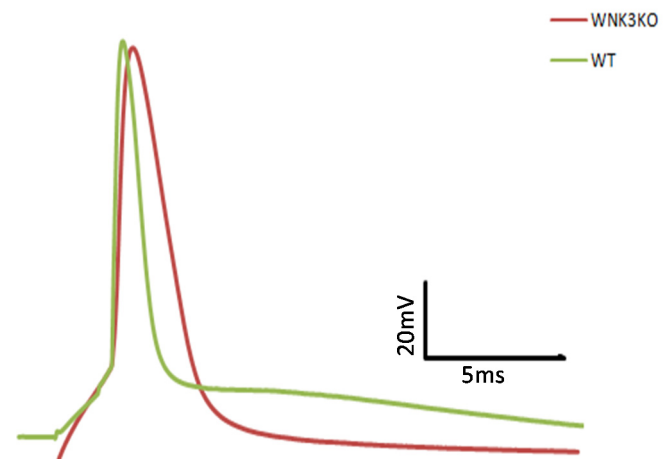


Fig. 2. Representative single action potential traces of Layer V pyramidal neurons in medial prefrontal cortex
Note that WNK3 KO (red) demonstrated deeper resting potential, slower rise and decay times, resulting in prolonged duration as compared to WT littermate (green).

4. 考 察

TauT-KO マウスでは抑制性シナプスの GABA_A 受容体数の減少が示唆された。GABA_A 受容体 $\beta 3$ サブユニットのリン酸化が減少することによりポストシナプスにおける GABA_AR の細胞表面への発現が減少している可能性が示唆された (Fig. 3)。また、脳の発達の時期に KCC2 の Thr906 と Thr1007 のリン酸化が適切に制御されることが、KCC2 の機能発現、発達期の神経回路形成、生後の神経機能の発達に重要な役割を持つことが明らかになった。従来大脳での発現が遅く、成人とは異なり新生児・乳児期でんかんへの関与は小さいと考えられてきた KCC2 は、発現の早い間脳以外でも機能発現しており、その機能低下はてんかん原性になりえると考えられた⁽⁶⁾。また、WNK3 は Kir を抑制し、かつ抑制性シナプス活動を低下させることで大脳皮質錐体細胞の興奮性を上昇させていることが示唆された。以上より、塩分調節や浸透圧調節に関わる

TauT, WNK-SPAK/OSR1, KCC2 などの分子が GABA システムの正常な発達に必須であることが明らかとなった。

5. 今後の課題

TauT-KO でのオープンフィールドでの総移動距離に異常は見られなかったが、中央区画への侵入頻度と時間に低下傾向が見られたので、今後例数を増やす必要がある。最近 OSR1 によるリン酸化が Kir 機能を抑制する可能性が報告された⁽⁷⁾。WNK3 が Kir を抑制し、抑制性シナプス活動を低下させるメカニズムとして、WNK-SPAK/OSR-NKCC1/KCC2 カスケードのリン酸化状態を今後確認する必要がある。以上から母体の塩分摂取量が胎仔の WNK-SPAK/OSR1 のリン酸化反応を介して、KCC2, NKCC1 による Cl⁻ホメオダイナミクス調節と GABA システムを介して⁽²⁾、神経発達に影響を与える母仔相関を解明する道筋ができた。

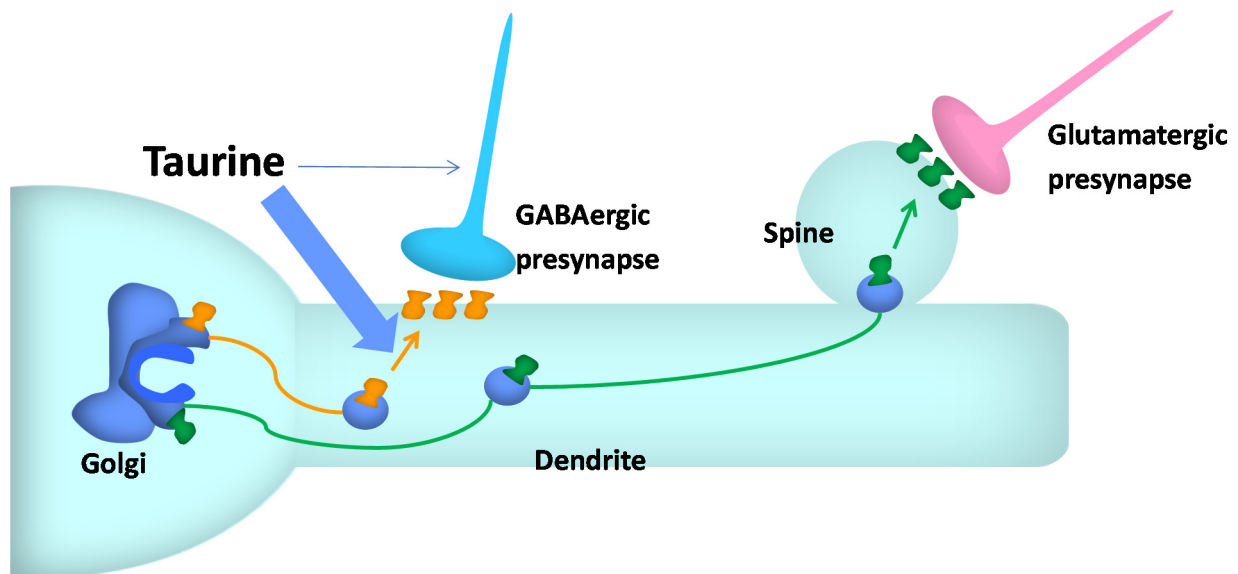


Fig. 3. Intracellular taurine affects the GABA_AR trafficking

Taurine is reported to modify protein phosphorylation, such as WNK-SPAK/OSR1⁽³⁾. So it is possible that taurine affects GABA_AR trafficking via alteration of phosphorylation state of $\beta 3$ subunit.

6. 文献

1. Kahle KT, Deeb TZ, Puskarjov M, Silayeva L, Liang B, Kaila K, Moss SJ. Modulation of neuronal activity by phosphorylation of the K-Cl cotransporter KCC2. *Trends Neurosci* 36: 726-737, 2013.
2. Watanabe M and Fukuda A. Development and regulation of chloride homeostasis in the central nervous system. *Front Cell Neurosci* 9: 371, 2015.
3. Inoue K, Furukawa T, Kumada T, Yamada J, Wang T, Inoue R, Fukuda A. Taurine inhibits the K⁺-Cl⁻ cotransporter KCC2 to regulate embryonic Cl⁻ homeostasis via the with-no-lysine (WNK) protein kinase signaling pathway. *J Biol Chem* 287: 20839-20850, 2012.
4. Kilb W, Fukuda A. Taurine as an essential neuromodulator during perinatal cortical development. *Front Cell Neurosci* 11: 328, 2017.
5. Luhmann HJ, Fukuda A, Kilb W. Control of cortical neuronal migration by glutamate and GABA. *Front Cell Neurosci* 9: 4, 2015.
6. Saitsu H, Watanabe M, Akita T, Ohba C, Sugai K, Ong WP, Sciraishi H, Yuasa S, Matsumoto H, Beng KT, Saitoh S, Miyatake S, Nakashima M, Miyake N, Kato M, Fukuda A, Matsumoto N. Impaired neuronal KCC2 function by biallelic *SLC12A5* mutations in migrating foal seizures and severe developmental delay. *Sci Rep* 6, 30072, 2016.
7. Taylor IV, CA, An S-W, Kankanamalage SG, Stippec S, Earnest S, Trivedi AT, Yang JZ, Mirzaei H, Huang C-L, Cobb MH. OSR1 regulates a subset of inward rectifier potassium channels via a binding motif variant. *Proc Natl Acad Sci* 115: 3840-3845, 2018.

Influence of Maternal High Salt Diet on Fetal Brain Development Via Osmotic and Na, Cl Modulators

Atsuo Fukuda¹, Tenpei Akita¹, Miho Watanabe¹, Hiroki Mutoh¹, Kenichiro Hata²

¹ Department of neurophysiology, Hamamatsu University School of Medicine

² Department of Maternal-Fetal Biology, National Research Institute for Child Health and Development

Summary

We are interested in the Cl⁻ homeodynamics and multimodal GABA actions. We used WNK3 knock-out (KO) mice, since WNK family kinases are essential elements in the signaling cascade regulating Cl⁻ concentrations after salt intake. WNK family kinases are known to phosphorylate KCC2 at two threonine (Thr⁹⁰⁶ and Thr¹⁰⁰⁷) residues via downstream kinases, SPAK/OSR1. So, we engineered mice with the missense mutations Glu⁹⁰⁶ and Glu¹⁰⁰⁷ (*Kcc2^{e/e}*) to mimic constitutive phosphorylation. Intracellular taurine imported by taurine transporter (TauT) activate the signaling cascade of WNK1 and SPAK/OSR1, hence we also used TauT KO mice.

In TauT KO mice, the amplitude of miniature inhibitory postsynaptic currents decreased. Although dose-response of GABA_A receptor (R) indicated no differences in sensitivity, the maximum currents and $\gamma 2$ subunit immunostaining were significantly decreased, indicating reduced numbers of postsynaptic GABA_ARs in TauT KO mice. In WNK3 KO, neuronal excitability was significantly reduced, e.g., hyperpolarized resting membrane potential (RMP), decreases in input resistance and membrane time constant, and resultant increase in the action potential threshold current. Inwardly rectifying potassium conductance (IRK) underlying RMP was enhanced and injection of WNK3 to recorded neurons restored this enhancement. Thus, WNK3 regulates IRK via phosphorylation of downstream kinases, e.g., SPAK/OSR1. Phosphorylation of KCC2 at Thr⁹⁰⁶ and Thr¹⁰⁰⁷, which inhibits KCC2 activity, decreases with an increase in KCC2 activity and the lowering of neuronal [Cl⁻]_i during brain development. *KCC2^{e/e}* mice demonstrated abnormal neuronal distribution, status epilepticus provoked by mild physiological stimulation, normal resting [Cl⁻]_i but with significantly impaired Cl⁻ extrusion capacity after Cl⁻ loading, a lack of spontaneous respiratory discharge and an altered locomotor rhythm. Thus, precisely regulated KCC2 Thr⁹⁰⁶/Thr¹⁰⁰⁷ phosphorylation is essential for activity-dependent Cl⁻ extrusion required for normal brain development.