

研 究 報 告 書

「本能機能を司る視床下部神経回路操作と行動制御」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 21 年 10 月～平成 25 年 3 月

研 究 者: 山中 章弘

1. 研究のねらい

視床下部は摂食行動、性行動、睡眠覚醒などの本能行動の中枢である。視床下部には約 20 の神経核が知られており、古典的な脳の局所破壊実験からこれらの神経核が特異的な本能機能を担っていることが分かっている。それらの神経核にはペプチドを神経伝達物質として含有する神経が多く存在しており、そのペプチド性神経伝達物質が本能行動発現において中心的役割を担っている。このことは、そのペプチド遺伝子の発現調節領域(プロモーター)を用いて神経活動の光操作を可能にする光活性化タンパク質を特定神経のみに発現させると、その神経の活動を制御することが可能となり、ひいては本能行動発現を制御出来る可能性を示唆している。本能行動は個体の生存や生物種の維持に極めて重要な機能であるが、それを調節する神経機構については未だに十分解明されていない。その大きな原因の一つは、多くの神経回路研究がスライス標本などの摘出組織標本を用いて行われていることに起因する。本能行動は個体のみで生じる現象であるため、それを調節する神経回路の動作様式は、最終的に個体を用いて検討しなければ解明出来ない。しかし、これまで特定神経の活動のみを制御する手法が無く、神経活動と本能行動発現を繋げる研究を行うことが出来なかった。そこで、本研究提案では、本能行動の中でも特に睡眠覚醒に焦点を当て、覚醒維持に極めて重要な役割を担っている視床下部外側野のオレキシン神経細胞特異的に光活性化タンパク質(チャネルロドプシン 2(ChR2); ハロロドプシン(Halo))を発現する遺伝子改変マウスを作成し、個体において神経活動を光制御したときに表出する睡眠覚醒状態変化や投射先神経の調節様式などを明らかにする。それにより、睡眠覚醒調節に関わる神経回路とその動作原理を統合的に解明することを目的とする。

2. 研究成果

(1) 概要

視床下部は摂食行動、性行動、睡眠覚醒などの本能行動の中枢である。視床下部には約 20 の神経核が知られており、古典的な脳の局所破壊実験からこれらの神経核が特異的な本能機能を担っていることが分かっている。それらの神経核にはペプチドを神経伝達物質として含有する神経が多く存在しており、そのペプチド性神経伝達物質が本能行動発現において中心的役割を担っている。本能行動は個体の生存や生物種の維持に極めて重要な機能であるが、それを調節する神経機構については未だに十分解明されていない。本研究では、本能行動調節に重要な役割を担っている神経細胞特異的に光活性化タンパク質を発現する遺伝子改変マウスを作成し、その神経活動を人為的に制御することによって表出する行動および、

下流の神経活動変化を統合的に解析することによって、本能行動を調節する神経回路の仕組みの解明を試みた。

(2) 詳細

研究成果

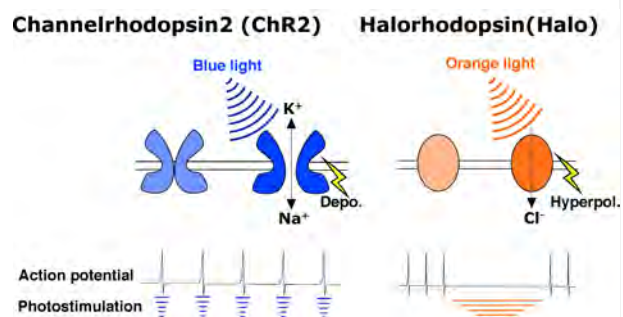
本能行動の中でも特に睡眠覚醒に焦点を当て、覚醒維持に極めて重要な役割を担っている視床下部外側野のオレキシン神経細胞¹に光活性化タンパク質(チャネルロドプシン2(ChR2); ハロロドプシン(Halo))を発現する遺伝子改変マウスを作成した。動物個体において神経活動を光制御したときに表出する睡眠覚醒状態変化や投射先神経の調節様式などを明らかにした。オレキシン神経は、視床下部外側野だけに少数が疎らに存在し、そこから脳内のほとんどの領域に軸索を投射している。中でも特に睡眠覚醒に重要とされるモノアミン神経起始核や、アセチルコリン神経起始核に密な投射が観察され、これらの神経核の神経細胞は、いずれもオレキシンによって活性化される。オレキシンやオレキシン神経を欠損させた動物の解析からオレキシン神経活動が睡眠覚醒調節に極めて重要であることが分かってきた。これらの動物は短時間に睡眠覚醒を繰り返し、頻回に脱力して数分間動けなくなる奇妙な発作(情動脱力発作)を起こした^{2,3}。これらの症状は、ナルコレプシー患者で見られる症状に非常に酷似しており、患者の脳においてオレキシン神経だけが脱落していた⁴。これらのことから、「ナルコレプシーはオレキシン神経の異常が原因」であり、オレキシンが睡眠覚醒調節において重要な役割を担っていることが分かってきた。

(1) 光操作を可能にする遺伝子改変マウスの作成

睡眠覚醒調節に重要な役割を担っている視床下部のオレキシン神経細胞に光活性化タンパク質(ChR2、Halo)を発現する遺伝子改変マウスを作成した。Halo は橙色光によって活性化され、細胞外から細胞内へクロライドイオンを輸送するイオンポンプであり、それによって細胞膜電位を過分極させるため、神経活動を抑制

する(図 1)。一方、ChR2 は、青色光によって活性化される非選択的陽イオンチャネルであり、それによって膜電位を脱分極させるため、神経活動を活性化させる(図 1)。免疫組織化学的解析解析によって、これらの遺伝子改変マウスの脳では、オレキシン神経細胞特異的に光活性化タンパク質が発現していることを確認した。さらに脳スライス標本を用いた電気生理学的解析によって、オレキシン神経活動が光によって興奮もしくは抑制されることを確認した。これらのマウスを用いたインビボ光刺激を開始し、睡眠覚醒を制御することに成功した。

図 1 光活性化タンパク質

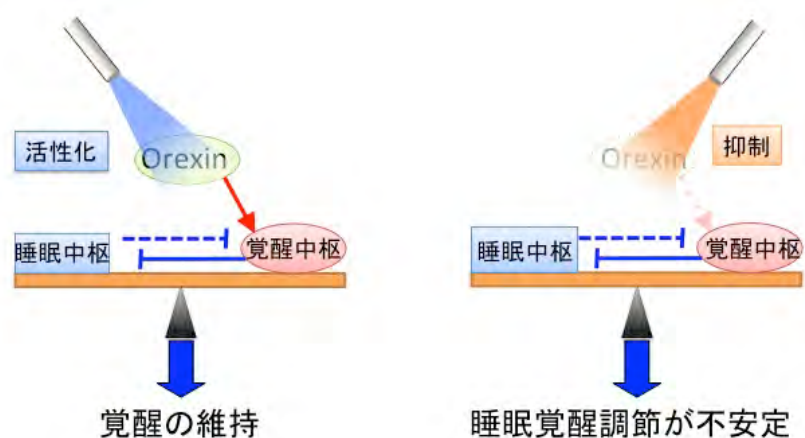


(2) 睡眠覚醒サイクル発現におけるオレキシン神経活動の役割の解明

In vivo におけるオレキシン神経活動と睡眠覚醒状態変化との関連を明らかにするために、意識下に睡眠覚醒を自由に繰り返すマウス個体において、オレキシン神経活動のみを光で制御し、その時の睡眠覚醒状態変化について、脳波・筋電図の同時記録による睡眠解析から明らかにした。視床下部のオレキシン神経細胞に光を照射するために、光ファイバー（直径 0.5 mm）をオレキシン神経が存在する視床下部外側野上方 1 mm まで両側性に刺入した。パルスジェネレーターによって光照射のタイミングと光強度を制御し、青色光（470 nm）もしくは、橙色光（593 nm）のレーザー光を視床下部に照射した。この時の睡眠覚醒状態変化を観察した。覚醒下において毛繕いをしているマウスの脳内に橙色光照射を行い、オレキシン神経活動を急性的に強制停止させた。オレキシン神経活動が抑制されてもマウスは数秒間毛繕いを続けたが、急に寝る準備をはじめて眠りについた。このときの脳波筋電図記録からマウスがノンレム睡眠に移行していることが分かった。光照射を止めて、オレキシン神経活動を再び元の状態に戻すと、マウスは直ちに覚醒し、先ほどと同様の毛繕いを再開した。このことから、オレキシン神経活動を抑制することによって、マウスにノンレム睡眠を誘導出来ることが明らかとなった。逆に ChR2 を用いてオレキシン神経を活性化させると、睡眠状態から覚醒状態に移行することを確認した。睡眠覚醒は、視床下部前方部の視索前野に存在する GABA 神経系の睡眠中枢と視床下部後部及び、中脳上部に存在するモノアミン神経系の覚醒中枢が互いに抑制し合

う相互抑制によって制御されていると考えられてきた。オレキシン神経は解剖学的に丁度その中間に存在し、覚醒中枢とされるモノアミン神経系に密に投射し、これらの神経系を活性化することで、睡眠覚醒調節を安定化する作用があることが明らかとなった(図 2)⁵。

図 2 睡眠覚醒中枢とオレキシン神経



参考文献

- 1 Sakurai, T. *et al.* Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* **92**:573-585, 1998.
- 2 Chemelli, R. M. *et al.* Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. *Cell* **98**:437-451, 1999.
- 3 Hara, J. *et al.* Genetic ablation of orexin neurons in mice results in narcolepsy,

- hypophagia, and obesity. *Neuron* **30**:345-354, 2001.
- 4 Peyron, C. *et al.* A mutation in a case of early onset narcolepsy and a generalized absence of hypocretin peptides in human narcoleptic brains. *Nat Med* **6**:991-997, 2000.
- 5 Tsunematsu, T. *et al.* Acute optogenetic silencing of orexin/hypocretin neurons induces slow-wave sleep in mice. *J Neurosci* **31**:10529-10539, 2011.

3. 今後の展開

光遺伝学を様々な神経に適用することによって、これまで不可能であった丸ごと個体を用いて、特定の神経活動だけを任意のタイミングで操作出来る実験が可能となった。本研究成果のひとつである、様々な細胞種においてチャンネルロドプシン 2 やアーキオロドプシン 3 などの光活性化分子を発現させることを可能にした遺伝子改変マウスを用いることで、標的とする細胞に容易に光遺伝学を適用することができるようになった。また、局所光照射装置の開発によって、自由行動するマウスの脳に任意のタイミングで光照射を行うことができるようになったほか、無線の光照射装置の開発も進めている。今後は本研究成果であるこれらのツールを拡充・活用して、睡眠覚醒を含めた多くの本能行動を調節するメカニズムの解明を続けていく予定である。特に光遺伝学をオレキシン神経細胞以外の様々な神経ペプチド産生神経に適用することによって、様々な本能行動を調節する神経回路の機能の解明に繋がることが期待される。

4. 自己評価

本研究提案では、主たる課題である「本能機能を司る視床下部神経回路操作と行動制御」を達成するために、以下に示す各項目について研究行ってきた。

- (1) 光操作を可能にする遺伝子改変マウスの作成
- (2) 睡眠覚醒サイクル発現におけるオレキシン神経活動の役割の解明
- (3) 睡眠と覚醒を作り出す脳の仕組みの解析
- (4) 新しい神経の光刺激方法開発とそれを用いた行動制御
- (5) 視床下部の他のペプチド作動性神経への応用

以下に個別の達成の状況について示す。

- (1) については、オレキシン神経細胞特異的にチャンネルロドプシン 2 やハロロドプシンなどの光活性化タンパク質を発現する遺伝子改変マウスを作成に成功している。また、様々な細胞種において光活性化タンパク質を発現可能な遺伝子改変マウスを作成し、中枢の神経細胞やグリア細胞のみならず、末梢の細胞においても光遺伝学を適用可能な遺伝子改変マウスの作出に成功している。(6.の原著論文番号 4. *Cell Reports* (2012) 2(2):397-406)
- (2) では、(1) で作出したマウスを用いて、オレキシン神経細胞の活動を個体マウスを用いて操作し、睡眠覚醒状態の変化を観察することによって、オレキシン神経活動が覚醒の維持に重要であることを示した。(6.の原著論文番号 3. *J Neurosci* (2011) 31:10529-10539)
- (3) では、オレキシン神経細胞においてセロトニン 1A 受容体の発現量を可逆的に変化させた時

の睡眠覚醒状態変化について明らかにした。縫線核のセロトニン神経からオレキシン神経への抑制性入力が活動期の覚醒の持続に重要であることを示した。(6.の原著論文番号 5. Sleep (2013) in press)

(4) では、網膜神経節細胞に発現する光感受性色素であるメラノプシンを異所性に発現させ、神経活動を光で制御可能であることを示した。メラノプシンを用いることでチャネルロドプシン 2 よりも高感度かつ持続的な光操作が可能となった。(Tsunematsu T et al., **Neurosci Res** (2012) in press)

(5) では、(1) で作出したマウスを用いて、視床下部の様々な神経細胞に光遺伝学を適用し、その機能を制御して本能行動を発現する神経回路の機能解明を現在進めている。(現在論文作成中)

上記に示すように、当初に計画した研究項目をほぼ達成できたと判断している。今後は(5)について進めて行く予定である。さががけ研究期間においては、潤沢な研究費にサポートされ、研究に集中することができた。また、他の刺激的なさががけ研究者との交流や、的確な意見を下さった研究統括の村上先生やアドバイザーの先生方のお陰で研究の進展に繋がったことを感謝すると共に、今後さらに「さががけ研究」が拡充・発展され、多くの若い研究者に対して継続的に支援を頂けますことを願っています。

5. 研究総括の見解

摂食・睡眠・性行動などの本能行動は個体レベルで見られる現象であり、その神経回路はスライス標本等の摘出標本では解明しきれない。視床下部には多様な神経ペプチドが特定の神経核に発現することに着目して、本課題ではオレキシン神経細胞特異的に光活性化タンパク質を発現するマウス系統を作出し、実際に自由行動下のマウス脳内に導入した光ファイバーにより両側性に光刺激をすると、ハロロドプシンマウスでは急性的可逆的にノンレム睡眠が誘導されること、逆にチャネルロドプシン2マウスでは睡眠状態のマウスを覚醒させることを明らかにした。こうして技術開発に成功する同時に GABA 系睡眠中枢とモノアミン系覚醒中枢を取り持つオレキシン神経が睡眠覚醒神経回路を制御していることを生理学的に立証したことは高く評価される。これらの成果は当初の提案課題を十分に達成したものであり、今後ここで実証した方法論を他の神経回路にも工夫・改良・適用することにより、さらなる発展が期待できる。

6. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. **Yamanaka A**, Tabuchi S, Tsunematsu T, Fukazawa Y, Tominaga M
Orexin Directly Excites Orexin Neurons through Orexin 2 Receptor.
J Neurosci (2010) 30:12642-12652.
2. Hirashima N, Tsunematsu T, Ichiki K, Tanaka H, Kilduff TS, **Yamanaka A**

	Neuropeptide B induces slow wave sleep in mice. Sleep (2011) 34:31-37.
3.	Tsunematsu T, Kilduff TS, Boyden ES, Takahashi S, Tominaga M, <u>Yamanaka A</u> Acute optogenetic silencing of orexin/hypocretin neurons induces slow wave sleep in mice. J Neurosci (2011) 31:10529-10539.
4.	Tanaka K F, Matsui K, Sasaki T, Sano Hiromi, Sugio S, Fan K, Hen R, Nakai J, Yanagawa Y, Hasuwa H, Okabe M, Deisseroth K, Ikenaka K, <u>Yamanaka A</u> Expanding the repertoire of optogenetically targeted cells with an enhanced gene expression system. Cell Reports (2012) 2(2):397-406.
5.	Tabuchi S, Tsunematsu T, Kilduff TS, Sugio S, Xu M, Tanaka KF, Takahashi S, Tominaga M, <u>Yamanaka A</u> Physiological significance of inhibitory serotonergic inputs to orexin/hypocretin neurons for the regulation of sleep/wakefulness. Sleep (2013) in press.

(2)特許出願

研究期間累積件数:1 件

1.

発 明 者: 山中 章弘、田中 謙二

発明の名称: テトラサイクリン遺伝子発現誘導システムにおける発現量を増幅させる遺伝子座

出 願 人: 自然科学研究機構

出 願 日: 2011/9/6

出 願 番 号: 特願 2011-193680

(2)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

国内学会 招待講演

1. 山中章弘 第 63 回日本細胞生物学会大会 サテライトシンポジウム ST1 「オプトジェネティクスを用いた睡眠覚醒制御」札幌 2011 年 7 月
2. 山中章弘、常松友美 第 34 回日本分子生物学会年会 ワークショップ 「視床下部神経機能の光操作による本能行動制御」横浜 2011 年 12 月
3. 山中章弘 第 117 回 日本解剖学会総会・全国学術集会 シンポジウム 「オプトジェネティクスを用いた睡眠覚醒制御とリズム」甲府 2012 年 3 月
4. 山中章弘(オーガナイザー)、常松友美 日本薬学会第 132 回年会 企画シンポジウム 「オプトジェネティクスを用いた個体行動制御」札幌 2012 年 3 月

5. **山中章弘**、常松友美、田淵紗和子 日本睡眠学会第 37 回定期学術集会 シンポジウム 9:オレキシン研究の最近の話題「オレキシン神経の運命制御を用いた睡眠覚醒調節機構の解明」横浜 2012 年 6 月
6. **山中章弘** 2012 年包括型脳科学研究推進支援ネットワーク夏のワークショップ 新学術領域研究「大脳新皮質構築」「メゾ神経回路」合同ワークショップ「様々な神経細胞の活動制御と行動発現」仙台 2012 年 7 月
7. **山中章弘** 第 20 回脳の世紀シンポジウム 若手研究者によるパネルディスカッション:脳科学研究これからの 20 年脳を育む:「睡眠覚醒の脳科学」東京 2012 年 9 月
8. **山中章弘** 日本遺伝学会第 84 回大会 ワークショップ:マウス遺伝学が支える生命科学 part 2
「光遺伝学を用いた視床下部神経による本能制御機構の解明」福岡 2012 年 9 月
9. **山中章弘** 2012 年日本神経化学会 公開シンポジウム:構造生物学から創薬まで;G 蛋白質共益型受容体研究がもたらすパラダイムシフト
「光遺伝学を用いた視床下部神経による本能制御機構の解明」神戸 2012 年 9 月
10. **Akihiro Yamanaka** and Tomomi Tsunematsu 第 35 回日本神経科学学会大会 シンポジウム:光操作で探る神経回路の作動原理
“Control of mice instinctive behaviors using optogenetics” 名古屋 2012 年 9 月
11. **Akihiro Yamanaka** 第 50 回日本生物物理学会年会 シンポジウム:レチナール蛋白質と光遺伝学
"Optogenetics reveals function of neural network involved in the regulation of sleep/wakefulness" 名古屋 2012 年 9 月
12. **山中章弘**、常松友美 「細胞を創る」研究会 5.0
「オプトジェネティクスを用いた神経活動操作と行動制御」横浜 2012 年 11 月

国際学会 招待講演

1. New approaches to studying orexin function
Akihiro Yamanaka and Tomomi Tsunematsu
International Congress of Neuroendocrinology 2010, Rouen, France (2010, 7)
2. Physiological importance of orexin/hypocretin neural activity in the regulation of sleep/wakefulness
Akihiro Yamanaka
SRI International Symposium, MenloPark, CA, USA (2010, 11)



3. An artificial control of sleep/wakefulness state using optogenetics in mice
Akihiro Yamanaka
 2nd International Symposium on Photonic Bioimaging, Niseko, Japan (2011, 2)
4. Optogenetical approach to study regulatory mechanisms of sleep/wakefulness using transgenic mice
Akihiro Yamanaka
 The 6th World Congress of the World Sleep Federation, AS-11, Kyoto, Japan (2011, 10)
5. Sleep/wakefulness control by manipulating the activity of orexin/hypocretin neurons
Akihiro Yamanaka
 The 6th World Congress of the World Sleep Federation Satellite Symposium, Kyoto, Japan (2011, 10)
6. Sleep/wakefulness control using optogenetics in mice
Akihiro Yamanaka
 23rd Annual meeting of the Korean Society for Molecular and Cellular Biology, Seoul, Korea (2011, 10)
7. Optogenetics reveals regulatory mechanism of sleep/wakefulness
Akihiro Yamanaka
 8th Japanese-German Frontiers of Science Symposium (JGFoS), Tokyo, Japan (2011, 10)
8. Timing controlled ablation of orexin/hypocretin neurons reveals the
Akihiro Yamanaka
 Neuroscience 2012 Symposium "Dissection of CNS Circuitry Regulating Sleep and Arousal: Conditional Transgenics and Genetically Engineered Receptor-Channel Systems", New Orleans, LA, U.S.A. (2012, 10)
9. Timing controlled ablation of orexin/hypocretin neurons reveals the mechanism of narcolepsy
Akihiro Yamanaka
 SRI International Symposium, SRI International, Menlo Park, CA, U.S.A., (2012, 10)
10. Optogenetical approach to reveal the regulatory mechanism of instinctive

behaviors by the hypothalamic neurons

Akihiro Yamanaka and Tomomi Tsunematsu

Sydney 2012 Joint AuPS/PSNZ/ASB Meeting Symposia: Brain dysfunction and translational neurophysiology, Sydney, NSW, Australia (2012, 12)

11. Perturbation using optogenetics affects autonomic regulation of sleep/wakefulness cycle

Akihiro Yamanaka

The 13th RIES-Hokudai International Symposium "律" Joined with The 1st International Symposium of Nano-Macro Materials, Devices, and System Research Alliance Project, Sapporo, Japan (2012, 12)

著作物・総説

1. New approaches for the study of orexin function.
***Yamanaka A** and Tsunematsu T
J Neuroendocrinol 22: No.7, 818-824 (2010).
2. 覚醒を維持する神経ネットワーク
山中章弘 **遺伝** 65: No.5, 92-99 (2011).
3. オプトジェネティクス(光遺伝学)を用いたインビボにおける特定神経細胞活動制御法
山中章弘 **日薬理誌** 140: 280-284 (2012).
4. オレキシン神経による睡眠覚醒調節
山中章弘 **Clinical Neuroscience 月刊臨床神経科学** 31: No.2, 160-163 (2013).
5. オプトジェネティクスを用いた睡眠覚醒操作
山中章弘 **生体の科学[特集]神経回路の計測と操作** 64: No.1, 65-71 (2013).
6. 光による睡眠覚醒の制御と疾患研究
山中章弘 **レーザー研究** 「生命機能の創発を理解する光操作とイメージングの最前線」特集号 41: No.2, 92-97 (2013).
7. Inutsuka A and ***Yamanaka A**
The physiological role of orexin/hypocretin neurons in the regulation of sleep/wakefulness and neuroendocrine functions.
Front in Neuroendocrine Sci (2013) (in press).

プレスリリース等

1. 光スイッチでマウスのノンレム睡眠誘導に成功



—脳のオレキシン神経細胞の活動を光スイッチ遺伝子改変技術で操作—
<http://www.nips.ac.jp/contents/release/entry/2011/07/post-183.html>

2. ノンレム睡眠を誘導する新しい神経タンパク質の働きを解明
—ニューロペプチドBの作用をマウスの脳波解析で解明—
<http://www.nips.ac.jp/contents/release/entry/2010/06/post-126.html>

3. 脳の"覚醒"レベルを上げる神経メカニズムを解明
<http://www.nips.ac.jp/contents/release/entry/2010/09/post-134.html>