

平成 22 年 5 月 10 日現在

研究種目：基盤研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19390057
 研究課題名 (和文) 組織時計の統合：覚醒個体における時計遺伝子発現の *in vivo* 分子イメージング
 研究課題名 (英文) *In vivo* imaging of clock gene expression in conscious animals
 研究代表者
 本間 さと (HONMA SATO)
 北海道大学・大学院医学研究科・教授
 研究者番号：20142713

研究成果の概要：本研究は、*in vivo* で、無麻酔・無拘束動物から時計遺伝子発現リズムを計測し、視交叉上核 (SCN) に局在する哺乳類の中枢時計の行動リズム制御メカニズムを明らかにすることを目的として行った。時計遺伝子 *Per1* プロモータ支配下に発光酵素ルシフェラーゼを発現する *Per1-luc* マウスを用い、自発行動量と光ファイバーによる SCN の時計遺伝子発現を同時計系を構築し、1 分毎の連続測定を行った。その結果、SCN、嗅球いずれからも、安定した *Per1-luc* のフリーランリズムが計測された。さらに、光同調や位相反応を示すことから、内因性振動を反映していることが確認できた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	9,700,000	2,910,000	12,610,000
2008 年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：医歯薬学・環境生理学 (含体力医学・栄養生理学)

キーワード：生理学、生体リズム、生物発光、神経科学、時計遺伝子

1. 研究開始当初の背景

約 24 時間のリズムを発振する生物時計は、単細胞からヒトまですべての生物がもつ生存のための重要な生体戦略である。生物時計の分子機構は、単細胞からヒトまで、時計遺伝子の転写・翻訳フィードバックループによる自律的リズム発振にあると考えられている (Reppert&Weaver, Nature 2002)。

哺乳類における分子時計機構の研究は、時計遺伝子プロモーター支配下にルシフェラーゼを発現するトランスジェニック動物の開発により著明に進展し、視交叉上核以外の末梢培養組織 (Yamazaki et al, Science 2000) や株化細胞 (Nagoshi et al, Cell. 2004) が、安定した時計遺伝子発現リズムを示すことが分かった。この結果、視床下部視交叉上核 (SCN)

にある生物時計(中枢時計)の機能は、自律振動する各組織時計の同調や統合にあることが分かったが、そのメカニズムは依然不明である。研究代表者は、哺乳類時計遺伝子クローニング当初から、*Bmal1*のリズム発振をはじめ(BBRC,1998)30編以上の時計遺伝子機能に関する論文を発表すると共に、bHLH転写因子*Dec1,Dec2*サブグループの存在を発見し(Honma et al, Nature,2002)、多重ループによる振動の安定化が哺乳類生物時計の特徴であることを明らかにした。さらに、*Bmal1*のレポーターマウスを世界に先駆けて作成し、これを用いて組織時計の安定性と高精度な位相調節を明らかにした(Nishide et al,GTC, 2006.図3)。また、発光分子イメージングの開発・普及、測定系の開発・改良に努めた。この間、光、蛍光、RIなど各種プローブによるイメージングや放射線量*in vivo*測定に関するプロジェクトに参加し、各種光ファイバーの改良が進み、覚醒動物において同時多臓器のモニタリングを行う研究環境が整ってきたことを知った。光ファイバーは急速な普及により単価が下がり、周辺機器も揃ったため、*in vitro*測定で蓄積したノウハウを*in vivo*測定に応用できる段階にある。

一方、研究代表者は、*Clock* 変異マウス SCN 神経のマルチ電極測定により、細胞間リズム同期が個体のリズム発振に必須であること(Nakamura et al. Nat.Neurosci.2002)を明らかにして以来、細胞レベルと個体レベルでの時計遺伝子機能の差異の原因を追及してきた。遺伝子機能の生理的意義は、個体機能との照らし合わせなくしては不明である。優れた分子マーカーの動きを、自由に行動する動物の個体内で連続測定することにより、中枢時計が末梢機能、特に行動リズムを制御するメカニズムを検討することを着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究は、無麻酔・無拘束の動物個体の脳深部からの時計遺伝子発現と自発行動リズムを、リアルタイムに連続測定解析システム

を構築し、これを用いて SCN の中枢時計が環境変化に応じてリズム変位を示すと共に、全身の各臓器に局在する組織時計を統合するメカニズムを明らかにすることを目的として行った。このため、光ファイバーを脳内に挿入し、高感度測光システムに組み合わせ、時計遺伝子発現を長期計測する。これまでの発光リズム計測は、培養組織や培養細胞に限られてきた。一方、体表から発光を計測するイメージング機器は市販されているが、麻酔動物における短時間計測のための機器であり、生理的な刺激への反応や、長期に渡る計測を想定したものは皆無である。個体内、しかも環境情報を正常に感受し、かつ全身レベルで刺激に応答可能な自由行動中の覚醒個体においてレポーター解析を行うには、未だ機器開発を含め多くの障害が存在する。本研究では、時計遺伝子 *Per1* プロモーター支配下に発光酵素ルシフェラーゼを発現する *Per1-luc* トランスジェニックマウスを用い、SCN や他の脳部位からの発光活性を計測することにより、生理的な全身の反応が可能な動物において、中枢時計がいかに全身を統合しているかを検討することを目的とする。

3. 研究の方法

動物：研究には独自に開発した *Per1* プロモーター活性支配下にホタルルシフェラーゼを発現する C57BL/6J バックグラウンドの *Per1-luc* マウスを用いた。使用したレポーター配列は *Per1* プロモーター領域 6.8kb を含み、生理的な反応をほぼすべてレポート可能であることが示されている。また、本マウスの行動リズム、明暗サイクル下における自発行動、恒常暗の下でのフリーラン周期、光パルスによる位相依存性リズム位相シフトなどのサーカディアンリズムの formal property はすべて野生型と有意差がない。SCN や大脳皮質における時計遺伝子発現リズムにも、野生型と有意差がないことをすでに確認済みである。

発光計測システム：光ファイバーはファイバー直径 0.5mm、被覆を加えて直径 1mm のプラ

スチックファイバーを用い、両端を研磨して使用した。発光計測機器は、アトー社クロノスに準じ、恒温槽とターンテーブルを除いた計測部のみで作成した。

行動リズム計測：赤外線感熱センサーを用いて自発行動量を計測し、Stanford Chrono Kitを用いて1分ごとにコンピュータに蓄積した。リズムの解析にはClock Labを用いた。

動物手術：イソフルラン麻酔下で定位脳固定手術法にてガイドカニューレをSCNおよび嗅球直上に設置し、1週間の回復期において光ファイバーを介して発光・行動同時計測を行った。腹腔内に移植したオスモティックミニポンプを介し、基質ルシフェリンK塩を連続投与した。ポンプは、所定の期間で、イソフルラン麻酔下に新たなポンプに入れ替えた。

4. 研究成果

(1) In vivo 発光計測システムの構築

浜松ホトニクス社性光電子増倍管PMT:R7518Pを用い、光ファイバーから連続発光計測を行った。第一号機は、不安定で高い基礎値のため内因性発光計測に不適と判断し、改造を行った。光電子増倍管を4℃にペルチェ冷却した結果、安定した低レベルの基礎値を得ることができた。また、集光レンズの焦点距離を1mmから9mmに変更し、ファイバーの多少のずれが集光に影響しないようにした。さらに、光パルスや光同調実験のため、照明タイマーと連動したシャッターを設け、照明点灯前にシャッターを閉め、消灯後にシャッターを開けるシステムを追加した。

また、研究開始時には透過率の高いグラスファイバーを選択して実験を行ったが、可動性が悪く、重く、マウスに多大な負担がかかるだけでなく、先端が折れることが多く、マウスを対象とした実験には不向きであることが判明した。そこで、メチルメタクリル樹脂ファイバーに変更し、先端の十分な研磨により透過率を上げることに成功した。このファイバーは、軽くて可動性がよく、数ヶ月間ファイバーを取り付けてもマウスの摂食や自発行動に影響しないことを確認した。

また、LEDを用いた実験により、先端形状、

光源からの距離と発光値を検討した。その結果、先端は平坦であることが望ましく、かつ、光源とごく近接した発光のみ測定できることが判明した。(図1)

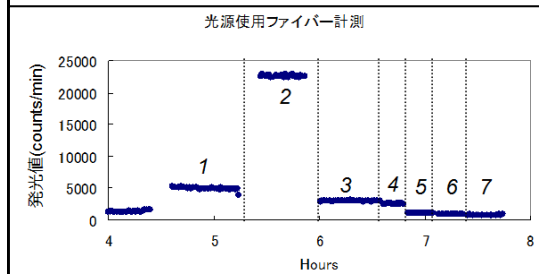


図1. 光源からの位置と先端形状の発光値への影響. 左端: 光源点灯なし. 1. 先端密着斜めカット, 2. 密着水平カット, 3-7: 光源から1, 2, 3, 4, 5mm 離す.

(2) in vivo *Per1-luc* リズム計測

*Per1-luc*マウスを用いたSCNからの連続発光計測の結果を図2に示す。本システムを用い、脳深部からの長期間の計測が可能となった。SCN、嗅球とも発光リズムピークは内因性リズムピークと一致し、同時計測した自発行動リズムと一致したフリーラン周期を示した。このため、計測した発光リズムは、内因性の*Per1*発現を反映していることが明らかとなった。

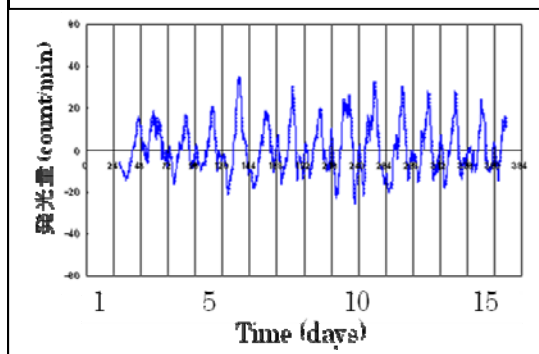


図2: 無麻酔無拘束マウス SCN からの発光リズム (24時間トレンドデータ)

(3) 光反応性

12時間の明暗サイクルに同調していたマウスを、光ファイバーによる発光測定の前半に点灯と消灯時刻にあたる6時と18時に30分のみ光を照射する枠光周期に曝露した。その後、枠光周期を6時間位相変位した。その結

果、*Per1* 発現に2つの光パルスに一致した発光変動が確認され、このリズムは棒光周期の変動に伴い、変化した。また、恒常暗下ではフリーランを示した(図3)。一方、1分毎の発光レベルには活動に7-8分遅れた上昇が現れ、行動によるノイズあるいは、活動に伴う血流量上昇がもたらした基質・酸素濃度の上昇による影響、などの可能性が考えられた。今後、基質濃度を増やす、行動を抑制する、などの方法でノイズ原因を明らかにし、より時間分解能のよい測定系を構築する予定である。

今回、光パルスによる *Per1* 誘導は観察できなかった。理由の1つには、上記ノイズが考えられるが、測定した部位が *Per1* の光誘導を示さない位置である可能性もある。図1に示したように、光源からわずかに離れただけで、ファイバーを介した発光値は激減する。測定値、ファイバー先端の狭い範囲の発光量を反映する可能性が大である。むしろ、この特徴を活かし、今後、SCN 内の光反応性の部位差を *in vivo* 計測により追求していきたい。

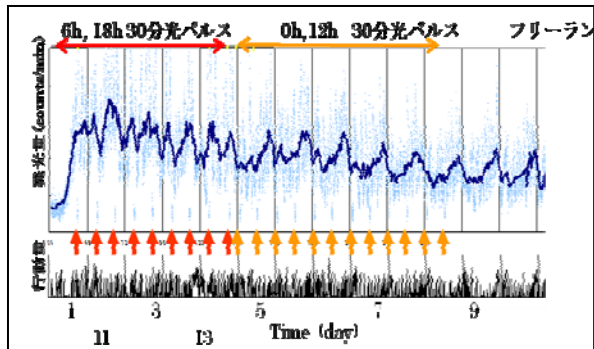


図3: SCNからの*Per1-luc*リズム(上段)と同時に計測した行動リズム(下段)水色は1分毎の発光値、藍色は4時間移動平均値を示す。

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21件)

1. Noshiro M, Usui E, Kawamoto T, Sato F, Nakashima A, Ueshima T, Honda K, Fujimoto K, Honma S, Honma K, Makishima M and Kato Y. The liver X receptors (LXR α and LXR β) are potent regulators for hepatic Dec1

expression *Genes Cells*14:29-40, 2009. 査読有

2. Baba K, Ono D, Honma S and Honma K. A TTX sensitive local circuit is involved in the expression of PK2 and BDNF circadian rhythms in the mouse suprachiasmatic nucleus. *Eur J Neurosci* 27: 909-916, 2008. 査読有
3. Honma S, Inagaki N, Ono D, Yoshikawa T, Hashimoto S and Honma K. Clock mechanisms for seasonal adaptation: Morning and evening oscillators in the suprachiasmatic nucleus. *Sleep Biol Rhythms* 6: 84-90, 2008. 査読無
4. Yamanaka Y, Honma S and Honma K. Scheduled exposures to a novel environment with a run-ning-wheel differentially accelerate re- entrain- ment of mice peripheral clocks to new light- dark cycles. *Genes Cells* 13:497-507, 2008. 査読有
5. Nishide S, Honma S and Honma K. The circadian pacemaker in the cultured suprachiasmatic nucleus from pup mice is highly sensitive to external perturbation. *Eur J Neurosci* 27:2686-2690, 2008. 査読有
6. Nakashima A, Kawamoto T, Honda KK, Ueshima T, Noshiro M, Iwata T, Fujimoto K, Kubo H, Honma S, Yorioka N, Kohno N, Kato Y. DEC1 modulates the circadian phase of clock gene expression. *Mol Cell Bio.* 28:4080-4092. 2008. 査読有
7. Kononenko NI, Honma S, Dudek FE, and Honma KI. On the role of calcium and potassium currents in circadian modulation of firing rate in rat suprachiasmatic nucleus neurons: Multi- electrode dish analysis. *Neurosci Res.* 62:51-57, 2008. 査読有
8. Honma S, Yasuda T, Yasui A, van der Horst GTJ and Honma K. Circadian Behavioral Rhythms in *Cry1/Cry2* Double Deficient Mice Induced by Methamphetamine. *J Biol Rhythms* 23:91-94,2008. 査読有
9. 吉川朋子、本間さと、本間研一. 生体リズムの分子機構 *日本臨床*66巻2(通巻933)増刊号 臨床睡眠学: 睡眠障害の基礎と

- 臨床. 90-95, 2008. 査読無
10. 増渕悟、**本間さと**、本間研一. モデル動物を使った睡眠研究. ヒト型睡眠の特徴とそのモデル化. *細胞工学* 27:456-460, 2008. 査読無
 11. 山仲勇二郎、**本間さと**、本間研一. 真夜中の人体の生理. *JIM* 18: 820-825, 2008. 査読無
 12. 山仲勇二郎、**本間さと**、本間研一. 睡眠と生体リズム, 概日リズムの位相制御. *脳* 21. 11: pp.26-31, 2008. 査読無
 13. Abe H, **Honma S**, and Honma K. Daily restricted feeding resets the circadian clock in the suprachiasmatic nucleus of CS mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292: R607-R615, 2007. 査読有
 14. Masubuchi S, **Honma S**, Abe H, Nakamura W and Honma K. Methamphetamine induces circadian oscillation in the brain outside the suprachiasmatic nucleus in rats. *Sleep Biol Rhythms* 5:132-140,2007. 査読有
 15. Inagaki N, **Honma S**, Ono D, Tanahashi Y and Honma K. Separate oscillating cell groups in mouse suprachiasmatic nucleus couple photoperiodically to the onset and end of daily activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104:7664-7669, 2007. 査読有
 16. Hayasaka N, Yaita T, Kuwaki T, **Honma S**, Honma KI, Kudo T and Shibata, S. Optimization of dosing schedule of daily inhalant dexamethasone to minimize phase-shifting of clock gene expression rhythm in the lungs of the asthma mouse model. *Endocrinology*. 148:3316-3326,2007. 査読有
 17. Noshiro M, Usui E., Kawamoto T, Kubo H, Fujimoto K, Furukawa M. **Honma S**, Makishima M, Honma K and Kato Y. Multiple regulatory mechanisms for the circadian expression of hepatic Cyp7a. *J Biol Rhythms* 22:299-311, 2007. 査読有
 18. **本間さと**、本間研一. ラットの眠りをヒトの眠りにーメタンフェタミンモデルを用いた睡眠覚醒リズム制御研究- *週間医学のあゆみ* 220:279-284,2007. 査読無
 19. 橋本聡子、**本間さと**、本間研一. 睡眠と生体リズム. *日本薬理学会誌* 129 : 400-403,2007. 査読無
 20. 棚橋祐典、**本間さと**、本間研一. 中枢時計と末梢時計の統合. *Clinical Neuroscience*: 250,10,1105-1108,2007. 査読無
 21. 中村 渉、**本間さと**、本間研一. Clock遺伝子と概日リズム形成. *Clinical Neuroscience* 250,10,1112-1115,2007. 査読無
- [学会発表] (計 12 件)
1. **Honma S**. Bioluminescence imaging for assessing heterogeneous cell functions in the central circadian clock. The 6th Symposium for Future Drug Discovery and Medical Care “Molecular Imaging for Integrated Medical Therapy”. Sapporo, March 13-14,2009.
 2. **本間さと**. ヒト睡眠覚醒リズム障害の動物モデル: メタンフェタミン慢性投与と行動・睡眠リズムの脱同調 日本睡眠学会第 33 回学術集会, 福島, 6/5-26, 2008.
 3. 吉川朋子、**本間さと**、本間研一、マイケル・メナカー. 卵巣に存在する概日時計の中枢 時計による位相調節. シンポジウム「生理機能を支配する末梢時計: 生物リズム研究の新展開」第 85 回日本生理学会大会プログラム. 東京, 3/25-27, 2008
 4. **本間さと**. 光でみる生体リズム: 細胞時計のダイナミズム Asahikawa Winter Conference on Molecular Medicine 旭川, 2/2, 2008.
 5. **本間さと**. ルシフェラーゼレポーターを用いた遺伝子発現の連続測定: 組織リズムと細胞リズム. 第 2 回未来医療イノベーションシンポジウム. 11/21,2007
 6. **Yoshikawa T, Honma S**, and Honma K. *Per1-luc* oscillations and localization of neuropeptides in the suprachiasmatic nucleus. Symposium “Functional structure of the suprachiasmatic nucleus.” 日本睡眠学会第 34 回学術集会・第 14 回日本時間生物学会合同大会, 東京, 11/7-9, 2007.

7. Inagaki N, **Honma S.** and Honma, K.
Oscillatory cell network in the mouse SCN.
Symposium “Oscillatory mechanisms of circadian rhythms”, 日本睡眠学会第 34 回学術集会・第 14 回日本時間生物学会合同大会, 東京, 11/7-9, 2007.
8. **Honma S.**, Baba K and Honma K. Oscillatory mechanisms underlying sleep-wake rhythm disorders: analysis by an animal model with methamphetamine. Symposium “Validation of two oscillator model and two process model.” 日本睡眠学会第 34 回学術集会・第 14 回日本時間生物学会合同大会, 東京, 11/7-9, 2007.
9. **Honma S.**, Inagaki N, Nakagawa T and Honma K. Oscillating cell networks and their reorganization in the suprachiasmatic nucleus for photoperiodic regulation of behavioral rhythms. Symposium, “SCN re-organization”, 2nd World Congress of Chronobiology, Tokyo, Nov.4-6, 2007.
10. **Honma S** and Honma K. Clock mechanisms in the suprachiasmatic nucleus coding day length. Symposium: Unraveling the Suprachiasmatic Nucleus, 50th Anniversary Meeting of Mexican Physiological Society. Puebla, Mexico, Sep.9-14, 2007.
11. **本間さと.** 生物の光を時計の針に：発光レポーターによる生物時計機構の解析。生物発光化学研究会 第 25 回学術講演会 シンポジウム「生物発光化学発光の拡がりー発光・蛍光を超えて」 札幌 6/30, 2007.
12. **Honma S.**, Baba K. and Honma K. Clocks regulating behavior rhythms of mammals. Gordon Conference on Chronobiology. Aussois, France, May 6-11, 2007.

[図書] (計 5 件)

1. **本間さと.** 睡眠覚醒リズムの分子機構, **睡眠学**, 日本睡眠学会 (編) pp.233-240, 2009.
2. 吉川朋子, **本間さと.** 視交叉上核と光周性。光周性の分子生物学, 海老原史樹文, 伊澤毅 編 シュプリンガー・ジャパン, 東京, pp.159-168, 2009.
3. **本間さと.** リズムパラメーター, 位相反応曲線, マルチ電極アレイディッシュ法。

時間生物学事典, 本間研一, 石田直理雄 (編) 朝倉書店 pp.34-36, pp.44-45, pp.92-93. 2008.

4. **本間さと.** 本間研一. サーカディアンリズム形成のメカニズム **Annual Review 神経** 柳澤信夫, 篠原幸人, 岩田 誠, 清水輝夫, 寺本 明 (編) 中外医薬, 東京, pp.1-7, 2007.
5. **本間さと.** 昼夜サイクルへの同調 「環境生理学」本間研一, 彼末一之 (編) 北海道大学図書刊行会, 札幌, pp.161-174, 2007

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本間 さと (HONMA SATO)
北海道大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：20142713

(2) 研究分担者

早坂 直人 (HAYASAKA NAOTO)
近畿大学・医学部・講師
研究者番号：80368290

仲村(吉川) 朋子 (NAKAMURA (YOSHIKAWA) TOMOKO)

北海道大学・大学院医学研究科・特任助教
研究者番号：30451397
(平成 20 年度:連携研究者)

(3) 連携研究者

浜田 俊幸 (HAMADA TOSHIYUKI)
北海道大学・大学院医学研究科・特任講師
研究者番号：20360208

(4) 外部研究協力者

石川 正純 (ISHIKAWA MASAYORI)
北海道大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：80314772

久保田 英博 (KUBOTA HIDEHIRO)
アトー株式会社・技術開発部・執行役 次長
研究者番号：60518059

下川原 正博 (SHIMOGAWARA MASAHIRO)
アトー株式会社・技術開発部 戦略製品開発グループ・リーダー 主席技師
研究者番号：20518063

榎本 敏照 (ENOMOTO TOSHITERU)
アトー株式会社・技術開発部 技術 2 課 学術研究グループ・リーダー 主任研究員
研究者番号：30518064