

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 4月 30日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659047

研究課題名（和文）遺伝子の環境応答をみる：自由行動マウスのリアルタイム発光イメージング

研究課題名（英文）Visualizing gene expression in response to environmental stimuli :real-time bioluminescence imaging in freely moving mice

研究代表者 本間 さと (HONMA SATO)

北海道大学・大学院医学研究科・特任教授

研究者番号：20142713

研究成果の概要（和文）：本研究は、ルシフェラーゼレポーターを用いて、無麻酔・無拘束の動物の遺伝子発現をリアルタイムで体表より定量・解析するシステムを構築し、遺伝子レベルでの環境や薬物への応答、臓器間相関などを解明することを目的として行われた。2台のCCDカメラによるステレオ撮像による距離に応じた発光値のリアルタイム補正プログラムと発光マーカによる自由行動マウスの目的部位追跡プログラムを開発した。本システムを用い、無麻酔・無拘束マウスの嗅球、大脳皮質、皮膚における時計遺伝子*Per1*および*Bmal1*発現を数日にわたり計測し、両遺伝子に特徴的なリズム変動を測定した。本システムは、自由行動個体の遺伝子応答を行動と同時に多くの組織で計測することを可能とし、社会的接触、母性行動などに伴う遺伝子発現など、広範な研究に応用が可能な優れたシステムである。

研究成果の概要（英文）：We aimed to develop a real-time monitoring system for reporter gene expression from the body surface of freely moving mice which can respond to various environmental stimuli. Using 2 CCD cameras, we performed stereoimaging to identify the region in a space and calibrated the luminescence in real-time. We tracked the region of interest by using 3 markers surrounding the region. By using this system and programs, we succeeded in demonstrating *Per1-Luc* and *Bmal1-Luc* expression from the olfactory bulb, cerebral cortex and skin simultaneously from freely moving mice at real time for more than 3 consecutive days. The system we developed enables us to monitor gene expression not only in single animal but to various social signals.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	0	1,300,000
2011年度	1,400,000	0	1,400,000
年度			0
年度			
年度			
総計	2,700,000	0	2,700,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・環境医学（含体力医学・栄養生理学）

キーワード：イメージング、時計遺伝子、生体リズム、生物発光、転写調節

1. 研究開始当初の背景

生物は、内因性の概日振動機構「生物時計」により駆動される 24 時間周期のリズムを生体の殆どの機能に発現する。リズム発振のサイクルがある地球環境において、原核生物からヒトまでの生物が発達してきた、共通の生存戦略である。リズム発振の細胞内分子メカニズムは、1997 年のほ乳類時計遺伝子クローニング以来、飛躍的に進展を遂げた。一方、時計遺伝子クローニングや、その発現の発光レポーターによる計測技術の普及で、胚細胞を除く生体のすべての細胞は時計遺伝子発現に明瞭な概日リズムがあり、分子時計が各細胞で振動していること、各末梢臓器の「末梢時計」が存在し、中枢時計である視床下部視交叉上核 (SCN) が全統合することで、生体が調和のとれた生理機能リズムを示すことが明らかとなった。しかし、多数の振動細胞から構成され、複数のペースメーカーのカップリングにより安定した周期を発振する多振動体階層構造をもつ SCN の中枢時計において振動細胞がいかにカップリングして安定した単一周期的リズムを発振するかは未だ不明であった。また、各末梢時計へのリズム情報の伝達、特に、明暗サイクルのみならず、発達や季節変動で変化する行動リズムの調節メカニズムは全く不明であった。視交叉上核の主要な神経ペプチドである VIP が SCN 細胞間カップリングに重要な機能を示すこと、テトロドトキシンによるシナプス連絡の遮断では、時計遺伝子発現リズムのわずかな振幅低下のみと言う報告と、著しい振幅低下と脱同期という、相対する報告があり、リズムカップリングにおける神経連絡の意義については不明の点が多かった。また、時計遺伝子発現の測定は多くは培養系での検討であり、時計への入力、出力系が intact である無麻酔・無拘束動物における発光計測は未だ行われていなかった。

2. 研究の目的

本研究は、自由行動下でのマウスの全身の様々な臓器における遺伝子発現を同時にリアルタイムで計測・解析するプログラムを備えた計測システムを作成することを目的として行われた。また、本システムを用い、光、温度などの環境刺激や他の動物との接触などの社会的要因、薬物投与への反応などを、全身の多くの臓器で同時に計測すると共に、自発行動、睡眠覚醒、摂食・飲水などの行動出力との相関を検討することにより、マウスの遺伝子応答、臓器間相関を明らかにする測定系を構築することを目的とした。

研究には、安定したリズム発振、予測可能な位相変化など、生理的範囲の変動を高精度に評価できる時計遺伝子のレポーターを用い、計測システム構築、基

礎データの蓄積による検討、解析プログラムの作成を同時進行で進めた。

3. 研究の方法

実験動物：時計遺伝子 *Per1* 発現、*Bmal1* 発現を発光活性にてリアルタイムで計測できる *Per1-luc* と *Bmal1-Eluc* の 2 種の時計遺伝子レポーターマウスの雄の成獣個体を用いた。これらのマウスは自家繁殖し、明期 12 時間暗期 12 時間の、温度湿度を調整した動物室で飼育した。

in vivo 計測系：恒温・恒湿室に計測用特注ケージを設置し、EMCCD カメラ、目的位置のトラッキングのためのマーカー発光装置などを組み込んだ。

カメラからの位置補正を行い、発光値を標準値により補正して、場所による補正を行った。また、3 点マーカーによる動物追跡法を確立し、追跡・定量プログラムを完成した。

基質注入と血中基質レベル計測：基質ルシフェリンは、オスモティックミニポンプの腹腔内埋め込み、ないしプログラム注入による連続投与方法により行った。血中ルシフェリン濃度は、尾先端からの連続採血後、HPLC 法にて計測した。

4. 研究成果

(1) ルシフェラーゼレポーターを用いた、遺伝子発現量の体表からの定量システムの構築：マウスの嗅球上部の頭蓋骨を削り、嗅球からと、耳・鼻・尾等の無毛部の発光を計測し、発光計測のための露光時間、昼夜差などを検討した。まず、腹腔内ルシフェリン注射による基質投与で、昼と夜との発光計測を行い、時間経過に伴う発光量を計測し、注射直後の指数関数的に減少、その後 30 分程度の安定期を経てゆっくりとバックグラウンドレベルに戻ることを確認された。発光量の時間経過に昼夜差は検出できなかったが、安定期の発光レベルには明瞭な昼夜差が見られた。*Per1-luc* は 0.5 秒露光、*Bmal1-ELuc* は 1 秒露光で昼夜差を検出できること、その差異は、遺伝子発現量の昼夜差を反映し、基質の代謝の差異にはよらないことを確認した。現在、広く用いられている麻酔下での in vivo 計測は、基質投与方法、投与直後の測定は定量が難しく、安定期を待たなければならないこと、概日変動を測定する場合は、基質の蓄積による誤差を生じやすいこと、などの問題点があることも明らかとなった。

自由行動中のマウスの遺伝子発現量の連続撮像と発光量補正のため、2 台の EM-CCD カメラによるステレオ撮像を行なった。*Per1-luc* および *Bmal1-Eluc* マウスの目的部位の発光レベルを数日間計測し、いずれも明

瞭な概日変動を示すこと、両マウスでの発光パターンは、ex vivo 計測や RT-PCR の結果と同様、逆位相を示し、内因性の生理的変動が検出可能であることを証明した。

(2) 自由行動中のマウスの目的部位を確実に追跡しつづける動体追跡プログラムの作成：マウスの体表から複数のターゲット部位を自動認識するため、目的部位を発光マーカーにて囲み、マーカーのパターン認識により、一旦視野から消えても着実に追跡できるよう動体追跡プログラムを作成した。嗅球、大脳皮質は上部の頭蓋骨を薄くして透明度を上げ、さらに補強することで発光計測を容易にした。また、背部皮膚の遺伝子発現も計測した。無毛のために発光量の高い両耳と鼻先もマーカーとして利用した。これら6カ所を同時に追跡し、目的部位の三次元空間内での位置と発光量をリアルタイム計測するプログラムを完成させた。

(3) カメラからの距離に伴う発光量変動の補正解析プログラムの作成：マウスが自由に行動するため、発光レベルは、ルシフェラーゼ活性のみならず、カメラと目的部位との距離により、刻々と変化する。このため、まず、一定量で発光するマーカーを用いてケージ空間内の部位による発光量の減少率を詳細に計測した。この標準値を用いて、目的部位の空間内位置が確定と同時に位置による発光量の増減を補正するプログラムを開発した。動体追跡、位置の算出、発光計測のプログラムに本プログラムを組み込んで発光量標準化までをリアルタイムで行うことを可能とした。

(4) 基質ルシフェリンの血中レベルを一定にたもつ、ルシフェリンの安定的な投与法を確立と検証：

基質ルシフェリンの持続注入は2つの方法によって行った。D-ルシフェリンカリウム塩をオスモティックミニポンプに入れ、腹腔内に埋め込む、あるいは iPRECIO ポンプによるプログラム注入により持続投与を行った。後者では、マウスにハーネスを取り付け、行動を妨げず、連続注入を行った。

投与開始後、マウスの尾先端から微量採血を行い、血漿中のルシフェリン量を HPLC にて計測し、血中レベルは1日を通して一定に保たれることを確認した。

(5) 結論：本システムを用い、基質連続投与下でマウスの嗅球、大脳皮質、皮膚の発光リズムを数日間連続計測し、光に同調した時計遺伝子発現リズムを自発行動リズムと共に着実に計測するシス

テムを完成させた。本システムは、薬物投与に伴う全身の様々な臓器における遺伝子発現の計測、個体間の社会的反応、母子間の相関などを遺伝子レベルで検討することができる優れたシステムである。

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10件)

1. Yoshikawa T, Matsuno A, Yamanaka Y, Nishide S, Honma S and Honma K. Daily exposure to cold phase-shifts circadian clock of neonatal rat in vivo. *Eur.J.Neurosci.* 37, 491-497, 2013. doi: 10.1111/ejn.12052. (査読有)
2. Natsubori A, Honnma K and Honma S. Differential responses of circadian Per2 expression rhythms in discrete brain areas to daily injection of methamphetamine and restricted feeding in rats. *Eur.J.Neurosci.* 37: 251-258, 2013. doi: 10.1111/ejn.12034. (査読有)
3. Enoki R, Kuroda S, Ono C, Hasan MT, Honma S, Ueda T and Honma K. Topological specificity and hierarchical network of the circadian calcium rhythm in the suprachiasmatic nucleus. *Proc.Natl. Acad.Sci USA.* 109:21498-21503, 2012. doi: 10.1073/pnas.1214415110 (査読有)
4. Honma S, Ono D, Suzuki Y, Inagaki N, Yoshikawa T, Nakamura W and Honma K. Suprachiasmatic nucleus: cellular clocks and networks In *Progress in Brain Res.* 199: 129-141, 2012. doi: 10.1016/B978-0-444-59427-3.00029-0. (査読有)
5. Enoki R, Ono D, Hasan MT, Honma S and Honma K. Single-cell resolution fluorescence imaging of circadian rhythms detected with a Nipkow spinning disk confocal system. *J Neurosci Methods* 202:72-29, 2012. doi: 10.1016/j.jneumeth.2012.03.004. (査読有)
6. Yoshitane H, Honma S, Imamura K, Nakajima H, Nishide S, Ono D, Kiyota H, Shinozaki N, Matsuki H, Wada N, Doi H, Hamada T, Honma K and Fukada Y. JNK regulates the photic response of the mammalian circadian clock. *EMBO Report*, 13:455-561, 2012. doi: 10.1038/embor.2012.37. (査読有)
7. Kwon HJ, Ohmiya Y, Honma K-I, Honma S, Nagai T, Saito K, and Yasuda K. Synchronized ATP oscillations have a critical

role in prechondrogenic condensation during chondrogenesis. *Cell Death and Disease* 3: e278, 2012. doi: 10.1038/cddis.2012.20. (査読有)

8. Nishide S, Ono D, Yamada Y, Honma S and Honma K. De novo synthesis of PERIOD initiates circadian oscillation in cultured mouse suprachiasmatic nucleus after prolonged inhibition of protein synthesis by cycloheximide. *Eur J Neurosci* 35:291-299, 2012. doi: 10.1111/j.1460-9568.2011.07952.x(査読有)
9. Hamada T, Honma S and Honma K. Light responsiveness of clock genes, Per1 and Per2, in the olfactory bulb of mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 409:727-731, 2011. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.05.076. (査読有)
10. Watanabe T, Enomoto T, Takahashi M, Honma S, Honma K, Ohmiya Y. Multichannel perfusion culture bioluminescence reporter system for long-term detection in living cells. *Anal. Biochem*. 402:107-109, 2010. doi: 10.1016/j.ab.2010.03.014. (査読有)

[学会発表] (計 19 件)

1. 浜田俊幸、石川正純、Kenneth Sutherland, 宮本直樹、白土博樹、本間さと、本間研一. 動物追跡技術による全身の時計遺伝子発現定量解析と行動解析. 第 155 回日本獣医学会学術大会、東京大学駒場キャンパス、東京、3 月 28-30 日、2013
2. 本間さと 光が告げる生物時計の振動. 先端的光イメージング拠点形成プログラムクロージングシンポジウム 北海道大学医学研究科フラテ会館、札幌、3 月 18 日 2013.
3. Honma S, Natsubori A, Honma K. Multi-oscillator System of Mammalian Circadian Clock. Symposium “Molecular and cellular mechanisms of circadian clock and sleep”, Asian Society for Sleep Research, Taipei International Convention Center, Taiwan Nov.30-Dec.2, 2012.
4. Honma S. Monitoring the circadian clock’s tick; multiple hands for multiple functions. 4th International Symposium on Photonic Bioimaging, Hokkaido University Conference Center, Sapporo, 9.16-17, 2012.
5. 本間さと. 時計遺伝子と生物時計の発達. 日本小児神経学会第 42 回小児神経学セミナー. 湘南国民村センター、葉山、10 月 7-8 日、2012
6. 浜田俊幸、石川正純、Kenneth Sutherland, 宮本直樹、白土博樹、本間さと、本間研

一. 覚醒マウスにおける時計遺伝子発現の 4D イメージング. 第 2 回睡眠研究会. 名古屋大学、7 月 5-6 日、2012.

7. Honma S. Signal integration of circadian neuronal networks. Society for Research on Biological Rhythms Biannual meeting 2012. Sandestin Golf and Beach Resort, USA May 19-24. 2012.
8. Honma S. Suprachiasmatic nucleus output couplings. Suprachiasmatic Structure Workshop. Society for Research on Biological Rhythms Biannual meeting 2012. Sandestin Golf and Beach Resort, USA. May 19-24. 2012.
9. 本間さと 生物時計の発達と睡眠覚醒リズム: 時間生物学の小児科学への応用、日本小児神経学会 5 月. 17-19 日、札幌 2012.
10. Honma S. Continuous monitoring of circadian clock’s tick in the suprachiasmatic neurons. International Symposium on Frontiers in Sleep and Biological Rhythms’ Research. Dokuz Eylul University Izmir, Turkey 30 April- 2 May, 2012.
11. 本間さと. 睡眠リズム発生のメカニズム. 日本学術会議「脳と意識」「神経科学」「脳とこころ」分科会合同シンポジウム「脳と睡眠」、東京(日本学術会議)、12 月 10 日、2011.
12. Honma S, Yoshikawa T and Honma K. Mammalian circadian clocks detecting morning light and evening lights. 6th World congress of the World Sleep Federation, Kyoto International Conference Center, Kyoto, Oct.15-20, 2011.
13. Honma S. Suprachiasmatic nucleus: cellular clocks and networks. 12th Congress of European Society for Biological Rhythm. Oxford, UK. Aug.20-26, 2011
14. Honma S. Cellular rhythms and oscillatory networks in the suprachiasmatic nucleus. Workshop: Emergence of circadian rhythms from the central pacemaker and beyond. Institute of Theoretical Biology, Humboldt University, Germany, Aug.15, 2011.
15. Honma S. Network vs. single neuronal rhythms in the SCN. Symposium: Molecular and network properties of the suprachiasmatic nucleus, the 3rd World Congress of Chronobiology, Cultural Center of BUAP, Puebla, Mexico May 5-9, 2011.
16. Honma S. and Honma K. Animal model of human sleep-wake rhythm. The 11th

Congress of Turkish Sleep Society, Maritim Pine Beach Resort, Antalya, Turkey, Nov.6-10, 2010.

17. 本間さと. 光イメージングによる挑戦;長期・マルチ・*in vivo* 計測. 第5回北海道大学大学院医学研究科連携研究センターシンポジウム.10月1日, 2010.
18. Honma S. Assessing multi-oscillator mammalian clock using mice with clock gene mutation. Lorenz Center Workshop, Assembling multi-cellular Circadian Pacemaker. Lorenz Center, Leiden, The Netherlands, Aug.16-20, 2010.
19. 本間さと、小野大輔、本間研一. 行動リズムと時計遺伝子機能. 第87回日本生理学会大会 5月19日~21日 盛岡市民文化ホール、いわて県民情報交流センター(盛岡市), 2010

[図書] (計5件)

1. Honma S., Ono D and Honma k. Oscillator cell networks in the hypothalamic suprachiasmatic nucleus, the mammalian circadian clock. In "Advances in Cognitive Neurodynamics (III)", Y.Yamaguchi ed. Springer, Tokyo, 2013 (in press) DOI 10.1007/978-94-007-4792-0 25.
2. 本間さと 中枢時計の分子生物学 DOJIN SCIENCE SERIES 02「時間生物学」、海老原史樹文、吉村 崇(編) 化学同人、pp. 55-65, 2012. (231 ページ)
3. 浜田俊幸、本間さと、本間研一. 嗅球の体内時計と嗅覚刺激の作用、体内時計の科学と産業応用、柴田重信 監修、シーエムシー出版 2011、pp117-124
4. Honma S., Yoshikawa T, Nishide S, Ono D and Honma K. Bioluminescent imaging for assessing heterogeneous cell functions in the mammalian central circadian clock. Tamaki N. Kuge Y eds "Molecular Imaging for Integrated Medical Therapy and Drug Development" Springer, Tokyo. 189-196, 2010
5. 本間さと. 環境応答-概日リズム からだと光の事典 太陽紫外線防御研究委員会 編集 朝倉書店、pp281-285, 2010 (全421 ページ)

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: ターゲット位置追跡装置およびターゲット発光検出装置

発明者: 石川正純、浜田俊幸、本間研一、本間さと、ケネス・リー・サザーランド

権利者: 北海道大学

種類: 特許

番号: 特願 2010-245624

出願年月日: 2010年11月1日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.hucc.hokudai.ac.jp/~a10071/>

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・特任教授
研究者番号: 20142713

(2) 研究分担者 なし

(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