

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K16645

研究課題名(和文) 高速カルシウム計測による視交叉上核神経回路の機能的構造解析

研究課題名(英文) Analysis of transient calcium activities in the mammalian central circadian clock

研究代表者

織田 善晃 (ODA, Yoshiaki)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・助教

研究者番号：20735542

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類のサーカディアンリズムは脳・視床下部の視交叉上核に存在するリズム中枢により調整されている。視交叉上核は約2万個の神経細胞がネットワークを構築し連携してリズム情報を発振すると考えられるが、この連携機構は不明である。本研究課題では高速・長期間の蛍光カルシウムイメージングを行い、神経細胞としての特徴であるミリ秒単位の神経活動がサーカディアンリズム形成にどのように寄与するかを解析した。さらに膜電位のサーカディアンリズムや単離細胞での解析により、細胞集団のサーカディアンリズム形成機構の一端を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体の生理機能は約24時間周期の変動(概日リズム)を示し、多様な機能を最適な時間に配分することで1日の環境変化に適応することができる。概日リズムは、ヒトを含む哺乳類では脳視床下部の視交叉上核に在る約2万個の神経細胞により制御されている。しかしこれらがどのように連携し概日リズムを形成しているかの理解に乏しい。

本研究では神経細胞の活動を細胞1個単位で視覚化し観察することにより、視交叉上核における概日リズム形成機構の一端を解明した。ヒトは社会生活の中で体が本来持つ概日リズムと大きく異なる行動を起こすことがあるが、その影響や不全の治療を行うための基本的な性質を理解するために本研究は有意義である。

研究成果の概要(英文)：The central circadian clock in mammals locate in the suprachiasmatic nucleus (SCN). The SCN controls the circadian rhythmicity of the whole body, although the significance of the SCN neuronal network is not understood.

In this study, we aimed to know the contribution of transient calcium activities of SCN neurons in creating circadian rhythms. We performed high-time resolution calcium imaging in cultured SCN slices and analyzed the properties of transient activities. We also performed voltage imaging in SCN slices, circadian calcium imaging in solitary cultured SCN neurons, and revealed the network mechanism in creating circadian rhythms.

研究分野：神経生理学

キーワード：サーカディアンリズム カルシウム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生体の生理機能は約 2 4 時間の日内変動(サーカディアンリズム)を示し、多様な機能を最適な時間に配分することで 1 日の環境適応を円滑に行うことができる。サーカディアンリズムの根幹は細胞における時計遺伝子とその転写産物による負のフィードバック調節が細胞機能に周期性をもたらすもので、これは生殖細胞や幹細胞などを除く全身のほぼ全ての細胞で行われている。各細胞は個々では独自の周期・位相のサーカディアンリズムを刻むが、個体がもつサーカディアン中枢から発振されるリズム情報により全身レベルで周期・位相が整えられている。

哺乳類のサーカディアン中枢は脳深部にある視床下部の視交叉上核に存在することが知られている。視交叉上核は網膜からの光情報を直接受け取り、全身に約 24 時間周期のリズム情報を発振し、睡眠・覚醒リズムや生理機能を調節している(図 1)。この神経核は約 2 万個の神経細胞により構成されており、形態学的に大きく腹外側部と背内側部の二つの領域に分けられる。腹内側部に位置する神経細胞は主に網膜からの入力を受け、背内側部の神経細胞へと情報を伝達すると考えられている。従来の遺伝子・タンパクの発光レポーターを用いた光計測により、視交叉上核におけるサーカディアンリズムの発現は背内側部から腹内側部へ伝播していくように見える特徴的な空間パターンを示し、神経細胞集団が階層的なネットワーク構造を形成していることが示唆された(Welsh et al., 2010, Annu. Rev. Physiol.)。さらに近年、蛍光プローブを用いた一細胞解像度での解析により、個々の神経細胞において細胞内のカルシウムイオン動態がサーカディアンリズムを示すことが分かった(Enoki et al., 2012, PNAS)。

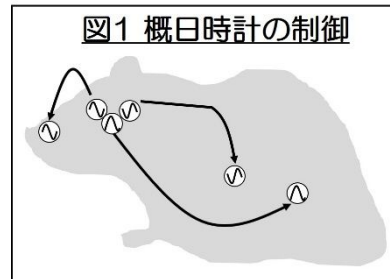


図1 概日時計の制御

一方、神経細胞の特徴の一つであるミリ秒単位の速い時間スケールの活動が「日」レベルの長い時間スケールであるサーカディアンリズムの形成にどのように寄与しているかは分かっていない。視交叉上核神経細胞は活動電位の発火頻度にサーカディアンリズムを示し、さらに局所的なテトロドトキシン(電位依存性 Na チャネルブロッカー)投与実験により個体のサーカディアンリズム(行動リズム)が消失することから、リズム情報は活動電位によって視交叉上核から末梢部位へ発振されることが報告されている。しかしながら視交叉上核の神経ネットワーク内における挙動は分かっておらず、個々の神経細胞活動が視交叉上核全体としての機能にどのように貢献しているかという問いに対する答えは得られていない。

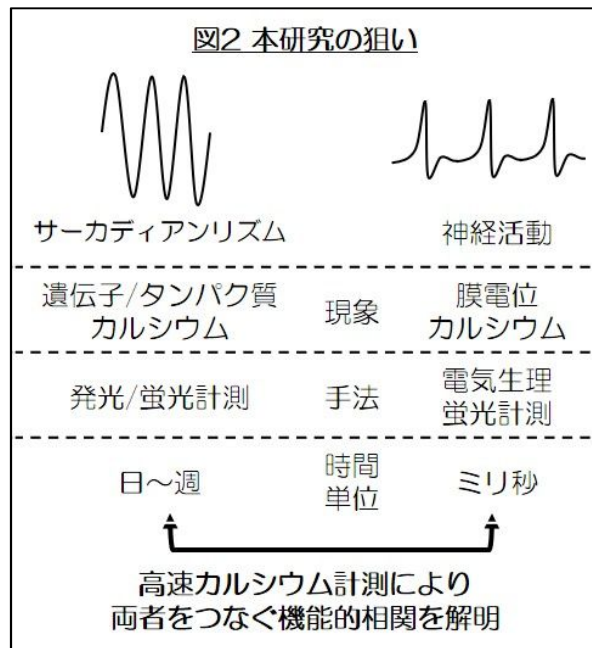


図2 本研究の狙い

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、サーカディアンリズムという長期間の現象を観察しつつ、神経細胞の速い活動がサーカディアンリズム形成にどのように寄与しているかを解明することである。

### 3. 研究の方法

高感度・高速度 CCD カメラとディスク回転式共焦点システムからなる長期蛍光タイムラプスシステムを用い、イメージング観察を行った。視交叉上核神経細胞の活動の指標として細胞内カルシウム動態を観察した。細胞内においてカルシウムは多様なシグナル伝達に関与しており、複雑な動態を示すことが知られている。視交叉上核神経細胞においては細胞内のカルシウム濃度がサーカディアンリズムを示すことが報告されている。さらに一般的に神経細胞においては活動電位などの速い電気活動に伴い、細胞内のカルシウム濃度がミリ秒単位の速度で上昇し時間経過と共に静止状態に戻る一過性変動を示すことが知られている。そこで本研究ではこの、大きく時間経過の異なる 2 系統のカルシウム動態に着目し、観察・解析を行った。標本には培養視交叉上核スライスを用いた。細胞内のカルシウム動態を観察するため、高輝度・高速変化を示す遺伝子コード型蛍光カルシウムプローブ GCaMP6f (f: fast) を視交叉上核の神経細胞特異的に発現させた。GCaMP6f はアデノ随伴ウイルスを用いた遺伝子導入法により細胞に感染発現させた。イメージング観察は 2 種類の画像撮影方法を経時的に行った。カルシウムのサーカディアンリズム測定を行うため、1 秒間の長露光時間撮影を 1 時間毎に行った。速い時間経過の神経活動として一過性カルシウム変動を観察するため、同時に高時間分解能の連続撮影を行った。30 フレーム/秒の速度で 20 秒間連続撮影(高速カルシウムイメージング)し、これを毎時の長露光時間撮影の直後に行った。これにより、1 時間毎に 1 秒間の積算値を反映したサーカディアンカルシウムリズムと、最短 30 ミリ秒の高時間分解能での神経活動の観察を同時に行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 高速カルシウムイメージング

当初の想定では、培養視交叉上核スライスにおいて1細胞レベルで一過性カルシウム変動が観察され、これらの発生頻度や振幅などにサーカディアンリズムが観察できると期待していた。従来報告されたサーカディアンカルシウムリズムはこの一過性変動が長露光時間観察という手法の影響により時間的に平均化され、サーカディアンリズムの波形として観察されたものと想定していた。しかしながら本研究結果は予想と異なるものとなった。

まず1時間ごとに行った高速カルシウムイメージングにより得られた連続画像において一細胞の蛍光輝度の経時変化を計測し、一過性カルシウム変動の有無を解析した。その結果、観察した視交叉上核神経細胞(n=3128)のうち99%は一過性カルシウム変動を示さなかった(図3)。また全体の0.7%の細胞は一過性カルシウム変動を示したものの、それは観察期間中の1時点のみであり、複数の時刻にわたって一過性カルシウム変動を示した細胞は全体の0.3%であった。観察された一過性カルシウム変動の発生タイミングと、その細胞のサーカディアンカルシウムリズムの位相とを比較したが、発生タイミングに特徴を見出すことはできなかった。

一過性カルシウム変動が観察されなかったことは測定系の感度不足により検出できなかったという可能性を考慮し、一過性変動を示さないGFPタンパクを視交叉上核神経細胞に発現させ、測定系由来の振動(ノイズ)の特徴を高速カルシウムイメージングのシグナルから除去する試みを行ったが、結果が変わることはなかった。

さらに視交叉上核スライスのみで行ったサーカディアンカルシウム/高速カルシウムイメージングの同時計測を、視交叉上核よりさらに背側部に位置する旁室傍核領域および室傍核でも行った。ここではイメージングの頻度を上げ、1時間毎に行っていた撮影を10分毎に行い、より時間解像度の高い観察を行った。この結果、これらの領域では細胞内カルシウム濃度に30分から4時間程度の短周期のウルトラディアンリズムが観察された。このウルトラディアンリズムの振幅が低い時点では一過性カルシウム変動の発生頻度は低く、振幅の上昇と共に発生頻度が上昇することが観察された。このことからウルトラディアンリズムはミリ秒スケールの一過性カルシウム変動の頻度が変動することにより形成されることが分かった(Wu et al., 2018, PNAS)。また、本測定系は一過性カルシウム変動を観察するための環境を十分に満たしていることも示された。

以上の結果から視交叉上核の神経細胞において観察されるサーカディアンカルシウムリズムが一過性カルシウム変動の発生頻度や振幅の変化により形成されるとする予想は否定され、細胞内カルシウム濃度の静止レベルが変動することにより生じるものであることが分かった。

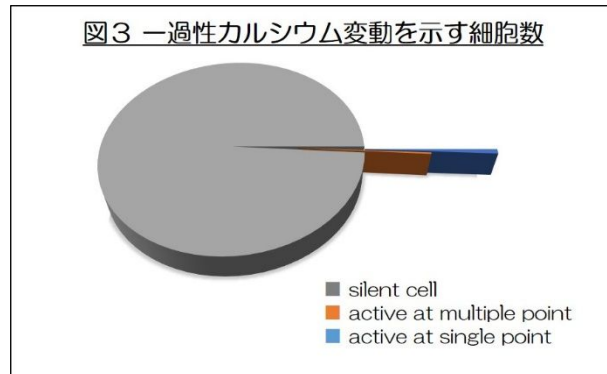
##### (2) 長期膜電位イメージング

視交叉上核の神経ネットワークがどのようにサーカディアンリズム中枢として機能しているかという問いを解明するため、視交叉上核神経細胞の膜電位変動を長期的に観察する実験を行った。膜電位変化により蛍光輝度が変化する遺伝子コード型膜電位感受性タンパクを感染発現させ、長期蛍光イメージング観察を行った。その結果、視交叉上核の膜電位はサーカディアンリズムを示す事が観察された。さらにカルシウムプローブとの同時計測を行うことで両者の位相関係を解析し、カルシウムリズムは特徴的な空間パターンを示すことに対し膜電位リズムは視交叉上核ネットワーク全体として同位相のサーカディアンリズムを示すことが分かった。この結果により、視交叉上核ではサーカディアンリズムの空間パターンを膜電位変化として全体を1つの位相にまとめ、視交叉上核外へ発振しているという可能性を見出した(Enoki, Oda, et al., 2017 PNAS)。

##### (3) 単一培養細胞イメージング

神経細胞一般的な現象として入力を受けることにより細胞内カルシウム濃度が変動することが知られている。またDNA合成を含む細胞内の多様な生理機能においてカルシウムは重要なメッセンジャーとして機能する。このことから本研究において神経細胞活動の指標として観察したサーカディアンカルシウムリズムの発生機序について、単一細胞のみで生じる現象であるか、入力依存的に生じるものであるかという2つの仮説が挙げられた。これを解明するために、神経投射を受けないよう物理的に単離した培養視交叉上核を用いて長期蛍光カルシウムイメージングを行った。その結果単一の視交叉上核神経細胞でもサーカディアンリズムがあることを発見した(Hirata et al., 2019, PNAS)。

図3 一過性カルシウム変動を示す細胞数



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hirata Yoshihiro, Enoki Ryosuke, Kuribayashi-Shigetomi Kaori, Oda Yoshiaki, Honma Sato, Honma Ken-ichi	4. 巻 9
2. 論文標題 Circadian rhythms in Per1, PER2 and Ca2+ of a solitary SCN neuron cultured on a microisland	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 18271
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-54654-5	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 Wu Yu-Er, Enoki Ryosuke, Oda Yoshiaki, Huang Zhi-Li, Honma Ken-ichi, Honma Sato	4. 巻 115
2. 論文標題 Ultradian calcium rhythms in the paraventricular nucleus and subparaventricular zone in the hypothalamus	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 E9469 ~ E9478
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.1804300115	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 該当する

1. 著者名 Enoki R, Oda Y, Mieda M, Ono D, Honma S, and Honma KI	4. 巻 114
2. 論文標題 Synchronous circadian voltage rhythms with asynchronous calcium rhythms in the suprachiasmatic nucleus.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America	6. 最初と最後の頁 2476-2485
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.1616815114	査読の有無 有
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10件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 織田善晃, 榎木亮介, 高須奈々, 中村渉, 本間研一, 本間さと
2. 発表標題 高速蛍光イメージングを用いた概日時計中枢神経細胞の概日Ca2+リズム形成機構の解析
3. 学会等名 第69回西日本生理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 織田善晃, 榎木亮介, 本間研一, 本間さと
2. 発表標題 高速蛍光計測による視交叉上核神経細胞の概日Ca <sup>2+</sup> リズムの形成機構の解析
3. 学会等名 第25回日本時間生物学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshiaki Oda, Ryosuke Enoki, Ken-ichi Honma, and Sato Honma
2. 発表標題 Fast fluorescent imaging reveals the mechanism of circadian calcium rhythms in suprachiasmatic nucleus neurons
3. 学会等名 International Symposium on Biological Rhythms (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshiaki Oda, Ryosuke Enoki, Ken-ichi Honma, and Sato Honma
2. 発表標題 Understanding circadian calcium rhythms by fast calcium imaging techniques in suprachiasmatic nucleus neurons
3. 学会等名 Gordon Research Conference Chronobiology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 織田善晃, 榎木亮介, 本間研一, 本間さと
2. 発表標題 視交叉上核神経細胞の概日Ca <sup>2+</sup> リズムはCa <sup>2+</sup> の静止濃度の変動による
3. 学会等名 第24回日本時間生物学会学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 織田善晃、榎木亮介、本間研一、本間さと
2. 発表標題 Simultaneous imaging of circadian Ca <sup>2+</sup> rhythms and fast Ca <sup>2+</sup> activities in the suprachiasmatic nucleus.
3. 学会等名 第94回日本生理学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 織田善晃、榎木亮介、本間研一、本間さと
2. 発表標題 視交叉上核神経細胞における概日Ca <sup>2+</sup> リズムの形成機構：高速蛍光Ca <sup>2+</sup> イメージングによる解析
3. 学会等名 第12回環境生理学プレコンgres
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 織田善晃、榎木亮介、本間研一、本間さと
2. 発表標題 視交叉上核神経細胞における概日Ca <sup>2+</sup> リズムと一過性Ca変動の光イメージング計測.
3. 学会等名 第23回日本時間生物学会学術大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 織田善晃
2. 発表標題 Monitoring circadian rhythms and transient activities of intracellular Ca <sup>2+</sup> in suprachiasmatic nucleus neurons.
3. 学会等名 Sapporo Symposium on Biological Rhythm in 2016 (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 織田善晃、榎木亮介、本間研一、本間さと
2. 発表標題 Simultaneous imaging of fast neuronal activities and circadian calcium rhythms in the suprachiasmatic nucleus.
3. 学会等名 第39回日本神経科学大会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----