

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：82675

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20H03425

研究課題名(和文)なぜ概日リズム中枢はGABA作動性神経細胞から構成されるのか？

研究課題名(英文)Why is the circadian rhythm center composed of GABAergic neurons?

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) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類の概日リズム中枢である視交叉上核が「何故GABA作動性神経細胞で構成されるか」という生理的意義を、光イメージング技術を駆使して解明することを目指して研究を行った。GABAの興奮性-抑制性の応答の方向性を決定する主たる要因は、細胞内の塩素イオンであり、視交叉上核ではクロライド濃度が概日変動することで、興奮性と抑制性が切り替わると考えられている。我々のイメージング研究の試みにより、クロライドイオン濃度の24時間のリズムを神経細胞ネットワークレベルで観察し、空間的な特徴的なリズム位相パターンを観察することを可能とした。

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、視交叉上核ネットワークの作動原理を理解することは重要であり、本研究は学術的に意義があると考えられる。また、様々な細胞機能への超長期イメージング計測の展開という計測技術としても領域の広がりを示すものであり、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理を解明することは、社会的にも意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The research was conducted to elucidate the physiological significance and mechanisms of GABAergic neurons in the master clock neurons, the suprachiasmatic nucleus, using optical imaging techniques. Intracellular chloride ion is the main factor that determines the direction of GABAergic excitatory-inhibitory responses, and circadian fluctuations in chloride concentration in the suprachiasmatic nucleus are thought to cause a switch between excitatory and inhibitory responses. Our imaging studies have allowed us to observe 24-hour rhythms of chloride ion concentrations at the neuronal network level and to observe spatially characteristic rhythmic phase patterns.

研究分野：神経生理学

キーワード：概日時計 視交叉上核 イメージング 神経細胞 GABA

## 1. 研究開始当初の背景

私たち哺乳類の概日リズムの中核は、脳深部の視床下部領域の視交叉上核に局在し、他の脳領域や末梢臓器にリズム情報を発振することで、睡眠覚醒サイクルやホルモン分泌などの約 24 時間の生理機能を制御している。視交叉上核は約 2 万個の  $\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA) 作動性の神経細胞により構成されるが、近年の研究により神経ペプチドを介して神経細胞同士が互いに連絡することで、組織全体としては 24 時間に正確で強靱なリズムを示すことが分かってきている。しかしながら、「なぜ概日リズム中枢は GABA 作動性神経細胞から構成されるのか？」という根源的な問いに対しては、私達は未だ明確な回答を持ち合わせていない。本研究では、これまで申請者が開発してきた長期/多機能の光イメージング計測を基軸に、GABA の興奮/抑制性作用の方向性を決定する細胞内クロライド(塩素)イオン濃度を細胞ネットワークレベルで可視化することで、GABA 作動性神経細胞が「いつ・どこで・どのように」働くのかを明らかにし、概日リズム中枢の神経回路の作動原理を理解することを目指す。

## 2. 研究の目的

本研究では、哺乳類の概日リズム中枢である視交叉上核が GABA 作動性神経細胞で構成される生理的意義を、光イメージング技術を駆使して解明することを目指して研究を行った。教科書的には、GABA は幼弱期の神経細胞では興奮性に働き、生後発達と共に抑制性の作用へと切り替わると言われており、視交叉上核は GABA の応答性が興奮性-抑制性が 24 時間で変動すると考えられている。GABA の興奮性-抑制性の応答の方向性を決定する主たる要因は、細胞内の塩素イオン(クロライドイオン)であり、視交叉上核ではクロライド濃度が概日変動することで、興奮性と抑制性が切り替わると考えられている。従来の研究は、パッチクランプ計測による 1 細胞の電気特性の計測に基づいており、多様な細胞種の集団で構成される視交叉上核の神経細胞ネットワークが、どのように時空間的にクロライド濃度を 24 時間スケールで変動させるかは不明であった。長期蛍光イメージング顕微鏡システムにより、視交叉上核の数日間の連続的なタイムラプス計測を行い、クロライドイオン濃度の 24 時間のリズムを神経細胞ネットワークレベルで観察し、空間的な特徴的なリズム位相パターンを観察することを試みる。さらに、細胞内クロライド濃度を決定する主因子である輸送体、調節因子の阻害剤を添加してリズムパターンを計測し、概日クロライドリズムのリズムパラメーターや空間パターンを解析する。

## 3. 研究の方法

生後 4~6 日齢のマウスより視交叉上核の培養スライスを作成し、アデノ随伴ウイルスを用いて、遺伝子コード型クロライドセンサーを神経細胞特異的に感染発現させた。10~14 日後より、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。得られたデータはリズム解析プログラムを用い、視交叉上核内の振幅、基底レベル、周期、頂点位相を算出した。

## 4. 研究成果

視交叉上核の神経細胞における発現と機能確認を行い(図 1)。長期蛍光イメージング顕微鏡システムにより、視交叉上核の数日間の連続的なタイムラプス計測を行った。クロライドイオン濃度の 24 時間のリズムを神経細胞ネットワークレベルで検出し(図 2)、空間的な特徴的なリズム位相パターンを見いだした(図 3)。加えて、クロライドイオンイメージングに精通する分担者の江川潔博士の研究協力のもと定量的な解析を行った。さらに、クロライドイオンとカルシウムイオンの同時イメージング計測により“概日クロライドリズム”の位相を決定した。さらに現在は、細胞内クロライド濃度を決定する主因子である輸送体、調節因子の阻害剤を添加してリズムパターンを計測し、概日クロライドリズムのリズムパラメーターや空間パターンを解析している。

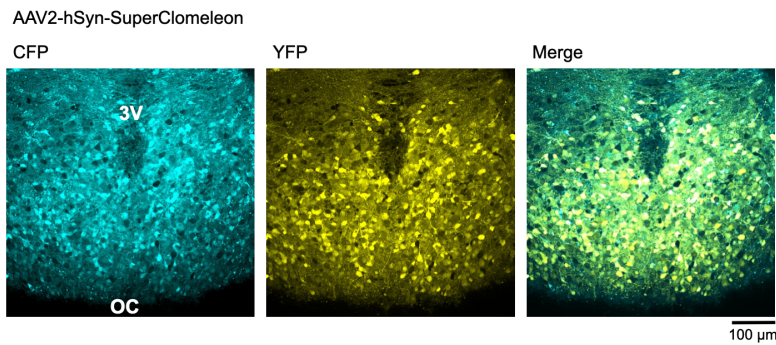


図 1. 視交叉上核における遺伝子コード型クロライドセンサーの発現パターン

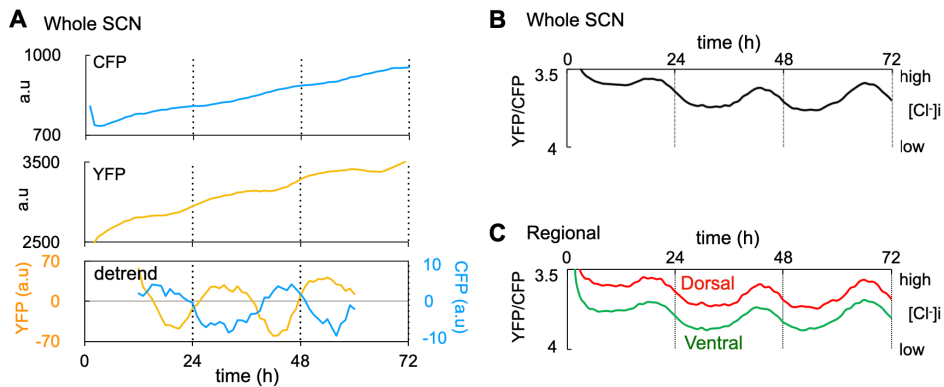


図 2. 概日クロライドリズムの検出

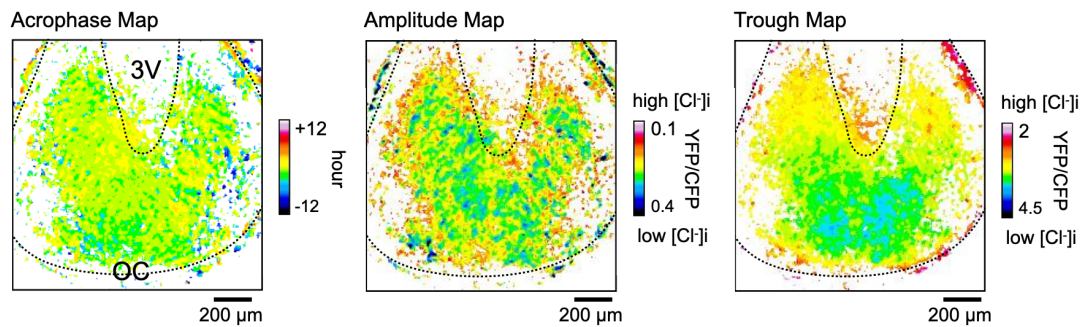


図 3. 視交叉上核における概日クロライドリズムの時空間パターン解析

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 6件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 6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 <sup>2+</sup> 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 Ataka Mitsutoshi, Otomo Kohei, Enoki Ryosuke, Ishii Hirokazu, Tsutsumi Motosuke, Kozawa Yuichi, Sato Shunichi, Nemoto Tomomi	4. 巻 15
2. 論文標題 Multibeam continuous axial scanning two-photon microscopy for in vivo volumetric imaging in mouse brain	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Biomedical Optics Express	6. 最初と最後の頁 1089 ~ 1089
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1364/BOE.514826	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 榎木亮介, 根本知己	4. 巻 55
2. 論文標題 極低温下における概日時計中枢のリズム発振機構	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 月刊「細胞」	6. 最初と最後の頁 32-35
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 Hiro Sota, Kobayashi Kenta, Nemoto Tomomi, Enoki Ryosuke	4. 巻 17
2. 論文標題 In-phasic cytosolic-nuclear Ca <sup>2+</sup> 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 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 <sup>2+</sup> 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 -

1. 著者名 Kon Naohiro, Wang Hsin-tzu, Kato Yoshiaki S., Uemoto Kyouhei, Kawamoto Naohiro, Kawasaki Koji, Enoki Ryosuke, Kurosawa Gen, Nakane Tatsuto, Sugiyama Yasunori, Tagashira Hideaki, Endo Motomu, Iwasaki Hideo, Iwamoto Takahiro, Kume Kazuhiko, Fukada Yoshitaka	4. 巻 7
2. 論文標題 Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> exchanger mediates cold Ca <sup>2+</sup> signaling conserved for temperature-compensated circadian rhythms	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science Advances	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) 10.1126/sciadv.abe8132	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 Maejima Takashi, Tsuno Yusuke, Miyazaki Shota, Tsuneoka Yousuke, Hasegawa Emi, Islam Md Tarikul, Enoki Ryosuke, Nakamura Takahiro J., Mieda Michihiro	4. 巻 118
2. 論文標題 GABA from vasopressin neurons regulates the time at which suprachiasmatic nucleus molecular clocks enable circadian behavior	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	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) 10.1073/pnas.2010168118	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 榎木亮介	4. 巻 558
2. 論文標題 哺乳類のウルトラディアンカルシウムリズムの生成機構	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 月刊「細胞」	6. 最初と最後の頁 34 - 37
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 榎木亮介	4. 巻 -
2. 論文標題 概日リズムより短い周期の体内時計：ウルトラディアンリズム	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Annual Review神経2020	6. 最初と最後の頁 9 - 15
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34件（うち招待講演 20件 / うち国際学会 6件）

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 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 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 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 冬眠休眠研究会 (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 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」(招待講演)
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 国際先端研究リトリート(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 (招待講演)
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 <sup>2+</sup> and Transcriptional Rhythms in the Suprachiasmatic Nucleus Neurons
3. 学会等名 Gordon Research Conference Chronobiology (招待講演)
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 張菁圃, 山口良文, 渡邊正知, 根本知己, 榎木亮介
2. 発表標題 Identification of uncoupling protein 1 (UCP1) in the hypothalamus of Syrian hamster brain
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 李明亮, 張菁圃, 根本知己, 榎木亮介
2. 発表標題 A temperature-dependent diabetes-like metabolic state regulated by QIH
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 極低温環境下における概日リズム発振機構
3. 学会等名 BIOTHERMOLOGY WORKSHOP 2022 & 温度生物学若手の会 合同シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 榎木亮介, 金尚宏, 清水貴美子, 小林憲太, 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 第29回 時間生物学会学術大会
4. 発表年 2022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 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2回生理研研究会「極限環境適応」(招待講演)
4. 発表年 2022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 低温環境下における概日時計中枢のリズム発振機構
3. 学会等名 温熱研究会2022 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 CHANG Ching-Pu, Kohei OTOMO, Yuichi KOZAWA, Hirokazu ISHII, Miwako YAMASAKI, Masahiko WATANABE, Shunichi SATO, Ryosuke ENOKI, Tomomi NEMOTO
2. 発表標題 An easy-to-use light-needle creating device for single scan volumetric imaging in thick tissue specimens
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
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 Optical recording of mitochondrial Ca <sup>2+</sup> dynamics in the central circadian clock
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 安宅光倫, 大友康平, 榎木亮介, 根本知己
2. 発表標題 多点走査型2光子顕微鏡を用いた生体脳ボリュームCa <sup>2+</sup> イメージング
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中田開人, 大友康平, 石井宏和, 堤元佐, 榎木亮介, 根本知己
2. 発表標題 High-speed imaging of calcium elevations and glutamate release under Aβ oligomers exposure in primary cultured astrocytes
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 LEE Ming-Liang, CHANG Ching-Pu, NEMOTO Tomomi, ENOKI Ryosuke
2. 発表標題 In vivo calcium imaging reveals neuronal glucose-sensing regulated by body energy status
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
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ミトコンドリアCa <sup>2+</sup> 濃度動態の光計測
3. 学会等名 冬眠休眠研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ming-Liang LEE, Ching Pu CHANG, Tomomi NEMOTO, Ryosuke ENOKI
2. 発表標題 In vivo calcium imaging reveals dynamic neuronal glucose-sensing in the ventromedial hypothalamus
3. 学会等名 冬眠休眠研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 榎木亮介, 廣蒼太, 根本知己
2. 発表標題 概日カルシウムリズムの源流を探る
3. 学会等名 生理研研究会「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」(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 榎木亮介, 平田 快洋, 繁富-栗林 香織
2. 発表標題 マイクロパターン基盤上に培養した単一神経細胞における概日時計の光イメージング解析
3. 学会等名 日本機械学会 2021年度年次大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ryosuke Enoki
2. 発表標題 Exploring the origin of circadian calcium rhythms in the master clock in mammals
3. 学会等名 Asia Forum on Chronobiology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 榎木亮介
2. 発表標題 Visualizing Neuronal Circuits Controlling Circadian and Ultradian Ca <sup>2+</sup> Rhythms in Mammals
3. 学会等名 第10回 生理研 霊長研 新潟脳研 合同シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 榎木亮介
2. 発表標題 Visualizing Neuronal Circuits Controlling Circadian and Ultradian Ca <sup>2+</sup> Rhythms in Mammals
3. 学会等名 第10回 生理研 霊長研 新潟脳研 合同シンポジウム 2021年3月13日 (招待講演)
4. 発表年 2021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-細胞質カルシウム動態の長期イメージング解析
3. 学会等名 第29回日本バイオイメーjing学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 榎木亮介, 廣蒼太, 根本知己
2. 発表標題 光イメージング計測で紐解く生物時計中枢神経回路の作動原理
3. 学会等名 第10回大生理研合同シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 榎木亮介, 廣蒼太, 根本知己
2. 発表標題 多機能イメージング計測から迫る概日リズム中枢神経回路の作動原理
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 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

個人研究紹介HP <a href="https://ryosukeenoki.wixsite.com/enokiresearchmap">https://ryosukeenoki.wixsite.com/enokiresearchmap</a> <a href="https://researchmap.jp/enoki">https://researchmap.jp/enoki</a>
--

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
研究分担者	江川 潔  (Egawa Kiyoshi)  (40450829)	北海道大学・医学研究院・助教    (10101)	

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