

ナトリウム恒常性に関わる神経機構の解析

檜山 武史

自然科学研究機構基礎生物学研究所

概要 動物の体液ナトリウム(Na)レベルは一定に保たれている。これまでの我々の研究から、体液(血液・脳脊髄液)のNaレベルは脳弓下器官(SFO)において監視され、その情報に基づいて塩分摂取行動が制御されること、SFOのグリア細胞に発現するNaチャンネル分子 Na_x が体液Naレベルセンサーであることなどが明らかになっている。しかしながら、SFO以外の脳領域に発現する Na_x については解析が進んでいなかった。

本研究では、 Na_x の発現が弱く、これまで解析が遅れていた脳部位について、新たに作成した抗体を用いて詳細に検討した。その結果、 Na_x は扁桃体や大脳皮質において、ニューロンに発現していることを確認した。新たにニューロンにおける Na_x のチャンネル特性を解析するため、マウス神経芽細胞腫由来の細胞株であるNeuro-2aに Na_x を発現する細胞株を樹立した。その細胞を用いて生理学的解析を行ったところ、ニューロンに発現した Na_x も細胞外 Na^+ レベルに対する感受性を示すこと、その Na^+ 濃度依存性はグリア細胞に発現させた場合と変わらないことが明らかになった。さらに、 Na_x を透過する陽イオンの選択性を解析したところ、 $Na^+ \approx Li^+ > Rb^+ > Cs^+$ であることが明らかになった。

また、 Na_x のC末端にはPSD95/Disc-large/ZO-1 (PDZ)結合モチーフが存在するが、今回新たに、シナプス後部PDZタンパク質であるPSD95がPDZ結合モチーフを介して Na_x と結合することが明らかになった。免疫染色の結果、扁桃体ニューロンにおいて Na_x とPSD95は共局在し、 Na_x がシナプス後部に局在することが示唆された。 Na_x を発現させたNeuro-2aにおいて、siRNAを用いて内在性のPSD95の発現を減少させると、 Na_x の細胞膜における発現が減少し、その結果、 Na_x を介した Na^+ 流入が減少した。この減少は、細胞内取り込み阻害剤により抑えられたことから、PSD95が Na_x の細胞膜における安定化に寄与していると考えられた。

以上のことから、 Na_x がニューロンのシナプス後部に発現し、なんらかの生理機能を果たしていることが示唆された。

1. 研究目的

ヒトを含む哺乳動物において、体液のナトリウム(Na^+)レベルは135~145 mMに保たれている。こうしたNa恒常性を維持するために、脳は体液の Na^+ レベルや浸透圧を監視するとともに、アンジオテンシンIIなどの血中ホルモンを介して末梢からの情報を受け取り、水分/塩分の経口摂取行動の制御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。例えば、脱水状態において体液の Na^+ レベルが上昇すると、脳の Na^+ レベルセンサーが活性化して塩分摂取を避ける行動をとるようになる。こうした体液 Na^+ レベルの上昇を感知する脳内のNaレベルセンサーについては、我々の研究から、脳弓下器官(Subfornical

organ, SFO)に発現する Na_x チャンネルがセンサー分子の実体であることが明らかになった⁽¹⁻⁵⁾。 Na_x はSFOを始めとする脳室周囲器官(Circumventricular organs, CVOs)のグリア細胞に主に発現している⁽⁶⁾。CVOsは血液脳関門を持たない領域であり、血液中の物質をモニターするのに適した脳領域であるため、センサーである Na_x が機能するのに適した場所と言える。一方、 Na_x は弱いながらも、CVOs以外の脳領域にも発現していることがわかっていたが、その発現が弱いために、発現している細胞種を含めて解析が進んでいなかった。本研究では、 Na_x チャンネルの発現が弱い脳領域について、新たに作成した抗体を用いて解析を進め、さらにその生理機能に迫ることを目的とし

て研究を行った⁽⁷⁾。

2. 研究方法

2.1 Na_x発現細胞株の樹立

FLAGタグを融合したマウスNa_xを誘導発現する細胞C6Mf4及びN2a-Mf1は、ラットグリオーマ細胞C6及びマウス神経芽細胞Neuro-2a (N2a) にテトラサイクリン誘導発現ベクターに遺伝子を導入したpTRE-FLAG-mNa_xを安定発現する株を選択し、樹立した。FLAGタグの無いNa_xを発現するC6M16については既に報告した⁽⁴⁾。Na_xの発現誘導には、アデノウィルスベクターを用いてTetOff 遺伝子を導入し、さらに1 mM dbcAMPを加えた無血清培地中で36時間培養した。

2.2 Na_x抗体の作成

マウス Na_x の II-III ドメイン間の細胞内領域(アミノ酸残基 724-933)に GST を融合したタンパク質を抗原としてウサギに免疫した。硫酸アンモニウム沈殿により免疫グロブリン画分を回収し、GST 結合セファロースを通して精製した。

2.3 逆転写 PCR (RT-PCR)

N2A細胞からトータルRNAを回収した。プライマーには、TaqMan Gene Expression assay (Na_x: ID#Mm008801952_m1とGAPDH: ID#Mm99999915_g1, いずれも Applied biosystems)を用いた。

2.4 GST プルダウンアッセイと質量分析

Na_x の C 末端領域(アミノ酸残基 1489-1681)に GST を融合した GST-Na_xを用いた。プルダウン実験は GST 融合タンパク質でコートしたグルタチオン・セファロース・ビーズを用いて行った。SDS-PAGE 後、バンドを切り出し、ゲル内トリプシン消化した後、MALDI-TOF MS 法(Reflex III, Bruker Daltonics)により質量分析を行った。

2.5 免疫沈降実験

HEK293T 細胞に FLAG-mNa_x または FLAG-mNa_x-T1679A⁽⁸⁾と PSD95⁽⁹⁾を共発現した。細胞抽出物を抗FLAG-M2 抗体を用いて処理した。

2.6 RNA 干渉

マウス PSD95 に対する small interfering RNA (siRNA) (SASI_Mm02_00304274, Sigma-Aldrich)とコントロール用 siRNA (MISSION siRNA Universal Negative Control, SIC-001, Sigma-Aldrich)を用いた。

2.7 Na⁺イメージング

細胞内Na⁺イメージングは、Na⁺感受性色素である(sodium-binding benzofuran isophthalate acetoxymethyl ester; SBFI/AM)を用いて行った。細胞外液(mM): 135 NaCl, 5 KCl, 2.5 CaCl₂, 1 MgCl₂, 20 HEPES, 10 NaOH, (HClでpH 7.3に調整)。

2.8 パッチクランプ実験

細胞外液(mM): 140 NaCl, 5 KCl, 2.5 CaCl₂, 1 MgCl₂, 5 HEPES, and 20グルコース。Na⁺を調整するためにNaClを加えた。電極内液 120 K-gluconate, 20 TEA-Cl, 2 MgCl₂, 2Na₂ATP, 1 EGTA, and 10 HEPES (pH 7.3)。Na_xの電流を検出するため、ダブル・バレルガラス管をピエゾドライブで高速駆動し、外液を切り替えた⁽¹⁰⁾。半値応答(C_{1/2})の[Na⁺]_oを計算するため、 $I = I_{Max} / \{1 + \exp[(C_{1/2} - C)/a]\}$ (I = 電流密度, C = [Na⁺]_o, I_{Max} = 1.0)を用いて得た近似曲線から計算した。

3. 研究結果

3.1 ニューロンにおけるNa_xの発現

Na_x は、元々、ラットのアストロサイト、ヒトの心臓、マウスの心房腫瘍細胞株、ラットの後根神経節から独立にクローニングされたNaチャンネルである⁽¹¹⁻¹⁴⁾。電位依存性Naチャンネルファミリーの一つであるが、電位依存性や不活性化に必須の配列を失っている⁽¹⁵⁻¹⁸⁾。lacZ(β ガラクトシダーゼ遺伝子)をインフレームに挿入して作成した Na_x ノックアウト(Na_x-KO)マウスを用いると、Na_x の発現を可視化することが可能である⁽¹⁹⁾。このマウスで、β ガラクトシダーゼ由来の強いシグナルが脳の一部の領域のグリア細胞において観察された。それらの領域には SFO、終板脈管器官(organum vasculosum of the lamina terminalis, OVLT)、正中隆起(Median eminence, ME)が含まれていた⁽¹⁹⁾。さらに、弱いシグナルが脳皮質IV層と扁桃体に観察されたが、発現が弱く、我々が作成したラット Na_x を抗原とする抗体では発現を確認することができなかった。末梢神経系では、非ミエリン化シュワン細胞と後根神経節細胞のニューロン及びサテライト細胞に観察された⁽²⁰⁾。

免疫染色によりマウスの大脳皮質や扁桃体における発現を確認するため、マウス Na_x の細胞内領域(ドメインII-III 間)を抗原とした抗体を新たに作成した。この抗体を用いて免疫染色を行った結果、いずれの領域も染色を確

認することができ、扁桃体においては Na_x の発現は外側に限局していることがわかった (Fig. 1A)。 Na_x -KO ではシグナルが観察されなかった。扁桃体外側部から単離した細胞で免疫染色を行った結果、ニューロンのマーカーである β チューブリン III と染色が重なり、 Na_x がニューロンに発現していることがわかった (Fig. 1B)。

3. 2 Na_x を発現するニューロン由来細胞株の樹立と Na_x の特性

ニューロンにおける Na_x チャネルの特性を解析するため、ニューロン由来細胞株 N2a にマウス Na_x を遺伝子導入し、TetOff ベクターによって誘導発現される細胞株 N2a-Mf1 を樹立した (Fig. 2)。 N2a には内在性 Na_x は発現していなかった。共焦点顕微鏡を用いて Na_x の免疫染色像を確認したところ、細胞膜に局在していることがわかった。 N2a には、内在性に PSD95 が発現しており、 Na_x を細胞膜で安定化した結果であると考えられる (後述)。

細胞外 Na^+ レベル ($[\text{Na}^+]_o$) を変化させ、パッチクランプ法を用いて膜電位固定条件において Na_x の電流を観察した (Fig. 3A)。細胞外液を高 Na^+ 溶液 ($[\text{Na}^+]_o = 160$ and 190 mM) に変えると、内向きの電流が現れ、 $[\text{Na}^+]_o$ が高い間は、不活性化せず、 $[\text{Na}^+]_o$ を元に戻すと ($[\text{Na}^+]_o = 140$

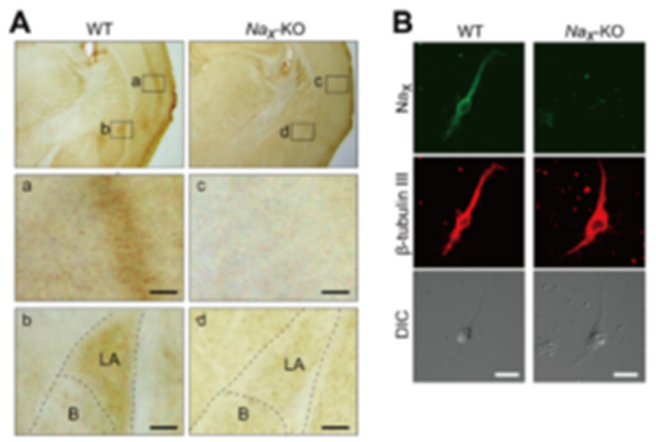


Fig. 1. 外側扁桃体ニューロンにおける Na_x の発現
(A) 野生型マウス及び Na_x -KOマウスの成体脳冠状断切片を、抗 Na_x 抗体を用いて染色した組織染色像。上段の拡大像を中段 (大脳皮質) 及び下段 (扁桃体) に示す。 LA, 外側扁桃体; B, 基底扁桃体。スケール $50 \mu\text{m}$ 。
(B) 外側扁桃体から単離した細胞の二重免疫染色像。 DIC, 微分干渉像。スケール $20 \mu\text{m}$ 。

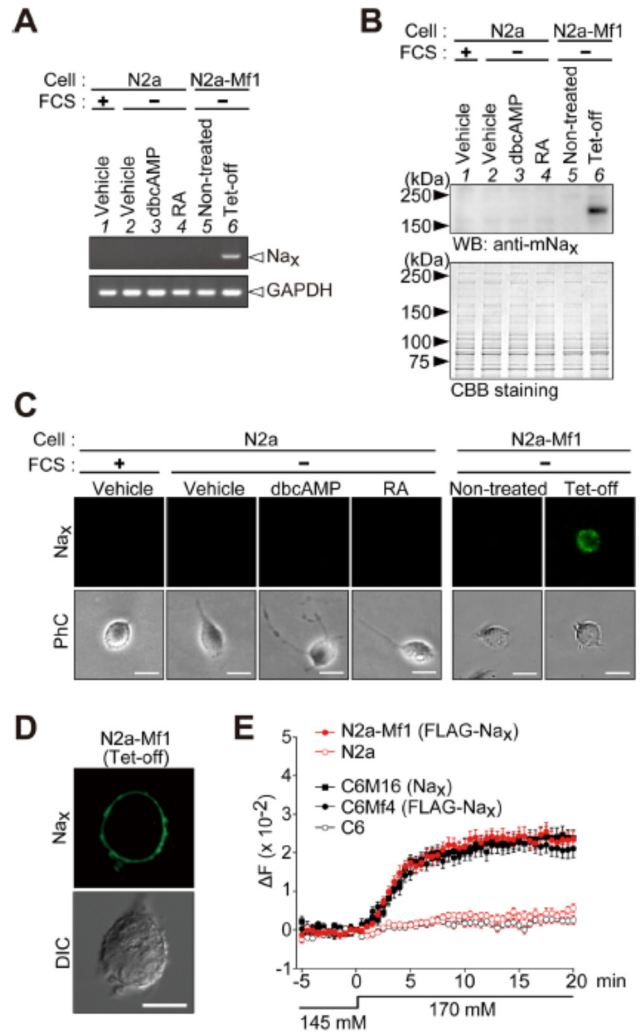


Fig. 2. Na_x を誘導発現する N2a 細胞の樹立
(A) RT-PCR による Na_x と対照用 GAPDH の発現解析。 FCS, 10% ウシ胎仔血清; dbcAMP, 1 mM dbcAMP; RA, 20 μM レチノイン酸, N2a-Mf1; pTRE-FLAG-m Na_x の安定発現株; Tet-off, Tet-off アデノウィルスにより Na_x 発現を誘導済み。
(B) 抗 Na_x 抗体を用いたウエスタン・ブロッティング解析。細胞の培養条件は A に準ずる。
(C, D) 抗 Na_x 抗体を用いた免疫染色。培養条件は A に準ずる。 D は共焦点顕微鏡画像。 PhC, 位相差像; DIC, 微分干渉像。スケール $20 \mu\text{m}$ (C), $10 \mu\text{m}$ (D)。
(E) Na^+ イメージングによる Na_x の機能的発現の確認。 C6M16, C6Mf4, and N2a-Mf1 細胞は、良く似た $[\text{Na}^+]_i$ 依存性の応答を示した。一方、親細胞株であり Na_x を発現していない N2a 及び C6 細胞は $[\text{Na}^+]_i$ 依存性の応答を示さなかった。縦軸、蛍光比の変化量 (ΔF , 340/380 nm)。 0 min の値を縦軸の 0 としている。 Mean \pm SE (n = 25)

mM)直ちに消失した。この電流は $[Na^+]_o$ を低下(130 mM)させた場合には観察されなかった。同様の実験をC6細胞に遺伝子を導入して樹立した Na_x 発現株(C6Mf4 及び C6M16)を用いて行ったが、応答電流は似通っていた。さらに、電流の振幅と $[Na^+]_o$ の関係を調べたが、Neruro-2a由来の細胞株と C6 由来の細胞株の間に差が無かった(最大振幅の半分値に対応する濃度は N2a-Mf1=159.8, C6Mf4=161.4, C6M16=160.4) (Fig. 3B)。

N2a-Mf1 細胞に発現した Na_x の各一価陽イオン(リチウム(Li⁺), ルビジウム(Rb⁺), セシウム(Cs⁺)に対する応答を

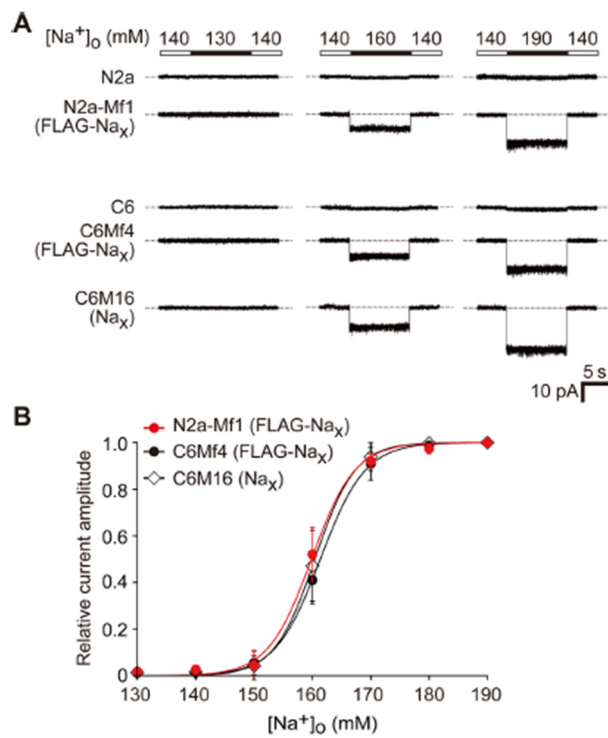


Fig. 3. N2A 細胞と C6 細胞に発現した Na_x の Na^+ 感受性の比較

(A) パッチクランプ法により記録した全細胞電流。細胞外液(140 mM)から低張 Na 溶液(130 mM)や高張 Na 溶液(160 and 190 mM)に切り替えた。(B) 電流の振幅と $[Na^+]_o$ 。細胞ごとに 190 mM に切り替えた際の応答で正規化。 Na_x を発現していない親細胞株である N2a 及び C6 には応答が現れなかった。C6Mf4(FLAG- Na_x)と C6M16(Na_x)の比較から、FLAG の融合がチャネル機能に影響しないことが示唆される。さらに、N2a-Mf1 と C6Mf4 の比較から、ニューロンに発現させた場合とグリア細胞に発現させた場合で機能に差が無い。Mean \pm SE. n = 5.

調べた (Fig. 4)。160 mM の細胞外 Na^+ を各イオンに置き換えると、電流密度(電流振幅を細胞の膜容量で割ったもの)が減少した (Fig. 4)。それぞれの電流は、不活性化せず、濃度を 140 mM まで下げると急速に戻る点において、 Na^+ で観察された電流と違い無かった。

3.3 Na_x と PSD95 の結合

Na_x のカルボキシル (C) 末端には PSD95/Disc-large/ZO-1 (PDZ) 結合ドメインが存在する⁽²¹⁾。その配列(ラット及びマウス-Q-T-Q-I, ヒト-Q-S-Q-I)は、非標準的(non-canonical)PDZ 結合モチーフ(-X-S/T-X-I/A)⁽²²⁾に一致する。PDZ 結合ドメインはタンパク質-タンパク質相互作用モジュールであり、標的となる PDZ タンパク質に結合する。我々は、 Na_x の PDZ 結合ドメインに結合する可能性のある PDZ タンパク質を PDZ アレイ・オーバーレイ・アッセイ⁽²³⁾を用いて探索した⁽⁸⁾。 Na_x の C 末端領域にグルタミン S 転スフェラーゼ(GST)を融合したタンパク質を用いて探索した結果、複数の結合タンパク質を見出した。その中には膜結合グアニル酸キナーゼ(MAGUK)ファミリー⁽²⁴⁾の一つである SAP97 も含まれていた。SAP97 は SFO のグリア細胞において Na_x と共局在していた。さらに C6 グリオーマ細胞を用いた実験から、SAP97 が Na_x の細胞膜における安定化に寄与していることが明らかになった⁽⁸⁾。

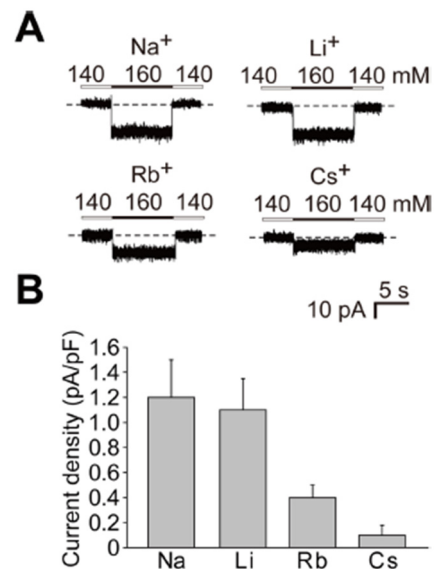


Fig. 4. Na_x のイオン選択性

(A) Na, Li, Rb または Cs を 20 mM 増加させた際の N2a-Mf1 細胞の全細胞電流。いずれの場合も、塩化物を使用。(B) 全細胞電流のまとめ。Mean \pm SE. n = 5.

以上の知見に基づき、我々はニューロンにおいても Na_x と結合する PDZ タンパク質が存在すると考えて、以下の実験を実施した (Fig. 5)。 Na_x の C 末端領域を GST に融合したタンパク質 (GST- Na_x -Cterm) を用いて成体ラット大脳皮質のシナプス小胞分画からのプルダウン実験を行った。質量分析装置を用いた解析により 95 kDa のバンドが MAGUK ファミリーの足場タンパク質の一つ PSD95 であることがわかった。また、プルダウンによって回収した試料をウェスタン・ブロッティング解析することにより、 Na_x と PSD95 の結合が確認された。また、HEK293T 細胞に全長

の FLAG タグを融合した Na_x と PSD95 を共発現し、免疫沈降法により全長同志の結合を確認した (Fig. 5C)。 Na_x の PDZ 結合モチーフに変異を入れて結合能力を失わせたもの⁽⁸⁾では (FLAG- Na_x -T1679A)、PSD95 は免疫沈降により回収されなかった。以上より、 Na_x は PSD95 と PDZ 結合モチーフを介して結合していることが明らかになった。免疫染色の結果、 Na_x と PSD95 は扁桃体において Thy1 陽性のニューロンに共発現していることが明らかになった。

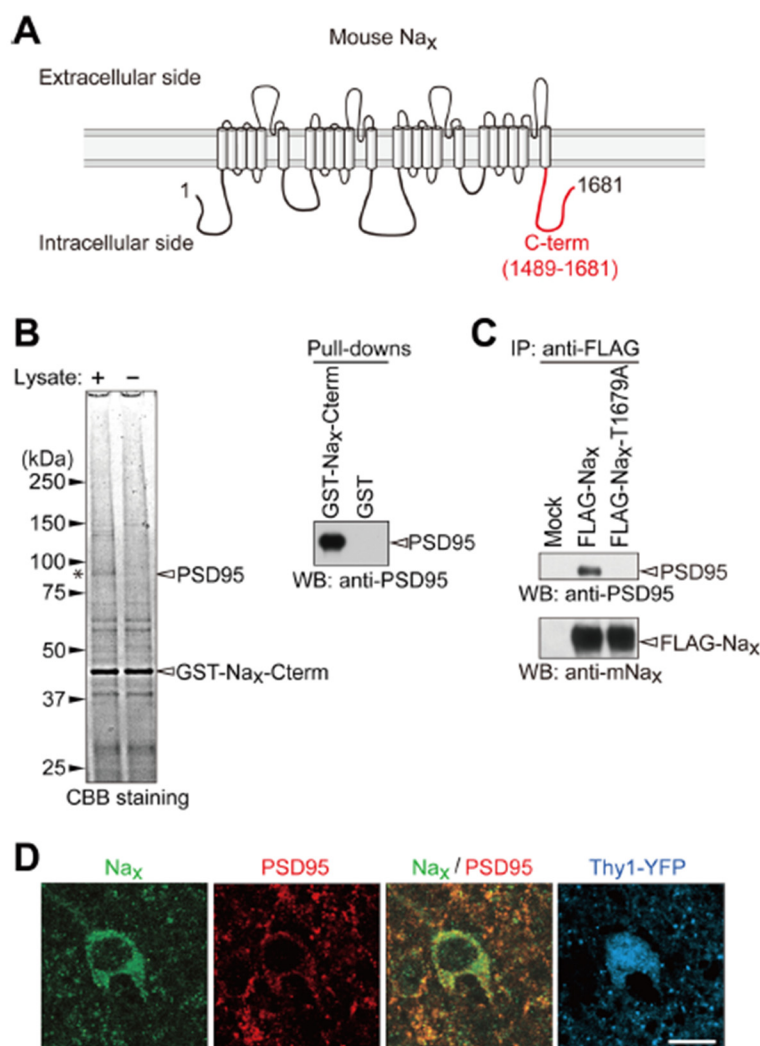


Fig. 5. Na_x は PSD95 と C-末 PDZ ドメイン結合モチーフを介して結合する

(A) マウス Na_x の構造。プルダウンアッセイに用いた C 末端領域を赤で図示。(B) GST プルダウンアッセイ。左、ゲルの CBB 染色。* はプルダウン回収物に特異的なバンド。右、シナプス小胞画分のウェスタンブロット解析。(C) HEK293T 細胞における全長 Na_x と PSD95 の結合。Mock, コントロールベクターを導入した細胞。(D) Thy1-YFP マウスの扁桃体における免疫組織染色。Thy1-YFP マウスでは、脳のニューロンの一部に蛍光タンパク質 YFP を発現する (本図では青色に表示)。

3. 4 PSD95 は Na_x の細胞膜における安定化を促進する

Na_x 発現細胞を樹立した親細胞株である N2A は内在性に PSD95 を発現していた (Fig. 6A)。そこで、 Na_x と内在性の PSD95 の細胞内局在を調べた。親細胞株 (N2A) では PSD95 は細胞内に存在したが、 Na_x を発現させた N2a-Mf1 では細胞膜において Na_x と共局在した。一方、siRNA を用いて PSD95 の発現を抑えると Na_x の細胞膜における発現が減少した (Fig. 6A, B)。エンドサイトーシスの阻害剤である Wortmannin⁽²⁵⁾ やダイナミン依存性のエンドサイトーシスの阻害剤である Dynasore⁽²⁶⁾ を投与すると、 Na_x の細胞膜における発現が回復したことから、PSD95 は Na_x を細胞膜において安定化していることが明らかになった。

次に、PSD95 の siRNA による細胞膜 Na_x の減少が Na^+ 流入に影響するか調べた (Fig. 6C)。まず、コントロール siRNA で処理した細胞を用い、 $[\text{Na}^+]_i$ を 145 から 170 mM に切り替えると細胞内 Na 濃度が上昇し、最終的に一定値になった。この時、 Na_x を介した Na^+ 流入と Na^+/K^+ -ATPase を介した Na^+ の汲み出しが平衡状態になったと考えられる。一方、PSD95 の siRNA で処理した細胞では、 Na^+ 濃度の上昇速度が遅くなり、一定値に達するまでの時間が長くなった。

4. 考察

PSD95 は興奮性シナプスに発現するシナプス後部の足場タンパク質として、様々なイオンチャネルや関連分子を連結していることが知られている。本研究において、 Na_x が大脳皮質や扁桃体基底部の一部の興奮性ニューロンに発現し、PSD95 と局在していることが明らかになったことから、 Na_x が、興奮性シナプス伝達機能においてなんらかの役割を果たしている可能性が示唆された。しかし、通常状態において大脳皮質や扁桃体のシナプス周囲の $[\text{Na}^+]_o$ が変動するとは考えにくい。我々は、最近、エンドセリンが受容体 ET_BR を介して Na_x の活性化閾値を調節し、エンドセリンの濃度によっては、通常レベルの $[\text{Na}^+]_o$ 下でも Na_x を開口させることを見出した^(3,27)。シナプス部においてエンドセリンが Na_x を開口させ、シナプス後部を脱分極させる仕組みが存在する可能性がある。 Na_x のシナプス部位における機能については、今後の研究課題である。

本研究における Na_x の陽イオン選択性の順序が $\text{Na}^+ \approx \text{Li}^+ > \text{Rb}^+ > \text{Cs}^+$ であることが明らかになった (Fig 4)。こ

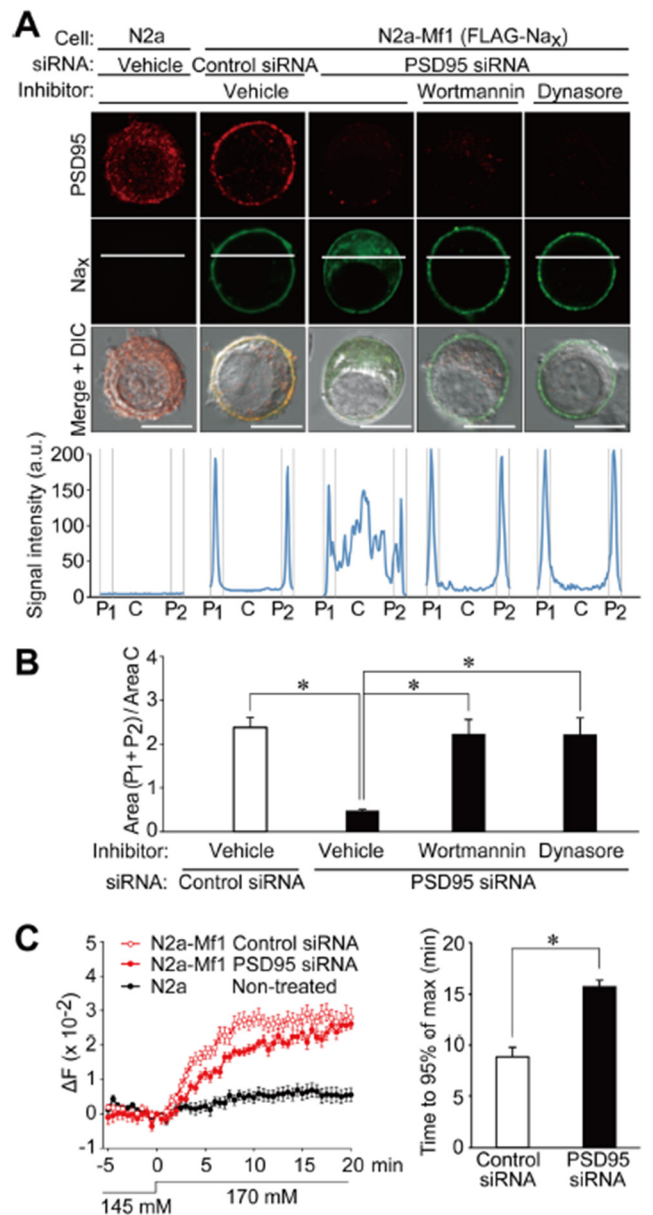


Fig. 6. PSD95による Na_x の細胞膜での安定化

(A) N2a及びN2a-Mf1細胞におけるPSD95及び Na_x の免疫染色。コントロール用siRNA及びPSD95用siRNAを投与。Wortmannin (100 nM) 及びDynasore (200 μM) は6時間処理した。スケール, 10 μm 。下段は、白線における蛍光値。(P1: C: P2 = 15: 70: 15)。a. u., arbitrary unit. (B) 膜領域における局在度(Aより計算)。mean \pm SE (n = 8); *p < 0.01, ANOVA followed by Scheffé's test. (C) Na^+ イメージング。左、平均波形、右、最大値の95%到達時間。Mean \pm SE (n = 21)。*p < 0.01, two-tailed t test.

の順序は、ミエリン化軸索で測定された電位依存性Naチャンネル(Na_v)のそれと近い⁽²⁸⁾。しかし、 Na_v が Rb^+ や Cs^+ をほとんど通さないのに対し、 Na_x は少なからず通した(**Fig 4B**)。イオン選択性フィルターはNaチャンネル α サブユニットのポアの細胞外側に存在し、アミノ酸EEMDが配置する外側リングとDEKAが配置する内側リングから構成される^(28,29)。この2つのリングは全ての Na_v (Na_v 1.1–1.9)で保存されている。一方、 Na_x に関しては、それぞれEEIDとDENSに変化しており、 Rb^+ や Cs^+ の透過性に影響した可能性が考えられる。チャンネルのイオン選択性を解析する最も良い方法は、各イオンの透過比を決定することである⁽²⁸⁾。そのためには、正確な逆転電位を測定する必要があるが、 Na_x の場合は、電流の振幅が小さいために正確に逆転電位を測定することが困難であり、この手法を使うことができなかった。今後更なる検討が必要である。

5. 謝辞

本研究の実施にあたり、研究助成を賜りました公益財団法人ソルト・サイエンス研究財団に厚く御礼申し上げます。

6. 文献

- Hiyama TY, Watanabe E, Ono K, Inenaga K, Tamkun MM, Yoshida S, et al. Na_x channel involved in CNS sodium-level sensing. **Nat Neurosci.** 2002; 5: 511–512.
- Hiyama TY, Watanabe E, Okada H, Noda M. The subfornical organ is the primary locus of sodium level sensing by Na_x sodium channels for the control of salt-intake behavior. **J Neurosci.** 2004; 24: 9276–9281.
- Hiyama TY, Yoshida M, Matsumoto M, Suzuki R, Matsuda T, Watanabe E, et al. Endothelin-3 expression in the subfornical organ enhances the sensitivity of Na_x , the brain sodium-level sensor, to suppress salt intake. **Cell Metab.** 2013; 17: 507–519.
- Shimizu H, Watanabe E, Hiyama TY, Nagakura A, Fujikawa A, Okado H, et al. Glial Na_x channels control lactate signaling to neurons for brain $[\text{Na}^+]$ sensing. **Neuron.** 2007; 54: 59–72.
- Noda M, Hiyama TY. Sodium sensing in the brain. **Pflugers Arch.** 2015; 467: 465–474.
- Watanabe E, Hiyama TY, Shimizu H, Kodama R, Hayashi N, Miyata S, et al. Sodium-level-sensitive sodium channel Na_x is expressed in glial laminate processes in the sensory circumventricular organs. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** 2006; 290: 568–576.
- Matsumoto M, Hiyama TY, Kuboyama K, Suzuki R, Fujikawa A, Noda M. Channel properties of Na_x expressed in neurons. **PLoS One** 2015; 10: e0126109.
- Matsumoto M, Fujikawa A, Suzuki R, Shimizu H, Kuboyama K, Hiyama TY, et al. SAP97 promotes the stability of Na_x channels at the plasma membrane. **FEBS Lett.** 2012; 586: 3805–3812.
- Fujikawa A, Chow JP, Shimizu H, Fukada M, Suzuki R, Noda M. Tyrosine phosphorylation of ErbB4 is enhanced by PSD95 and repressed by protein tyrosine phosphatase receptor type Z. **J Biochem.** 2007; 142: 343–350.
- Johnson JW, Ascher P. Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. **Nature.** 1987; 325: 529–531.
- Gautron S, Dos Santos G, Pinto-Henrique D, Koulakoff A, Gros F, Berwald-Netter Y. The glial voltage-gated sodium channel: cell- and tissue-specific mRNA expression. **Proc Natl Acad Sci USA.** 1992; 89: 7272–7276.
- George AL Jr, Knittle TJ, Tamkun MM. Molecular cloning of an atypical voltage-gated sodium channel expressed in human heart and uterus: evidence for a distinct gene family. **Proc Natl Acad Sci USA.** 1992; 89: 4893–4897.
- Felipe A, Knittle TJ, Doyle KL, Tamkun MM. Primary structure and differential expression during development and pregnancy of a novel voltage-gated sodium channel in the mouse. **J Biol Chem.** 1994; 269: 30125–30131.
- Akopian AN, Souslova V, Sivilotti L, Wood JN. Structure and distribution of a broadly expressed

- atypical sodium channel. **FEBS Lett.** 1997; 400: 183–187.
15. Goldin AL, Barchi RL, Caldwell JH, Hofmann F, Howe JR, Hunter JC, et al. Nomenclature of voltagegated sodium channels. **Neuron.** 2000; 28: 365–368.
 16. Noda M, Hiyama TY. Sodium-level-sensitive sodium channel and salt-intake behavior. **Chem Senses.** 2005; 30 (Suppl 1): i44–i45.
 17. Noda M. The subformal organ, a specialized sodium channel, and the sensing of sodium levels in the brain. **Neuroscientist.** 2006; 12: 80–91.
 18. Noda M, Hiyama TY. The Na_x Channel: What It Is and What It Does. **Neuroscientist.** 2015; 21: 399–412.
 19. Watanabe E, Fujikawa A, Matsunaga H, Yasoshima Y, Sako N, Yamamoto T, et al. Na_v2/NaG channel is involved in control of salt-intake behavior in the CNS. **J Neurosci.** 2000; 20: 7743–7751
 20. Watanabe E, Hiyama TY, Kodama R, Noda M. Na_x sodium channel is expressed in non-myelinating Schwann cells and alveolar type II cells in mice. **Neurosci Lett.** 2002; 330: 109–113.
 21. Matsumoto M, Fujikawa A, Suzuki R, Shimizu H, Kuboyama K, Hiyama TY, et al. SAP97 promotes the stability of Na_x channels at the plasma membrane. **FEBS Lett.** 2012; 586: 3805–3812.
 22. Giallourakis, C., Cao, Z., Green, T., Wachtel, H., Xie, X., Lopez-Illasaca, M., Daly, M., Rioux, J. and Xavier, R. A molecular-properties-based approach to understanding PDZ domain proteins and PDZ ligands. **Genome Res.** 2006; 16, 1056–1072.
 23. He, J., Bellini, M., Inuzuka, H., Xu, J., Xiong, Y., Yang, X., Castleberry, A.M. and Hall, R.A. Proteomic analysis of b-adrenergic receptor interactions with PDZ scaffold proteins. **J. Biol. Chem.** 2006; 281, 2820–2827.
 24. Zheng, C.Y., Seabold, G.K., Horak, M. and Petralia, R.S. MAGUKs, synaptic development, and synaptic plasticity. **Neuroscientist.** 2011; 17, 493–512.
 25. Gong, Q., Weide, M., Huntsman, C., Xu, Z., Jan, L.Y. and Ma, D. Identification and characterization of a new class of trafficking motifs for controlling clathrin-independent internalization and recycling. **J. Biol. Chem.** 2007; 282, 13087–13097.
 26. Kirchhausen, T., Macia, E. and Pelish, H.E. Use of dynasore, the small molecule inhibitor of dynamin, in the regulation of endocytosis. **Methods Enzymol.** 2008; 438, 77–93.
 27. Unezaki S, Katano T, Hiyama TY, Tu NH, Yoshii S, Noda M, et al. Involvement of Na_x sodium channel in peripheral nerve regeneration via lactate signaling. **Eur J Neurosci.** 2014; 39: 720–729.
 28. Hille B. The permeability of the sodium channel to metal cations in myelinated nerve. **J Gen Physiol.** 1972; 59: 637–658.
 29. Noda M. Structure and function of sodium channels. **Ann N Y Acad Sci.** 1993; 707: 20–37.

Studies on the Neural Mechanisms for Salt Homeostasis in the Brain

Takeshi Y. Hiyama

National Institutes of Natural Sciences

Summary

Na_x is a sodium-concentration ($[\text{Na}^+]$)-sensitive Na channel with a gating threshold of ~ 150 mM for extracellular $[\text{Na}^+]$ ($[\text{Na}^+]_o$) in vitro. We previously reported that Na_x was preferentially expressed in the glial cells of sensory circumventricular organs including the subfornical organ, and was involved in $[\text{Na}^+]$ sensing for the control of salt-intake behavior. Although Na_x was also suggested to be expressed in the neurons of some brain regions including the amygdala and cerebral cortex, the channel properties of Na_x have not yet been adequately characterized in neurons. We herein verified that Na_x was expressed in neurons in the lateral amygdala of mice using an antibody that was newly generated against mouse Na_x . To investigate the channel properties of Na_x expressed in neurons, we established an inducible cell line of Na_x using the mouse neuroblastoma cell line, Neuro-2a, which is endogenously devoid of the expression of Na_x . Functional analyses of this cell line revealed that the $[\text{Na}^+]$ -sensitivity of Na_x in neuronal cells was similar to that expressed in glial cells. The cation selectivity sequence of the Na_x channel in cations was revealed to be $\text{Na}^+ \approx \text{Li}^+ > \text{Rb}^+ > \text{Cs}^+$ for the first time. Furthermore, we demonstrated that Na_x bound to postsynaptic density protein 95 (PSD95) through its PSD95/Disc-large/ZO-1 (PDZ)-binding motif at the C-terminus in neurons. The interaction between Na_x and PSD95 may be involved in promoting the surface expression of Na_x channels because the depletion of endogenous PSD95 resulted in a decrease in Na_x at the plasma membrane. These results indicated, for the first time, that Na_x functions as a $[\text{Na}^+]$ -sensitive Na channel in neurons as well as in glial cells.