

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：13904

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590350

研究課題名(和文) 中枢時計の概日リズム発振の時空間的機能マップ作成とその制御

研究課題名(英文) The function map to oscillate the circadian rhythm in the central clock

研究代表者

沼野 利佳 (Numano, Rika)

豊橋技術科学大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30462716

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：SPFマウス飼育施設・設備の整備し、哺乳類の概日リズムを制御するPer1の発現を指標にして、組織の時計機能をリアルタイムで1細胞レベルの測定をするため、Per1::GFP組み換えマウスのSCN スライスに共焦点や2光子顕微鏡で観察する系を確立した。SCNの神経を刺激する手段は、1) VLS法で作成された微小刺入型電極プローブ。先端の形状を先端化するタイプ、強力な電気刺激を行う目的の構造体も付加した。2) 光照射により神経活動が調節できるLiGluR受容体システム。繊維芽細胞株は光刺激されPer1の発現誘導がおきた。外部刺激を受け、SCN組織内で、シグナル情報が周囲に数時間単位で伝達される。

研究成果の概要(英文)：All living things use internal clocks with the 24 hr period, circadian rhythms. Period1 (Per1) gene is an important member of the central clock system in the SCN. I observed Per1::GFP transgenic mice SCN to monitor circadian rhythms by Per1 rhythmic expression. Dynamic simulation system for functional map in the SCN can be established to activate by pinpoint stimulation by 1) TOYOHASHI Vapor-liquid-solid micro electrical array chip has nano-scale electrical probes with 1 μm diameter and can be used for both detecting the electric activity and stimulating neural activity in one cell level. TOYOHASHI probes could insert into deeply brain. 2) LiGluR for rapid, remote and reversible control of cell membrane potential by photo illumination and photoisomerizable chemicals. The fibroblast cell lines transfected by Per1::GFP and by LiGluR showed to induce Per1 transcription after UV illumination. The signal were transferred in the SCN slice for several hours.

研究分野：医科学一般

キーワード：概日リズム 電極プローブ 光刺激

1. 研究開始当初の背景

視交叉上核(SCN)のペースメーカー神経のリズムを規定する時計遺伝子発現と神経発火頻度は、それぞれ個別に観察している実験系は国内外にもあるが、同時にしかも細胞レベルで神経活動を観察し、さらに細胞レベルで任意に刺激する研究ない。照射による神経活動の刺激は、クラミドモナス由来の光受容体チャンネルロドプシン(ChR2)や、古細菌由来のハロドプシン受容体を使用する実験が国内外で行われていが、(Zhang F., *Nat Methods*. 2006, Zhang F., *Nature*. 2007)今回用いるオリジナルのLiGluR受容体(Numano R, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009)は、哺乳類ラット由来の受容体で、神経活動電位のONとOFFが1つの蛋白質ですばやく切り替え、電位変化や反応速度もChR2に比べて優れており、より正確に神経活動を調節できる。LiGluR受容体LiGluR(Light-gated glutamate receptor)受容体は、380nmのUV領域の光で曲がったシス体となり、500nm可視領域の光でまっすぐなトランス体となる新規化学物質(MAG)を用いて、UVで開き、可視光で閉る。この受容体をもつ細胞に異なる波長の光を照射すると、細胞膜の電位や神経細胞の活動を、波長依存的に、可逆的に変化させうる(図1)。

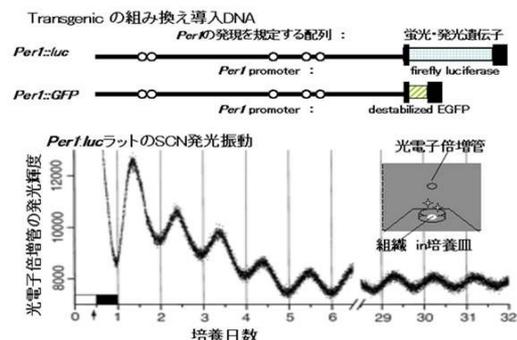
また、同大学の河野研究室で作成される、神経活動測定に使用する微小刺入型マルチ電極チップは、従来のユタ型の電極チップと比べて、独自のVapor-liquid-solid(VLS)法による製法により直径数百nmの極小電極を自在な配置で設置でき、単一神経細胞からの電気的な反応を測定することができる(図2)(Kawano T., *Biosens Bioelectron*. 2010)。細胞レベルの測定と刺激は、独自の光刺激実験系やチップ技術をもっては

じめて実現する研究で、特定の神経回路が時計遺伝子発現にフィードバックして影響を及ぼすかなど、2つのリズムの関連性をはじめて細胞レベルで詳細に探求でき、少数の最上位のリズム発振神経細胞群を同定できる。

哺乳類の概日リズムの中核SCNでは、*Period1* 遺伝子(*Per1*)の発現が日周変動し、目からの光情報により *Per1* 発現誘導がおこる。全細胞で *Per1* を一日中恒常的に過剰発現させたトランスジェニック(Tg)ラットを独自で新たに作成し、SCNにおける *Per1* の発現振動と光による *Per1* 発現誘導を阻害した。このTg組み換えラットは、行動、生理学的リズムや光による位相リセット機構が野生型と比べて乱れた。

これらの事実は、哺乳類概日リズムのオシレーター機能において *Per1* の転写振動が重要であること、また、リズムの光環境への同調は *Per1* の転写の光誘導に由来することを示唆する(Numano R, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006)。

そこで、*Per1* の発現を指標にして、中枢及び末梢組織の時計機能を同時に測定するため、*Per1* 発現制御領域で発光ルシフェラーゼや緑蛍光GFPで確認できる *Per1::luc* や *Per1::GFP* Tg マウスを作り、その各組織を培養する実験観察系を構築した。哺乳類ではSCNに自律したペースメーカーが存在し、末梢の概日リズムを



Per1::luc SCNの発光振動リズム

組織固有の位相に維持することを示した (Yamazaki S, Numano R, *Science*. 2000) このマウスの SCN スライスや他の末梢組織を培養しながら、*Per1* 発現を反映する発光・蛍光を顕微鏡で観察すると、SCN 内にも外界からの情報を入力する部分や自律的なリズムを強く刻む部分などに分かれていて機能的な極性が存在することがわかった。

2. 研究の目的

不規則な生活による 24 時間周期の概日リズムの乱れが、摂食行動や脂質代謝のリズムを乱し、肥満、高脂血症などの成人病の発症・進行につながる。本研究は、哺乳類概日リズムを発振する中枢である脳の SCN の 24 時間周期の活動を、独自の時計遺伝子 *Per1* 発現観察系や、大学独自の電極プローブを搭載したセンサーにて、細胞レベルで神経発火頻度を同時に計測し、電気的に刺激する。また、外部から光照射で神経活動を調節する独自の実験系 LiGluR 受容体を用いて刺激し、SCN を含む脳スライスで、リズム発振の時空間的な細胞レベルの機能マップを作成する。

3. 研究の方法

申請者が開発した、脳や末梢組織、様々な部位の時計遺伝子 *Per1* 発現変化をリアルタイムで観察できる *Per1* 組み換え Tg マウス(概日リズムモニタリング)や、所属する豊橋技術科学大学の細胞レベルで神経活動を測定できる最先端ニューロンセンサーチップ技術も組み合わせ、時計中枢 SCN 神経の時空間的に正確な観察・刺激を実現する。また、UV/可視光の照射光の波長切り替えにより神経活動を瞬時に定量的に ON、OFF できる神経細胞制御技術 (LiGluR 受容体) を応用し、マウスの SCN 神経群を外からピンポイント光照射刺激し、SCN 内部の *Per1* 発現誘導を観察し、リズム発振のダイナミックな時空間的機能マップを作成する。

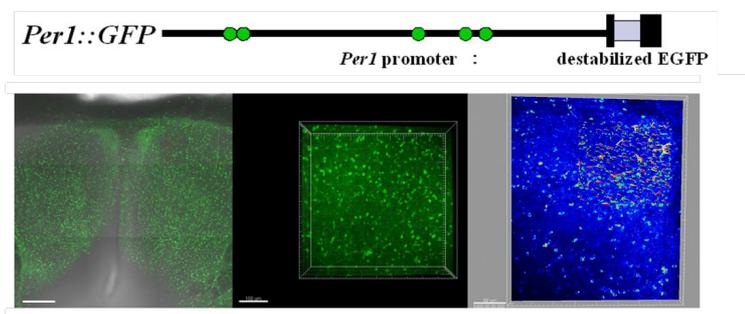
4. 研究成果

4-1 SPF マウス飼育施設・設備の整備

まず、研究に用いる遺伝子組み換えマウスを、特定の微生物に感染していない SPF (Specific Pathogen Free) 実験空間において飼育するために、豊橋技術科学大学にて、SPF マウス飼育施設や行動解析、マウスの手術、サンプルを用意する施設・設備を新しく整備した。

4-2 *Per1::GFP* 組み換えマウス観察系の確立

哺乳類の概日リズム制御において重要な役割を担う *Per1* の発現を指標にして、組織の時計機能をリアルタイムで 1 細胞レベルの測定をするため、*Per1* 発現制御領域に連結させたりポーターの緑蛍光 GFP を確認できる *Per1::GFP* 組み換えマウスを確立した (図 1)。このマウスの SCN スライスや他の末梢組織を培養しながら、共焦点や 2 光子顕微鏡で観察する実験性を確立した。培養スライス中の細胞の *Per1* の発現振動の周期は、24 時間よりも短めで部位により位相は少しずつずれていることがわかった。ひきつづき、より長期観察に適切な培養方法を探索している。



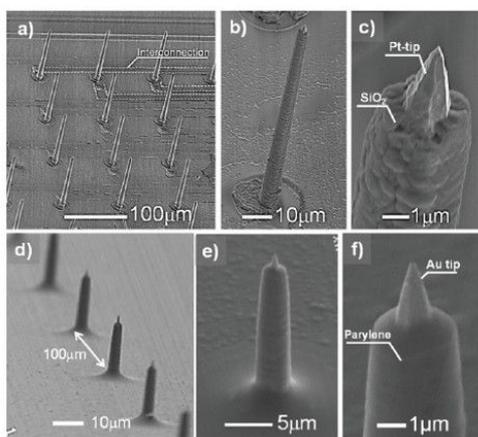
Per1::GFP マウスの SCN スライス imaging

4-3 豊橋プローブの作成と測定

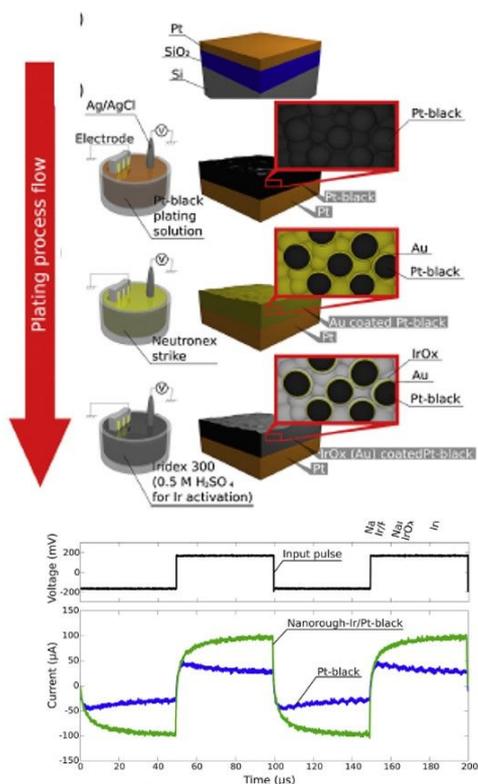
SCN スライスの神経を任意に刺激する手段は、1) Vapor-liquid-solid (VLS) 法で作成された微小刺入型マルチ電極プローブをア

レイ状に並べたセンサーチップにより、1細胞の神経活動計測・神経電気刺激を行う。また、2) 独自で開発した光照射により神経活動が調節できる LiGluR 受容体システムで繊維芽細胞株や SCN 神経細胞株を光刺激した。

まず、SCN スライスに対して、Vapor-liquid-solid(VLS)法で作成された極小ケンザン型電極刺入電極を用いて、SCN 神経細胞の発火スパイクを測定した。ノイズが高く、明確な発火スパイクを区別できなかった。脳スライスの深部の神経細胞に、



VLS 法で作成された極小ケンザン型電極



電気刺激用電極プローブ

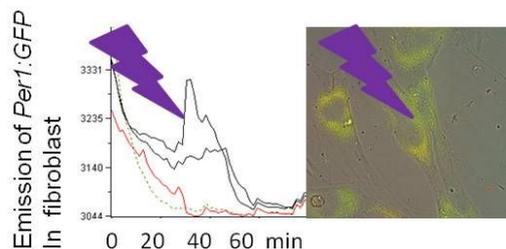
100 micron ほどの長さのプローブで、

外来性の DNA 発現ベクターを複数個所に導入できることをしめし、細胞内電位測定、1細胞電気刺激、アプローチした細胞のマーキング、さらに機能改変などをさせることができる可能性をしめた。また、豊橋プローブには、先端の形状を尖電端化するタイプのほかに、より強力な電気刺激を行う目的の構造体を付加したものも作成した。先端近くの数個の神経細胞の細胞外電位の総和をとりながら、局所的な電気刺激を試みたが、発火スパイクの振幅の増加は見られなかった。

4-4 LigluR 受容体による光刺激

次に、中枢 SCN のリズムを変化させる手段で、照射光の波長により、1細胞レベルで外部からシグナルを伝達できるバイオナノマシン LigluR 受容体遺伝子と *Per1*:GFP を発現させた培養細胞で機能させ、UV 照射で刺激する方法を行った。LigluR を発現した細胞は赤い蛍光蛋白 mcherry で光るようにし、発現を確認し、その細胞に、UV と可視光の光刺激を行い、細胞内のカルシウムイオン濃度を緑の furo4 カルシウムダイで測定する実験を行った結果、UV 照射した細胞のみでカルシウムイオン濃度が上がることから、光刺激が細胞内に伝達されていることがわかった。

次に、外部シグナルが細胞に入るとカルシウム濃度が上がり、活性化された転写因子がプロモーターに結合し、概日リズムを規定する *Per1* 遺伝子が誘導されることを *Per1*:GFP シグナルで確認した。LigluR を発現 LigluR



発現細胞の光刺激による *Per1* 遺伝子の誘導した繊維芽細胞株と SCN 細胞株は、UV 照射

で、刺激が入り、誘導剤で誘導させたポジコンと比較して、*Per1* 遺伝子が1時間後に強く誘導されていること、また、UV照射ピンポイント照射した細胞のみ、刺激が入り、*Per1* 遺伝子が強く誘導されていることがわかった

共焦点顕微鏡のレーザーを光刺激用に用いて、*Per1::GFP* トランスジェニックマウスのSCNスライスにおいても、この光刺激実験系を応用して、概日リズムに変化がきたすかを調べた。すなわち、SCNの入力・ペースメーカー・出力の部分などの色々な箇所を細かくべつべつに光刺激し、SCN周辺部位の*Per1* の発現変化を観察し光刺激による*Per1* 遺伝子の誘導ができることを確認した。

これにより、概日リズムを規定する時計遺伝子 *Per1* の発現のタイミングが緑蛍光 GFP で確認できる *Per1::GFP* トランスジェニックマウスのSCNスライスに対し、局所的に任意の場所を、任意のタイミングで刺激してリズムの変化をリアルタイムで観察できる実験形が確立した。

この実験系を利用し、左右対称なSCNの、片側のみ、光刺激を行うと、刺激した側の細胞にシグナルが伝わり、*Per1* 遺伝子が誘導されるが、数時間遅れて正中線の反対側のSCNでも誘導された。このことから、SCNの左右では、シグナルが伝達すること、その伝達には数時間単位で時間を要することがわかった。

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6件)

1 Nanoscale tipped microwire arrays enhance electrical trap and depth injection of nanoparticles. *Nanotechnology*. Vol. 23, 2741-2705, (2012)
Goryu A, Numano R, Ikedo A, Ishida M, Kawano T.

2 Small GTPase Cdc42 modulates the number

of exocytosis-competent dense-core vesicles in PC12 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. Vol.420,417-421,(2012)

Sato M, Kitaguchi T, Numano R, Ikematsu K, Kakeyama M, Murata M, Sato K, Tsuboi T 3 A fluorescence spotlight on the clockwork development and metabolism of bone

J Bone Miner Metab. Vol.30, 254-269, (2012)
Iimura T*, Nakane A, Sugiyama M, Sato H, Makino Y, Watanabe T, Takagi Y, Numano R*, Yamaguchi A * (* to whom correspondence should be addressed):

4 Melanopsin resets circadian rhythms in cells by inducing clock gene *Period1* AIP Conf. Proc. Vol.1585, 40-44,(2014)
Yamashita S, Uehara T, Matsuo M, Kikuchi Y and Numano R

5 A vertically integrated nanoscale tipped microprobe intracellular electrode array

Kubota, Y., Oi, H., Sawahata, H., Goryu, A., Ando, Y., Numano R, Ishida, M., Kawano, T.

Micro Electro Mechanical Systems (MEMS), 155 - 158, (2014)

6 Layer-by-layer assembled nanorough iridium-oxide/platinum-black for low-voltage microscale electrode neurostimulation,

Sensors and Actuators B: Chemical, 206, 205-211 (2015)

Yamagiwa S, Fujishiro A, Sawahata H, Numano R, Ishida M, Kawano T

[学会発表](計18件)

2012

1 Relationship between circadian rhythms and cell cycle, 第12回日本抗加齢医学会総会(招待講演) 沼野利佳

2 Nanosculpting reversed wavelength sensitivity into a photoswitchable iGluR, 第89回日本生理学会大会, 沼野利佳

3 Invention of Photoswitchable Glutamate Receptor " 第9回日本女性科学者の会, 沼野利佳

4 Melanopsin DNA Aptamer to regulate the phase of circadian rhythms, Interdisciplinary research Conference, S Yamashita, Y Kikuchi and R Numano

5 Nanosculpting reversed wavelength sensitivity into a photoswitchable iGluR., proceedings of the 89th annual meeting, Numano R, Isacoff EY

6 Nanoscale tipped microwire arrays enhance electrical trap and depth injection of nanoparticles. proceedings of the 89th annual meeting, Goryu A, Numano

R, Ikedo A, Ishida M, Kawano T.
7 New tool for optical control to reset circadian rhythms ,Interdisciplinary research Conference 2012 , T Nagao, S Nomura, Y Kikuchi and R. Numano
8 Optical resets circadian rhythms in peripheral cell by inducing clock gene Period1, Interdisciplinary research Conference, M Matsuo and R. Numano
9 Optical Control of Circadian Rhythms, Neuroscience (Society for Neuroscience), R. Numano:
10 時計遺伝子が脳の中核時計の針として発信する機構, JST 科学技術コミュニケーション推進事業「ネットワーク形成 地域型」, 沼野利佳

2013
11 Circadian rhythms reset by photo-activated LiGluR in aging fibroblast cells, Interdisciplinary research Conference nce Research, M Matsuo, M Yoshino and R Numano
12 Bioluminescence imaging with the bundle-fiber-coupled microscope,Interdisciplinary research Conference nce Research , Y. Ando¹ T. Sakurai, M. Natsume, K. Koida and R. Numano
13 The circadian clock can be phase-reset by photo-switched channels, proceedings of the 2013 Neuro meeting , Numano R* , Matsuo M

2014
14 A vertically integrated nanoscale tipped microprobe intracellular electrode array Micro Electro Mechanical Systems (MEMS), IEEE 27th International Conference, Kubota, Y. ,Oi, H. ; Sawahata, H. ; Goryu, A. ; Ando, Y. ; Numano, R. ; Ishida, M. ; Kawano, T
15 Nano-scale electrical probe and photoswitchable nanomachine for manipulation of neuronal cell activity applied to circadian rhythm research, 14th Japan-China-Korea Joint Workshop on Neurobiology and Neuroinformatics NBNI 2014, Numano, R
16 Multi monitoring of pacemaker neurons in circadian rhythms, 名古屋大学神経回路国際シンポジウム, Numano, R
17 The spatial resolution analysis of the bundle-fiber-coupled microscope for in vivo bioluminescence imaging,The Irago Conference, Y. Ando, K. Koida, T. Sakurai, M. Natsume and R. Numano "
18 時計遺伝子が脳の中核時計の針として発信する機構, 日本動物学会 第85回仙台大会, 沼野利佳

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tut.ac.jp/university/faculty/ens/677.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

沼野 利佳 (Numano Rika)

豊橋技術科学大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号: 3 0 4 6 2 7 1 6

(2)研究分担者

中尾 和貴 (Nakao Kazuki)

東京大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号: 2 0 2 1 7 6 5 7

(3) 研究分担者

河野 剛士 (Kawano Takesi)

豊橋技術科学大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号: 7 0 4 5 2 2 1 6