

助成番号 0642

## 脳内ナトリウムセンサー分子と浸透圧センサー分子の機能

野田 昌晴

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

**概要** 血液や脳脊髄液に代表される体液中の Na 濃度は生理的 Na 濃度に厳密に保たれている。生命にとって必須である Na 恒常性を保つため、私たちの体は、塩分・水分の経口摂取と腎臓における排泄・再吸収の制御を統合的に行っている。

我々はこれまで、体液中の Na 濃度の上昇を検出するセンサーが  $Na_x$  チャンネルであり、その部位が脳内の感覚性脳室周囲器官であることを明らかにしてきた。 $Na_x$  遺伝子を欠損したマウスは、体液中の Na 濃度の上昇を感知できず、脱水状態でも塩分摂取を抑制しない。 $Na_x$  は感覚性脳室周囲器官のグリア細胞に発現しており、グリア細胞で検出された Na 濃度上昇の情報がどのようにして神経細胞に伝達されるのか謎であった。

今回の研究で、 $Na_x$  チャンネルは  $Na^+/K^+$ -ATPase と結合しており、機能的にもカップルしていることが判明した。細胞外液の Na 濃度の上昇をグリア細胞上の  $Na_x$  チャンネルが感知すると、 $Na_x$  チャンネルが開口し Na イオンが流入するとともに、 $Na^+/K^+$ -ATPase が活性化し細胞内の ATP が消費される。この ATP を補うためにグリア細胞のグルコース(糖)代謝が活性化し、その結果、乳酸の産生・分泌が上昇することが判明した。感覚性脳質周囲器官である脳弓下器官には自発発火している GABA 神経細胞が存在し、その発火頻度は乳酸によって活性化することも明らかになった。 $Na_x$  陽性のグリア細胞の突起は、GABA 神経細胞を取り巻いており、優先的に乳酸を供給できるものと思われる。また、この GABA 神経細胞が塩分摂取行動を司る神経細胞の活性を制御していると考えられる。このように、脳内の Na 濃度の検出では、グリア細胞が主役を果たしており、神経細胞はグリア細胞によってコントロールされていることが明らかになった。

一方、体液中の Na 濃度の上昇は、浸透圧の上昇としても感知されていることが判っている。 $Na_x$  遺伝子を欠損したマウスも、脱水状態において総水分摂取量を増加させる行動適応は正常である。脳で働いている浸透圧センサーの実体が Trpv1, 4 の両 Ca チャンネルである可能性を遺伝子ノックアウトマウスを用いて検証した。

## 1. 研究目的

血液や脳脊髄液に代表される体液(細胞外液)中の Na (ナトリウム)濃度は生理的 Na 濃度(約 150 mM)に厳密に保たれている。また細胞内の Na 濃度(約 15 mM)も、同様に厳密に維持されている。この細胞内外の Na 濃度勾配は、種々の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だけでなく、神経細胞における活動電位の発生に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 Na 恒常性を保つため、我々の体は、塩分・水分の経口摂取と腎臓における排泄・再吸収の制御を統合的に行っている。

体液の Na と水のバランスが崩れた時、例えば、長時間の脱水により体液中の Na 濃度が上昇すると、喉の渇きを覚えて水分の補給を行うとともに、塩分の摂取を抑制する。体液中の Na 濃度上昇や浸透圧上昇を感知する機構が存

在し、こうした行動制御に関わっていると考えられてきたが、感知している場所や仕組みは長い間不明であった。

この内、体液中の Na 濃度上昇を感知する機構について、我々は数年前から、センサー分子は  $Na_x$  チャンネルであると提唱してきた。このチャンネルは Na 濃度が 150 mM を越えると開く性質があり<sup>[1]</sup>、脳内の脳弓下器官(SFO)や終板脈管器官(OVLT)という感覚性脳室周囲器官に分布している<sup>[2]</sup>。いずれも第三脳室の前壁に位置して脳脊髄液に接しており、また、血液-脳関門が欠損した部位であるため、脳脊髄液や血液の状態をモニタリングするために最適の場所である。我々が作成した  $Na_x$  遺伝子ノックアウトマウス( $Na_x$ -KO マウス)は、脱水状態において起こる体液中の Na 濃度上昇が感知できず、脱水時でも塩分摂取を抑制しないという行動異常を示した<sup>[2, 3]</sup>。脱水時の SFO や OVLT における神経活動を Fos 蛋白質の発現を指標と

して調べると、野生型マウスと較べて  $Na_x$ -KO マウスにおいてより活性化していた<sup>[2]</sup>。また、 $Na_x$ -KO マウスの脳内に  $Na_x$  遺伝子を局所的に導入して  $Na_x$  の発現を回復させる実験から、SFO に発現する  $Na_x$  が脱水時の塩分摂取行動の制御に重要であることが判明した<sup>[3]</sup>。このように、SFO における  $Na_x$  をセンサーとする体液情報モニタリング機構が働いて、その神経活動が調節され、脱水時の塩分摂取行動が制御されていると推定された。

昨年、我々は  $Na_x$  チャンネルが SFO や OVLT の上衣細胞やアストロサイト(星状細胞)に特異的に発現していることを明らかにした<sup>[4]</sup>。これらの器官では、 $Na_x$  を発現したこれらの特殊なグリア細胞の突起が神経細胞を取り巻いている様子が、電子顕微鏡によって観察された。そこで今回、SFO において、グリア細胞に発現している  $Na_x$  が感知した体液 Na 濃度上昇の情報が、神経細胞に伝えられる仕組みについて検討した<sup>[5]</sup>。

## 2. 研究方法

### 2.1 $Na_x$ 結合分子の探索とその発現解析

マウス後根神経節から cDNA ライブラリーを作成し、酵母ツーハイブリッド法により、 $Na_x$  の細胞内領域に結合する蛋白質を探索した。この探索により見つかった結合候補分子について、免疫共沈降法を用いて直接的結合を確認した。また、SFO の組織切片及び単離細胞において免疫二重染色を行なった。

### 2.2 代謝活性の測定

糖代謝の活性を調べるため、非代謝性の蛍光性グルコース誘導体である 2-NBDG の取り込み活性を測定した。SFO 組織切片における代謝活性測定 (Figure 2A, B) では、37度で1時間2-NBDGを取り込ませた後、ホルマリンにより固定した細胞の蛍光を測定した。

### 2.3 SFO における電気生理学的解析

グルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD) 67 の遺伝子座に、緑色蛍光蛋白質 (EGFP) 遺伝子をノックインし、GABA ニューロンにおいて EGFP を発現するようになった *GAD-GFP* マウスを実験に用いた。マウスより SFO の急性スライスを作成し、セル・アタッチド・パッチクランプ法により、蛍光を手がかりに同定した GABA ニューロンの発火活動を記録した。

その他の実験方法の詳細については、文献5を参照いただきたい。

## 3. 研究結果

### 3.1 $Na_x$ チャンネルは $Na^+/K^+$ -ATPase と直接的に結合する

マウス後根神経節から cDNA ライブラリーを作成し、酵母ツーハイブリッド法により、 $Na_x$  細胞内領域に結合する蛋白質を探索した (Figure 1A, B)。  $Na_x$  の C 末端領域に結合する分子として  $Na^+/K^+$ -ATPase  $\alpha$ 1 サブユニットが単離され、免疫共沈降法を用いて両者間の直接的な結合を確認した (Figure 1C)。また、SFO の組織切片、及び単離細胞において免疫二重染色を行ない、両者は共局在することを確認した (Figure 1D, E)。  $Na^+/K^+$ -ATPase  $\alpha$  サブユニットのファミリー分子のうち、 $\alpha$ 1 以外に、 $\alpha$ 2、 $\alpha$ 3 も脳において発現することが報告されている。 $\alpha$ 2 と  $\alpha$ 3 について、 $\alpha$ 1 の  $Na_x$  への結合領域に対応する領域 (Figure 1B) をクローニングし、フィルター・リフト  $\beta$  ガラクトシダーゼ・アッセイにより  $Na_x$  との結合を調べたところ、 $\alpha$ 2 には結合能が認められた (Figure 1F)。 *in situ* ハイブリダイゼーション法により SFO における  $\alpha$ 1-3 の発現を  $Na_x$  と比較したところ、 $\alpha$ 1 及び  $\alpha$ 2 は  $Na_x$  に類似した発現分布を示したが、 $\alpha$ 3 は発現自体が確認されなかった (Figure 1G)。

### 3.2 $Na_x$ は SFO における Na 依存的なグルコース取り込みに関与している

$Na^+/K^+$ -ATPase の活性に対する  $Na_x$  共発現の影響を調べるため、 $Na^+/K^+$ -ATPase 活性の指標となる細胞の糖代謝活性を測定した。測定には蛍光グルコース誘導体 (2-NBDG) の取り込み活性を用い、マウスの脳より SFO の急性スライスを作成して比較した (Figure 2A, B)。野生型マウス (WT マウス) の SFO において、外液の Na 濃度を体液レベルの 145 mM から 170 mM に上昇させると、グルコース取り込み活性が有意に上昇した (Figure 2Aa,b; 2B の WT)。一方、 $Na_x$ -KO マウスではこの上昇は観察されなかった (Figure 2Ac,d; 2B の KO)。WT における Na レベル依存的なグルコース取り込みの増加は、 $Na^+/K^+$ -ATPase の阻害剤 Ouabain により抑えられたことから、 $Na^+/K^+$ -ATPase の活性化を反映していると考えられる (Figure 2Ae,f; 2B の WT + Ouabain)。WT マウスの SFO の単離細胞において、グルコース取り込みを測定した後に  $Na_x$  の免疫染色を行なったところ、取り込みの上昇を示したのは全て  $Na_x$  陽性の細胞であることがわかった (Figure 2C, D)。

$Na_x$  が  $Na^+/K^+$ -ATPase を活性化する機構として、 $Na_x$  を通して流入する  $Na^+$  が  $Na^+/K^+$ -ATPase に供給されることが活性化の原因である可能性を検討するため、 $Na^+$  イオノフ

オアの Monensin が  $\text{Na}_x$  を代替することができるか検討した。 $\text{Na}_x$  を発現しない細胞に細胞外の Na レベル 145 mM で 0.5  $\mu\text{M}$  の Monensin を投与すると、 $\text{Na}_x$  陽性細胞に 170 mM の Na 溶液を灌流した時に相当する Na が流入する<sup>[5]</sup>。SFO の単離細胞を用いて、145 mM の Na レベルの条件において Monensin を投与したところ、WT マウス由来の細胞では、外液 Na レベルを 170 mM に上げた時と同様に代謝活性の増加が観察されたが、 $\text{Na}_x$ -KO マウス由来の細胞では、有意な影響は観察されなかった (Figure 2E)。この結果は、 $\text{Na}_x$  による  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase の活性化には、 $\text{Na}^+$  の供給だけでなく、 $\text{Na}_x$  の  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase への結合も必要であることを示している[詳しくは論文5を参照]。

### 3.3 $\text{Na}_x$ は SFO における Na 依存的な乳酸放出に関与している

糖代謝活性の上昇は、乳酸あるいはピルビン酸の産生増加につながっていると考えられる。マウス脳より SFO を切り出し、37°C で 30 時間保温する間に放出された乳酸及びピルビン酸量を測定した (Figure 3A, B)。放出された乳酸は、WT において Na 依存的に増加したが、KO では増加しなかった。一方、ピルビン酸は、WT、KO に関わらず Na に依存した変化は見られず、またその放出量も乳酸の 1/10 量程度であった。このように、乳酸がシグナル分子として機能している可能性が示唆された。

### 3.4 Na 濃度の上昇は $\text{Na}_x$ 依存的に SFO の GABA 作動性ニューロンを活性化する

脱水条件下のマウスの脳弓下器官では、その神経活動が活性化することがわかっている<sup>[2]</sup>。また、 $\text{Na}_x$  陽性のグリア細胞に囲まれる主要なニューロンは GABA ニューロンであることがわかっている<sup>[4]</sup>。そこで、Na レベル上昇時の GABA ニューロンの神経活動を電気生理学的に測定した。SFO の急性スライスにおいてセル・アタッチド・パッチクランプ法により GABA 作動性ニューロンの発火活動を測定した (Figure 3C-F)。GABA ニューロンを同定するため、実験には GABA ニューロンにおいて蛍光蛋白質 EGFP を発現する *GAD-GFP* マウスと  $\text{Na}_x$ -KO マウスを掛け合わせて得られた *GAD-GFP/Na<sub>x</sub>-KO* マウスを用いた。GABA ニューロンは、灌流液の Na レベルが 145 mM の時 4 Hz 程度の自発発火活動を行っていたが、160 mM へ増加させると発火頻度は約 2 倍に増加し、145 mM へ戻すと再び元の頻度へ戻った (Figure 3C 及び 3E の Na)。この Na 依存的な活性化は、 $\text{Na}_x$ -WT では観察されたが、 $\text{Na}_x$ -KO では観察されなかった。

### 3.5 乳酸は GABA 作動性ニューロンを活性化する

$\text{Na}_x$  を発現しているグリア細胞は、Na 濃度依存的に乳酸を放出することから、GABA ニューロンの発火活動に対する乳酸の作用を調べた。1 mM の乳酸投与により、WT、 $\text{Na}_x$ -KO の両方において GABA ニューロンが活性化した (Figure 3D 及び 3E の Lactate)。乳酸は約 1 mM において最も活性化作用が強く、高濃度になるとむしろ抑制作用が観察された (Figure 3F)。乳酸と Na を同時に投与しても相加的な作用は無く、両者の作用が同じ機構を介していることが示唆された (Figure 3E の Na + Lactate)。また、160 mM Na の条件においてカルボン酸トランスポーター (MCT) の阻害剤  $\alpha$ -シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸 ( $\alpha$ -CHCA) を投与すると、Na による活性化作用が阻害されたことから、MCT を介したモノカルボン酸の細胞内取り込みの必要性が示唆された (Figure 3E の Na +  $\alpha$ -CHCA)。他の代謝由来のモノカルボン酸として、1 mM のピルビン酸は GABA 作動性ニューロンを活性化したが、酢酸は活性化しなかった (Figure 3E の Pyruvate 及び Acetate)。

次に、GABA 作動性ニューロンが活性化する機構について調べた。in vitro では乳酸とピルビン酸が同様に効果があったことから、GABA ニューロンが C 源の供給 (エネルギー供給) により活性化されている可能性が考えられた。Kir6.2/ $\text{K}_{\text{ATP}}$  チャンネルの活性化薬 diazoxide (0.3 mM) を投与したところ GABA ニューロンの発火活動を抑制することがわかった (Figure 4A)。 $\text{K}_{\text{ATP}}$  チャンネルは、細胞内 ATP レベルの上昇に反応して閉じることから、これに応じて膜電位は上昇することになる。そこで高 Na 条件や乳酸投与時の GABA ニューロンの膜電位を測定したところ、膜電位が上昇しており、その効果は 0.3 mM の diazoxide により打ち消されることがわかった (Figure 4B)。以上より、GABA ニューロンが乳酸の供給により活性化されるのは、乳酸をエネルギー源として代謝し、細胞内の ATP 量が増加するためであると推定された。

## 4. 考察

### 4.1 $\text{Na}_x$ 陽性のグリア細胞は Na 依存的に乳酸を放出することによって神経活動を制御している

本研究によって、 $\text{Na}_x$  を発現する特異なグリア細胞が、SFO の神経活動を制御している機構が明らかになった (Figure 5)。脱水によって起こる体液中の Na レベルの上昇は  $\text{Na}_x$  によって検知され、 $\text{Na}_x$  チャンネルの開口が起こり  $\text{Na}^+$  が細胞内へ流入する。 $\text{Na}_x$  は  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase と結合

しており、このNa<sup>+</sup>の流入はNa<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaseの活性化を導く。Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaseはATPを使ってNa<sup>+</sup>を細胞外へ排出することから、細胞内のATP含量の低下を招き、グリア細胞は解糖によってATPを産生する必要が生じる。SFOには自発発火する特異なGABAニューロンが存在し、このニューロンは乳酸によって活性化する性質を有している。解糖の結果生じる乳酸はグリア細胞の外へ放出されることから、この乳酸によってGABAニューロンの活性化が起きることになる。この乳酸の確実なニューロンへの供給を可能としているのが、グリア細胞の突起がGABAニューロンをしっかりと取り巻いているという物理的関係にあると思われる[4参照]。

#### 4.2 グリア—ニューロン間シグナル伝達の担い手としての乳酸

近年、グリアにおいて産生された乳酸がエネルギー源としてニューロンに供給されるという、アストロサイト—ニューロン乳酸シャトルの存在が提唱されている<sup>[7]</sup>。この仮説では、神経活動により細胞外のグルタミン酸やGABA等の神経伝達物質の濃度が増加するが、それらをグリア細胞が取り込むことから、グリア細胞のNa<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaseやグルタミン合成酵素の活性化が起こるとされる。この活性化がグリア細胞内においてエネルギー要求を誘導することから解糖系を活性化し、産生された乳酸がニューロンに供給されると考えられている。本研究により、SFOではNa<sub>x</sub>陽性のグリア細胞において、Naレベル依存的な乳酸産生が起こっており、この乳酸がGABAニューロンの活性化を調節する作用を有することが明らかとなった。我々の知る限り、グリア細胞が乳酸をシグナル分子としてニューロンの活動を調節していることを実証的に示したのは、この研究が初めてである。本研究の成果は、Neuron誌に報告した<sup>[5]</sup>。

#### 5. 今後の課題

我々は、これまでに、Na<sub>x</sub>-KOマウスのSFOにNa<sub>x</sub>遺伝子を再導入すると、脱水条件下におけるNa<sub>x</sub>-KOマウスの塩分摂取行動異常が回復することを見出している。従って、本研究で明らかとなった、SFOにおけるNaレベル依存的な神経活動の制御がマウスの塩分摂取行動の制御において中心的役割を果たしていると考えられるとともに、SFOから出力する行動制御のための神経経路の存在が推定される<sup>[3]</sup>。過去の知見から、食物の嗜好に関する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。また行動判断を司る大脳皮質との連絡も報告されている。SFOにおいてNaレベル依存的に活動制御を受けるニューロンとこうした神経経路との関係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一の課題である。

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、脳内において浸透圧の検出に関与すると考えられるセンサー分子の候補として、TRPV1やTRPV4チャンネルが報告されている。我々は、それぞれTRPV1あるいはTRPV4遺伝子を欠損したKOマウスを用意し、脳室内への高浸透圧溶液の注入による飲水行動の変化を解析することによって、これら候補分子が体液浸透圧感知に関与している可能性について最終的な結論を出そうとしている。第二の課題として水分摂取行動に関わる体液浸透圧の感知機構を明らかにする計画である。

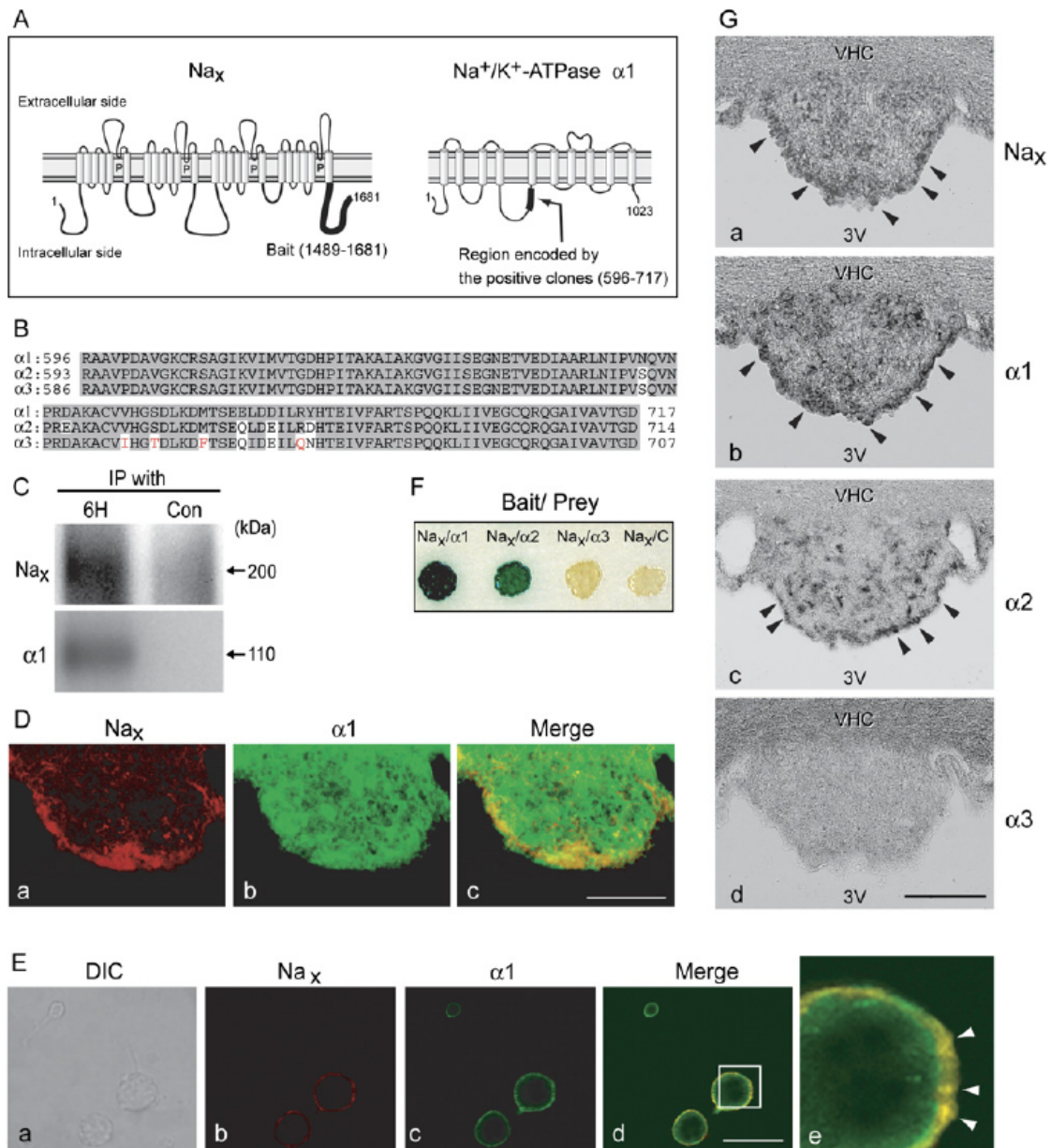
#### 謝辞

GAD-GFPマウスは、柳川右千夫教授(群馬大学)より提供いただいた。

#### 文献等

1. Hiyama TY, Watanabe E, Ono K, Inenaga K, Tamkun MM, Yoshida S, Noda M. Na<sub>x</sub> channel involved in CNS sodium-level sensing. *Nature Neuroscience* 6: 511-512, 2002.
2. Watanabe E, Fujikawa A, Matsunaga H, Yasoshima Y, Sako N, Yamamoto T, Saegusa C, Noda M. Na<sub>v</sub>2/NaG channel is involved in control of salt-intake behavior in the CNS. *Journal of Neuroscience* 20: 7743-7751, 2000.
3. Hiyama TY, Watanabe E, Okado H & Noda M. The subfornical organ is the primary locus of sodium-level sensing by Na<sub>x</sub> sodium channels for the control of salt-intake behavior. *The Journal of Neuroscience* 24: 9276-9281, 2004.
4. Watanabe E, Hiyama TY, Shimizu H, Kodama R., Hayashi N, Miyata S, Yanagawa Y, Obata K & Noda M. Sodium-level-sensitive sodium channel Na<sub>x</sub> is expressed in glial lamina processes in the sensory circumventricular organs. *American Journal of*

- Physiology* 290: R568-576, 2006.
5. Shimizu H, Watanabe E, Hiyama TY, Nagakura A, Fujikawa A, Okado H, Yanagawa Y, Obata K & Noda M. Glial  $\text{Na}_x$  channels control lactate signaling to neurons for brain  $[\text{Na}^+]$  sensing. *Neuron* 54: 59-72, 2007.
  6. Gladden LB. Lactate metabolism: a new paradigm for the third millennium. *Journal of Physiology* 558: 5-30, 2004.
  7. Chih CP, Lipton P & Roberts EL Jr. Do active cerebral neurons really use lactate rather than glucose? *Trends in Neuroscience* 24: 573-578, 2001.



**Figure 1. Interaction between Na<sub>x</sub> Channels and α Subunits of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase**

(A) Schematic illustrations of Na<sub>x</sub> channel (Left) and α1 subunit of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (Right). P, putative pore-forming regions.

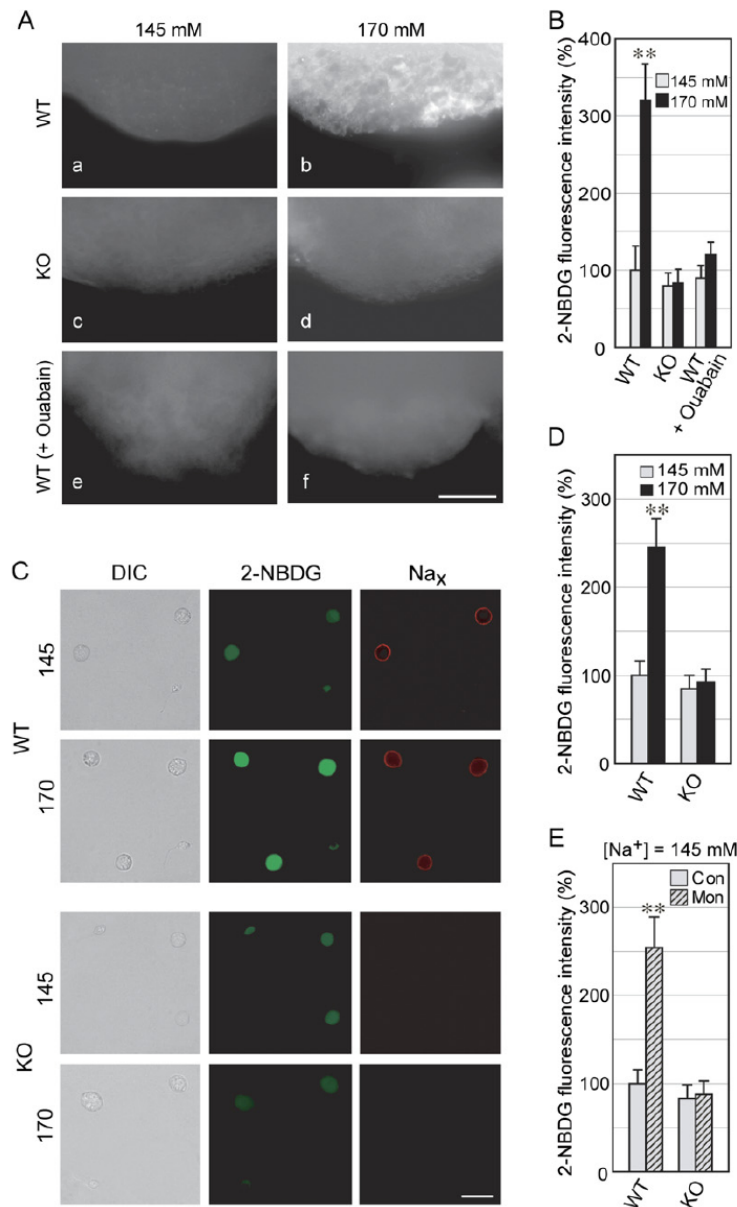
(B) Alignment of amino acid sequences of the α1 (596–717), α2 (593–714) and α3 (586–707) isoforms of mouse Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. Amino acids identical among them are shaded, and unique amino acids in α3 are drawn in red.

(C) Coimmunoprecipitation of Na<sub>x</sub> channels and the α1 subunit of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. Cell lysate prepared from C6M16 cells was immunoprecipitated with a monoclonal antibody (6H) to the α1 subunit of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase or anti-HA monoclonal antibody (Con) as a negative control and analyzed by Western blotting using anti-Na<sub>x</sub> antibody (upper) or 6H (lower).

(D and E) Colocalization of Na<sub>x</sub> channels and the α1 subunit of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase on coronal tissue sections (D) and dissociated cells (E) of the mouse SFO. A higher magnified picture of the boxed area in (Ed) is shown in (Ee). Arrowheads point to the dense colocalization of Na<sub>x</sub> and the α1 subunit in the plasma membrane. DIC, differential interference contrast image; scale bars: 100 μm for (D), 30 μm for (E).

(F) Filter-lift β-galactosidase assay to examine the binding of the C-terminal region of Na<sub>x</sub> channels with the α1, α2 and α3 subunits of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. The bait is the C-terminal region of Na<sub>x</sub>. As prey, three polypeptides derived from the third cytoplasmic domain of the α subunit of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (shown in [B]) were used (Na<sub>x</sub>/α1–α3). As a negative control, only the GAL4-activating domain was expressed (Na<sub>x</sub>/C).

(G) *In situ* hybridization with probes for Na<sub>x</sub> channel, and α1, α2, and α3 subunits of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase on coronal tissue sections of the mouse SFO. VHC: ventral hippocampal commissure; 3V: the dorsal third ventricle. Scale bar: 100 μm.



**Figure 2.  $Na_x$  Channel Is Involved in Na-Sensitive Uptake of Glucose in the SFO**

(A) Imaging analysis of the uptake of glucose in the SFO using a fluorescent glucose derivative. The SFO was isolated from wild-type (WT; [Aa, Ab, Ae, and Af]) and  $Na_x$ -KO (KO; [Ac and Ad]) mice and incubated with 2-NBDG in the 145 mM (Aa, Ac, and Ae) or 170 mM (Ab, Ad, and Af) Na solution. In some experiments, the extracellular solutions contained 1 mM ouabain (Ae and Af). The tissues did not show any significant autofluorescence before incubation with 2-NBDG (not shown). Scale bar: 50  $\mu$ m.

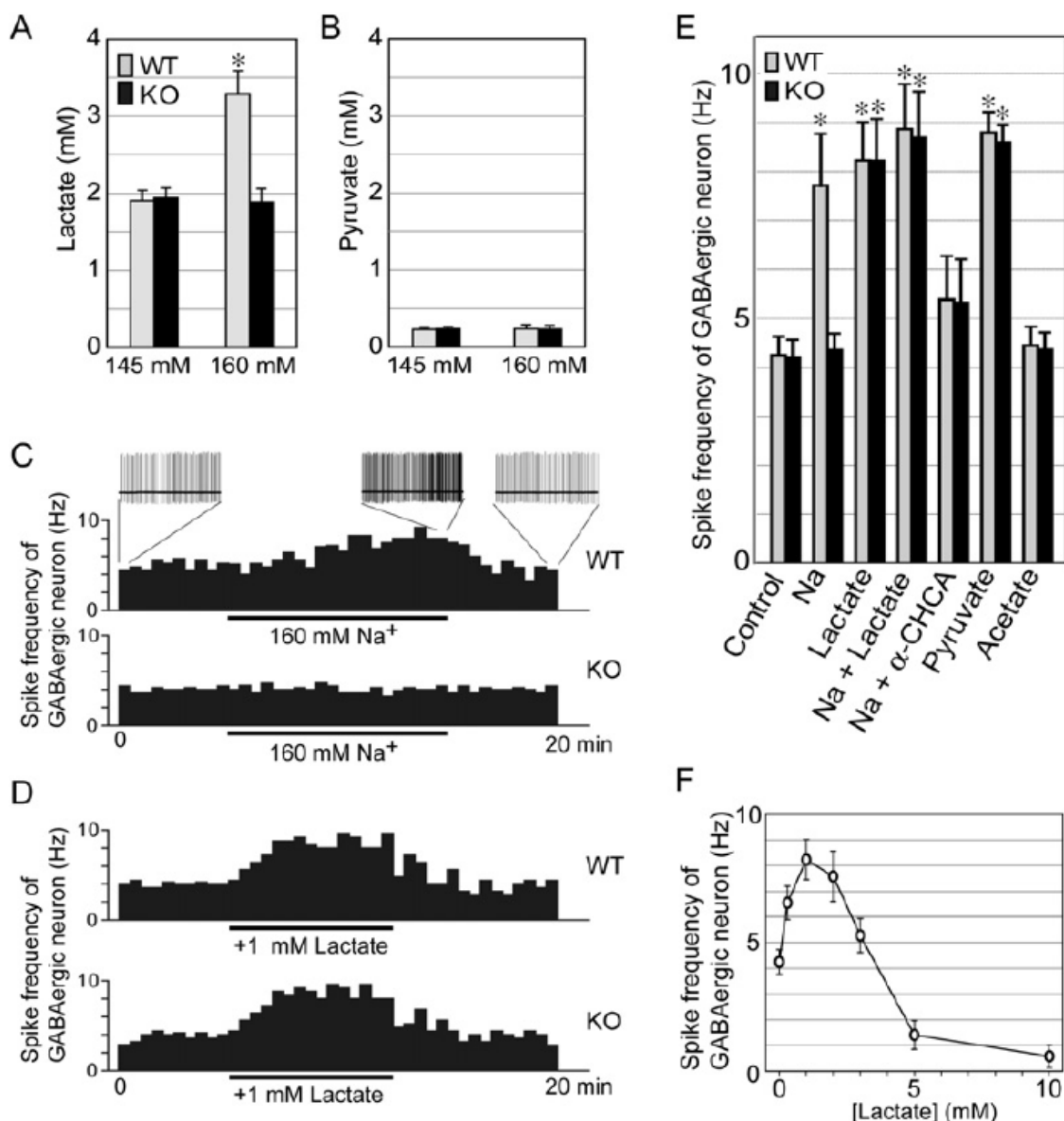
(B) Summary of glucose uptake activity of the SFO. Fluorescence intensities of the tissues were quantified by imaging software, and the mean and SE was obtained. The mean fluorescence intensity of the wild-type in the 145 mM Na solution was set at 100%. \*\* $p < 0.01$ , two-tailed t test (against 145 mM of WT); data are the mean and SE ( $n = 5$  for each).

(C) Imaging analysis of glucose uptake in dissociated SFO cells. Cells dissociated from the SFO of wild-type (WT) and  $Na_x$ -KO (KO) mice were subjected to imaging analysis of glucose uptake using 2-NBDG in the 145 mM or 170 mM Na solution. After the imaging, cells were stained with anti- $Na_x$  channel antibody ( $Na_x$ ). DIC, differential interference contrast image. Scale bar: 25  $\mu$ m.

(D) Summary of glucose uptake activity of the dissociated SFO cells. The mean fluorescence intensity of wild-type (WT) cells in the 145 mM solution was set at 100%. \*\* $p < 0.01$ , two-tailed t test (against 170 mM of KO); data are the mean and SE ( $n = 20$  for each).

(E) Effect of monensin on glucose uptake in dissociated SFO cells. Cells were dissociated from the SFO of wild-type (WT) and  $Na_x$ -KO (KO) mice. Cells were treated with 0.5  $\mu$ M monensin (Mon) in the 145 mM Na solution. The mean fluorescence intensity of Con (without Mon treatment) of WT was set at 100%. \*\* $p < 0.01$ , two-tailed t test (against Con of WT); data are the mean and SE ( $n = 20$  for each).





**Figure 3. Lactate Activates Inhibitory Neurons in the SFO**

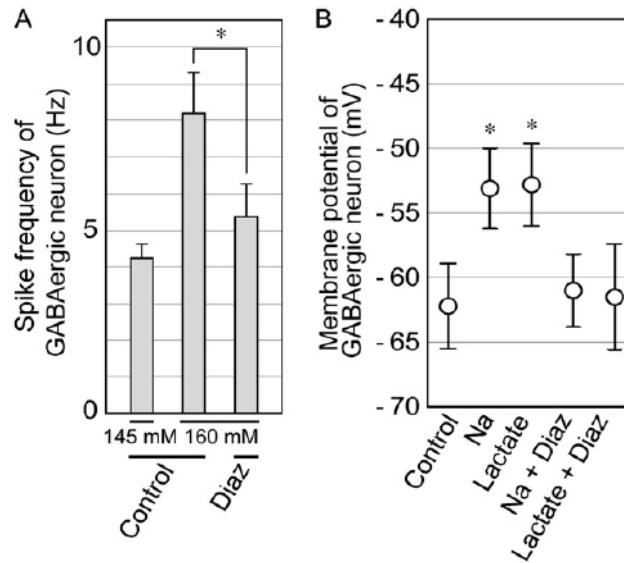
(A and B) Release of lactate (A) and pyruvate (B) from the SFO tissue into the incubation medium. Modified Ringer solutions, in which the SFO tissues from wild-type (WT) or  $Na_x$ -KO (KO) mice were incubated for 24 hr at 37°C, were subjected to measurements by the enzyme assay. The normal modified Ringer solution and high-Na modified Ringer solution contained 145 mM and 160 mM Na, respectively. \* $p < 0.05$ , two-tailed t test (against WT of 145 mM). Data are the mean and SE ( $n = 10$  for each).

(C and D) Control of spike frequency of GABAergic neurons in the SFO by Na and lactate. The SFO tissues from wild-type (WT) and  $Na_x$ -KO (KO) mice were treated with the high-Na modified Ringer solution (C) or 1 mM lactate in the normal modified Ringer solution (D).  $Na_x$  is indispensable for Na-dependent activation of the GABAergic neurons in the SFO, but lactate activates them independent of  $Na_x$ .

(E) Summary of the electrophysiological experiments with the SFO of wild-type (WT) and  $Na_x$ -KO (KO) mice. Means of spike frequency of the GABAergic neurons during perfusion of various kinds of solutions are shown. Na, 160 mM Na solution; Lactate, 1 mM lactate;  $\alpha$ -CHCA, 5 mM  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid (an inhibitor of monocarboxylate transporters); Pyruvate, 1 mM pyruvate; Acetate, 1 mM acetate; \* $p < 0.05$ , Bonferroni's multiple comparison test (against WT of control). Data are the mean and SE ( $n = 8$  for each).

(F) Concentration dependency of lactate's effect on the spike frequency of GABAergic neurons. The SFO tissues of wild-type mice were used for this experiment. Data are the mean and SE ( $n = 5$  for each).

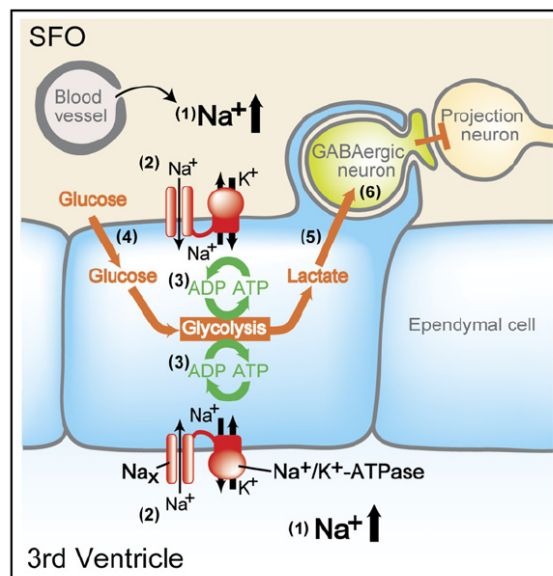




**Figure 4. Putative Role of  $K_{ATP}$  Channel in Na-Dependent Stimulation of GABAergic Neurons in the SFO**

Electrophysiological experiments were performed with SFO slices of wild-type mice. (A) Means of the spike frequency of GABAergic neurons during the perfusion with various kinds of solutions are shown. Diaz, 0.3 mM diazoxide, an opener of  $K_{ATP}$  channel. \* $p < 0.05$ , two-tailed t test (against Control of 160 mM); data are the mean and SE ( $n = 5$  for each).

(B) The membrane potentials of GABAergic neurons in the presence of 1  $\mu$ M TTX. Na, 160 mM Na solution; Lactate, 1 mM lactate; Diaz, 0.3 mM diazoxide; \* $p < 0.05$ , Bonferroni's multiple comparison test (against Control); data are the mean and SE ( $n = 20$  for each).



**Figure 5. Schematic Overview of the Na-level-Sensing Mechanism and Na-Dependent Regulation of Neurons in the SFO.**

When animals are dehydrated, Na concentration in plasma and CSF increases above the usual level of ~145 mM (1). When the extracellular Na concentration exceeds ~150 mM, Na<sub>x</sub> channels open, and the intracellular Na concentration in these glial cells is increased. This leads to activation of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in these cells (2). Activated Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase consumes ATP higher than the usual level to pump out Na ions (3). To fuel Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase with ATP, the glial cells enhance the glucose uptake to stimulate the anaerobic glycolysis (4). Lactate, the end product of the anaerobic glycolysis, is released from the glial cells and supplied to neurons, including GABAergic neurons, through the processes enveloping them (5). Lactate stimulates the activity of the GABAergic neurons through production of ATP, which presumably regulate hypothetic neurons involved in the control of salt-intake behavior (6). In dehydrated KO mice, the Na-dependent stimulation of glycolysis is impaired and the activity of the GABAergic neurons is not promoted. This figure shows the case of ependymal cells; however, the same scheme would be applicable for Na<sub>x</sub>-positive astrocytes.

No. 0642

## The Functions of the Sodium Sensor and Osmosensor in the Brain.

Masaharu Noda

Division of Molecular Neurobiology, National Institute for Basic Biology

### Summary

Sodium homeostasis is crucial for life and Na-levels in body fluids are constantly monitored in the brain. The subfornical organ (SFO) is the center of the sensing responsible for the control of Na-intake behavior, where  $\text{Na}_x$  channels are expressed in specific glial cells as the sodium-level sensor. Here, we show direct interaction between  $\text{Na}_x$  channels and  $\alpha$  subunits ( $\alpha 1$  and  $\alpha 2$  isoforms) of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, which brings about Na-dependent activation of the metabolic state of the glial cells. The metabolic enhancement leading to extensive lactate production was observed in the SFO of wild-type mice, but not of the  $\text{Na}_x$ -knockout mice. Furthermore, lactate, as well as Na, stimulated the activity of GABAergic neurons in the SFO. These results suggest that the information on a physiological increase of the Na level in body fluids sensed by  $\text{Na}_x$  in glial cells is transmitted to neurons by lactate as a mediator to regulate neural activities of the SFO. On the other hand, the research to examine the possibility that Trpv4 and Trpv1 are the osmosensor in the brain is now in progress using the respective gene-knockout mice.