

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19287

研究課題名（和文）Qニューロンの作動メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of action of Q-neurons

研究代表者

桜井 武（Sakurai, Takeshi）

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：60251055

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,000,000円

研究成果の概要（和文）：QIHを誘導するメカニズムを詳細に明らかにするために、Qrfp-Flp0マウスを確立し、また、光遺伝学的に長時間（24時間以上）連続的にQIHを誘導するための光遺伝学ツールとしてOPN4^Cを開発した。この系を用いて、QIH導入相と覚醒相における心拍数変化が体温より早く応答することを明らかにした。また、Qニューロンの単核RNAシーケンスを行い、発現している遺伝子を網羅的に明らかにし、そのうち一部の受容体のアゴニストがQニューロンを興奮させること、および、マウスへの脳室内投与により低体温状態を誘導できることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経系の操作による人工冬眠状態であるQIHの生理的状态をよりよく理解するための知見を得たとともに、将来さらに詳細に解明するためのリソースを確立した。また、Qニューロンを興奮させ、低体温を惹起する低分子化合物を開発するために必要な情報を獲得した。

研究成果の概要（英文）：To investigate the mechanisms underlying QIH in detail, we generated the Qrfp-Flp0 mouse line and developed the photogenetic tool OPN4^C to induce QIH for extended periods (>24 hours). Our findings demonstrated that heart rate changes during QIH induction and recovery phases occur more rapidly than changes in body temperature. Additionally, we conducted mononuclear RNA sequencing of Q neurons to comprehensively identify the genes expressed by these neurons. Our results revealed that agonists of some of these receptors excite Q neurons and that intracerebroventricular administration of these agonists in mice can induce hypothermia.

研究分野：神経科学

キーワード：冬眠 人工冬眠 体温調節 視床下部

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

研究代表者らは、マウスの視床下部の一部の小領域（前腹側脳室周囲核, AVPe）に存在し、神経ペプチド QRFP 遺伝子を発現する神経を特異的に興奮させるとマウスの体温が数日に渡って大きく低下し併せて代謝も著しく低下することを明らかにした（Takahashi et al., Nature 2020）。この状態は様々な点で冬眠動物にみられる冬眠に酷似していた。この冬眠様状態の誘導に關与する神経集団を Q ニューロン（Quiescence-inducing neurons=休眠誘導神経）、Q ニューロンが興奮することにより生じる低代謝を QIH（Q neuron-induced hypometabolism）と名付けた。QIH を経験しても行動試験、各組織の病理試験により異常はなく、マウスが死亡した例は存在せず、全例が一週間ほどで自発的に回復した。Q 神経は主に視床下部背内側核（DMH）に作用しており、神経伝達物質としてグルタミン酸と GABA の両方を使用して QIH を誘導している。今後ヒト Q 神経を人為的に活性化させる技術が開発された場合、ヒトの人工冬眠が現実味を帯びてくる。人工冬眠は救急医療をはじめさまざまな臨床応用が想定できる。それにむけたスタートを切るには、Q ニューロンの発現遺伝子プロファイリングから、Q ニューロンを薬物により興奮させるためのターゲット分子候補を見つけ出す必要があった。

2. 研究の目的

本研究計画では、(1)QIH の作用機構を明らかにし、また(2)Q ニューロンの生体における活動様式を解明、さらには(3)Q ニューロンの発現遺伝子を明らかにし将来のヒトにおける QIH の誘導技術につながる知見を得ることを目指す。

3. 研究の方法

(1)QIH 誘導メカニズムの解明：Q ニューロンを刺激した後、FosTRAP (Targeted Recombination in Active Populations) を用いて興奮したニューロンをラベル、トレーサーにより上流下流のニューロンを明らかにする

(2)生理的状态における Q ニューロンの機能：GCaMP6 を AAV により発現させ、ファイバースコプを用いて絶食下や暑熱環境化、および各睡眠・覚醒ステージでの Q ニューロンの発火状態を明らかにする。

(3)Q ニューロンのトランスクリプトーム解析：Q ニューロンを薬物により興奮させるための低分子化合物を探索するための分子を同定するため、Q ニューロンの核に H2B-GFP を発現させ核単離を行う。

(4)光操作による QIH 誘導法の確立：QIH 中の生理・神経機能の解析を高時間分解能で行うため、光遺伝学により長時間の QIH を誘導する実験系を構築した。従来の DREADD による方法（Takahashi et al., Nature, 2020）では、化学遺伝学により QIH を誘導していたため、低体温になっている時間をコントロールできず、復温期が長く自然の冬眠で見られるような急激な体温の上昇を模倣できていないという問題点があった。そこで、光遺伝学ツールとして汎用されている ChR2 を Q ニューロンに発現させて光照射することにより低体温を誘導したが神経の興奮に必要な光強度が強くなり 24 時間の刺激を与えると組織損傷が引き起こされることが判明した。さらに低体温状態も 10 時間ほどしか持続させることができず、個体による差も大きかった。そこで内在性タンパク質である OPN4（メラノプシン）を用いて微弱な光で Gq シグナリングを活性化させることにより神経の興奮を試みた。

4. 研究成果

(1)TRAP2 では Cre を用いるので Cre ではなく Flp を Q ニューロン特異的に発現する Q-FlpO マウスを作成した。今後 Flp 依存性の AAV をもちいて、Q ニューロンにオプシンや hM3Dq を発現させて、QIH を誘導し、DMH 等で活性化されたニューロンをトラップする予定である。

(2)生理的状态における Q ニューロンの機能：GCaMP6 を AAV により発現させ、ファイバースコプを用いて Q ニューロンの活動がモニターできる系を確立した。ホットプレートに乗せたり、暑熱環境におくと、Q ニューロンが興奮することが明らかになり、Q ニューロンは体温の上昇を防ぐための機能を果たしている可能性が示唆された。今後、Q ニューロンを除去したマウスを用いて、外気温の変動に対する応答を明らかにする予定である。

(3)AVPe に発現している Q ニューロンの核を抽出し、10xGenomics 社の Chromium にてシングルセル解析を実施した。その結果、Q ニューロンの制御に関わる因子群を複数同定した。この情報をもとに、Q ニューロンに作用する可能性のある因子を数個ピックアップし、スライス標本にてカルシウムイメージングおよび電気生理実験によって Q ニューロンを興奮させる因子を見出した。

(4)OPN4（メラノプシン）を用いて微弱な光で Gq シグナリングを活性化させることにより神経の興奮を試みた。また感度を上げるために不活性化に關与する C 末端側のリン酸化クラスター領域を欠損させた（hOPN4dC）。hOPN4dC は青色光で活性化し、神経の興奮を誘導することを電気生理学的に確かめた。さらに、in vivo において Q ニューロンに発現させ光照射の体温への

影響を観察した。3-10 mW という極めて弱い光で体温の低下を誘導することが可能であった。重要なことに、24 時間という長期間にわたって光照射を持続させても神経の損傷は観察されず、何度も QIH 誘導が可能であった。この系を用いて、これまでに Q ニューロンの活性化によって体温の低下に先行して心拍数が急激に低下することを見出しており、Q ニューロンの新しい機能を提唱した。さらに、光照射を終了することで 30 分以内に元のレベルに体温が戻ることが判明した。この研究成果を論文として発表した (Takahashi et al., Cell Reports Methods, 2022)。

一方、概日時計に与える影響を概日時計によって制御される生理リズムを指標に解析している。これまでに恒暗条件においてマウスの輪回し行動リズムの位相は QIH によって影響を受けないことを見出した。つまり、生体において QIH 中も概日時計が振動していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hasegawa Emi, Miyasaka Ai, Sakurai Katsuyasu, Cherasse Yoan, Li Yulong, Sakurai Takeshi	4. 巻 375
2. 論文標題 Rapid eye movement sleep is initiated by basolateral amygdala dopamine signaling in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 994 ~ 1000
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/science.abl6618	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 8件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Sakurai, T.
2. 発表標題 Induction of hypometabolic and hypothermic states in mice.
3. 学会等名 JST-CREST “Opt Bio” / WPI-IIIIS Joint Symposium（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 櫻井 武
2. 発表標題 Induction of hibernation-like hypometabolic state by manipulating hypothalamic neurons
3. 学会等名 第99回日本生理学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 櫻井 武
2. 発表標題 冬眠様の制御された低代謝状態を誘導する視床下部神経系
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 櫻井 武
2. 発表標題 冬眠様の制御された低代謝状態を誘導する新規神経回路
3. 学会等名 第28回時間生物学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 櫻井 武
2. 発表標題 視床下部神経系の操作による冬眠様の低代謝・低体温状態の誘導
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 櫻井 武
2. 発表標題 マウスにおける冬眠様状態の誘導
3. 学会等名 日本睡眠学会第46回定期学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 櫻井 武
2. 発表標題 冬眠様の制御された低代謝状態を誘導する新規神経回路
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 櫻井 武
2. 発表標題 冬眠様の制御された低代謝状態を誘導する新規神経回路の同定
3. 学会等名 第68回日本実験動物学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------