

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：13901

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(B)）

研究期間：2020～2023

課題番号：20KK0177

研究課題名（和文）自然環境下における睡眠覚醒調節メカニズムの解明

研究課題名（英文）Understanding of sleep-wake regulatory mechanisms in nature

研究代表者

小野 大輔（Ono, Daisuke）

名古屋大学・環境医学研究所・講師

研究者番号：30634224

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 14,400,000円

研究成果の概要（和文）：近年の光遺伝学の技術開発により、様々な生命現象を調節する神経回路が同定されてきている。哺乳類の睡眠研究においても、実験室の飼育環境下における睡眠・覚醒調節に関わる神経細胞が同定されてきた。一方、自然界における動物の睡眠研究はほとんどなされていない。しかし、最近になって自然界における睡眠・覚醒パターンが、実験室の結果とは大きく異なる事が示唆されてきた。本研究では、自然環境下を模倣した環境を実験室で再現し、夜行性であるマウスを昼行性にシフトさせる事に成功した。また、生体内のカルシウムやcAMPを非侵襲的に計測可能なツール開発にも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

睡眠はすべての動物に普遍的にみられる生命現象であり、その神経回路や分子が明らかにされつつある。しかしこれらの実験はすべて実験室で行われたものであり、地球上の様々な環境下でみられる睡眠調節メカニズムの解明は皆無と言ってもよい。本研究では、この大きな問題に挑戦し実験室であっても自然環境下と同様な睡眠覚醒様式を示す条件を見出すことに成功した。動物には夜行性と昼行性動物が存在するが、このメカニズムが明らかになれば睡眠の普遍的メカニズムの解明にも結び付き、さらには睡眠障害の新たな治療法の開発にも結び付く事が期待される。

研究成果の概要（英文）：Recent technological developments in optogenetics have led to the identification of neural circuits that regulate various biological phenomena. In mammalian sleep research, neurons involved in the regulation of sleep and wakefulness in the laboratory captive environment have been identified. On the other hand, little research has been conducted on sleep in animals in the wild. Recently, however, it has been suggested that sleep-wake patterns in nature differ significantly from those in the laboratory. In the present study, we have succeeded in inducing nocturnal mice to shift to diurnal behavior by recreating an environment in the laboratory that mimics the natural environment. We also succeeded in developing a tool to measure calcium and cAMP in vivo noninvasively.

研究分野：時間生物学

キーワード：概日リズム 神経回路 行動リズム 睡眠 自然環境 光イメージング 光遺伝学 In vivoゲノム編集

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年の光遺伝学の技術開発により、様々な生命現象を調節する神経回路が同定されてきている。哺乳類の睡眠研究においても、実験室の飼育環境下における睡眠・覚醒調節に関わる神経細胞が同定されてきた。一方、自然界における動物の睡眠研究はほとんどなされていない。しかし、最近になって自然界における睡眠・覚醒パターンが、実験室の結果とは大きく異なる事が示唆されてきた。国際生物学賞を受賞した Dr. S. Daan (故) は、自然条件下(野外)でマウスを飼育すると、夜行性から昼行性にシフトする事を発見し (Daan et al., 2011)、その弟子であり本研究の共同研究者の Dr. R.A. Hut らは、自然環境を模した特定の条件でマウスを飼育すると、実験室であっても夜行性から昼行性へのシフトがみられることを報告した (Hut et al., 2011)。つまり、自然界と実験室内では、睡眠・覚醒調節の脳内メカニズムは異なる事が考えられる。

睡眠・覚醒や体温調節など、ほぼすべての生理機能には 24 時間を 1 サイクルとする “概日リズム” が存在し、“概日時計” がその時間的調節を担う。我々の身体を構成するすべての細胞に、概日時計は備わり、時計遺伝子の転写・翻訳を介したフィードバックループがその中心的役割を示す(図 1)。概日時計の中でも、中枢時計である「視交叉上核」はペースメーカーとして機能し、睡眠・覚醒のリズムを調節する。ヒトを含め動物は、夜間に活動する夜行性動物と、昼間に行動する昼行性動物が存在する。この夜行性・昼行性動物は行動の時間帯が昼夜逆転しているが、中枢時計である視交叉上核では、時計遺伝子発現や神経活動は同じリズムを示す。つまり、視交叉上核の概日リズム情報は、視交叉上核以外の脳領域で反転し、夜行性・昼行性が決定している事が示唆される。しかしながら、夜行性・昼行性のスイッチングに関わるメカニズムは未だ明らかにされていない

### 2. 研究の目的

本研究では、マウスを用い、自然環境下でみられる睡眠覚醒調節メカニズムを神経回路レベルで明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 近赤外発光プローブの開発

動物の行動を調節する神経回路を明らかにするためには、神経回路を破壊することなく特定の細胞からの神経活動を計測する事が必要となってくる。そこで、沖縄産ホタル発光タンパク質を用いたカルシウムおよび cAMP プローブの開発を行った。沖縄産ホタルタンパク質の N 末と C 末の間にカルモジュリン-M13 の配列または、PKA regulatory subunit を挿入し、それぞれ細胞内のカルシウムおよび cAMP を可視化する事の出来るプローブ開発を進めた。また Cre 依存的に発現するレポーターマウスの作製も進めた。

#### (2) 発光 cAMP プローブを用いた概日時計中枢における cAMP の機能解析

作製した発光 cAMP プローブを、アデノ随伴ウイルスを用いて概日時計中枢である視交叉上核のスライスに感染させ、2 週間後に発光画像を、EMCCD カメラを用いてタイムラプスイメージングを行った。得られた画像をピクセルレベルのコサインカーブフィッティングを行い、時空間パターンを、定量的に解析を行った。

#### (3) 自然環境下におけるマウスの行動評価

共同研究先において、マウスの半自然環境下における行動解析を行う予定でいたが、コロナウイルスの流行により渡航が困難となってしまった。その代わりに、自然環境を模倣した環境を実験室内で再現するシステムを構築した。

### 4. 研究成果

量子収率の高い蛍光タンパク質 (mScarlet) をスプリット型発光カルシウムプローブに結合させ、アミノ酸を削っていくことで明るい発光プローブのスクリーニングを行った。複数の変異カルシウムプローブのうちこれまでの所およそ 150% の発光輝度上昇するプローブの作成に成功した。その後、この発光カルシウムプローブ (Oki-luc-CaM) を Cre 依存的に発現可能な DNA コンストラクト (flex-Oki-luc-CaM-2A-hrGFP) を含む、トランスジェニックマウスの作成に取り掛かった。コンストラクトを含む DNA を 176 個の前核期胚に注入し、166 個の生存した胚を得た。その後、偽妊娠マウスに移植したところ、複数ラインのマウスを得ることができた。さらにその中から 2 ラインに目的の配列が入っている事を確認した。しかし、組織学的検討を行った結果、両ラインとも Oki-luc の発現はみられなかった。挿入された領域によって発現レベルが変わるため、今回作成したトランスジェニックマウスでは適切な位置に Oki-luc の配列が入っていなかったと考えられる。

沖縄産ホタルタンパク質をN末とC末に分け、その間にcAMP結合ドメイン(PKAのcAMP結合ドメイン)を挿入し、スプリット型cAMP発光プローブを作成した。発光波長はおよそ610nmで、HeLa細胞を用いて、cAMP濃度依存的に発光強度が上昇する事を確認した。さらに、HEK細胞にこのcAMP発光プローブを遺伝子導入し、フォスコリン投与により細胞レベルにおけるcAMPの上昇を、光で計測する事に成功した。さらに、概日時計中枢である視交叉上核の脳スライスを作成し、アデノ随伴ウイルスベクターを用い、cAMP発光プローブと、蛍光カルシウムプローブ、GCaMP6sを遺伝子導入し、セカンドメッセンジャーとして重要なcAMPとカルシウムの同時タイムラプスイメージングに世界で初めて成功した。フォスコリン投与において、cAMP発光プローブのみ概日リズムが消失する事を明らかにした。また、両者の時空間パターンを比較したところ、概日時計中枢の視交叉上核において、cAMPの概日リズムは全体として位相の分布が小さく、ほぼ同一位相でのパターンを示したのに対し、カルシウムの概日リズムは背側で最も位相が前進し、位相の分布も全体として幅広くなっていた。これらの事は、概日リズム振動において、cAMPとカルシウムはそれぞれ異なるメカニズムでの調節機構が存在する事を示唆している。

自然環境下における動物行動の調節メカニズムを明らかにするため、共同研究先への渡航を検討したが、コロナウイルスの影響で渡航ができなかった。そのため、実験の方針を一部変更した。渡航予定先の共同研究者が開発した、work-for-foodシステムを立ち上げた。これにより、実験室の環境でありながらも、自然環境を模倣し実験を行うことができるようになった。この実験では、マウスを回転輸入りのケージで飼育し、ある特定の回転数に応じて餌を与えるプログラムを作成した。マウスがペレットをもらうために必要な回転数を徐々に上げていくと、夜行性のマウスを昼行性にシフトする事を確認した。この結果は、自然環境下におけるマウスの行動リズムの結果と一致する。この昼行性シフトマウスを用い、全脳レベルで神経活動変化を定量化し、自然環境下で機能する神経回路の探索を進めた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計15件（うち査読付論文 15件／うち国際共著 6件／うちオープンアクセス 12件）

1. 著者名 Ono, D., Wang, H., Hung, J.C., Wang, T.H., Kon, N., Yamanaka, A., Li, Y., and Sugiyama, T.	4. 巻 9(1)
2. 論文標題 Network-driven intracellular cAMP coordinates circadian rhythm in the suprachiasmatic nucleus	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eabq7032
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.abq7032	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 Natsubori, A., Hirai, S., Kwon, S., Ono, D., Deng, F., Wan, J., Miyazawa, M., Kojima, T., Okado, H., Karashima, A., Li, Y., Tanaka, F. K., and Honda, M.	4. 巻 1(20)
2. 論文標題 Serotonergic neurons control cortical neuronal intracellular energy dynamics by modulating astrocyte-neuron lactate shuttle	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 105830
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2022.105830	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 Padlom, A., Ono, D., Hamashima, R., Furukawa, Y., Yoshimura, T., and Nishiwaki-Ohkawa, T	4. 巻 12
2. 論文標題 Level of constitutively expressed BMAL1 affects the robustness of circadian oscillations	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 19519
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-24188-4	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 Ono, D.	4. 巻 182
2. 論文標題 Neural circuits in the central circadian clock and their regulation of sleep and wakefulness in mammals	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 44932
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neures.2022.05.005	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 -

1. 著者名 Rahaman, S.M., Chowdhury, S., Mukai, Y., Ono, D., Yamaguchi, H. and Yamanaka, A.	4. 巻 15
2. 論文標題 Functional interaction between GABAergic neurons in the ventral tegmental area and serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 808754
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnins.2022.877054	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 Hung, J.C., Yamanaka, A., and Ono, D.	4. 巻 15:808754
2. 論文標題 Conditional knockout of Bmal1 in corticotropin-releasing factor neurons does not alter sleep/wake rhythm in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 808754
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnins.2021.808754	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 Nishide, S., Suzuki, Y., Ono, D., Honma, S., and Honma, K.	4. 巻 36(6)
2. 論文標題 The food-entrainable oscillator is a complex of non-SCN activity bout oscillators uncoupled from the SCN circadian pacemaker	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Rhythms	6. 最初と最後の頁 575-588
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/07487304211047937	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 Ono, D., Honma, K., Schmal, C., Takumi, T., Kawamoto, T., Fujimoto, K., Kato, Y., and Honma S.	4. 巻 11:19240
2. 論文標題 CHRONO and DEC1/DEC2 compensate for lack of CRY1/CRY2 in expression of coherent circadian rhythm but not in generation of circadian oscillation in the neonatal mouse SCN	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 19240
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-98532-5	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 Myung, J., Nakamura, T.J., Jones, R.J., Silver, R., and Ono, D.	4. 巻 15:735007
2. 論文標題 Editorial: Development of Circadian Clock Functions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 735007
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnins.2021.735007	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 Kolarski, D., Mir-Vinyals, C., Sugiyama, A., Srivastava, A., Ono, D., Nagai, Y., Iida, M., Itami, K., Tama, F., Szymanski, W., Hirota, H., and Feringa, L. B.	4. 巻 12:3164
2. 論文標題 Reversible modulation of circadian time with chronopharmacology	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 3164
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-23301-x	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 Ono, D., Honma, K., and Honma S.	4. 巻 15:650154
2. 論文標題 Roles of Neuropeptides, VIP and AVP, in the Mammalian Central Circadian Clock	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 650154
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnins.2021.650154	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 Ono Daisuke, Honma Ken-ichi, Honma Sato	4. 巻 15
2. 論文標題 Roles of Neuropeptides, VIP and AVP, in the Mammalian Central Circadian Clock	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 650154
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnins.2021.650154	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 Ono Daisuke, Mukai Yasutaka, Hung Chi Jung, Chowdhury Srikanta, Sugiyama Takashi, Yamanaka Akihiro	4. 巻 6
2. 論文標題 The mammalian circadian pacemaker regulates wakefulness via CRF neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 0384 ~ 0384
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.abd0384	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 Ono Daisuke, Honma Ken ichi, Honma Sato	4. 巻 157
2. 論文標題 GABAergic mechanisms in the suprachiasmatic nucleus that influence circadian rhythm	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Neurochemistry	6. 最初と最後の頁 31 ~ 41
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jnc.15012	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 Hung Chi Jung, Ono Daisuke, Kilduff Thomas S, Yamanaka Akihiro	4. 巻 9
2. 論文標題 Dual orexin and MCH neuron-ablated mice display severe sleep attacks and cataplexy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 54275
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.54275	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

〔学会発表〕 計14件 (うち招待講演 7件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Ono, D.
2. 発表標題 The central circadian clock regulates wakefulness via CRF neurons in the hypothalamus
3. 学会等名 Journal of Neurochemistry Mini-meet (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ono, D., Wang, H., Hung, J.C., Wang, T.H., Kon, N., Yamanaka, A., Li, Y., and Sugiyama, T.
2. 発表標題 Network-driven intracellular cAMP coordinates circadian rhythm in mouse suprachiasmatic nucleus
3. 学会等名 International Symposium on Chronogenesis (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ono, D.
2. 発表標題 Network-driven intracellular cAMP coordinates circadian rhythm in mouse suprachiasmatic nucleus
3. 学会等名 第29回日本時間生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ono, D., Hung, J.C., Yamanaka, A., and Sugiyama, T.
2. 発表標題 Network driven circadian cAMP rhythm in the mouse suprachiasmatic nucleus
3. 学会等名 NEURO2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小野大輔, Huan Wang, Chi Jung Hung, Hsin-tzu Wang, 山中章弘, Yulong Li, 杉山崇
2. 発表標題 Network-driven intracellular cAMP coordinates circadian rhythm in the suprachiasmatic nucleus
3. 学会等名 第100回日本生理学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ono, D.
2. 発表標題 Circadian output pathways from the suprachiasmatic nucleus that control sleep and wakefulness
3. 学会等名 第99回日本生理学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小野大輔
2. 発表標題 中枢概日時計細胞の同期・非同期状態と生後発達
3. 学会等名 第72回コロナおよび界面化学討論会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ono, D., Mukai, Y., Hung, C. J., Chowdury, S., Sugiyama, T., and Yamanaka A.
2. 発表標題 The central circadian clock regulates wakefulness via CRF neurons in the hypothalamus
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小野大輔, Chi Jung Hung, 杉山崇, 山中章弘
2. 発表標題 Optical recording of intracellular cAMP rhythms in the mouse suprachiasmatic nucleus
3. 学会等名 第28回日本時間生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ono, D.
2. 発表標題 The suprachiasmatic nucleus regulates wakefulness via CRF neurons in the hypothalamus
3. 学会等名 5th Asian forum on chronobiology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Daisuke Ono
2. 発表標題 Postnatal Development of the Cellular Networks in the Suprachiasmatic Nucleus.
3. 学会等名 Society for research on biological rhythms (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小野大輔
2. 発表標題 概日時計と睡眠・覚醒を繋ぐ神経回路
3. 学会等名 シナプス研究会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小野大輔
2. 発表標題 The suprachiasmatic nucleus regulates wakefulness via CRF neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus
3. 学会等名 時間生物学会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ono, D., Hung, C. J, Chowdury, S., Wang, G., and Yamanaka A
2. 発表標題 The suprachiasmatic nucleus regulates wakefulness via CRF neurons in the hypothalamus
3. 学会等名 日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>研究ユニットHP  <a href="https://daiono14.wixsite.com/circadianrhythm">https://daiono14.wixsite.com/circadianrhythm</a>          体内時計中枢における細胞内 cAMP の機能を解明  <a href="https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical_J/research/pdf/Sci_230105.pdf">https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical_J/research/pdf/Sci_230105.pdf</a>          研究ユニットHP  <a href="https://daiono14.wixsite.com/circadianrhythm">https://daiono14.wixsite.com/circadianrhythm</a>          研究室HP  <a href="http://www.riem.nagoya-u.ac.jp/4/neuroscience2/nr/">http://www.riem.nagoya-u.ac.jp/4/neuroscience2/nr/</a>          独自HP  <a href="https://daiono14.wixsite.com/circadianrhythm">https://daiono14.wixsite.com/circadianrhythm</a></p>
--

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
研究分担者	池上 啓介  (Ikegami Keisuke)  (10709330)	愛知医科大学・医学部・助教    (33920)	
研究分担者	山仲 勇二郎  (Yamanaka Yujiro)  (20528343)	北海道大学・教育学研究院・准教授    (10101)	

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			
中国	北京大学			
オランダ	University of Groningen			
ドイツ	Humboldt-Universit&#228;t zu Berlin			
米国	Center for Neuroscience	Biosciences Division, SRI International		