

個々の中枢概日時計ニューロンの生体内での活動リズムの解析

In vivo analysis of neural activity rhythms of individual central circadian clock neurons

(日本生理学会推薦)

代表研究者	金沢大学	三枝 理博	Kanazawa University	Michihiro MIEDA
協同研究者	金沢大学	前島 隆司	Kanazawa University	Takashi MAEJIMA
	金沢大学	津野 祐輔	Kanazawa University	Yusuke TSUNO

The suprachiasmatic nucleus (SCN) functions as the central circadian pacemaker in mammals and entrains to the environmental light/dark cycle. It is composed of multiple types of GABAergic neurons, and interneuronal communications among these neurons are essential for the circadian pacemaking of the SCN. To understand the principles underlying the SCN network, we took an approach of neuron type-specific genetic manipulations within the SCN and demonstrated that arginine vasopressin (AVP)-producing GABA neurons, which form one of the major neuron types in the SCN, play a critical role in the generation of circadian behavior rhythm and the determination of the circadian period by the SCN network. In the current study, as the next step, we aimed to record the activities of SCN neurons in vivo in a neuron-type-specific manner from both normal and mutant mice with impaired circadian rhythms. By doing so, we expected to uncover the linkage between the abnormalities of the SCN neural network and behavior rhythms. An outcome of such efforts is the finding that GABAergic transmission from AVP neurons regulates the timing of SCN output from the SCN cellular clocks to control when to wake and locomote.

研究目的

哺乳類の概日（サーカディアン）リズム制御中枢は視床下部・視交叉上核である。視交叉上核は中枢概日時計として機能して全身に時刻の情報を送り、様々な生体機能を調節する。概日時計システムは、地球の自転に伴う 24 時間周期の昼夜変化を予測して行動や体内環境を最適化するために進化した。一方現代社会では、時差や夜間勤務、生活習慣の乱れにより、概日リズムの変調は誰にでも起こりうる問題である。これは睡眠障害のみならず、気分障害、肥満・メタボリックシンドローム、がん等、様々な疾患・健康障害のリスクを増大する。したがって、概日リズム発振のメカニズムを理解し、概日リズム変調の効果的な予防方法・対処方法を見つけることは、大変重要である。

視交叉上核は約 2 万の神経細胞よりなる神経ネットワークである。哺乳類の概日リズム制御中枢・視交叉上核（SCN）は約 2 万のニューロンにより構成される。単離された個々のニューロンは位相もばらばらで不安定な概日振動を示す点で、線維芽細胞などの末梢細胞と何ら変わらない。多種・多数の時計ニューロンから成る、強固で安定な概日振動を発振する神経ネットワークの構築こそ、SCN のみに見られる特異な性質であるが、その動作原理は殆ど分かっていない。

本研究では、SCN の主要なニューロンタイプ、AVP (arginine vasopressin) 産生ニューロンと VIP (vasoactive intestinal peptide) 産生ニューロンについて、各々を特異的に、その神経活動の概日リズムを in vivo で測定する。正常マウスだけでなく、代表研

研究者がこれまでに作成した、概日リズム異常を示す遺伝子操作マウスについても測定を行う。このアプローチにより神経ネットワークの異常と行動リズムの異常を結びつけることができれば、SCN 神経ネットワークの原理解明に向け、重要な手がかりが得られる。

研究経過

① SCN ニューロンのニューロンタイプ特異的な in vivo マルチニューロン記録

当初の計画は以下の通りであった。Cre 発現細胞のみでチャンネルロドプシン2 (ChR2) を発現するトランスジェニックマウスと、ニューロンタイプ特異的 Cre 発現マウス) を交配し、AVP ニューロン、あるいは VIP ニューロンに特異的に ChR2 を発現させる。このマウスに麻酔を施し、脳定位固定装置に固定した上で、SCN にシリコンプローブ電極 (多点電極)・光ファイバーアセンブリを挿入、短時間青色光照射による発火頻度上昇を指標として AVP/VIP ニューロン (=ChR2 発現ニューロン) を同定した上で、神経活動の多チャンネル記録を行い、記録したデータはスパイク・ソーティングにより個々のニューロンの活動に分離する。

記録装置を導入し、シリコンプローブ電極を用いた麻酔下での in vivo 神経活動記録を試みた。神経活動記録自体は上手く行うことに成功した。しかしながら、SCN からの記録は、多くの試行を行ったが、未だ成功していない。SCN は長径 1mm にも満たない微小な神経核であり、脳定位固定装置を用いても、in vivo で SCN に電極を挿入することが非常に難しいためである。様々な細かい工夫を行い、現在も粘り強くチャレンジし続けている。

② ファイバーフォトメトリーを用いた SCN ニューロンのニューロンタイプ特異的な細胞内 Ca^{2+} の in vivo 計測

①の方法では、個々の SCN ニューロンの発火を記録できる点が魅力があるが、技術的に難易度が高いので、他のアプローチも平行して行った。ファイバーフォトメトリーは、脳内に挿入した光ファイバーを介し励起光照射・蛍光測定する手法である。Cre 依存発現 AAV ベクターとニューロンタイプ特異的 Cre

発現マウスを用いて、 Ca^{2+} センサー蛋白質 jGCaMP7s を SCN の AVP ニューロンや VIP ニューロンに特異的に発現させた。これらのマウスからファイバーフォトメトリーを用いて、各ニューロンタイプの細胞内 Ca^{2+} 変動 ($[Ca^{2+}]_i$) を in vivo で長期間測定することに成功した。どちらのニューロンも、明暗条件下、恒常暗条件下共に、明瞭な $[Ca^{2+}]_i$ 概日リズムを示した (図1) (未発表)。しかし興味深いことに、 $[Ca^{2+}]_i$ リズムのピーク時刻は両タイプのニューロンで明らかに異なった。ファイバーフォトメトリーは個々のニューロンの活動ではなく、蛍光センサータンパク質 (ここでは jGCaMP7s) を発現するニューロン集団の活動しか計測できないが、十分に有用な情報を得ることができる。in vivo マルチニューロン記録に比べれば比較的簡便ではあるが、自由行動下マウスの SCN などの脳深部の微小な神経核から長期的に計測を行うのは容易ではない。

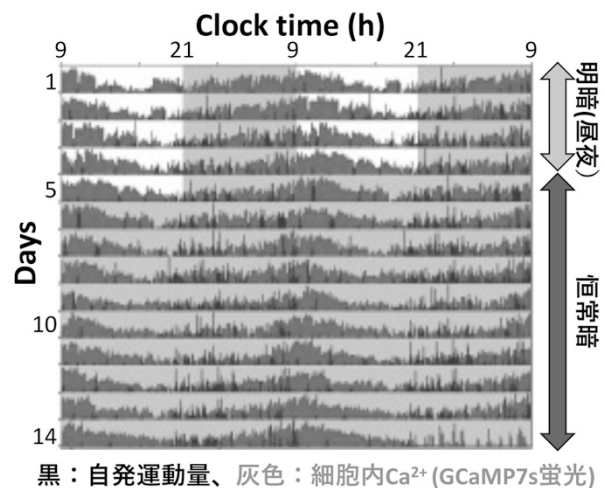


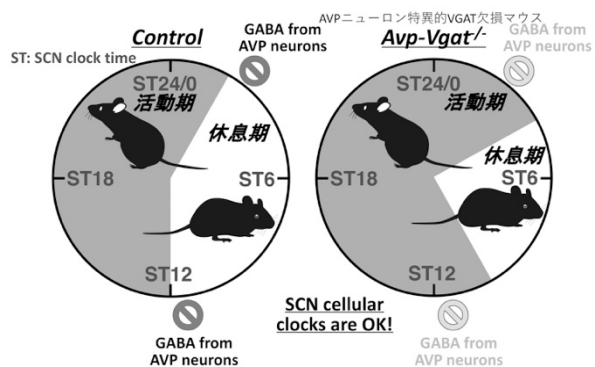
図1 SCN AVP ニューロンの細胞内 Ca^{2+} の in vivo 長期計測

③概日リズム異常マウスでの SCN ニューロン $[Ca^{2+}]_i$ リズムの in vivo 計測

②で立ち上げたファイバーフォトメトリーの系を、我々がこれまでに作成してきた概日リズム異常マウスに適用し、行動リズム異常の神経基盤を明らかにすることを目指した。様々な系統で計測を行ったが、ここでは一例を挙げる。

AVP ニューロンを含め、SCN のほぼ全てのニューロンは GABA を含有するが、SCN 神経ネットワークにおける GABA の機能については、未だ明らかにな

っていない。そこで AVP ニューロンの伝達物質としての GABA の役割を明らかにするために、AVP ニューロン特異的に小胞 GABA トランスポーター (VGAT: GABA のシナプス小胞放出に必要) を欠損したマウス (*Avp-Cre; Vgat^{flx/flx}*) を作成し、解析を進めてきていた。*Avp-Cre; Vgat^{flx/flx}* マウスの概日行動リズムは、活動時間 (活動期の長さ) が5時間以上延長し、リズム分割様の表現型を示した。このような行動リズム異常にもかかわらず、スライスでの時計遺伝子レポーターPER2::LUC 発光リズムなど、時計遺伝子を基盤とした概日時計の分子機構 (細胞時計) は、SCN においてほぼ正常であった。しかし、SCN の細胞時計に対し、行動リズムの活動期開始の位相は前進し、終了位相は後退していた。そこで、ファイバーフォトメトリーを用いて SCN AVP ニューロンの $[Ca^{2+}]_i$ リズムを計測したところ、*Avp-Cre; Vgat^{flx/flx}* マウスでは AVP ニューロンの $[Ca^{2+}]_i$ リズムと行動リズムの位相関係が、*in vivo* でも明らかに異常になっていることを明らかにすることができた。したがって、AVP ニューロンによる GABA 作動性神経伝達は、SCN 中枢概日時計から行動への出力のタイミングを制御し、マウスがいつ起きて動き回るかを調節すると考えられた (図2)。以上の結果は、



他のデータと共に論文にまとめ、現在投稿中である。

図2 AVP ニューロンによる GABA 作動性神経伝達は、SCN 中枢概日時計から行動への出力のタイミングを制御し、マウスがいつ起きて行動するかをコントロールする

考察

SCN からの *in vivo* マルチニューロン記録は想像以上に難しいことが分かった。問題は、「以下に SCN

に電極を挿入するか」であり、今後も様々な工夫を重ね、粘り強く取り組んでいきたい。一般的には、神経の発火頻度と $[Ca^{2+}]_i$ 相関するとされ、 Ca^{2+} センサーを用いて神経活動の計測がしばしば行われている。しかしながら SCN ニューロンでは、発火に伴う細胞外からの Ca^{2+} 流入だけではなく、細胞内 Ca^{2+} ストア由来の Ca^{2+} が $[Ca^{2+}]_i$ に大きく寄与することが知られており、発火頻度と $[Ca^{2+}]_i$ は必ずしも相関しない。 $[Ca^{2+}]_i$ 概日リズムは発火頻度リズムに先行しえする。したがって、両者を別の細胞活動指標として測定する必要があるので、*in vivo* マルチニューロン記録を成功させたいと考えている。

一方で、ファイバーフォトメトリーにより、ニューロンタイプ特異的な *in vivo* $[Ca^{2+}]_i$ リズム計測に成功した意義は大きい。「研究経過」で述べたように、概日リズム異常を示すマウスの SCN の活動を *in vivo* で解析するのに力を発揮しており、今後も様々なマウスシステムに適用していく。また、 Ca^{2+} だけでなく、時計遺伝子発現、膜電位、GABA、ドーパミンなど、さまざまな蛍光センサータンパク質が開発されている。多様なセンサータンパク質を SCN にニューロンタイプ特異的に発現させ、ファイバーフォトメトリーで生体内でその日内変動を計測することで、中枢時計・SCN 神経ネットワークの動態を多層的に解析することが可能であり、今後行っていきたい。

将来的には、本研究で確立した *in vivo* 計測技術を、概日リズム異常を示すことが知られている様々な疾患モデルマウス (肥満、老化、アルツハイマー、うつ、等など) にも適用し、これらのモデルで中枢体内時計 SCN がどのような異常を来しているのか、明らかにしていきたい。

研究の発表

口頭発表

1. 三枝理博. 中枢概日時計神経ネットワークの遺伝学的解析. 第26回日本時間生物学会学術大会, 金沢, 2019.10.
2. 三枝理博、長谷川恵美、津野祐輔、前島隆司. GABAergic transmission of AVP neurons regulates correctly timed output of the central circadian pacemaker of the SCN. 第42回日本神経科学大会, 新潟, 2019.8.

3. 三枝理博. 哺乳類中枢概日時計の神経メカニズム. 明治大学現象数理学共同研究集会, 東京, 2019.3.
 4. 三枝理博. サーカディアンペースメーカーの神経機構. 第41回日本神経科学大会, 神戸, 2018.8.
 5. 三枝理博. 中枢概日時計におけるバソプレシンニューロンの機能. 第43回日本睡眠学会定期学術集会, 札幌, 2018.7.
 6. Mieda M. Genetic dissection of neural mechanisms underlying the central circadian pacemaker, Sapporo Symposium on Biological Rhythm in 2018, Sapporo, 2018.7.
 7. 三枝理博. 視交叉上核の中枢概日時計におけるAVPニューロンの役割. 第95回日本生理学会, 高松, 2018.3.
- 誌上発表
1. Mieda M. The central circadian clock of the suprachiasmatic nucleus as an ensemble of multiple oscillatory neurons. *Neurosci Res*, in press.
 2. Mieda M. The Network Mechanism of the Central Circadian Pacemaker of the SCN: Do AVP Neurons Play a More Critical Role Than Expected? *Front Neurosci* 13, 139 (2019).
 3. 三枝理博. 概日時計と睡眠. 生体の科学 71, 18-22 (2020)
 4. 三枝理博. 中枢概日時計の神経生理学的基盤の解明. *ブレインサイエンスレビュー* 2018, 307-326 (2018).