

令和 2 年 6 月 21 日現在

機関番号：82609

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14756

研究課題名(和文)オレキシン神経の細胞内エネルギー動態の解明

研究課題名(英文)Cellular energy dynamics in orexin neurons 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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：動物の睡眠覚醒を引き起こす睡眠あるいは覚醒中枢神経の膜電位興奮性の調節因子として、細胞共通のエネルギー分子であるATP(アデノシン3リン酸)の細胞内濃度が関与している可能性がある。本研究はこの仮説検証を目指すため、ATPを感知する蛍光プローブを細胞質に発現させた遺伝子改変マウスを用い、覚醒中枢オレキシン神経が局在する外側視床下部の細胞内ATP濃度動態を光ファイバ計測した。結果、外側視床下部の細胞内ATP濃度は動物の覚醒時と比較してノンレム睡眠時に増加し、一方でレム睡眠時に大きな低下を認めた。この結果は、睡眠覚醒に伴う脳の細胞内ATP変動が存在し、神経膜電位興奮性に影響を与えることを示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、動物の睡眠覚醒に合わせ、細胞のエネルギー分子であるATP(アデノシン3リン酸)が脳内で生理的に変動していることを、マウスを用いた生体計測により明らかにした。特に、動物の覚醒を引き起こす中枢領域である外側視床下部において細胞内ATP濃度が変動していたことから、細胞内ATPが覚醒中枢神経の活動を調節する新たな因子として機能している可能性が予想できる。

研究成果の概要(英文)：As one of the regulators of membrane excitability of sleep or arousal-related neurons in animals, the intracellular concentrations of adenosine 5'-triphosphate (ATP), the major cellular energy metabolite, could be involved. In order to test this hypothesis, we conducted in vivo optical recording of intracellular ATP concentration in the lateral hypothalamus, where the orexin neurons involved in arousal is localized, using a genetically encoded fluorescent ATP sensor. With fiber photometric recordings, we observed that intracellular ATP concentrations in the lateral hypothalamus increased during non-REM sleep compared to awake, while a great decrease was observed during REM-sleep of animals. These results showed that intracellular ATP concentrations fluctuates depending on the sleep-wake state of animals. These state-dependent ATP fluctuations could affect neuronal membrane excitability under physiological conditions.

研究分野：神経生理学

キーワード：アデノシン3リン酸(ATP) 睡眠覚醒 ファイバフォトメトリー 生体脳計測

1. 研究開始当初の背景

動物の睡眠覚醒は、脳幹や視床下部に存在する睡眠中枢と覚醒中枢の神経活動が交互に活発化し、大脳皮質を含む広範な投射先領域の神経発火パターンを変化させることにより生じると考えられている。この睡眠・覚醒中枢の神経活動を調節する因子の一つとして、細胞共通のエネルギー分子である ATP (アデノシン 3 リン酸) の細胞内濃度が関与している可能性がある。ATP は各細胞内の代謝活動により生合成され、その細胞内濃度は細胞のエネルギー消費と供給のバランスを保つため、一定のレベルに維持されていると予想されてきた。一方で、覚醒中枢神経の一つである視床下部オレキシン神経など複数の神経において、その細胞膜に ATP 感受性 K⁺チャンネルが発現し、細胞内 ATP 濃度変化を感知して神経膜電位を変化させる機構が報告されている[1]。このことから研究代表者は、オレキシン神経を含む複数の神経で細胞内 ATP 濃度の生理的変動が生じており、それが当該神経活動に影響を与えることで、最終的に動物の睡眠覚醒を変化させるトリガーとして機能している可能性を予想した。この仮説を検証する第一段階として、動物の睡眠覚醒に伴い、神経細胞内 ATP が生理的変動していることを示す必要がある。

研究代表者らはこれまでに、カルシウム蛍光プローブを特定細胞に発現させたマウスの脳に光ファイバを留置し、プローブ蛍光を生体計測する光学システム (ファイバフォトメトリー) を構築した[2]。それにより、脳表から顕微鏡の焦点距離が届かない脳深部における in vivo 蛍光計測を実現させた。この光ファイバ計測システムを用い、ATP を感知する蛍光プローブを特定神経の細胞質に発現させたマウスの生体脳計測を行うことで、脳深部に局在する睡眠・覚醒中枢神経の細胞内 ATP 濃度が動物の睡眠覚醒に伴い変動し、当該神経活動を変化させる因子となりうるかどうかを明らかにできると考えた。

参考文献

- [1] Liu, ZW. et al., 2011, J.Physiol.
- [2] Natsubori, A. et al., 2017, J.Neurosci.

2. 研究の目的

ATP を感知する蛍光プローブを細胞質に発現させたマウス脳の光ファイバ計測により、動物の睡眠覚醒に伴い、覚醒中枢神経の一つであるオレキシン神経が局在する外側視床下部において神経細胞内 ATP 濃度がどのように変動するかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ATP の蛍光プローブ (GOATeam; Nakano et al., 2011, ACS Chem Biol.) (図 1) を細胞質に発現するノックインマウス (ROSA-CAG-GOATeam; 未発表) を用い、オレキシン神経が局在する外側視床下部に留置した光ファイバを通じて細胞内 ATP 濃度動態を計測する (図 2)。

(2) 次に、Orexin-Cre マウスの外側視床下部に floxed-GOATeam (ATP 蛍光プローブ) かつ floxed-RGECO (カルシウム蛍光プローブ) を搭載した AAV (アデノ随伴ウイルス) を局所投与し、オレキシン神経選択的に ATP 蛍光プローブ (GO-ATeam) とカルシウム蛍光プローブ (RGECO) を発現させる。AAV 投与領域に光ファイバを留置し、動物の睡眠覚醒に伴う、オレキシン神経の細胞内 ATP 濃度動態とカルシウム活動計測を行う。

ATP 計測時、脳波・筋電図の同時計測を行い、オフラインで睡眠覚醒ステージ判定を行う。

4. 研究成果

(1) GOATeam プローブは KO (クサビラオレンジ) 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 KO(FRET)/GFP 蛍光比で表される。このため、光ファイバ計測システムは 1 波長励起・2 波長同時計測の仕様のものを用いた。なお、本研究で用いた ROSA-CAG-GOATeam ノックインマウスにおける

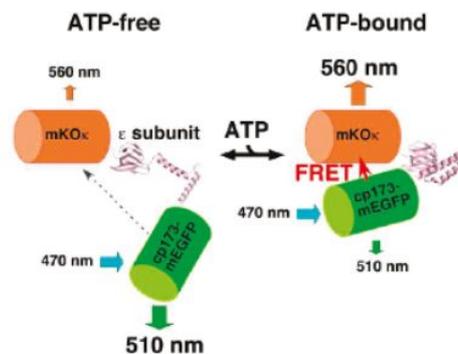


図1. ATP 蛍光プローブ (GOATeam) Nakano et al. 2011 ACS Chem.Biol. より引用.

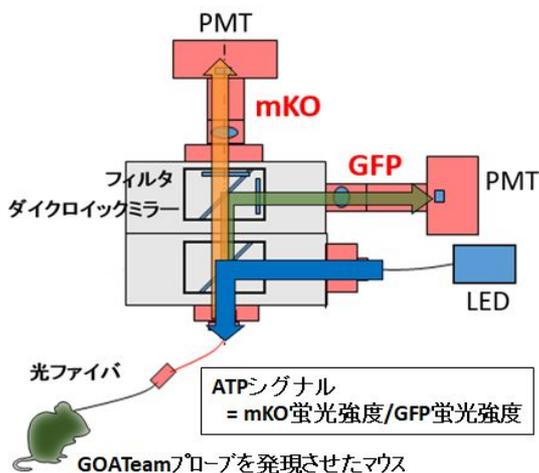


図2. ファイバフォトメトリー (1波長励起・2波長蛍光計測) による細胞内 ATP 動態の生体計測.

GOATeam プローブ動態の信頼性は、視神経軸索を用いた *ex vivo* 実験で既に確認済である。

このマウスの外側視床下部に光ファイバを留置して細胞内 ATP 動態を計測したところ、外側視床下部の細胞内 ATP 濃度は動物の覚醒時と比較してノンレム睡眠時に増加し、一方でレム睡眠中に大きな低下を認めた (図 3)。このことから、動物の睡眠覚醒に伴い、オレキシン神経を含む外側視床下部の細胞内 ATP 濃度に生理的変動が存在し、神経膜電位興奮性に影響を与えることが示唆された。なお本研究で計測した細胞内 ATP 変動は、細胞のエネルギー合成と消費のバランスを表すパラメータとみなすことができる。これまでに外側視床下部に加え、大脳皮質など複数の脳領域でレム睡眠中の大きな細胞内 ATP シグナル低下を見出し、レム睡眠中には複数の脳領域で細胞のエネルギーバランスが大きく負に傾くことが示唆される。レム睡眠中の細胞内エネルギー低下の原因としては、脳内で ATP 合成に働くエネルギー代謝活動の低下あるいは ATP 消費活動の亢進が生じている可能性が考えられる。

(2) 外側視床下部にはオレキシン神経の他、GABA 作動性神経やアストロサイトなど、多種類の細胞が混在して分布する。このため、次にオレキシン神経選択的な細胞内 ATP 動態と、神経活動を反映したカルシウム動態計測に着手した。結果、RGECO プローブによるオレキシン神経カルシウム活動の光ファイバ計測には成功したものの、GOATeam プローブの光ファイバ計測では、明らかなオレキシン神経の ATP シグナル変動を捉えることができなかった。原因として、オレキシン神経の細胞内 ATP 変動は極めて小さいか、オレキシン神経の視床下部における分布が比較的粗であることから、ダイナミックレンジが低い GOATeam プローブでは ATP 変動を捉えられない可能性が考えられた。このため、より S/N の高い別の ATP 蛍光プローブ (MaLion; Arai et al., 2018, *Angew Chem Int Ed Engl.*) を用いた ATP 計測に再挑戦する予定である。

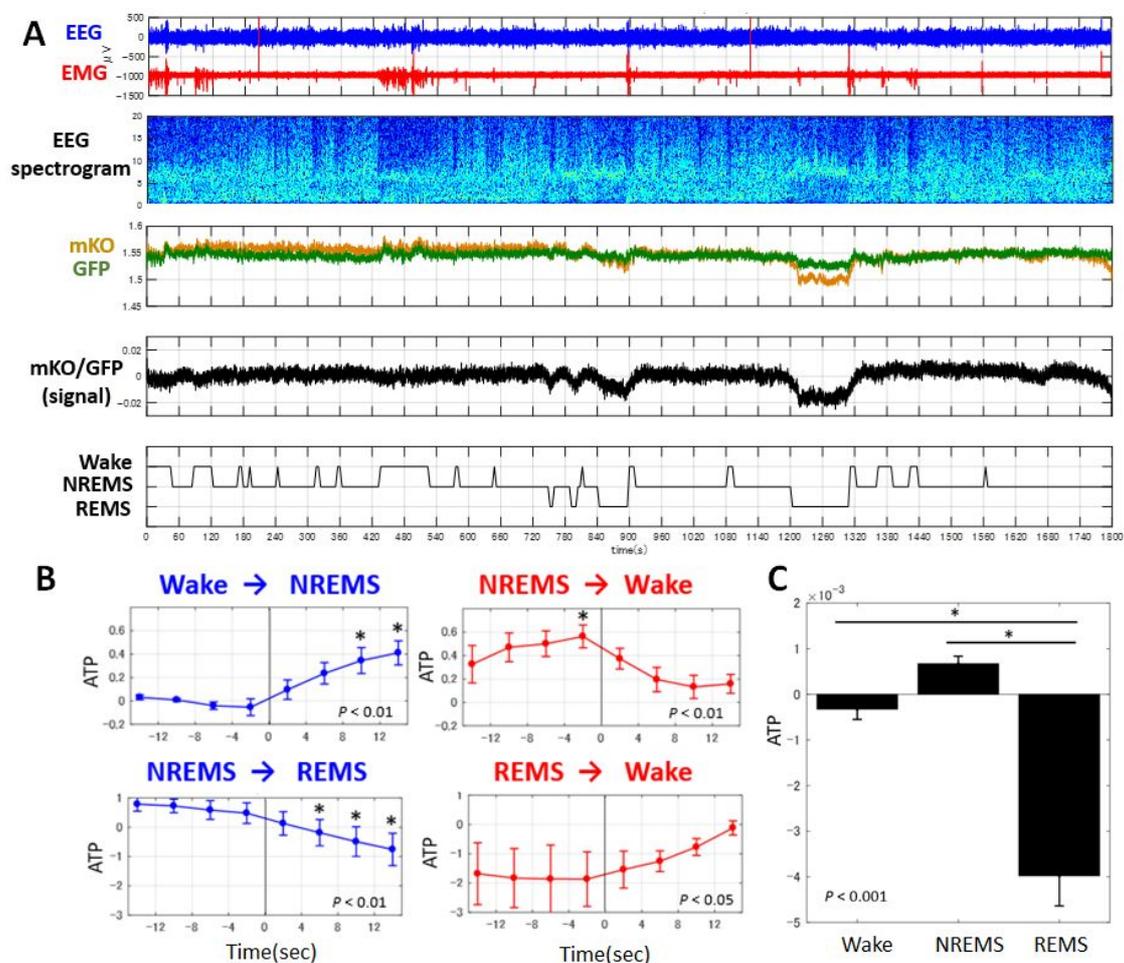


図3. 動物の睡眠覚醒に伴う視床下部の細胞内ATP動態。

A. シグナル代表例 B. 睡眠覚醒ステージ変化に伴うシグナル変動 C. 睡眠覚醒ステージ間ATPシグナル平均値. * $P < 0.05$, two-way ANOVA; *post hoc* Bonferroni test (N=6 mice, mean \pm SEM)

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Wada, M., Mimura, M., Noda, Y., Takasu, S., Plitman, E., Honda, M., Natsubori, A., Ogyu, K., Tarumi, R., Graff-Guerrero, A., Nakajima, S.	4. 巻 142
2. 論文標題 Neuroimaging correlates of narcolepsy with cataplexy: A systematic review.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neurosci Res.	6. 最初と最後の頁 16-29
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neures.2018.03.005	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 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 夏堀 晃世
2. 発表標題 睡眠覚醒に伴う大脳皮質の細胞内ATP動態の解明
3. 学会等名 日本睡眠学会第43回定期学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akiyo Natsubori, Akihiro Karashima, Takashi Kojima, Toru Kodama, Kazuto Masamoto, Norio Takata, Kenji F Tanaka, Masamichi Yamamoto, Makoto Honda
2. 発表標題 The intracellular ATP dynamics in the cerebral cortex is closely related to the neurometabolic coupling
3. 学会等名 Sapporo Symposium on Biological Rhythm in 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akiyo Natsubori
2. 発表標題 In vivo optical recording reveal state-dependent intracellular ATP dynamics in neurons.
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 Akiyo Natsubori
2. 発表標題 In vivo dynamics of cortical neuronal intracellular ATP levels
3. 学会等名 第11回光操作研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akiyo Natsubori, Akihiro Karashima, Takashi Kojima, Tohru Kodama, Kazuto Masamoto, Norio Takata, Kenji F Tanaka, Masamichi Yamamoto, Makoto Honda
2. 発表標題 The intracellular ATP dynamics in the cerebral cortex across sleep-wake cycle of mice
3. 学会等名 第10回光操作研究会・第2回脳情報動態 合同シンポジウム
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

公益財団法人 東京都医学総合研究所 睡眠プロジェクト http://www.igakuken.or.jp/sleep/index.html

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