



## 生物時計中枢を司る脳の神経細胞ネットワークは 同期した活動リズムを示すことを発見

### 研究成果のポイント

- ・脳の生物時計中枢における神経活動リズムを直接可視化することに成功。
- ・神経細胞ネットワークは同期した 24 時間の活動リズムを示すことを発見。
- ・概日リズムの乱れが引き起こす様々な疾病の予防法や治療法の開発に期待。

### 研究成果の概要

北海道大学の榎木亮介助教らのグループは、ほ乳類の概日リズム<sup>注1)</sup>を作り出す生物時計中枢における神経細胞ネットワーク活動を、数日間連続モニタリングできる新規計測法を開発し、多数の神経細胞が一斉に同期した活動リズムを示すことを発見しました。

従来の研究では、遺伝子発現や細胞内カルシウムなどを指標に間接的に神経細胞の出力を計測してきましたが、直接的な神経細胞活動指標である膜電位<sup>注2)</sup>を計測できる手法の開発が望まれていました。

本研究グループは、蛍光膜電位センサー<sup>注3)</sup>を脳の生物時計中枢である視交叉上核<sup>注4)</sup>の神経細胞に発現させ、高感度カメラにより長期間撮影することで、膜電位変化を可視化することに成功しました。その結果、カルシウムが細胞種特異的なリズム位相<sup>注5)</sup>を示すのに対し、膜電位は生物時計の神経細胞全体が同期した概日リズムを示すことが分かりました。生物時計が統一のとれたリズムを全身に出力するメカニズムが、神経活動のネットワークにあることが明らかになりました。

近年の研究により、極端な夜型生活、慢性的睡眠不足、交代勤務などによる概日リズムの乱れが生活習慣病の誘因となることが明らかとなり、概日リズムの基礎的研究はますます重要度を増しています。本研究で得られた知見は、生体リズムや睡眠障害の治療法や予防法の開発に道を拓き、健康増進に寄与すると期待されます。

本研究成果は、米国東部時間 2017 年 3 月 7 日（火）発行の科学誌「米国科学アカデミー紀要」のオンライン速報版で公開されました。

## 論文発表の概要

研究論文名 : Synchronous circadian voltage rhythms with asynchronous calcium rhythms in the suprachiasmatic nucleus (視交叉上核における同期する膜電位リズムと非同期するカルシウムリズム)

著者 : 榎木亮介, 織田善晃, 小野大輔, 本間さと, 本間研一 (北海道大学), 三枝理博 (金沢大学)

公表雑誌 : Proceedings of the National Academy of Sciences (米国科学アカデミー紀要)

公表日 : 米国東部時間 2017年3月7日(火) (オンライン公開)

## 研究成果の概要

### (背景)

ほ乳類の概日リズムの中核は、脳の視床下部にある視交叉上核に局在しています。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、全身の細胞や臓器に統一のとれたリズム情報を出力しています。その結果、睡眠と覚醒、体温調節、ホルモン分泌などの生理機能に24時間のリズムが作り出されます(図1)。視交叉上核は数万個の神経細胞からなるネットワークを形成していますが、神経細胞の活動は膜電位変化の情報となって出力されるため、生物時計がどのように生体機能の24時間リズムを調節しているかを調べるには、多数の視交叉上核神経細胞から膜電位変化を長期間(数日間)計測することが必要です。しかし、従来のガラス電極などを用いた計測方法では少数の細胞からの短時間の膜電位記録に限られ、また、遺伝子発現や細胞内カルシウムイオンを計測する方法では、神経細胞の出力を直接捉えることが出来ませんでした(図2)。また、従来の蛍光膜電位センサーは変化量が小さく、長期間安定的に計測することは極めて困難でした。

### (研究手法)

今回、榎木助教らのグループは、光を用いて神経細胞の膜電位変化を長期間捉えることが出来る計測法を確立しました。視交叉上核の組織を培養し、緑色蛍光タンパク質の改変体からなる緑色蛍光膜電位センサーを多数の神経細胞に発現させ、高感度カメラ、恒温培養装置、顕微鏡などからなる光計測システムを用いて、膜電位変化を数日間測定することを試みました。さらに、膜電位センサーとは波長が異なる赤色カルシウムセンサーを同時に神経細胞特異的に発現させて光の変化を計測することで、数百~千個の神経細胞から膜電位と細胞内カルシウムの概日リズムを同時計測することに成功しました(図3)。

### (研究成果)

以前の榎木助教らの報告通り、細胞内カルシウムの概日リズムは視交叉上核内で特徴的な時空間パターンを示し、個々の神経細胞間でリズムは同期していませんでした。一方、膜電位のリズムは神経細胞全体で同期していました(図4①)。さらに、細胞種特異的に膜電位とカルシウムの2種のセンサーを発現させてリズムを比較したところ、従来の定説とは異なり、細胞種ごとに両リズムの位相差が異なることを発見しました(図4②)。今回の研究で、神経ネットワークが特異的なリズム位相をもつ細胞種を統一して、同期した出力を作り出していることが分かりました。

### (今後への期待)

神経細胞の膜電位変化は、活動電位の発生や神経伝達物質の放出に直接関わることから、中枢時計が全身の末梢時計を調節して、メリハリのある日々のリズムを作り出すために、視交叉上核の神経細胞ネットワークが同期したリズム情報を出力し、他の脳部位や全身にリズム情報を伝えていることが

示唆されます。本研究の知見は、脳の時計が体のリズムを整える概日システムの基本メカニズムの解明につながると期待されます。

現代社会において、概日リズムの破綻は様々な体と心の変調を引き起こし、高血糖、高脂血症、高血圧などのリスクファクターとなり、生活習慣病やうつ病の発症率を上げることが知られています。本研究で得られた新たな知見をもとにして、リズム障害の治療法や予防法を考えていくことで、健康の増進に寄与できると期待されます。

#### (研究プロジェクトについて)

本研究成果は、科学技術振興機構 (JST) 戦略的創造研究推進事業 さきがけ (個人型研究) 「細胞機能の構成的な理解と制御」研究領域における研究課題「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」(榎木亮介)、文部科学省 先端融合領域イノベーション創出拠点形成プログラム補助金、科学研究費補助金、秋山記念生命科学振興財団、精神・神経科学振興財団などの支援のもとで得られたものであり、北海道大学の織田善晃博士研究員、小野大輔特任助教 (現 名古屋大学)、本間研一名誉教授、本間さと客員教授、及び金沢大学の三枝理博教授との共同研究です。

#### お問い合わせ先

所属・職・氏名：北海道大学大学院医学研究科 光バイオイメージング部門

助教 榎木 亮介 (えのき りょうすけ)

TEL : 011-706-4780 FAX : 011-706-4737 E-mail : enoki@pop.med.hokudai.ac.jp

ホームページ : <http://www.chronomedicine-sapporo.com/>

#### 【用語解説】

##### 注1) 概日リズム

約 24 時間周期で変動する生理現象で、地球上のあらゆる生命体に存在する。一般的に体内時計とも言う。

##### 注2) 膜電位

細胞の内外に存在する電位の差のこと。

##### 注3) 蛍光膜電位センサー

膜電位変化を光変化で捉えることができる蛍光タンパク質。

##### 注4) 視交叉上核<sup>しこうさじょうかく</sup>

ほ乳類の概日リズムの中枢としての役割を担う脳の視床下部にある領域。

##### 注5) 位相

振動や波などの周期的な運動の過程でどの点にあるかを示す変数。

【参考図】

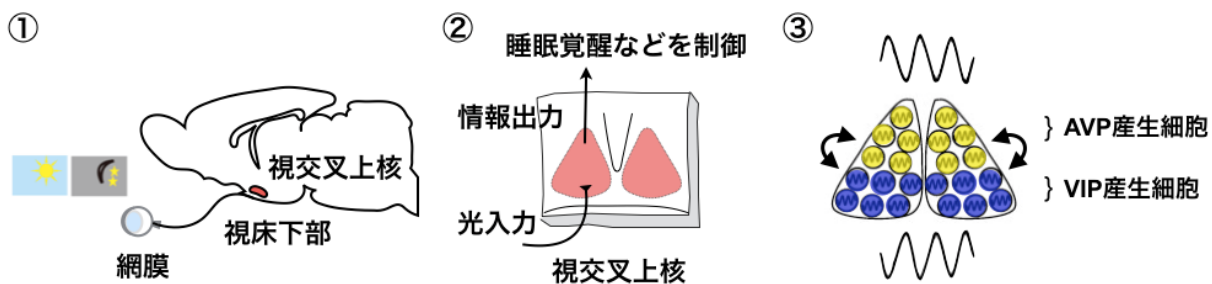
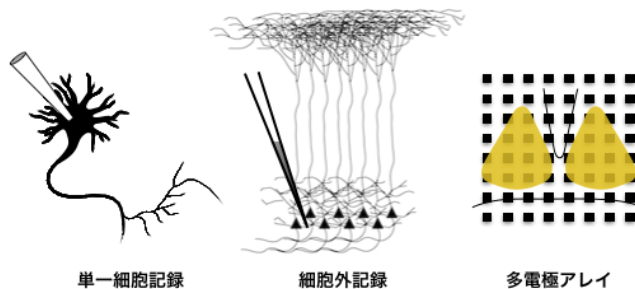


図1 概日リズムの中樞の視交叉上核しこうさじょうかく

- ① マウス脳の断面図。視交叉上核は脳深部の視床下部に存在し、網膜を介して外界の光環境情報を受けとる。
- ② 視交叉上核は光入力を受けて情報を統合し、リズム情報を全身に出力して、睡眠覚醒リズムなどの約24時間の生理機能を制御する。
- ③ 視交叉上核は多数の神経細胞からなるネットワークを構築する。特に、バソプレッシン（AVP）及び血管作動性腸管ペプチド（VIP）産生細胞が領域を構成し、互いに情報連絡しあう。

① これまでの電気記録法



② これまでの光計測法

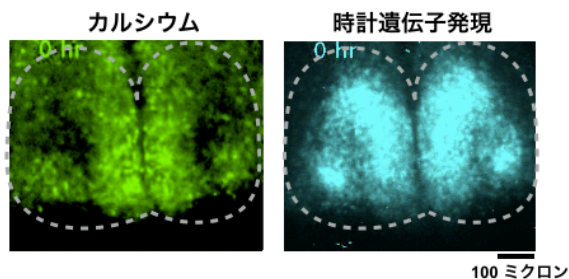
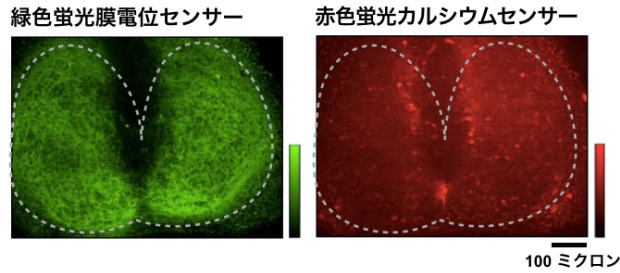


図2 従来の計測方法

- ① 従来のガラス電極や多電極アレイによる神経細胞の膜電位計測法では、空間情報に乏しく、神経細胞ネットワークでの活動が分からない。
- ② 細胞内カルシウム濃度や時計遺伝子発現の光計測法では、間接的にしか神経細胞の活動が分からない。

① 膜電位とカルシウムの光計測



② 概日リズムの長期計測

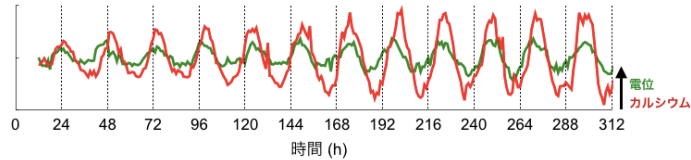
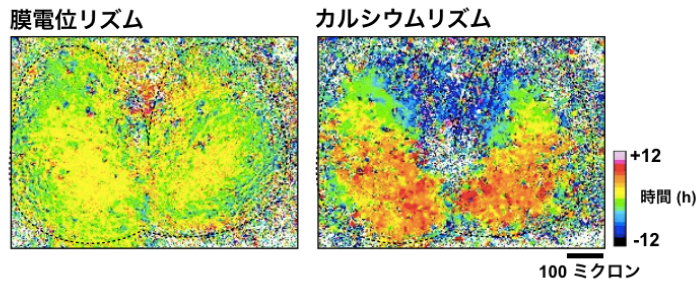


図3 2種の蛍光センサーを利用した概日リズムの計測

- ① 視交叉上核のネットワーク全体で緑色蛍光膜電位センサー（左）と赤色蛍光カルシウムセンサー（右）が発現している。
- ② 膜電位（緑）と細胞内カルシウム（赤）の概日リズムの長期計測。

① リズム位相の空間分布



② 細胞種によるリズム位相の違い

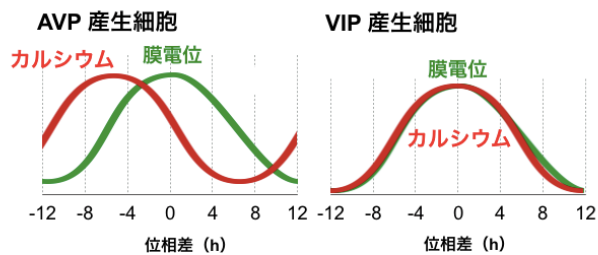


図4 細胞種別の概日リズムのリズム位相と空間分布

- ① 概日リズムの位相を疑似カラーで表示している。膜電位リズムは視交叉上核組織でリズム位相が一様であり（緑～黄色）、神経細胞ネットワーク全体でリズムが同期していることが分かる（左）。一方で、カルシウムリズムの位相は平均値±10 時間ほどに幅広く分布しており（青～赤色）、リズムが同期していない（右）。
- ② バソプレッシン（AVP）産生細胞ではカルシウムリズムが膜電位リズムに比べ前進している。一方で血管作動性腸管ペプチド（VIP）産生細胞では両者のリズム位相は同じである。