

平成 30 年 5 月 9 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K12763

研究課題名(和文)自由行動下の脳内遺伝子転写エピソード測定解析：ウルトラディアンリズムの生理的意義

研究課題名(英文) Measurement of transcription activity in freely moving mice: Ultradian rhythms and their physiological roles

研究代表者

本間 さと (HONMA, Sato)

北海道大学・脳科学研究教育センター・招へい教員

研究者番号：20142713

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：自由行動下のマウス視交叉上核(SCN)から時計遺伝子発現を連続測定すると概日リズムに加えて数時間周期のウルトラディアン変動を認め、周期が異なる遺伝子間で共通していたという発見に基づき、背後にある振動メカニズムを明らかにすることを目的とした。その結果、ウルトラディアンリズムの発振源が室傍核と傍室傍核領域にあること、グルタミン酸とGABAがリズム発振に関わることを明らかにした。さらに、ファイバースystemによる遺伝子発現計測系を完成させ、本システムを用い、Per1リズムが活動開始、Bmal1リズムが終了位相と一致して変位し、同一転写ループに関わる遺伝子間に乖離があることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In freely moving mice, clock gene expression, continuously recorded by luciferase reporter from the suprachiasmatic nucleus (SCN), exhibits ultradian rhythms in addition to the circadian gene expression rhythm. Since the ultradian periodicities were similar in three clock genes, we hypothesized the common mechanisms generating ultradian rhythms within or near the SCN. In the present study, we aimed to find out the common mechanisms underlying these rhythms.

We found that the ultradian oscillation originated not in the SCN but in the paraventricular nucleus and subparaventricular zone using the co-culture system and calcium imaging. Glutamate and GABA are involved in generating ultradian rhythms. Using an optical fiber system for measuring bioluminescence continuously, we measured Per1-luc and Bmal1-ELuc expression rhythms and found that two rhythms were transiently uncoupled after phase-delaying light pulse. We further confirmed the two rhythms can be separable in culture system.

研究分野：環境生理学

キーワード：生体リズム 転写調節 インピボ計測

1. 研究開始当初の背景

生体内のほぼすべての細胞は、時計遺伝子を発現し、約 24 時間のリズムを発振する。哺乳動物の概日時計中枢である視床下部視交叉上核(SCN)では、固有の概日周期をもつ約 20,000 の神経細胞が液性および神経性に同期して、安定した約 24 時間の周期を自律的に発振し、全身の末梢臓器のリズムに概日周期のシグナルを送ることで、末梢時計を統合して、昼行性や夜行性のリズムを全身の生理機能に発揮している。一方、この 24 時間周期よりも短い周期性(ウルトラディアンリズム)は、心拍、呼吸、消化管運動、ホルモン分泌など、全身に多数ある。その一部については、分子メカニズムが明らかにされている一方、中枢神経内にも様々な周期のリズムが存在し、部位や周波数により、運動・記憶・睡眠などと密接に関連しているが、遺伝子転写レベルでの検討はされていない。また、メカニズムや生理的意義の多くは不明である。

2. 研究の目的

自由行動下マウスの中枢神経内における遺伝子転写活性のウルトラディアンリズム発振メカニズムとその中枢を明らかにする。このため、長期にわたり自由行動下で転写活性を連続計測するシステムの構築、測定系の最適化を行う。

様々なパラメータのウルトラディアンリズムを比較し、発振から出力にいたる経路を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 実験材料:

実験には、野生型の C57BL6J マウスおよび C57BL6J バックグラウンドの *Per1-luc*, *PER2::LUC*, *Bmal1-ELuc* の 3 の時計遺伝子レポーターマウスを用いた。また、これらのマウスを交配して、ダブルレポーターマウスをエタ。さらに、SCN 内の細胞振動同期に関わるとされる VIP の受容体 *VIPr2* のノックアウトマウスを用いた。

(2) 自由行動下での転写活性連続測定:

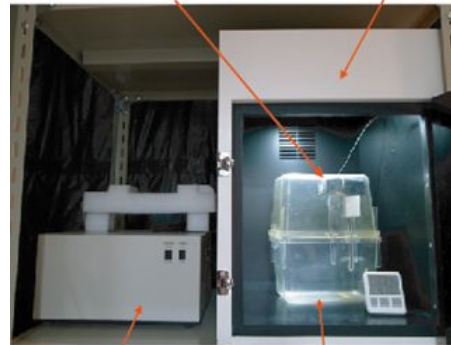
プラスチック製光ファイバーを用い、ガイドカニューラを目的とする脳部位の直上に挿入し、頭蓋骨に固定した。手術からの回復を待って、ガイドカニューラを通してファイバーを挿入し SCN 直上、または嗅球に先端が達したところで固定した。同時に、腹腔に発光酵素基質ルシフェリン液を含むオスモティックポンプ (Alzet) を埋め込んだ。手術回復後、連続暗の下で発光計測を行った。

発光計測システムを図に示す。明暗サイクル調整可能な特性ボックスに個別ケージを置き、自発行動量は赤外線センサーで計測した。また、組織からの発光量は、ファイバーを介して微量測光システム *in vivo Kronos* にて計測した。*In vivo Kronos* は、集光レンズを用いるとともに、冷却光電子増倍管を用いる

ことでノイズレベルを下げ、高感度に発光変動を定量解析することを可能とした。本システムに電気活動の同時計測系を併用することを試みたが、電気活動のノイズの抑制が十分に得られず、本研究期間に完成するに至らなかった。

In vivo 計測システム

赤外線感熱センサー 計測用ボックス



(自発行動計測)

In vivo Kronos

マウスケージ

(3) 脳培養スライスにおける経時的カルシウムイメージング:

生後 4~6 日目の C57BL6J バックグラウンドのマウスの冠状断切片 (200 μ m) をマイクロサイザーにて作成し、SCN 単独および SCN と視床下部室傍核 (PVN)、傍室傍核領域 (SPZ) を含む部位を切り出し、培養メンブレン (Millipore, Millicell) 上で 5% 牛胎児血清を含有する DMEM 培地にて培養した。培養 7 日目にアデノ随伴ウイルスベクターを用い、GCaMP6S (プロモータは human synapsin) を感染させた。さらに 10 日間培養し、GCaMP6 が十分発現した培養スライスを用い、経時的イメージングを行った。測定は 10 分毎に 0.1-1fps で 10 日以上測定し、また速い変化の解析のため、最後の 2 日間、10 分毎に 30fps の撮像も行った。

(4) 自発発火リズム計測:

マルチ電極アレイディッシュ上 (MED64 システム) で SCN の冠状切片を培養した。自発発火頻度を SCN 上の電極より 1 分毎に計測した。

(5) SCN 破壊手術

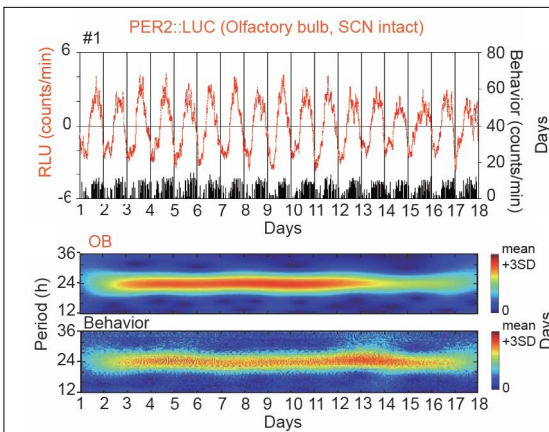
イソフルラン麻酔下で定位脳手術法により、両側 SCN を電的に破壊した。術後、自発発火リズムを明暗下で測定し、行動リズム消失を確認するとともに、実験終了後に組織学的に SCN の破壊について確認した。行動リズム残存、および SCN 組織の残存例は実験から除外した。

4. 研究成果

(1) 自由行動下マウスの嗅球と SCN の遺伝子

発現リズム

SCN 外の脳内の時計遺伝子発現におけるサーカディアンリズムとウルトラディアンリズムの検討のため、PER2::LUC マウスの嗅球より光ファイバーにて PER2 レベルを計測した。野生型マウスでは、PER2::LUC レベルに安定したサーカディアンリズムに加えて SCN と同様のウルトラディアンリズム観察され (下図)、行動ではサーカディアンリズムが完全に消失し、ウルトラディアンリズムのみを示す SCN 破壊マウスの嗅球では、PER2::LUC レベルのウルトラディアンリズムは持続し、サーカディアン周期は測定期間中に出現したり消失したりの繰り返しが見られた。中枢時計による同調情報を欠損した結果、細胞振動が脱同調することが示唆された。一方、VIPr2 ノックアウトマウスでは、行動リズムのサーカディアン成分が非常に低下してウルトラディアンリズムが強くみられるにも関わらず、嗅球の PER2::LUC には安定したサーカディアンリズムが見られ、野生型との差が見られなかった。一方、培養嗅球組織にはウルトラディアンリズムが全くみられず、SCN からの情報がなくても安定したサーカディアン振動を示した。上記の結果、ウルトラディアンリズムの発振源は SCN 以外であり、行動や嗅球に情報を送ること、嗅球はウルトラディアン発振源にはならないこと、培養下では組織作成や培地交換が嗅球細胞リズムを同期することで、組織リズムがしばらく持続することが分かった。



自由行動中のマウス嗅球における PER2::LUC レベル (赤) と自発行動量 (黒ヒストグラム) の 18 日間の同時計測結果。安定したサーカディアンリズムとそれに加えてウルトラディアンリズムが観察される。下はそれぞれの Wavelet 解析結果。(論文)

(2) 脳内ウルトラディアンリズム発振源の探索:

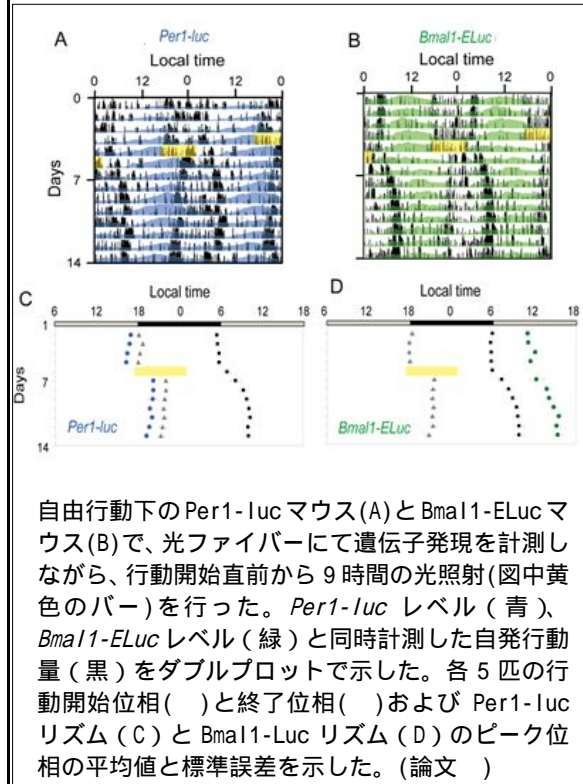
SCN 破壊動物でも行動および嗅球の遺伝子発現にウルトラディアンリズムが見られた。そこで、SCN 外組織でウルトラディアンリズム発振源となり、かつ SCN にもウルトラディアンリズムを伝える可能性のある部位として、PVN, SPZ に注目した。PVN, SPZ, SCN

を含むスライスを培養し、細胞内カルシウムレベルを長期計測した。その結果、PVN, SPZ の細胞内カルシウムレベルにウルトラディアン周期のリズムが確認され、SCN と PVN/SPZ を別々に培養すると、PVN/SPZ のみにウルトラディアンリズムが発現することが分かった。PVN/SPZ が、行動や他の脳領域のウルトラディアンリズムの発振源である可能性が示唆された。また、その発振にグルタミン酸と GABA が関わっていることを、薬理実験により明らかにした。

(3) *Per1* と *Bmal1* 発現リズムの乖離

a. 光パルスによる位相変位と遺伝子発現リズム間乖離

行動リズムを位相後退させる位相で 9 時間の光照射をしたところ、*Per1-luc* は、行動開始位相と一致して速やかに位相後退し、*Bmal1-ELuc* は、行動終了位相と一致して、数日の移行期を経て位相後退するという、時計遺伝子転写翻訳ループに関わる 2 遺伝子発現に乖離が見られた。

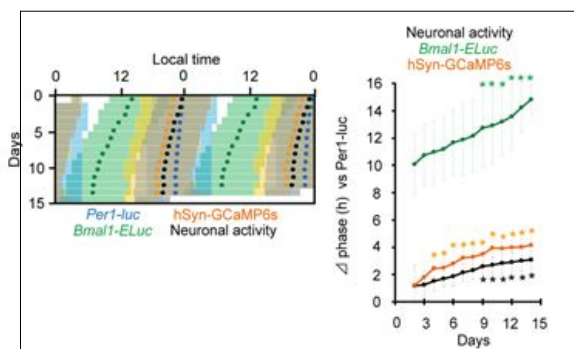


自由行動下の *Per1-luc* マウス (A) と *Bmal1-ELuc* マウス (B) で、光ファイバーにて遺伝子発現を計測しながら、行動開始直前から 9 時間の光照射 (図中黄色のバー) を行った。*Per1-luc* レベル (青)、*Bmal1-ELuc* レベル (緑) と同時計測した自発行動量 (黒) をダブルプロットで示した。各 5 匹の行動開始位相 () と終了位相 () および *Per1-luc* リズム (C) と *Bmal1-Luc* リズム (D) のピーク位相の平均値と標準誤差を示した。(論文)

b. 培養組織における時計遺伝子リズム間の乖離

リズムの乖離を発見した。このため、*Per1-luc*, *Bmal1-Eluc* のダブルレポーターマウスを作成し、ロングパスフィルターを用いて 2 遺伝子発現量の変動を測定解析した。その結果、長期にわたる培養では、両遺伝子発現リズムの周期が異なり、徐々に乖離すること、周期差は新生児で有意に大きいことが分かった。一方、同一スライスから計測した自発発火リズムおよび細胞内カルシウムリズム

は2週間の計測でも同期したままであったが、*Per1*, *Bmal1* のどちらとも異なる中間値を示した。分子時計を形成する同一の転写翻訳ループに属する *Per1* と *Bmal1* のリズムは乖離しうるものであり、その支配する出力についてもについても差異があること、生後発達におけるネットワーク形成が乖離を抑制することなどが明らかとなった。



左は同一 SCN からの *Per1-luc* (青), *Bmal1-ELuc*(緑), 細胞内カルシウム (オレンジ) 自発発火(グレー)リズムの同時計測の一例。横線は、平均値よりも高いレベルを示す時間帯。同色のマーカーは、それぞれのリズムのピーク位相。*Per1-luc*リズムからの位相差の培養中の変化を右に記載した (n=3、平均値とSD) (論文)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計7件)

Honma S. Mammalian circadian clock and development. *Eur.J.Neurosci.* 2018 (in press) 査読有

Honma S. The mammalian circadian system: a hierarchical multi-oscillator structure for generating circadian rhythm. *J Physiol Sci.* 68:207-219, 2018. doi: 10.1007/s12576-018-0597-5. 査読有

Ono D, Honma S., Nakajima Y, Kuroda S, Enoki R and Honma K. Dissociation of *Per1* and *Bmal1* circadian rhythms in the suprachiasmatic nucleus in parallel with behavioral outputs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 114:E3699-E3708, 2017. doi: 10.1073/pnas.1613374114. 査読有

Pauls SD, Honma KI, Honma S., Silver R. Deconstructing Circadian Rhythmicity with Models and Manipulations. *Trends Neurosci.* 39:405-19, 2016. doi: 10.1016/j.tins.2016.03.006. 査読有

Tokuda I, Ono D, Ananthasubramaniam B, Honma S., Honma K and Herzog H. Coupling controls synchrony of clock cells in development and knockouts. *Biophysical J.* 109: 2159-70, 2015. doi: 10.1016/j.bpj.2015.09.024. 査読有

Ono D, Honma S. and Honma K. Circadian

PER2::LUC rhythms in the olfactory bulb of freely moving mice depend on the SCN but not on behavior rhythms. *Eur J Neurosci.*42: 3128-3137, 2015. doi: 10.1111/ejn.13111. 査読有
Ono D, Honma K and Honma S. Circadian and ultradian rhythms of clock gene expression in the suprachiasmatic nucleus of freely moving mice. *Scientific Rep* 5:12310, 2015. doi: 10.1038/srep12310. 査読有

[学会発表](計11件)

榎木亮介, Wu Yu-er, 織田善晃, Huang Zhi-li, 本間研一, 本間さと. 室傍核ウルトラディアンカルシウムリズムの発生機序. 第95回日本生理学会大会、高松、3.28-30,2018

Wu Yu-er, 榎木亮介, 織田善晃, Huang Zhi-li, 本間研一, 本間さと. 第24回日本時間生物学学会学術大会、京都、10.28-29, 2017.

Honma S. In vivo monitoring of clock gene expression rhythms from freely moving mice. Special Lecture in Chronobiology, Hyderabad University, Sep 18, 2017.

Honma S., Ono D, Hamada T and Honma K. In vivo monitoring of circadian rhythms revealed tissue specific regulation of peripheral clocks by the master circadian pacemaker. Asian Forum on Chronobiology, Bin Yue Hotel, Hohhot, China, June 25-27, 2017.

本間さと. 概日リズム発振の中核機構: 複数機能の長期・連続・同時記録への挑戦 生理学会北海道地方会総会 札幌医科大学、12.4, 2016.

Ono D, Honma S. and Honma K. Circadian *Bmal1* and *Per2* rhythms driven by different oscillators in the suprachiasmatic nucleus. Sapporo Symposium on Biological Rhythms 2016, Keio Plaza Hotel Sapporo & Furate Hall, Sapporo, Japan Nov. 9-10,2016.

Honma S. Oscillator networks in the suprachiasmatic nucleus. Keynote Lecture, the 29th Chronobiologia International Congress, Four points by Sheraton Suzhou, Suzhou, China, Oct.24-28, 2016.

Honma S. Suprachiasmatic nucleus, a master circadian pacemaker of mammals. The 4th International Chronobiology Summer School, Beijing University, Beijing, China, Aug. 1-5, 2016.

Honma S., Ono D and Honma K, Mediators of cellular oscillators in the suprachiasmatic nucleus. 9th Conference of Chinese Sleep Research Society, Eberbright Exhibition and Convention Center, Shanghai, China, May 27-29, 2016.

本間さと. 「時刻」のイメージングで哺乳類中枢時計の謎に挑む. 第93回日本生理学会大会 札幌, 3.22-24, 2016

本間さと.光を用いた経時的分子バイオ
イメージング.未来創薬医療イノベーション
拠点国際シンポジウム、北海道大学、札幌、
1.21,2016.

〔図書〕(計 3 件)

本間さと. サーカディアンリズム睡眠覚
醒障害の中樞神経機構. 千葉茂、本間研一
(編)「サーカディアンリズムと睡眠」新興
医学出版、2018 (印刷中)

Ono D, Honma S, Honma K. Differential roles
of AVP and VIP signaling in the postnatal
development of the neural networks for
circadian clock in the suprachiasmatic nucleus.
Biological Clocks with reference to
suprachiasmatic nucleus. Ed by K. Honma and
S. Honma, Hokkaido Univ. Press, pp.21-36,
2017.

Honma S, Ono D, Enoki R, Yoshikawa T,
Kuroda S and Honma K. Oscillator networks
in the suprachiasmatic nucleus: analysis of
circadian parameters using time-laps images.
Biological Clocks - 30th Anniversary of
Sapporo Symposium on Biological Rhythm,
(eds) Honma K and Honma S, Hokkaido
University Press, Sapporo. 33-41, 2015.

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本間 さと (HONMA, Sato)
北海道大学・脳科学研究教育センター・
客員教授
研究者番号：20142713

(2) 研究分担者 (平成 27 年度のみ)

織田 善晃 (ODA, Yoshiaki)
北海道大学・大学院医学研究院・博士研
究員
現所属：長崎大学・大学院医歯学総合研
究科・助教
研究者番号：20735542

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

中村 渉 (NAKAMURA, Wataru)
小野 大輔 (ONO, Daisuke)