

## 蛍光 live imaging による睡眠覚醒機構の解明

石井 亮 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 柳沢 正史 (筑波大学 医学医療系)

### 【背景と目的】

睡眠はすべての動物に見られる普遍的な生理現象であり、身体の休息のみならず記憶の形成や神経系の機能の維持にも関わることが示唆されている。しかし、その機能的意義や根本的なメカニズムは依然未解明な点が多い。現在、皮質下に局在する睡眠・覚醒の調節に関与する神経核の機能は明らかになりつつあるものの、それらの神経核のニューロンの投射先であり、睡眠の発生要因でもあり最大の受益者でもある大脳新皮質における睡眠覚醒に伴う神経活動は不明なままである。そもそも睡眠は大脳皮質の神経活動を反映する脳波により定義されており、その脳波により脳の状態は覚醒、rapid eye movement (REM)睡眠、non-REM (NREM)睡眠に分類される。睡眠とは何かという根源的な問題の解決には、睡眠・覚醒に伴う大脳新皮質の神経活動を詳細に調べることが必要不可欠である。

睡眠・覚醒は脳全体の状態遷移であり、多数のニューロンの振る舞いを同時計測する必要がある。さらに大脳新皮質は多種多様なニューロンが層構造を成し、非ニューロン細胞であるアストロサイトも多く存在する。このため研究にはセルタイプの同定と複数の細胞の同時記録が必要である。加えて、睡眠は麻酔とは似て異なるものであり、自然な睡眠と覚醒サイクルで計測を行うことが望ましい。事実、麻酔下では神経活動がREM/NREM睡眠の特徴をもたず自然状態の睡眠とは大きく異なる。それにも関わらず大脳新皮質の神経活動の研究は麻酔下のものがほとんどであり、自然な睡眠時における広範囲の大脳新皮質のセルタイプを同定した状態での神経活動の記録はこれまでに報告がない。

本研究では、二光子励起顕微鏡下でのマウスの自然な睡眠・覚醒を実現し、脳波/筋電図を同時測定しながら、自然な睡眠時のニューロンとアストロサイトの活動を、蛍光 Ca<sup>2+</sup>イメージングによって観察することを可能とする独自の計測システムの立ち上げを目的とした。二光子励起顕微鏡は長波長の近赤外光を用いるため細胞へのダメージを軽減でき、また細胞を構成するたんぱく質や水による吸収が少ないため、皮質深層まで低侵襲かつ低光毒性条件で長時間観察することができる。さらに遺伝子コード型蛍光 Ca<sup>2+</sup>インジケーターを採用することでセルタイプを同定して *in vivo* での活動をリアルタイムイメージングすることが可能である。本研究では、これらを用いて自然睡眠時及び覚醒時の皮質の活動を高精度でイメージングした。

### 【研究手法】

#### 1. Cranial window 及び EEG/EMG 手術

##### 1-1. Ca<sup>2+</sup>感受性色素

睡眠覚醒の判断基準となる脳波/筋電図(EEG/EMG)測定を行うため、野生型マウス(C57BL/6J)の頭皮を切開し、硬膜に EEG 用電極を、項部筋に EMG 用電極を取り付け、さらに二光子励起顕微鏡下で頭部を固定するためのヘッドプレートを頭蓋骨に設置した。このマウスを球形トレッドミル上で 1 日 6 時間 1 週間に渡って慣らし、トレッドミル上で自然状態に近い睡眠を観察できるようにした。観察日に歯科用ドリルで頭蓋骨

に直径 2 mm の穴 (Cranial window)をあげ、皮質の 200~400  $\mu\text{m}$  (第 2/3 層) 部位のニューロンとアストロサイトを同定するために、アストロサイト特異的マーカーである蛍光色素 (sulforhodamine 101, SR101) と Ca<sup>2+</sup>感受性色素 (oregon green-488 BAPTA-1 AM, OGB1) を大脳新皮質一次運動野に微量注入し、Cranial window をカバーガラスで覆った。

##### 1-2. Ca<sup>2+</sup>感受性たんぱく質

マウス頭蓋骨に直径 0.2 mm の穴をあげ、大脳新皮質の 100~400  $\mu\text{m}$  の部位に、Ca<sup>2+</sup>感受性たんぱく質 (GCaMP5G) を発現させるアデノ随伴ウイルス(AAV-EF1 $\alpha$ -GCaMP5G)を微量注入し、EEG/EMG 手術を行った。マウスの回復とウイルスの発現期間を考慮し、手術後 2 週間以上経過したマウスを用いて、1-1 と同様に Cranial window を作成した。

#### 2. Ca<sup>2+</sup> imaging

Ca<sup>2+</sup>感受性色素を注入または Ca<sup>2+</sup>感受性たんぱく質を発現させたマウスを二光子励起顕微鏡下の球形トレッドミルに乗せ、ヘッドプレートで頭部を固定し、EEG/EMG の電極を測定機器に接続した後、大脳新皮質第 2/3 層を二光子イメージングした。EEG/EMG とともにニューロンとアストロサイトの OGB1 及び GCaMP5G の蛍光強度を経時記録し、活動をモニターした。

### 【結果】

実験系の確認のため、錐体細胞に YFP が発現した遺伝子改変マウス Thy1-YFP マウスの皮質の覚醒時の二光子イメージングを行った。表層の樹状突起やスパイン、大脳新皮質 5 層の細胞体が蛍光観察でき、大きな懸念であった視野ブレもほぼ見られなかった。次に SR101 と OGB1 の同時注入マウスの二光子イメージングを行った。アストロサイトとニューロンを SR101 で明確に区別することが出来たが、OGB1 の取り込み効率が悪いという問題があった。さらに AAV 注入による GCaMP5G でのニューロンの Ca<sup>2+</sup>イメージングを行った。OGB1 と異なり、細胞体だけでなく微細構造にまで蛍光たんぱく質を満たすことが出来るためニューロンの樹状突起の Ca<sup>2+</sup>変化が観察可能となった。

### 【考察と展望】

本研究は世界に類を見ない計測系の立ち上げに多くの時間を割いた。技術的問題であった対物レンズ下での自然な睡眠と覚醒の実現を球形トレッドミルの採用により達成し、覚醒時にも関わらず視野ブレの少ない高精細の画像を取得することができた。OGB1 注入に関しては注入方法を改善し、効率良く細胞を観察する必要がある。AAV-EF1 $\alpha$ -GCaMP5G では注入領域の細胞に非特異的にあまりに高密に発現してしまうため、細胞体を正確に検出できない問題があった。今後はプロモータを *synapsin* や *CaMKII $\alpha$*  に変更した AAV を試行する。現状は覚醒時の神経活動を確認できた段階であり、今後は自然な睡眠時の神経活動を観察する予定である。ニューロンとアストロサイト、錐体細胞と介在神経など多種多様な細胞群の活動が覚醒~NREM 睡眠~REM 睡眠という脳状態の遷移時にどのように変化するかを詳細に光学計測し、大脳新皮質における睡眠の重要性に迫る。