

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 5 月 7 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22700430

研究課題名（和文）光スイッチ遺伝子発現システムを用いた生物時計細胞間相互作用の解明

研究課題名（英文）The Photo-switch system of the gene expression and the application for the analysis of biological-clock-cell interactions

研究代表者

安東 頼子（ANDO YORIKO）

北海道大学・大学院医学研究科・特任助教

研究者番号：10514234

研究成果の概要（和文）：マウスの視交叉上核に光受容体メラノプシンを発現させ、光照射刺激により時計遺伝子を発現させる”光スイッチシステム”を用いて、SCN における時計細胞間カップリング、リズム位相変化・伝達の可視化を試みた。

研究成果の概要（英文）：Expressing photoreceptor, Melanopsin, in the mouse Suprachiasmatic nuclei as “photo-switch system” inducing a clock gene by the photoradiation, and applied this system for the analysis of the biological-clock-cell interactions.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・融合基盤脳科学

キーワード：脳とリズム

1. 研究開始当初の背景

基礎自然科学実験から臨床に渡る広範囲な分野において、遺伝子発現を制御する手段は極めて重要である。目的遺伝子の発現を制御する方法として、薬剤刺激、熱処理などが一般的に用いられて来たが、これら従来の方法では、空間的（任意領域的）な発現制御は不可能であった。そこで本研究では、光照射により遺伝子発現を制御する“光スイッチシステム”の確立を目指した。哺乳類細胞に光受容体を発現させ、光照射された細胞（領域）のみ、目的遺伝子が発現するというものである。

本研究で用いた光受容体は、哺乳類の網膜に存在する7回膜貫通型タンパク質「メラノプシン」である[1]。メラノプシンは、光に応答して変動する時計遺伝子の発現制御に関わっているとされ、概日光受容体の一つとして注目されている[2, 3]。

本研究では、この光スイッチシステムを用いて、マウスの視交叉上核(SCN)における時計細胞間カップリング、リズム位相変化・伝達の可視化を試みた。

2. 研究の目的

地球上に生活する生物の多くが地球の自転による約 24 時間の周期をもって活動しており、その活動リズムは生物時計中枢である SCN により制御されていると考えられている。SCN のリズム振動は大変強固であり、自律振動している数千個の細胞が同調し、コヒーレントなリズムを刻んでいる。

現在までに、SCN 内でリズム位相の異なる領域が存在するという実験結果が次々と報告され[4, 5]、生理や季節変化に伴う行動、生殖など様々な生体機能に影響していると考えられている。しかし、個々の時計細胞を結び付け、強固なリズム同調を生み出す細胞間カップリング機構や、リズム位相変化・伝達機構は未だに解明されていない。

本研究では、メラノプシンを SCN に発現させる事により、光照射により SCN の時計遺伝子発現を誘発させることにより、眼球から SCN への光投射を SCN 培養切片上で再現した。光照射前後の時計遺伝子発現変化・伝達の様子をリアルタイムイメージング測定する事により、時計細胞間カップリング、リズム位相変化・伝達の可視化を試みた。

3. 研究の方法

(1)メラノプシン発現アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルス作製

①メラノプシン発現アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルスの作製。

②ウイルスタイター測定。

③免疫染色(Tag抗体)によるメラノプシン発現確認。

④共発現蛍光タンパク質蛍光観測によるメラノプシン発現確認。

⑤ウイルス感染条件最適化。

(2)SCN 発現メラノプシン機能確認：蛍光 Ca^{2+} イメージング測定

①蛍光 Ca^{2+} 指示薬を用いた発現メラノプシンの機能確認。

SCN に発現させたメラノプシンが正常に機能していれば、光照射刺激により細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇する事が予想される。

(3)メラノプシン発現 SCN における時計遺伝子発現発光レポーターイメージング測定

①時計遺伝子発光レポーターマウス (PER2::LUC) の SCN 切片標本作製。

②SCN 培養切片にウイルス感染(アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルス)を用いてメラノプシンを発現させる。

③メラノプシン発現 SCN に光照射刺激を行い、時計遺伝子発現を誘発させる。光照射前後の時計遺伝子発現を発光レポーターイメ

ージング測定する。

(4)メラノプシン発現 SCN における時計遺伝子発現発光イメージング画像解析

①(3)で得られた発光イメージング画像データから、ピクセル毎にコサイン法を応用したフィッティングにより各リズムパラメータ求めた。画像解析プログラムの作成と解析を行った。

4. 研究成果

(1)メラノプシン発現アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルス作製

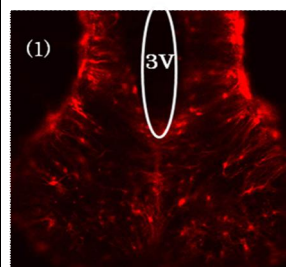
メラノプシン発現アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルスの作製を行った。それぞれに長所・短所があるので、本実験目的にあう系を検討した。

図 1(1)はアデノウイルスを用いて、CMV プロモーター下でメラノプシンを発現させた SCN の蛍光画像である(共発現蛍光タンパク質 DsRed 蛍光観察)。感染は確認されたが、発現が一樣では無かった。また、形態学的な判断から主にグリアに発現している様子であった。細胞毒性も一般的に指摘されているといった問題も存在する。

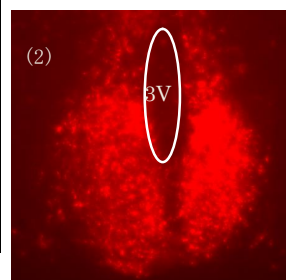
一方、図 1(2)にアデノ随伴ウイルスを用いて Human synapcin (hsyn) プロモーター下でメラノプシンを強制発現させた SCN の蛍光画像を示す(メラノプシン N 末結合 mCherry 蛍光観察)。SCN 全体に渡って強く発現している様子が分かる。また、hsyn プロモーターを用いている事から、神経細胞特異的な発現であると考えられ、本実験に適している。

以後の実験には、アデノ随伴ウイルスによるメラノプシン発現 SCN を用いた。

図 1 メラノプシン発現 SCN 蛍光観察



(1)アデノウイルスによるメラノプシン発現 SCN 蛍光観察 (DsRed)

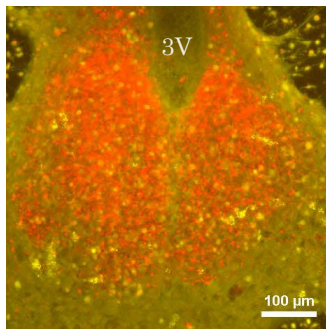


(2)アデノ随伴ウイルスによるメラノプシン発現 SCN 蛍光観察 (mCherry)

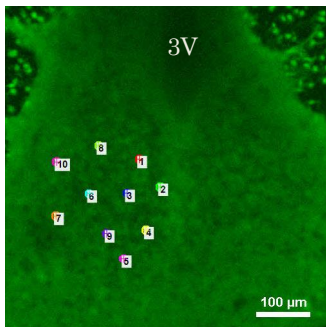
(2) SCN 発現メラノプシン機能確認: 蛍光 Ca^{2+} イメージング測定

時計遺伝子発光レポーターマウス (PER2::LUC, P5) の SCN 切片 (100 μ m) を作製し、5% CO₂、37°C 下で 1 週間培養した後、メラノプシン強制発現アデノ随伴ウイルス (1.5 μ l) を感染させた。感染 14 日後の SCN 培養切片 (図 2(1)) に Ca^{2+} 蛍光指示薬 (Oregon Green 488 BAPTA 1 (OGB1)) を負荷させ、光照射刺激による細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を確認し (図 2(2, 3))、SCN に発現したメラノプシンの機能確認を行った。

図 2 アデノ随伴ウイルスによるメラノプシン発現 SCN における蛍光 Ca^{2+} イメージング

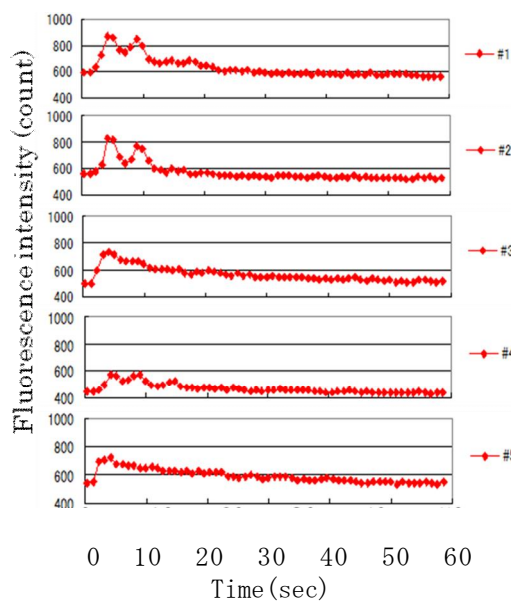


(1) 蛍光観察 (赤:mCherry, 緑:OGB1)



(2) 蛍光 Ca^{2+} イメージング (OGB1, ROI#1-10)

(3) 光照射刺激による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇



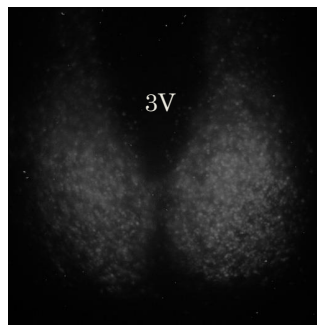
(3) メラノプシン発現 SCN における時計遺伝子発現発光レポーターイメージング測定

時計遺伝子発光レポーターマウス (PER2::LUC, P6) の SCN 切片 (100 μ m) を作製し、5% CO₂、37°C 下で 1 週間培養した後、メラノプシン強制発現アデノ随伴ウイルス (1.5 μ l) を感染させた。感染 12 日後から発光イメージング測定 (図 3) を開始し、感染 19 日後に光照射刺激 (460-480nm, $\sim 7 \times 10^{14}$ photon/s/cm², 1h) を行い、その後発光イメージングを再開した。

光照射刺激前は安定した発光概日リズム振動が見られるが、頂点位相付近における光照射刺激を行った後、発光強度が減弱し、発光リズムにバラツキが見られる (図 3(2a, b))。

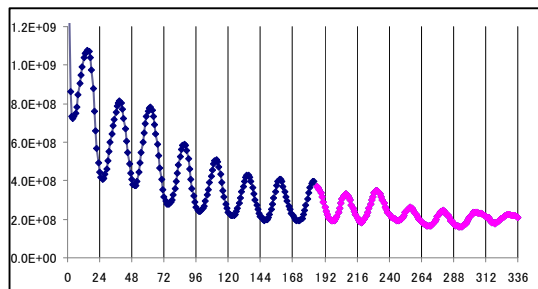
これらの結果から、メラノプシンを発現させた SCN において、光照射刺激により時計遺伝子発現に摂動を与える事が出来たと考えられる。

図 3 アデノ随伴ウイルスによるメラノプシン発現 SCN 発光イメージング測定

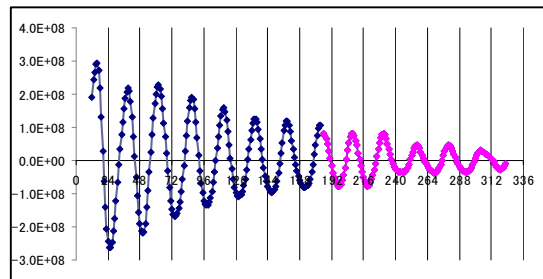


(1) 発光イメージング画像

(2a) 発光強度生データ vs. 時間 (h) (青: 光照射前, ピンク: 光照射後)



(2b) 発光強度デトレンドデータ (± 12 h) vs. 時間 (h)



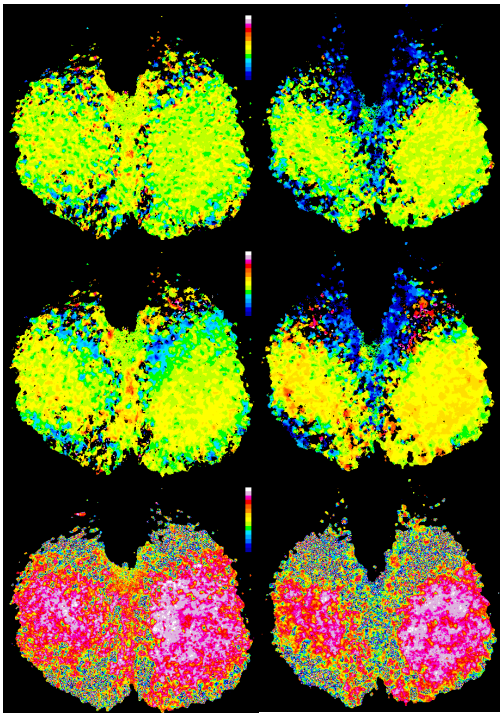
(4)メラノプシン発現 SCN における時計遺伝子発現発光イメージング画像解析

(3)で得られた発光イメージング画像データからピクセル毎の各リズムパラメータ(周期、頂点位相、強度、フィッティング精度等)をコサイナー法を応用したフィッティングで求める画像解析プログラムを作成し、解析を行った。

光照射前の周期は SCN 全体に渡って一様であるが、光照射後は背内側部の周期が早くなっている。それに伴い、頂点位相の位相差も光照射前と比較して大きくなっている。フィッティング精度は、相互相関係数で評価しており、0.8 以上のものを採用している。(図 4)

本研究により、メラノプシンを発現させた SCN において、光照射により時計遺伝子発現に摂動を与える事が出来た。また更に、リズムパラメータ変位は SCN 内の領域によって異なる事が明らかとなった。

図 4 時計遺伝子発光レポーターマウス (PER2::LUC) SCN 発光イメージング画像解析 (上:周期(color bar:19.5-30h), 中:頂点位相(-10.5-12h), 下:フィッティング精度(0.8-1), 左:光照射前, 右:光照射後)



(5)まとめ

マウスの SCN 培養切片にウイルス感染法を用いて高効率にメラノプシンを発現させる事により、光照射刺激により、時計遺伝子発現に摂動を与える事が出来る事を示した。またそのリズムパラメータ変位は、SCN 内の領域によって異なる事が明らかとなった。

昨今光を用いて活動電位を制御する光遺伝学が脚光を浴びているが、今後光で遺伝子発現を操作する技術も国内外で更に用いられるようになると予想される。本研究では、概日リズム研究に光操作による時計遺伝子発現法を取り入れ、本技術が有効である事を示した。今後は更に、SCN における領域限定的な時計遺伝子発現制御を行う事により、時計細胞間カップリング、リズム位相変化・伝達の解明を目指す。

(6)参考文献

- [1]S. Hatter et al., Science (2002). [2]H. Ukai et al., Nature Cell Biology (2007). [3]R. P. Sandhya et al., PNAS (2007). [4]Yamaguchi et al., Science (2003). [5]Inagaki et al., PNAS (2007).

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 2 件)

- ① Yoriko Ando, Hidefumi Akiyama
“pH-Dependent Fluorescence Spectra, Lifetimes, and Quantum Yields of Firefly-Luciferin Aqueous Solution Studied by Selective-Excitation Fluorescence Spectroscopy”
Japanese Journal of Applied Physics, 査読有, 49, 117002 (2011).
DOI: [10.1143/JJAP.49.117002](https://doi.org/10.1143/JJAP.49.117002)

- ② 秋山英文, 安東頼子, 王 瑜
「ホタルの発光の効率と色変化機構-定量計測による新事実-」
現代化学, 査読無, 473, 21-25 (2011).
<http://www.tkd-pbl.com/book/b67782.html>

[学会発表] (計 4 件)

- ① 安東頼子, 本間さと, 本間研一
先端的発光イメージング拠点形成プロジェクト成果報告シンポジウム
“メラノプシンを用いたマウス視交叉上核における時計遺伝子発現解析”
2013 年 3 月 18 日, 北海道大学(札幌)
- ② Yoriko Ando, Sato Honma, Ken-ichi Honma
“Ca²⁺ response of melanopsin-expressing culture cell with photo-excitation”
International Symposium on Photonic

Bioimaging Satellite Symposium of
Worldsleep 2011 on Human Circadian
Clock
2011年11月, 京王プラザホテル (札幌)

- ③ Yoriko Ando, Yu Wang, Yuhei Hayamizu,
Miyabi Hiyama, Hidehiro Kubota,
Nobuaki Koga, Hidefumi Akiyama
“What should we learn about
concerning the color change of firefly
bioluminescence?”
日本生物物理学会 第49回年会,
2011年9月, 兵庫県立大学 (姫路)

- ④ Yoriko Ando, Hidefumi Akiyama
2nd International Symposium on Photon
ic Bioimaging
“Firefly bioluminescence quantum yi
eld and spectroscopy of firefly luci
ferin”
2011年2月, ニセコヒルトンホテル(北海
道ニセコ町)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安東 頼子 (ANDO YORIKO)
北海道大学・大学院医学研究科
特任助教
研究者番号 : 10514234