

氏 名 常松 友美

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第 1444 号

学位授与の日付 平成 23 年 3 月 24 日

学位授与の要件 生命科学研究科 生理科学専攻
学位規則第 6 条第 1 項該当

学位論文題目 Sleep/wakefulness regulation by controlling the activity
of orexin neurons using optogenetics

論文審査委員 主 査 教授 南部 篤
教授 富永 真琴
教授 鍋倉 淳一
研究部長 裏出 良博

大阪バイオサイエンス研究所

論文内容の要旨

Sleep is one of instinctive behaviors and is widely conserved physiological phenomenon not only in vertebrates but also in invertebrates. Sleep is believed to be a physiologically essential behavior to maintain of brain function and life since sleep deprivation for a few days results in death. Additionally, humans spend approximately one third of our lifetime to sleep. Nevertheless, regulatory mechanism of sleep is not completely understood so far. In the present study, to clarify the importance of the activity of orexin-producing neurons in the regulation of sleep/wakefulness, the author incorporated a novel technology 'optogenetics'. She generated two different transgenic mice lines used for optogenetics. Especially, she focused on the relationship between the activity of orexin neurons and human sleep disorder 'narcolepsy' (chapter I). She revealed that neuronal circuit involved in sleep/wakefulness regulation (chapter II) using these transgenic mice.

Chapter I: Sleep/wakefulness regulation by controlling the activity of orexin neurons using *orexin/Halo* transgenic mice

Orexin neurons have a crucial role in the regulation of sleep and wakefulness. Animals that lack the orexin neurons show phenotypes remarkably similar to that of the human sleep disorder, narcolepsy. Recent *in vitro* electrophysiological studies revealed the afferents to and efferents from orexin neurons. However, it is not completely understood how their activity induces wakefulness *in vivo*. To help determine how these neurons promote wakefulness, She generated transgenic mice in which orexin neurons expressed halorhodopsin, an orange light-activated chloride ion pump. Immunohistochemical analysis revealed that 94% of orexin-immunoreactive neurons specifically express halorhodopsin. Slice patch clamp recordings of orexin/halorhodopsin neurons demonstrated that photic illumination reduced orexin neuron discharge. Acute silencing of orexin neurons *in vivo* by illuminating orange light into the hypothalamus decreased electromyogram (EMG) power and increased slow wave components of electroencephalogram (EEG) power suggesting that the mice showed slow wave sleep (SWS). Photic illumination-induced SWS was time-of-day dependent, indicating that activation of orexin neurons is necessary for wakefulness during the light period. Although the discharge of dorsal raphe (DR) serotonergic neurons, which receive orexin neuronal excitatory input, was gradually reduced to almost the same level of SWS during acute photic inhibition of orexin neurons, DR serotonergic neurons exhibited normal discharge rates in mice lacking orexin neurons during either sleep or wakefulness. These results indicate that serotonergic DR neuronal activity is usually highly dependent on

orexin neuronal activity but can be regulated appropriately in the chronic absence of orexin input. This difference between acute vs. chronic reduction in orexin input may underlie the progression of symptomatology in narcoleptic patients.

Chapter II: Sleep/wakefulness regulation by controlling the activity of orexin neurons using *orexin/Arch* transgenic mice

Orexin neurons have a crucial role in the regulation of sleep and wakefulness. Recent *in vitro* electrophysiological studies revealed the afferents to and efferents from orexin neurons. However, it is not completely understood how their activity induces wakefulness *in vivo*. To help determine how these neurons promote wakefulness, She generated transgenic mice in which orexin neurons expressed archaerhodopsin-3, a yellow-green light-activated proton pump. Immunohistochemical analysis revealed that about 80% of orexin-immunoreactive neurons specifically express archaerhodopsin-3. Slice patch clamp recordings of *orexin/archaerhodopsin-3* neurons demonstrated that repetitive and long-lasting photic illumination is able to silence the activity of most of orexin neurons. Acute silencing of orexin neurons *in vivo* by illuminating yellow-green light for 1 min into the hypothalamus induced slow wave sleep (SWS) in the light period, but failed in the dark period. This result showed a good agreement with the result obtained from Halo transgenic mice. To confirm that photic inhibition of orexin neurons failed to induce SWS in the dark period is not caused by insufficient inhibition of orexin neurons, She performed immunohistochemical study. c-Fos, a marker for activation of neurons, and orexin was stained. Continuous photic inhibition of orexin neurons for 2 hr significantly decreased c-fos expression in the orexin neurons in the dark period compared with without photic inhibition. Although photic illumination certainly silenced the activity of orexin neurons *in vivo*, photic inhibition of orexin neurons failed to induce SWS in the dark period. These results might suggest a necessity of sleep pressure to induce SWS. To study the effect of sleep pressure, mice were sleep deprived for 3 hr before the experiments. The mice receiving sleep deprivation for 3 hr showed SWS by photic inhibition of orexin neurons even in the dark period. These results suggest that not only the cessation of the activity of orexin neurons but also the homeostatic sleep pressure is critical factors to induce SWS in mice.

睡眠は脳の機能を維持するのに必須な生理現象であり、ヒトは人生の約1/3を睡眠に費やすにも拘らず、それを調節する神経機構については未だによく分かっていない。これは、睡眠覚醒が全ての神経ネットワークが保存された動物個体でのみ生じる生理現象であり、実験対象として動物個体を扱う困難さに起因している。本研究では、近年新しく開発された光遺伝学を用い、光によって神経活動を抑制する分子であるハロロドプシンおよびアーキロドプシンを、睡眠覚醒調節に重要な働きを持つと考えられる視床下部のオレキシン神経細胞に特異的に発現させ、*in vivo*においてその神経活動を光で制御することを試みた。その結果、表出する睡眠覚醒を詳細に解析することによって、睡眠覚醒を調節する神経機構に関して、以下の点が明らかとなった。

- 1) 光によって活性化され神経活動を抑制する分子であるハロロドプシンやアーキロドプシンは、これまでウイルスを用いて細胞に発現させる手法が主であり、遺伝子改変マウスにおいてこれらの分子を特定の神経に発現させた例は無かった。本研究では、オレキシン神経にこれらの分子を発現する遺伝子改変マウス系統の確立に成功した。さらに、スライスパッチクランプを用いた解析の結果、特定の波長の光を照射することによってオレキシン神経活動を抑制出来ることを示した。
- 2) オレキシン神経細胞を活性化すると、覚醒が導かれることが先行研究で分かっていたが、逆に抑制するとどうなるかについては不明であった。本研究では光ファイバーを用いた光刺激装置を開発し、意識下自由行動下においてマウスの視床下部に光照射を行った。その結果、マウスの非活動期である明期にオレキシン神経活動を光で抑制すると、徐波睡眠が誘導されることが分かった。また、その時、覚醒中枢のひとつである縫線核セロトニン神経細胞の活動を同時記録すると、徐波睡眠誘導と同期して低下することを見いだした。
- 3) しかしながら、マウスの活動期である暗期において同様にオレキシン神経活動を抑制しても、徐波睡眠は誘導されなかった。この現象は、ハロロドプシンよりも強力かつ持続的にオレキシン神経を抑制することが出来るアーキロドプシンを発現するトランスジェニックマウスにおいても再現された。これらのことから、オレキシン神経活動は覚醒に必須ではなく、むしろ覚醒の維持に重要であることが明らかとなった。

本研究では、自由行動下の動物個体においてオレキシン神経活動のみを人為的に操作する方法を開発することによって、オレキシン神経活動は覚醒の維持に重要であることが明らかとなった。手法の斬新さ、得られた結果の重要性などから、本研究が学位論文としてふさわしいものであると結論された。