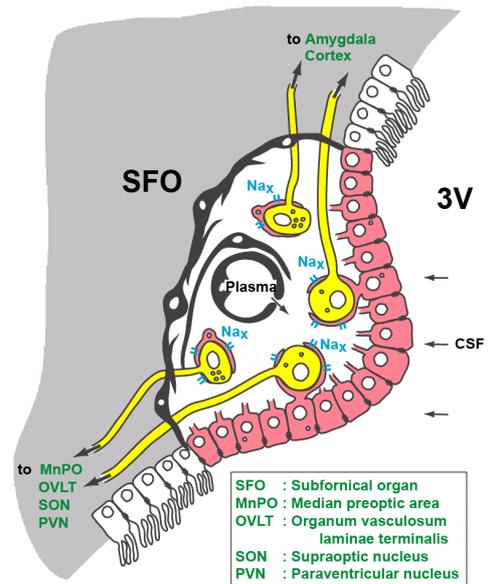


発表番号 63 (0536)

塩分摂取行動制御に関わる神経制御機構

檜山 武史 (自然科学研究機構基礎生物学研究所)

Na_x は、電位型ナトリウムチャネルファミリー属するナトリウムチャネルである。 Na_x 遺伝子ノックアウトマウスを用いた我々の最近の研究から、 Na_x チャネルが哺乳類では塩分と水分の恒常性の中枢とされる脳室周囲器官(CVO)に発現し、体液のナトリウムレベルセンサーとして機能することが明らかとなってきた。 Na_x チャネルによって検出された情報が脳室周囲器官の活動へ移される細胞メカニズムを理解するために、本研究において Na_x の細胞内局在を調べた。免疫二重染色と免疫電子顕微鏡解析から、 Na_x が上皮細胞と星状細胞から延びるニューロンを取り巻く膜状突起に局在することが分かった。さらに、CVO の一つ脳弓下器官(SFO)から単離した細胞を用いてイオンイメージングを行なった所、グリア細胞が細胞外ナトリウムレベルの増加に感受性があった。これらの結果は Na_x チャネルを発現するグリア細胞が体液ナトリウムレベルの生理的増加を検出する中心的役割を担っていることを示唆すると共に、ニューロンを取り巻くことによって CVO の神経活動を制御すると考えられた。以上より、非興奮性のグリア細胞と興奮性の神経細胞の間の密接なコミュニケーションが、塩分恒常性の中枢制御の基礎となっていることが示唆された。



脳弓下器官(SFO)における Na_x 発現グリア細胞(赤)とニューロン(黄)

助成番号 0536

塩分摂取行動制御に関わる神経制御機構

檜山 武史 (自然科学研究機構基礎生物学研究所統合神経生物学研究部門)

①研究の目的

ナトリウムイオンは生体の浸透圧活性の 90%以上を担っており、体液中のナトリウムイオン濃度は生理的濃度として厳密に維持されている。また、細胞内外のナトリウムイオン濃度差も、各種トランスポーターによる物質輸送の駆動力になっているため、厳密に制御されている。神経系においては、この濃度勾配は活動電位の発生の主要な役割を担っている。このように生命にとって必須であるナトリウム恒常性を保つために、我々の身体は塩分の経口摂取と腎臓における排出・再吸収の制御を統合的に行っている。体液のナトリウムバランスが崩れた時、例えば長時間の脱水は体液中のナトリウムイオン濃度を約 10%上昇させると言われているが、我々は喉の渴きを覚えると共に、知らず知らずのうちに塩分摂取を抑制する。

では、我々の身体は、この体液中のナトリウムイオン濃度の上昇をどこでどのように感知しているのでしょうか。約 30 年前、ヤギを用いて脳室内に様々な溶液を注入する実験や脳の部分破壊実験が行なわれた。それらの研究に基づいて、第 3 脳室の前壁が体液ナトリウムイオン濃度の検出を行なうとする仮説が提唱された。第 3 脳室の前壁には、脳弓下器官 (SFO) と終板脈管器官 (OVLT) が存在する。いずれも、血液脳関門の外側に位置する脳室周囲器官と呼ばれる器官群に含まれ、血液中の物質が血液脳関門による選択を経ずに直接流入する特長を持つことから、血液中の成分を検出する目的に適した構造をしている他、第 3 脳室に上皮細胞 1 層を介して直接面していることから、脳脊髄液中の成分を検出する目的にも適している。しかしながら、ナトリウムイオンセンサー分子の実体がつかめなかったために、この分野の研究は長い間滞ったままであった。

近年、我々は、電位依存性ナトリウムチャンネルのファミリーに属する分子 Na_x がナトリウムレベルセンサーの分子実体であると提唱してきた。 Na_x はファミリー内の他の分子と比べ相同性が低く、電位依存性に重要な配列を失っているため構造から機能を推定することができなかった。また、複数の研究グループにより卵母細胞などの異所細胞発現系を用いて電位依存性電流の検出が試みられたが、全て失敗に終わり、クローニングされて以降 10 年余り機能不明のまま残されていた。我々は Na_x 遺伝

子ノックアウトマウスを作成し、その解析を行ってきた。

脱水状態のマウスに水と食塩水を同時に提示すると、野生型マウスは水を大量に摂取する一方、食塩水を回避する。これは、脱水によって体液中のナトリウム濃度が増加したことを脳内のナトリウムセンサーが感知し、新たなナトリウム摂取を抑制しているためであると考えられる。ところが、 Na_x 遺伝子ノックアウトマウスでは脱水状態においても食塩水を回避しないという行動異常が観察された (Watanabe et al. 2000 Journal of Neuroscience)。ノックアウトマウスの脳弓下器官へ Na_x 遺伝子を再導入すると、行動が野生型と同様に回復したことから、体液 Na 濃度検出及び水分・塩分摂取制御の中樞が脳弓下器官であることが明らかとなった (Hiyama et al. 2004 The Journal of Neuroscience)。また、脳弓下器官由来の単離細胞を用いて、 Na_x チャンネルが細胞外ナトリウム濃度依存的に開くイオンチャンネルであることが明らかにした (Hiyama et al. 2002 Nature Neuroscience)。

以上の知見に基づき、本研究では、体液 Na 濃度の検出と塩分摂取行動制御にあたって脳弓下器官の内部において行われる細胞間の情報処理機構を明らかにすることを旨とし、脳弓下器官内部における Na_x の発現分布を検討した。

②研究方法

ホルマリンまたはパラホルムアルデヒドを用いて灌流固定したマウス脳より、脳弓下器官及び終板脈管器官を含む切片を作成し、抗 Na_x 抗体と抗 GLAST 抗体による蛍光二重染色を行った。GLAST は、グリア細胞に特異的に発現しているグルタミン酸輸送体である。また、グリア細胞に局在しているグリア線維性酸性タンパク質 (GFAP) と Na_x との蛍光二重染色を行った。次に脳弓下器官と終板脈管器官において抗 Na_x 抗体を用い、免疫電子顕微鏡法観察を行った。さらに、脳弓下器官から細胞を単離して、ナトリウム感受性色素 SBFI を用いて細胞内ナトリウムイメージングを行った後に、上皮細胞及びアストロサイトのマーカーである GLAST 及び GFAP に対する抗体を用いて免疫染色を行った。

③研究結果

3. 1 脳室周囲器官(CVO)において Na_x チャンネルはグリアマーカーのGLASTと共局在する

Na_x 発現細胞を同定するため抗 Na_x 抗体と抗GLAST抗体を用いた免疫二重染色を行なった(Fig. 1)。GLASTはグリアに特異的に発現するグルタミン酸トランスポーターである。脳弓下器官(SFO)と終板脈管器官(OVLT)において Na_x はGLAST陽性細胞の一部に発現していた。これより、 Na_x はグリア細胞に発現することがわかった。

3. 2 Na_x チャンネルはグリアの膜状突起に発現する

Na_x の細胞内局在を調べるため、SFOとOVLTにおいて抗 Na_x 抗体を用いた免疫電子顕微鏡観察を行なった(Fig. 2A, Fig. 3A)。 Na_x は細胞体周縁部及び突起に存在していた。Fig. 2CからFにSFOにおける電子顕微鏡観察例を示す。染色像はニューロンの細胞体やシナプスを囲む薄い膜状突起(矢印)に観察された。この突起は上皮細胞(Fig. 2C, D)及びアストロサイト(Fig. 2E, F)から伸びていた。以上より、 Na_x は上皮細胞及びアストロサイトの膜状突起に発現することがわかった。同様の観察結果がOVLTにおいても得られた(Fig. 3B, C)。

3. 3 SFOから単離されたグリア細胞は細胞外ナトリウムレベルの増加に感受性がある

GLAST陽性細胞の内、 Na_x を発現する細胞の割合を調べるため、 Na_x とGLASTと微小管結合蛋白質2(MAP2)の三重染色を行なった。MAP2はニューロンに特異的に発現する細胞骨格蛋白質である。全細胞数は核染色剤のDAPIを用いて行なった。調べた細胞の内、52.5%が Na_x 陽性であり、65.5%がGLAST陽性であり、32.9%はMAP2陽性であった。 Na_x 陽性細胞は全てGLASTを発現しており、MAP2を共発現する細胞は無かった。

我々はこれまでにSFOから単離した細胞において細胞内イオンイメージング解析を行い、 Na_x 陽性細胞が細胞外ナトリウムレベルの増加にตอบสนองして細胞内ナトリウム濃度を増加させることを見出している。そこで、こうしたナトリウムレベル増加に感受性のある細胞がグリアのマーカー蛋白質を発現するか免疫染色により調べた(Fig. 4B, C)。ナトリウムイメージング実験を行いナトリウム感受性のある細胞を確認したあと、それぞれの抗体で免疫染色を行なった。その結果、細胞外ナトリウムレベルの増加にตอบสนองした細胞は全てGLAST陽性であり、グリア線維性酸性蛋白質(GFAP)陽性であることがわかった。

3. 4 Na_x 陽性グリア細胞は複数のニューロン集団と接する

次に、 Na_x 陽性グリア細胞が取り囲むニューロンの細胞種同定を試みた。これまで、脳室周囲器官においてはグ

ルタミン酸作動性、セロトニン作動性、GABA作動性、グリシン作動性など、様々なニューロンの突起が存在することが確認されている。しかし、細胞体が確認されているのはGABA作動性ニューロンのみである。そこで、GABA作動性ニューロンにおいて緑色蛍光蛋白質GFPを発現するグルタミン酸脱炭酸酵素(GAD)-GFPノックインマウスを用いてGABA作動性ニューロンの細胞体と Na_x の免疫染色像の位置関係を調べた(Fig. 5)。その結果、 Na_x を発現するグリア細胞の突起はGFPを発現しない細胞の周囲も取り囲んでおり、GABA作動性ニューロン以外のニューロンとも接することが示唆された。一方、OVLT近傍において同様の観察を行なったところ、GFP発現細胞はOVLTの背側に位置し、OVLTの Na_x 免疫染色像近傍には観察されなかった。これより、OVLTにおいては、 Na_x 陽性のグリア細胞突起とGABA作動性ニューロンが殆ど接していないことが示唆された。

④考察

これまでの我々の研究から、 Na_x がナトリウムレベル感受性のナトリウムチャンネルであり、CVOによるナトリウムレベル検出と塩分摂取行動の制御に重要であることが明らかとなってきた。これらの結果は、 Na_x が過去に提唱されていた脳内ナトリウムセンサーの分子実体であることを示唆している。本研究では、 Na_x の分布を検討し、体液ナトリウムレベルを検出する部位が脳室周囲器官のグリア細胞の突起であることを明らかにした。この結果は、グリア細胞による神経活動の制御がナトリウム感受性機構において最も重要であることを示唆している。

本研究において、抗 Na_x 抗体を用いた組織化学的観察、免疫電子顕微鏡観察から、 Na_x がニューロンに発現せず、グリア細胞に発現することが明らかとなった。単離細胞において Na_x 、GLAST、MAP2、それぞれに対する抗体を用いて染色した所、 Na_x とGLASTは共局在したが、MAP2と共局在する Na_x 陽性細胞は無かった(Fig. 4A)。また、ナトリウムイメージングと免疫細胞化学実験から、細胞外ナトリウム濃度に感受性のある細胞はGLAST陽性であることがわかった(Fig. 4B, C)。さらに、グリア細胞の別のマーカーであるGFAPに対しても陽性であったことから、ナトリウム感受性のある細胞はグリア細胞であることがわかった。以上の結果と免疫電子顕微鏡観察の結果を合わせて、 Na_x がCVOのアストロサイトと上皮細胞に発現する可能性の高いことが結論された。

Na_x のcDNAをアデノウイルス発現ベクターを用いて Na_x ノックアウトマウスの脳内へ導入したところ、SFOへ導入されたマウスだけが野生型マウスに似た塩分回避行動

を回復した。中枢神経系においてアデノウィルスはニューロンよりもグリア細胞に導入されやすいことがわかっている。SFO に注入した場合にはグリア細胞の多くが導入遺伝子を発現することが既に報告されている。この知見もグリア細胞における Na_x の発現がSFOの機能に必須であることを示している。 Na_x は、SFOの上皮細胞とアストロサイトに発現するが、上皮細胞は脳室に面し、アストロサイトは、血管に接する。このことから、両者はそれぞれ脳脊髄液(CSF)と血液のナトリウムレベル検出を担っている可能性も考えられる。

Na_x は、SFO及びOVLTL以外に正中隆起(ME)及び下垂体後葉(PP)においてもグリア細胞に発現することが観察されている(Watanabe et al. 2000 *Journal of Neuroscience*)。この事実は、CVOにおいて Na_x を発現するという今回の知見を支持する。また、末梢神経系において、 Na_x はグリア細胞の一種である非ミエリン化シュワン細胞に発現していることがわかっている(Watanabe et al. 2002 *Neuroscience Letters*)。このことから、 Na_x が中枢と末梢において共通の機能を果たしている可能性も示唆される。

以上をまとめると、 Na_x チャンネルはニューロンを取り囲むグリアの突起に発現し、CVOにおいてグリア-ニューロン間の何らかの情報伝達を介して神経活動を制御していると考えられる。これまで長い間、グリア細胞はニューロンと異なり不活性な細胞であると考えられてきた。しかし、近年、グリア細胞がニューロンの信号伝達に密接に関与していることが明らかとなりつつある。我々が Na_x ノックアウトマウスにおいて神経活動の指標であるcfos遺伝子の発現を調べた過去の知見から、 Na_x が脱水条件下でSFOとOVLTLの神経活動を抑制する働きを持つことがわかっている。CVOにおける Na_x チャンネルの機能がニューロン-グリア相互作用の分子機構を調べるよい系となる可能性がある。

⑤今後の課題

本研究の知見から、CVOにおいて Na_x を発現するグリア細胞が何らかの情報伝達機構を介してニューロンの活動を制御していることが示唆された。この情報伝達機構の実体を明らかにすることが第1の課題である。

また、脱水条件下において Na_x ノックアウトマウスが塩分を回避しないという行動異常が、SFOに Na_x 遺伝子を再導入することにより回復するという過去の知見から、SFOから投射する神経連絡のいずれかがマウスの塩分摂取行動の制御に関与していると考えられる。過去の知見から、食物の選択行動には扁桃体が中心的役割を果

たしていることが明らかとなっているが、SFOから扁桃体中心核に直接的な神経投射があることが報告されている他、他の神経核を介して二次的に結合している可能性も考えられる。こうした神経経路を詳細に検討することにより、塩分摂取行動制御に関わる神経回路を明らかにすることが第2の課題である。

脱水状態においては、体液中のナトリウム濃度が増加すると同時に浸透圧も上昇する。これまでに脳内における浸透圧の検出に関与すると考えられる浸透圧センサー分子が複数報告されている。こうした分子による浸透圧検出情報と Na_x によるナトリウムレベル検出情報がどのように組み合わせられ、脱水状態からの回避という個体の目的を達成するために用いられるかを明らかにすることが、第3の課題である。

謝辞

Na_x ノックアウトマウスは、渡辺英治助教授(基礎生物学研究所)が中心となって本研究室において作成された。GAD-GFPマウスは、柳川右千夫教授(群馬大学)が作成された。以上の研究は、野田昌晴教授(基礎生物学研究所)の指導の下、行なわれた。本研究の成果は、*American Journal of Physiology* 誌に報告した。

文献等

- Watanabe E, Fujikawa A, Matsunaga H, Yasoshima Y, Sako N, Yamamoto T, Saegusa C, Noda M, Nav2/ Na_x channel is involved in control of salt-intake behavior in the CNS. *Journal of Neuroscience* 20: 7743-7751, 2000
- Hiyama TY, Watanabe E, Ono K, Inenaga K, Tamkun MM, Yoshida S, Noda M, Na_x channel involved in CNS sodium-level sensing. *Nature Neuroscience* 6: 511-512, 2002.
- Watanabe E, Hiyama TY, Kodama R, Noda M, Na_x sodium channel is expressed in non-myelinating Schwann cells and alveolar type II cells. *Neuroscience Letters* 330: 109-113, 2002.
- Hiyama TY, Watanabe E, Okado H & Noda M, The subformal organ is the primary locus of sodium-level sensing by Na_x sodium channels for the control of salt-intake behavior. *The Journal of Neuroscience* 24(42), 9276-9281, 2004.
- Watanabe, E., Hiyama, TY, Shimizu, H., Kodama, R., Hayashi, N., Miyata, S., Yanagawa, Y., Obata, K. & Noda, M. Sodium-level-sensitive sodium channel Na_x

is expressed in glial laminate processes in the sensory circumventricular organs. *American Journal of Physiology*, 290, R568-576, 2006.

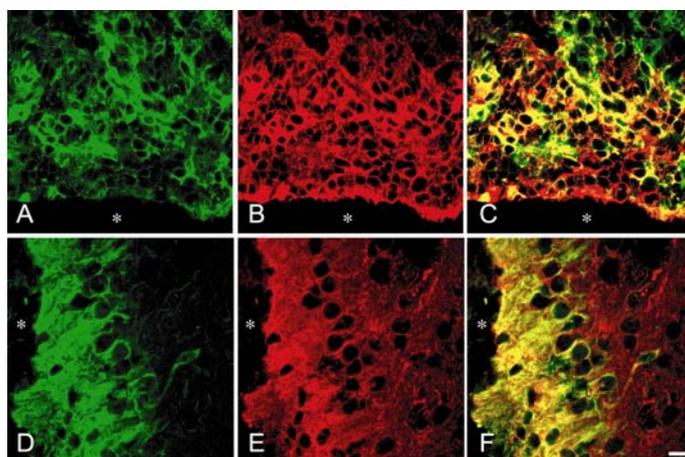


Fig. 1 The Na_x channel is co-localized with a glia-specific glutamate transporter GLAST in the SFO and OVLT. Coronal tissue sections of the SFO (A-C) and OVLT (D-F) were double-stained with anti- Na_x (A, D) and GLAST (B, E) antibodies. Right panels (C, F) are merged images of the left (A, D) and middle (B, E) panels. Asterisks indicate the ventricles. A large number of round GLAST- and Na_x -negative black holes represent neuronal cell bodies. Scale bar: 10 μm .

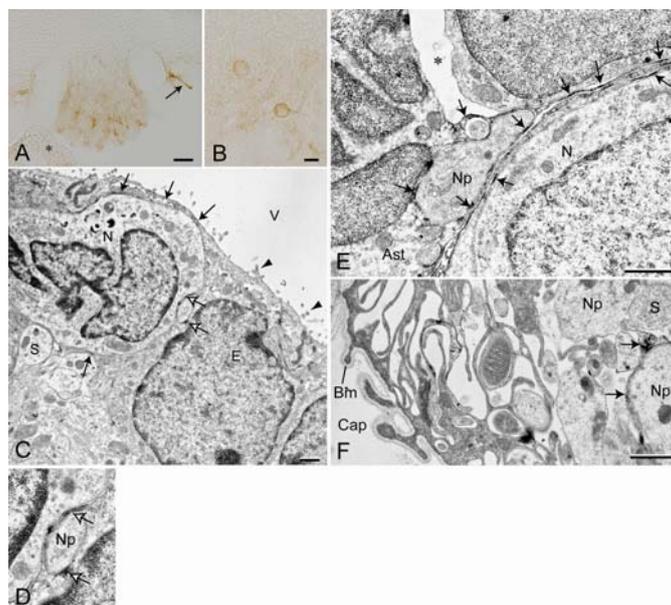


Fig. 2 The Na_x channel is expressed in perineuronal processes of astrocytes and ependymal cells in the SFO. A, Coronal tissue sections of the SFO stained with anti- Na_x antibody. Immunopositive signals are observed throughout the SFO. An arrow indicates the immunopositive ventricular cell-layer peeled off from the SFO during treatments and an asterisk indicates the choroid plexus. B, A higher magnified photograph of the SFO stained with anti- Na_x antibody. Intensive signals were concentrated around some neurons. C-F, Immunoelectron microscopy using anti- Na_x antibody. Ventricular surface region of the SFO is shown in C. A neuron is enveloped with immunopositive thin processes of an ependymal cell. Arrows (filled and open) point at immunopositive signals, and arrowheads indicate short microvilli of ependymal cells. A small neuronal process surrounded by immunopositive glial feet (open arrows in C) is magnified in D. In E and F, core regions of the SFO were shown. Neurons and their processes including synapses are surrounded by immunopositive thin processes of astrocytes. The asterisk in E indicates an artificial void region produced during fixation or staining. Capillary network shown in the left half of F is free of signals. V, ventricle; N, neuron; S, synapse; E, ependymal cell; Ast, astrocyte; Np, neural process; Bm, basement membrane; Cap, capillary. Scale bars: 50 μm for A, 10 μm for B, and 1 μm for C, E, and F.

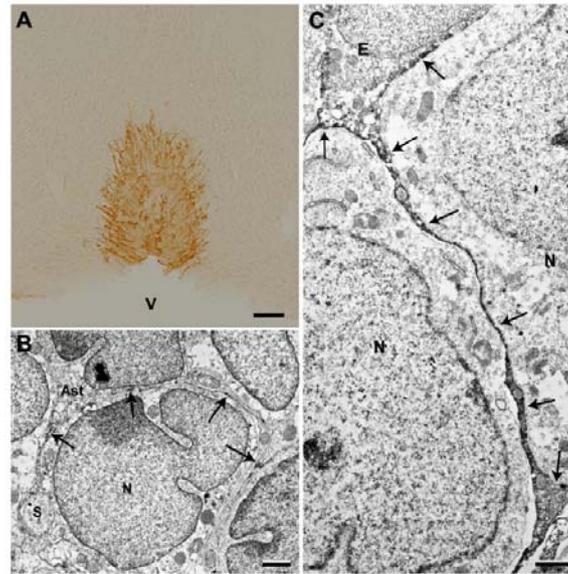


Fig. 3 The Na_x channel is localized to glial processes enveloping neurons in the OVLT. *A*: a coronal tissue section of the OVLT stained with anti- Na_x antibody. Fiber-like structures radiating out from the midline and ventricle were immunopositive. *B* and *C*: immunoelectron microscopy using anti- Na_x antibody. In *B*, the core region of the OVLT is shown. Neurons and their processes are surrounded by immunopositive thin processes of astrocytes. In *C*, a ventricular region in the OVLT is shown. The ventricular side is toward the upper side. Neurons are covered by extremely thin immunopositive processes of ependymal cells. Arrows in *B* and *C* indicate immunopositive signals. Scale bars: 50 μm for *A*, and 1 μm for *B* and *C*.

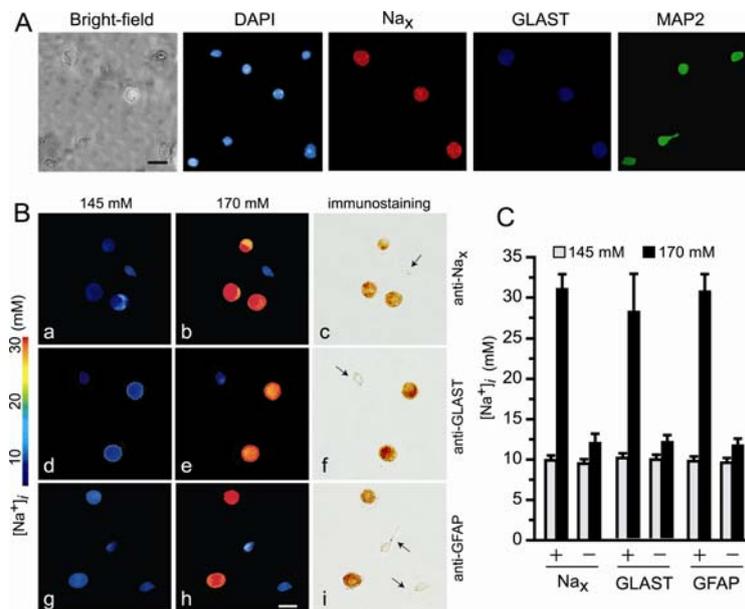


Fig. 4 Glial cells isolated from the SFO express Na_x channel and show sensitivity to the extracellular sodium level. *A*, Immunostaining of the dissociated SFO cells with anti- Na_x (red), anti-GLAST (purple), and anti-MAP2 (green) antibodies. The nuclei of cells were visualized with a fluorescent dye, DAPI (blue). Note that any Na_x -positive cells do not overlap with MAP2-positive neurons. *B*, Sodium imaging study using the dissociated SFO cells. Pseudocolor images of the intracellular sodium concentration ($[\text{Na}^+]_i$) of SFO cells in the control solution (the extracellular sodium concentration = 145 mM, *Ba*, *Bd* and *Bg*) and in the high sodium solution (170 mM, *Bb*, *Be* and *Bh*). *Ba*, *Bd*, *Bg* and *Bb*, *Be*, *Bh* are images 5 min before and 20 min after stimulation with the hypertonic 170 mM $[\text{Na}^+]$ solution, respectively. After sodium-image recordings, cells were fixed and stained with anti- Na_x (*Bc*), anti-GLAST (*Bf*) or anti-GFAP (*Bi*) antibodies. All the sodium-sensitive cells are immunopositive for Na_x , GLAST and GFAP. Arrows in *Bc*, *Bf* and *Bi* indicate small neurons bearing short neurites, which are all insensitive to the extracellular sodium increase. Scale bar: 20 μm . *C*, Quantified intracellular sodium-ion concentrations before (open bars) and after (filled bars) the stimulation in Na_x -positive (+) or Na_x -negative (-) cells, in GLAST-positive (+) or GLAST-negative (-) cells, and in GFAP-positive (+) or GFAP-negative (-) cells. Data represent mean and SE ($n=20$, each).

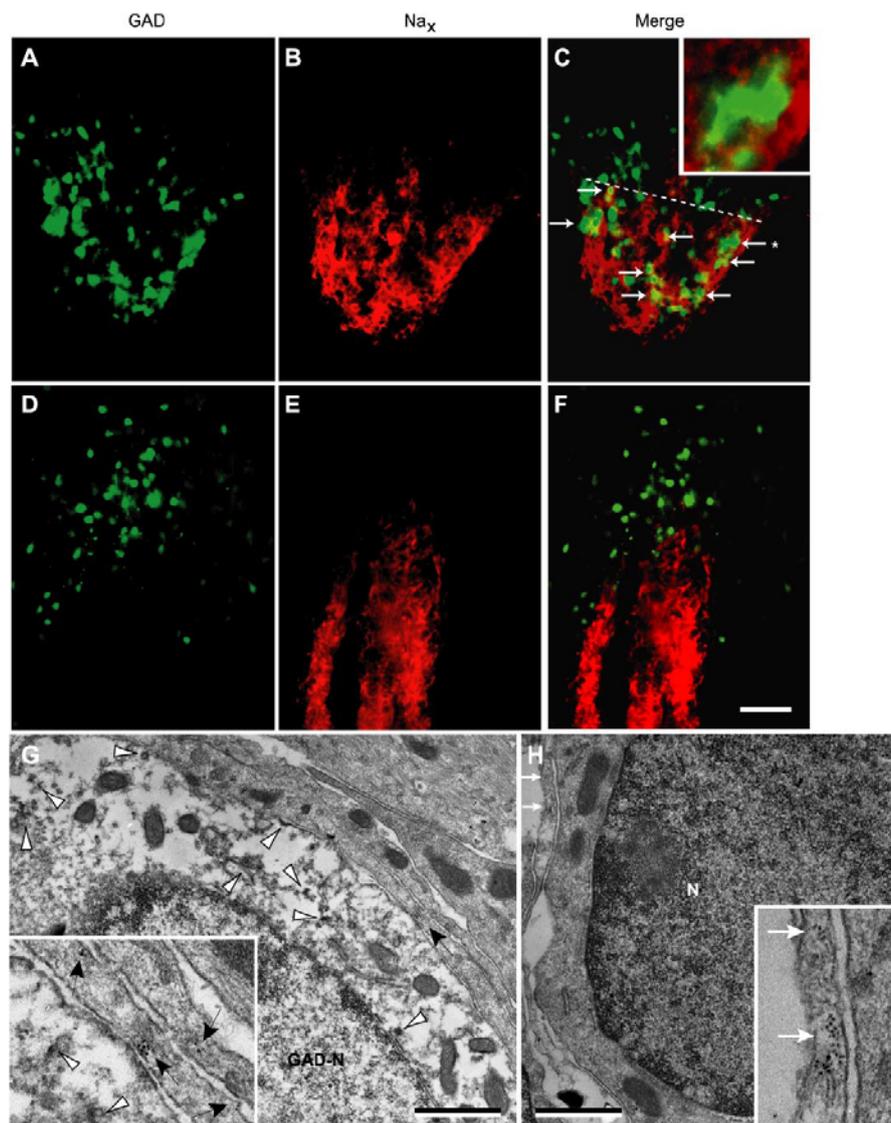


Fig. 5 Na_x-positive glial cells associate with multiple neurochemical circuitries.

SFO (A–C, G, and H); OVLT (D–F). GFP fluorescence of GAD (A, D), Texas-Red fluorescence of Na_x (B, E), and merged images (C, F). Tissue sections derived from GAD-GFP mice were stained with anti-Na_x antibody and visualized with Texas-Red. Tissue sections 50- μ m thick were penetrated with a detergent to enhance Na_x signals. White arrows in C indicate GAD67-positive neurons enveloped with Na_x-positive glial cells. The area indicated by a white arrow with an asterisk is magnified in the *inset* of C. Dashed line in C indicates the boundary between the fornix and SFO. Electron-photomicrographs in the SFO were derived from GAD-GFP mice (G, H), in which a double-immunolabeling method for GFP and Na_x was performed. GAD-positive neurons were identified by the immunoperoxidase method for GFP, whereas Na_x-positive glial processes were labeled by immunogold-silver methods. Arrowheads in G indicate dense reaction products of peroxidase. Because the DAB reaction products break and condense fine cellular architectures, a large part of cytoplasmic area of GAD-positive neuron become blank. Glial laminate processes (arrows) surrounding a GAD-positive neuron (GAD-N in G) or GAD-negative neuron (N in H) are magnified in the *insets* of G and H, respectively. Arrows in the *insets* point to silver-enhanced gold particles. Scale bars: 50- μ m for A–F, 1- μ m for G and H.

0536

Neural mechanism for salt-intake behaviours

Takeshi Y. Hiyama

Division of Molecular Neurobiology, National Institute for Basic Biology
Department of Molecular Biomechanics, The Graduate University for Advanced Studies

Summary

Na_x is an atypical sodium channel that is assumed to be a descendant of the voltage-gated sodium channel family. Our recent studies on the Na_x -gene-targeting mouse revealed that Na_x channel is localized to the circumventricular organs (CVOs), the central loci for the salt and water homeostasis in mammals, where the Na_x channel serves as a sodium-level sensor of the body fluid. To understand the cellular mechanism by which the information sensed by Na_x channels is transferred to the activity of the organs, we dissected the subcellular localization of Na_x in the present study. Double-immunostaining and immunoelectron microscopic analyses revealed that Na_x is exclusively localized to perineuronal lamellate processes extended from ependymal cells and astrocytes in the organs. In addition, glial cells isolated from the subfornical organ, one of the CVOs, were sensitive to an increase in the extracellular sodium level, as analyzed by an ion-imaging method. These results suggest that glial cells bearing the Na_x channel are the first to sense a physiological increase in the level of sodium in the body fluid, and they regulate the neural activity of the CVOs by enveloping neurons. Close communication between inexcitable glial cells and excitable neural cells thus appears to be the basis of the central control of the salt homeostasis.