

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月22日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790268

研究課題名（和文） 概日カルシウム振動の大規模イメージング解析

研究課題名（英文） Large-scale imaging and analysis of circadian calcium rhythm

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

研究成果の概要（和文）：

ほ乳類の概日リズムの中核である視交叉上核の神経回路の作動原理を理解する為、長期蛍光イメージング法により 1000 個規模の神経細胞から数日間細胞内カルシウム濃度を測定した。その結果、視交叉上核神経回路には少なくとも 2 つの振動体（同期してリズムを刻む細胞集団）が存在し、細胞間連絡の薬理阻害により 2 振動体は次第に脱同調することが分った。これは、視交叉上核では細胞間連絡により正確かつ強靱な概日リズムを刻むことを示している。

研究成果の概要（英文）：

The present study was carried out to understand the network-level mechanisms of circadian rhythm in the mammalian master clock, suprachiasmatic nucleus (SCN) in the brain. We developed a unique time-lapse fluorescence imaging method and monitored circadian rhythms of intracellular calcium concentration in a large-population of neurons (>1000 cells) in the SCN. We found that two regional pacemakers are coupled under physiological condition, but these regions start to decouple by inhibiting neuronal connections. The results indicate that cell-cell interactions and regional coupling in the SCN network play crucial roles for generating coherent circadian rhythms.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：神経生理学

科研費の分科・細目：環境生理学(含体力医学・栄養生理学)

キーワード：概日リズム、視交叉上核、カルシウム、イメージング、神経回路網、共焦点顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

視交叉上核は全身の生理機能の約 24 時間周期リズムを駆動する概日時計の中核である。個々の細胞内におけるリズム発振機構は、時計遺伝子転写翻訳と抑制の転写翻訳フィードバックループが想定されており、その詳細な機序の解明が進んでいる。しかし最近の研究により、視交叉上核の個々の神経細胞は様々なレベルで（電気的特性や時計遺伝子発現/含有する神経伝達物質など）多種多様な特性を有し、回路網を形成して部位特異的な機能を有するなど、視交叉上核は単純な細胞の集合体ではなく、複雑な局所神経回路であることがわかってきた。転写翻訳フィードバックモデルでは想定できない現象も報告されてきており、回路網レベルでの遺伝子欠損の補償機構や回路固有の機能が存在することなどが示唆されている。生物時計をより深く正確に理解するためには、神経回路網レベルでの性質を理解することが必須と考えられる。

2. 研究の目的

視交叉上核の多数の神経細胞から高時間空間分解能で概日カルシウム振動を長期測定するため、低光毒性・低光退色の長期蛍光タイムラプス顕微鏡システムと、アデノ随伴ウイルスによる FRET 型蛍光タンパク質カルシウムプローブ感染導入法による神経細胞群へ長期遺伝子導入により、数百個～千個規模の神経細胞群から概日カルシウム濃度変化を数日～数週間の長期間測定する。概日カルシウム振動に関わるシグナル伝達のメカニズムを同定し、細胞間の同調/脱同調のメカニズムの実体を解明する。

3. 研究の方法

超高感度 CCD カメラとニポウディスク型の共焦点ユニットからなる長期イメージング観察用システムを独自に構築することで、超微弱光での蛍光イメージング観察を可能とし、蛍光観察の際の励起光による毒性や退色の問題を解決した。さらに、アデノ随伴ウイルスを用いた網羅的な神経細胞への感染発現により、蛍光タンパク質からなるカルシウムイオンプローブを視交叉上核の全ての神経細胞に発現させる実験手法を確立した。これにより、視交叉上核の神経細胞ネットワークから概日カルシウムリズムを測定することに成功した（図 1）。

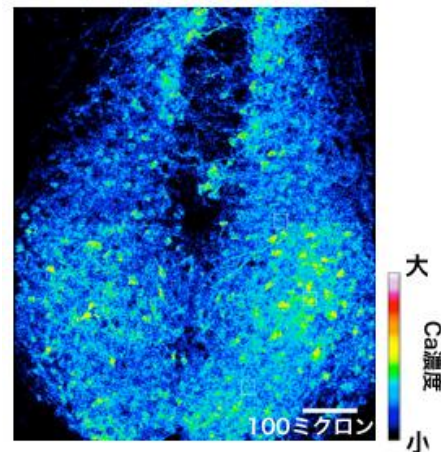


図 1：視交叉上核のカルシウムイメージング（最大ピーク時）

また、得られたイメージング像から概日リズムを規定する周期や位相などの主要なパラメーターを抽出する解析プログラムを作成して、概日カルシウムリズムの空間情報を自動的かつ網羅的に解析することにも成功した（図 2）。

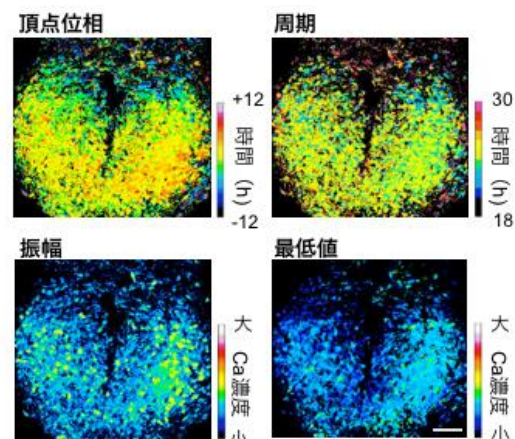


図 2：リズムパラメーターの空間マッピング

4. 研究成果

本研究により、視交叉上核内の個々の細胞のリズム特性を詳細に比較することで、視交叉上核内には少なくとも 2 つの異なる領域振動体が存在し、これらの領域は普段は細胞間連絡をして同期していることを見出した。さらに研究では、神経細胞の活動電位を薬理的に阻害することで、これらの 2 振動体は固有のリズムを刻み始め、次第に脱同調する（互いのリズムがずれる）ことが分かった。これらの結果は、視交叉上核の神経細胞ネットワークは、細胞間や領域間の相互連絡により、組織全体として正確で強靱な概日リズムを刻むことを示している。

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4件)

1) Enoki R, Koizumi A. A method of horizontally sliced preparation of the retina. *Methods Mol Biol.* 2013;935:201-5. doi: 10.1007/978-1-62703-080-9_13. 招待有、査読無

2) 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 109(52):21498-503. doi: 10.1073/pnas.1214415110. 査読有

3) Enoki R, Ono D, Hasan MT, Honma S, Honma K. Single-cell resolution fluorescence imaging of circadian rhythms detected with a Nipkow spinning disk confocal system. *J Neurosci Methods.* 2012 207(1):72-9. doi: 10.1016/j.jneumeth.2012.03.004. 査読有

4) 榎木亮介, 本間さと, 本間研一. 生物発光を利用した分子細胞機能のリアルタイム計測とその医療への応用. *光アライアンス* 2012; 23(10):18-21. 査読無

〔学会発表〕(計13件)

1) 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 2013年3月27日~29日. タワーホール船堀. 口頭発表. 招待講演.

2) 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. 2013年3月18日. 北海道大学. 口頭発表.

3) Enoki R. Large-scale time-lapse imagings of circadian calcium rhythm in the suprachiasmatic nucleus. 第10回未来創薬・医療イノベーション拠点形成国際シンポジウム 2012年10月2-3日. 北海道大学. ポスター発表.

4) Enoki R, Kuroda S, Ono D, Hasan M. T, Ueda T, Honma S, Honma KI. Large-scale calcium imaging of circadian rhythm in neuronal network of the suprachiasmatic nucleus. 4th International Symposium on Photonic Bioimaging. 2012年9月17日. 北海道大学. 口頭発表. 招待講演.

5) 榎木亮介, 黒田茂, 小野大輔, Hasan Mazahir, 上田哲男, 本間さと, 本間研一. 概日カルシウムリズムの大規模イメージング解析. 第19回日本時間生物学会学術集会 2012年9月15-16日. 北海道大学. ポスター発表.

6) 榎木亮介, 黒田茂, 小野大輔, Hasan Mazahir, 上田哲男, 本間さと, 本間研一. 概日リズム中枢を司る神経細胞ネットワークの大規模イメージング解析. 第四回光塾 2012年8月25-26日. 北海道大学. 口頭発表. 招待講演

7) 榎木亮介, 黒田茂, 小野大輔, Hasan Mazahir, 上田哲男, 本間さと, 本間研一. タイムラプス共焦点システムを用いた概日カルシウムリズムの時空間解析. 第89回日本生理学会大会 2012年3月29-31日. 信州大学. ポスター発表.

8) Enoki R. Large-scale calcium imaging of circadian rhythm in neuronal network of the suprachiasmatic nucleus. *Frontier in Behavioral Brain Science.* 2012年3月19-20日. 東京国際フォーラム. ポスター発表.

9) 榎木亮介, 黒田茂, 小野大輔, Hasan Mazahir, 上田哲男, 本間さと, 本間研一. 共焦点タイムラプス測定による概日リズム解析. 第18回日本時間生物学会学術集会 2011年11月24-25日. 名古屋大学. ポスター発表.

10) 榎木亮介, 黒田茂, 小野大輔, Hasan Mazahir, 上田哲男, 本間さと, 本間研一. 新規光計測法による概日リズム解析. 北海道大学連携研究センターシンポジウム 2011年11月4日. 北海道大学. 口頭発表.

11) Enoki R. Time-lapse fluorescent confocal imaging of circadian rhythm in the suprachiasmatic nucleus circuits. 3th International Symposium on Photonic Bioimaging. 2011年10月21-23日. 京王プラザホテル札幌. ポスター発表.

12) Enoki R. Time-lapse Confocal Imagings of Circadian Rhythm in Neuronal Network of the Suprachiasmatic Nucleus. 第9回未来創薬・医療イノベーション拠点形成国際シンポジウム 2011年9月29-30日. 北海道大学. ポスター発表.

13) 榎木亮介, 黒田茂, 小野大輔, Hasan Mazahir, 上田哲男, 本間さと, 本間研一.

Time-lapse confocal imaging of circadian gene expression and calcium in neuronal networks of suprachiasmatic nucleus. 日本神経科学学会 2011年9月14-17日. パシフィコ横浜. 口頭発表.

〔その他〕

2012年12月6日、北海道大学広報を通じてプレスリリースを行い、北海道新聞（12月6日夕刊）、日本経済新聞（12月6日夕刊）、北海道医療新聞（12月14日）など、約40紙で研究成果が紹介された

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