

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：82609

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19009

研究課題名(和文) 睡眠・覚醒の脳内エネルギー状態の解明

研究課題名(英文) Study for brain cellular energy dynamics across sleep-wake cycle

研究代表者

夏堀 晃世 (NATSUBORI, Akiyo)

公益財団法人東京都医学総合研究所・精神行動医学研究分野・主席研究員

研究者番号：20732837

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ATP(アデノシン三リン酸)は動物の各細胞で生合成され、あらゆる細胞機能に利用されるエネルギー代謝分子であり、その細胞内濃度は神経興奮性に影響を与えることが知られる。しかし生きた動物の脳内では、エネルギー消費活動に合わせたエネルギー合成促進機構が存在するため、脳活動に伴い細胞内ATP濃度が変動するのか、あるいは常に一定に保たれているのか不明であった。本研究はATPの蛍光プローブを細胞質に発現するノックインマウスを用い、生きたマウス脳の細胞内ATP動態を計測する光ファイバ計測システムを構築した。このシステムを用い、マウスの睡眠覚醒に伴う大脳皮質の細胞内ATP動態を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Adenosine 5'-triphosphate (ATP) is a metabolic molecule which is used for all subcellular processes as the major energy currency of cells. The intracellular ATP concentration was reported to affect the neuronal excitability in ex vivo conditions. However, it has been unclear the physiological dynamics of intracellular ATP levels in the living brain, which has energy homeostatic regulation mechanisms. Here we conducted in vivo optical recording of brain intracellular ATP dynamics using knock-in mice for fluorescent ATP probes ubiquitously expressed in the cellular cytoplasm and the fiberphotometric system. We observed the unique pattern of cortical intracellular ATP dynamics across sleep-wake cycle of mice.

研究分野：神経生理学

キーワード：アデノシン三リン酸(ATP) 睡眠覚醒 大脳皮質 ファイバフォトメトリー in vivo

## 1. 研究開始当初の背景

ATP (アデノシン三リン酸) は動物の各細胞内で生合成され、脳においては細胞膜電位維持や物質伝達など、あらゆる細胞機能に利用されるエネルギー代謝分子である。Ex vivo 先行研究から、ATP の細胞内濃度は細胞のエネルギー合成とエネルギー消費活動の両方の影響を受けて変動し、かつ神経興奮性に影響を与えることが示されている。一方、生きた動物の脳内では、エネルギー消費活動に合わせたエネルギー合成促進機構が存在するため、細胞内 ATP 量が脳活動に伴い変動して神経活動に影響を与えようのか、あるいは脳活動変化にかかわらず常に一定に保たれているのか不明であった。従来脳内 ATP を定量する方法は脳組織のルシフェリン・ルシフェラーゼアッセイ法であり、時間分解能と測定精度に問題があったことから、新たな脳内 ATP 計測法の開発が必要と考えられた。

脳における細胞のエネルギー消費活動とそれに伴うエネルギー合成は、動物の状態や行動に伴い変化する。先行研究から、動物の睡眠覚醒に伴い、神経活動や物質伝達などのエネルギー消費活動が変化すると同時に、エネルギー合成に関わるグルコース代謝や脳血流が変動することが報告されている。このことから、本研究では動物の最大の生理的变化の一つである睡眠覚醒に伴う細胞内 ATP 動態に着目して計測を行った。

## 2. 研究の目的

- (1) ATP の蛍光プローブ(GOATeam; Nakano et al., 2011, ACS Chem Biol.)を細胞質に発現するノックインマウスを用い、生きたマウス脳細胞内 ATP 動態をリアルタイム計測する光ファイバ計測システムを構築する。
- (2) 構築した計測システムを用い、マウスの睡眠覚醒に伴う大脳皮質の細胞内 ATP 動態を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) in vivo ATP 計測法の確立

ATP の蛍光プローブのノックインマウス (ROSA-CAG-GOATeam) の視神経軸索を急性培養下で、共焦点顕微鏡を用いてイメージングする (図 1)。ATP 合成阻害条件下での GOATeam プローブの反応性を確認する。

光ファイバ計測システムの光学系を改変し、GOATeam プローブ計測 (OFP と GFP 蛍光の 2 波長同時計測) に最適化する。動作確認実験として、イソフルラン麻酔下のマウスの大脳皮質における細胞内 ATP 動態計測を行う。

### (2) 睡眠覚醒に伴う大脳皮質細胞内 ATP 動態計測

マウスの大脳皮質へ光ファイバを留置し、脳波・筋電電極の留置手術を行う。手術回復後、マウスを頭部固定に馴化させ、頭部固定下で大脳皮質の細胞内 ATP 動態と脳波・筋電計測を行う。睡眠覚醒ステージは脳波・筋電図から 4 秒ごとの視察判定により行う。

## 4. 研究成果

- (1) GOATeam プローブは OFP と GFP の 2 つの蛍光タンパクを持ち、ATP 結合時に生じる両者の FRET 現象を利用した蛍光プローブである。ATP シグナルは GFP 励起光に対する OFP(FRET)/GFP 蛍光比で表される。本研究ではまず、ROSA-CAG-GOATeam ノックインマウスの視神経軸索を、急性培養下で共焦点顕微鏡を用いてイメージングした (図 1A)。視神経軸索と周囲のグリア細胞に GOATeam プローブ蛍光 (OFP(FRET), GFP) 発現を認めた (図 1B)。培養液中のグルコース除去かつ sodium azide 投与による ATP 合成阻害条件下で、ATP シグナル (FRET/GFP ratio) は有意に低下した (図 1C)。この結果は、細胞質の ATP 濃度低下に対し、ROSA-CAG-GOATeam マウスに発現する GOATeam プローブが反応してシグナルが低下したことを意味する。この結果は、別の ATP プローブを用いた先行研究の結果と完全に一致した (Trevisiol et al., 2017, Elife)。このことから、ROSA-CAG-GOATeam マウスにおける GOATeam プローブ動態の信頼性が確認された。

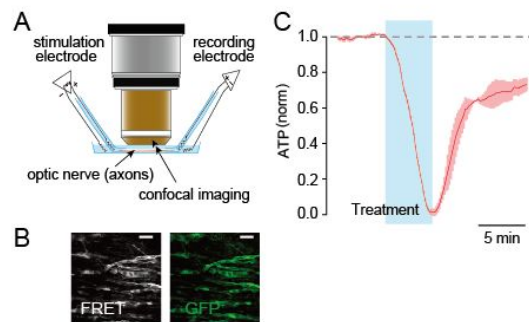


図 1. 視神経軸索を用いた GOATeam イメージング

光ファイバ計測システムの光学系を GOATeam プローブ計測に最適化し、ROSA-CAG-GOATeam マウスの大脳皮質に光ファイバを留置して in vivo 細胞内 ATP 計測を行った (図 2A)。ROSA-CAG-GOATeam マウス由来の蛍光検出感度を上げ、シグナルの S/N 比を増加させる目的で、ノックインマウスをホモ化し、さらに計測システムの PMT (光電子増倍管) をウルトラバイアルカリから GaAsP フォトダイオードに変更した。

イソフルラン麻酔下のマウスの計測を行ったところ、大脳皮質の ATP シグナル (F/G ratio) は麻酔投与下で有意に低下した (図 2B)。イソフルラン麻酔により ATP 合成に関わる

脳代謝活動と ATP を消費する神経活動の両方が低下することが報告されている。このことから、イソフルラン投与下で ATP 消費低下を上回る ATP 合成低下が生じ、細胞のエネルギーバランスが一時的にマイナスに傾くと考えられた。

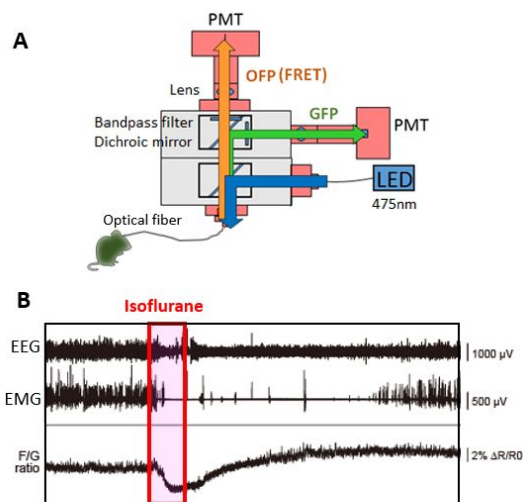


図2. ファイバ計測システムによる大脳皮質ATP動態計測

(2) マウスの睡眠覚醒に伴う大脳皮質の細胞内 ATP 動態を計測した。ATP シグナル(F/G ratio)はマウスの睡眠覚醒に伴い変動し、覚醒と比較してノンレム睡眠で低下傾向、レム睡眠で有意低下を認めた(図 3A, B)。レム睡眠中、エネルギー合成に関わる脳血流やグルコース利用率が増加することが報告されており、エネルギー合成促進が示唆されるにもかかわらず細胞内 ATP 量の低下がみられたことから、レム睡眠中の大脳皮質におけるエネルギー消費の増大が示唆された。

次に、マウスのノンレム睡眠あるいはレム睡眠の深度と大脳皮質の細胞内 ATP 濃度の関係性を明らかにするため、ノンレム睡眠中の脳波デルタパワー、レム睡眠中の脳波シータ周波数と ATP シグナルの相関解析を行ったが、いずれも明らかな相関を認めなかった(図 3C)。このことから、動物の睡眠深度と大脳皮質の細胞内 ATP 量には明らかな関係性がないことが示唆された。

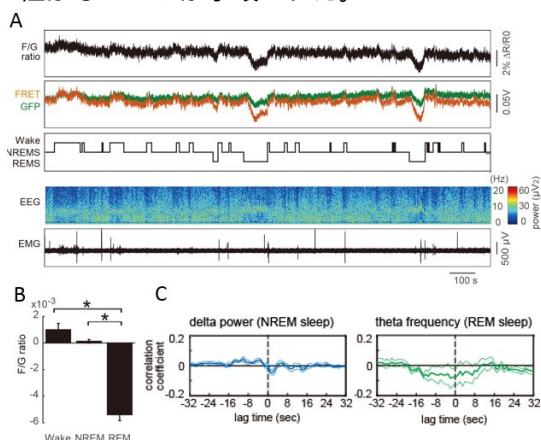


図3. マウスの睡眠覚醒に伴う大脳皮質の細胞内ATP動態

今後は、レム睡眠中に大脳皮質の細胞内 ATP 低下をもたらすエネルギー消費活動の解明を目指すとともに、神経活動をはじめとする様々な脳活動と細胞内 ATP 動態の関係性を解明することを目指す。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Tsutsui-Kimura I, Natsubori A, Mori M, Kobayashi K, Drew MR, de Kerchove d'Exaerde A, Mimura M, Tanaka KF. Distinct Roles of Ventromedial versus Ventrolateral Striatal Medium Spiny Neurons in Reward-Oriented Behavior. (2017) *Curr Biol.*, 27: 3042-3048. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3377-16.2017. (査読有り)

Natsubori A, Tsutsui-Kimura I, Nishida H, Bouchekioua Y, Sekiya H, Uchigashima M, Watanabe M, de Kerchove d'Exaerde A, Mimura M, Takata N, Tanaka KF. Ventrolateral Striatal Medium Spiny Neurons Positively Regulate Food-Incentive, Goal-Directed Behavior Independently of D1 and D2 Selectivity. (2017) *J Neurosci.*, 37: 2723-2733. doi: 10.1016/j.cub.2017.08.061. (査読有り)

〔学会発表〕(計 2 件)

夏堀 晃世, 児玉 亨, 辛島 彰弘, 山本 正道, 高田 則雄, 田中 謙二, 本多 真. 光ファイバ計測システムを用いたマウス脳の細胞内 ATP 動態計測. 第 40 回日本神経科学大会, 2017 年 (ポスター)

夏堀 晃世, 児玉 亨, 辛島 彰弘, 山本 正道, 高田 則雄, 田中 謙二, 本多 真. 光ファイバを用いたマウス脳の細胞内 ATP 動態計測. 第 94 回日本生理学会大会, 2017 年 (ポスター)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.igakuken.or.jp/sleep/>

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

夏堀 晃世 (NATSUBORI, Akiyo)

公益財団法人東京都医学総合研究所・精神

行動医学研究分野・主席研究員

研究者番号：20732837

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

なし