

新たな遺伝学的アプローチによるナトリウム・水バランス調節機序の解明

上田 陽一, 丸山 崇

産業医科大学医学部

概要 下垂体後葉ホルモンの一つとして知られるバゾプレッシンは、腎臓の V2 受容体に作用して水の再吸収を促進することから抗利尿ホルモンとも呼ばれ、中枢性体液調節の中軸をなす。バゾプレッシンを産生する大細胞性神経分泌ニューロンは視床下部室傍核および視索上核に局在し、その軸索を下垂体後葉に投射して循環血液中に神経活動依存性に分泌される。

これまで、バゾプレッシン (AVP) ニューロンを特異的に活性化させる手法は少なく、AVP ニューロンの行動における役割の理解が十分に進んでいない。我々は、バゾプレッシン (AVP) 遺伝子に薬剤興奮性受容体である *hM3Dq* 遺伝子および *mCherry* 遺伝子を挿入した融合遺伝子を用いて、AVP-*hM3Dq*-*mCherry* トランスジェニックラットを作成した。このトランスジェニックラットに *hM3Dq* のアゴニストである clozapine-N-oxide (CNO, 1mg/kg) を腹腔内投与し、90 分後に灌流固定を行い、抗 AVP 抗体、抗オキシトシン抗体、および抗 Fos タンパク抗体を用いた免疫組織化学的染色法を行った。

その結果、*mCherry* 陽性ニューロンは AVP 免疫染色性陽性ニューロンと一致し、視交叉上核、視索上核および室傍核大細胞性 *mCherry* 陽性ニューロンの約 90% に Fos タンパク発現を認めた。一方で、*mCherry* 陽性ニューロンはオキシトシン免疫染色陽性ニューロンとは一致しなかった。また、共焦点レーザー顕微鏡による細胞レベルの観察により、*mCherry* 蛍光が主に細胞膜に発現していることを明らかにした。これらは *mCherry* 陽性ニューロンが AVP ニューロンに特異的であり、*hM3Dq* が機能的であることを示唆する。次に CNO 投与後の血漿 AVP 濃度を測定した。CNO 腹腔内投与後 10 分、30 分、60 分、120 分後に、有意な血漿 AVP 濃度の上昇を認めた。暗期直前に CNO を腹腔内投与したところ、摂食量、飲水量、および尿量が有意に低下した。成熟雄性 Wistar 系ラットに CNO を投与しても、血漿 AVP 濃度は増加せず、摂食量、飲水量、および尿量に変化を認めなかった。CNO の腹腔内投与によって、活動量や体温のサーカディアンリズムが顕著に乱れることを明らかにした。

以上より、内因性 AVP ニューロンの活性化はサーカディアンリズムの乱れを引き起こすこと、また、摂食量、飲水量、および尿量を低下させることを明らかにした。このラットを用いることにより、今後、脳内バゾプレッシン系の神経回路を解明し、新たなナトリウム・水バランス調節機序を明らかにすることが期待される。

1. 研究目的

生体内のナトリウム・水分バランスは種々の液性・神経性調節によって一定の範囲内に保持されている。下垂体後葉ホルモンの一つであるアルギニンバゾプレッシン (AVP) は、腎臓に作用して水の再吸収を促進する。バゾプレッシンは、視床下部視索上核および室傍核に局在する大細胞性神経分泌ニューロンの細胞体で産生され、下垂体後葉に投射した軸索終末から活動電位依存性に血

中に分泌される。

我々は、AVP ニューロンを可視化するために AVP 遺伝子に改変緑色蛍光タンパク (eGFP) 遺伝子を挿入した融合遺伝子を用いて AVP-eGFP トランスジェニックラットを作成した¹⁾。このトランスジェニックラットでは、脱水および食塩水の飲水負荷によりバゾプレッシンニューロンの eGFP 緑色蛍光が著明に増加することを報告した。

最近、光遺伝学 (オプトジェネティクス) 技術や薬理遺伝

学(ケモジェネティクス)技術の進展により、ニューロン活動を特定波長の光や、特定薬剤で操作することが可能となった。我々は、光興奮性タンパク(チャネルロドプシン2(ChR2))をバズプレッシンニューロンに特異的に発現させることで、その神経活動を光制御することができるトランスジェニックラットの作出に成功した^[2]。この経験から、AVPニューロンに薬剤感受性受容体(hM3Dq)を発現させることによって、AVPニューロンの活動を特異的に制御できるのではないかとこの着想に至った。

そこで、本研究課題では、薬剤興奮性受容体(hM3Dq)をAVPニューロンに特異的に発現させることでその神経活動を制御することを目的とした。

2. 研究方法

2.1 AVP-hM3Dq-mCherry トランスジェニックラットの作出

AVP遺伝子に、蛍光タンパク質のmCherryで標識したhM3Dq遺伝子を挿入した融合遺伝子を用いて、AVP-hM3Dq-mCherryトランスジェニックラットを作出した。

得られたトランスジェニックラットでのこの融合遺伝子の発現量および発現の有無は、耳介組織より抽出したDNAを用いて、サザンブロット法およびPCR法により確認した。深麻酔下で開胸して、4%パラフォルムアルデヒド溶液で灌流固定を行い、脳を取り出した。2日間の後固定後、視床下部を含む薄切切片(40 μm)を作成し、蛍光顕微鏡下でmCherry赤色蛍光を観察した。

2.2 hM3Dq-mCherryニューロンのAVPニューロンとの共局在とCNOによるhM3Dq-mCherryニューロンの活性化

実験には、成熟雄性トランスジェニックラットを用いた。hM3Dqのアゴニストであるclozapine-N-oxide(CNO, 1mg/kg)を腹腔内投与90分後に、深麻酔下で開胸して4%パラフォルムアルデヒド溶液で灌流固定を行い、脳を取り出した。2日間の後固定後、視床下部を含む薄切切片(40 μm)を作成した。神経活動性マーカーとして汎用されているFosタンパク(Alexa 488で標識)、およびAVP(Alexa 633で標識)を、蛍光免疫組織化学的染色法を用いて染色した。

2.3 hM3Dq-mCherryの細胞内局在とオキシトシンニューロンとの共局在の検討

共焦点レーザー顕微鏡による観察を行い、hM3Dq-mCherry, Fosタンパク(緑色)、およびAVP免疫染色性(白色)のニューロン内での局在を検討した。

また、SONおよびPVNで産生されるオキシトシンに対する抗体を用いて、蛍光免疫組織化学的染色法を行い、これらの共局在を確認した。

2.4 視索上核(SON)および室傍核(PVN)のmCherry陽性ニューロンにおけるFosタンパク発現率と血中AVP濃度の変化

CNO(1 mg/kg)腹腔内投与90分後に深麻酔下で灌流固定を行い、SONおよびPVNのmCherryニューロンにおけるFosタンパク発現率を検討した。

また、CNO(1 mg/kg)腹腔内投与後の血漿AVP濃度の変化を検討した。

2.5 AVPニューロンを特異的に活性化させた時の摂食量、飲水量、および尿量変化

暗期直前にCNO(1 mg/kg)腹腔内投与を行い、24時間に渡って摂食量、飲水量、および尿量を測定した。

2.6 視交叉上核(SCN)のmCherry陽性ニューロンにおけるFosタンパク発現率

CNO(1 mg/kg)腹腔内投与90分後に深麻酔下で灌流固定を行い、SCNのmCherryニューロンにおけるFosタンパク発現率を検討した。

2.7 Wistar系雄性ラットにおけるCNOの影響の検討

Wistar系ラットを用いて、CNO(1 mg/kg)腹腔内投与90分後に深麻酔下で灌流固定を行い、SCN, SON, およびPVNのmCherryニューロンにおけるFosタンパク発現率を検討した。また、CNO(1 mg/kg)腹腔内投与後の血漿AVP濃度の変化を検討した。

2.8 内因性AVPニューロンの活性化によるサーカディアンリズムへの影響の検討

暗期直前に生理食塩水もしくはCNO(1 mg/kg)を腹腔内投与し、4日間の活動量と深部体温を記録した。

3. 研究結果

3.1 AVP-hM3Dq-mCherry トランスジェニックラットの作出

ファウンダーからF1個体を得て、PCR法により融合遺伝子の継代を確認することができた(Fig. 1)。30コピーの個体でmCherryが確実に継代されている個体を選出し

た。

3. 2 hM3Dq-mCherry ニューロンの AVP ニューロンとの共局在とCNOによるhM3Dq-mCherryニューロンの活性化

mCherry 陽性ニューロンは AVP 免疫染色性陽性ニューロンと一致し, mCherry ニューロンに Fos タンパクの発現を認めた (Fig. 2)。

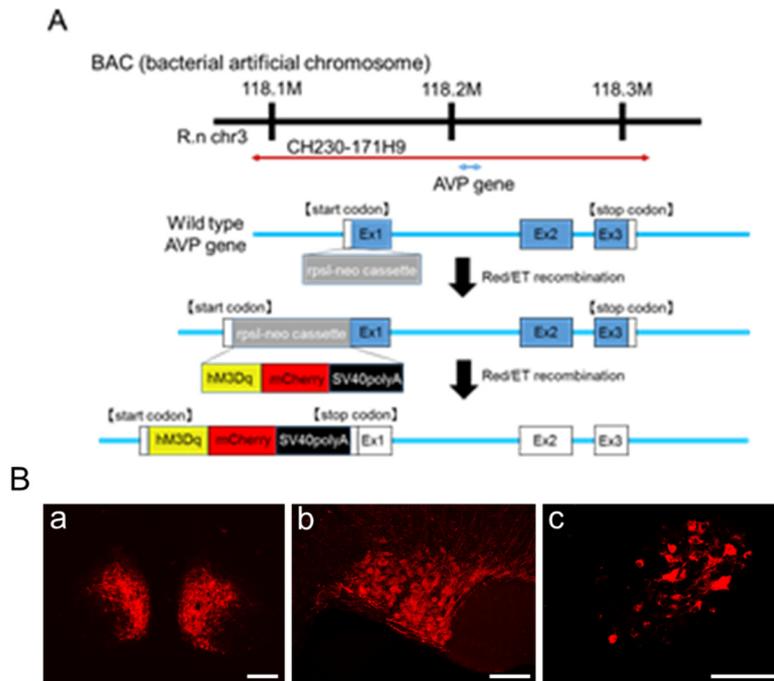


Figure 1. Construction strategy and establishment of an AVP-hM3Dq-mCherry transgenic rat line. (A) A chimeric AVP-hM3Dq-mCherry BAC clone transgene construct was purified for microinjections. SV40 poly A sequence was framed to the hM3Dq-mCherry sequence. Finally, this hM3Dq-mCherry SV40 poly A cassette was introduced into the rat AVP gene in place of the genomic start codon. (B) The mCherry positive neurons were observed in the suprachiasmatic nucleus (SCN, a), supraoptic nucleus (SON, b), and magnocellular division of the paraventricular nucleus (PVN, c). Scale bars indicate 100 μ m.

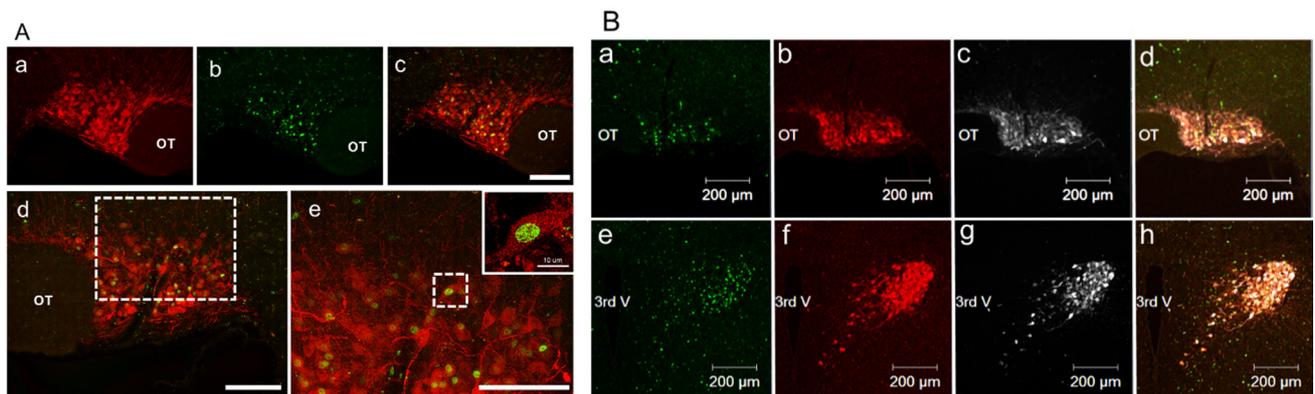


Figure 2. Expression of Fos-like immunoreactivity (LI), hM3Dq-mCherry, and AVP-LI in the SON and PVN after i.p. administration of CNO. (A) Representative image of an hM3Dq-mCherry neuron expressing Fos in the SON 90 min after intraperitoneal (i.p.) administration of CNO (1 mg/kg). The mCherry positive neuron (a), Fos-like-immunoreactive (-LI) neuron (b), and merged image (c) are shown. The surrounded white dotted line in merged image in the SON (d) is enlarged in panel e (e). Scale bars indicate 100 μ m and 10 μ m. OT, optic tract. (B) Digital images of FIHC for Fos (a and e) and AVP (c and g) in the SON (a-d) and PVN (e-h) 90 min after i.p. administration of CNO (1 mg/kg) are shown. Endogenous hM3Dq-mCherry fluorescence was also observed (b and f). Merged image of a-c and e-g are demonstrated in d and h. Scale bars indicate 200 μ m. OT, optic tract; 3rd V, third ventricle

3. 3 hM3Dq-mCherryの細胞内局在とオキシトシンニューロンとの共局在の検討

hM3Dq-mCherryは主に細胞膜に局在していた。オキシトシンニューロンと内因性 hM3Dq-mCherry はほとんど一致しなかった (Fig. 3)。

3. 4 視索上核 (SON) および室傍核 (PVN) の mCherry

陽性ニューロンにおける Fos タンパク発現率と血中 AVP 濃度の変化

CNO 投与後, SON および PVN における mCherry 陽性ニューロンの約 90%において Fos タンパクが発現した。また, CNO 投与後少なくとも 120 分にわたって, 有意に血漿 AVP 濃度が上昇した (Fig. 4)。

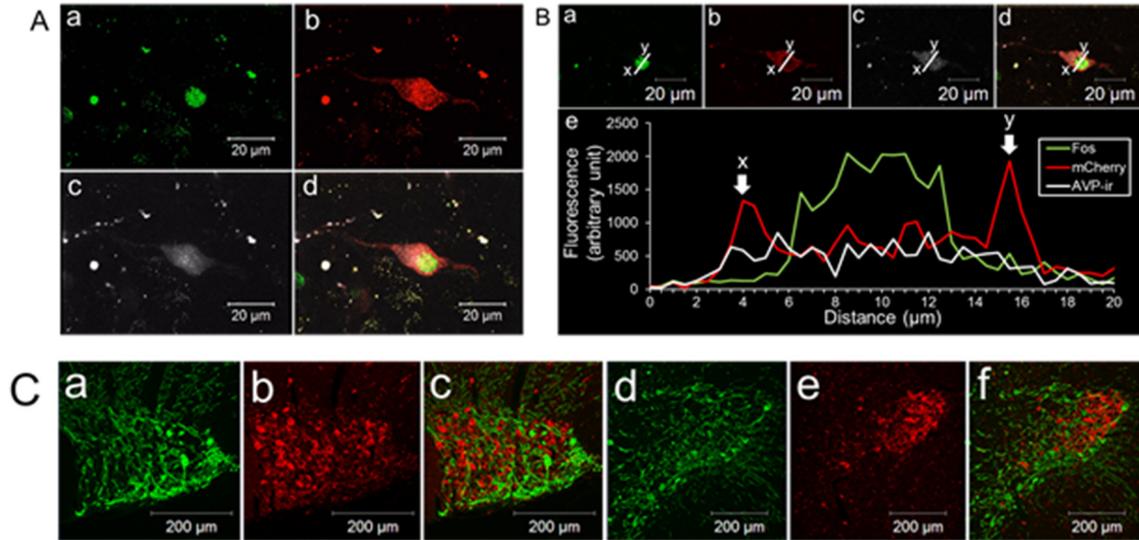


Figure 3. Fluorescent intensity profile and FIHC for OXT. (A) Reconstructed 3D images of an AVP neuron in the PVN. Fos-LI (a), endogenous hM3Dq-mCherry (b), AVP-LI (c). Merged image of a-c is shown in panel d (d). Scale bars indicate 20 μ m. (B) Fluorescent intensity was analysed in cross section by using confocal microscope. Fos-LI was observed in the nucleus of an AVP neuron (a and e). Endogenous hM3Dq-mCherry was located in the membrane (b and e) and AVP-LI was distributed in the cytoplasm (c and e). Merged image (d). Scale bars indicate 20 μ m. Fluorescence intensity profiles of Fos-LI (green), endogenous hM3Dq-mCherry (red), and AVP-LI (white) were measured at the location of line (x-y) (e). (C) FIHC for OXT was performed in the AVP-hM3Dq-mCherry transgenic rat line. OXT-LI (a and c) and endogenous hM3Dq-mCherry (b and d) was observed in the SON (a-c) and PVN (d-f). Merged images in the SON (c) and PVN (f) are demonstrated. Scale bars indicate 200 μ m.

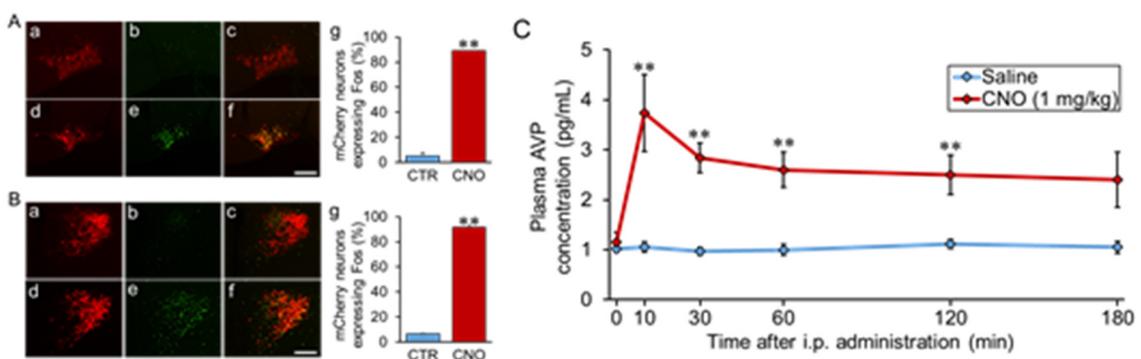


Figure 4. Percentage of Fos induction and plasma AVP concentration. (A) Digital images of endogenous hM3Dq-mCherry neurons (a and d), Fos-LI neurons (b and e), and their merged images (c and f) of the SON. The group given saline as control (CTR) (a-c) or CNO (1 mg/kg) (d-f) were compared. The percentages of hM3Dq-mCherry neurons expressing Fos-LI in the SON (g). (B) Digital images of endogenous hM3Dq-mCherry neurons (a and d), Fos-LI neurons (b and e), and their merged images (c and f) of the PVN. The percentages of hM3Dq-mCherry neurons expressing Fos-LI in the PVN were counted manually (g). Scale bars indicate 100 μ m. ****** $P < 0.01$ vs. CTR. Data are presented as means \pm SEM (n = 6 each). (C) Plasma AVP was measured after i.p. administration of saline or CNO (1 mg/kg) (n = 4-6 in each group at each time point). ****** $P < 0.01$ vs. saline. Data are presented as means \pm SEM.

3. 5 AVP ニューロンを特異的に活性化させた時の摂食量, 飲水量, および尿量変化

CNO 投与後 24 時間にわたって, 有意に積算摂食量, 積算飲水量, および積算尿量が減少した (Fig. 5)。

3. 6 視交叉上核 (SCN) の mCherry 陽性ニューロンにおける Fos タンパク発現率

SCN における mCherry 陽性ニューロンのうち, CNO 投与後には約 90%において Fos タンパクが発現した (Fig. 6)。

3. 7 Wistar 系雄性ラットにおける CNO の影響の検討

Wistar 系雄性ラットにおいては CNO による Fos タンパクの発現は認められず (Fig. 7), 血漿中 AVP 濃度の上昇も認めなかった (Fig. 8)。また, 積算摂食量, 積算飲水量, および積算尿量に対する影響はなかった (Fig. 9)。

3. 9 内因性 AVP ニューロンの活性化によるサーカディアンリズムへの影響の検討

CNO 投与後に, 活動性や深部体温が顕著に乱れた (Fig. 10)。

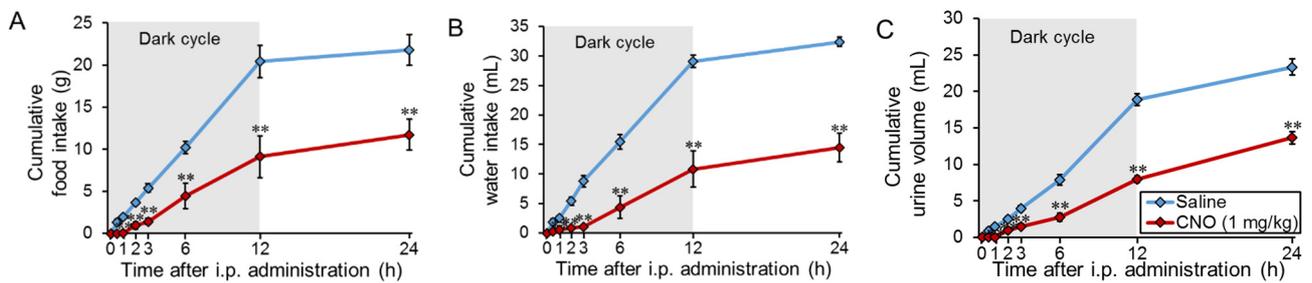


Figure 5. Cumulative food intake, water intake, and urine volume after i.p. administration of CNO. (A) Effects of i.p. administration of saline or CNO (1 mg/kg) on food intake in AVP-hM3Dq-mCherry transgenic rats at 0 h, 0.5 h, 1 h, 2 h, 3 h, 6 h, 12 h, and 24 h. Data are presented as means \pm SEM (n = 6 each). ** $P < 0.01$ vs. Saline. (B) Effects of i.p. administration of saline or CNO (1 mg/kg) on water intake in AVP-hM3Dq-mCherry transgenic rats at 0 h, 0.5 h, 1 h, 2 h, 3 h, 6 h, 12 h, and 24 h. Data are presented as means \pm SEM (n = 6 each). ** $P < 0.01$ vs. Saline. (C) Effects of i.p. administration of saline or CNO (1 mg/kg) on urine volume in AVP-hM3Dq-mCherry transgenic rats at 0 h, 0.5 h, 1 h, 2 h, 3 h, 6 h, 12 h, and 24 h. Data are presented as means \pm SEM (n = 6 each). ** $P < 0.01$ vs. Saline.

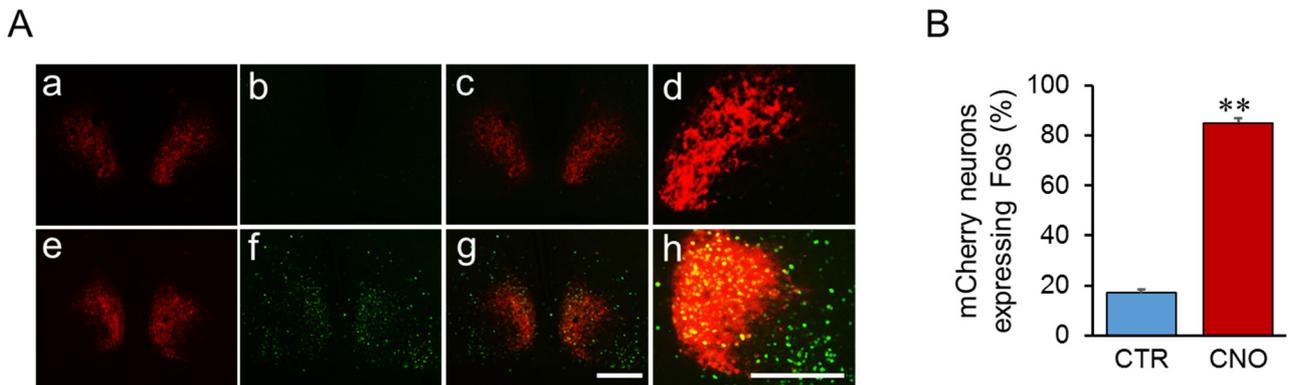


Figure 6. Percentage of Fos induction in mCherry neurons after i.p. administration of CNO in the SCN. (A) Digital images of endogenous hM3Dq mCherry neurons (a and d), Fos-LI neurons (b and e), and their merged images (c and f) of the SCN are displayed. The group given saline as control (CTR) (a-c) or CNO (1 mg/kg) (d-f) were compared 90 min after i.p. administration of each compound. Scale bar indicates 100 μ m. (B) The percentages of hM3Dq-mCherry neurons expressing Fos-LI in the SCN were counted manually. ** $P < 0.01$ vs. CTR. Data are presented as means \pm SEM (n = 6 each).

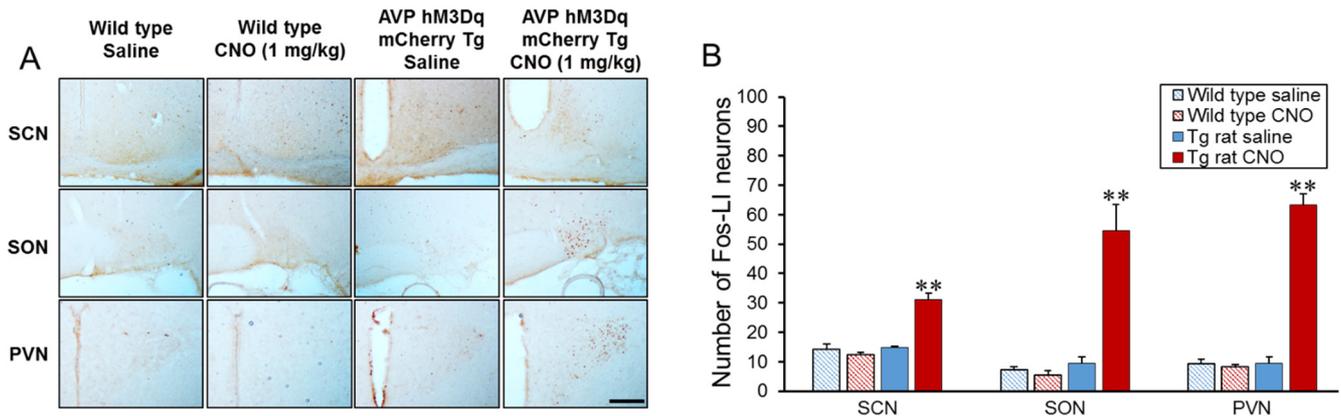


Fig.7 Fos induction was not observed after i.p. administration of CNO in wild type rats. (A) Digital images of Fos-LI in the SCN, SON, and PVN which were obtained from 90min after i.p. administered saline or CNO (1 mg/kg) in adult male non-transgenic Wistar rats and AVP-hm3Dq-mCherry transgenic rats (n=3each). Scale bar indicate 200 μ m. (B) Quantitative analysis of number of Fos-LI neurons in the SCN, SON, and PVN. Fos-LI neurons were manually counted in three cross sections (six nuclei including right and left) of the each nucleus and the results were averaged. ** $P < 0.01$ vs.all other groups. Data are presented as mean \pm SEM (n=3, each).

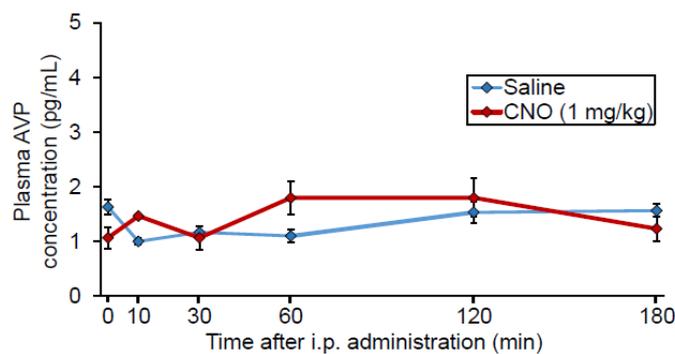


Fig. 8 Plasma AVP concentration after i.p. administration of CNO in wild type rats. Plasma AVP concentration were comparable for 180 min after i.p. administration of saline or CNO (1 mg/kg) in adult male non-transgenic Wistar rats. Data are presented as mean \pm SEM (n=3 in each group at each time point).

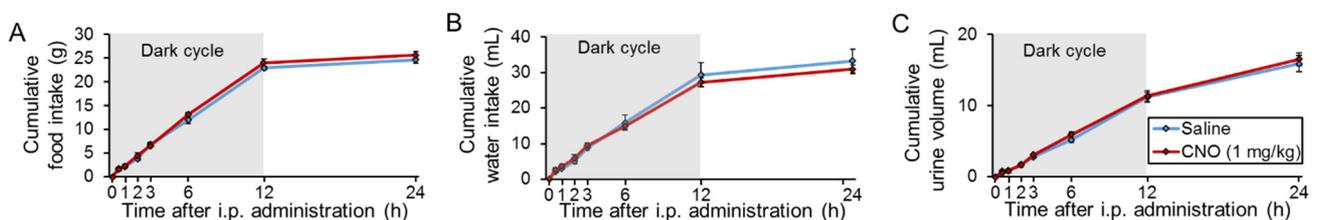


Fig. 9 I.p. administration of CNO did not affect food intake, water intake, nor urine volume in wild type rats. Saline or CNO (1 mg/kg) was i.p. administered at 19:00 (start of a dark cycle) in adult male non-transgenic Wistar rats (180-210 g). Cumulative food intake (A), water intake (B), and urine volume (C) were comparable between saline group and CNO group for 24 h. Data are presented as mean \pm SEM (n=5-6 each).

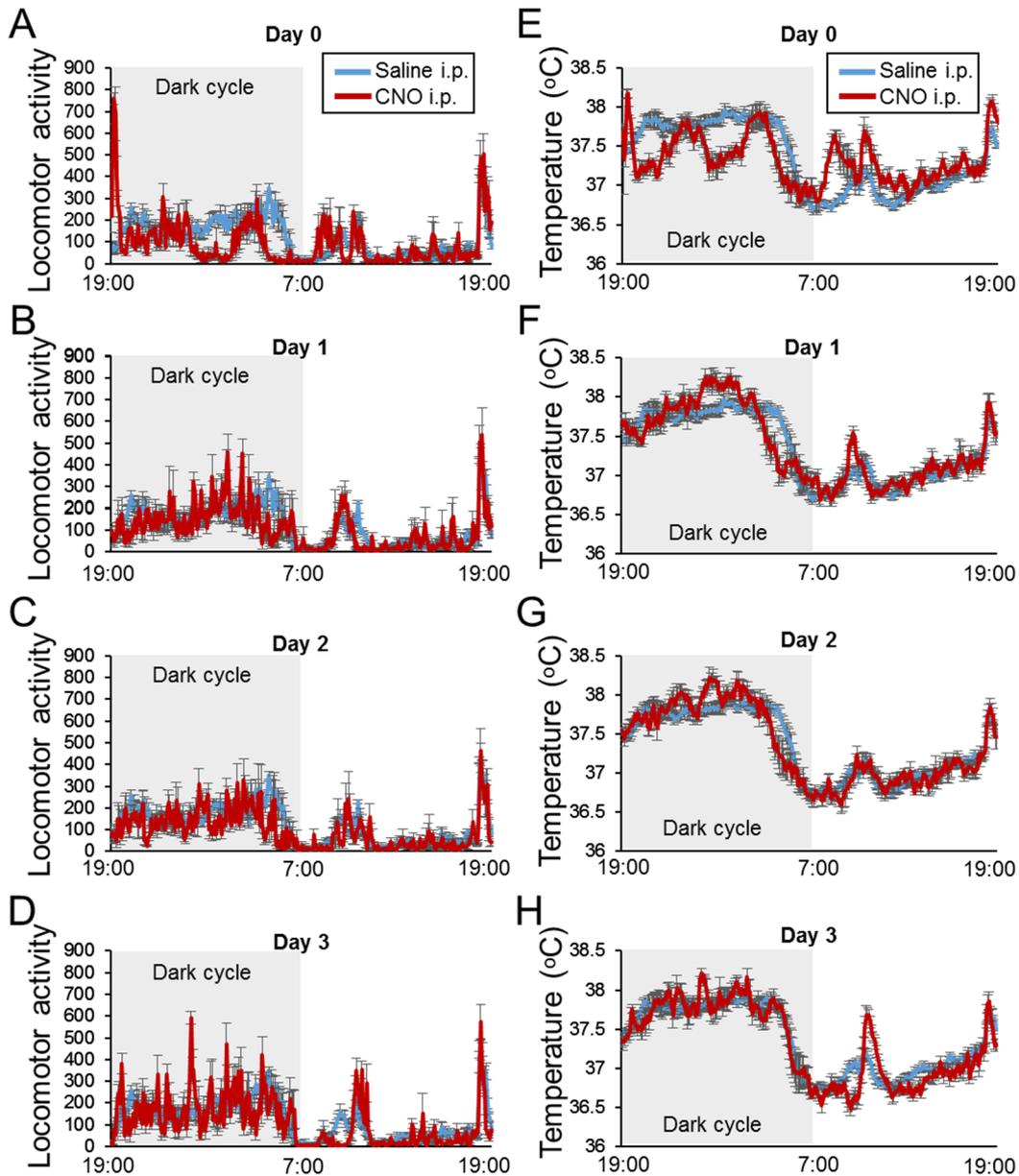


Fig. 10 Locomotor activity and body temperature after i.p. administration of CNO in AVP-hM3Dq-mCherry transgenic rats. Nano tag (KISSEI COMTEC, Japan) was intraperitoneally implanted 2 weeks before the experiment. Saline or CNO (1 mg/kg) was i.p. administered only one time at 19:00 (start of a dark cycle) at day 0. Panel (A) to (D) indicate locomotor activity and panel (E) to (H) indicate body temperature. Locomotor activity and body temperature were disturbed after endogenous AVP activation at day 0 (A and E), day 1 (B and F), and day 2 (C and G). They turned back to baseline at day 3 (D and H). Data are presented as mean \pm SEM (n=5 each).

4. 考察

我々は、薬理遺伝学的手法(ケモジェネティクス, Designer Receptor Exclusively Activated by Designer Drugs (DREADDs))を用いることによって、AVP-hM3Dq-mCherry トランスジェニックラットの作出に成功した。内因性の hM3Dq-mCherry 蛍光は、AVP ニューロンに限局しオキトシンニューロンとの共局在はほとんど認めなかった。hM3Dq のアゴニストである CNO を投与し

た際に、hM3Dq-mCherry ニューロンにおける Fos タンパク発現を認め、さらに AVP 濃度が上昇したことから、導入した受容体は機能的であることが示唆される。

一般的に、十分な発現量を担保する目的で、遺伝子導入にはアデノウイルスベクターやレンチウイルスといったウイルスベクターが用いられることが多い。しかしながら我々は、これまでのトランスジェニックラット作出の十分な経験から、トランスジェニックアプローチを試みた。実験結果か

ら、hM3Dq-mCherry は CNO によってニューロン活動の上昇を引き起こすのに十分量発現しており、これらの導入遺伝子が継代されることを確認している。トランスジェニックラットにおける導入遺伝子の発現量は継代しても一定であり、ウイルスベクターなどによる遺伝子導入にみられる発現量の程度のばらつきを無視することができる。また、トランスジェニックラットを用いることで、ウイルスベクターの微量注入やウイルスベクター自体による炎症反応を除外することもできる。

CNO の大部分は、不活性型の代謝物と考えられているが、その一部は逆代謝されてクロザピンに変換されるという報告がある。クロザピンは、動物の行動に影響を与える可能性があるため、その投与量に注意を払う必要がある。野生型 Wistar 系ラットを用いた実験結果から、今回用いた投与量では、CNO の影響は無視できると考えられる。

CNO 投与後に血漿 AVP 濃度が顕著に増加することから、尿量が低下することは合理的である。我々は、AVP ニューロンを興奮させた時に摂食量が低下することを初めて報告した。CNO が、SON および PVN のみならず、SCN における AVP ニューロンも興奮させることにより、サーカディアンリズムに乱れが生じたためと考えられる。

DREADDs システムは、非侵襲的にニューロンを制御することのできるパワーツールであるが、行動学における急性効果を検討するには時間的解像度が低いことが欠点である。また、hM3Dq を含む G タンパク共役型受容体の反応は、イオンチャネルのように単純ではなく、様々な細胞内シグナル伝達経路を介する。脳スライス切片を用いて、CNO 投与時に AVP ニューロンにどのような反応が起こるのかを検討する必要がある。

今回作出した AVP-hM3Dq-mCherry トランスジェニックラットは、AVP ニューロンの神経活動を薬剤で操作することで、新たなナトリウム・水分調節機構、さらには末梢・中枢における AVP の行動への役割を解明するための有力なツールとなることが期待される。

本研究成果は、“Activation of endogenous arginine vasopressin neurons inhibit food intake: by using a novel transgenic rat line with DREADDs system.”という題目で国際総合誌である Scientific Reports 誌に掲載された^[3]。

5. 今後の課題

AVP-hM3Dq-mCherry トランスジェニックラットの作出により、AVP ニューロンの神経活動を、薬剤を用いて操作することが可能となった。今後の課題は、脳スライス標本ひいては *in vivo* での AVP ニューロン操作を行う研究へと発展させることである。また、AVP ニューロン操作による AVP 分泌調節機構についても検討すべきである。

最近の報告によると、CNO はごく少量しか血液脳関門を通過しない^[4]という指摘もあるため、別の hM3Dq アゴニストを用いた実験を行う必要がある。

6. 文献

- [1] Y. Ueta, H. Fujihara, R. Serino, G. Dayanithi, H. Ozawa, K.I. Matsuda, M. Kawata, J. Yamada, S. Ueno, A. Fukuda, D. Murphy, Transgenic expression of enhanced green fluorescent protein enables direct visualization for physiological studies of vasopressin neurons and isolated nerve terminals of the rat, *Endocrinology*. 146 (2005) 406–413. doi:10.1210/en.2004-0830.
- [2] M. Ishii, H. Hashimoto, J.-I. Ohkubo, T. Ohbuchi, T. Saito, T. Maruyama, M. Yoshimura, Y. Yamamoto, K. Kusuhara, Y. Ueta, Transgenic approach to express the channelrhodopsin 2 gene in arginine vasopressin neurons of rats, *Neurosci. Lett.* 630 (2016). doi:10.1016/j.neulet.2016.08.001.
- [3] M. Yoshimura, K. Nishimura, H. Nishimura, S. Sonoda, H. Ueno, Y. Motojima, R. Saito, T. Maruyama, Y. Nonaka, Y. Ueta, Activation of endogenous arginine vasopressin neurons inhibit food intake: By using a novel transgenic rat line with DREADDs system, *Sci. Rep.* 7 (2017). doi:10.1038/s41598-017-16049-2.
- [4] J.L. Gomez, J. Bonaventura, W. Lesniak, W.B. Mathews, P. Sysa-Shah, L.A. Rodriguez, R.J. Ellis, C.T. Richie, B.K. Harvey, R.F. Dannals, M.G. Pomper, A. Bonci, M. Michaelides, Chemogenetics revealed: DREADD occupancy and activation via converted clozapine, *Science* (80-.). 357 (2017) 503–507. doi:10.1126/science.aan2475.

New Genetic Approaches to Study Regulatory Mechanisms of Sodium·Water Balance

Yoichi Ueta, Takashi Maruyama

Department of Physiology, School of Medicine, University of Occupational and Environmental Health

Summary

A neurohypophysial hormone, arginine vasopressin (AVP) as well as oxytocin is known to an anti-diuretic hormone because AVP acts on V2 receptor in the kidney and reabsorb water in the systemic circulation. AVP is main regulatory system to maintain water balance via the central nervous system. The magnocellular neurosecretory cells (MNCs)-synthesizing AVP locate in the paraventricular nucleus (PVN) and the supraoptic nucleus (SON) of the hypothalamus, terminate their axon terminals to the posterior pituitary, and secrete AVP into the systemic circulation with depending on the firing rate of MNCs.

Recent development of chemogenetic techniques as well as optogenetic techniques have made a progress to understand the neural circuits in the central nervous system. In particular, these techniques have been widely used to understand the linkage between neuronal activity and diverse behaviors. Designer receptors exclusively activated by designer drugs (DREADDs) are the most common G-protein coupled receptors (GPCRs) used in chemogenetic approaches. Human muscarinic acetylcholine receptor (hM3Dq), of which ligand is Clozapine-N-oxide (CNO), is one of the pharmacologically modulated GPCRs which enables us to exploit Gq signaling pathway.

We generated a novel transgenic rat line which expresses both hM3Dq and mCherry fluorescence specifically in AVP-synthesizing neurons. The mCherry neurons that indicate the expression of the hM3Dq gene were observed in the PVN and the SON. The hM3Dq-mCherry fluorescence was localized mainly in the membrane of the neurons. The mCherry neurons were co-localized with AVP-like immunoreactive (LI) neurons, but not with oxytocin-LI neurons. The induction of Fos, which is the indicator for neuronal activity, was observed in approximately 90% of the AVP-LI neurons in the PVN and the SON 90 min^[1]_{SEP} after intraperitoneal (i.p.) administration of CNO. Plasma AVP was significantly increased and food intake, water intake, and urine volume were significantly attenuated after i.p. administration of CNO.

This novel DREADDs transgenic rat line that expresses the AVP-hM3Dq-mCherry fusion gene promise the future to provide new insights into the neuronal mechanism regarding AVP system responsible for the central regulation of sodium and water balance in whole body.