

令和 2 年 5 月 14 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19421

研究課題名（和文）中枢概日時計の局所神経回路で2種類の細胞を遺伝子操作・活動操作し分ける方法の開発

研究課題名（英文）Developing a method for differential genetic manipulations on two types of neurons within a local neural circuit of the central circadian clock

研究代表者

三枝 理博（MIEDA, Michihiro）

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：20296552

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：概日（サーカディアン）リズムを制御する中枢概日時計・視交叉上核の神経ネットワークを題材にし、複雑な局所神経ネットワークにおいて、近接する2種類の神経細胞に異なる遺伝子操作・神経活動操作を加え、両者間のコミュニケーションを様々な角度から記録・解析できるシステムを構築することを目的とした。具体的には、一方を刺激した時の他方の応答、両者の神経活動の同時測定、上流・下流関係の解析等である。この目的のために、複数の新たな遺伝子改変マウスや各種の組換えアデノ随伴ウイルスベクターを作成し、また生体内で特定の種類の神経活動を計測する技術も立ち上げ、上述のようなシステムの構築に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

中枢概日時計・視交叉上核神経ネットワークは、多種・多数の神経細胞間のコミュニケーションを介し、強固で安定な概日振動を発振する。しかしながら、視交叉上核の神経回路レベルでの動作原理に関する知見は驚くほど少ない。本研究は中枢概日時計神経ネットワークの動作原理解明において、これまでに無い斬新なアプローチを採るもので、学術的意義が大きい。加えて、神経科学・神経生理学全般に対し、複雑な局所神経回路網の機能を解析する上で、新たな方法論を提供する。また、概日時計の変調や他の局所神経回路の異常に起因する健康障害・疾患の病態生理の理解、さらにはその対処法の開発に繋がれば、社会的意義も大きい。

研究成果の概要（英文）：Using the neural network of the central circadian clock of the suprachiasmatic nucleus (SCN) as a model, we aimed to construct a strategy for analyzing intercellular communications between different two types of neurons within a complex local circuit, by differential genetic and optogenetic manipulations on those different neuronal types. Its specific purposes include recording responses of one neuron type to the stimulation of another neuron type, recording activities of two types of neurons simultaneously, and uncovering upstream/downstream relationships between two types of neurons. To do this, we generated novel genetically-modified mouse lines and recombinant adeno-associated viral vectors. We also set up a system to record the neuronal activity of a particular type of neurons in vivo. Thus, we have successfully constructed such a strategy.

研究分野：生理学

キーワード：サーカディアンリズム 体内時計 視交叉上核 神経ネットワーク 遺伝子操作マウス アデノ随伴ウイルスベクター 光遺伝学 カルシウムセンサー

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

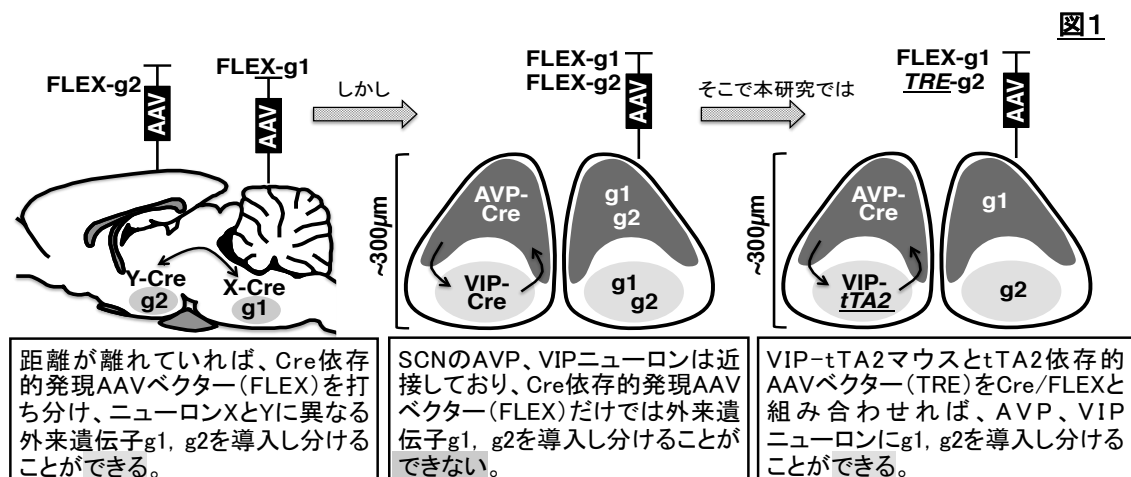
(1) 蛍光タンパク質やカルシウムセンサータンパク質 (GECI)、光遺伝学プローブの開発により、特定のタイプのニューロンの特異的な標識、神経活動 (カルシウムダイナミクス) 計測、神経活動操作が可能になった。特に、ニューロンタイプ特異的な Cre ドライバーマウスがあれば、FLEX/DIO (flip-excision/Double-floxed inverse Orientation) システムを利用した Cre 依存発現 AAV (アデノ随伴ウイルス) ベクターを局所感染させることで、発現させるタンパク質とニューロンタイプを様々な組み合わせで選ぶことができる。

(2) 神経回路の動作原理を明らかにするために、接続する2種類のニューロンの活動を同時に計測する、一方を活性化したときの他方の応答を調べる、一方を活性化し他方を抑制した場合の神経回路や行動レベルの挙動を観察する、などのアプローチにより極めて有用な情報が得られる。そのためには、2種類のニューロンタイプに特異的に、異なる外来遺伝子を導入する必要がある。両者がある程度離れた領域に存在する場合には、Cre 依存発現 AAV ベクターを空間的にインジェクションし分けることにより、ニューロン X に外来遺伝子 g1、ニューロン Y に外来遺伝子 g2 を発現させることが可能である。しかし、視床下部の神経核など、小領域内で複数タイプのニューロンが構築する神経回路では、AAV ベクターを神経核内で空間的に打ち分けることは不可能である (図1)。

2. 研究の目的

(1) 哺乳類の概日リズム制御中枢 SCN (視交叉上核) は、多種・多数の時計ニューロン間のコミュニケーションを介し強固で安定な概日振動を発振する神経ネットワークである。SCN の神経回路レベルでの動作原理に関する知見は驚くほど少ない。そこで本研究では、応募者がこれまでに蓄積してきた、ニューロンタイプ特異的に遺伝子操作・神経活動操作をするためのツールを活用し、中枢概日時計 SCN を構成するニューロンタイプごとの役割を明らかにするアプローチによりその動作原理を理解することを目的とした。

(2) SCN 神経ネットワークのメカニズムを理解するためには、単一のニューロンタイプを計測・操作するだけでは十分でなく、複数のニューロンタイプの活動を同時に記録する、1つの神経活動を操作した時の他のニューロンタイプの応答を記録する、また一方を活性化すると同時に他方を抑制し両者の機能的な上流・下流関係を明らかにすることが必要である。既に SCN の主要な二つのニューロンタイプ、AVP ニューロンと VIP ニューロンに特異的に Cre を発現するマウス (AVP-Cre、VIP-Cre マウス) は利用可能だが、これだけでは異なる2つのニューロンタイプを操作し分けることができない。なぜなら、SCN は非常に小さい神経核のため (長径 0.3~0.4 mm)、AAV ベクターを場所により打ち分けることが出来ないためである。そこで本研究では、同一個体内で AVP ニューロンと VIP ニューロンに異なる外来遺伝子を発現させ、両者の相互作用を ex vivo, in vivo で直接解析できる系を構築する (図1)。



3. 研究の方法

(1) VIP ニューロン特異的に tTA2 (tetracycline-dependent transactivator) を発現するトランスジェニックマウスを作製する (VIP-tTA2)。VIP-tTA マウスと AVP-Cre マウスを交配したマウスの SCN に、Cre 依存発現 AAV ベクター (外来遺伝子 g1 を発現) と TRE (Tetracycline Response Element) 制御下で外来遺伝子 g2 を発現する AAV ベクターを感染させ、同一個体の SCN 内で AVP ニューロンに g1、VIP ニューロンには g2 を発現させる (図1)。VIP-tTA2 マウスの作成には、高効率・高精度のゲノム編集技術を利用して、tTA2 発現カセットをゲノム内在性 VIP 遺伝子座へノックインする。

(2) Cre 依存的 (FLEX)、あるいは tTA2 依存的 (TRE) に、神経活動記録・操作のための蛍光プローブを発現する、様々な組換え AAV ベクターを作成する。使用する傾向プローブの例としては：

- ChR2 (channelrhodopsin 2): 青色光で開口するカチオンチャネル
- ReaChR: 赤色光で開口する ChR2
- jGCaMP7s: GFP 由来の蛍光カルシウムセンサータンパク質
- RCaMP1a: 赤色版の蛍光カルシウムセンサータンパク質

などが挙げられる。

(3) In vivo で蛍光カルシウムセンサーを指標に神経活動をモニターするために、ファイバーフォトメトリーの系を立ち上げて用いる。In vivo で神経活動を操作する手段としては、光遺伝学的手法を用いる。後者は既に研究室で稼働している。

4. 研究成果

(1) 受精卵でのゲノム編集技術を用いて、tTA2-polyA カセットを Vip 遺伝子翻訳開始点にノックインした Vip-tTA2 マウスを作成した。5 匹のファウンダーマウスが得られ、野生型マウスとの戻し交配により系統を確立した。TRE-EGFP レポーターマウスと交配し、tTA2 の特異的な発現を確認した。

(2) 得られた Vip-tTA2 マウスを Avp-Cre マウスと交配し、Vip-tTA2;Avp-Cre ダブルトランスジェニックマウスを得た。

(3) Vip-tTA2;Avp-Cre ダブルトランスジェニックマウスにインジェクションすることで、VIP ニューロンと AVP ニューロンを操作し分けるための、tTA 依存的 (TRE)、Cre 依存的 (FLEX) な各種発現 AAV ベクターを作成した。具体的には、AAV-TRE-jGCaMP7s、AAV-TRE-ChR2::EYFP、AAV-EF1 α -FLEX-jGCaMP7s、AAV-EF1 α -FLEX-RCaMP1a、AAV-EF1 α -FLEX-ChR2::EYFP などである。多くのものについて既に動作確認を行った。

(4) AAV-EF1 α -FLEX-jGCaMP7s を用いて SCN の AVP ニューロンあるいは VIP ニューロンに jGCaMP7s を発現し、ファイバーフォトメトリーを用いて自由行動下マウスの SCN AVP ニューロン、VIP ニューロンから細胞内 Ca²⁺ を長期間計測することに成功した。ChR2::EYFP を用いた in vivo での光遺伝学的神経活動操作は既に研究室で成功しているため、今後この二つを組み合わせ、ニューロンタイプ間の相互作用を調べていく。

(5) AVP ニューロン、VIP ニューロンに次ぐ、SCN 内の第三のニューロンタイプとも呼ぶべきニューロン集団をラベルできる分子マーカー (ペプチド) が報告された。そこでゲノム編集技術を用いて、当該ペプチド遺伝子に tTA2、あるいは Cre をノックインした、特異的 tTA2 ドライバー、Cre ドライバーマウスを作成した。既に両者についてファウンダーマウスが得られ、現在戻し交配により系統を確立している。これらのマウスを用いることで、第三のニューロンタイプと AVP ニューロン、あるいは VIP ニューロン間の相互作用を解析することができる。

(6) VIP ニューロンに特異的に組換え酵素 flippase (Flp) を発現するマウス (Vip-ires-Flp マウス) がジャクソン研究所から入手可能になったので、入手した。Flp 依存的に jGCaMP7s を発現する AAV ベクター (AAV-EF1 α -fDIO-jGCaMP7s) を作成して Vip-ires-Flp マウスの SCN にインジェクションし、ファイバーフォトメトリーを用いた VIP ニューロンから細胞内 Ca²⁺ の in vivo 計測に成功した。Avp-Cre マウスとの組み合わせで AVP、VIP ニューロンを操作し分けられるだけでなく、将来的には Avp-Cre、Vip-ires-Flp、第三のペプチド-tTA2 マウスの組み合わせで 3 種類の SCN のニューロンタイプを同一マウス個体内で操作仕分けすることも可能になる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Saito YC, Maejima T, Nishitani M, Hasegawa E, Yanagawa Y, Mieda M, Sakurai T	4. 巻 38
2. 論文標題 Monoamines Inhibit GABAergic Neurons in Ventrolateral Preoptic Area That Make Direct Synaptic Connections to Hypothalamic Arousal Neurons.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Neurosci	6. 最初と最後の頁 6366-6378
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/JNEUROSCI.2835-17.2018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Rigney N, Whylings J, Mieda M, de Vries G, Petruelis A	4. 巻 6
2. 論文標題 Sexually Dimorphic Vasopressin Cells Modulate Social Investigation and Communication in Sex-Specific Ways.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 eNeuro	6. 最初と最後の頁 in 0415-18.2019
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/ENEURO.0415-18.2019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Zhang T, Yanagida J, Kamii H, Wada S, Domoto M, Sasase H, Deyama S, Takarada T, Hinoi E, Sakimura K, Yamanaka A, Maejima T, Mieda M, Sakurai T, Nishitani N, Nagayasu K, Kaneko S, Minami M, Kaneda K.	4. 巻 Epub ahead of print
2. 論文標題 Glutamatergic neurons in the medial prefrontal cortex mediate the formation and retrieval of cocaine-associated memories in mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Addict Biol	6. 最初と最後の頁 e12723
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/adb.12723	査読の有無 有
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 -
1. 著者名 Mieda M.	4. 巻 13
2. 論文標題 The Network Mechanism of the Central Circadian Pacemaker of the SCN: Do AVP Neurons Play a More Critical Role Than Expected?	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Front Neurosci	6. 最初と最後の頁 139
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnins.2019.00139	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fujiwara T, Nakata R, Ono M, Mieda M, Ando H, Daikoku T, Fujiwara H.	4. 巻 3
2. 論文標題 Time Restriction of Food Intake During the Circadian Cycle Is a Possible Regulator of Reproductive Function in Postadolescent Female Rats.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Curr Dev Nutr	6. 最初と最後の頁 nzy093
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/cdn/nzy093	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mieda M.	4. 巻 in press
2. 論文標題 The central circadian clock of the suprachiasmatic nucleus as an ensemble of multiple oscillatory neurons.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neurosci Res	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neures.2019.08.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 三枝理博
2. 発表標題 中枢概日時計におけるバソプレシンニューロンの機能
3. 学会等名 第43回日本睡眠学会定期学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三枝理博
2. 発表標題 Genetic dissection of neural mechanisms underlying the central circadian pacemaker
3. 学会等名 Sapporo Symposium on Biological Rhythm in 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三枝理博
2. 発表標題 Neural mechanisms underlying the central circadian pacemaker of the SCN
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 AVP神経特異的小胞GABAトランスポーター遺伝子欠損マウスにおける中枢概日時計の解析
2. 発表標題 AVP神経特異的小胞GABAトランスポーター遺伝子欠損マウスにおける中枢概日時計の解析
3. 学会等名 第25回日本時間生物学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三枝理博
2. 発表標題 哺乳類中枢概日時計の神経メカニズム
3. 学会等名 明治大学現象数理学共同研究集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 "前島隆司 長谷川恵美 津野祐輔 三枝理博"
2. 発表標題 Analysis of the central circadian clock in AVP neuron-specific VGAT deficient mice
3. 学会等名 第9回アジア・オセアニア生理学会連合（FAOPS）2019年大会（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三枝理博、長谷川恵美、津野祐輔、前島隆司
2. 発表標題 GABAergic transmission of AVP neurons regulates correctly timed output of the central circadian pacemaker of the SCN.
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三枝理博
2. 発表標題 中枢概日時計神経ネットワークの遺伝学的解析
3. 学会等名 第26回日本時間生物学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 津野祐輔、前島隆司、長谷川恵美、三枝理博
2. 発表標題 AVPニューロン特異的Vgatノックアウトマウスにおける視交叉上核概日リズムのインビトロ、行動、及びインビボ解析
3. 学会等名 第26回日本時間生物学会学術大会
4. 発表年 2019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
連携研究者	前島 隆司 (MAEJIMA Takashi) (70399319)	金沢大学・医学系・准教授 (13301)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	津野 祐輔 (TSUNO Yusuke) (70827154)	金沢大学・医学系・助教 (13301)	