

# 研究報告書

## 「生物時計中枢における細胞ネットワークの計測・制御と再構成」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成25年10月～平成29年3月

研究者: 榎木 亮介

### 1. 研究のねらい

「生物時計」は、生命が地球の24時間の環境変化に適応する為、進化の過程で獲得した能力であり、生命は様々な形で自身の生物時計を巧みに利用して、己の生存戦略を有利にしている。我々ほ乳類の生物時計(概日リズム)の中枢は、脳深部の視床下部にある視交叉上核に存在する。視交叉上核は、多様な性質を持つ神経細胞やグリア細胞が相互連絡し、ネットワーク内に複数の領域振動体を形成し、さらに領域振動体同士が連絡しあう、「階層的」かつ「多振動体」構造をもつ細胞ネットワークを構築する。個々の神経細胞を分散培養して細胞連絡を疎にすると細胞レベルの概日リズムの周期や振幅は多様ではあつくが、細胞ネットワークを形成すると組織全体としては24時間に正確で強靱な概日リズムを刻むが、生理現象の背後にあるメカニズムについての多くは不明である。

本研究では、光イメージング計測を基盤として、生物時計中枢として特徴的な機能「自律振動性」や「光同調性」といった性質が、視交叉上核の細胞ネットワークでどのように達成されているかを解明する目的で研究を行った。特に高解像度の長期間の光イメージング計測により、神経細胞の時計遺伝子の発現リズムや、細胞内カルシウム濃度、膜電位変動といった神経細胞の複数機能を同時に可視化することを試みた。特に、細胞内における時計遺伝子の発現から中間分子であるカルシウム、膜電位や神経発射活動などの細胞出力応答を同時に可視化することで、その関連性を解析した。さらに光遺伝学による細胞機能を時空間的に自在に操作することや、微細加工技術などを駆使して、細胞ネットワーク機能を構成的に理解することを目指して研究を行った。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

これまでの高解像度の長期光イメージング計測により、神経細胞ネットワークレベルでの概日カルシウムリズムを報告している(Enoki et al., PNAS, 2012)。本研究では、複数の細胞機能(時計遺伝子発現・神経発射活動・細胞内カルシウム濃度)を、同組織の同部位から同時計測する手法を確立し、概日カルシウムリズムが時計遺伝子と細胞間カップリングの2つの機構により制御されることを見出した。また、神経細胞の膜電位変動を光イメージングにより直接捉えることで、空間特異的な概日カルシウムリズムの位相パターンとは異なる、神経細胞ネットワーク全体で同期する「概日膜電位リズム」を見出し、細胞種により細胞機能の位相関係が異なることを発見した。また、さきがけ領域の班会議や自主研究会で得た微細加工技術の知識を概日リズム研究に応用し、マイクロパターン基盤上に視交叉上核の神経細胞を分散培養することで、細胞ネットワークやグリア細胞の影響を排除した「真の1神経細胞」から、概日カルシウムリズムを計測することに成功した。

## (2) 詳細

### 研究テーマ A 「視交叉上核の神経細胞ネットワークの多機能計測」

時計遺伝子 *Period2* (PER2) の発光レポーターマウス (PER2::LUC) と交配した正常マウス、及び時計遺伝子 *Cryptochrome*<sup>1/2</sup> 二重欠損マウス (以下 Cry-dKO) より視交叉上核培養スライスを作成し、アデノ随伴ウイルスを用いて高感度カルシウムセンサー (GCaMP6s) を発現させ、多電極ディッシュアレイ (MED) 上に培養して、視交叉上核の細胞ネットワークの同領域から時計遺伝子発現/カルシウム濃度変化/神経発射頻度変化を同時計測した (図1)。

各リズムパラメーター、位相関係、空間パターンを詳細に解析した。正常マウスの視交叉上核では、カルシウム→神経発射活動→時計遺伝子発現のリズム位相順が観察された。一方、視交叉上核の神経間連絡が減弱する

Cry-dKO の視交叉上核では、各リズムの振幅が減弱し、野生型と比較して PER2-カルシウム間の位相関係が有意に短縮していることを見出した。またリズムの空間パターンを野生型と Cry-dKO 動物間で比較したところ、Cry-dKO では視交叉上核の背側領域でカルシウムリズムが著しく減弱し、腹側領域では PER2-カルシウム間の位相関係が顕著に短縮していた。

これらの結果を総合的に解釈することで、カルシウムリズムは「時計遺伝子」と「細胞間連絡」による二重の制御機構により調節されることを示した。本研究の結果は、原著論文の投稿を完了し、現在審査中である。

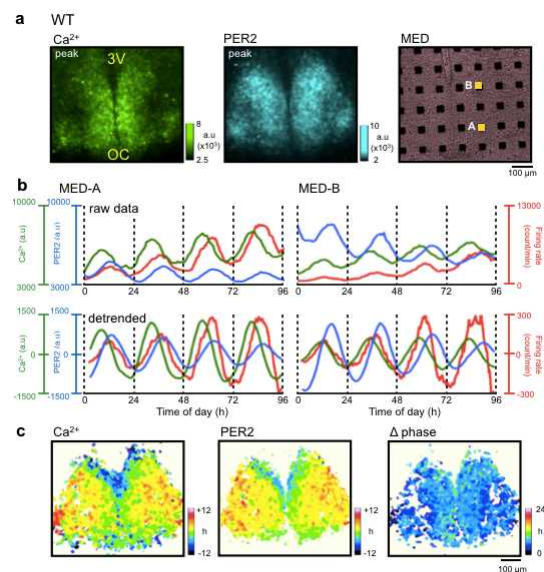


図1: 正常マウスにおける3機能同時計測

(a). カルシウム (左)、時計遺伝子 PER2 (中央)、多電極アレイ (右)。  
(b). 3機能リズムの同時計測。  
(c). 頂点位相マップ (左、中央) と位相差マップ (右)

**Enoki R, Ono D, Kuroda S, Honma S, Honma KI.** Dual origins of the intracellular circadian calcium rhythm in the suprachiasmatic nucleus. under 2nd round of review.

### 研究テーマ B 「概日膜電位リズムの可視化解析」

培養視交叉上核スライス of 神経細胞特異的に、アデノ随伴ウイルスを用いて遺伝子コード型の膜電位感受性蛍光プローブ (ArcLightD) を発現させ、長期蛍光タイムラプスシステムにより長期計測を行ったところ、視交叉上核の神経細胞ネットワーク全体でリズム位相が同期する膜電位の概日リズムを見出した。赤色カルシウムセンサー (R-GECO) を用いてカルシウムリズムと膜電位リズムの同時計測を行ったところ、概日カルシウムリズムは以前の報告の通り視交叉上核の背側-腹側領域で特徴的な位相空間パターンを示したが、膜電位リズムは視交叉上核全体で同位相だった (図2)。

さらに細胞種特異的に ArcLightD を発現させ、VIP 細胞と AVP 細胞特異的に膜電位リズムを計測した所、細胞種別に膜電位リズムとカルシウムリズムの位相関係が異なることを見出し

た。さらに、多電極アレイディッシュを用いた神経発射リズム計測と、光計測による膜電位リズムの同時測定により、神経発射リズムも視交叉上核ネットワークで同期することと、生後発達に伴い膜電位リズムの同期が強くなることが分かった。これらの結果をまとめた原著論文を投稿し現在審査中である。

**Enoki R, Oda Y, Mieda M, Ono D, Honma S, Honma KI.** Synchronous circadian voltage rhythms with asynchronous calcium rhythms in the suprachiasmatic nucleus. under 2nd round of review.

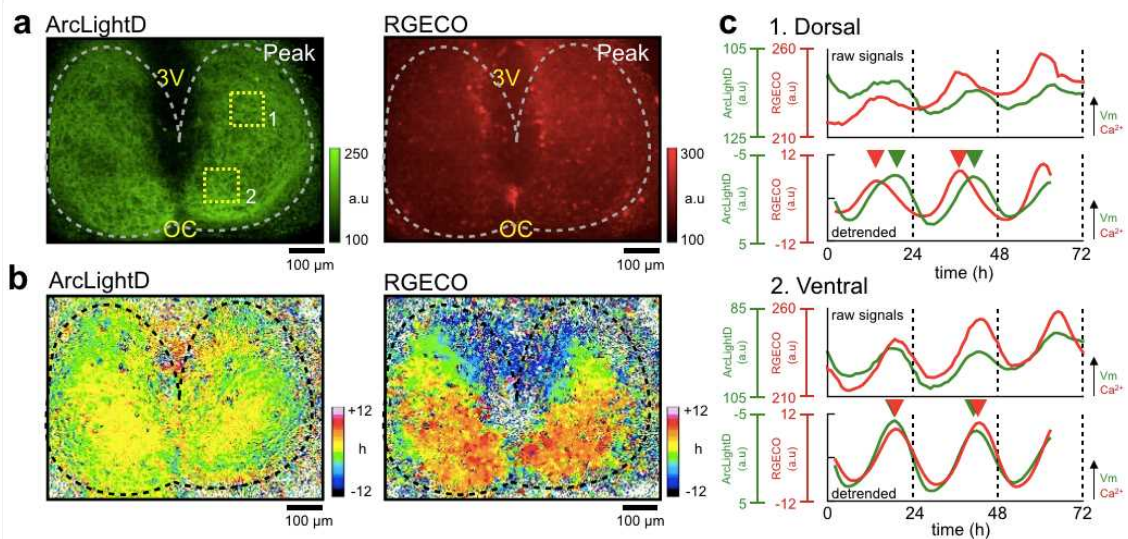
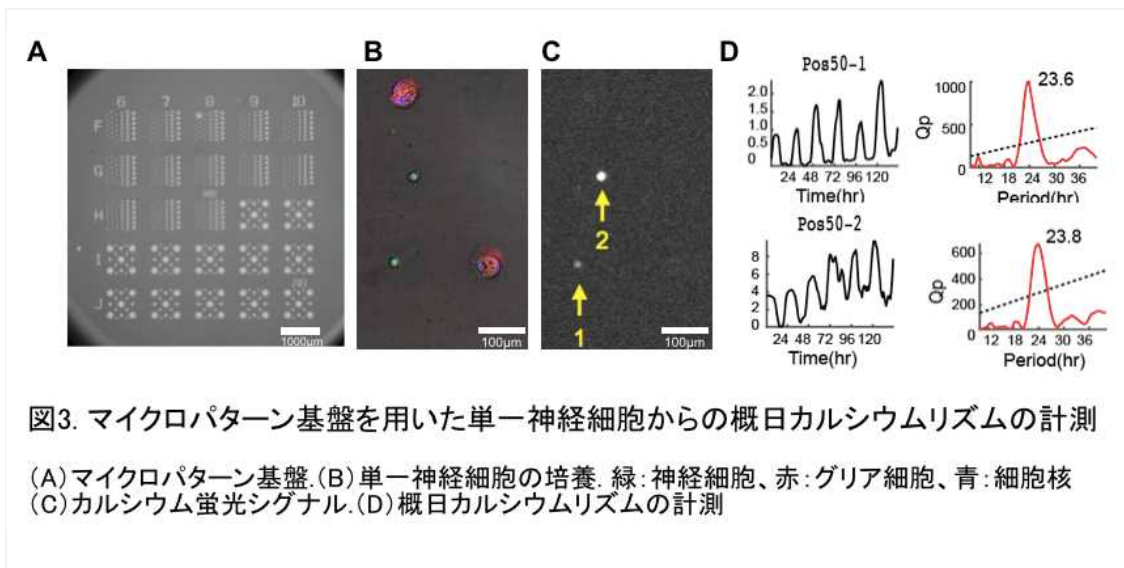


図2: 膜電位リズムとカルシウムリズムの同時計測

(a). 膜電位プローブと(左)カルシウムプローブ(右)の発現. (b). 頂点位相マップ.  
(c)カルシウム(赤)と膜電位(緑)の概日リズム

### 研究テーマ C 「微細加工技術による単一神経細胞の概日カルシウムリズム計測」

細胞間連絡がない1神経細胞で自律的な概日リズムが観察できるか検証する為、微細加工技術を利用して細胞培養区画(ウェル)サイズの異なる様々なマイクロパターン基盤を作成し、視交叉上核から神経細胞およびグリア細胞を採取して分散培養を行った。アデノ随伴ウイルスによる感染発現によりカルシウムプローブ(GCaMP6s)を発現させ長期タイムラプス観察を行ったところ、細胞間の直接連絡のない、かつグリア細胞も存在しない1神経細胞のみからカルシウムリズムを観察することに成功した(図3)。



### 3. 今後の展開

本研究課題により、光イメージング計測を駆使して生物時計中枢の細胞ネットワーク機能の自律振動メカニズムの本質に関わる発見をすることができた。一方で外界環境に適應する光同調メカニズムや、動物個体レベルでの機能については本研究でまだ明らかにすることが出来ておらず、継続課題である。一方、本研究を通じて今後の研究のシーズとなる新規の実験系を確立することや、新しい生命現象を見つけており、一つ一つの研究のシーズを育てて行きたい。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

(研究者)

本研究により、これまでの生物時計の光イメージング計測を複数機能の同時計測に拡張し、新規プローブにより膜電位リズムを発見することが出来た。生物時計研究では世界でトップレベルの光イメージング計測の研究技術を確立し、独自の研究スタイルを築くことが出来たと自負している。また研究費サポートによりに研究に必須の顕微鏡タイムラプスシステムを構築することができ、また共同研究を通じて異なる分野との融合研究が進み、次世代の人材も育てており、今後の研究の大きな資産となってゆくと思われる。

一方で、当初掲げた目標である細胞操作やビボ計測などは計画通りには進んでおらず、まだ目標を達成できていない。これらは今後の継続課題であるが、当初計画では予想していなかった工学との融合研究などにより、今後の研究のシーズとなる新規の実験系を確立することや、新しい生命現象を見つけることが出来たことは大きな収穫である。これはさきがけでのサポート期間中に挑戦的な実験を行うことができたことが大きい。またこれらの研究のシーズはさきがけ会議や同期生との自主研究会での交流から生まれている。このさきがけ領域で、異なる分野の研究者が密に交流することで新しい研究が生まれることを実感した。今後もこのシーズを一つ一つ育てて行きたい。

最後に、3度の書類と面接審査を通じて、実験計画の立て方、申請書の書き方、プレゼンテーション技術、質疑応答対応など、研究者として生きてゆくのに必要な力をつけることができ、

加えて今後 10 年単位の長期的な視点をもつ大切さも学ぶことができたことも大きな収穫であった。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

視交叉上核の神経細胞に細胞種選択的に様々な遺伝子コード型機能プローブを発現させて、長期間光計測することで、細胞ネットワークレベルで、細胞内カルシウム濃度、膜電位、神経発射活動などの概日リズムを同時計測することに成功した。一連の実験により、概日カルシウムリズム、時計遺伝子発現と細胞間連絡の2つの機構により制御されること、また細胞ネットワーク全体で同期する概日膜電位リズムの存在を見出したことを高く評価したい。

## 5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Brancaccio M, Enoki R, Mazuski CN, Jones J, Evans JA, Azzi A. Network-mediated encoding of circadian time: the suprachiasmatic nucleus (SCN) from genes to neurons to circuits, and back. *J Neurosci*. 2014;34(46):15192-9.
2. Yoshikawa T, Nakajima Y, Yamada Y, Enoki R, Watanabe K, Yamazaki M, Sakimura K, Honma S, Honma KI. Spatiotemporal profiles of arginine vasopressin transcription in cultured suprachiasmatic nucleus. *European Journal of Neuroscience*. 2015;42(9):2678-89.

(2) 特許出願

特になし

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. 第 15 回 日本生理学会奨励賞(2013.3)
2. 環境生理学 久野寧賞(2013.3)
3. Enoki R, Honma S, Honma KI. Imaging Circadian Calcium Rhythm in the Suprachiasmatic Nucleus. *Dynamics of Circadian Oscillation in the SCN*, Hokkaido University Press, 2014; 37-49.
4. 榎木亮介. 動物の生物時計～視交叉上核を中心として～. *生体の科学(生命動態システム科学)* 2014; 65(5): 432-433.