

121. 中枢時計特異的遺伝子操作を用いた概日システムの理解

小野 大輔

Key words : 概日リズム, 神経回路, 光イメージング,
多電極ディッシュ, 行動リズム

北海道大学 大学院医学研究科

緒言

哺乳類における概日時計の中核は視床下部に位置する視交叉上核に存在する^{1,2)}。視交叉上核には片側およそ1万個の神経細胞が密集しており³⁾、個々の細胞が約24時間のリズムを刻むとともに互いに調子し安定した概日リズムを形成している。視交叉上核の個々の細胞では、複数の時計遺伝子の転写・翻訳を介したフィードバックループにより概日リズムが形成され⁴⁾、複数の伝達物質を介して神経回路を形成し個々のリズムが同期する⁵⁾。また網膜からの光情報により視交叉上核の概日リズムはリセットされ、外界の明暗サイクルに同調する。視交叉上核の細胞内で生じた遺伝子レベルの概日リズムは、細胞内カルシウムイオン濃度、神経発火に出力され、最終的に行動リズムへ出力される。これまでの技術の発展により、細胞単位における遺伝子発現計測や細胞内カルシウムイオン濃度の計測が可能になり、個々の細胞の性質が理解されるようになってきた。視交叉上核の個々の細胞一つ一つはロバストではないが、それらが同期することで見事に安定したリズムが形成される。しかしながら、細胞、組織レベルで生じる遺伝子レベルのリズムがどのようにして出力され最終的に行動リズムを制御しているのかは、細胞だけを見ては理解することはできない。また発達に伴う神経回路の再構成⁶⁾および環境に対する神経回路の可塑性⁷⁾における分子メカニズムは明らかになっていない。本研究では、*ex vivo*, *in vivo*における脳内時計遺伝子発現、細胞内カルシウムイオン濃度、神経発火、自発行動の多機能同時計測システムを構築し、細胞から個体に至る現象をシームレスにとらえ、概日リズム形成メカニズムの新たな側面を明らかにする事を目的とした。

方法

1. *ex vivo*における視交叉上核多機能同時計測

時計遺伝子 *Per2* のタンパク質にルシフェラーゼが結合したレポーター (PER2::LUC) マウス⁸⁾ の新生児 (postnatal day 1-5) から厚さ 200 μ m の脳スライスを作製し、視交叉上核を切り出した。切り出した視交叉上核スライスを培養用メンブレン上に置き、DMEM の入った 35 mm ペトリディッシュで培養し、視交叉上核表層にアデノ随伴ウイルスを用い神経細胞特異的に GCaMP6s を発現させた。GCaMP6s を発現させた視交叉上核をメンブレンごとカットし、多電極ディッシュ (アルファメッドサイエンティフィック社) 上に移動させた。多電極ディッシュは 8 \times 8 の合計 64 個の電極が中心部に並べられており、電極の大きさは 20 μ m、中心間距離は 10 μ m のもの (MED-P210A) を使用した。その後正立顕微鏡と EM-CCD カメラ (浜松ホトニクス社) を組み合わせ、発光にて時計遺伝子 *Per2* のリズムを、蛍光にて細胞内カルシウム濃度を、多電極ディッシュにて神経発火の頻度を同一視交叉上核から連続的に計測を行った。顕微鏡ステージは保温ボックスを設置し、培養視交叉上核をとりまく環境温度を 36.5 $^{\circ}$ C に一定に保った。

2. *in vivo*における脳内時計遺伝子発現と自発行動量の同時計測

無麻酔・無拘束マウス脳内の遺伝子発現計測を行うために、2~7ヶ月齢 PER2::LUC マウスの頭蓋に光ファイバーを装着した。頭蓋にアンカースクリューを装着し光ファイバーとスクリューを、光重合性デンタルレジンをを用い頭蓋に固定した。数日間の手術回復期間を経た後に、100 mM ルシフェリンを生理食塩水に溶解し、オスモティックポンプ (アルゼット) に充填した。その後ルシフェリンの入ったオスモティックポンプを腹腔内に導入した。ルシフェリンは

0.5 μ l/hr で2週間連続して投与可能である。さらに3~5日間の手術回復期間を経た後に光ファイバーの逆単面からの1分毎の発光輝度を光電子増倍管にて計測した。光電子増倍管はペルチェ素子にて10 $^{\circ}$ Cに保ち、バックグラウンドレベルを下げると同時に安定したバックグラウンドレベルに保った。マウスの自発行動量は赤外線センサーにて1分毎の行動量を計測した。

結果および考察

本研究により多電極ディッシュ上に培養した視交叉上核から、PER2::LUC、細胞内カルシウム、神経発火の同時計測に成功した。またこれらの多機能同時計測は連続して3日以上行う事に成功した。電極上に位置する範囲にROIを設定し、そこから得られるPER2::LUC、細胞内カルシウム濃度、また個々の電極から得られる神経発火リズムのピーク位相を比較すると、細胞内カルシウム、神経発火、PER2::LUCの順に認められた。今後はこの*ex vivo*多機能同時計測システムを用い、時計遺伝子欠損マウス視交叉上核における細胞間カップリングの時間的変化、あるいは薬理的に細胞機能を変化させ、遺伝子、細胞内カルシウム、神経発火のどの分子がどの状態に影響を及ぼし、その結果それぞれのパラメーターが時空間的にどのように再編成されるかを明らかにしていく。

*In vivo*では、光ファイバーを用いた自由行動下マウス脳内の嗅球からのPER2::LUCリズムと行動リズムの同時計測に連続して2週間以上行う事に成功した。*In vivo*における嗅球のPER2::LUCリズムのピーク位相は主観的夜の中心に認められ安定したリズムが認められた(図1)。

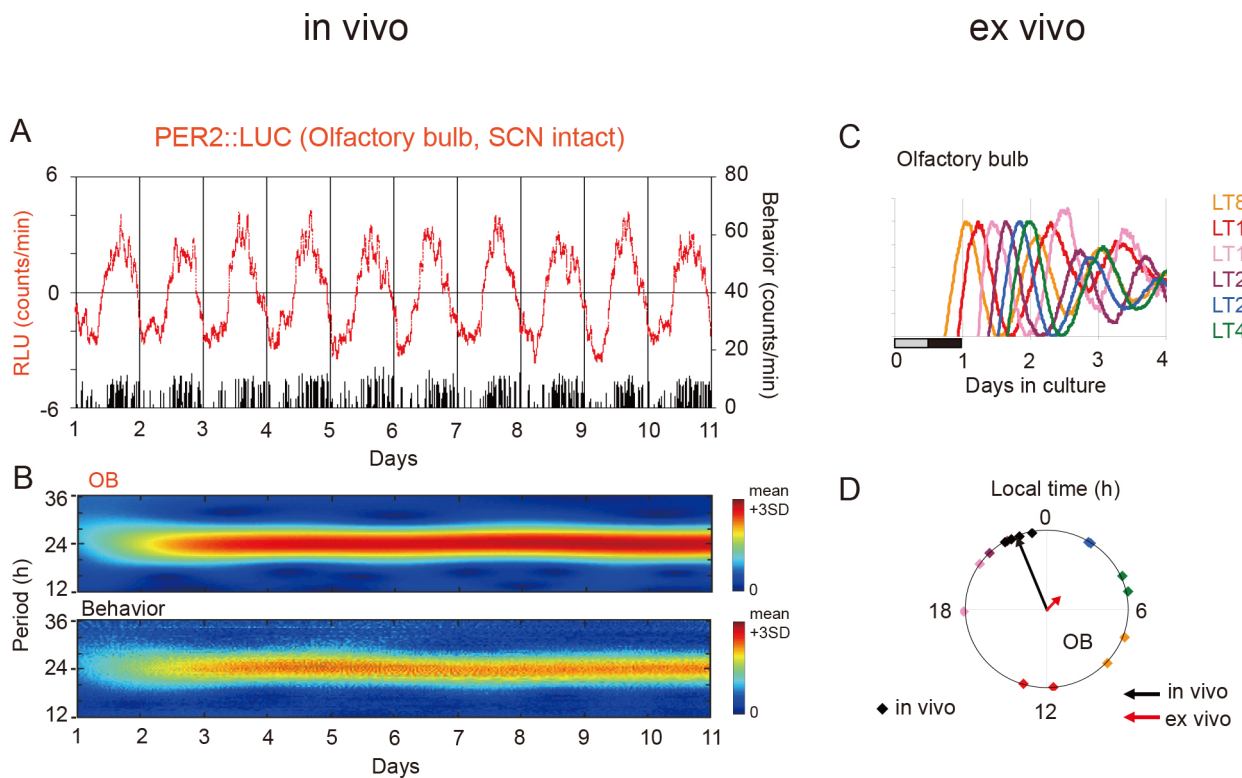


図1. 光ファイバーを用いた *in vivo*, *ex vivo*における嗅球の遺伝子発現計測。

A) *In vivo*の嗅球におけるPER2::LUC(赤)と自発行動量(黒)の同時計測結果。B) 嗅球のPER2::LUCおよび自発行動量の時系列データを用いたウェーブレット解析結果をヒートマップで表示。縦軸が周期、横軸は時間。青から赤にかけて出現した周期のパワーが高い事を示す。C) 嗅球の脳スライスを4時間間隔で作製し、光電子増倍管で計測した際のPER2::LUCリズム。LTはlocal timeを示す。嗅球の概日リズムはスライス作製によりリセットされた。D) *in vivo*と*ex vivo*における嗅球のPER2::LUCのピーク位相の比較。*In vivo*における嗅球のピーク位相(黒)は主観的夜に認められたが、*ex vivo*ではスライス作製時間に依存したピーク位相が認められた。

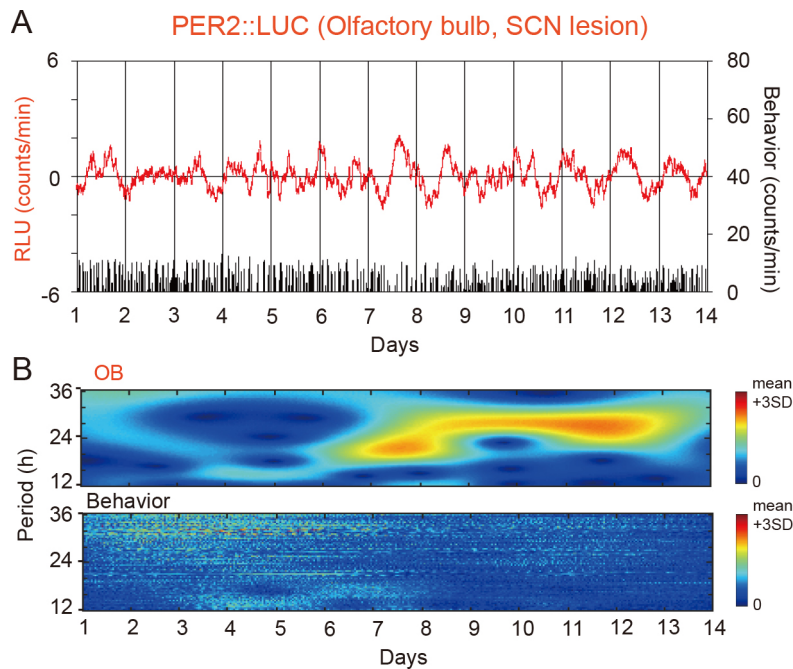


図2. 視交叉上核を電気破壊したマウスの嗅球の遺伝子発現計測。

A) 視交叉上核を電気破壊したマウスの嗅球から得られた PER2::LUC パターン (赤) と自発行動量 (黒) の計測結果。自発行動リズムは視交叉上核破壊により完全に消失したが、嗅球の PER2::LUC リズムは完全には消失しない。B) 嗅球の PER2::LUC および自発行動量の時系列データを用いたウェーブレット解析結果をヒートマップで表示。

また概日時計の中核である視交叉上核を電気破壊し、行動リズムが消失したマウスの嗅球からの PER2::LUC を計測すると、いくつかの周期成分が認められ、そのリズムは数日後とに繰り返し出現した (図2)。これは複数の概日リズムの振動体がビート現象を示した結果である可能性を示唆している。

本研究手法を用いることで、異なる階層の時系列情報を同時に得ることが可能となり、複雑な概日システムを遺伝子から個体にいたる幅広い範囲で理解することが可能となる。特に脳内は複雑な神経回路を形成しており、自由行動下マウスの脳内のそれぞれの部位における遺伝子発現、細胞内カルシウム、神経活動を計測する事で、実際に生体内で生じている現象を正確に読み取ることが可能である。これまで多くの研究はスライス培養を用いたイメージングにより様々な生理現象を説明してきたが、今後は生体内で実際に生じている現象を直接計測し、そこから様々な生理機能を明らかにしていく時代に移っていくと考える。このような観点から本研究手法は有用なツールの一つになりうると考える。

共同研究者

本研究の共同研究者は、北海道大学大学院医学研究科時間医学講座の本間さと教授、本間研一教授、同大学大学院医学研究科光バイオイメージング部門の榎木亮介助教である。PER2::LUC を提供して下さったテキサスサウスウエスタン大学の Joseph S. Takahashi 先生、*In vivo* 発光計測システムを構築して下さったアトー株式会社の下川原正博博士、久保田英博博士に感謝いたします。また *In vivo* 発光計測の技術におけるアドバイスをしてくださった、モアハウス・スクールオブメディスンの馬場謙吉博士に感謝いたします。そして上記の研究を支えて下さった上原記念生命科学財団に心から感謝申し上げます。

文 献

- 1) Moore, R. Y. & Eichler, V. B. : Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res.*, **42** : 201-206, 1972.

- 2) Stephan, F. K. & Zucker, I. : Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **69** : 1583-1586 , 1972.
- 3) Van den Pol, A. N. : The hypothalamic suprachiasmatic nucleus of rat: intrinsic anatomy. *J. Comp. Neurol.*, **191** : 661-702, 1980.
- 4) Darlington, T. K., Wager-Smith, K., Ceriani, M. F., Staknis, D., Gekakis, N., Steeves, T. D., Weitz, C. J., Takahashi, J. S. & Kay, S. A. : Closing the circadian loop: CLOCK-induced transcription of its own inhibitors *per* and *tim*. *Science*, **280** : 1599-1603, 1998.
- 5) Maywood, E. S., Chesham, J. E., O'Brien, J. A. & Hastings, M. H. : A diversity of paracrine signals sustains molecular circadian cycling in suprachiasmatic nucleus circuits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **108** : 14306-14311, 2011.
- 6) Ono, D., Honma, S. & Honma, K. : Cryptochromes are critical for the development of coherent circadian rhythms in the mouse suprachiasmatic nucleus. *Nat. Commun.*, **4** : 1666, 2013.
- 7) Ono, D., Honma, S. & Honma, K. : Postnatal constant light compensates Cryptochrome1 and 2 double deficiency for disruption of circadian behavioral rhythms in mice under constant dark. *Plos One*, **8**:11, e80615, 2013.
- 8) Yoo, S. H., Yamazaki, S., Lowrey, P. L., Shimomura, K., Ko, C. H., Buhr, E. D., Slepka, S. M., Hong, H. K., Oh, W. J., Yoo, O. J., Menaker, M. & Takahashi, J. S. : PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **101** : 5339-5346, 2004.