

助成番号 0841

絶水に伴う体液恒常性危機に対処する神経機構の解明

山中 章弘¹, 常松 友美²¹自然科学研究機構生理学研究所細胞生理研究部門, ²総合研究大学生命科学研究科

概要 陸上生物にとって体液恒常性は、エネルギー恒常性ととも生存における重要な命題である。マウスを絶水により脱水状態に陥らせると、体内水分量を保持するために行動量を減らすのではなく、多少の水分消費が増えても行動量を増加させることが知られている。この反応は、自然界において新たな水源を探索するために、行動範囲を拡大しなければならないからだと解釈されているが、この絶水による行動量増加のメカニズムは未だ解明されていなかった。今回の我々の研究により、抗利尿ホルモンとして知られているバソプレシンとオレキシン神経細胞が、この行動量増加に重要な役割を担っていることを明らかにした。

オレキシン神経細胞に緑色蛍光タンパク質(EGFP)を発現するトランスジェニックマウスを用いたスライスパッチクランプ解析によって、バソプレシンおよび、オキシトシンがオレキシン神経を脱分極させ、活性化することを見出した。この反応は、V1a 受容体選択的拮抗薬によって濃度依存的に抑制された。抗オレキシン抗体と抗 V1a 受容体抗体を用いた二重蛍光免疫染色によって、オレキシン神経に V1a 受容体が発現していることが明らかとなった。さらに、V1a 受容体欠損マウスのオレキシン神経では、バソプレシン、オキシトシンに対する反応が完全に消失していた。これらのことから、バソプレシンおよび、オキシトシンによるオレキシン神経の活性化は、いずれも V1a 受容体を介していることが判明した。また、ホスホリパーゼ C β 阻害薬(U73122)と非選択的陽イオンチャネル阻害薬(SKf96365)を用いた解析によって、V1a 受容体の下流において、ホスホリパーゼ C β の活性化を介して、非選択的陽イオンチャネルを開口させることによりオレキシン神経を活性化するという細胞内シグナル伝達経路を明らかにした。

次に、バソプレシンによるオレキシン神経細胞の活性化の生理的意義について、行動薬理学的手法を用いて明らかにした。バソプレシンを野生型マウスに脳室内投与する、もしくは、絶水させると、自発行動量の有意な増加が見られた。しかし、これらの反応はいずれも、オレキシン神経を特異的に脱落させたトランスジェニックマウスでは全く観察されなかった。また、V1a 受容体欠損マウスでは、野生型マウスと比べて通常の自発行動量が有意に減少しており、絶水による自発行動量の増加も見られなかった。

これらの結果から、バソプレシンおよびオキシトシンによる V1a 受容体を介したオレキシン神経の活性化は、マウスの自発行動量の調節に重要な役割を果たしていることが示唆された。脱水時においては、血漿浸透圧上昇により、バソプレシンが遊離され、末梢では腎臓における水の再吸収を増加させたり、血管を収縮させることによって、体内水分と循環を保持するように作用すると同時に、中枢神経系では、水分消費が増えるにも関わらず、オレキシン神経を活性化させて行動量を増加させていることが明らかとなった。このバソプレシンの末梢と中枢での異なる反応により、水分を出来るだけ保持しつつ、行動量の増加によって新たな水源に出会う確率を増やし、自然界において生存に有利となるように作用している可能性が示唆された。

1. 背景

絶食や絶水などによる恒常性危機状況下を生き延びる

ために、生体では内分泌系を発達させてきたと同時に、危機的状況を積極的に打開するための経路を併せ持つ。本

研究ではバソプレシンを介した視床下部オレキシン神経の活性化がこの経路に含まれている可能性について、電気生理学的、行動薬理的に解析を行った。

オレキシンは1998年にオーファンGタンパク質共役型受容体の内因性リガンドとして同定された神経ペプチドである(de Lecea *et al.*, 1998; Sakurai *et al.*, 1998)。オレキシンには、共通の前駆体であるプレプロオレキシンから生成されるオレキシンAおよび、オレキシンBが存在する。オレキシン受容体には、OX₁受容体とOX₂受容体の二つのサブタイプが存在することが知られており、OX₁受容体は、オレキシンAに対する親和性がオレキシンBに対する親和性よりも約50倍高い。一方、OX₂受容体は、オレキシンAとオレキシンBに対して同程度の親和性を持つ。また、OX₁受容体はGタンパク質のαサブユニットのGqサブクラスに共役しており、OX₂受容体はGqサブクラスおよび、Gi/oサブクラスに共役していることが報告されている(Zhu *et al.*, 2003)。この二つの受容体は、脳内において異なる発現パターンを示す。OX₁受容体は海馬、扁桃核、大脳皮質、視床、視床下部、脳幹などに広く発現し、特に青斑核に強い発現が見られる。一方、OX₂受容体は視床下部の弓状核、腹内側核、外側野や大脳皮質、アセチルコリン神経核の外背側被蓋核、橋脚被蓋核などに発現が見られ、結節乳頭体核において、最も強い発現が見られる(Trivedi *et al.*, 1998; Nambu *et al.*, 1999; Marcus *et al.*, 2001)。

オレキシンを産生するオレキシンニューロンは、古くから摂食中枢や飲水中枢として知られている視床下部外側野と、その周辺領域にのみ少数が散在し、そこから小脳を除く中枢神経系全域にその軸索を投射している。中でも特にモノアミン神経系の起始核である青斑核、縫線核、結節乳頭体核や、コリン作動性神経系の起始核である外背側被蓋核および、橋脚被蓋核に強い投射が認められ、これらはオレキシン受容体の発現領域とよく一致している(Date *et al.*, 1999)。また、これらの神経核はいずれも、覚醒の維持や睡眠覚醒サイクルの形成に重要な役割を果たしていることが知られており、合成したオレキシンペプチドをラットの脳室内に投与すると、摂食量や飲水量の増加だけでなく、覚醒レベルの上昇や、常同行動の亢進、自発行動量の増加および、交感神経系の活性化などの様々な生理作用を引き起こすことが報告されている

(Sakurai *et al.*, 1998; Kunii *et al.*, 1999; Hagan *et al.*, 1999; Shirasaka *et al.*, 1999; Nakamura *et al.*, 2000)。

また、プレプロオレキシン欠損マウス、OX₂受容体欠損マウスおよび、オレキシンニューロンのみを特異的に脱落させた遺伝子改変マウスを用いた実験から、これらのマウスが、ヒトのナルコレプシーで特徴的な症状と酷似した症状を呈することが見出された(Chemelli *et al.*, 1999; Hara *et al.*, 2001; Willie *et al.*, 2003)。ナルコレプシーとは、日中の堪え難い眠気や、強い感情の動きによって抗重力筋が脱力するカタプレキシーを主徴とする睡眠障害である。ナルコレプシー患者は、日常生活において覚醒を維持できないことから、オレキシンが覚醒状態の適切な維持に重要な役割を担っていると考えられる。

このようにオレキシンシステムは、生命活動の根幹を成す摂食行動、飲水行動や、睡眠覚醒サイクルの形成において重要な役割を担っているため、オレキシンニューロンに対する入力系を詳細に解析することで、これら生命現象の基盤を成す神経機構の理解に寄与すると考えられた。

そこで、オレキシンニューロンに対する入力系を解明するために、神経の経シナプスの逆行性トレーサーとして用いられる、無毒化した破傷風毒素C末断片とGFPとの融合タンパク質(TTC::GFP)をオレキシンニューロン特異的に発現する遺伝子改変マウスを作製し、オレキシンニューロンに直接投射しているニューロンの局在が明らかとなった(Sakurai *et al.*, 2005)。この結果から、オレキシンニューロンが、扁桃核、分界条床核などの大脳辺縁系や視索前野のGABA作動性ニューロン、縫線核のセロトニン作動性ニューロンからの入力を受けていることが明らかとなった。さらに、それらの入力系が、オレキシンニューロンに対してどのような調節を行っているのかについて、オレキシンニューロン特異的にEGFPを発現する遺伝子改変マウスを作成し、電気生理学的手法を用いて詳細な解析が行われた(Yamanaka *et al.*, 2003b; Yamanaka *et al.*, 2003a)。オレキシンニューロンは視床下部外側野とその周辺領域にのみ少数がまばらに散在しているため、オレキシンニューロン特異的にCa²⁺感受性タンパク質Yellow Cameleon 2.1(YC2.1)を発現する遺伝子改変マウスを作製し、Ca²⁺イメージング法により、オレキシンニューロンの活動に影響を与える神経ペプチドのスクリーニングを行った。このオレキシンYC2.1マウスの脳スライス標本を用いることで、一度

に複数のオレキシンニューロンの活動を記録することができ、ハイスループットな解析が可能となった。摂食行動や睡眠覚醒の制御に関与していることが報告されている 25 種類の神経ペプチドをオレキシンニューロンに次々と投与した結果、コレシストキニン、ニューロテンシン、バソプレシン、オキシトシンがオレキシンニューロンを活性化し、ノシセプチンがオレキシンニューロンを抑制することを見出した (Tsujino *et al.*, 2005)。

バソプレシンとオキシトシンは、よく似た 9 個のアミノ酸からなるペプチドである。バソプレシンおよび、オキシトシンの受容体には V1a、V1b、V2、オキシトシン受容体の四つのサブタイプが存在し、それらは全て G タンパク質共役型受容体である。V1a、V1b、オキシトシン受容体は、G タンパク質 α サブユニットの Gq サブクラスと共役しており、V2 受容体は Gs サブクラスと共役している (Birnbaumer, 2000)。末梢組織における作用として、バソプレシンは腎集合管における水の再吸収を高めることによる抗利尿作用や血管収縮作用を有すること、オキシトシンは子宮収縮作用を有することが古くから知られている。一方、中枢神経系においては、バソプレシン、オキシトシンともにペプチド性神経伝達物質として機能していると考えられているが、その生理的役割は未だ十分解明されていない。

2. 材料と方法

2.1 脳スライス標本の作製

オレキシン/*EGFP* マウス (2~3 週齢)、*V1aR^{+/+}*; オレキシン/*EGFP* マウス (2~3 週齢) は吸入麻酔薬のフォーレン (Takeda, Osaka, Japan) で十分麻酔し、素早く断頭した。頭部を、100% O₂ で通気した Cutting Solution で急速に冷却後、同溶液中において脳を摘出し、視床下部を含む脳のブロック片を作製した。脳ブロック片は、ビブラトーム (VTA-1000S, Leica, Wetzlar, Germany) を用いて厚さ 300~400 μ m に薄切し、視床下部外側野を含むスライス標本を 100% O₂ で通気した人工細胞外液に移し、室温 (24~26°C) で 1 時間以上インキュベーション後に実験に用いた。

2.2 オレキシンニューロンの Ca²⁺ イメージング

Ca²⁺ イメージングには、オレキシン/*YC2.1* マウスを使用した。オレキシン/*YC2.1* マウスから作製した脳スライス標本を正立蛍光顕微鏡 (BX51WI, Olympus, Tokyo, Japan) に

取り付けられた記録用チャンバー (RC-27L, Warner Instrument, Hamden, CT, USA) に静置した。赤外線カメラ (C2741-79, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan) により、近赤外微分干渉 (IR-DIC) 像を、また高速高感度 CCD カメラ (Cascade 650, Roper Scientific, Tucson, AZ, USA) にて蛍光像を取得した。

2.3 電気生理学的測定

ホールセル記録には、オレキシン/*EGFP* マウスを使用した。パッチクランプアンプとして Axopatch 200B (Molecular Devices, Union City, CA, USA) を用い、パッチ電極は borosilicate 製ガラス管 (GC150-10, Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA) を微小電極プレー (P-97, Sutter Instruments) を用いて作製した。

2.4 免疫組織化学

オレキシンと V1a 受容体の二重免疫染色には、*V1aR^{+/+}* マウス、*V1aR^{-/-}* マウスそれぞれの冠状断脳切片 (40 μ m) を使用した。脳切片を 1% bovine serum albumin (BSA) および 0.25% Triton X-100 とした 0.1 M sodium phosphate (NaPi) buffer に浸した後 (10 分間 3 回)、同溶液を用いて 500 倍に希釈したウサギ抗 V1a 受容体抗体 (Millipore, MA, USA) を 4°C で 48 時間インキュベーションさせた。その後、同溶液で 800 倍に希釈した Alexa594 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を室温で 1 時間インキュベーションさせた。さらにその後、その脳切片を 500 倍に希釈したモルモット抗オレキシン抗体を 4°C で 48 時間インキュベーションし、800 倍に希釈した Alexa 488 標識ヤギ抗モルモット IgG 抗体 (Invitrogen) を室温で 1 時間インキュベーションした。

2.5 脳室内投与

オスの野生型マウス (20-25 g, オレキシン/*ataxin-3* マウスの同腹子マウス)、およびオレキシン/*ataxin-3* マウスは、12 時間周期の明暗サイクル (light on; 8:00~20:00 / light off; 20:00~8:00)、22°C の条件で飼育し、餌と水は自由摂取させた。マウスはペントバルビタール (50 mg/kg) を腹腔内投与することによって麻酔後、脳定位固定装置 (David Kopf Instruments, CA, USA) にマウス用固定具を介して固定した。ガイドカニューレ (23G, 9 mm) を脳定位固定装置を用いて第 3 脳室に埋め込み、歯科用セメントを用いて留置した (AP = -0.5 mm, ML = 0 mm, DV = -5.0 mm)。脳室内投与は 8:30 に開始し、9:00 までには終了した。それ

ぞれのマウスは、十分環境に慣れさせた飼育ケージ中に戻し、赤外線モニター (Supermex, Muromachi Kikai, Tokyo, Japan) を用いて、脳室内投与後 5 時間に渡って自発行動量を測定した。

3. 1 結果

3. 1 バソプレシンおよび、オキシトシンは、オレキシニューロンを活性化する

ホールセルカレントクランプを用いて、膜電位をモニタ

ーしながら、バソプレシン、またはオキシトシンをオレキシニューロンに投与すると、濃度依存的に膜電位の上昇と、それに伴う発火頻度の増加が観察された (図 1A と 1F)。また、テトロドトキシン存在下においても、バソプレシンおよび、オキシトシンはオレキシニューロンを脱分極させたことから、この反応は直接作用 (後シナプス作用) であると考えられた (図 1B)。バソプレシン (1 μ M)、またはオキシトシン (1 μ M) を局所投与法によりオレキシニューロンに投与すると、発火頻度はそれぞれ薬物作用前の $604 \pm 175\%$

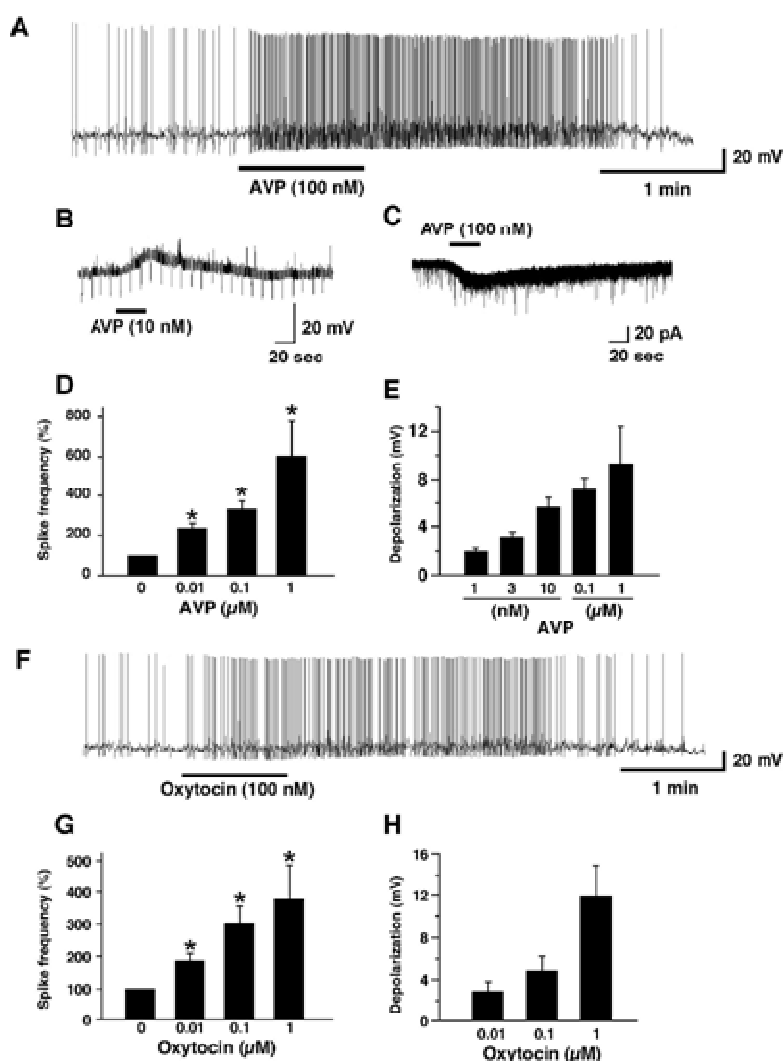


図 1. バソプレシン、オキシトシンはオレキシニューロンを活性化する。カレントクランプにおいて、オレキシニューロンにバソプレシン (100 nM) を投与すると脱分極と発火頻度の増加が観察された。B. テトロドトキシン存在下で、オレキシニューロンにバソプレシン (10 nM) を投与すると持続的な脱分極が観察された。C. ボルテージクランプ下 (-60 mV)、テトロドトキシン存在下においてバソプレシン (100 nM) を投与すると内向き電流が生じた。D と E. バソプレシンは濃度依存的に発火頻度の増加 (D) と脱分極 (E) を引き起こした。F. カレントクランプにおいて、オキシトシン (100 nM) を投与すると脱分極と発火頻度の増加が観察された。G と H. オキシトシンは濃度依存的に発火頻度の増加 (G) と脱分極 (H) を引き起こした。

($n = 5, p < 0.001$, ANOVA)、または $378 \pm 108\%$ ($n = 5, p < 0.001$, ANOVA) に有意に増加した(図 1D と 1G)。テトロドトキシン存在下において、バソプレシン ($1 \mu\text{M}$)、またはオキシトシン ($1 \mu\text{M}$) 投与は、それぞれ $9.3 \pm 2.7 \text{ mV}$ ($n = 5, p < 0.05$, ANOVA)、または $11.9 \pm 3.0 \text{ mV}$ ($n = 5, p < 0.05$, ANOVA) の有意な脱分極を引き起こした(図 1E と 1H)。

3.2 バソプレシンによるオレキシンニューロンの活性化には V1a 受容体が関与している

バソプレシンの受容体には、V1a、V1b、V2、オキシトシン受容体の四つのサブタイプが知られている。それらの中で、どの受容体がバソプレシンによるオレキシンニューロンの活性化に関与しているのかについて、受容体選択的拮抗薬を用いた同定を試みた。オレキシンニューロン特異的に Ca^{2+} 感受性タンパク質 YC2.1 を発現するオレキシン/YC2.1 マウスを用いた Ca^{2+} イメージングによる検討を行った。テトロドトキシン存在下において、オレキシンニューロンにバソプレシンを投与すると、YFP/CFP ratio の増加が観察された。YFP/CFP ratio の増加は細胞内 Ca^{2+} 濃度が増加したことを意味している。バソプレシンによる細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加はバソプレシンの濃度依存的であった(図 2A と 2B, $\text{EC}_{50} = 2.8 \pm 0.8 \text{ nM}$, $n = 10 - 19$)。

最初に、バソプレシン (10 nM) を脳スライス標本に繰り返し投与し、バソプレシン投与によって得られる ratio の変化が、毎回同程度であることを確認し、この時の ratio の変化を 100% とした(図 2C, ratio の変化; 1 回目 0.19, 2 回目 0.18)。次に、受容体選択的拮抗薬を溶解した溶媒のみを灌流投与後、バソプレシンを投与し、この時の ratio の変化を対照群とした。3 回目、4 回目は受容体選択的拮抗薬を灌流投与しながらバソプレシンを投与した。V1a 受容体選択的拮抗薬である SR49059 (Serradeil-Le Gal *et al.*, 1993; Serradeil-Le Gal *et al.*, 2002a) 存在下では、バソプレシンによる細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加が濃度依存的に有意に抑制された(図 2D と 2E)。SR49059 (10 nM)、または SR49059 (100 nM) を作用させた時、バソプレシンによる細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加は対照群のそれぞれ $52.9 \pm 3.9\%$ ($n = 9, p < 0.0001$, ANOVA)、または $9.3 \pm 3.4\%$ ($n = 9, p < 0.0001$, ANOVA) に抑制された(図 2E)。一方、V1b 受容体選択的拮抗薬である SSR149415 ($10 \mu\text{M}$, $n = 23, p = 0.436$ 有意差なし, ANOVA) (Serradeil-Le Gal *et al.*, 2002b)、V2 受容体選択的拮抗薬である SR121463 (10

μM , $n = 21, p = 0.305$ 有意差なし, ANOVA) (Serradeil-Le Gal, 2001)、およびオキシトシン受容体選択的拮抗薬である OVTA ($1 \mu\text{M}$, $n = 9, p = 0.757$ 有意差なし, ANOVA) (Pequeux *et al.*, 2002) は、バソプレシンによる細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加をほとんど抑制しなかった(図 2E)。

この SR49059 による抑制作用をオレキシン/EGFP マウスを用いてスライスパッチクランプ法によって確認した。ボルテジクランプモードで膜電位を -60 mV に固定し、バソプレシンを投与すると $20.2 \pm 1.1 \text{ pA}$ ($n = 9$) の内向き電流が観察された。このバソプレシンによって誘発される内向き電流は、SR49059 により濃度依存的に有意に抑制された(図 2F)。SR49059 (1 nM)、または SR49059 (10 nM) 投与により内向き電流は、それぞれ $11.4 \pm 1.6 \text{ pA}$ ($n = 14, p < 0.0001$, ANOVA)、または $1.8 \pm 1.0 \text{ pA}$ ($n = 7, p < 0.0001$, ANOVA) に抑制された。しかし、V2 受容体選択的拮抗薬である SR121463 を作用させても、内向き電流は抑制されなかった。SR121463 ($10 \mu\text{M}$) の存在下でバソプレシンによって誘発される内向き電流は、 $20.1 \pm 2.2 \text{ pA}$ ($n = 6, p = 0.97$ 有意差なし, ANOVA) であった(図 2F と 2G)。

これらのことから、バソプレシンが V1a 受容体を介してオレキシンニューロンを活性化していることが示唆された。

3.3 V1a 受容体はオレキシンニューロンに発現している

さらに、抗 V1a 受容体抗体の特異性を確認するため、 $V1aR^{-/-}$ マウスの脳切片を用いて二重蛍光免疫染色を行った(図 3)。 $V1aR^{-/-}$ マウスのオレキシン免疫陽性神経細胞の数や形に異常は認められなかったものの、V1a 受容体免疫陽性は全く観察されなかったことから、抗 V1a 受容体抗体が V1a 受容体特異的であることが確認できた。これらの結果より、オレキシンニューロンに V1a 受容体が発現していることがタンパク質レベルで確認できた。

3.4 $V1aR^{-/-}$ マウスではバソプレシンとオキシトシンに対する反応が完全に消失した

さらに、V1a 受容体の関与を確認するために、 $V1aR^{-/-}$ マウスのオレキシンニューロンにバソプレシンを作用させた。オレキシンニューロン活性化の確認にはコレシストキニンを使用した。これまでの研究から、コレシストキニンは CCK_A 受容体を介して全てのオレキシンニューロンを活性化することが示されている(Tsujino *et al.*, 2005)。コレシストキニン (30 nM) により誘発される内向き電流は、V1a 受容

体の遺伝子型に関わらず、ほぼ同程度の電流が観察された。それに対し、バソプレシン(100 nM)により誘発される内向き電流は、*V1aR^{+/+}*; オレキシン/*EGFP* マウスと比較して、*V1aR^{+/-}*; オレキシン/*EGFP* マウスでは有意に減少し、

V1aR^{-/-}; オレキシン/*EGFP* マウスでは完全に消失した(図4Aと4C)。*V1aR^{+/+}*; オレキシン/*EGFP*、*V1aR^{+/-}*; オレキシン/*EGFP*、および *V1aR^{-/-}*; オレキシン/*EGFP* マウスのオレキシンニューロンで測定されたバソプレシンによる内向き

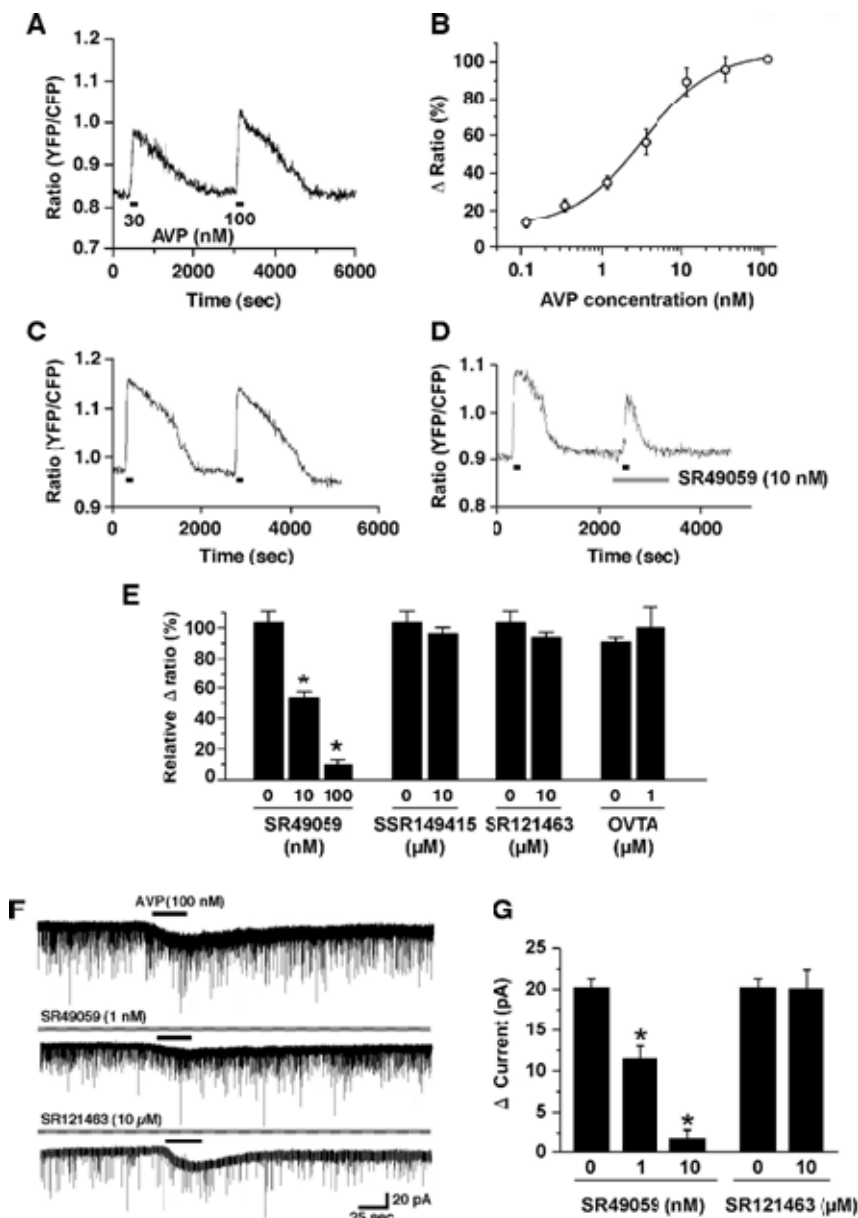


図2. バソプレシンによるオレキシンニューロンの活性化には V1a 受容体関与する。A と B. オレキシンニューロンにバソプレシンを投与すると、細胞内 Ca^{2+} 濃度が増加する。C. バソプレシン(10 nM)をオレキシンニューロンに連続して投与しても、その反応の大きさはほぼ同じであった。D と E. V1a 受容体選択的拮抗薬である SR49059 はバソプレシンによるオレキシンニューロンの細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加を抑制した。SSR149415; V1b 受容体選択的拮抗薬。SR121463; V2 受容体選択的拮抗薬。OVTA; オキシトシン受容体選択的拮抗薬。F. バソプレシン(100 nM)によって誘発されるオレキシンニューロンの内向き電流は SR49059 により濃度依存的に抑制された。しかし、SR121463(10 μ M) は内向き電流を抑制しなかった。G. F の結果をまとめた棒グラフ。

電流は、それぞれ 20.9 ± 1.1 pA ($n = 12$)、 14.7 ± 1.2 pA ($n = 6$, $p = 0.005$, $V1aR^{+/+}$; オレキシン/EGFP マウスと比較)、および 0.0 ± 0.0 pA ($n = 8$, $p < 0.0001$, $V1aR^{+/+}$; オレキシン/EGFP マウスと比較)であった。さらに高濃度のバソプレシン (300 nM ($n = 3$), 1 μ M ($n = 4$))を投与しても、全く内向き電流が観察されなかった。一方、コレシストキニンによる内向き電流はそれぞれ 15.9 ± 1.1 pA ($n = 12$)、 $17.5 \pm$

2.0 pA ($n = 6$, $p = 0.39$ 有意差なし, ANOVA)、および 16.8 ± 1.3 pA ($n = 8$, $p = 0.87$ 有意差なし, ANOVA)であった。また、興味深いことに $V1aR^{-/-}$ マウスのオレキシンニューロンは、高濃度オキシトシン (3 μ M)に対しても同様に全く反応を示さなかった ($n = 6$, 図 4B と 4C)。これらのことから、バソプレシンが V1a 受容体を介してオレキシンニューロンを活性化していることが強く示唆された。また、バソプレシ

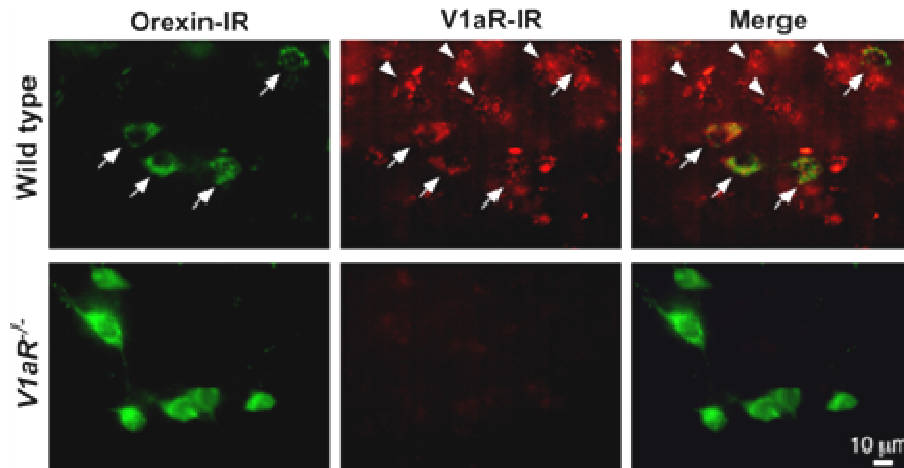


図 3. オレキシンニューロンは V1a 受容体を発現する。抗オレキシン抗体免疫陽性神経細胞は野生型マウス(上段)、 $V1aR^{-/-}$ マウス(下段)両方において視床下部外側野に局在していた (Alexa 488, 緑)。V1a 受容体免疫陽性も同じ領域で観察された (Alexa 594, 赤)。野生型マウスの重ね合わせた写真から、オレキシン免疫陽性細胞上に V1a 受容体免疫陽性が存在していることが確認された。矢印は V1a 受容体を発現しているオレキシンニューロンを示している。

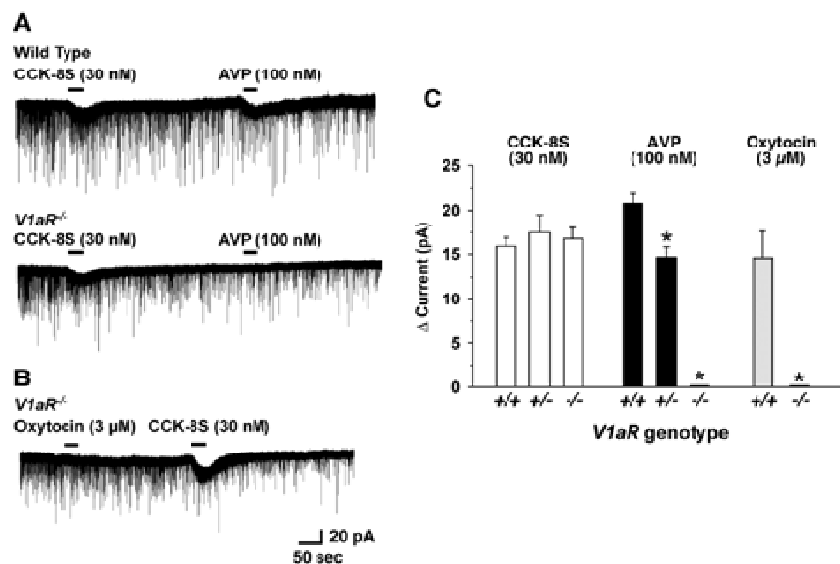


図 4. $V1aR^{-/-}$ マウスではバソプレシン、オキシトシンによる内向き電流が完全に消失する。A. ボルテージクランプ (-60 mV)において、コレシストキニン (30 nM)とバソプレシン (100 nM)を連続投与した。B. $V1aR^{-/-}$ マウスにオキシトシン (3 μ M)を投与したが、オキシトシンに対する応答は全く見られなかった。C. A と B の結果をまとめた棒グラフ。

ンのみならずオキシトシンも V1a 受容体を介してオレキシンニューロンを活性化していると考えられた。

3. 5 V1a 受容体を介したオレキシンニューロンの活性化は自発行動量の調節および絶水による自発行動量増加に重要な役割を果たしている

バソプレシン、オキシトシンによるオレキシンニューロン活性化の生理的意義を解明するため、個体マウスを用いた行動実験を行った。野生型マウスとオレキシンニューロンを特異的に脱落させたオレキシン/*ataxin-3* マウス(Hara *et al.*, 2001)の第3脳室にバソプレシンを脳室内投与した。バソプレシンはマウスにとって休息期である明期の始めに(8:30)に投与し、投与後5時間(9:00 - 14:00)のマウスの自発行動量を測定した。対照群には生理食塩水を投与したマウスの自発行動量を用いた。野生型マウスに10 ngのバソプレシンを投与すると、自発行動量が有意に増加した($n = 6$, 図5A)。バソプレシン投与による自発行動量の増加は用量依存的であった(図5C)。生理食塩水、バソプレシン(3 ng)、およびバソプレシン(10 ng)投与後の自発行動量は3時間でそれぞれ、 $2,548 \pm 605$ counts ($n = 6$)、 $4,546 \pm 783$ counts ($n = 6$, $p = 0.037$, ANOVA)、および $5,026 \pm 990$ counts ($n = 6$, $p = 0.011$, ANOVA)であった。

一方、オレキシンニューロンのみを特異的に脱落させたオレキシン/*ataxin-3* マウスでは、バソプレシンを投与しても自発行動量は増加しなかった($n = 6$, 図5Bと5C)。生理食塩水、バソプレシン(3 ng)、およびバソプレシン(10 ng)投与後3時間の自発行動量は、それぞれ $2,553 \pm 327$ counts ($n = 6$)、 $2,216 \pm 460$ counts ($n = 6$, $p = 0.88$ 有意差なし, ANOVA)、および $2,685 \pm 825$ counts ($n = 6$, $p = 0.72$ 有意差なし, ANOVA)であった(図5C)。これらの結果から、バソプレシンの脳室内投与によって引き起こされる自発行動量の増加には、オレキシンニューロンが重要な役割を担っていると考えられた。

また、*V1aR*^{-/-} マウスの平時の自発行動量を測定したところ、野生型マウス(*V1aR*^{+/+} マウス)と比べて有意に減少していた(図5D)。自発行動量は3日間連続して測定したものを平均して算出した。野生型マウス、または *V1aR*^{-/-} マウスの暗期(20:00 - 8:00)の自発行動量は、それぞれ $62,656 \pm 10,008$ counts ($n = 6$)、または $49,292 \pm 3,199$ counts ($n = 9$, $p = 0.12$ 有意差なし, unpaired *t*-test)であり、有意差は認められなかったが、*V1aR*^{-/-} マウスでは自発行

動量に減少傾向が見られた。明期(8:00 - 20:00)の自発行動量は、それぞれ $15,462 \pm 2,078$ counts ($n = 6$)、または $9,647 \pm 1,157$ counts ($n = 9$, $p = 0.013$, unpaired *t*-test)であり、*V1aR*^{-/-} マウスでは有意に自発行動量が減少していた。一日(24時間分)の総自発行動量は、それぞれ $78,119 \pm 8,445$ counts ($n = 6$)、または $58,940 \pm 3,415$ counts ($n = 9$, $p = 0.02$, unpaired *t*-test)であり、*V1aR*^{-/-} マウスにおいて有意な自発行動量の減少が観察された。このことから、オレキシンニューロンに発現する V1a 受容体が、自発行動量の調節に重要な役割を担っている可能性が示唆された。これまでの研究から、絶水させると視索上核や室傍核に局在するバソプレシン神経が活性化すること、また脳脊髄液中のバソプレシン濃度が有意に増加することが報告されている(Szczepanska-Sadowska *et al.*, 1983; da Silveira *et al.*, 2007)ことから、野生型マウスとオレキシン/*ataxin-3* マウスを絶水させた時の自発行動量を測定した。絶水時の自発行動量は、自由に飲水させているときの同一個体の自発行動量を対照群として比較した。絶水により、血漿浸透圧は野生型マウス、オレキシン/*ataxin-3* マウス共に有意に上昇した。しかしながら、野生型マウスでは絶水時の自発行動量の増加が観察されたものの、オレキシン/*ataxin-3* マウスでは絶水時の自発行動量の増加は観察されなかった(図5Eと5F)。野生型マウスにおける絶水時の行動量増加は、特に暗期の始めに顕著であった。暗期開始後3時間(20:00 - 23:00)の自発行動量は、野生型マウスの絶水前、または絶水時で、それぞれ $11,198 \pm 2,973$ counts ($n = 6$)、または $17,591 \pm 3,342$ counts ($n = 6$, $p = 0.0015$, paired *t*-test)であった。一方、オレキシン/*ataxin-3* マウスのそれは、それぞれ $8,351 \pm 2,134$ counts ($n = 4$)、または $8,434 \pm 1,159$ counts ($n = 4$, $p = 0.47$ 有意差なし, paired *t*-test)であった。

さらに、絶水による自発行動量の増加に V1a 受容体が関与しているかどうかを、*V1aR*^{-/-} マウスを絶水させることにより検討した。野生型マウスでは絶水に伴い自発行動量の増加が観察されたが、*V1aR*^{-/-} マウスでは自発行動量に有意な変化は見られなかった(図6)。野生型マウスの暗期開始後3時間(20:00 - 23:00)の自発行動量は、絶水前、または絶水時で、それぞれ $25,955 \pm 5,556$ counts ($n = 4$)、または $36,154 \pm 7,057$ counts ($n = 4$, $p = 0.018$, paired *t*-test)であった。一方、*V1aR*^{-/-} マウスの暗期開始後3時間

(20:00 - 23:00)の自発行動量は絶水前、または絶水時で、それぞれ $17,256 \pm 1,979$ counts ($n = 5$)、または $18,259 \pm 2,673$ counts ($n = 5$, $p = 0.38$ 有意差なし, paired t -test)であった。

これらの結果から、バソプレシンによる V1a 受容体を介したオレキシンニューロンの活性化は、自発行動量の増加に重要な役割を果たしていることが示唆された。

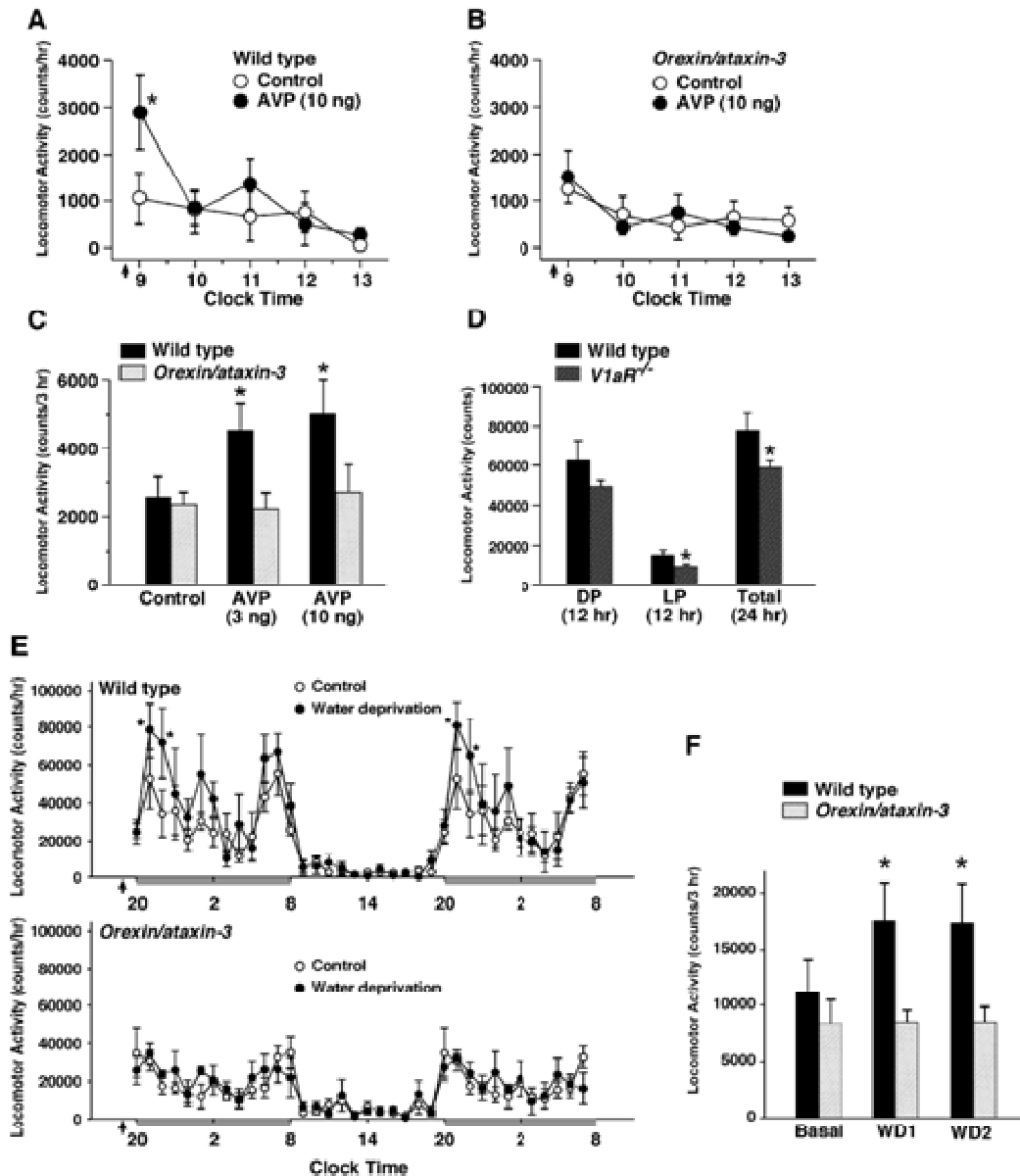


図5. バソプレシンによるオレキシンニューロン活性化の生理的意義。AとB. 明期にバソプレシンを脳室内に投与すると、野生型マウスでは自発行動量が増加するがオレキシン/ataxin-3 マウスでは有意な変化は観察されなかった。C. A、Bのグラフの投与後3時間分の自発行動量をまとめた棒グラフ。D. 野生型マウスと比較してV1aR^{-/-}マウスの平時の自発行動量は減少していた。平時の自発行動量は3日間測定した自発行動量を平均して算出した。E. 野生型マウス(上のグラフ)を絶水させると、暗期において自発行動量が増加したが、オレキシン/ataxin-3 マウス(下のグラフ)では変化が見られなかった。F. Eの20:00から23:00の3時間の自発行動量を結果をまとめた棒グラフ。Orexin/ataxin-3はオレキシン/ataxin-3遺伝子改変マウス、DPは暗期(12時間;20:00 - 8:00)、LPは明期(12時間;8:00 - 20:00)、Basalは通常の自発行動量、WD1は絶水1日目、WD2は絶水2日目をそれぞれ意味している。

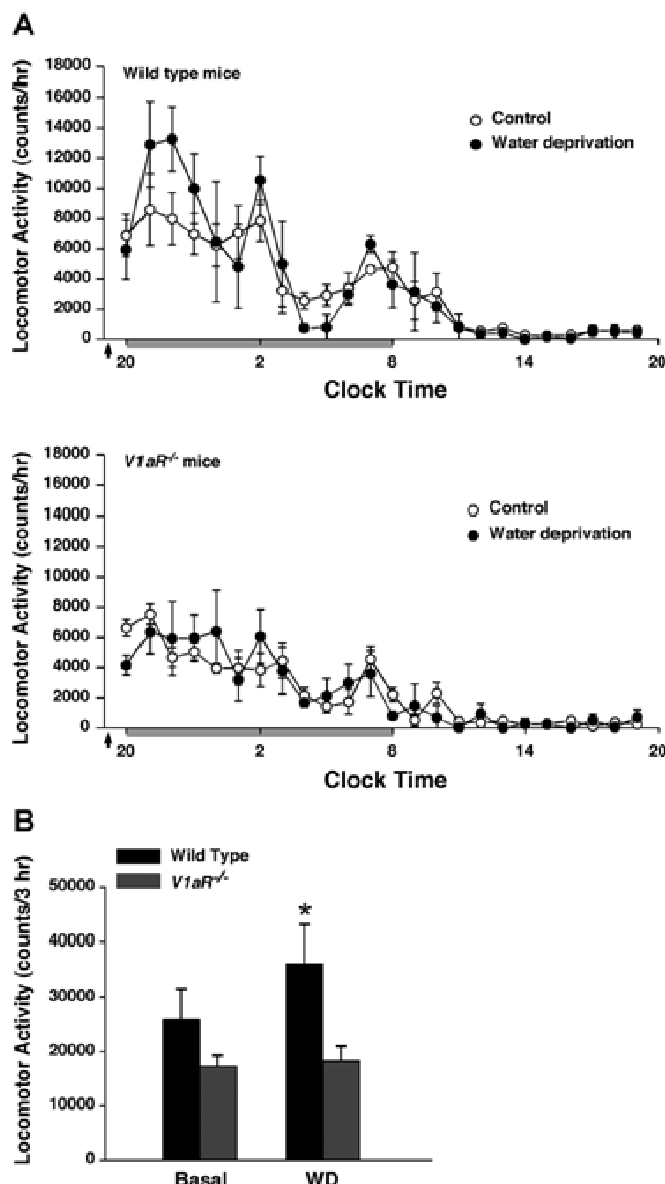


図6. $V1aR^{-/-}$ マウスは絶水による自発行動量の増加を示さない。A. 野生型マウスを絶水させると暗期において自発行動量が増加したが、 $V1aR^{-/-}$ マウスでは変化が見られなかった。暗期開始時に絶水を開始した。暗期は横軸の灰色の線で示している。B. A の 20:00 から 23:00 の 3 時間の自発行動量の結果をまとめた棒グラフ。Basal は平時、WD は絶水時をそれぞれ意味している。

4. 考 察

バソプレシンの受容体には、V1a、V1b、V2、オキシトシン受容体の四つのサブタイプが存在し、全て 7 回膜貫通型の構造を持つ G タンパク質共役型受容体である。それらのうち、V1a、V1b、オキシトシン受容体は Gq サブクラスと共役し、V2 受容体は Gs サブクラスと共役しており、それぞれ異なる細胞内シグナル伝達によってその生理作用を示す(Birnbaumer, 2000)。V1a 受容体は血管平滑筋、血

管内皮細胞、血小板、心筋細胞、脳、精巣、肝臓、腎尿細管などに発現する(Phillips *et al.*, 1988)。末梢での主な生理作用として血管平滑筋の収縮や血管内皮細胞からの凝固因子の放出、肝臓でのグリコーゲン分解などが報告されている。また、V1a 受容体は脳内において、皮質、外側中隔、海馬、扁桃体などに広く分布しており、記憶や情動、生殖行動に関与している(Young *et al.*, 1999)。V1b 受容体は主に下垂体前葉の副腎皮質刺激ホルモン産生細

胞に発現しており、副腎皮質刺激ホルモンの分泌を引き起こす。また、V1b 受容体は、ストレスホルモンであるコルチコトロピン放出因子と共に副腎皮質刺激ホルモン分泌を制御し、ストレス応答と関わっていると考えられる。また、この他に視索上核、室傍核、扁桃核、副腎髄質にも発現している (Johnson *et al.*, 1993; de Vries and Miller, 1998; Hernando *et al.*, 2001)。一方、V1bR^{-/-} マウスは攻撃行動やストレス応答が減弱していることが報告されており (Wersinger *et al.*, 2002; Lolait *et al.*, 2007)、中枢神経系における役割が明らかになりつつある。V2 受容体は主に腎臓に発現しており、腎集合管の尿細管で水チャネルであるアクアポリン 2 の管腔側細胞膜への挿入を促進することにより、水の透過性を増加させて水の再吸収を促進する。オキシトシン受容体は末梢組織では子宮や乳腺に分布し、乳汁分泌作用、子宮収縮作用を持つ。また、脳内にも広く分布することが分かっている (Gould and Zingg, 2003)。

今回の研究により、バソプレシンによるオレキシンニューロンの活性化には、V1a 受容体が関与していることが明らかとなった。バソプレシンによるオレキシンニューロンの活性化は、V1a 受容体選択的拮抗薬によって濃度依存的に抑制され、オレキシンニューロンに V1a 受容体免疫陽性シグナルが観察された。また、V1aR^{-/-} マウスのオレキシンニューロンでは、バソプレシンだけでなく、オキシトシンに対する反応も消失していたことから、バソプレシンおよび、オキシトシンはいずれも V1a 受容体を介してオレキシンニューロンを活性化することが明らかとなった。

オレキシンニューロンに入力するバソプレシンニューロンが局在する領域について

どこの領域に局在しているバソプレシンニューロン、またはオキシトシンニューロンがオレキシンニューロンに対して入力しているのだろうか？バソプレシンニューロンおよび、オキシトシンニューロンは視索上核、視交叉上核 (Sofroniew and Weindl, 1980)、室傍核、分界条床核 (Sawchenko and Swanson, 1982; Rosen *et al.*, 2006)、扁桃核中心核 (Dubois-Dauphin *et al.*, 1989) に局在していることが報告されている。

バソプレシンおよび、オキシトシンによるオレキシンニューロンの活性化は、どのような生理的役割を担っているのだろうか？バソプレシンを野生型マウスの脳室内に投与すると、マウスにとっての休息期である明期において自発

行動量が増加した。しかし、オレキシンニューロンのみを特異的に脱落させたオレキシン/*ataxin-3* マウスでは自発行動量の有意な変化は観察されなかった。このことから、バソプレシンの作用による自発行動量の増加は、オレキシンニューロンの活性化を介していると考えられる。オレキシンを脳室内投与すると、摂食行動の増加や覚醒時間の延長 (España *et al.*, 2002) だけでなく、自発行動量が増加すること (Nakamura *et al.*, 2000; Matsuzaki *et al.*, 2002) も報告されており、これらのことは今回の結果とよく一致している。ラットにバソプレシン、もしくはオキシトシンを脳室内投与すると、覚醒時間が延長したり (Arnauld *et al.*, 1989)、心拍数が増加すること (Diamant and De Wied, 1993) が報告されている。オレキシンニューロンが活性化すると覚醒時間が延長したり (Nishino, 2007)、交感神経系が活性化される (Shirasaka *et al.*, 2003) ため、これらのバソプレシン脳室内投与で観察される作用の一部は、V1a 受容体を介してオレキシンニューロンを活性化することで引き起こされている可能性が考えられる。脱水状態に陥ると、血液中、脳脊髄液中の両方でバソプレシン濃度が増加する (Szczepanska-Sadowska *et al.*, 1983)。増加したバソプレシンは交感神経系に作用すると同時に、循環系を維持するためにレニン・アンジオテンシン系に作用する。これらの反応と同時に、中枢神経系においてバソプレシンは、オレキシンニューロンを活性化することで自発行動量を増加させる作用を持つことが明らかとなった。また、V1aR^{-/-} マウスは野生型マウスと比較して、平時の自発行動量が有意に減少していたことから、自発行動量の調節には、V1a 受容体を介したオレキシンニューロンの活性化が重要な役割を担っていると考えられる。

これまでも、動物を絶水させると自発行動量が増加することがよく知られていたが (Finger and Reid, 1952; Hall, 1955)、その行動量増加に関わる神経機構は今日までほとんど理解されていなかった。絶水により引き起こされる暗期開始後の自発行動量の増加は野生型マウスでは観察されたが、オレキシン/*ataxin-3* マウスでは観察されず、V1aR^{-/-} マウスにおいても絶水による自発行動量の増加は観察されなかった。これらのことは、絶水による自発行動量の増加に、V1a 受容体を介したオレキシンニューロンの活性化が関与していることを示唆している。これまでの研究から、ラットへのオレキシン A の脳室内投与により摂水

量が増加したり、24時間のラットの絶水によりオレキシンの mRNA の発現が上昇したりすることが明らかとなっている (Kunii *et al.*, 1999)。これらのことから、オレキシンは摂食行動のみならず飲水行動にも重要な役割を果たしていると考えられる。この絶水によって引き起こされる自発行動量の増加は、何を意味するのであろうか？自然界で生息する動物は、絶水により体内水分量が減少し、脱水状態に陥った時に、新たな水源を求めて動き回らなければならない。この反応は、絶食条件下の反応と酷似している。マウスを絶食させるとオレキシンニューロンの活性化を介した覚醒時間の延長、自発行動量の増加が引き起こされる (Yamanaka *et al.*, 2003b)ことが報告されているため、脱水や飢餓といった生命が危険に晒されている時に、オレキシンニューロンが活性化されるのは、自然界で生き残っていくために動物が身に付けた術なのかも知れない。

引用文献

- Anthes N, Schmid HA, Hashimoto M, Riediger T, Simon E (1997) Heterogeneous actions of vasopressin on ANG II-sensitive neurons in the subfornical organ of rats. *Am J Physiol* 273:R2105-2111.
- Arnauld E, Bibene V, Meynard J, Rodriguez F, Vincent JD (1989) Effects of chronic icv infusion of vasopressin on sleep-waking cycle of rats. *Am J Physiol* 256:R674-684.
- Arnhold MM, Wotus C, Engeland WC (2007) Differential regulation of parvocellular neuronal activity in the paraventricular nucleus of the hypothalamus following single vs. repeated episodes of water restriction-induced drinking. *Exp Neurol* 206:126-136.
- Bielsky IF, Hu SB, Ren X, Terwilliger EF, Young LJ (2005) The V1a vasopressin receptor is necessary and sufficient for normal social recognition: a gene replacement study. *Neuron* 47:503-513.
- Birnbaumer M (2000) Vasopressin receptors. *Trends Endocrinol Metab* 11:406-410.
- Chemelli RM, Willie JT, Sinton CM, Elmquist JK, Scammell T, Lee C, Richardson JA, Williams SC, Xiong Y, Kisanuki Y, Fitch TE, Nakazato M, Hammer RE, Saper CB, Yanagisawa M (1999) Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. *Cell* 98:437-451.
- da Silveira LT, Junta CM, Monesi N, de Oliveira -Pelegrin GR, Passos GA, Rocha MJ (2007) Time course of c-fos, vasopressin and oxytocin mRNA expression in the hypothalamus following long-term dehydration. *Cell Mol Neurobiol* 27:575-584.
- Date Y, Ueta Y, Yamashita H, Yamaguchi H, Matsukura S, Kangawa K, Sakurai T, Yanagisawa M, Nakazato M (1999) Orexins, orexigenic hypothalamic peptides, interact with autonomic, neuroendocrine and neuroregulatory systems. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:748-753.
- de Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, Gao X, Foye PE, Danielson PE, Fukuhara C, Battenberg EL, Gautvik VT, Bartlett FS, 2nd, Frankel WN, van den Pol AN, Bloom FE, Gautvik KM, Sutcliffe JG (1998) The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:322-327.
- de Vries GJ, Miller MA (1998) Anatomy and function of extrahypothalamic vasopressin systems in the brain. *Prog Brain Res* 119:3-20.
- Diamant M, De Wied D (1993) Differential effects of centrally injected AVP on heart rate, core temperature, and behavior in rats. *Am J Physiol* 264:R51-61.
- Dubois-Dauphin M, Tribollet E, Dreifuss JJ (1989) Distribution of neurohypophysial peptides in the guinea pig brain. I. An immunocytochemical study of the vasopressin-related glycopeptide. *Brain Res* 496:45-65.
- Egashira N, Tanoue A, Higashihara F, Mishima K, Fukue Y, Takano Y, Tsujimoto G, Iwasaki K, Fujiwara M (2004) V1a receptor knockout mice exhibit impairment of spatial memory in an eight-arm radial maze. *Neurosci Lett* 356:195-198.
- Egashira N, Tanoue A, Matsuda T, Koushi E, Harada S, Takano Y, Tsujimoto G, Mishima K, Iwasaki K, Fujiwara M (2007) Impaired social interaction and reduced anxiety-related behavior in vasopressin V1a receptor knockout mice. *Behav Brain Res* 178:123-127.
- Espana RA, Plahn S, Berridge CW (2002) Circadian-dependent and circadian-independent behavioral actions

- of hypocretin/orexin. *Brain Res* 943:224-236.
- Finger FW, Reid LS (1952) The effect of water deprivation and subsequent satiation upon general activity in the rat. *J Comp Physiol Psychol* 45:368-372.
- Fu LY, Acuna-Goycolea C, van den Pol AN (2004) Neuropeptide Y inhibits hypocretin/orexin neurons by multiple presynaptic and postsynaptic mechanisms: tonic depression of the hypothalamic arousal system. *J Neurosci* 24:8741-8751.
- Gould BR, Zingg HH (2003) Mapping oxytocin receptor gene expression in the mouse brain and mammary gland using an oxytocin receptor-LacZ reporter mouse. *Neuroscience* 122:155-167.
- Hagan JJ, Leslie RA, Patel S, Evans ML, Wattam TA, Holmes S, Benham CD, Taylor SG, Routledge C, Hemmati P, Munton RP, Ashmeade TE, Shah AS, Hatcher JP, Hatcher PD, Jones DN, Smith MI, Piper DC, Hunter AJ, Porter RA, Upton N (1999) Orexin A activates locus coeruleus cell firing and increases arousal in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:10911-10916.
- Halaszovich CR, Zitt C, Jungling E, Luckhoff A (2000) Inhibition of TRP3 channels by lanthanides. Block from the cytosolic side of the plasma membrane. *J Biol Chem* 275:37423-37428.
- Hall JF (1955) Activity as a function of a restricted drinking schedule. *J Comp Physiol Psychol* 48:265-266.
- Hara J, Beuckmann CT, Nambu T, Willie JT, Chemelli RM, Sinton CM, Sugiyama F, Yagami K, Goto K, Yanagisawa M, Sakurai T (2001) Genetic ablation of orexin neurons in mice results in narcolepsy, hypophagia, and obesity. *Neuron* 30:345-354.
- Hernando F, Schoots O, Lolait SJ, Burbach JP (2001) Immunohistochemical localization of the vasopressin V1b receptor in the rat brain and pituitary gland: anatomical support for its involvement in the central effects of vasopressin. *Endocrinology* 142:1659-1668.
- Hiroyama M, Aoyagi T, Fujiwara Y, Birumachi J, Shigematsu Y, Kiwaki K, Tasaki R, Endo F, Tanoue A (2007) Hypermetabolism of fat in V1a vasopressin receptor knockout mice. *Mol Endocrinol* 21:247-258.
- Inenaga K, Yamashita H (1986) Excitation of neurones in the rat paraventricular nucleus in vitro by vasopressin and oxytocin. *J Physiol* 370:165-180.
- Johnson AE, Audigier S, Rossi F, Jard S, Tribollet E, Barberis C (1993) Localization and characterization of vasopressin binding sites in the rat brain using an iodinated linear AVP antagonist. *Brain Res* 622:9-16.
- Kunii K, Yamanaka A, Nambu T, Matsuzaki I, Goto K, Sakurai T (1999) Orexins/hypocretins regulate drinking behaviour. *Brain Res* 842:256-261.
- Lintschinger B, Balzer-Geldsetzer M, Baskaran T, Graier WF, Romanin C, Zhu MX, Groschner K (2000) Coassembly of Trp1 and Trp3 proteins generates diacylglycerol- and Ca²⁺-sensitive cation channels. *J Biol Chem* 275:27799-27805.
- Liu ZW, Gao XB (2007) Adenosine inhibits activity of hypocretin/orexin neurons by the A1 receptor in the lateral hypothalamus: a possible sleep-promoting effect. *J Neurophysiol* 97:837-848.
- Lolait SJ, Stewart LQ, Roper JA, Harrison G, Jessop DS, Young WS, 3rd, O'Carroll AM (2007) Attenuated stress response to acute lipopolysaccharide challenge and ethanol administration in vasopressin V1b receptor knockout mice. *J Neuroendocrinol* 19:543-551.
- Marcus JN, Aschkenasi CJ, Lee CE, Chemelli RM, Saper CB, Yanagisawa M, Elmquist JK (2001) Differential expression of orexin receptors 1 and 2 in the rat brain. *J Comp Neurol* 435:6-25.
- Mason WT (1980) Supraoptic neurones of rat hypothalamus are osmosensitive. *Nature* 287:154-157.
- Matsuzaki I, Sakurai T, Kunii K, Nakamura T, Yanagisawa M, Goto K (2002) Involvement of the serotonergic system in orexin-induced behavioral alterations in rats. *Regul Pept* 104:119-123.
- Muraki Y, Yamanaka A, Tsujino N, Kilduff TS, Goto K, Sakurai T (2004) Serotonergic regulation of the orexin/hypocretin neurons through the 5-HT1A receptor. *J Neurosci* 24:7159-7166.
- Nakamura T, Uramura K, Nambu T, Yada T, Goto K, Yanagisawa M, Sakurai T (2000) Orexin-induced

- hyperlocomotion and stereotypy are mediated by the dopaminergic system. *Brain Res* 873:181-187.
- Nambu T, Sakurai T, Mizukami K, Hosoya Y, Yanagisawa M, Goto K (1999) Distribution of orexin neurons in the adult rat brain. *Brain Res* 827:243-260.
- Nishino S (2007) The hypothalamic peptidergic system, hypocretin/orexin and vigilance control. *Neuropeptides* 41:117-133.
- Oka T, Sato K, Hori M, Ozaki H, Karaki H (2002) Xestospongins C, a novel blocker of IP₃ receptor, attenuates the increase in cytosolic calcium level and degranulation that is induced by antigen in RBL-2H3 mast cells. *Br J Pharmacol* 135:1959-1966.
- Pequeux C, Breton C, Hendrick JC, Hagelstein MT, Martens H, Winkler R, Geenen V, Legros JJ (2002) Oxytocin synthesis and oxytocin receptor expression by cell lines of human small cell carcinoma of the lung stimulate tumor growth through autocrine/paracrine signaling. *Cancer Res* 62:4623-4629.
- Phillips PA, Abrahams JM, Kelly J, Paxinos G, Grzonka Z, Mendelsohn FA, Johnston CI (1988) Localization of vasopressin binding sites in rat brain by in vitro autoradiography using a radioiodinated V₁ receptor antagonist. *Neuroscience* 27:749-761.
- Pirnik Z, Kiss A (2005) Fos expression variances in mouse hypothalamus upon physical and osmotic stimuli: co-staining with vasopressin, oxytocin, and tyrosine hydroxylase. *Brain Res Bull* 65:423-431.
- Ragenbass M, Tribollet E, Dreifuss JJ (1987) Electrophysiological and autoradiographical evidence of V₁ vasopressin receptors in the lateral septum of the rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:7778-7782.
- Rosen GJ, De Vries GJ, Villalba C, Weldele ML, Place NJ, Coscia EM, Glickman SE, Forger NG (2006) Distribution of vasopressin in the forebrain of spotted hyenas. *J Comp Neurol* 498:80-92.
- Sakurai T, Nagata R, Yamanaka A, Kawamura H, Tsujino N, Muraki Y, Kageyama H, Kunita S, Takahashi S, Goto K, Koyama Y, Shioda S, Yanagisawa M (2005) Input of orexin/hypocretin neurons revealed by a genetically encoded tracer in mice. *Neuron* 46:297-308.
- Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, Williams SC, Richardson JA, Kozlowski GP, Wilson S, Arch JR, Buckingham RE, Haynes AC, Carr SA, Annan RS, McNulty DE, Liu WS, Terrett JA, Elshourbagy NA, Bergsma DJ, Yanagisawa M (1998) Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 92:573-585.
- Sawchenko PE, Swanson LW (1982) Immunohistochemical identification of neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus that project to the medulla or to the spinal cord in the rat. *J Comp Neurol* 205:260-272.
- Serradeil-Le Gal C (2001) An overview of SR121463, a selective non-peptide vasopressin V₂ receptor antagonist. *Cardiovasc Drug Rev* 19:201-214.
- Serradeil-Le Gal C, Wagnon J, Valette G, Garcia G, Pascal M, Maffrand JP, Le Fur G (2002a) Nonpeptide vasopressin receptor antagonists: development of selective and orally active V_{1a}, V₂ and V_{1b} receptor ligands. *Prog Brain Res* 139:197-210.
- Serradeil-Le Gal C, Wagnon J, Garcia C, Lacour C, Guiraudou P, Christophe B, Villanova G, Nisato D, Maffrand JP, Le Fur G, *et al.* (1993) Biochemical and pharmacological properties of SR 49059, a new, potent, nonpeptide antagonist of rat and human vasopressin V_{1a} receptors. *J Clin Invest* 92:224-231.
- Serradeil-Le Gal C, Wagnon J, Simiand J, Griebel G, Lacour C, Guillon G, Barberis C, Brossard G, Soubrie P, Nisato D, Pascal M, Pruss R, Scatton B, Maffrand JP, Le Fur G (2002b) Characterization of (2S,4R)-1-[5-chloro-1-[(2,4-dimethoxyphenyl)sulfonyl]-3-(2-methoxy-phenyl)-2-oxo-2,3-dihydro-1H-indol-3-yl]-4-hydroxy-N,N-dimethyl-2-pyrrolidine carboxamide (SSR149415), a selective and orally active vasopressin V_{1b} receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther* 300:1122-1130.
- Shirasaka T, Takasaki M, Kannan H (2003) Cardiovascular effects of leptin and orexins. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284:R639-651.
- Shirasaka T, Nakazato M, Matsukura S, Takasaki M,

- Kannan H (1999) Sympathetic and cardiovascular actions of orexins in conscious rats. *Am J Physiol* 277: R1780-1785.
- Sofroniew MV, Weindl A (1980) Identification of parvocellular vasopressin and neurophysin neurons in the suprachiasmatic nucleus of a variety of mammals including primates. *J Comp Neurol* 193:659-675.
- Spasova MA, Hewavitharana T, Xu W, Soboloff J, Gill DL (2006) A common mechanism underlies stretch activation and receptor activation of TRPC6 channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:16586-16591.
- Spasova MA, Soboloff J, He LP, Hewavitharana T, Xu W, Venkatachalam K, van Rossum DB, Patterson RL, Gill DL (2004) Calcium entry mediated by SOCs and TRP channels: variations and enigma. *Biochim Biophys Acta* 1742:9-20.
- Szczepanska-Sadowska E, Gray D, Simon-Oppermann C (1983) Vasopressin in blood and third ventricle CSF during dehydration, thirst, and hemorrhage. *Am J Physiol* 245:R549-555.
- Takai Y, Sugawara R, Ohinata H, Takai A (2004) Two types of non-selective cation channel opened by muscarinic stimulation with carbachol in bovine ciliary muscle cells. *J Physiol* 559:899-922.
- Trivedi P, Yu H, MacNeil DJ, Van der Ploeg LH, Guan XM (1998) Distribution of orexin receptor mRNA in the rat brain. *FEBS Lett* 438:71-75.
- Tsujino N, Yamanaka A, Ichiki K, Muraki Y, Kilduff TS, Yagami K, Takahashi S, Goto K, Sakurai T (2005) Cholecystokinin activates orexin/hypocretin neurons through the cholecystokinin A receptor. *J Neurosci* 25: 7459-7469.
- Wersinger SR, Ginns EI, O'Carroll AM, Lolait SJ, Young WS, 3rd (2002) Vasopressin V1b receptor knockout reduces aggressive behavior in male mice. *Mol Psychiatry* 7:975-984.
- Willie JT, Chemelli RM, Sinton CM, Tokita S, Williams SC, Kisanuki YY, Marcus JN, Lee C, Elmquist JK, Kohlmeier KA, Leonard CS, Richardson JA, Hammer RE, Yanagisawa M (2003) Distinct narcolepsy syndromes in Orexin receptor-2 and Orexin null mice: molecular genetic dissection of Non-REM and REM sleep regulatory processes. *Neuron* 38:715-730.
- Winslow JT, Insel TR (2002) The social deficits of the oxytocin knockout mouse. *Neuropeptides* 36:221-229.
- Yamanaka A, Muraki Y, Tsujino N, Goto K, Sakurai T (2003a) Regulation of orexin neurons by the monoaminergic and cholinergic systems. *Biochem Biophys Res Commun* 303:120-129.
- Yamanaka A, Muraki Y, Ichiki K, Tsujino N, Kilduff TS, Goto K, Sakurai T (2006) Orexin neurons are directly and indirectly regulated by catecholamines in a complex manner. *J Neurophysiol* 96:284-298.
- Yamanaka A, Beuckmann CT, Willie JT, Hara J, Tsujino N, Mieda M, Tominaga M, Yagami K, Sugiyama F, Goto K, Yanagisawa M, Sakurai T (2003b) Hypothalamic orexin neurons regulate arousal according to energy balance in mice. *Neuron* 38:701-713.
- Young LJ, Toloczko D, Insel TR (1999) Localization of vasopressin (V1a) receptor binding and mRNA in the rhesus monkey brain. *J Neuroendocrinol* 11:291-297.
- Zhu Y, Miwa Y, Yamanaka A, Yada T, Shibahara M, Abe Y, Sakurai T, Goto K (2003) Orexin receptor type-1 couples exclusively to pertussis toxin-insensitive G-proteins, while orexin receptor type-2 couples to both pertussis toxin-sensitive and -insensitive G-proteins. *J Pharmacol Sci* 92:259-266.

No. 0841

The Study of Neuronal Networks Response to Water Homeostasis Emergency

Akihiro Yamanaka, Tomomi Tsunematsu

Section of Cell Signaling, National Institute of Physiological Sciences (NIPS)

Summary

Water homeostasis is a critical challenge to survival for land mammals. Mice display increased locomotor activity when dehydrated, a behavior that improves the likelihood of locating new sources of water and simultaneously places additional demands on compromised hydration levels. The neurophysiology underlying this well-known behavior has not been previously elucidated. We report that the anti-diuretic hormone vasopressin is involved in this response. AVP and oxytocin directly induced depolarization and an inward current in orexin/hypocretin neurons. AVP-induced activation of orexin neurons was inhibited by a V1a receptor (V1aR) selective antagonist and was not observed in V1aR knockout mice suggesting an involvement of V1aR. Subsequently activation of phospholipase C β triggers an increase in intracellular calcium by both calcium influx through non-selective cation channels and calcium release from calcium stores in orexin neurons. Intracerebroventricular injection of vasopressin or water deprivation increased locomotor activity in wild type mice, but not in transgenic mice lacking orexin neurons. V1aR knockout mice were less active than wild type mice. These results suggest that the activation of orexin neurons by AVP or oxytocin has an important role in the regulation of spontaneous locomotor activity in mice. This system appears to play a key role in water deprivation-induced hyperlocomotor activity, a response to dehydration that increases the chance of locating water in nature.