

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07259

研究課題名(和文) 多種センサーを用いた視交叉上核AVPニューロンのin vivo解析

研究課題名(英文) In vivo analysis of suprachiasmatic nucleus AVP neurons using multiple type sensors

研究代表者

津野 祐輔 (TSUNO, Yusuke)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：70827154

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では視交叉上核における細胞種特異的in vivoファイバーフォトメトリー法を確立し、AVP陽性細胞特異的にGABA放出ができないAVP-Vgat<sup>-/-</sup>マウスで、動物行動とAVP陽性細胞カルシウムリズムの相関関係が崩れることを明らかにした。次に、VIP-tTAノックインマウスを確立し、AVP陽性細胞特異的に時計タンパク質リン酸化酵素CK1<sup>-/-</sup>マウスと掛け合わせ、AVP陽性細胞・VIP陽性細胞・動物行動リズムの全てで概日周期延長が起こることを明らかにした。最後に、同一個体で異なる細胞種のカルシウムリズムを同時に計測するため、二色ファイバーフォトメトリー法を確立し予備データを得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、視交叉上核内において従来機能が不明であったAVP陽性神経細胞が、視交叉上核全体の概日リズム周期を決定し、動物行動リズムを制御していることを示唆する。本研究により、視交叉上核による概日リズム制御メカニズムの一部が明らかになった点が意義深い。本研究は、時差ぼけや睡眠相後退症候群、季節性うつ病、タイムシフト労働などの概日リズム障害の予防や治療に貢献し、健康寿命の延伸にも資する。研究によって得られた知識と技術は、医療、健康管理、生産性向上など様々な領域での応用に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we established a cell type-specific in vivo fiber photometry method in the suprachiasmatic nucleus and showed that the correlation between animal behavior and AVP-positive neuron calcium rhythm is disrupted in AVP-Vgat knock-out mice, which cannot release GABA specifically in AVP-positive neurons. Next, we established VIP-tTA knock-in mice and crossed them with AVP-positive cell-specific clock protein phosphatase CK1<sup>-/-</sup> knock-out mice and found that circadian rhythm periods extend in all AVP-positive neurons, VIP-positive neurons, and animal locomotor activity. Finally, a two-color fiber photometry method was established to simultaneously measure calcium rhythms of different cell types in the same individual, and preliminary data were obtained.

研究分野：神経生理学

キーワード：概日リズム 視交叉上核 ファイバーフォトメトリー カルシウム in vivo

### 1. 研究開始当初の背景

概日リズムは、地球上の生物に幅広く見られる現象であり、昼夜の変化に合わせて個体の活動を最適化するシステムであると考えられる。概日リズムの変調は、様々な身体的・精神的ストレスを引き起こし、精神疾患の原因となりうる。この概日リズムは、どのようなメカニズムで制御されているのであろうか。哺乳類において、全身の細胞の時計遺伝子発現が日内変動を示すが、それらを安定化し同期させる中枢が、視床下部の視交叉上核である。視交叉上核からのシグナルによって、個体の日内リズムは地球上における一日と同期する。視交叉上核はGABA性ニューロンの集合体であり、背内側にはバソプレシン(AVP, arginine vasopressin)陽性細胞、腹外側には血管作動性腸管ペプチド(VIP, vasoactive intestinal peptide)陽性細胞が集合している。網膜からの光刺激は直接VIP陽性細胞に入力し、AVP陽性細胞を介して、その出力として個体の概日リズムがシフトすると考えられている。VIP欠損マウスの概日リズムは顕著な異常を示すことから、多くの研究者がVIP陽性細胞に注目している。その中で三枝らはAVP陽性細胞が概日リズム調節の鍵であるという証拠を見出してきた。AVP陽性細胞特異的にCre組換え酵素を発現するマウスを用いて時計遺伝子の一つであるBmal1を欠損したマウス(*Avp-Bmal1<sup>-/-</sup>*)では、概日リズムの周期が延長し、強度が弱まる(Mieda et al., 2015)。また、AVP陽性細胞特異的に、シナプス小胞性GABAトランスポーターを欠損したマウス(*Avp-Vgat<sup>-/-</sup>*)では、概日リズムに異常が見られる(研究開始当初は未発表)。AVP陽性細胞内に限局したBmal1やVgatの発現の有無によって、個体の概日リズムが変化することから、AVP陽性細胞が個体の概日リズム制御に決定的な役割を担うのではないかと考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究では、視交叉上核AVP陽性細胞の活動及び入力を長時間記録し、概日リズム制御メカニズムを理解することを目的とする。本研究は概日リズム研究への導入報告の少ないファイバーフォトメトリー法を用いて、様々なインジケータを用いて活動や入力を可視化する点に独創性と新規性がある。日内リズムや概日リズムの研究は、ある特定の時刻に固定した脳や脳スライスを用いた研究がこれまで主流であったが、スライスで見られる現象がin vivoで同じである保証はなく、一致しない結果も見られる。本研究では、日内リズムを基軸として、細胞集団を時空間的に解析し、動物の一日の行動全体を司るメカニズムを理解することを目指す。本研究は、概日リズムの変調を伴う疾患メカニズムの、科学的根拠となる。

### 3. 研究の方法

活動記録方法として用いるファイバーフォトメトリー法とは、脳内に埋め込んだ光ファイバーを介して光を照射し、放出される蛍光を記録することで、神経細胞の活動を計測する手法である。マウスは明暗条件(12 h:12 h)または恒暗条件で飼育。ファイバーフォトメトリーによって概日リズムが乱れることはない。本研究では、蛍光インジケータであるjGCaMP7s(Dana et al., 2019)を含むウイルスベクター(AAV)を、AVPニューロンに特異的に組換え遺伝子Creを発現する遺伝子改変マウスの視交叉上核に注入。視交叉上核AVPニューロンに特異的に蛍光インジケータを発現させ、長期間のシグナル記録を行う。

本研究の最大のネックは、データ収録に時間がかかる事である。基本的には一つのファイバーフォトメトリーシステムでは一匹からの記録になり、データ収録に二週間かかる。従来のファイバーフォトメトリー法でデータ収録方法を確立しつつ並行して、データ収録の効率を上げるため、新たなファイバーフォトメトリーシステムを使用する。複数の光ファイバーを一つの光継手にまとめ、その先端をCMOSセンサーで測定する(Kim et al., 2016)ことで、複数の動物から同時に活動を計測する。本手法を用いることで、飛躍的なデータ収録効率の改善が期待できる。

### 4. 研究成果

本研究ではまず、視交叉上核における細胞種特異的in vivoファイバーフォトメトリー法を確立し、AVP陽性細胞特異的にGABA放出ができないAVP-Vgat(vesicular GABA transporter)ノックアウトマウスでは、動物行動リズムとAVP陽性細胞カルシウムリズムとの相関関係が崩れることを明らかにした(Maejima, Tsuno et al., 2021, PNAS, 図1)。AVP陽性細胞からの

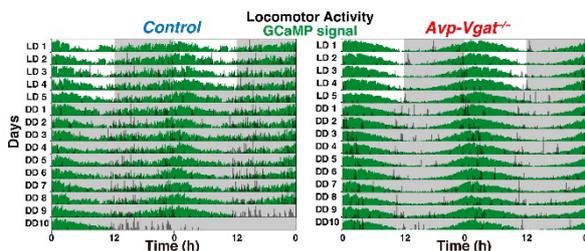


図1. 視交叉上核AVP陽性細胞におけるin vivoカルシウム活動と、動物行動の日内変動。縦軸は日、横軸は二日間の時間。5日間の明暗条件(LD)の後、10日間の恒暗条件(DD)で連続記録。緑：カルシウムシグナル、黒：動物行動。左：コントロール、右：*Avp-Vgat<sup>-/-</sup>*。コントロールでは、動物行動の終わりとカルシウムリズムのピークが、ほぼ同じ時(ZT $\approx$ 0)であるのに対して、*Avp-Vgat<sup>-/-</sup>*ではその関係性が崩れている。(Maejima, Tsuno et al., 2021, PNAS)

GABA の放出の役割を調べるために、AVP 陽性細胞特異的に小胞性 GABA トランスポーターをノックアウトしたマウスを用いた。その結果、このマウスでは AVP 陽性細胞のカルシウムリズムと、動物行動リズムとの関係が崩れることが観察された。コントロール実験として、カルシウムに依存しない蛍光タンパク質 EGFP を発現させ、シグナルに明確な日内リズムが見られないことを確かめた。さらに、本研究で用いているファイバーフォトメトリー法の妥当性を検証するため、既に日内リズムが報告されている視交叉上核 VIP 陽性細胞群にカルシウムインジケータを発現させ、その日内リズムが既存の報告と一致することを確認した。本結果により、AVP 陽性細胞の GABA 放出が、マウスの行動リズムを制御することを明らかにした。

次に、視交叉上核 AVP 陽性細胞と VIP 陽性細胞を区別して標識するために、新たに VIP-tTA(tetracycline transactivator) ノックインマウスを確立し、*Avp-Cre* マウスと掛け合わせることで、異なる細胞種を標識できることを示した (Peng, Tsuno et al., 2022, Front Physiol, 図 2)。このマウスを AVP 陽性細胞特異的に時計タンパク質リン酸化酵素 CK1  $\delta$  (casein kinase 1 delta) をノックアウトしたマウス (*Avp-CK1  $\delta^{-/-}$* ) と掛け合わせることで、AVP 陽性細胞カルシウムリズム、VIP 陽性細胞カルシウムリズム、動物行動リズムの全てにおいて、概日周期が延長することを明らかにした (Tsuno et al., 2022, bioRxiv, 図 3)。このことは、AVP 陽性細胞が視交叉上核全体の概日リズムの周期に、決定的な役割を担っていることを示唆する。

最後に、ファイバーフォトメトリーの二色・四動物同時記録法に成功し、日内リズムが見られる予備データを得た (図 4)。当初はシグナル強度が弱く、安定した記録ができていなかったが、フレームレートを下げることで、シグナル強度を十分得られ記録が安定した。また、当初は赤色のカルシウムインジケータの発現が弱く、カルシウムリズムを計測できるレベルではなかったが、jRGECO1a を用いて、かつ AAV ベクターのタイター値を上げることで、飛躍的に発現強度を上げることに成功した。

#### <引用文献>

Kim CK, Yang SJ, Pichamoorthy N, Young NP, Kauvar I, Jennings JH, Lerner TN, Berndt A, Lee SY, Ramakrishnan C, Davidson TJ, Inoue M, Bito H, Deisseroth K. Simultaneous fast measurement of circuit dynamics at multiple sites across the mammalian brain. *Nat Methods*. 2016 Apr;13(4):325-8

Maejima T, Tsuno Y, Miyazaki S, Tsuneoka Y, Hasegawa E, Islam MT, Enoki R, Nakamura TJ, Mieda M (2021) GABA from vasopressin neurons regulates the time at which suprachiasmatic nucleus molecular clocks enable circadian behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 118: e2010168118

Mieda M, Ono D, Hasegawa E, Okamoto H, Honma K, Honma S, Sakurai T. Cellular clocks in AVP neurons of the SCN are critical for interneuronal coupling regulating circadian behavior rhythm. *Neuron*. 2015 Mar 4;85(5):1103-16

Peng Y, Tsuno Y, Matsui A, Hiraoka Y, Tanaka K, Horike S, Daikoku T, Mieda M (2022) Cell type-specific genetic manipulation and impaired circadian rhythms in *Vip<sup>Cre</sup>* knock-in mice. *Front Physiol* 13: 895633

Tsuno Y, Peng Y, Horike S, Yamagata K, Sugiyama M, Nakamura TJ, Daikoku T, Maejima T, Mieda M (2022) AVP neurons act as the primary circadian pacemaker cells in vivo. *bioRxiv*. doi: 10.1101/2022.08.04.502742



図 2. *Avp-Cre* と *Vip-tTA* を掛け合わせ、AAV を用いて VIP 陽性細胞に GCaMP (左: 緑)、AVP 陽性細胞に mCherry (中央: マゼンタ) を発現させた。スケールバーは 200 $\mu$ m。(Peng, Tsuno et al., 2022, Front Physiol)

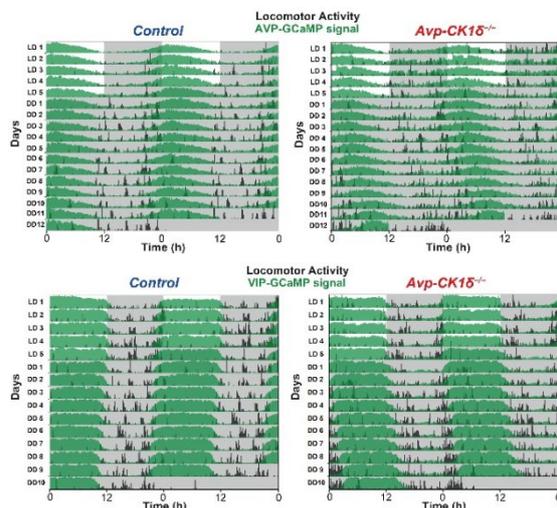


図 3. *Avp-CK1  $\delta^{-/-}$*  における視交叉上核 AVP 陽性細胞 (上段) と VIP 陽性細胞 (下段) における in vivo カルシウム活動と、動物行動の日内変動。*Avp-CK1  $\delta^{-/-}$*  では動物行動リズム (黒) の概日周期延長と同期して、AVP 陽性細胞カルシウムリズムと VIP 陽性細胞カルシウムリズムの周期も延長する。(Tsuno et al., 2022, bioRxiv)

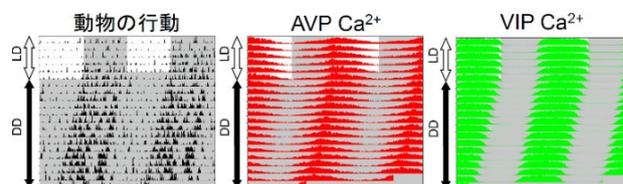


図 4. 同一個体における AVP 陽性細胞と VIP 陽性細胞のカルシウムリズム同時記録。縦軸は日、横軸は二日間の時間。6 日間の明暗条件 (LD) の後、15 日間の恒暗条件 (DD) で連続記録。(未発表)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

|   |                              |
|---|------------------------------|
| 1. 著者名<br>Maejima Takashi, Tsuno Yusuke, Miyazaki Shota, Tsuneoka Yousuke, Hasegawa Emi, Islam Md Tarikul, Enoki Ryosuke, Nakamura Takahiro J., Mieda Michihiro | 4. 巻<br>118                  |
| 2. 論文標題<br>GABA from vasopressin neurons regulates the time at which suprachiasmatic nucleus molecular clocks enable circadian behavior                         | 5. 発行年<br>2021年              |
| 3. 雑誌名<br>Proceedings of the National Academy of Sciences   | 6. 最初と最後の頁<br>e2010168118    |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1073/pnas.2010168118  | 査読の有無<br>有                   |
| オープンアクセス<br>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<br>-                    |
| 1. 著者名<br>Islam Md Tarikul, Rumpf Florian, Tsuno Yusuke, Kodani Shota, Sakurai Takeshi, Matsui Ayako, Maejima Takashi, Mieda Michihiro                          | 4. 巻<br>32                   |
| 2. 論文標題<br>Vasopressin neurons in the paraventricular hypothalamus promote wakefulness via lateral hypothalamic orexin neurons                                  | 5. 発行年<br>2022年              |
| 3. 雑誌名<br>Current Biology   | 6. 最初と最後の頁<br>3871 ~ 3885.e4 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.cub.2022.07.020  | 査読の有無<br>有                   |
| オープンアクセス<br>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<br>-                    |
| 1. 著者名<br>Peng Yubo, Tsuno Yusuke, Matsui Ayako, Hiraoka Yuichi, Tanaka Kohichi, Horike Shin-ichi, Daikoku Takiko, Mieda Michihiro                              | 4. 巻<br>13                   |
| 2. 論文標題<br>Cell Type-Specific Genetic Manipulation and Impaired Circadian Rhythms in ViptTA Knock-In Mice   | 5. 発行年<br>2022年              |
| 3. 雑誌名<br>Frontiers in Physiology   | 6. 最初と最後の頁<br>895633         |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.3389/fphys.2022.895633  | 査読の有無<br>有                   |
| オープンアクセス<br>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<br>-                    |
| 1. 著者名<br>Tsuno Yusuke, Peng Yubo, Horike Shin-ichi, Yamagata Kanato, Sugiyama Mizuki, Nakamura Takahiro J., Daikoku Takiko, Maejima Takashi, Mieda Michihiro   | 4. 巻<br>-                    |
| 2. 論文標題<br>AVP neurons act as the primary circadian pacesetter cells in vivo  | 5. 発行年<br>2022年              |
| 3. 雑誌名<br>bioRxiv   | 6. 最初と最後の頁<br>-              |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1101/2022.08.04.502742  | 査読の有無<br>無                   |
| オープンアクセス<br>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<br>-                    |

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Yusuke Tsuno, Yubo Peng, Takiko Daikoku, Shin-ichi Horike, Michihiro Mieda.                                   |
| 2. 発表標題<br>Cellular clocks of AVP neurons regulate the cellular circadian period of VIP neurons in the mouse SCN in vivo |
| 3. 学会等名<br>The 28th Annual Meeting of the Japan Society for Chronobiology  |
| 4. 発表年<br>2021年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Yusuke Tsuno, Yubo Peng, Takiko Daikoku, Shin-ichi Horike, Kanato Yamagata, Takashi Maejima, Michihiro Mieda. |
| 2. 発表標題<br>AVP neurons of the SCN act as the principal circadian pacemaker cells in vivo                                 |
| 3. 学会等名<br>The 99th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan   |
| 4. 発表年<br>2022年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Yusuke Tsuno, Yubo Peng, Takiko Daikoku, Shin-ichi Horike, Kanato Yamagata, Takashi Maejima, Michihiro Mieda. |
| 2. 発表標題<br>AVP neurons control the ensemble period of the central circadian clock of the SCN                             |
| 3. 学会等名<br>The 45th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society   |
| 4. 発表年<br>2022年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Yubo Peng, Yusuke Tsuno, Ayako Matsui, Yuichi Hiraoka, Kohichi Tanaka, Shin-ichi Horike, Takiko Daikoku, Michihiro Mieda. |
| 2. 発表標題<br>Histological and behavioral characterization of ViptTA knock-in mice  |
| 3. 学会等名<br>The 29th Annual Meeting of the Japanese Society for Chronobiology   |
| 4. 発表年<br>2022年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Kaito Onodera, Yusuke Tsuno, Yuichi Hiraoka, Kohichi Tanaka, Michihiro Mieda.             |
| 2. 発表標題<br>Circadian behavior and intracellular Ca <sup>2+</sup> rhythms of Prok2 neurons in the SCN |
| 3. 学会等名<br>The 29th Annual Meeting of the Japanese Society for Chronobiology                         |
| 4. 発表年<br>2022年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Yusuke Tsuno, Yubo Peng, Shin-ichi Horike, Kanato Yamagata, Mizuki Sugiyama, Takahiro J. Nakamura, Takiko Daikoku, Takashi Maejima, Michihiro Mieda. |
| 2. 発表標題<br>Arginine vasopressin neurons of the suprachiasmatic nucleus act as the principal circadian pacemaker cells in vivo.                                  |
| 3. 学会等名<br>The 100th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan   |
| 4. 発表年<br>2023年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Yusuke Tsuno, Yubo Peng, Shin-ichi Horike, Kanato Yamagata, Mizuki Sugiyama, Takahiro J. Nakamura, Takiko Daikoku, Takashi Maejima, Michihiro Mieda. |
| 2. 発表標題<br>In vivo recording of the suprachiasmatic nucleus dynamics reveals a dominant role of arginine vasopressin neurons in the circadian pacesetting       |
| 3. 学会等名<br>The 17th Environmental Physiology Pre-Congress   |
| 4. 発表年<br>2023年   |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

|   |
|---|
| <p>体内時計のオン・オフタイマー設定機構の一端を解明 (2021.2.3)<br/> <a href="https://www.kanazawa-u.ac.jp/rd/88959">https://www.kanazawa-u.ac.jp/rd/88959</a></p> <p>眠りを覚ます新たな神経細胞を特定 (2022.8.2)<br/> <a href="https://www.kanazawa-u.ac.jp/wp/wp-content/uploads/2022/08/220802.pdf">https://www.kanazawa-u.ac.jp/wp/wp-content/uploads/2022/08/220802.pdf</a></p> |
|---|

6. 研究組織

|  |                           |                       |    |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|  | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(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 |
|---------|---------|