

機関番号：10101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890003

研究課題名（和文）視交叉上核におけるネットワークカルシウムイメージング

研究課題名（英文）Network Calcium Imaging in Suprachiasmatic Nucleus

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）：本研究は、哺乳類概日時計の中核である視交叉上核の神経回路網の性質を明らかとする為に、光イメージング技術を用いて多数の神経細胞から同時に活動を記録することを目的として行った。高速フレームレートで撮影可能な共焦点顕微鏡システムを構築し、また多数の神経細胞にカルシウム蛍光指示薬を負荷する方法の検討を行い、単一細胞解像度で数百の神経細胞からシナプス応答に伴うカルシウム濃度変動を測定する事を可能とした。

研究成果の概要（英文）：The present study was carried out to visualize the spatiotemporal patterns of neuronal network activities in suprachiasmatic nucleus, the center for mammalian circadian clock. To this goal, I have developed fast scanning single or multi-photon confocal microscopy and methods to load calcium sensitive dye in large neuronal population in suprachiasmatic nucleus. I successfully recorded synaptically-induced or spontaneous calcium concentration changes from hundreds of neurons in deep brain tissue at high spatial (single cell level) and temporal resolutions (millisecond scale).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,060,000	318,000	1,378,000
2010年度	960,000	288,000	1,248,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,020,000	606,000	2,626,000

研究分野：神経生理学

科研費の分科・細目：基礎医学・環境生理学(含体力医学・栄養生理学)

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

## 1. 研究開始当初の背景

脳は多数の神経細胞により構成され複雑な回路網を形成する。近年の研究により単一細胞やシナプスの性質が詳細に明らかとなってきたが、多細胞が集合して回路網を形成すると個々の細胞やシナプスの性質からは予測出来ない複雑な非線形な挙動を示す。回路網の作動機序を理解する為には、回路網をシステムとして捕らえ、多細胞の活動を1細胞

レベルで網羅的に観察することが必要である。

本研究は哺乳動物の生物時計の中核である視床下部の視交叉上核をモデルとして行う。哺乳動物の概日時計の中核は視交叉上核に局在し、睡眠・覚醒や体温調節などの生理機能の約24時間の生体リズムを制御している。個々の細胞のリズム発振機構は、時計遺伝子の転写と抑制の分子フィードバックモ

デルが想定され、詳細な分子機構の解析が進んでいる。しかしながら最近の研究により、視交叉上核は単なる個々の振動子の結合体ではなく、極めて多様な性質をもつ細胞が多振動体階層構造を形成する事が分かって来た。また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、例えば視交叉上核を構成する細胞は極めて不均一な性質を持つにも関わらず（不均一性）、細胞集団の刻むリズムは強靱であるなど（ロバスト性）、個々の細胞に関する知識の蓄積や数理モデルだけではもはや説明することが出来なくなっている。古典的現象として知られるゲート機構（昼間の入力情報を遮断/制御する仕組み）は、末梢細胞や株化細胞では認められず、組織・個体レベルにおいて出現することから、神経間のシナプス・ギャップ結合や液性因子などの細胞間情報伝達により形成されると推測される。こうした神経回路網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発光測定による遺伝子モニタリング、数理モデルの構築などでは解き明かせる見通しが立っておらず、概日時計の次なるブレイクスルーの為には、神経回路網を時空間的に包括的に観察できる、従来の技術を凌駕する新たな観察方法による研究が必須のものと考えられ、神経回路網を時空間的に大規模イメージングする新たな観察手法が必須のものと考えられる。

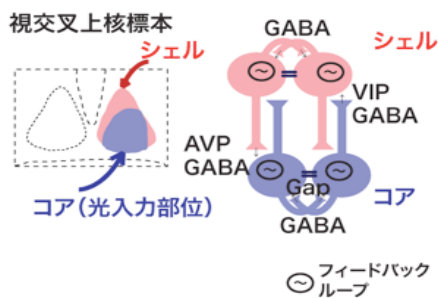


図1：視交叉上核の構造と機能の概念図。本研究では光イメージング観察法により、回路網の活動を可視化することで、その作動原理を解明する。

申請者はこれまで光イメージングを用いた観察により、神経回路網での神経細胞の情報統合メカニズムを研究して来た。比較的神経回路が解剖学的に明瞭である海馬と網膜組織を用い、膜電位やカルシウム等の光イメージング法を利用して神経細胞樹状突起でシナプス入力の伝搬や加算統合のメカニズムを解明してきた。また最近では、多光子励起顕微鏡観察により長期可塑性表出の際の神経伝達放出の様子を可視化し、定説とは異なる伝達物質放出確率の増大/源弱というシ

ナプス前終末性の可塑性を見いだし (Enoki et al., Neuron, 2009)、注目を集めた。

本研究では、これまで申請者がこれまで培った光イメージング技術と神経細胞の情報統合研究の経験を総動員し、視交叉上核神経回路網の包括的イメージングを行う為の観察方法を構築し、単一神経細胞の空間分解能で神経回路網の活動を観察する。特に、高速用焦点顕微鏡によるミリ秒時間スケールで多細胞イメージングを行うことで、外界光入力の情報統合機構からリズム発振に至る過程を神経回路網のレベルで解明する。視交叉上核は比較的小型の神経核であり、大脳皮質、海馬、網膜は全回路網が広範囲に渡り回路網全てを包括して可視化することは出来ないのに対し、全局所回路を網羅的に観察することが出来る利点がある。これまでの古典的な行動実験や様々な遺伝子改変動物も巧みに利用し、また数理モデル研究者との情報交換により実験データの解釈と斬新な新規モデル構築などを行う事で、分子から行動レベルまでの概日リズム生成と、その恒常性の破綻に至るメカニズムを解明することを目指す。

## 2. 研究の目的

従来の分子生物学的手法による還元的アプローチや、古典的な動物行動実験だけでは、多振動体階層構造である視交叉上核の機能解明への決定的な進展は得られていない。電気生理学的手法や発光モニタリングによる機能解析でも時空間分解能が不十分で、局所回路網を包括的にその作動基盤の実体を捉えることは出来ない。分子モデルで説明出来ない現象や未解決な重要問題の多くは、神経回路網レベルでの機能に起因することが推定される。

本研究では、視交叉上核の局所回路網の作動原理を解明する為、広範囲の多細胞神経細胞からのイメージングを可能とする高速共焦点顕微鏡システムを構築し、神経細胞の活動を回路網レベルで観察する。特にカルシウム濃度の変化を指標として神経活動を捕らえることで、回路網としての挙動を一斉に捕らえる。この研究を通じて、視交叉上核の神経回路網の生理学的機能と解剖学的構造の相関、細胞間連絡の様式、光入力応答様式を明らかとし、概日リズムの回路網レベルでの作動基盤を解明する。

こうした未解決の問題は、多様な環境刺激に晒される現代社会において、情報を取捨選択して恒常性を維持し生活を送る上で必須の仕組みであり、また概日リズムの破綻は睡眠障害・うつ病等の様々な疾患に至り、医療応用面においても研究の必要性が非常に高く、生体リズムの制御の研究は最優先で取り組む課題である。

### 3. 研究の方法

外界環境から光情報は網膜神経節細胞の活動電位に符号化され、直接の神経経路（網膜視床下部経路）により視交叉上核に投射される。神経伝達物質グルタミン酸を介して視交叉上核に情報が伝わり、時計遺伝子の転写翻訳から神経発火活動の出力に至る。情報処理の初期過程である光入力応答は速いミリ秒の時間スケールの現象である為、イメージング観察にはこれらの現象を追従できる時間分解能が必要となる。従来のガルバノスキャナではフルフレーム観察に約1秒を要する為、活動電位やシナプス伝達のような早い神経細胞の活動を追う事が出来ない。レゾナントスキャナによる高速測定を行うことで、視交叉上核のシナプス応答および自発活動を観察する。さらに2光子顕微鏡への顕微鏡改造により組織深部からの網羅的観察を試みる。また視交叉上核の神経細胞にカルシウム蛍光指示薬を取り込ませる為、Oregon Green BAPTA-1 AM, fura-2-AMなどの指示薬を細胞に取り込ませ、活動電位及びシナプス応答に伴うカルシウム応答を観察する。

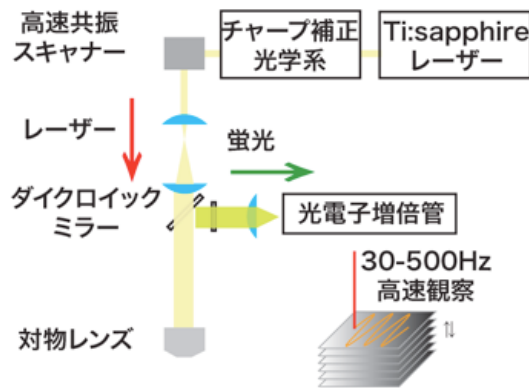


図2：高速多光子共焦点システムの概略図。

### 4. 研究成果

視交叉上核での蛍光高速共焦点イメージングは世界的にも殆ど行われていない為、研究に先立ち顕微鏡観察システムの構築と実験条件検討に重点を置き研究を進めた。高速フレームレートで撮影可能な多光子共焦点顕微鏡システムを構築し、また多数の神経細胞にカルシウム蛍光指示薬を負荷する方法の検討を行い、単一細胞解像度で数百の神経回路網からカルシウム濃度変動を測定する事を可能とした。また多光子顕微鏡観察により標本深部からの応答を記録することや、時計遺伝子レポーター動物を用いる事により遺伝子発現パターンを網羅的に可視化することを可能とした。

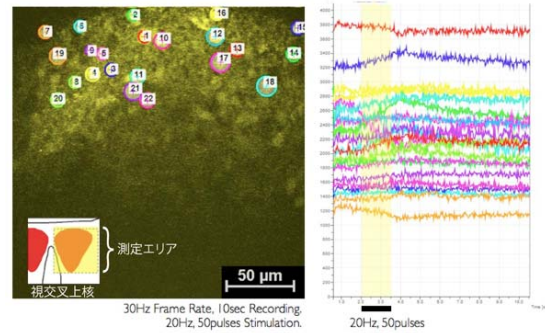


図3：視交叉上核における高速カルシウムイメージング

同システムでは、シナプス応答のような速い神経活動が観察でき、特に比較的短期間の観察（数時間）であれば大きな威力を発揮することが分かった。しかしながら視交叉上核は数 Hz の速い自発活動を起す為、カルシウム蛍光指示薬では活動電位に伴うカルシウム応答を分離することは困難であった。またレーザーの連続長時間照射により細胞が光退色や障害を起すため、長期間連続観察が必要な際にはさらなる低侵襲な観察法が求められた。並行して回転板式共焦点の構築を行い長期間観察を試みた所、顕著な退色と毒性の改善が認められた。二つの方法を組み合わせる事で、神経回路網の性質を高速から長期間の時間的に広範囲な観察が可能となった。

視交叉上核の神経細胞は時計遺伝子発現レベルでも多様な性質を持ち、時計遺伝子の発現細胞と非発現細胞が存在することが知られ、最近ではこれらの細胞の電気生理学的特性が異なることが報告されている。一方、解剖学的には神経回路網は光受容部（コア）と非受容部（シェル）に区分され、それぞれ神経伝達物質や時計遺伝子の発現パターンが異なることが知られている。時計遺伝子蛍光レポーター動物 (Per1::d2EGFP) を用いて、時計遺伝子発現および解剖学的特徴とカルシウム応答との機能相関解析を行った。通常1光子観察では時計遺伝子とカルシウムの光シグナルは分離できないが、多光子励起ではEGFPと蛍光指示薬の吸収波長が異なることを利用し、両者の相関解析を可能としている。

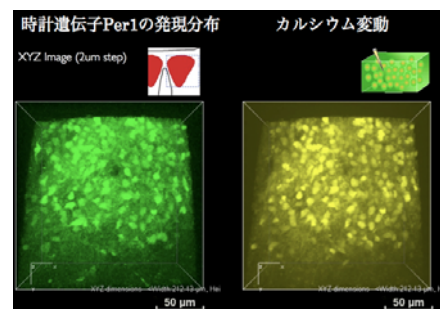


図4：時計遺伝子発現とカルシウム変動の相関解析

## 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1件)

1) R. Enoki, Y. Hu, D. Hamilton, A. Fine. Expression of long-term plasticity at individual synapses in hippocampus is graded, bidirectional and mainly presynaptic. Optical quantal analysis. NEURON, 62(2) 242-253, 2009. 査読有

[学会発表] (計6件)

1) R. Enoki, Multi-photon imaging of synaptic transmission and plasticity in the brain, 2<sup>nd</sup> International Symposium on Photonic Bioimaging, Feb 10<sup>th</sup>, 2011. ニセコヒルトンビレッジ (北海道) .

2) R. Enoki, Multi-photon analysis of synaptic transmission and plasticity in the brain, 第八回未来創薬イノベーション国際シンポジウム, 2010年9月1日, 北海道大学 (北海道) .

3) 小野大輔、榎木亮介、本間さと、本間研一. Circadian rhythm generation in the suprachiasmatic nucleus of Cry1/Cry2 double deficient mice. 2010 包括脳ワークショップ. 2010年7月27日. さっぽろ芸文館 (北海道) .

4) 榎木亮介. 多光子励起顕微鏡による神経活動の可視化解析. 北海道大学連携研究センターシンポジウム. 2010年3月24日. 北海道大学 (北海道) .

5) Enoki R. 2光子励起顕微鏡によるシナプス可塑性の可視化解析. 北海道大学第5回未来創薬医療イノベーションセミナー. 2010年1月12日. 北海道大学 (北海道) .

6) Enoki R. Illuminating presynaptic plasticity by two-photon optical quantal analysis. International Symposium on Biological Rhythm. Sapporo. August 1<sup>st</sup>, 2009. 北海道大学 (北海道) .

## 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