

令和元年6月4日

## 睡眠覚醒調節における伝達物質の役割を解明

名古屋大学環境医学研究所の山中章弘教授らの研究グループは、新潟大学の崎村建司教授、阿部学准教授、東京大学の尾藤晴彦教授、京都大学の今吉格教授、自治医科大学の犬束歩助教らとの共同研究によって、新しい遺伝子改変動物を用いて、睡眠覚醒調節に重要な視床下部のオレキシン産生神経（オレキシン神経）に化学遺伝学による神経活動操作を適用し、オレキシンとそれ以外の神経伝達物質の睡眠覚醒調節における役割について明らかにしました。

本研究は、国立研究開発法人科学技術振興機構（JST）の大型プロジェクトであるCREST「ファイバーレス光遺伝学による高次機能を支える本能機能の解明」及び独立行政法人日本学術振興会（JSPS）新学術領域研究「脳情報動態を規定する多領野関連と並列処理」による支援を受けています。

本研究成果は、2019年6月4日付け（日本時間16時）米国科学雑誌「eLife」電子版に掲載されました。

## ポイント

○覚醒維持に重要なオレキシン神経は、オレキシン以外に、グルタミン酸、ダイノルフィンなどを産生し、神経伝達物質として遊離するが、睡眠覚醒調節におけるオレキシンと他の伝達物質の役割の違いについては十分に分かっていなかった。

○オレキシン神経だけに DNA 組換え酵素である Flippase を発現する遺伝子改変マウスを新たに作成し、化学遺伝学<sup>\*1</sup>を用いたオレキシン神経活動の持続的な操作を適用することで、睡眠覚醒調節におけるオレキシンの機能と、オレキシン以外の伝達物質の機能について解析した。

○オレキシン以外の伝達物質も睡眠覚醒調節に重要であるが、脱力発作はオレキシンがないと抑制できないことが明らかになった。

## 1. 背景

・覚醒を維持できずにどこでも眠ってしまう睡眠障害「ナルコレプシー」は、思春期に免疫細胞によってオレキシン神経が攻撃されて特異的に脱落することによって発症する。そのため、オレキシン神経が覚醒の維持に極めて重要な役割を持つことが知られていた。

・オレキシン神経はオレキシン以外に、興奮性伝達物質のグルタミン酸、オピオイドペプチドであるダイノルフィンなどを産生し、これらも同時に神経伝達物質として遊離するために、睡眠覚醒調節におけるオレキシンと他の伝達物質の役割の違いについては十分に分かっていなかった。

・オレキシン神経だけに DNA 組換え酵素である Flippase を発現する遺伝子改変マウスを新たに作成し、オレキシン神経活動の持続的な操作を適用することで、睡眠覚醒調節におけるオレキシンの機能とオレキシン以外の伝達物質の機能について解析を行った。

## 2. 研究成果

睡眠覚醒調節において、オレキシンと他の伝達物質との生理的役割の違いを解明するために、オレキシン神経特異的に DNA 組換え酵素である Flippase を発現する遺伝子改変マウス(Orexin-Flip マウス)を新たに作成し、睡眠覚醒調節におけるオレキシンの機能とオレキシン以外の伝達物質の機能について解析した。オレキシン遺伝子の存在する遺伝子領域に Flippase を挿入することでオレキシン神経特異的な Flippase の発現を制御することができた。Flippase リコンビナーゼ<sup>\*2</sup>は、Cre リコンビナーゼと異なる配列を認識して組換える酵素であるため、Orexin-Flip マウスと様々な Cre マウスを交配させることで、オレキシン神経と Cre 発現神経にそれぞれ別々の遺伝子の発現を制御できる。また、Orexin-Flip ホモマウスは、オレキシンを作れないオレキシン欠損マウスとなるため、ナルコレプシーの症状である睡眠覚醒の分断化、脱力発作などの症状が現れる。

オレキシンを産生できないオレキシン神経に対して、神経の電気活動を記録できる電気生理学的解析を適用したところ、細胞体が若干膨大しており、神経活動頻度が低下していることを見出した。さらに、睡眠覚醒調節におけるオレキシンとオレキシン以外の伝達物質の機能について明らかにするために、オレキシンを産生できないオレキシン神経を化学遺伝学を用いて活性化させると、覚醒の持続、ノンレム睡眠とレム睡眠の抑制などの機能は回復することが明らかになった。しかし、脱力発作は抑制されず、むしろ、頻度が増加した。これらのことから、オレキシン以外の伝達物質も覚醒の維持に重要な役割を担っているが、脱力発作の抑制にはオレキシンが必須であることが明らかになった。

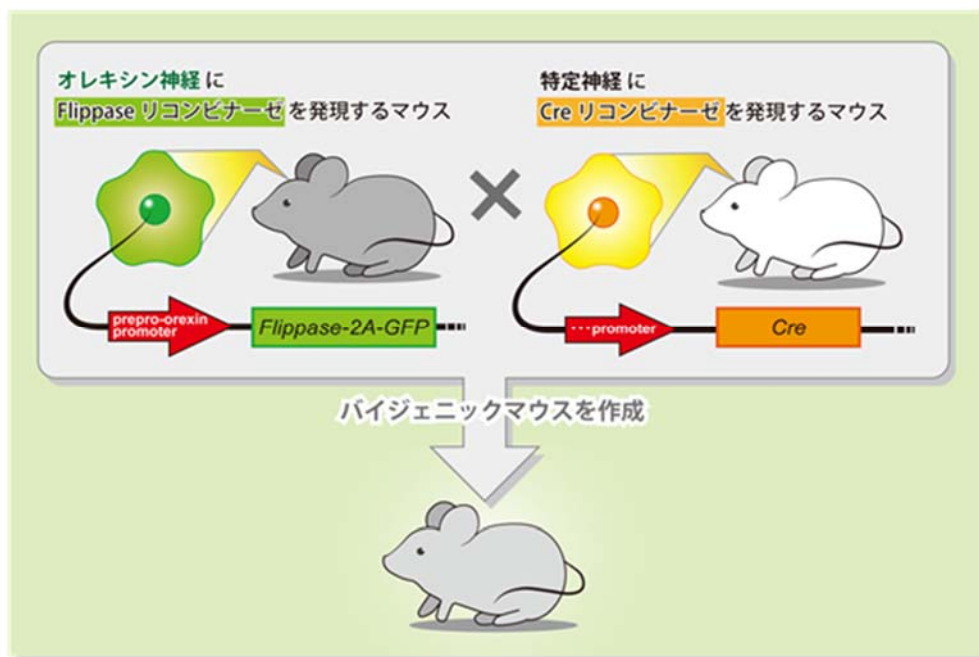


図 1 オレキシン神経に Flippase リコンビナーゼを発現するマウスと、特定神経に Cre リコンビナーゼを発現するマウスを交配させてバイジェニックマウスを作成することで、それぞれの神経に異なる遺伝子を発現誘導させることが可能となり、オレキシン神経と特定神経との機能連関について解析が加速する。



図 2 オレキシンを欠損すると、睡眠覚醒の分断化や脱力発作などナルコレプシーの症状が現れる。オレキシンを産生できないオレキシン神経を活性化させて、オレキシン以外の伝達物質を遊離させると、睡眠覚醒の異常は改善されるが、脱力発作については改善されなかった。

### 3. 今後の展開

・Orexin-Flip マウスを用いることで、オレキシン神経と他の神経との機能連関について詳細な解析が容易になるため、睡眠覚醒調節に関わる神経回路機能の解明に繋がることが期待される。

・ナルコレプシーにおける脱力発作の抑制にはオレキシンが必須であることが明らかになったため、ナルコレプシーの病態の理解が進んだ。

### 4. 用語説明

1. 化学遺伝学：特定の化学物質によって活性化される人工受容体を標的神経だけに発現させ、標的神経の活動を特定の化学物質を用いて長時間制御する実験技術
2. Flippase リコンビナーゼ：34bpのDNA配列であるFRTを認識して組み換える組換え酵素のひとつ。遺伝子発現制御のために、よく使われているCre リコンビナーゼが認識するloxP配列とは異なる配列を認識して組換えるため、Cre リコンビナーゼとの併用によって、異なる遺伝子の発現を制御することが可能となる。

### 5. 発表雑誌

雑誌名：eLife (2019年6月4日付け(日本時間16時))の電子版に掲載)

論文タイトル：Dissociating orexin-dependent and -independent functions of orexin neurons using novel Orexin-Flp knock-in mice

著者：Srikanta Chowdhury<sup>1,2,3,#</sup>, Chi Jung Hung<sup>1,2,3</sup>, Shuntaro Izawa<sup>1,2,3</sup>, Ayumu Inutsuka<sup>1</sup>, Meiko Kawamura<sup>4</sup>, Takashi Kawashima<sup>5</sup>, Haruhiko Bito<sup>5</sup>, Itaru Imayoshi<sup>6</sup>, Manabu Abe<sup>4</sup>, Kenji Sakimura<sup>4</sup> and Akihiro Yamanaka<sup>1,2,3\*</sup>

所属：1Department of Neuroscience II, Research Institute of Environmental Medicine, Nagoya University, Nagoya 464-8601, Japan

2Department of Neural Regulation, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya 466-8550, Japan

3CREST, JST, Honcho Kawaguchi, Saitama 332-0012, Japan

4Brain Research Institute, Niigata University, Niigata 950-2181, Japan

5Department of Neurochemistry, The University of Tokyo Graduate School of Medicine, Tokyo, Japan

6Graduate School of Biostudies, Kyoto University, Kyoto 606-8501, Japan

DOI：10.7554/eLife.44927

English ver.

[https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical\\_E/research/pdf/eLife\\_1\\_20190604en.pdf](https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical_E/research/pdf/eLife_1_20190604en.pdf)