

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860175

研究課題名(和文)概日リズム中枢を司る神経細胞ネットワークの作動基盤

研究課題名(英文)Neuronal network level understanding of master circadian clock in mammals

研究代表者

榎木 亮介(Enoki, Ryosuke)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：00528341

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ほ乳類の概日リズムは脳視床下部の視交叉上核に存在する中枢時計により調節される。視交叉上核は約2万個の神経細胞がネットワークを形成し、睡眠覚醒やホルモン放出などの生理機能を調節するが、神経細胞の集団レベルでの現れてくる機能やその背後にあるメカニズムの多くは不明である。

本研究課題では、概日リズム観察に特化した長期蛍光タイムラプスイメージング法を用いて、神経細胞ネットワークレベルで概日リズムを高空間分解能にかつ網羅的に可視解析した。さらに時計遺伝子発現や神経細胞発射活動、膜電位の概日リズムを同時に捉えることに成功し、概日リズムの神経細胞ネットワークレベルでの発振機構の一端を解明した。

研究成果の概要(英文)：Circadian clocks in mammals are controlled by neuronal network activities in the suprachiasmatic nucleus (SCN) of the hypothalamus in the brain. The SCN controls 24h rhythms in physiology and behavior, such as sleep-wake cycles, hormone release, etc. However, the network-level mechanisms of circadian rhythm are poorly understood.

In the present study, we performed large-scale time-lapse imaging in large population of neurons in the SCN. I combined the methods of fluorescence imaging of intracellular calcium ion, bioluminescence imaging of clock gene expression, multi-electrode array dish for detecting neuronal firings, or voltage-sensitive fluorescent probes, and I succeeded, for the first time, in simultaneous recording of multiple neuronal functions (Calcium, gene expression, neuronal firing, etc) from identical locations in same SCN. I analyzed spatial patterns and temporal order of these functions, and found the functional link between these rhythms.

研究分野：神経生理学

キーワード：概日リズム 生物時計 カルシウム 光イメージング 時計遺伝子 神経ネットワーク

1. 研究開始当初の背景

近年の分子生物学の技術革新により、生物リズム（生物時計）の分子機構の研究は飛躍的に進展し、哺乳類細胞においても時計の動きを分子・細胞レベルで観察することが可能となった。これにより単一細胞レベルでの機能解明が急速に進み、個々の細胞でのリズム発振機構の分子メカニズムが次々と明らかとなってきている。しかしながら、細胞集団で現れてくる機能については未解明の問題が山積しており、例えば主要な時計遺伝子を欠損した動物でも細胞集団レベルでは機能が代償され明瞭なリズムが観察されることや、組織や個体レベルで出現する外界情報の取捨選択能など、細胞集団に起因する特徴的な機能の存在が示唆されている。これらの現象は、多細胞集団の形成、および、各細胞間・領域間の結合により生み出される推測されている。こうした細胞集団としての特性や重要な未解決問題は、従来の分子生物学的手法を中心とする還元的実験アプローチや、従来の遺伝子リズム解析及び数理モデルの構築などの単独の手法のみでは解き明かせる見通しが立っておらず、生物時計中枢ネットワークへの理解の為に、細胞集団を網羅的に高空間分解能で可視化する技術が必須のものであり、これらの観察技術により神経細胞間や領域間の結合メカニズムを解析することで、生物時計中枢を司る神経細胞ネットワークの作動基盤を解明することが必要である。

2. 研究の目的

哺乳類の中枢時計は脳視床下部の視交叉上核に存在する。視交叉上核は両脳で約2万個の神経細胞が機能的なネットワークを形成し、階層的な多振動体構造を形成し、睡眠覚醒、動物行動リズムなどの全身の生理機能を制御している。個々の神経細胞におけるリズム発振機構は、時計遺伝子の転写翻訳ループが想定され、近年詳細な分子機構の解析が進んでいる。一方で、神経細胞集団で現れる機能については未解明問題が山積しており、その機能的性質や作動基盤は不明である。

本研究では私達が開発した長期蛍光タイムラプス計測法により、神経細胞ネットワークレベルで概日リズムを高空間分解能に網羅的に可視解析することで、概日リズム中枢を司る神経細胞ネットワークの作動基盤を解明することを目的で研究を行った。特に高感度カルシウムセンサーを用い、細胞内カルシウム濃度を指標として神経細胞の活動を捉えることで、神経細胞ネットワークの活動を計測する。さらに様々な機能プローブや時計遺伝子発現の発光レポーター、多電極アレイディッシュ等の方法を組み合わせることで、複数の細胞機能を同時に捉え、1細胞からネットワークレベルでの神経細胞の機能を多角的に捉えることで、その作動基盤を解明する。

3. 研究の方法

野生型および時計遺伝子欠損マウスから視交叉上核の培養組織スライスを作成し、アデノ随伴ウイルスの感染発現により高感度カルシウムセンサーおよび膜電位センサーを神経細胞特異的に発現させた。また各種 Cre 発現マウスを用い、細胞種特異的に機能センサーを発現させた。蛍光シグナルは、倒立顕微鏡に取り付けたニポウディスク型共焦点と高感度 CCD カメラにより捉えた。

また時計遺伝子レポーターマウス

(PER2::LUC) から作成した視交叉上核に、カルシウムセンサーを感染発現させ、多電極ディッシュアレイ上に静置培養し、正立顕微鏡と高感度 CCD カメラによる光計測により、時計遺伝子発現・カルシウム濃度・神経発射活動の概日リズムを同時計測した。ネットワークレベルの概日リズムは、画像データを用いてリズムパラメーターの空間マッピングプログラムにより振幅、位相、周期などの空間分布を算出した。

4. 研究成果

(1) 3機能同時計測

これまで確立した概日カルシウムリズムの計測に加え、時計遺伝子発現の発光測定、多電極ディッシュアレイによる神経発射活動の計測法を組み合わせることで、時計遺伝子発現・カルシウム濃度・神経発射活動の3機能の概日リズムを、視交叉上核の同一領域から計測することに世界で初めて成功した。カルシウムは細胞内で時計遺伝子と入出力をつなぐ主要な中間分子であり、神経発射活動は出力そのものを反映することから、3者の関係性を知れば、時計発振機構の実態に迫ることが可能となる。

実験では、野生型動物において明瞭な3機能の概日リズムを観察し、カルシウムリズムは神経発射リズムより2時間程位相前進し、時計遺伝子発現リズムからは6時間位相前進し、その位相関係を保ってリズムが継続していた。また光シグナルのリズムパラメーターの空間解析により (Enoki et al., PNAS, 2012)、カルシウムリズムと時計遺伝子発現リズムは、背側領域は腹側領域と比較し位相前進しており、両者の空間位相特異性は相似していることを観察した。

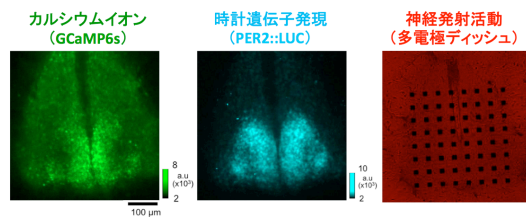


図1：3機能同時計測

さらに遺伝子発現ループを形成する主要な時計遺伝子である Cryptochrom1/2 (Cry1/2) の時計遺伝子二重欠損動物を用い同様の解析を行った。これまでの私たちの

ループの先行研究により、発達期の Cry1/2 二重欠損動物では、神経間連絡が著しく減弱していることが分かっている (Ono et al., Nat. Com, 2013)。

その結果、Cry1/2 二重欠損動物では、3 機能の概日リズムは振幅が減弱し、短周期で不安定であった。またカルシウムリズムと時計遺伝子発現リズムは、ネットワークレベルの位相特異性が崩れており、特に背側領域ではカルシウムリズムが消失していた。さらに、腹側領域では時計遺伝子とカルシウムのリズム位相関係が 2 時間程短縮していることから、概日カルシウムリズムは時計遺伝子のコアグループによる制御と、細胞間連絡に由来する制御の 2 種類の機構が存在することが分かった。これらの研究成果は論文投稿準備中である。

(2) 膜電位リズムの光計測

視交叉上核の神経細胞は膜電位や神経発射頻度の概日リズムが存在することが知られている。従来のパッチクランプ計測や多電極アレイディッシュによる計測では、空間解像度が低いなど技術的な限界がある。神経細胞ネットワークレベルで、かつ高い空間分解能で長期的に膜電位リズムを計測するため、タンパク質型の膜電位感受性プローブをアデノ随伴ウイルスにより感染発現させ、長期蛍光タイムラプス計測により膜電位の概日リズムの計測を試みた。

その結果、視交叉上核全体で明瞭な膜電位リズムが観察され、さらにカルシウムプローブの同時感染発現により、両者の概日リズムの時間空間的な差異を観察することが可能となった。また細胞種特異的な蛍光プローブの発現により、視交叉上核を構成する細胞の種類別に膜電位とカルシウムの概日リズムを計測し、細胞種に特徴的な性質と差異を見出した。これらの研究成果は論文投稿準備中である。

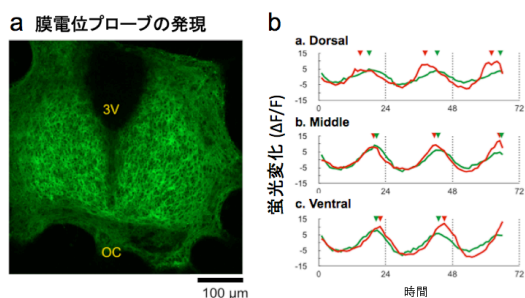


図 2 : 膜電位リズムの観察

<引用文献>

1. Enoki R, Kuroda S, Ono D, Hasan MT, Ueda T, Honma S, Honma K. Topological specificity and hierarchical network of the circadian calcium rhythm in the suprachiasmatic nucleus. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 Dec 26;109(52):21498-503. doi:

10.1073/pnas.1214415110.

2. Ono D, Honma S, Honma K. Cryptochromes are critical for the development of coherent circadian rhythms in the mouse suprachiasmatic nucleus. Nat Commun. 2013;4:1666. doi: 10.1038/ncomms2670.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

1. 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 by Honma K and Honma S), Hokkaido University Press, Sapporo. 2016; 33-41. 査読無
2. Yoshikawa T, Nakajima Y, Yamada Y, Enoki R, Watanabe K, Yamazaki M, Sakimura K, Honma S, Honma KI. Spatiotemporal profiles of arginine vasopressin transcription in cultured suprachiasmatic nucleus. **European Journal of Neuroscience**. 2015 Nov;42(9):2678-89. doi: 10.1111/ejn.13061 査読有
3. Brancaccio M, Enoki R, Mazuski C, Jones J, Evans J, Azzi A. Network-mediated encoding of circadian time: the suprachiasmatic nucleus (SCN) from genes to neurons to circuits, and back. **Journal of Neuroscience**. 2014, 34(46): 15192-15199. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3233-14. 査読有
4. 榎木亮介, 本間さと, 本間研一. 時を刻む脳～概日リズム中枢の光イメージング解析～. レーザー学会第 467 回研究会報告 (ニューロフォトニクス研究会), p11-15, 2014. 査読無
5. 榎木亮介. 動物の生物時計～視交叉上核を中心として～. 生体の科学(生命動態システム科学)2014; 65(5): 432-433. 査読無
6. 榎木亮介, 黒田茂, 小野大輔, Mazahir T. Hasan, 上田哲男, 本間さと, 本間研一. 視交叉上核における概日カルシウムリズムの位相特異性および階層的ネットワーク. 北海道医学雑誌 Best Article of the Year (BAY) 2014; 89(1): 60. 査読無
7. 榎木亮介, 本間さと, 本間研一. 生物時計中枢の光イメージング解析 (Bioimaging in Circadian Master Clock). 光学 (Japanese journal of optics: a publication of the Optical

- Society of Japan, the Japan Society of Applied Physics), 2014, 43(3), 111-116. 査読無
8. Enoki R, Honma S, Honma KI. Imaging Circadian Calcium Rhythm in the Suprachiasmatic Nucleus. Dynamics of Circadian Oscillation in the SCN, Hokkaido University Press, 2014; 37-49. 査読無
 9. Enoki R, Koizumi A. A method of horizontally-sliced preparation of the retina. Methods in Molecular Biology (Ocular Molecular Biology, Retinal degeneration). 2013; 935:201-5. doi: 10.1007/978-1-62703-080-9_13. 査読有

[学会発表] (計 34 件)

国際学会 (招待)

1. Enoki R, Ono D, Mieda M, Honma S, Honma KI. Multifunctional imaging of circadian rhythms in the suprachiasmatic nucleus, Asia Chronobiology Forum, Hokkaido, Sapporo, 2015. 9. 7-9.
2. Enoki R, Ono D, Mieda M, Honma S, Honma KI. Multicolor imaging of circadian rhythms in the suprachiasmatic nucleus. European Biological Rhythms Society (EBRS)/World Congress of Chronobiology (WCC) meeting, Manchester (UK), 2015. 8. 2-6.
3. Enoki R, Honma S, Honma KI. Single-cell resolution fluorescence imaging of functional neuronal networks in the circadian master clock. Society for Neuroscience, Washington DC (USA), 2014. 11. 14-20.
4. Enoki R, Honma S, Honma KI. Large-scale, high-resolution fluorescence imaging of circadian rhythm in the master circadian clock. Joint Annual Meeting of the Japanese Society for Mathematical Biology (JSMB) and the Society for Mathematical Biology (SMB), 大阪府立国際会議場 (大阪府・大阪市) 2014. 7. 30-8. 1.
5. Enoki R, Honma S, Honma KI. Large-scale imaging of calcium rhythm in the suprachiasmatic nucleus. Society for Neuroscience, San Diego (USA), 2013. 11. 9-14.

国内学会・シンポジウム (招待)

6. 榎木亮介, 小野大輔, 本間さと, 本間研一, 多機能同時計測による視交叉上核の細胞内機能カップリング機構の解明, シンポジウム「最新テクノロジーで迫る睡眠覚醒制御の多次元機能解析」,

- 第 93 回日本生理学会大会, 札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市), 2016. 3. 22-24.
7. 榎木亮介, 概日リズム中枢細胞ネットワークの多機能イメージング解析, 脳神経機能学のフロンティア, 東京薬科大学 (東京都・八王子市), 2016. 3. 12.
8. 榎木亮介, 概日リズム中枢神経ネットワークの多機能イメージング解析, 異分野融合ワークショップ, 奈良先端大学 (奈良県・生駒市), 2015. 12. 10-11.
9. 榎木亮介, 概日リズム中枢の大規模イメージング解析, 生理学会地方会総会, 北海道大学 (北海道・札幌市), 2014. 12. 5.
10. 榎木亮介, 生体のリズムを観る～生物時計中枢神経回路の画像解析～, 未来創薬・医療イノベーションセミナー, 北海道大学 (北海道・札幌市), 2014. 11. 26.
11. 榎木亮介, 時を刻む脳～概日リズム中枢の光イメージング解析～, 第三回ニューロフォトニクス研究会, 北海道大学 (北海道・札幌市), 2014. 11. 7.
12. 榎木亮介, 概日リズム中枢神経回路の可視化解析, 蛍光イメージングミニシンポジウム, 北海道大学ニコイイメージングセンター (北海道・札幌市), 2014. 9. 24.
13. 榎木亮介, 生物時計中枢の大規模イメージング解析, 第 91 回日本生理学会大会, 奨励賞受賞講演, 鹿児島大学 (鹿児島県・鹿児島市), 2014. 3. 16-18.
14. 榎木亮介, 概日リズム中枢細胞ネットワークのイメージング解析, 環境生理学プレコングレス, 久野賞受賞講演, レインボー桜島 (鹿児島県・鹿児島市), 2014. 3. 15.
15. 榎木亮介, 時を刻む脳～概日リズム中枢の可視化解析, 北大若手研究者交流会, 北海道大学 (北海道・札幌市), 2014. 1. 31.
16. Enoki R, Large-scale, high-resolution calcium imaging of circadian rhythm in the mammalian master clock, Kick-off Symposium 'Let's start collaboration' Hokkaido University Graduate School of Medicine & Dokuz Eylul University University, 北海道大学 (北海道・札幌市), 2013. 5. 27-28.
17. 榎木亮介, 振動ネットワークをみる: 視交叉上核の網羅的カルシウムイメージング, 第 90 回日本生理学会大会, タワーホール船堀 (東京都・江戸川区), 2013. 3. 27-29.

国内セミナー (招待)

18. 榎木亮介, 3 度目の正直～失敗例から学ぶ戦略的研究費獲得法～, 時間生物

- 学トレーニングコース，東京大学(東京都・文京区)，2015. 11. 20
19. 榎木亮介，生命現象を可視化する～光イメージングによる概日リズム中枢回路の作動原理の探求～，GE ヘルスケア・ジャパン はじめてのライフサイエンス基礎講座，TKP 札幌駅カンファレンスセンター（北海道・札幌市），2015. 6. 5.
 20. 榎木亮介，概日カルシウムリズムの制御機構と機能的役割，第三回視交叉上核アリーナ，北海道大学（北海道・札幌市），2015. 1. 22-23.
 21. 榎木亮介，視交叉上核ネットワークの多機能イメージング解析，第二回視交叉上核アリーナ，北海道大学（北海道・札幌市），2014. 1. 23-24.
 22. 榎木亮介，“光”で探る生物時計中枢細胞ネットワークの作動原理，生物リズム若手研究者の集い2013，四季の宿ぼぷら（山梨県・富士河口湖町），2013. 8. 26-27.
 23. 榎木亮介，視交叉上核ネットワークの多機能イメージング解析，第一回視交叉上核アリーナ，北海道大学（北海道・札幌市），2013. 8. 1-2.
 24. 榎木亮介，生物時計の多機能イメージング解析，イメージングブートキャンプ，北海道大学（北海道・札幌市），2013. 6. 10-14.
 25. Enoki R, Large-scale calcium imaging of circadian rhythm in the neuronal network, 第15回 WPI-IIIIS セミナー，筑波大学（茨城県・つくば市），2013. 4. 22-23.

国際会議発表（一般演題）

26. Enoki R, Ono D, Mieda M, Honma S, Honma KI, Multi-functional analysis of circadian rhythms in the mammalian master clock, 細胞機能と分子活性の多次元蛍光生体イメージング，国立京都国際会館（京都府・京都市），2015. 1. 26-28.
27. Enoki R, Imaging Circadian Calcium Rhythm in the SCN, 第68回藤原セミナー「Homeodynamics in Clocks, Sleep and Metabolism」，IBM 天城ホームステッド（静岡県・伊豆市），2014. 9. 25-27.
28. Enoki R, Topological specificity and hierarchical network of the circadian calcium rhythm in the SCN neuronal network, Gordon Research Conference in Chronobiology, サルヴェレジーナ大学（ロードアイランド州・米国），2013. 7. 14-19.

国内会議発表（一般演題）

29. 榎木亮介，概日リズム中枢神経ネットワークの多機能イメージング解析，時

- 間医学講座開講 10 周年記念シンポジウム，北海道大学（北海道・札幌市），2016. 3. 19
30. 榎木亮介，生物時計中枢における細胞ネットワークの計測・制御と再構成，第7回さきがけ領域会議，八芳園（東京都・港区），2015. 11. 26-27.
 31. 榎木亮介，小野大輔，本間さと，本間研一．複数機能同時計測による視交叉上核の細胞内機能カップリング機構の解析，時間生物学会，東京大学（東京都・文京区），2015. 11. 21-22.
 32. 榎木亮介，本間さと、本間研一，概日リズム中枢神経回路の多機能・高解像イメージング解析，環境生理プレコングレス（兵庫県・神戸市），2015. 3. 20
 33. Enoki R, Large-scale, high-resolution imaging of circadian calcium rhythm in the mammalian master clock, Optogenetics 2013, 慶應大三田キャンパス（東京都・港区），2013. 9. 26-27.
 34. 榎木亮介，本間さと、本間研一，視交叉上核神経回路網の大規模カルシウムイメージング解析，京都国際会館（京都市・京都市），2013. 6. 20-23.
 35. 榎木亮介，概日時計中枢を司る神経ネットワークの大規模イメージング解析，先端的光イメージング拠点形成プロジェクト 研究成果報告シンポジウム，北海道大学（北海道・札幌市），2013. 3. 18.

〔その他〕
 研究代表者ホームページ
<http://www.enokiryosuke.com/>

研究グループホームページ
<http://www.chronomedicine-sapporo.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榎木 亮介 (ENOKI, Ryosuke)
 北海道大学・大学院医学研究科・助教
 研究者番号：00528341