

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25560427

研究課題名(和文)“夜ふかし”行動はいつ決まるか

研究課題名(英文)When do we have a chance to become a night owl?

研究代表者

丹羽 康貴(Niwa, Yasutaka)

独立行政法人理化学研究所・生命システム研究センター・基礎科学特別研究員

研究者番号：40590071

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)：“夜ふかし”マウスをもちいてその行動を詳細に解析し始めたところ、Dox濃度を検討するための行動異常としては時間的にもマウスリソース的にも適切でないことが分かった。そこで同様の方法で作製した別の変異マウスをもちいてDox濃度の条件検討をおこなった。その結果、その変異マウスの表現型である体重減少と睡眠時間の減少をDox添加餌にて抑制することができた。また、それぞれ餌を変えるだけで、その表現型を抑制し、誘導し、再び抑制することにも成功した。これらの結果から得られたDox濃度条件をもとに、夜ふかし行動を抑える神経基盤がいつ決まるかを今後解析していく予定である。

研究成果の概要(英文)：Starting to examine the detail about night-owl behavior of mutant mice, I realized that it is difficult to determine the condition of Dox administration by using those mice. This is because not all the mutant mice show night-owl behavior and LD to DD light conditioning is required to examine it. So I used different mutant mice which would be controllable by Dox administration and do show less weight and less sleep phenotypes. During this research period, I succeeded in inducing and reversing those phenotypes by just Dox administration via food. Based on the condition of those results, in the future, I will analyze night-owl behavior and determine when the behavior is determined to be repressed.

研究分野：複合領域

キーワード：睡眠覚醒 Tetシステム

### 1. 研究開始当初の背景

子供の頃に規則的な就寝時刻の習慣を持つことは生物学的に重要なことなのだろうか。利便性が追求された社会で、私たちは非常に“便利な”生活を昼夜問わずに送ることができるようになった。しかし、それと期を同じくしてうつ病や気分障害といった心の病も増加し社会問題となっている。こうした問題に取り組むためには、そもそも生物が持つ1日の行動パターンの動作原理と、その発生・発達過程における成り立ちを明らかにすることが必須である。私はモデル生物としてマウスを選び、1日の中に見られる行動パターンと、そのパターンを形成する神経回路に注目し研究を行ってきた。その過程で、遺伝学的にラベルされた特定の神経細胞からの情報伝達を生まれつき阻害する実験を行い、いくつかの行動パターン異常を示す変異マウスを作製してきた。その中の1つが、明暗条件下では規則的な就寝時刻を持つにもかかわらず、明暗情報が無くなるとそれが遅延するようになった“夜ふかし”マウスである。このマウスには、薬剤誘導性にその阻害状態を解除する仕組みを遺伝学的に持たせているため、発生・発達過程において時期依存的にその神経を阻害する実験を行うことが可能である。

### 2. 研究の目的

本研究では、この変異マウスが Tet-off システムによってテタヌストキシン発現誘導していることを利用して、“夜ふかし”行動とそれを引き起こす神経回路との間で、“いつ”情報伝達が行われることが重要なのかを、時期依存的な神経活動阻害実験を行うことで明らかにする。

### 3. 研究の方法

まず上記変異マウスの行動異常を制御できるドキシサイクリン(Dox)濃度を決定する。次に、最適な濃度の Dox をもちいて、テタヌストキシンによる神経伝達阻害からどれくらいの時間において行動異常が現れるのかを調べる。(1) 神経伝達阻害がすぐに行動異常につながる場合は、1日のどの時刻での阻害によって行動異常が現れるのかを調べる。具体的には免疫組織化学によるそれら神経活動パターンの検索によって予想し、DREADD 法をもちいて、実際にその時刻での神経不活性化を行い、行動異常が現れることを証明する。(2) 神経伝達阻害がすぐに行動異常につながらな

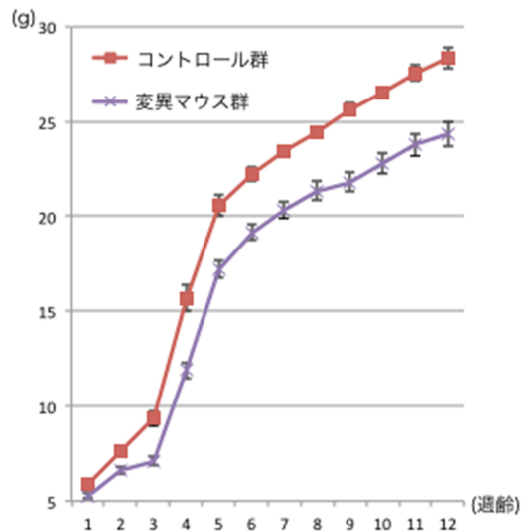
い場合は、発生・発達期の影響が考えられるので、どの時期の神経伝達阻害が行動異常をもたらしたのかを調べる。具体的には発生・発達期において Dox の投与期間を調整することにより、テタヌストキシンにさらされる期間を作る。その期間を変えることで、成体になってからの行動異常の発現がどう変わるかを調べる。

### 4. 研究成果

本研究では、まず上記変異マウスをもちいて Dox 濃度の条件検討を試みるために、夜ふかし行動を詳細に調べた。その結果、同じ遺伝子型をもつマウス個体間でさえ、夜ふかし行動を示す割合が半数以下であることが分かった。また、夜ふかし行動を調べるためには、2週間程度の明暗同調をおこなった後で恒暗条件にマウスをさらす必要があることも分かった。このような条件で行動異常を制御するための Dox 濃度を検討するのは、時間的にもマウスリソース的にも適切ではないと判断した。

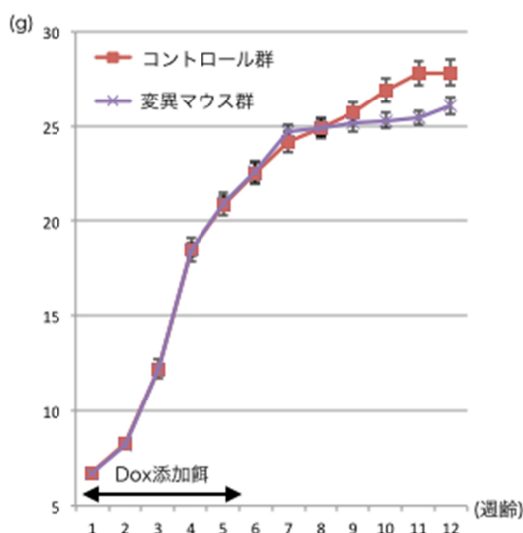
そこで、Tet-off システムによってテタヌストキシン発現誘導可能なシステムをもちいて、“夜ふかし”マウスとは異なる神経細胞群の情報伝達を阻害するマウスを作製し直した。それらのマウスの中で、変異マウス群がコントロールマウス群よりもひと回り小さい系統を見出した。その系統のマウスの体重変化を調べてみると、生後3~4週齢から変異マウス群で体重が減少していることが分かった(図1)。

図1 新たに作製した変異マウスとその体重増加



そこでその変異マウスをもちいて Dox 濃度の条件検討をおこなった。5ppm から 200ppm までの Dox 濃度の餌を生まれる前から与え続け、変異マウス群の体重減少の有無をもとに条件検討をおこなった。これらの検討はマウス生後 1 ヶ月以内に完了するため、それほど時間をかけずに Dox 濃度の条件検討が可能である。その結果、上記の範囲で Dox 添加餌を仮親に与え続けられれば、変異マウス群の体重減少を抑えることができた (図 2)。

図2 発達期のDox添加餌による体重減少の抑制



また、Dox 濃度を高くすると、Dox による抑制効果が抜けるまでに時間がかかることが明らかになった。

次に、Dox 添加餌によるマウスの行動制御が可能かどうかを調べるために、上記の体重減少マウスについて、その行動を赤外線で 24 時間測定した。その結果、そのマウスは過活動であり、睡眠時間が少なくなっている可能性が示唆された。

そこで、上記の体重減少マウスについて、その睡眠覚醒時間を測定した。その結果、そのマウスの睡眠時間は大きく減少している、いわゆる不眠マウスであることが分かった。

つまり上記の体重減少マウスは、身体的な変化だけでなく、その行動パターンにも異常も示しているため、Dox 添加餌による行動制御が可能かどうかを確かめるための条件検討に使用することが可能である。またそれらの表現型は、通常の明暗飼育条件下で観察されるため、“夜ふかし”行動を検出する際に必要であった恒暗条件も必要なく、測定しやすいという利点もあった。

そこで実際に、5ppm から 200ppm までの異なる 5 つの Dox 濃度をもちいて、Dox 添加餌の投与によるその変異マウスの睡眠覚醒時間の制御を試みた。その結果、睡眠覚醒時間の変化を抑制するための Dox 最低濃度と、Dox 投与をやめてからその変化を誘導するために必要な期間を明らかにすることができた。

さらに、Dox 添加餌から普通餌に変えて睡眠時間が大きく減少した変異マウスに、再度 Dox 添加餌を投与し直すことによって、誘導された睡眠覚醒時間の変化を元通りに回復させることにも成功した。このことは、当初の目的とは少し異なる方向性ではあったが、餌の種類を変えるだけで睡眠覚醒時間の変化を誘導し、元に戻すこともできるということを確認めた画期的な成果である。体重減少は 3 週齢頃から明らかのため、行動異常についても同時期から変化している可能性が高い。現状では離乳以前のマウスの行動を詳細に解析する方法が確立していないため、成体での解析となってしまいが、今後それらのマウスを非侵襲的に測定する方法が確立すれば、これまでアプローチが難しかった発達期の回路形成とそれがもたらす行動制御について研究することも可能である。

本研究によって、Tet-off システムをもちいてテタヌトキシンを特定の神経細胞に発現誘導することで、体重という身体的形質と、睡眠覚醒という行動パターンの両方を、Dox 添加餌だけで非侵襲的に制御できることが分かった。これらの結果から得られた条件をもとに、夜ふかし行動を抑える神経基盤がいつ決まるかを今後解析していく予定である。また本研究で Dox 濃度の条件検討に用いた不眠マウスについても、今後詳細な解析を進めていく予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

丹羽康貴

シエスタ行動はいつ決まるか

H25 年度研究奨励ファンド報告会

2015 年 1 月 14 日

理化学研究所和光キャンパス (埼玉県・和光市)

丹羽康貴

昼間の眠気はなぜ生じるのか

定量生物の会年会

2015年1月11日~12日  
九州大学筑紫キャンパス（福岡県・春日市）

丹羽康貴

1日の行動パターンを決定する細胞機構の探索

定量生物の会年会

2013年11月23日~24日

大阪大学吹田キャンパス銀杏会館（大阪府・吹田市）

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

丹羽 康貴 (Niwa Yasutaka)

独立行政法人理化学研究所・生命システム

研究センター・基礎科学特別研究員

研究者番号：40590071