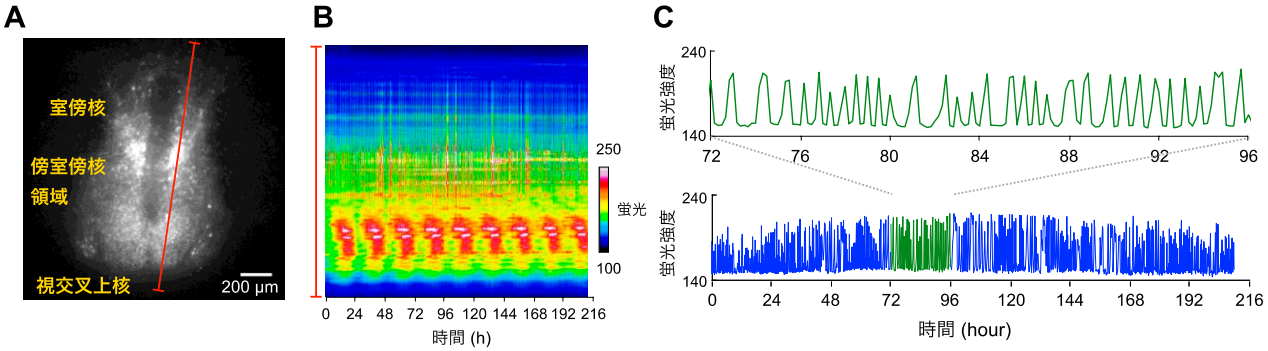
24　異なる時間スケールのリズムを統合する神経機構の解明	榎木　亮介

【目的】哺乳類の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。視交叉上核は網膜を介して光情報を受けて固有の周期を 24 時間に調節して、全身の細胞や臓器に統一のとれたリズム情報を伝達している。近年の研究により、概日リズムを生み出す分子や細胞レベルでのメカニズムが次第に明らかとなってきている。一方で、哺乳類の生体内では、レムーノンレム睡眠サイクルやホルモン分泌など、様々な生理機能に数十分〜数時間の短い周期のウルトラディアンリズムが観察される。視交叉上核を切除した動物では、行動や食事リズムなどにウルトラディアンリズムのみが観察されることから、概日リズム中枢とは別の領域にウルトラディアンリズムを生み出す領域があると推察されていた。しかしこれまでウルトラディアンリズムを長期的・高精細に計測するよい方法がなく、ウルトラディアンリズムを生成する脳の領域がどこにあるのかは長く不明だった。特に概日リズムとウルトラディアンリズムという 2 つの異なる時間スケールのリズムがどのように脳内で統合されているかは全く不明であった

【方法】これまで私は、概日リズム観察のための長期間の光イメージング計測法を確立し，視交叉上核の神経細胞ネットワークの働きを観察してきた。本研究では、視交叉上核とその周辺領域を含む組織を長期間培養し、緑色蛍光タンパク質からなるカルシウムイオンセンサーを多数の神経細胞に発現させ、概日リズム中枢を含む複数の脳領域の神経細胞から神経細胞の活動を数日間測定した。

【結果】視交叉上核の主な神経投射先である室傍核と傍室傍核領域の多数の神経細胞において、30 分〜4 時間周期で同期する細胞内カルシウムのウルトラディアンリズムを発見した。このリズムは室傍核と傍室傍核領域のみを単離した組織でも観察され、視交叉上核のみでは観察されないことから、室傍核と傍室傍核領域がウルトラディアンリズムの発生源であることが分かった。さらに、毎秒 30 フレームの高速カルシウム計測により、神経細胞ネットワークのミリ秒スケールの早い神経細胞の同期活動がウルトラディアンリズムを生み出すことが分かった。また薬理実験により、興奮性と抑制性の神経伝達物質であるグルタミン酸と GABA の協調によりウルトラディアンリズムが制御されること、またその発生頻度は概日リズムにより制御されることが分かった。

室傍核-傍室傍核領域のウルトラディアンカルシウムリズム



24. 異なる時間スケールのリズムを統合する神経機構の解明

榎木　亮介

*北海道大学 電子科学研究所 光細胞生理研究分野

Key words：生物時計，概日リズム，ウルトラディアンリズム，光イメージング，カルシウム

緒　言

私たち哺乳類では、ストップウォッチで計測する様な秒単位の早いスケールの時間感覚から、一生（寿命）という二度と繰り返されない時間まで、実に様々な時間スケールの生物時計が存在している。私たちの全身の細胞は時計機能を有しており、睡眠覚醒やホルモン分泌などの生理機能に周期的なリズムをもたらし、時刻や季節の認識や時間感覚にも重要な役割を持っている。非自然な光環境に絶えず晒される現代社会において、生物時計が乱れることは癌や鬱病などの体と心の変調を引き起こす。例えば、真夜中の高照度光は概日リズム中枢の神経ネットワークの脱同調を引き起こし、結果として全身の末梢組織でのリズムの乱れを引き起こすと考えられる。現代社会において生物時計の基礎的研究はますます重要性を増している。

哺乳類の約 24 時間の概日リズムの中枢は、脳深部の視床下部領域にある視交叉上核に存在している。視交叉上核は、網膜を介して光情報を受けて固有の周期を 24 時間に調節して、全身の細胞や臓器に統一のとれたリズム情報を伝達している（図 1A）。近年の研究により、概日リズムを生み出す分子や細胞レベルでのメカニズムが次第に明らかとなってきた。一方で、哺乳類の生体内では、レムーノンレム睡眠サイクルやホルモン分泌など、様々な生理機能に数十分～数時間の短い周期のウルトラディアンリズムが観察される。視交叉上核を切除した動物では、行動や食事リズムなどにウルトラディアンリズムのみが観察されることから、概日リズム中枢とは別の領域にウルトラディアンリズムを生み出す領域があると推察されていた。しかしこれまでウルトラディアンリズムを長期的・高精細に計測するよい方法がなく、ウルトラディアンリズムを生成する脳領域がどこにあるのかは長く不明だった。

これまで私は、独自に開発した神経活動の長時間の計測法により、視交叉上核の神経細胞の働きを調べてきた。本研究課題で私は、視交叉上核の主な神経投射先である室傍核と傍室傍核領域の多数の神経細胞において（図 1B）、30 分～4 時間周期で同期する細胞内カルシウムのウルトラディアンリズムを偶然見いだした。このリズムは室傍核と傍室傍核領域のみを単離した組織でも観察されることから、この部位がウルトラディアンリズムの発生源であることが分かった。さらに、神経細胞ネットワークのミリ秒スケールの早い神経細胞の同期活動がウルトラディアンリズムを生み出すことや、興奮性と抑制性の神経伝達物質であるグルタミン酸と GABA の協調によりウルトラディアンリズムが制御されていることが分かった。またウルトラディアンリズムの頻度は概日リズムにより制御されることを見いだし、異なる時間スケールの両リズムは相互作用することが分かった。

室傍核と傍室傍核領域はコルチコトロピン放出ホルモンやオキシトシンなどの様々なホルモンを産生する神経細胞が局在しており、さらに他の脳領域にリズム情報を伝達して体温や睡眠サイクルを調節すると推察されている。このことから、本研究で見いだしたウルトラディアンリズムは、生体内の様々な生理機能のリズムを制御していると考えられる［1］。

*現在の所属：自然科学研究機構 生命創成探究センター バイオフォトニクス研究グループ

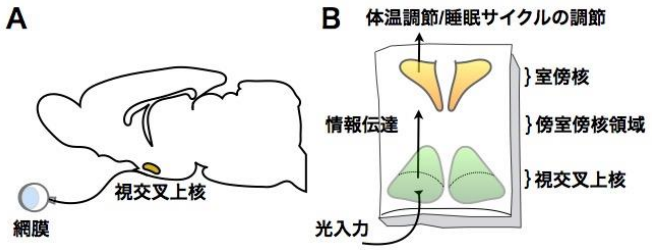


図 1. 視交叉上核-室傍核-傍室傍核領域の情報伝達

A) 哺乳類の概日リズムの中枢は視床下部にある視交叉上核に存在し、網膜を介して光情報を直接受ける。

B) 視交叉上核は室傍核と傍室傍核領域にリズム情報を伝達し、最終的には体温や睡眠サイクルを調節すると考えられる。

方　法

長期カルシウムイメージング計測

私はこれまでに概日リズム観察のため、長期間の光イメージング計測法を確立して視交叉上核の働きを観察してきた［2］。特に、細胞内カルシウム濃度や膜電位変動、時計遺伝子発現、神経発射活動などを高精細に可視化することで、視交叉上核の多振動体構造や［3］、概日カルシウムリズムと時計遺伝子発現との機能連関［4］、神経回路で同期する概日膜電位リズムの存在［5］などを明らかにしてきた。また、生体マウスの視交叉上核からの概日リズム可視化や［6］、マイクロパターン基板を用いて単一の視交叉上核の神経細胞からリズム計測により［7］、1 細胞～神経ネットワークレベルでの概日リズムの解析を行ってきた。

本研究では、生後 4～6 日齢の仔マウスの脳より視交叉上核と室傍核－傍室傍核領域を含むスライスを作製し、培養メンブレン上に静置培養した。培養後 5～7 日後に、アデノ随伴ウイルスをスライスに滴下し、緑色蛍光タンパク質からなる遺伝子コード型カルシウムプローブ（GCaMP6s）を神経細胞集団に発現させた。さらに 10 日間培養を行った後、高感度カメラ、ニポウディスク共焦点ユニット等からなる長期タイムラプス顕微鏡システムにより、視交叉上核と室傍核－傍室傍核領域の神経細胞から神経細胞の活動を数日間連続測定した（図 2）。

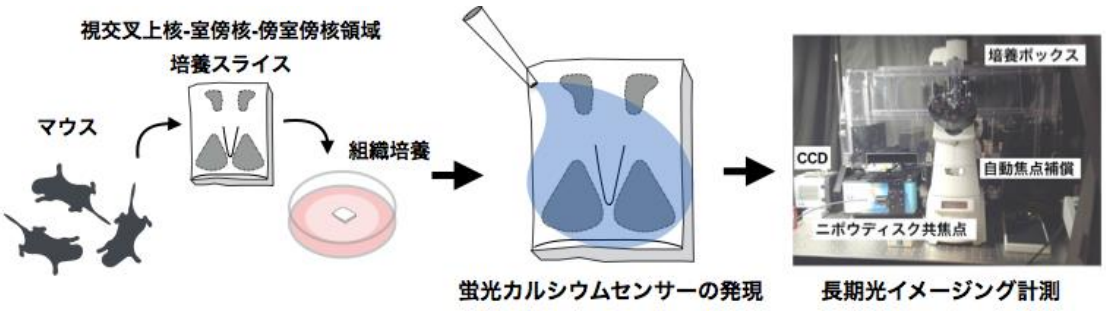


図 2. 長期光イメージング計測法

視交叉上核と室傍核、傍室傍核領域を含む組織を長期間培養し（左）、アデノ随伴ウイルスを用いて蛍光カルシウムイオンセンサーを多数の神経細胞に発現させる（中央）。高感度カメラ、恒温培養装置、ニポウディスク共焦点ユニットなどからなる光計測システムを用い（右）、細胞内カルシウム濃度変化を指標に神経細胞の活動を数日間測定する。

結　果

細胞内カルシウムのウルトラディアンリズム

視交叉上核の主な神経投射先である室傍核と傍室傍核領域の多数の神経細胞において、30 分～4 時間周期で同期する細胞内カルシウムのウルトラディアンリズムを見いだした（図 3)。このウルトラディアンカルシウムリズムは、室傍核と傍室傍核領域のみを単離した組織でも観察されるが、視交叉上核のみを単離した組織では観察されないことから、室傍核と傍室傍核領域がリズムの発生源であることが分かった。さらに、神経細胞ネットワークのミリ秒スケールの早い神経細胞の活動を高速カルシウムイメージングにより計測したところ、細胞ネットワークの早い同期活動がウルトラディアンリズムを生み出すことが分かった。また薬理実験により、興奮性と抑制性の神経伝達物質であるグルタミン酸と GABA の協調によってウルトラディアンカルシウムリズムが制御されていることを見いだした。また、ウルトラディアンリズムの頻度は概日リズムにより制御されることが分かった。

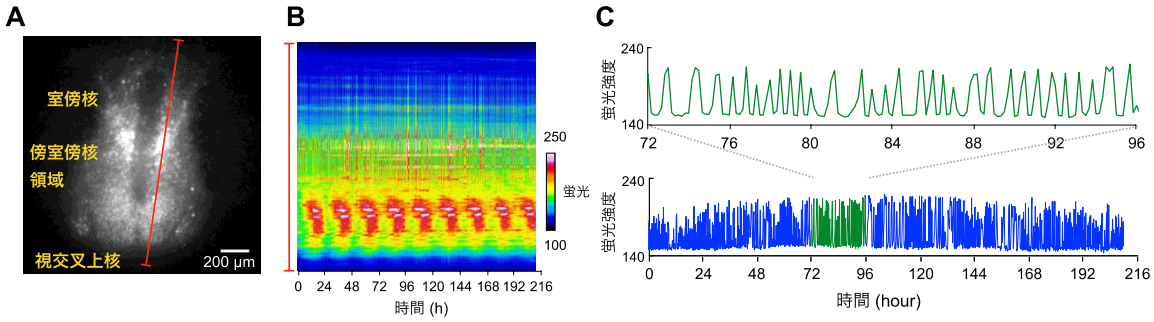


図 3.　室傍核-傍室傍核領域のウルトラディアンカルシウムリズム

A)　蛍光カルシウムイオンセンサーを発現する視交叉上核－室傍核－傍室傍核領域の培養スライス。

B)　スライスの背側から腹側部位における、細胞内カルシウム濃度の時間変化。蛍光輝度を擬似カラー表示している。

C)　室傍核－傍室傍核領域で観察される 0.5～4 時間周期の細胞内カルシウム濃度変化のウルトラディアンリズム。

考　察

室傍核と傍室傍核領域には、コルチコトロピン放出ホルモンやオキシトシンなどの様々なホルモンを産生する神経細胞が存在していることが知られている。またこの脳部位は、視床下部背内側核などの他の脳領域へと投射して、体温や睡眠サイクルを調節する中枢領域へと情報を伝えていると推察されている。このことから、私たちが見いだしたウルトラディアンカルシウムリズムは、生体の様々な生理機能のリズムを制御していると推察される。

私たちが培養組織で見いだした室傍核－傍室傍核領域におけるウルトラディアンカルシウムリズムは、生体内でも同様に観察されるか否かは不明であり、今後生体内におけるウルトラディアンリズムの発振源を特定することは重要課題である。ウルトラディアンリズムの発振源として特定するためには、生体内において特定の脳領域を計測し、さらに神経活動を操作して活性化／抑制することで、動物個体での生理現象との相関を調べることが必要である。近年開発されているファイバーフォトメトリーや超小型内視鏡を用いて脳深部からの神経活動を観察し、さらに行動リズム計測や深部体温計測などと組み合わせることで、ウルトラディアンリズムの生体内での発振メカニズムを解析できると考えられる。加えて、光遺伝学や薬理遺伝学を駆使してリズム発振源の神経活動を操作することで、動物行動や生理機能との相関を解析することが出来るだろう。

共同研究者・謝辞

本研究は、北海道大学の本間研一名誉教授、本間さと客員教授、長崎大学の織田善晃助教、復旦大学（中国上海）の吴瑜珥博士課程学生、黄志力教授との共同研究で行った。

文　献

1） Wu YE, Enoki R, Oda Y, Huang ZL, Honma KI, Honma S. Ultradian calcium rhythms in the paraventricular nucleus and subparaventricular zone in the hypothalamus. Proc Natl Acad Sci U S A. 2018 Oct 2;115(40):E9469-E9478. DOI: 10.1073/pnas.1804300115. Epub 2018 Sep 18. PMID: 30228120.

2） Enoki R, Ono D, Hasan MT, Honma S, Honma K. Single-cell resolution fluorescence imaging of circadian rhythms detected with a Nipkow spinning disk confocal system. J Neurosci Methods. 2012 May 30;207(1):72-9. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2012.03.004. Epub 2012 Mar 28. PMID: 22480987.

3） Enoki R, Kuroda S, Ono D, Hasan MT, Ueda T, Honma S, Honma K. Topological specificity and hierarchical network of the circadian calcium rhythm in the suprachiasmatic nucleus. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 Dec 26;109(52):21498-503. DOI: 10.1073/pnas.1214415110. Epub 2012 Dec 4. PMID: 23213253.

4） Enoki R, Ono D, Kuroda S, Honma S, Honma KI. Dual origins of the intracellular circadian calcium rhythm in the suprachiasmatic nucleus. Sci Rep. 2017 Feb 3;7:41733. DOI: 10.1038/srep41733. PMID: 28155916.

5） Enoki R, Oda Y, Mieda M, Ono D, Honma S, Honma KI. Synchronous circadian voltage rhythms with asynchronous calcium rhythms in the suprachiasmatic nucleus. Proc Natl Acad Sci U S A. 2017 Mar 21;114(12):E2476-E2485. DOI: 10.1073/pnas.1616815114. Epub 2017 Mar 7. PMID: 28270612.

6） Ono D, Honma S, Nakajima Y, Kuroda S, Enoki R, Honma KI. Dissociation of Per1 and Bmal1 circadian rhythms in the suprachiasmatic nucleus in parallel with behavioral outputs. Proc Natl Acad Sci U S A. 2017 May 2;114(18):E3699-E3708. DOI: 10.1073/pnas.1613374114. Epub 2017 Apr 17. PMID: 28416676.

7） Hirata Y, Enoki R, Kuribayashi-Shigetomi K, Oda Y, Honma S, Honma KI. Circadian rhythms in Per1, PER2 and Ca^{2+} of a solitary SCN neuron cultured on a microisland. Sci Rep. 2019 Dec 4;9(1):18271. DOI: 10.1038/s41598-019-54654-5. PMID: 31797953.