

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860156

研究課題名(和文) 中枢時計のin vivo計測による概日リズムのシステムの理解

研究課題名(英文) Understanding of circadian system in the central circadian clock using in vivo recording

研究代表者

小野 大輔(Ono, Daisuke)

名古屋大学・環境医学研究所・助教

研究者番号：30634224

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類の概日時計の中枢は視交叉上核に存在する。私たちは、時計遺伝子Cryに依存してAVP発現量が低下し、発達初期にはVIPを介したネットワークが重要であることを明らかにした。(Ono et al., 2016 Science Advances)。
光ファイバーを用いて、自由行動下マウス視交叉上核からのPer1とBmal1の遺伝子発現リズム計測システムを構築し、外界の光環境を一時的に変化させた際にPer1とBmal1の位相関係が変わることを明らかにした。また培養視交叉上核では、Per1とBmal1のリズム周期が異なる事を、明らかにした(Ono et al., 2017 PNAS)。

研究成果の概要(英文)：The temporal order of physiology and behavior is regulated by the circadian pacemaker located in the suprachiasmatic nucleus (SCN). We identified VIP is essential for the tissue-level circadian rhythm in the neonatal SCN of CRY double deficient mice (Cry1,2-/-). On the other hand, AVP synthesis was significantly attenuated in the Cry1,2-/- SCN, which contributes to aperiodicity in the adult mice together with an attenuation of VIP signaling as a natural process of ontogeny (Ono et al., 2016 Science Advances).
We also established in vivo clock gene expression rhythms using an optical fiber, and found that The Per1 rhythm was phase-delayed instantaneously by the light in parallel with the activity-onset, whereas the Bmal1 rhythm was phase-delayed gradually similar to the activity-offset. Dissociation of Per1 and Bmal1 rhythms was also observed in the cultured SCN slice. These results suggest the existence of two oscillations with different molecular mechanisms (Ono et al., 2017 PNAS).

研究分野：概日リズム

キーワード：概日リズム 視交叉上核 生後発達 発光イメージング 蛍光イメージング

1. 研究開始当初の背景

生体内で生じる睡眠・覚醒を含めた一日単位の現象を「概日リズム」と呼び、脳内視床下部に位置する「視交叉上核」が概日時計の中核として機能している。この概日リズムは時計遺伝子の転写・翻訳を介したネガティブフィードバックループにより形成され (Reppert et al 2002 Nature) 最終的に睡眠・覚醒を含めた行動リズムに出力される。近年の「光」を用いたイメージング技術により細胞、組織レベルの遺伝子発現測定が *ex vivo* レベルで可能となり、個々の細胞の性質や概日リズム形成と神経ネットワークとの関係性が徐々に明らかになってきた。例えば、分散培養条件における個々の細胞レベルの概日リズムを計測する方法 (Nagoshi et al 2004 Cell, Liu et al., 2007 Cell) や、ある薬剤を投与した時の細胞間ネットワークの変化を測定する方法 (Yamaguchi et al., 2003 Science, O'Neill et al., 2008 Science) により *ex vivo* における概日リズム形成メカニズムを定量化する試みは行われてきた。また申請者はこれらの技術を用い、概日時計の神経ネットワークが生後発達とともに変化すること、そしてその変化が時計遺伝子 *Cry* に依存していることを明らかにしてきた (Ono et al., 2013 Nat. Commun)。しかしながら、これら細胞単位で生じる現象がどのように行動リズムに出力され個体の行動を制御しているかは明らかになっていない。したがって、睡眠・覚醒リズム、体温リズムやホルモン分泌など体内で生じる生理現象のメカニズムを統一的に理解する為に、遺伝子レベルの現象と細胞ネットワークさらに個体レベルの現象を直接結び付けて評価することは重要なアプローチになる。

2. 研究の目的

本研究は、睡眠・覚醒リズムを制御する概日時計の遺伝子、細胞単位の現象と行動の変化を長期間、同時に計測する技術を駆使し、新たな概日リズム機能を明らかにする。これまで申請者は 発光イメージングを用い、*ex vivo* での生後発達に伴う概日リズムの神経ネットワークの変化と時計遺伝子との関係性を明らかにした (Ono et al., 2013 Nat. Commun.)。しかしながら遺伝子、細胞単位で生じる現象がどのように行動に出力され、

どの細胞集団がどの行動に関与しているかなど、個体単位で生じる現象との関連性を明らかにすることは重要な問題であるがその詳細は分かっていない。そこで申請者は自由行動下のマウスの脳内の遺伝子ネットワークを可視化し、部位特異的遺伝子操作により行動リズムを制御する概日リズムの新たなメカニズムに迫る。

3. 研究の方法

(1) 視交叉上核スライス培養を用いた、発光イメージング

視交叉上核の神経ネットワークの生後発達

概日時計の中核である、視交叉上核の神経ネットワークの生後発達に、時計遺伝子 *Cry* が関与する事を以前報告した (Ono et al., 2013 Nature Communications)。視交叉上核の生後発達に伴う神経ネットワークのさらなるメカニズム解明のために、神経ペプチドである vasoactive intestinal polypeptide (VIP) と arginine vasopressin (AVP) に着目した。時計遺伝子 *Cry1/2* 欠損マウスに、VIP 受容体 (VPAC2) の欠損マウスを掛け合わせ、*Cry1/2*-VPAC2 欠損マウスを作成した。なおこのマウスは、時計遺伝子の *Per2* タンパク質に発光酵素が結合したレポーターマウス (*PER2::LUC* マウス) も同時に掛け合わせている。生後7日目および8週齢以上のマウスから視交叉上核のスライスを作成し、ルシフェリン入りの培地で培養し、視交叉上核から得られる発光輝度を、光電子増倍管または CCD カメラで発光輝度を連続計測した。次に、*Avp* プロモーター下流に、Emerald-Luc (*E-Luc*) cDNA をノックインしたレポーターマウス (*Avp-ELuc*) マウスと、*Cry1/2* 欠損マウスを交配し、*Avp* の転写活性を計測した。同様に、生後7日目および8週齢以上のマウスから視交叉上核のスライスを作成し、発光輝度を光電子増倍管で計測した。

視交叉上核スライスの多機能同時計測システムの構築

培養視交叉上核から、時計遺伝子 *Per1* と *Bmal1*、細胞内カルシウムイオン濃度、神経発火の4機能同時計測を行った。*Per1-luc* マウスと *Bmal1-ELuc* マウスを交配し、ダブルトランスジェニックマウスを作成した。この

マウスの視交叉上核のスライスを作成し、610nm のロングパスフィルターで F-luc (Per1-luc) と E-Luc (Bmal1-ELuc) を分離した。さらに、アデノ随伴ウイルスを用いて蛍光カルシウムプローブ GCaMP6s を発現させ、多電極ディッシュ上で視交叉上核を培養した。

(2) 光ファイバーを用いた無麻酔・無拘束マウス脳内遺伝子発現測定

直径 500 μ m のプラスチックファイバーを Per1-luc または Bmal1-ELuc マウス脳内に挿入し、視交叉上核からの発光輝度を光電子増倍管にて計測した。同時に赤外線センサーを用いて、マウスの自発行動量を同時に計測した。基質である、ルシフェリンはオスモティックポンプに充填し、腹腔内から投与した。マウスを、恒常暗に移した5日目に9時間の光パルスを与えた。光パルスは、主観的夜の前半あるいは後半に与え、その後の自発行動の位相シフトと視交叉上核の Per1 あるいは Bmal1 の概日リズムのシフト量を計算した。

4. 研究成果

(1) 視交叉上核スライス培養を用いた、発光イメージング

視交叉上核の神経ネットワークの生後発達

Cry1/2-VPAC2 欠損マウスの視交叉上核の PER2::LUC は、生後7日目および8週齢以上の両条件ともに概日リズムが認められなかった。また CCD カメラを用いた一細胞イメージングの結果、細胞レベルには概日リズムが認められ、個々の細胞のリズム周期は短いものから長いものが認められた。また、Cry1/2 欠損マウスの新生児視交叉上核の cAMP, Ca²⁺ の細胞内濃度を薬剤で低下させると、Cry1/2-VPAC2 欠損マウスと同じ結果が得られた。これらの結果は、VIP とその細胞内シグナルトランスダクションの cAMP, Ca²⁺ 経路が Cry1/2 マウス視交叉上核の新生児期の細胞間カップリングに関わることを示す (Ono et al., 2016 Sci. Adv.)。

Cry1/2 欠損マウスの視交叉上核からの Avp 転写活性を発光レポーターで調べた際、新生児、成獣ともに Avp-ELuc リズムが認められず、転写活性も抑えられていた。この結果は、

AVP を介した細胞間カップリングには Cry がかわることを示す (Ono et al., 2016 Sci. Adv.)。

視交叉上核スライスの多機能同時計測システムの構築

培養視交叉上核から Per1, Bmal1, Ca²⁺, 神経発火の4機能同時計測を行った結果、Bmal1 リズムは、Per1 リズムに比べ周期が短く、内的脱同調をおこなっていた。また細胞内の Ca²⁺ と神経発火リズムは、Per1 と Bmal1 リズム周期のちょうど中間を示していた。これらの結果は、視交叉上核内には異なる二つのリズム形成メカニズムが存在することを示す (Ono et al., 2017 PNAS)。

(2) 光ファイバーを用いた無麻酔・無拘束マウス脳内遺伝子発現測定

主観的前半に9時間の光パルスを与えた結果、活動開始位相は直ちに位相シフトしたのに対し、活動終了位相は3 - 5日間の移行期を経て行動リズムがシフトした。視交叉上核の Per1 リズムは、9時間の光パルスにより、直ちに位相シフトしたのに対し、Bmal1 のリズムは、3 - 5日の移行期を経て位相シフトした。この結果は、視交叉上核の Per1 と Bmal1 のリズムは、光パルスにより一時的にかい離することを示す (Ono et al., 2017 PNAS)。

本研究結果は、哺乳類の概日時計に関わる2つの時計遺伝子が独自の振動機構を持つこと明らかにした世界で初めての研究成果であり、概日リズム振動機構理解の進展と、睡眠覚醒の制御メカニズム解明に結び付く。

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. Ono, D., and Yamanaka, A.: Hypothalamic regulation of the sleep/wake cycle. **Neuroscience Research** (2017) in press (査読有)
2. *Ono, D., *Honma, S., Nakajima, Y., Kuroda, S., Enoki, R., and Honma, K.: Dissociation of Per1 and Bmal1 circadian rhythms in the suprachiasmatic nucleus in

- parallel with behavioral outputs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. doi: 10.1073/pnas.1613374114. (2017). *: **Corresponding authors** (査読有)
3. Enoki, R., Oda, Y., Mieda, M., **Ono, D.**, Honma, S., and Honma, K.: Synchronous circadian voltage rhythms with asynchronous calcium rhythms in the suprachiasmatic nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. doi: 10.1073/pnas.1616815114 (2017). (査読有)
 4. †Enoki, R., †**Ono, D.**, Kuroda, S., Honma, S., and Honma, K.: Dual origins of the intracellular circadian calcium rhythm in the suprachiasmatic nucleus. *Scientific Reports* 7, 41733. doi: 10.1038/srep41733. (2017)†: **These authors contributed equally to this work.** (査読有)
 5. **Ono, D.**, Honma, S., and Honma, K.: Differential roles of AVP and VIP signaling in the postnatal changes of neural networks for coherent circadian rhythms in the SCN. *Science Advances* 2, e1600960 (2016). (査読有)
 6. **Ono, D.**, Honma, S., and Honma, K.: Circadian PER2::LUC rhythms in the olfactory bulb of freely moving mice depend on the SCN but not on behavior rhythms. *European Journal of Neuroscience* 42:3128-3137 (2015). (査読有)
 7. Tsuchiya, Y., Minami, Y., Umemura, Y., Watanabe, H., **Ono, D.**, Nakamura, W., Takahashi, T., Honma, S., Kondoh, G., Matsuishi, T., and Yagita, K. Disruption of MeCP2 attenuates circadian rhythm in CRISPR/Cas9-based Rett syndrome model mouse. *Genes to Cells* 20:992-1005 (2015). (査読有)
 8. †Tokuda, I., †**Ono, D.**, †Ananthasubramaniam, B., Honma, S., Honma, K., and Herzog, H. Coupling controls synchrony of clock cells in development and knockouts. *Biophysical Journal* 109:2159-2170 (2015). †: **These authors contributed equally to this work.** (査読有)
 9. **Ono, D.**, Honma, K., and Honma, S.: Circadian and ultradian rhythms of clock gene expression in the suprachiasmatic nucleus of freely moving mice. *Scientific Reports* 5, 12310; doi: 10.1038/srep12310 (2015). (査読有)
 10. Mieda M., **Ono, D.**, Hasegawa E., Okamoto H., Honma K., Honma S., Sakurai T. Cellular Clocks in AVP Neurons of the SCN Are Critical for Interneuronal Coupling Regulating Circadian Behavior Rhythm. *Neuron* 85:1103-1116, (2015). (査読有)
- [学会発表](計 26 件)
1. **小野大輔**, 本間研一, 柳川右千夫, 本間さと. マウス視交叉上核における GABA の機能 第 94 回日本生理学会大会, 3 月 28-30 日, 2017 年, 浜松アクロシティ.
 2. **小野大輔** Postnatal development of the neural networks in the mammalian circadian pacemaker 第 9 回 NAGOYA グローバルリトリート 2 月 11 日, 2017 年, あいち健康プラザ
 3. **小野大輔**, 中島芳浩, 本間研一, 本間さと. マウス視交叉上核の概日リズム多機能同時計測: Per1 と Bmal1 リズムの乖離, 第 23 回日本時間生物学会, 11 月 12-13 日, 2016, 名古屋大学
 4. **Ono, D.**, Honma, S., and Honma, K. Differential roles of AVP and VIP signaling in the postnatal development of the neural networks for the circadian clock in the suprachiasmatic nucleus. Sapporo symposium, Keio-praza Hotel, Sapporo, Japan, Nov. 9-10, (2016).
 5. **小野大輔** 視交叉上核の生後発達と時計遺伝子 Cryptochrome の役割, 日本時間生物学会奨励賞受賞講演, 11 月 13 日, 2016 年, 名古屋大学.
 6. **小野大輔**, 本間さと, 本間研一. Postnatal development of neuronal networks in the mammalian circadian clock. 神経回路研究会, 10 月 7 日, 2016, 名古屋.
 7. **小野大輔**, 本間さと, 中島芳浩, 本間研一 視交叉上核概日リズムの多機能同時計測 第 39 回日本神経科学大会 7 月 20-22 日, 2016 年, 横浜.

8. **小野大輔**、中島芳浩、本間研一、本間さと。発光・蛍光を用いた視交叉上核概日リズムの多機能同時計測 第8回光操作研究会、9月29-30日、2016、慶應義塾大学。
9. **小野大輔**、中島芳浩、本間研一、本間さと。発光タンパク質を用いた概日リズムの多機能同時計測 第6回生理学研究所・名古屋大学医学系研究科 合同シンポジウム 9月24日、2016、名古屋大学医学研究科。
10. **小野大輔** CRY 二重欠損マウスにおける視交叉上核の細胞間カップリングと生後発達 Cryptochrome 研究会 4月16日、2016年、東京大学。
11. **小野大輔**、本間さと、本間研一、VIP and AVP signaling regulate circadian cellular networks in the suprachiasmatic nucleus during postnatal development 第93回日本生理学会大会、3月22-24日、2016年、札幌コンベンションセンター。
12. **小野大輔**、本間さと、本間研一 VIP と AVP は生後発達における視交叉上核概日リズムの細胞間カップリングを調節する 第93回日本生理学会大会 3月22-24日、2016、札幌
13. **小野大輔** 視交叉上核と私。時間医学講座開講10周年シンポジウム 3月19日、2016年、北海道大学。
14. **Ono, D.**, Honma, S., and Honma, K. VIP and AVP regulate circadian cellular networks in the suprachiasmatic nucleus of Cryptochrome deficient mice during postnatal development. Asian Forum on Chronobiology in 2015, Hokkaido University, Sapporo, Japan, Sep. 7-9, (2015).
15. **小野大輔**、本間さと、本間研一。視交叉上核の生後発達にともなう神経ネットワーク形成 第38回日本神経科学学会 7月28-31日、2015、神戸国際会議場(**シンポジウムオーガナイザー**)。
16. **小野大輔**、本間研一、本間さと。Cry1/2ダブルノックアウトマウス視交叉上核における概日リズム形成メカニズム 第92回日本生理学会大会 3月21-23日、2015、神戸国際会議場。
17. **小野大輔**、本間さと、本間研一。Cryptochrome は生後発達における視交叉上核概日リズムの細胞間カップリングに重要である。久野賞受賞記念講演、第10回環境生理プレコンgres、3月20日、2015年、ホテル北野プラザ六甲荘。
18. **Ono, D.**, Honma, K., and Honma, S. Real time monitoring of clock gene expression in response to environmental time cues from the suprachiasmatic nucleus of freely moving mice. Society for Neuroscience 2014 (Selected for Data blitz), Washington DC. USA, Nov. 15-19, (2014).
19. **Ono, D.**, Honma, K., and Honma, S. Real time monitoring of clock gene expression in response to environmental time cues from the suprachiasmatic nucleus of freely moving mice. Society for Neuroscience 2014, Washington DC. USA, Nov. 15-19, (2014).
20. **小野大輔**、本間さと、本間研一。自由行動下マウス嗅球のPER2リズム計測と解析第22回日本時間生物学会 11月21-22日、2015、東京大学。
21. **小野大輔**、本間さと、本間研一。無麻酔・無拘束マウスの視交叉上核からの時計遺伝子発現計測 第21回日本時間生物学会 11月7-9日、2014、九州大学。
22. **小野大輔**、本間研一、本間さと。マルチモーダル計測システムを用いた概日リズムの理解 第87回日本生化学大会 10月15-18日、2014、国立京都国際会館。
23. **小野大輔**、本間さと、本間研一。Circadian rhythm generation and tuning in the suprachiasmatic nucleus, the master clock of mammals. 第37回日本神経科学学会 9月11-13日、2014、パシフィコ横浜。
24. **Ono, D.**, Honma, K., and Honma, S. In vivo measurement of gene expression in the circadian pacemaker with an optical fiber in freely moving mice. The 12th international symposium for future drug discovery and medical care. Hokkaido University, Sapporo, Japan, Sep. 4-5, (2014).
25. **小野大輔**、本間研一、本間さと。光ファイバーを用いた自由行動下マウス脳内長期遺伝子発現計測 第93回日本生理学会北海道地方会 8月30日、2014、札

幌 .

26. **Ono, D.**, Honma, K., and Honma, S. In vivo clock gene recording from the suprachiasmatic nucleus in freely moving mice. Sapporo symposium, Hokkaido University, Sapporo, Japan, July 25-27, (2014).

〔図書〕(計 7 件)

1. **小野大輔**、本間研一、本間さと：概日時計と生後発達。生体の科学 67 (6) (2016)
2. **小野大輔**、本間さと、本間研一：時計遺伝子 *Cryptochrome* は生後発達に伴う視交叉上核の概日リズム形成に重要な役割を示す(Best article of the year) 北海道医学雑誌 (2014) .
3. **Ono, D.**, Honma, S., and Honma, K. Simultaneous and long-term measurement of gene expression and neuronal activity from a brain slice. Protocol Exchange doi:10.1038/protex.2014.010 (2014).
4. **Ono, D.**, Kori, H., Honma, S., Daan, S., and Honma, K. Cellular circadian rhythms in the suprachiasmatic nucleus: An oscillatory or a stochastic process? In: Honma K. ed. Dynamics of Circadian Oscillation in the SCN, Hokkaido Univ. Press, pp.21-32, (2014).
5. Honma, S., **Ono, D.**, and Honma, K. Cellular oscillators in the suprachiasmatic nucleus for behavior rhythm expression in the mouse lacking CRYPTOCHROME. In: Honma K. ed. Dynamics of Circadian Oscillation in the SCN, Hokkaido Univ. Press, pp.79-89, (2014).
6. Honma, K., **Ono, D.**, Honma, S., and Tokuda, I. Bout Oscillator: hypothetical circadian oscillators for activity bouts. In: Honma K. ed. Dynamics of Circadian Oscillation in the SCN, Hokkaido Univ. Press, pp.91-105, (2014).
7. Tokuda, I., Herzog, H., **Ono, D.**, Honma, S., and Honma, K. Oscillator Network modeling of the suprachiasmatic nucleus in *Cry1/Cry2* double deficient mice. In: Honma K. ed. Dynamics of Circadian Oscillation in the SCN, Hokkaido Univ. Press, pp.139-153, (2014)

〔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.hokudai.ac.jp/news/170418_pr3.pdf
https://www.med.hokudai.ac.jp/press_release/2016/doc/160912_med_pr.pdf
<https://www.chronomedicine-sapporo.com/>
<https://daiono14.wixsite.com/circadianrhythm>
<http://researchmap.jp/daiono14/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

小野 大輔 (ONO DAISUKE)
名古屋大学・環境医学研究所・助教
研究者番号：30634224

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()