

氏 名 佐藤 かお理

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第 1439 号

学位授与の日付 平成 23 年 3 月 24 日

学位授与の要件 生命科学研究科 生理科学専攻
学位規則第 6 条第 1 項該当

学位論文題目 Roles of the volume-sensitive anion channel and the
V₂-type vasopressin receptor in rat AVP neurons

論文審査委員 主 査 教授 鍋倉 淳一
教授 岡田 泰伸
教授 箕越 靖彦
教授 酒井 秀紀 富山大学

The osmolarity of body fluids fluctuates around a set-point because of variations in the rate of intake and loss of water and Na^+ . Disturbances in plasma osmolarity can be caused by dehydration (through evaporation or diuresis), excessive ingestion of water, blood loss, excess salt ingestion, or excess Na^+ excretion. Homeostasis of the osmolarity and volume of body fluids requires the regulated release of arginine vasopressin (AVP). AVP neurons which synthesize AVP in the hypothalamus of the brain are osmosensory neurons that respond to an increase and a decrease in plasma osmolarity with enhanced and reduced AVP release, respectively, from their axon terminals.

It was shown that AVP is released by exocytosis not only from the axon terminals of magnocellular neurons into the systemic circulation but also from the somata and dendrites locally in response to hyperosmotic stimulation in a manner dependent on intracellular Ca^{2+} and actin depolymerization. However, it has been not known how AVP release from somata and dendrites is affected by extracellular hypoosmolarity. In the present study, hypoosmotic stress was found not to reduce, but to significantly enhance somato-dendritic AVP secretion from axon terminal-free AVP neurons acutely dissociated from the supraoptic nuclei (SON) in AVP-enhanced GFP transgenic rats. This response was found to be almost completely abolished by pretreatment with an exocytosis inhibitor, tetanus toxin or BAPTA-AM in Ca^{2+} -free Ringer solution, and prominently augmented by application of blockers (NPPB, phloretin and DCPIB) for the volume-sensitive outwardly rectifying (VSOR) anion channel. Immunocytochemical studies showed that F-actin becomes depolymerized upon osmotic cell swelling induced by hypoosmotic stimulation. The amount of released AVP was significantly increased in the presence of a depolymerization activator (latrunculin B) even in isoosmotic conditions. These results indicate that the hypoosmolarity-induced increase in AVP release from somata and dendrites is caused by exocytosis which is facilitated by swelling-associated F-actin depolymerization.

It was reported that rat SON neurons respond to hypoosmotic stimulation with sustained swelling and do not exhibit volume regulation for up to 10 min. However, most cell types exposed to a hypoosmotic solution can regulate their volume shortly after an osmotic volume increase by the mechanism called regulatory volume decrease (RVD). In addition, persistent cell swelling due to dysfunction of the volume-regulatory mechanism is known to be implicated in necrotic cell death. Thus, the author hypothesized that in AVP neurons the RVD process takes place slowly with a time course longer than 10 min. Actually, during exposure to a hypoosmotic solution, a slow RVD was found to occur over 10 min after swelling in a manner sensitive to VSOR anion channel blockers. Furthermore, application of a hypoosmotic solution was actually found to activate whole-cell anion currents. The activated currents were associated with osmotic cell swelling and exhibited moderate outward rectification, time-dependent inactivation kinetics at large positive potentials, a low-field

anion selectivity (Eizenman's type-I) sequence of $\Gamma^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{F}^-$, and sensitivity to VSOR anion channel blockers. Furthermore, she found that bath application of AVP significantly increased the amplitude of volume-sensitive anion currents and accelerated the time course of RVD.

Vasopressin is known to act on its target cells via the V_{1a} and V_{1b} receptor coupled to the Gq protein and phospholipase C (PLC), or the V_2 receptor coupled to the Gs protein and adenylate cyclase (AC). The V_{1a} receptor is mainly expressed in the brain, vascular system, liver and kidney, whereas the V_{1b} receptor is detected in the anterior pituitary. In contrast, the V_2 receptor is shown to be expressed in the kidney. On the other hand, it has been under controversy whether the V_2 receptor is expressed in the SON. In this study, she investigated using the AVP neurons which were dissociated from rat SON and clearly identified by GFP expression. Actually, the enhancing effects of AVP on the volume-sensitive anion currents and the RVD rate were abolished by antagonists for AC (SQ22356 and MDL 12330A) which is downstream to the V_2 receptor and by an antagonist for the V_2 receptor (OPC-31260) but not by an antagonist for PLC (U73122) which is downstream to the V_{1a} and V_{1a} receptors (OPC-21268). Even in the absence of exogenous AVP, when the amount of bath solution was reduced (from 1 ml to 50 μl), the time course of RVD in rat AVP neurons was accelerated and was inhibited by the V_2 receptor antagonist. RT-PCR using total RNA extracted from the pooled cytosol of 20 GFP-expressing AVP neurons and immunostaining studies showed expression of the V_2 receptor protein in AVP neurons.

Taken together, it is concluded that AVP released from somata and dendrites of AVP neurons under hypoosmotic conditions serves, in an autocrine fashion, as a signal to enhance volume-sensitive anion channel activity and thereby facilitate cell volume regulation via the V_2 receptor. Also, it is considered that AVP released from somata and dendrites in rat AVP neurons acts as a negative-feedback signal to maintain cell volume homeostasis via the V_2 -type vasopressin receptor under hypoosmotic conditions.

佐藤氏は抗利尿ホルモンとして知られているアルギニン・バソプレシン(AVP)産生ニューロン(AVPニューロン)の浸透圧調節機構の特性について詳細な解析を行うとともに、同細胞の細胞体等から放出されるバソプレッシンによる同細胞の浸透圧調節機能制御について、以下の様な報告を行った。

ラット視床下部・視索上核を酵素処理して得られたAVPニューロンを用いて、低浸透圧条件下におけるAVPの分泌量を測定した結果、軸索終末からの分泌減少とは対照的に、正常浸透圧条件下に比べて有意に分泌量が増大する結果が得られた。ファロイジン染色法による実験の結果、低浸透圧条件下における細胞体・樹状突起からのAVP分泌の増大は、細胞の膨張による一時的な皮質アクチンの脱重合がエクソサイトーシスを促進させることによる事が示唆された。また、容積感受性外向整流性(VSOR)アニオンチャネルのブロッカーを使用したAVP分泌測定、ファロイジン染色法により、VSORアニオンチャネルの活性が低浸透圧条件下において細胞体・樹状突起から分泌されるAVP量の調節に関与している事が示唆された。

低浸透圧刺激により活性化し細胞の容積恒常性を維持する重要なVSORアニオンチャネルの特性について、AVPにGFPタグをつけたトランスジェニックラットから、酵素で急性単離をしたAVPニューロンを用いてその断面積を測定した結果、刺激により増大した断面積は、刺激30分後からは有意な回復が起こることが観察された。細胞断面積の回復率は、VSORアニオンチャネル阻害剤によって有意に抑制された。また、ホールセル・パッチクランプ法により、VSORアニオンチャネルがAVPニューロンに機能的に発現しており、膨張後の細胞容積の回復に関与していることが明らかになった。

AVPニューロンから採取した細胞質サンプルを用いて、RT-PCR法によりmRNAの発現を調べた結果、 V_{1a} レセプターと V_2 レセプターも発現している事が明らかになった。免疫染色法により、 V_2 レセプタータンパク質は、AVPニューロンの細胞体・樹状突起の膜に発現している事が明らかになった。

断面積測定法により、低浸透圧刺激後の細胞容積回復におけるAVPの効果を検討した結果、AVPにより膨張後の細胞容積回復が促進される事が明らかになった。このAVPによって促進された容積の回復は、 V_2 レセプターの下流にあるアデニル酸シクラーゼに対する阻害剤及び V_2 レセプターに対する特異的阻害剤によって抑制された。ホールセル・パッチクランプ法で、VSORアニオンチャネル電流に対するAVPの効果を検討した結果、低浸透圧刺激で誘導されたVSORアニオンチャネル活性は、AVPによって更に亢進され、このAVP効果はアデニル酸シクラーゼに対する阻害剤及び V_2 レセプターに対する特異的阻害剤によって抑制されることが明らかとなった。

また、AVPニューロンの細胞体・樹状突起から分泌されたAVPが、 V_2 レセプターを介してAVPニューロン自身に作用し、細胞容積の回復を促進していることを見出した。

以上の結果より、低浸透圧刺激によって細胞体・樹状突起より分泌されたAVPは、バソプレッシンニューロンの細胞体・樹状突起の膜に発現している V_2 レセプターを刺激し、アデニル酸シクラーゼを介してcAMPシグナルが流れてVSORアニオンチャネルを更に活性化し、低浸透圧刺激によって膨張した細胞容積をすばやく完全に回復させるという、細胞容積の恒常性を維持させ

るネガティブフィードバックのためのオートクリンシグナルとして機能することが明らかとなった。

これらの知見は生体の浸透圧調節研究分野においてに重要な新たな知見を与えるものであり、基礎医学研究ばかりでなく、創薬および臨床医学研究への大きな貢献が期待出来る。