

## < 体液恒常性制御の脳内機構 >

体液（血液や脳脊髄液）には様々な物質が含まれており、それを一定に保つことが生命維持に不可欠です。私たちの研究グループでは、こうした体液の恒常性を維持する脳内機構の解明を目指しています。特に体液中にもっとも多く含まれる電解質であるナトリウム(Na)の恒常性機構を主な課題として研究を進めてきました。

図1は体液中のNaと水のバランスをあらわした図です。図の真ん中の「通常状態」から外れてバランスが崩れると、水や塩分の摂取行動や排尿を調節することにより、元の状態へ戻そうとします。例えば、マウスを絶水状態に長時間おくと、体液中のNa濃度は上昇します（図1左上の状態）。この状態で水と塩水を同時に提示されると、マウスは直ちに水分の補給を行うが、一方、塩分摂取は回避します。こうした行動実験の結果から、体液のNaレベルを感知し、行動を制御する機構の存在が推測されます。それは、どこで、どのようにして行われているのでしょうか。

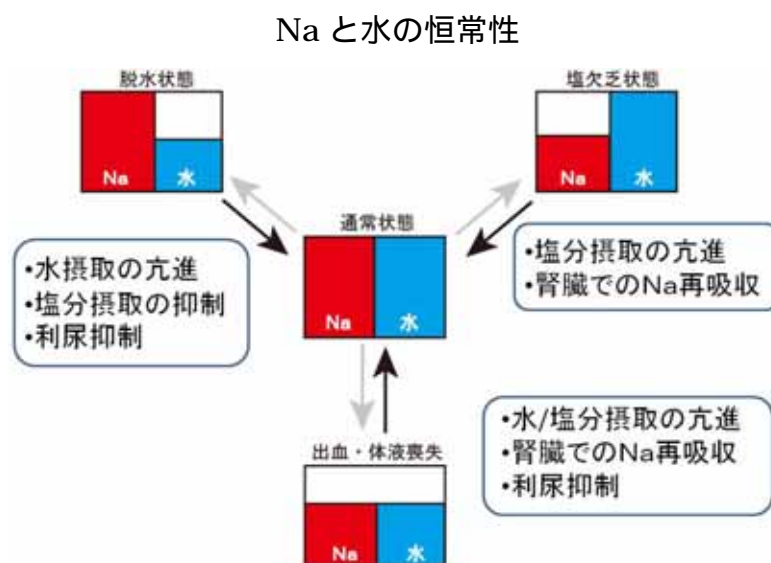


図1

体液のNaと水のバランスが真ん中の「通常状態」から崩れると（灰色矢印）、枠内に箇条書きしたような生体制御によって「通常状態」へ戻そうとする（黒色矢印）。こうした生理現象を体液恒常性という。体液恒常性には、脳による体液の監視とその情報に基づく生体調節が重要である。

### Na レベルセンサー分子 $Na_x$

私たちは10年余り前から、電位依存性Naチャンネルと相同性のある分子  $Na_x$  (図2)が脳内の体液Naレベルセンサーであると提唱してきました。 $Na_x$ は中枢神経

系では、主に脳室周囲器官 (circumventricular organs ; CVOs) に発現しています。CVOs は脊椎動物の脳の正中部に存在し、脳内への選択的物質輸送を担う血液脳関門を欠いた有窓性毛細血管が密集するとともに、特殊な上皮細胞を有するという特徴があります。Na<sub>x</sub>が発現するCVOsのうち、脳弓下器官 (subfornical organ; SFO) 及び終板脈管器官 (organum vasculosum of the lamina terminalis; OVLT) は、最後野 (area postrema) と併せて、感覚性脳室周囲器官 (sensory CVOs) と呼ばれます。それはCVOsのうち、この3つの部位にのみニューロンの細胞体が存在し、他の多くの脳領域と神経結合をつくっているからです。CVOsには血液脳関門が無いことから、その中の細胞は血中のホルモンやイオンレベルの変化に直接曝されています。また、脳室表面に位置することから、脳脊髄液とも上皮細胞一層を介して接しています。こうしたことから、体液中の物質の受容や感知に適した場所であることがわかります。

私たちは、Na<sub>x</sub>遺伝子を欠損したNa<sub>x</sub>ノックアウトマウス (Na<sub>x</sub>-KO マウス) を作成し、その解析を進めてきました。長時間の絶水後に、神経活動の指標として用いられる Fos 蛋白質の発現によって脳内の神経活動レベルを調べたところ、Na<sub>x</sub>を発現するSFOやOVLTにおいて、Na<sub>x</sub>-KOマウスの方が野生型マウスよりも神経活動が亢進していることがわかりました。さらに、野生型マウスは脱水状態では塩水の摂取を避けるのに対し、Na<sub>x</sub>-KOマウスは避けないという行動異常を示しました。Na<sub>x</sub>-KOマウスの味覚には異常がなかったことから、体液のNaレベルの検出能に異常があるものと推定されました。Na<sub>x</sub>のチャンネルとしての特性を調べるため、NaイメージングによりNa<sub>x</sub>チャンネルを介した細胞内へのNa流入を調べたところ、細胞外液のNaレベルの上昇に反応して約150 mM付近を閾値として開口するNaレベル感受性のNaチャンネルであることがわかりました。また、高張Na溶液を脳室内に直接投与すると、野生型マウスは絶水後と同様に塩分摂取を回避するのにに対しNa<sub>x</sub>-KOは回避しなかったことから、Na<sub>x</sub>が脳内の体液Naレベルセンサーとして機能しており、その情報が行動制御に関与していることが明らかとなりました。さらに、私たちはNa<sub>x</sub>遺伝子をコードしたアデノウイルスをNa<sub>x</sub>-KOマウスの脳内の様々な部位に注入してNa<sub>x</sub>の発現を局所的に回復させる実験を行なった結果、SFOに発現を回復させると脱水時の塩分摂取行動が正常に回復することを明らかにしました。こうした一連の知見から、SFOが塩分摂取行動の制御に関わる脳内Naレベル検出の中枢であり、Na<sub>x</sub>がそのNaレベルセンサーであると結論しました。

2006年、私たちはNa<sub>x</sub>チャンネル分子がSFOやOVLTのグリア (上皮細胞とアストロサイト) に発現していることを明らかにしました。電子顕微鏡による観察から、両器官で、Na<sub>x</sub>を発現したグリアの突起がニューロンを取り巻いていることが明らかになりました。しかし、グリア細胞は電氣的神経活動を行わない

細胞です。塩分の摂取行動を直接的に制御するのは電氣的神経活動を行うニューロンのはずですが、したがって、グリアからニューロンに情報が伝達される仕組みが存在すると考えられました。



図 2

数日間水を摂れず脱水状態になった動物では、体液中の Na の濃度が $\sim 20$  mM 上昇している。水と塩水を同時に提示されると、マウスは水を補給する一方塩水を避けようとする。

脳弓下器官から室傍核、視索上核に神経連絡がある。両神経核には尿量調節に携わる抗利尿ホルモン（バソプレシン）の産生細胞がある。一方、摂取行動の制御にかかわる神経回路（点線）は、まだ解明されていない。

脳弓下器官にはニューロンの細胞体があり、血液脳関門を持たない毛細血管が網目状に張り巡らされている。また、脳室に面しており、脳脊髄液と一層の上皮細胞により隔てられている。

グリア細胞である上皮細胞とアストロサイトは突起を伸ばし、神経細胞を取り巻いている。その突起の細胞膜上に Na<sub>x</sub> チャンネルが分布している。

Na<sub>x</sub> チャンネルは、細胞外(体液)の Na レベルが平常の体液レベルを超えて上昇すると開口する性質を持った Na チャンネルである。

**Na<sub>x</sub> は Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase と結合することによって細胞外 Na 依存的に解糖系を調節する**

私たちは、グリアにおける Na<sub>x</sub> の機能的役割を探る手がかりを得ることを期待し

て、 $Na_x$  に結合する分子を探索することにしました。その結果、 $Na_x$  の C 末端領域に  $Na^+/K^+$ -ATPase の ATP 代謝に関わる領域が結合することを見出しました。

$Na^+/K^+$ -ATPase は NaK ポンプとも呼ばれ、ATP を ADP に分解したエネルギーを利用して Na イオンを細胞内から組み出しカリウム (K) イオン細胞外から内へ取り込む細胞膜上の分子です。 $Na_x$  との結合が  $Na^+/K^+$ -ATPase の機能にどのような影響を及ぼしているのか可能性を検討するため、 $Na^+/K^+$ -ATPase の活性を調べました。 $Na_x$  を発現する細胞では、等張 Na 溶液 (145 mM) に比べ、高 Na 溶液 (170 mM) 中ではグルコース取り込みが 1.6 倍に増加し、その増加分は  $Na^+/K^+$ -ATPase の特異的機能阻害剤であるウバイン (ouabain) によって完全に抑えられました。SFO の急性スライスを用いた実験ではグルコースがグリア様の細胞に選択的に取り込まれることが観察されました。単離細胞で免疫染色を行った結果から、グルコースの取り込みが上昇した細胞は全て  $Na_x$  を発現するグリア細胞であることが確認されました。さらなる実験から、 $Na_x$  の C 末端領域の結合と  $Na_x$  からの Na 流入の両方が、 $Na^+/K^+$ -ATPase 活性化に必要であることがわかりました。

ところで、このように解糖系が活性化すれば、乳酸の産生が亢進するはずで、そこで SFO の組織からの乳酸放出量を測定したところ、高 Na 条件下において  $Na_x$ -KO マウスよりも野生型マウスの SFO から多くの乳酸が分泌されていることが判明しました。それでは、分泌された乳酸には、どのような生理的役割があるのでしょうか。

### 放出された乳酸が神経活動を活性化する

私たちの過去の知見から明らかになった通り、脱水下の  $Na_x$ -KO マウスの SFO の神経活動レベルを調べると、野生型マウスにくらべて亢進しています。SFO には GABA 作動性の抑制性ニューロンが多く存在し、それらは  $Na_x$  陽性のグリアによって囲まれています。そこで、脳の急性スライスを作製し、SFO における GABA 作動性ニューロンの活動を電気生理学的に解析しました。このニューロンは生理的 Na 濃度条件下で約 4 Hz の頻度で自発発火をしていることが判明しました。細胞外液の Na 濃度を 160 mM まで上げると、野生型マウスの GABA 作動性ニューロンの発火頻度は徐々に増加し約 2 倍に達しました。一方、 $Na_x$ -KO マウスではこの変化が見られませんでした。Na 濃度を上げる代わりに乳酸 (1 mM) を加えると、野生型と  $Na_x$ -KO マウスいずれにおいても発火頻度が増加しました。高 Na 条件における発火頻度上昇は、乳酸の輸送を行なうモノカルボン酸輸送体の抑制剤により抑制されたことから、Na シグナルの下流で乳酸の代謝が神経活動の制御に関与していることが明らかになりました。以上より、外液の Na 濃度の上昇が  $Na_x$  による  $Na^+/K^+$ -ATPase の活性化と乳酸の放出を引き起こし、それによって GABA 作動性ニューロンの発火頻度が増加したことがわかりました。



リアの細胞膜上の  $\text{Na}_x$  チャンネルが感知して開口し、細胞内  $\text{Na}$  濃度を上昇させるとともに、直ちに  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP アーゼを活性化する。 $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP アーゼは  $\text{Na}^+$  を汲みだすために通常よりも多くの ATP を消費し、それを補うためにグリア細胞のグルコース（糖）代謝は活性化する。その結果、乳酸の産生・分泌量が増加し、この乳酸が隣接する GABA ニューロン（抑制性ニューロン）の発火頻度を上昇させる。投射ニューロンは塩分摂取をうながす働きをしていると推定されるが、脱水状態では GABA ニューロンによって抑制される。

（参考文献）

檜山武史, 野田昌晴 脳における体液  $\text{Na}$  レベル感知機構 グリア細胞が神経活動を制御するしくみの解明 実験医学, 25(16), 2007

野田昌晴 体液  $\text{Na}^+$  レベルの感知機構 蛋白質 核酸 酵素, 53(10), 1258-1266, 2008