

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月1日現在

機関番号：63905

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2008～2010

課題番号：20680021

研究課題名（和文） 睡眠覚醒制御に関わる神経機構の統合的解明

研究課題名（英文） Integrated research for the mechanism of sleep/wakefulness regulation

研究代表者

山中 章弘（YAMANAKA AKIHIRO）

生理学研究所・細胞器研究系・准教授

研究者番号：60323292

研究成果の概要（和文）：睡眠覚醒は個体のみで生じる現象である。そのため、睡眠覚醒調節に関わる神経回路網の動作原理の解明には、全ての神経回路が保たれた丸ごと個体において、検証することが不可欠である。近年開発されたチャンネルロドプシン2 (ChR2) および、ハロロドプシン (Halo) を、オレキシン神経特異的に発現させると、*in vivo* において、オレキシン神経の活動を光を用いて人為的に制御することが可能となった。オレキシン神経特異的に Halo を発現するトランスジェニックマウスを作成して *in vivo*、*in vitro* の両方における解析を行った。*in vitro* スライス標本を作成し、オレキシン神経にパッチクランプした後に黄色光を照射して神経活動の抑制を行い、光刺激の条件を設定した。その後、意識下のマウスを用いてインビボにおけるオレキシン神経活動の抑制を試みた。光ファイバーを視床下部に留置しオレキシン神経活動を黄色光刺激により抑制した。同時に脳波筋電図および、縫線核セロトニン神経細胞から神経活動を細胞外記録によって記録した。光ファイバーを介して黄色光を視床下部に導き、オレキシン神経活動を抑制すると脳波は徐波成分の増加を示し、セロトニン神経活動は完全に抑制された。これらのことから、オレキシン神経活動の抑制によって徐波睡眠が誘導されることが示された。

研究成果の概要（英文）：Sleep/wakefulness is a physiological phenomenon which observed only in the whole body. Thus, it is essential to study using whole animal. Optogenetics is a recently developed technique to control the activity of neurons by expressing light activated proteins, such as channelrhodopsin2 (ChR2) or halorhodopsin (Halo). This technique allows us to control the activity of orexin-producing neurons (orexin neurons) using light *in vivo* and *in vitro*. First, we confirmed the function of ChR2 and Halo in the orexin neurons using slice patch clamp and decided a condition of light illumination. Next, we proceeded *in vivo* experiment using conscious mouse. Optical fibers were bilaterally implanted into the hypothalamus. The activity of orexin neurons was inhibited by illuminating orange light into the hypothalamus through the optical fibers. At the same time, the activity of serotonergic neurons in the raphe nucleus is recorded by the extracellular recordings. Acute inhibition of orexin neurons induced slow wave sleep and the activity of serotonergic neurons was decreased in accordance with initiation of slow wave sleep. This result showed that inhibition of orexin neurons induced slow wave sleep in mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,900,000	2,370,000	10,270,000
2009年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2010年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2011年度	0	0	0
総計	15,900,000	4,770,000	20,670,000

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：神経化学・神経薬理学

キーワード：睡眠覚醒、インビボ、トランスジェニックマウス、チャンネルロドプシン2、細胞外記録

#### 1. 研究開始当初の背景

我々は人生の約 1/3 を眠ることに費やしているが、睡眠覚醒調節の脳内メカニズムは未だ十分に解明されていない。しかし、近年のオレキシンに関する研究によって、**オレキシン神経が睡眠覚醒調節において重要な役割を担っている**ことが明らかとなってきた。これまでに、オレキシン神経細胞に様々な外来遺伝子を発現させたトランスジェニックマウスを作成し、スライスパッチクランプなどの *in vitro* 解析によって、その神経回路について、多くの知見を見いだしてきた。しかしながら、睡眠覚醒は、個体でのみ生じる現象であるため、睡眠覚醒を調節する神経機構の統合的解明には、睡眠覚醒を繰り返す丸ごと個体動物を用いた *in vivo* での解析が必須であった。

#### 2. 研究の目的

本研究では、近年報告された光による神経活動調節法を *in vivo* に応用し、意識下の個体を用いて、オレキシン神経の活動を光刺激によって、人為的にコントロールすることを試みる。オレキシン神経のみに光活性化タンパク質を発現させたトランスジェニックマウスを作成し、光刺激によって、オレキシン神経活動を活性化もしくは、抑制した時に動物の睡眠覚醒状態がどのように変化するかを観察し、睡眠覚醒調節機構におけるオレキシン神経の役割の解明を行う。個体を用いた *in vivo* 解析によって、これまでに蓄積された *in vitro* における断片的なデータを有機的に結びつけ、睡眠覚醒調節機構の本態の全体像と、その動作原理を明らかにする。

#### 3. 研究の方法

オレキシン神経特異的に Halo を発現するトランスジェニックマウスを用いてインビボ、インビトロの両方における解析を行った。*in vitro* スライス標本を作成し、オレキシン神経にパッチクランプした後に黄色光を照射して神経活動の抑制を行い、光刺激の条件を設定した。その後、意識下のマウスを用いてインビボにおけるオレキシン神経活動の抑制を試みた。

#### 4. 研究成果

睡眠覚醒は個体のみで生じる現象である。そのため、睡眠覚醒調節に関わる神経回路網の動作原理の解明には、全ての神経回路が保たれた丸ごと個体において、検証することが

不可欠である。近年開発されたチャンネルロドプシン 2 (ChR2) および、ハロロドプシン (Halo) を、オレキシン神経特異的に発現させると、*in vivo* において、オレキシン神経の活動を光によって、人為的に制御することが可能となった。光ファイバーを視床下部に留置しオレキシン神経活動を黄色光刺激により抑制した。同時に脳波筋電図および、縫線核セロトニン神経細胞から神経活動を細胞外記録によって記録した。光ファイバーを介して黄色光を視床下部に導き、オレキシン神経活動を抑制すると脳波は徐波成分の増加を示し、セロトニン神経活動は完全に抑制された。これらのことから、オレキシン神経活動の抑制によって徐波睡眠が誘導されることが示された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

1. Hirashima N, Tsunematsu T, Ichiki K, Tanaka H, Kilduff TS, Yamanaka A, Neuropeptide B induces slow wave sleep in mice, *Sleep*, 査読有 Vol.34, 2011, 31-37
2. Mihara H, Boudaka A, Shibasaki K, Yamanaka A, Sugiyama T, Tominaga M, Involvement of TRPV2 activation in intestinal movement through NO production in mice. *J Neurosci*, 査読有 Vol.30, 2010, 16536-16544
3. Kawaguchi H, Yamanaka A, Uchida K, Shibasaki K, Sokabe T, Maruyama Y, Yanagawa Y, Murakami S, Tominaga M, Activation of polycystic kidney disease-2-like 1 (PKDL-1)/PKD1L3 complex by acid in mouse taste cells. *J Biol Chem*, 査読有 Vol.285, 2010, 17277-17288
4. Yamanaka A and Tsunematsu T, New approaches for the study of orexin function. *J Neuroendocrinol*, 査読有 Vol.22, 2010, 818-824
5. Yamanaka A, Tabuchi S, Tsunematsu T, Fukazawa Y, Tominaga M, Orexin

Directly Excites Orexin Neurons through Orexin 2 Receptor. J Neurosci, 査読有, Vol.30, 2010, 12642-12652

6. Xie X, Wisor J, Hara J, Crowder T, LeWinter R, Khroyan T, Yamanaka A, Diano S, Horvath T, Sakurai T, Toll L, Kilduff TS, Stress-induced analgesia is coordinately regulated by hypocretin/orexin and nociceptin/orphanin FQ, J Clinical Inv 査読有 Vol. 118, 2009, 2471-2481
7. Tsunematsu T, Fu L, Yamanaka A, Ichiki K, Tanoue A, Sakurai T, van den Pol AN, Vasopressin increases locomotion through a V1a receptor in the orexin/hypocretin neurons-implication for water homeostasis, J Neurosci, 査読有, Vol. 28, 2008, 228-238

[学会発表] (計 10 件)

1. Yamanaka A and Tsunematsu T, An artificial control of sleep/wakefulness state using optogenetics in mice, 2nd International Symposium on Photonic Bioimaging, 2011 年 2 月 7 日 (ニセコリゾート 北海道)
2. Yamanaka A and Tsunematsu T, Optogenetic silencing of orexin neurons induces slow wave sleep in mice, 2nd International Symposium on Photonic Bioimaging, 2011 年 2 月 7 日 (ニセコリゾート 北海道)
3. Yamanaka A, Tsunematsu T, Tabuchi S, Tominaga M, 睡眠覚醒調節におけるオレキシン神経とセロトニン神経の役割について, 中部生理学会, 2010 年 10 月 15 日, (藤田保健衛生大学 愛知県)
4. Tsunematsu T, Tabuchi S, Tominaga M, Yamanaka A, Optical inhibition of orexin neuronal activity using transgenic mice in which orexin neurons express a light-activated protein, halorhodopsin, 2010 年 7 月 6 日, (アムステルダム オランダ)
5. Tabuchi S, Tsunematsu T, Tominaga M, Yamanaka A, Orexin activates orexin neurons via the OX2R, 7th FENS Forum of European Neuroscience, 2010 年 7 月 4 日 (アムステルダム オランダ)

6. Yamanaka A and Tsunematsu T, Optical control of hypothalamic neurons involved in sleep/wakefulness regulation, 日本睡眠学会, 2010 年 7 月 1 日 (名古屋国際会議場 愛知県)
7. Yamanaka A, Optical control of hypothalamic neurons involved in sleep/wakefulness regulation. 日本生理学会年会、2010 年 5 月 21 日 (盛岡市民文化ホール 岩手県)
8. Tabuchi S, Tsunematsu T, Tominaga M, Yamanaka A: Orexin activates orexin neurons via the OX2R. 日本生理学会年会、2010 年 5 月 21 日 (盛岡市民文化ホール 岩手県)
9. Yamanaka A, Optical control of hypothalamic neurons involved in sleep/wakefulness regulation. 国際生理学会 (IUPS2009), 2009 年 7 月 29 日, (京都国際会議場 京都府)
10. 常松友美、山中章弘、富永真琴、バソプレシンは V1a 受容体を介してオレキシン神経を活性化する、日本神経科学会、2008 年 7 月 11 日 (東京国際フォーラム 東京都)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

山中 章弘 (YAMANAKA AKIHIRO)

生理学研究所・細胞器官研究系・准教授

研究者番号：60323292