

機関番号：82675

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19319

研究課題名（和文）細胞内局所光イメージング計測から迫る概日カルシウムリズムの源流の解明

研究課題名（英文）Optical Imaging of Intracellular Organelles for Understanding the Origin of the Circadian Calcium Rhythms

研究代表者

榎木 亮介（Enoki, Ryosuke）

大学共同利用機関法人自然科学研究機構（機構直轄研究施設）・生命創成探究センター・准教授

研究者番号：00528341

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：哺乳類の概日時計の中核は脳視床下部にある視交叉上核に局在する。これまでに私は、視交叉上核の神経回路における時空間的に協調した概日Ca²⁺リズムを見だし、その作動機序を探究してきた。本研究では、光計測技術を駆使して細胞局所Ca²⁺イメージングを行ったところ、核内においても明瞭な概日Ca²⁺リズムを観察した。核内リズム位相は細胞質Ca²⁺リズムと同位相であり、視交叉上核内の空間位相パターンも同一であった。また薬剤投与の実験により、核内のCa²⁺リズムは主に細胞外からの流入がCa²⁺が主要因であり、おそらく核膜孔を介して核内にCa²⁺が入ると推察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

概日時計のリズム発振メカニズムを解明する上で、細胞内オルガネラレベルのリズム制御という新たな視点を与えるものであり、学術的に重要な結果である。また、高解像の超長期イメージング計測という、顕微鏡観察技術としても未開拓の領域を開くものであり、今後の更なる発展が期待できる。さらには、現代社会では概日リズムが乱れる事による心身の不調が問題になっており、概日時計のリズム発振の基本原則を解明することは、社会的にも意義があるものである。

研究成果の概要（英文）：The center of the mammalian circadian clock is located in the suprachiasmatic nucleus in the hypothalamus of the brain. I have previously identified spatiotemporally coordinated circadian Ca²⁺ rhythms in the neuronal circuits of the suprachiasmatic nucleus and investigated their underlying mechanisms. In this study, I performed organellar Ca²⁺ imaging using a high-resolution time-lapse imaging system and observed robust circadian Ca²⁺ rhythms in the nucleus that were in phase with cytosolic Ca²⁺ rhythms and had the identical spatial patterns in network. Drug application experiments revealed that the nuclear Ca²⁺ rhythm is mainly contributed by influx from outside the cell, probably through the nuclear membrane pore that allows Ca²⁺ entry into the nucleus.

研究分野：神経生理学

キーワード：概日リズム 視交叉上核 カルシウム 光イメージング オルガネラ

1. 研究開始当初の背景

地球上のほぼ全ての生物は、概日時計により環境変化を予測して、自身の細胞機能や生理機能を調節している。哺乳類には自律した約 24 時間のリズムを刻む概日時計が備わっており、その司令塔は脳深部の視床下部に存在する視交叉上核に局在する。視交叉上核は約 2 万個の神経細胞から構成され、全身にリズム情報を発振し、体温、睡眠・覚醒、ホルモン分泌などの生理機能や動物行動の 24 時間リズムを制御する。細胞レベルでの概日リズムの発振は、時計遺伝子の転写と翻訳によるフィードバックループが分子実体であると想定されている。視交叉上核においては、転写翻訳リズム、膜電位、神経発射、ペプチド放出、そして細胞内 Ca^{2+} に 24 時間リズムが観察される。

私はこれまで、視交叉上核の神経回路における時空間的に協調した概日 Ca^{2+} リズムを発見し、その作動機序を探究してきた(Enoki et al., PNAS, 2012, 2017, 2018 等)。予期しなかったことに、細胞質で見られる概日 Ca^{2+} リズムは、神経発射活動や電位依存性 Ca^{2+} チャネル、神経間連絡を遮断しても継続し、膜電位ともリズム位相が乖離するなど、典型的な神経細胞とは異なる Ca^{2+} 動態を示すことが分かってきた。さらには、時計遺伝子を欠損細胞においても概日 Ca^{2+} リズムが観察されることから(Enoki et al., Sci Rep, 2018)、概日 Ca^{2+} リズムは中心的な振動体である可能性もある。一般に Ca^{2+} は細胞内のミトコンドリアや小胞体などの小器官により調節され、 Ca^{2+} 依存性タンパク質が核内に移行して遺伝子発現調節などを行うと想定されている。しかしながら、視交叉上核の神経細胞において概日 Ca^{2+} リズムがどのようなメカニズムで生み出されるのかの詳細は不明であったことから、本研究では光イメージング計測技術を駆使してオルガネラレベルの Ca^{2+} 計測を試み、概日 Ca^{2+} の制御メカニズムを解明しようと研究計画を立案した。

2. 研究の目的

私は日から週単位の長期間で概日リズムを計測する為、光の連続照射による細胞毒性やダメージを軽減した独自の光イメージング計測法を確立してきた。本研究では、長期間の光観察法を細胞内小器官レベルへと展開し、概日リズム発振のメカニズムを新たな視点から理解することを試み、視交叉上核における Ca^{2+} リズムの発振メカニズムを解明する。

3. 研究の方法

本実験ではまず細胞核の Ca^{2+} 動態に注目した。従来の報告では核内では Ca^{2+} リズムが見られないことが報告されていた。しかしながら核膜孔は小分子が自由拡散できることから、核内の Ca^{2+} が独立に制御する機構の可能性が考えられた。マウス視交叉上核の培養のスライスを作成し、アデノ随伴ウイルスを用いて、遺伝子コード型 Ca^{2+} センサーを神経細胞特異的に感染発現させ(図 1)、ニポウディスク共焦点ユニット/高感度 CCD カメラ等から構成される長期タイムラプスシステムを用い、数日~週の長期間の光イメージング計測を行った。緑色/赤色の蛍光 Ca^{2+} センサー(GCaMP6s, jRGECO1a)にそれぞれ核移行シグナル、核外移行シグナルを付与し、細胞質と核に局所発現させ、2 色同時イメージングを行った。また Ca^{2+} の流入源を調べる為、神経発射の遮断薬、小胞体のリアノジン受容体、IP3 受容体の阻害薬を投与し、 Ca^{2+} リズムの振幅、基底濃度の変化を解析した。

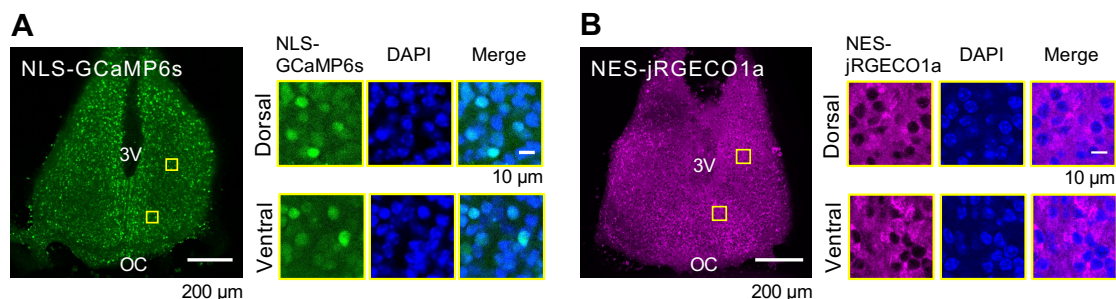


図 1. 視交叉上核スライスにおける Ca^{2+} センサーの発現パターン解析

4. 研究成果

従来の報告とは異なり、細胞質-核内それぞれで明瞭な Ca^{2+} リズムが観察された(図 2)。細胞質-核内の Ca^{2+} リズムは同位相であり、視交叉上核内で同様の空間位相パターンを示した。神経発射の遮断薬(TTX)により、細胞質-核内の双方の Ca^{2+} リズムの振幅は有意に減弱したが、リアノジン受

容体、IP3 受容体の阻害薬は有意な効果を殆ど示さなかった(図 3)。これらの結果から、核内 Ca^{2+} リズムは、細胞外からの Ca^{2+} 流入を介し、おそらく核膜孔の自由拡散を介して核内に流入するものと考えられる。細胞核は転写が行われる場であり、核内に流入した Ca^{2+} は核内の Ca^{2+} 依存性酵素の活性化を介して、転写調節を行っている可能性が考えられる。

本研究結果は、Frontiers in Neuroscience 誌にて論文を発表した。その他、ミトコンドリア内のイオン動態の可視化解析も進行中であり、今後も研究を継続して進めて行く計画である。

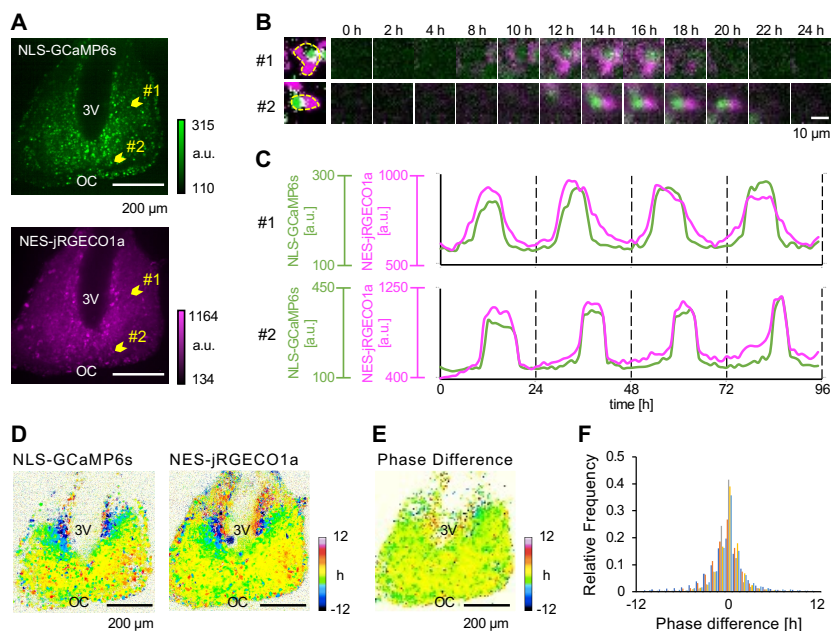


図 2. 細胞質-核内における概日 Ca^{2+} 動態の同時イメージング計測

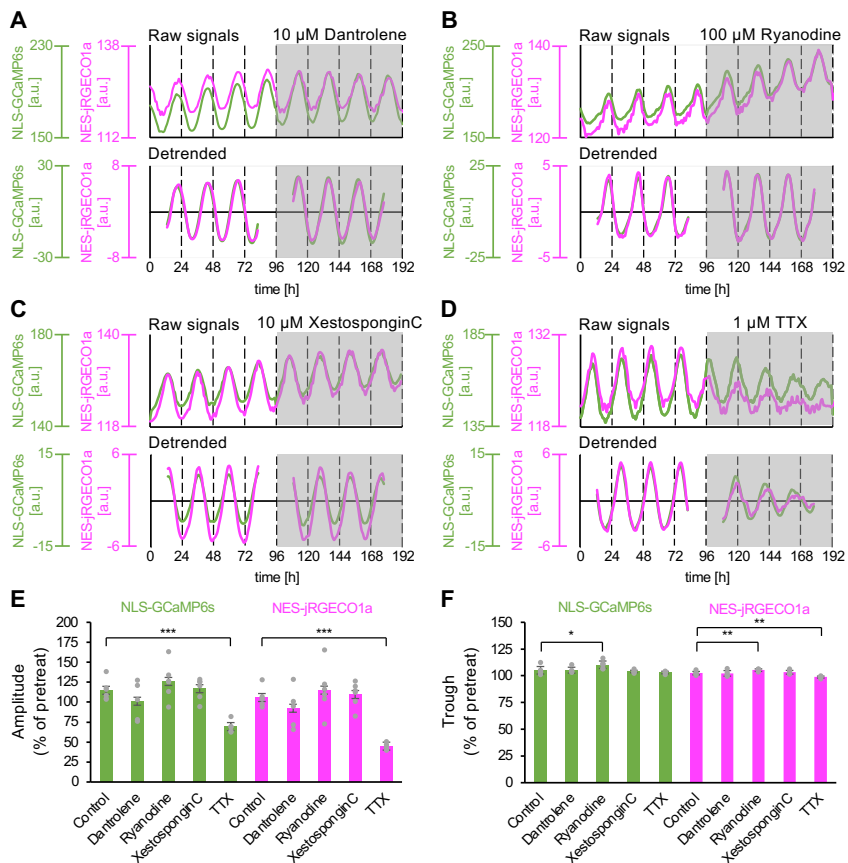


図 3. 細胞質-核内の概日 Ca^{2+} リズムに対する各種阻害薬の効果の検証

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Enoki Ryosuke, Kon Naohiro, Shimizu Kimiko, Kobayashi Kenta, Hiro Sota, Chang Ching-Pu, Nakane Tatsuto, Ishii Hirokazu, Sakamoto Joe, Yamaguchi Yoshifumi, Nemoto Tomomi	4. 巻 26
2. 論文標題 Cold-induced suspension and resetting of Ca ²⁺ and transcriptional rhythms in the suprachiasmatic nucleus neurons	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 108390 ~ 108390
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2023.108390	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Hiro Sota, Kobayashi Kenta, Nemoto Tomomi, Enoki Ryosuke	4. 巻 17
2. 論文標題 In-phasic cytosolic-nuclear Ca ²⁺ rhythms in suprachiasmatic nucleus neurons	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnins.2023.1323565	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Naohiro Kon, Ryosuke Enoki, Hsin-tzu Wang, Takahiro Iwamoto and Yoshitaka Fukada	4. 巻 -
2. 論文標題 Roles of Ca ²⁺ Signaling in Molecular Clocks.Circadian Clocks	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Circadian Clocks (Edited by Ken-ichi Honma and Sato Honma)	6. 最初と最後の頁 253-264
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 ENOKI Ryosuke	4. 巻 62
2. 論文標題 Calcium Rhythm in Mammalian Master Clock	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Seibutsu Butsuri	6. 最初と最後の頁 228 ~ 231
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophys.62.228	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 金尚宏, 榎木亮介	4. 巻 81
2. 論文標題 概日時計の温度補償性とCa ²⁺ シグナルの役割	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 低温科学・特集「動物の寒冷適応戦略」	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計19件 (うち招待講演 10件 / うち国際学会 7件)

1. 発表者名 Sota Hiro, Tomomi Nemoto, Ryosuke Enoki
2. 発表標題 Optical Imaging of Organelle Ca ²⁺ Rhythms in the Central Circadian Clock Neurons
3. 学会等名 第12回 生理学研究所・新潟大学脳研究所・京都大学ヒト行動進化研究センター合同シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Sota Hiro, Tomomi Nemoto, Ryosuke Enoki
2. 発表標題 Long-term organellar Ca ²⁺ imaging of master circadian clock neurons
3. 学会等名 生理研・韓国Korea大Yonsei大合同シンポジウム (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 廣蒼太, 根本知己, 榎木亮介
2. 発表標題 概日時計中枢におけるオルガネラCa ²⁺ リズムの長期イメージング解析
3. 学会等名 日本生理学会 第100回記念大会 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 榎木亮介, 金尚宏, 山口良文, 根本知己
2. 発表標題 Circadian Rhythms under Cold Temperature in the Master Clock Neurons
3. 学会等名 日本生理学会 第100回記念大会 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 廣蒼太, 根本知己, 榎木亮介
2. 発表標題 概日時計中枢における核-ミトコンドリア-細胞質のCa ²⁺ リズムの光イメージング解析
3. 学会等名 第29回 時間生物学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 廣蒼太, 根本知己, 榎木亮介
2. 発表標題 概日時計中枢における核-ミトコンドリア-細胞質のCa ²⁺ リズムの光イメージング解析
3. 学会等名 2022年度日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 榎木亮介
2. 発表標題 概日時計-冬眠の研究に欲しい光イメージング計測技術
3. 学会等名 先端光技術を基軸としたバイオイメージング研究会 (招待講演)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Ryosuke Enoki
2. 発表標題 Circadian Clock under Extreme Cold Environment
3. 学会等名 McGill-NIPS Joint Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Ryosuke Enoki
2. 発表標題 Circadian Rhythms in the Master Clock Neurons under Extreme Cold Temperature
3. 学会等名 Invited Seminar in Elena Gracheva's lab, Yale University (招待講演)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Ryosuke Enoki
2. 発表標題 Circadian Rhythms in the Master Clock Neurons under Extreme Cold Temperature
3. 学会等名 Invited Seminar in Rae Silver's lab, Columbia University (招待講演)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 榎木亮介
2. 発表標題 極低温環境下における概日リズム発振機構
3. 学会等名 生理研研究会「極限環境適応」(招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 榎木亮介
2. 発表標題 時を刻む脳-生命が時を刻む仕組み-
3. 学会等名 静岡県立大学大学院 大学院講義/公開セミナー（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 榎木亮介
2. 発表標題 極低温環境下における概日リズム発振機構
3. 学会等名 第5回冬眠休眠研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 榎木亮介
2. 発表標題 極低温環境下における概日リズム発振機構
3. 学会等名 生理学研究所研究会「細胞システム理解のためのシグナル応答原理解明の最前線」
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ryosuke Enoki
2. 発表標題 Circadian Rhythms under Extreme Cold Temperature in the Master Clock Neurons
3. 学会等名 国際先導研究リトリート（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 榎木 亮介, 金 尚宏, 山口 良文, 根本 知己
2. 発表標題 視交叉上核の神経細胞における細胞内カルシウムおよび時計遺伝子転写のリズムは低温により停止しリセットする
3. 学会等名 The 46th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ryosuke Enoki
2. 発表標題 Circadian Rhythms under Cold Temperature in the Master Clock Neurons
3. 学会等名 Washington University St.Louis, Sleep & Clock Seminar (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Sota Hiro, Tomomi Nemoto, Ryosuke Enoki
2. 発表標題 Long-term imaging of organellar rhythms in the suprachiasmatic nucleus neurons
3. 学会等名 Gordon Research Conference Chronobiology (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ryosuke Enoki, Naohiro Kon, Yoshifumi Yamaguchi, Tomomi Nemoto
2. 発表標題 Cold-induced Suspension and Resetting of Ca ²⁺ and Transcriptional Rhythms in the Suprachiasmatic Nucleus Neurons
3. 学会等名 Gordon Research Conference Chronobiology (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

個人研究紹介HP
<https://ryosukeenoki.wixsite.com/enoki>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------