

生物時計中枢の光イメージング解析

榎木 亮介^{*, **, ***, †}・本間 さと^{*}・本間 研一^{*}

Bioimaging in Circadian Master Clock

Ryosuke ENOKI^{*, **, ***, †}, Sato HONMA^{*} and Ken-ichi HONMA^{*}

In mammals, the master circadian clock is located in the hypothalamic suprachiasmatic nucleus (SCN) in the brain. The SCN controls physiological and behavioral events, such as sleep-wakefulness cycles. Recent studies revealed that the SCN is a hierarchical and multi-oscillator system in which the neuronal network plays a critical role in expressing robust and coherent rhythm in physiology and behavior. For better understanding of circadian clock at network level, we recently developed a time-lapse fluorescence imaging system composed of a Nipkow-spinning disk confocal unit and high sensitive CCD camera. Using a genetically encoded calcium sensor, we visualized the spatial and temporal patterns of circadian calcium rhythm in a large population of neurons (>1,000) in the SCN at single cell resolution. In this chapter, we summarize our network level calcium imaging method and discuss the possible future application and direction.

Key words: circadian rhythm, calcium, time-lapse, confocal, FRET (Förster resonance energy transfer)

1. 生物時計の光イメージング研究

生物時計は生命が地球の24時間の環境変化に適応するために獲得した機能であり、バクテリアからヒトに至るほとんどすべての生命体で観察することができる。生物時計の研究では、生物発光を利用した“発光イメージング”による解析手法が普及している。生物発光とは、ルシフェラーゼとよばれる酵素たんぱく質が、発光基質であるルシフェリンと化学反応（酸化反応）する際に放出する光エネルギーを利用するもので、生物時計の研究領域では時計遺伝子の発現リズムなどの計測に応用されている¹⁾。生物時計研究において生物発光イメージングは、細胞から個体に至るさまざまな階層での解析に用いられ、またシアノバクテリアや植物・げっ歯類などさまざまな生物種に応用され、生物時計の振動機構の理解に大きく貢献している。しかしながら、発光イメージングで得られるシグナルはきわめて微弱であり、現状では発光イメージングの空間・時間分解能の双方で蛍光イメージング（後述）に及ばない。また、ホタルルシフェラーゼの酵素反応はATPや酸素、そ

して発光基質ルシフェリンを必要とするが、細胞内のこれらの因子の変動によって発光シグナルが影響を受ける可能性を排除できない。細胞レベルの観察の際には、高濃度の発光基質を添加することが必要であり、また特に動物個体の長期測定では、臓器や血中のルシフェリン濃度を一定に調節する工夫が必要となる。

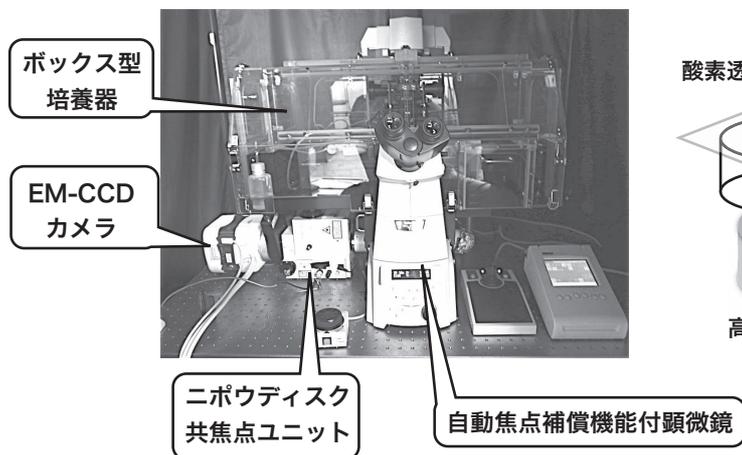
一方、2008年の下村脩博士の緑色蛍光たんぱく質（GFP）のノーベル賞受賞に代表されるように、蛍光たんぱく質を用いたバイオイメーキングは、生体内で生命現象を可視化することができる観察ツールとして急速に発展してきた。さまざまな波長特性をもつ蛍光たんぱく質や、それを応用した細胞機能を可視化するたんぱく質プローブが多数開発され、今や生物学や基礎医学研究において日常的に用いられる研究ツールとなっている。しかしながら、蛍光観察のためには必ず励起光を照射する必要があり、その結果、蛍光分子に対して退色や光異性化を生じさせ、時には細胞機能を大きく変化させてしまい、細胞死を引き起こしてしまうこともある。特に長期間測定の際には、連続的

^{*}北海道大学大学院医学研究科時間医学講座（〒060-8638 札幌市北区北15条西7丁目） [†]E-mail: enoki@pop.med.hokudai.ac.jp

^{**}北海道大学大学院医学研究科連携研究センター光バイオイメーキング部門（〒060-8638 札幌市北区北15条西7丁目）

^{***}独立行政法人科学技術振興機構さきかけ（〒102-0076 東京都千代田区五番町）

A. 長期蛍光観察用顕微鏡システム



B. スライス培養法

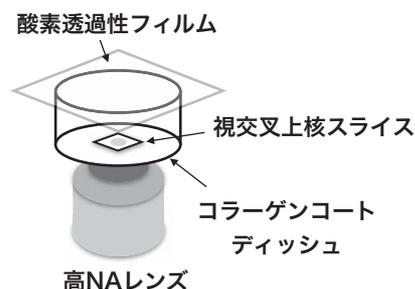


図1 長期蛍光タイムラプスイメージング法。

な励起光照射による細胞毒性と光退色が大きな問題となる。

最近著者らは、長期間の蛍光イメージングの際の励起光による問題点を軽減した共焦点イメージング法を確立し、高い時間空間解像度での生物時計(概日リズム)の観察を可能とした^{2,3)}。ごく弱い励起光での蛍光イメージングを行うことで、長期間の励起光の連続照射でも細胞障害や光退色を抑えることができる。この光イメージング法に細胞機能プローブを応用すれば、細胞内カルシウム濃度などの細胞機能のイメージングや、複数機能の同時イメージングへ応用が可能である。

2. 哺乳類の生物時計中枢—視交叉上核—

私たち哺乳類の生物時計(概日リズム)の中枢は脳深部の視床下部にある一対の神経核である視交叉上核にある。視交叉上核はその名の通り、網膜からの“視”神経が“交叉”する真“上”に存在する神経“核”である。視交叉上核は、外界環境の光情報(明暗情報)を直接受けて自身の時計を調節することで、地球環境に適応することができる。概日リズムの仕組みは、生殖細胞(卵子と精子)を除く全身のあらゆる細胞に存在しており、視交叉上核は全身の細胞の概日リズムを束ねる。視交叉上核を破壊すると、動物の行動やホルモンの概日リズムが消失し⁴⁾、また他の動物から視交叉上核を移植するとリズムが回復して、そのリズムはドナー動物由来となる⁵⁾。私たちの社会生活においても、大きな時差を伴う旅行や夜間交代勤務などを経験すると、視交叉上核や末梢細胞の時計が乱れ、不眠やホルモン分泌の異常などを引き、さまざまな心身の失調を引き起こす。

概日リズムは細胞レベルでの分子機構の理解が進んでいる。1997年にほ乳類細胞において時計遺伝子が発見され

たのに端を発して、遺伝子やたんぱく質レベルでの研究が急速に進み、そのメカニズムの理解が深まった。ほ乳類の概日リズムの分子メカニズムは、時計遺伝子とその転写産物(たんぱく質)が自身の翻訳を抑制する「転写翻訳のフィードバック機構」が想定されている⁶⁾。しかし近年の研究により、視交叉上核は単なる細胞の集合体ではなく、多種多様な細胞が集合してネットワークを形成し、ネットワーク内に複数の機能を有する「階層的な多振動体システム」であることがわかってきた⁷⁾。細胞を分散して培養して細胞間連絡を少なくし、個々の細胞の時計遺伝子発現リズムを計測すると、概日リズムが不安定となり周期が大きくばらつく。一方、ネットワークを形成した視交叉上核は、組織全体としては24時間に近い正確性をもち、かつ時計遺伝子発現リズムの振幅の大きい強靱(ロバスト)なリズムを示す⁸⁾。また、主要な時計遺伝子を欠損した個々の時計細胞は明瞭な概日リズムを示さなくなるが、視交叉上核の組織全体では正常と遜色のないリズムを示すなど⁹⁾、ネットワークレベルには遺伝子欠損の補償作用が存在することが示唆されている。概日リズムの作動メカニズムのさらなる解明のためには、今後は細胞ネットワークレベルでの理解が必要と考えられ、それを可能とする可視化技術が必須のものと考えられる。

3. 長期蛍光タイムラプスイメージング

筆者らは最近、視交叉上核の神経細胞ネットワークを、長期間かつ高い時間空間解像度で解析するためのタイムラプスイメージング法を確立した(図1)。回転板式ニポウディスク共焦点と高感度CCDカメラからなる顕微鏡システムを構築して、ごく弱い強度の励起光で共焦点観察を行うことで、細胞毒性や光退色の問題を解決し、視交叉上核

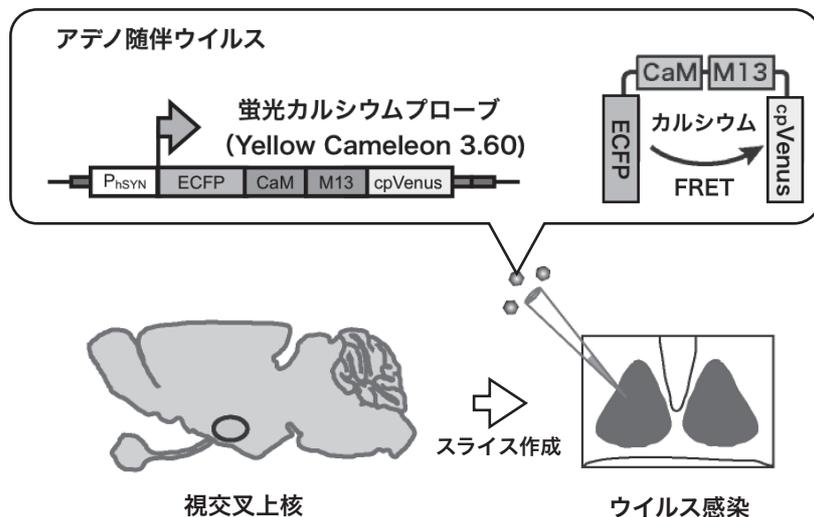


図2 アデノ随伴ウイルスによる蛍光カルシウムプローブの発現.

の細胞ネットワークを1細胞解像度で可視化することに成功している。これはCCDカメラが90%以上の量子効率をもつために励起光を低くすることができ(対物レンズ下で $30\mu\text{W}/\text{mm}^2$ 以下)、細胞毒性を抑えることができることによると思われる。筆者らの観察結果では、1週間以上の連続観察(1時間ごとの撮影、累計3時間の励起光照射)でも、細胞毒性を示す兆候はみられなかった。そのほか、顕微鏡システムには安定した長期間観察をするための工夫をしている。例えば、長期間観察の際には焦点面のずれや生物試料の動きが問題となるが、自動焦点面補償機能を有する顕微鏡を用い、また視交叉上核切片をコラーゲンコートしたガラスディッシュ上に静置培養することで、撮影中の試料そのものの動きを軽減している(図1B)。この方法では対物レンズと試料の距離が接近するので、高い開口数(NA)のレンズを使用することでSN比が格段に向上する。また高輝度LED型光源を共焦点観察の光源として利用することで、レーザー光源よりも長期間の安定的な出力が得られ、かつ多波長出力、安価、省スペース、超寿命、室温変動に安定な光源として利用している。

4. 概日カルシウムリズムの解析

視交叉上核の神経細胞ネットワークの動態を観察するため、カルシウムイオン濃度変動を細胞活動の指標としてイメージングすることを試みた。カルシウムイオンは神経細胞の活動電位の発生や、他の細胞からの入力応答に応じて上昇することが知られており、また時計遺伝子の発現にもカルシウムイオンが必要である。多くの細胞において、カルシウムイオンは遺伝子発現や伝達物質放出などさまざまな細胞機能を調節する主要なメディエーターであることか

ら、カルシウム濃度を観察することは“神経細胞の活動”の指標になるものと考えられる。実験では、遺伝子コード型の蛍光カルシウムプローブ(Yellow Cameleon 3.60)¹⁰⁾を視交叉上核の神経細胞群に発現させた(図2)。この蛍光プローブのカルシウム結合ドメインが細胞内のカルシウムイオンと結合すると、2色の蛍光たんぱく質(図ではVenusとCFP)の距離が接近し、ドナー分子からアクセプター分子にエネルギーが移動し(Förster resonance energy transfer: FRET)、アクセプター分子が蛍光を発する。二波長に蛍光フィルターを切り替えて蛍光比(Venus/CFP)を計測することで、定量的なカルシウム濃度変動の比較が可能であり、細胞内のプローブ濃度の変化や細胞の動きによるアーティファクトを除去することができる。著者らは蛍光カルシウムプローブの長期的発現のために、アデノ随伴ウイルスによる感染発現法を用いている。神経細胞に特異的なプロモーター(human synapsin)を利用することで、約1,000個の神経細胞への蛍光プローブを長期間安定的に発現させることができる(図3)。実験では1時間ごとに撮像して連続画像とすることで、細胞内カルシウムの概日リズム変動をネットワークレベルで捉えることに成功している。

細胞内カルシウム濃度を指標としたリズム計測は、時計遺伝子の発現に基づく計測と比較して、①網羅性、②リアルタイム性において優れている。前者①に関しては、時計遺伝子の自律振動パターンはすべての神経細胞で様ではなく、例えば網膜からの入力投射部位では時計遺伝子の発現が低いため、時計遺伝子発現のイメージングでは細胞ネットワーク情報の一部を欠く¹¹⁾。対して、アデノ随伴ウイルスを用いた蛍光カルシウムプローブの感染発現法で

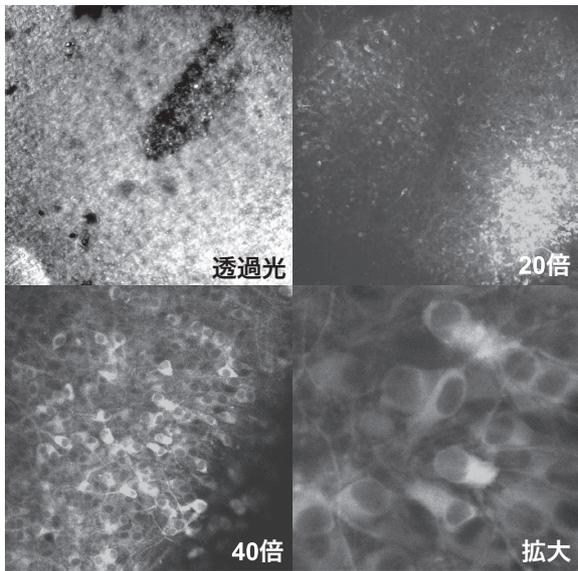


図3 視交叉上核における蛍光カルシウムプローブの発現パターン。

は、視交叉上核のほぼ 100% の神経細胞からシグナルを検出することができる²⁾。一方後者②に関しては、時計遺伝子の転写から光シグナルが検出できるまでには時間の遅れが生じるのに対して、蛍光プローブはカルシウムと結合すると数十ミリ秒の時定数をもって蛍光シグナルが変化するため、細胞内カルシウム濃度の急速な変動も検出することができる。

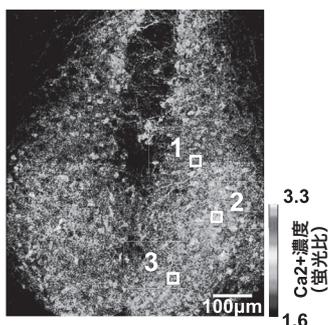
筆者らのカルシウムリズムの解析により、視交叉上核に存在するすべての神経細胞が明瞭な概日カルシウムリズムを示すこと、また、細胞種やネットワーク内の領域によりリズムパターンに顕著な差異があることがわかった(図4)。視交叉上核の空間的リズムパターンの差異をなるべく人為的なミスなく、また空間情報を失うことなく解析するため、イメージングデータから概日リズムを特徴づける主

要な4つのパラメーターを自動的に抽出して、パラメーターごとに空間表示するプログラムを作成した。この解析プログラムでは、CCDカメラのピクセル単位でシグナルをコサイン関数によりフィッティングし、概日リズムパラメーターを自動計算して空間的に表示している。その結果、視交叉上核の背側と腹側領域に特徴的なカルシウムリズムの存在を観察した。特に、カルシウムリズムの位相は背側領域で腹側領域よりも前進しており、腹側領域ではより振幅の大きなリズムが観察された。さらに神経細胞間の連絡を遮断する目的で、ナトリウムチャンネル阻害薬(テトロドトキシン)を添加したところ、視交叉上核内の背側と腹側の領域が解離してリズムを刻みはじめた(このようなリズムの同調が崩れることを“脱同調”とよぶ)。細胞間を直接電気的につなぐギャップ結合の阻害薬の投与では、リズムは有意に変化しなかった。この観察結果から、視交叉上核は通常は細胞間連絡により背側と腹側領域が一定の位相差をもって同調していることがわかった。特に、細胞間連絡にはギャップ結合ではなく、神経連絡を介した連絡が重要であることがわかった。

5. 視交叉上核の細胞ネットワークの作動原理

視交叉上核の神経細胞間には、さまざまな神経ペプチドによる連絡が主要な役割を果たしている¹²⁾。中でも、視交叉上核の背側と腹側領域はそれぞれ、神経ペプチドであるバソプレッシン(AVP)と血管作動性腸管ペプチド(VIP)を含有する細胞がおもに存在している。解剖学的には、腹側領域のVIP含有細胞から背側領域のVIP含有細胞へと神経投射があり、また網膜からの神経軸索投射はおもに腹側領域にある。こうした解剖学的な構造が視交叉上核における光情報の統合に重要であると考えられている¹³⁾。近年の研究により、こうした神経ペプチドが視交叉上核の神経間

A. カルシウム濃度の空間分布



B. 概日カルシウムリズム

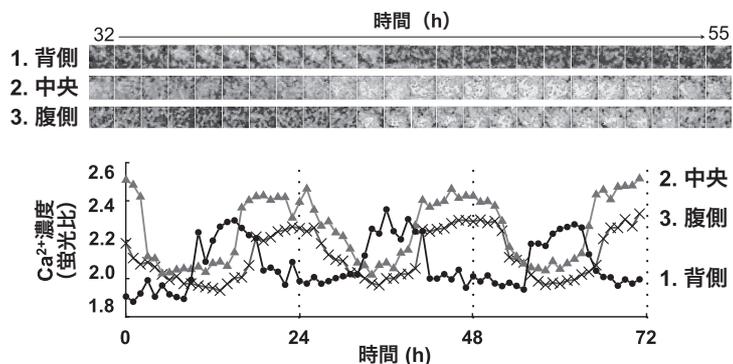


図4 概日カルシウムリズム。

連絡の主要な因子であることが示されている^{14,15)}。これらの神経ペプチドの受容体を欠損する遺伝子改変マウスは、視交叉上核の神経細胞リズムが脱同調する。特に、VIP そのものやVIP受容体をもたない遺伝子欠損マウスでは、脱同調が顕著であることから¹⁴⁾、VIPが主要な神経間連絡因子であると考えられている。また最近では、AVP受容体を欠くマウスでは8時間程度の明暗サイクルの急激なシフト(いわゆる時差ぼけ条件)でも、外界環境に適応することができることが報告された¹⁵⁾。視交叉上核の細胞リズムも正常と比較して脱同調しており、AVPも視交叉上核の細胞間連絡に重要であることが示された。

一方、視交叉上核におけるカルシウムイオンそのものの役割は、実はよくわかっていない。近年の報告では、カルシウム濃度は時計遺伝子発現より数時間先行して上昇することが示されているが¹⁶⁾、約24時間サイクルで起きる概日リズムにおいて、どちらが“先行”しているかの判断には慎重を要する。さらなる解析のためには、細胞内カルシウム濃度を、細胞特異的かつ時間特異的に増減する操作が必要となる。その結果、時計遺伝子発現や伝達物質放出にどのように関わっているかについての検討が必要と思われる。

本稿では、生物時計研究における著者らの長期間の蛍光イメージング観察の試みを紹介した。概日リズムの観察のために構築したこの長期観察技術そのものは、神経発生や長期間の神経細胞の可塑性など、長期間観察が必要となる研究に応用が可能である。例えば近年、海馬神経細胞においてシナプス部位(樹状突起スパイン)の形態的変化が、シナプス可塑性に重要であると考えられている。本イメージング観察法により数日~週にわたる長期的な形態的な変化を捉えることができるかもしれない。また本稿で示したカルシウムのほかにも、たんぱく質のリン酸化状態、膜電位変動などを捉えることができる機能プローブが開発されており、これらのプローブを複数同時に利用して多機能の解析が可能である。著者らも時計遺伝子発現とカルシウム濃度変動の同時測定を試みており²⁾、両者の関係性を解析している。時計遺伝子の転写産物が時刻とともに細胞質から核や膜へ移行すると考えられているが、この観察法を用いれば、原理的にはたんぱく質の移動の様子をリアルタイムで追うことができる。

最近では、光遺伝学ツールを用いた細胞の光操作技術(オプトジェネティクス)が、神経科学の分野で利用されている。これはバクテリア由来の光活性化イオンチャネルを利用するもので、光を用いて神経細胞を自在に活性化ま

たは不活性化させることができるツールとして注目されている。しかし蛍光イメージングと併用する場合、励起光の照射がこれらの光活性化イオンチャネルを活性化させてしまう場合がある。近年、多色の蛍光プローブが開発されており、例えば赤色系の蛍光カルシウムプローブと組み合わせれば、光測定と光操作を同時に行うことも可能である¹⁷⁾。しかし、多色測定と光操作を同時に行おうとすると、励起光の照射がこれらの光活性化イオンチャネルを活性化してしまうという問題が生じる。最近、高輝度の発光たんぱく質が開発されており、この発光イメージングと組み合わせることで、両者を併用して利用することも可能となってきた¹⁸⁾。今後光遺伝学ツールの隆盛に伴って、発光イメージングの有用性もさらに高まっていくと予想される。究極的には、発光基質ルシフェリンを細胞内で完全合成することが可能になれば、発光イメージングの利用価値はさらに格段に上がることだろう。蛍光・発光イメージング双方ともポテンシャルはまだまだ高く、さらなる技術ツールが開発されるのを期待したい。

文 献

- 1) D. Ono, S. Honma and K. Honma: "Cryptochromes are critical for the development of coherent circadian rhythms in the mouse suprachiasmatic nucleus," *Nat. Commun.*, **4** (2013) 1666.
- 2) R. Enoki, S. Kuroda, D. Ono, M. T. Hasan, T. Ueda, S. Honma and K. Honma: "Topological specificity and hierarchical network of the circadian calcium rhythm in the suprachiasmatic nucleus," *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **109** (2012) 21498-21503.
- 3) R. Enoki, D. Ono, M. T. Hasan, S. Honma and K. Honma: "Single-cell resolution fluorescence imaging of circadian rhythms detected with a Nipkow spinning disk confocal system," *J. Neurosci. Methods*, **207** (2012) 72-79.
- 4) Y. Sawaki, I. Nihonmatsu and H. Kawamura: "Transplantation of the neonatal suprachiasmatic nuclei into rats with complete bilateral suprachiasmatic lesions," *Neurosci. Res.*, **1** (1984) 67-72.
- 5) N. M. Lehman, R. Silver, W. R. Gladstone, R. M. Kahn, M. Gibson and E. L. Bittman: "Circadian rhythmicity restored by neural transplant: Immunocytochemical characterization of the graft and its integration with the host brain," *J. Neurosci.*, **7** (1987) 1626-1638.
- 6) S. M. Reppert and D. R. Weaver: "Coordination of circadian timing in mammals," *Nature*, **418** (2002) 935-941.
- 7) D. K. Welsh, J. S. Takahashi and S. A. Kay: "Suprachiasmatic nucleus: Cell autonomy and network properties," *Ann. Rev. Physiol.*, **72** (2010) 551-577.
- 8) S. Honma, D. Ono, Y. Suzuki, N. Inagaki, T. Yoshikawa, W. Nakamura and K. Honma: "Suprachiasmatic nucleus: Cellular clocks and networks," *Prog. Brain Res.*, **199** (2012) 129-141.
- 9) A. C. Liu, D. K. Welsh, C. H. Ko, H. G. Tran, E. E. Zhang, A. A. Priest, E. D. Buhr, O. Singer, K. Meeker, I. M. Verma, F. J. 3rd. Doyle, J. S. Takahashi and S. A. Kay: "Intercellular coupling confers robustness against mutations in the SCN circadian clock network," *Cell*, **129** (2007) 605-616.
- 10) T. Nagai, S. Yamada, T. Tominaga, M. Ichikawa and A.

- Miyawaki: "Expanded dynamic range of fluorescent indicators for Ca^{2+} by circularly permuted yellow fluorescent proteins," *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **101** (2004) 10554–10559.
- 11) J. LeSauter, L. Yan, B. Vishnubhotla, J. E. Quintero, S. J. Kuhlman, D. G. McMahon and R. Silver: "A short half-life GFP mouse model for analysis of suprachiasmatic nucleus organization," *Brain Res.*, **964** (2003) 279–287.
 - 12) E. S. Maywood, J. E. Chesham, J. A. O'Brien and M. H. Hastings: "A diversity of paracrine signals sustains molecular circadian cycling in suprachiasmatic nucleus circuits," *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **108** (2011) 14306–14311.
 - 13) M. Nagano, A. Adachi, K. Nakahama, T. Nakamura, M. Tamada, E. Meyer-Bernstein, A. Sehgal and Y. Shigeyoshi: "An abrupt shift in the day/night cycle causes desynchrony in the mammalian circadian center," *J. Neurosci.*, **23** (2003) 6141–6151.
 - 14) A. J. Harmar, H. M. Marston, S. Shen, C. Spratt, K. M. West, W. J. Sheward, C. F. Morrison, J. R. Dorin, H. D. Piggins, J. C. Reubi, J. S. Kelly, E. S. Maywood and M. H. Hastings: "The VPAC(2) receptor is essential for circadian function in the mouse suprachiasmatic nuclei," *Cell*, **109** (2002) 497–508.
 - 15) Y. Yamaguchi, T. Suzuki, Y. Mizoro, H. Kori, K. Okada, Y. Chen, J. M. Fustin, F. Yamazaki, N. Mizuguchi, J. Zhang, X. Dong, G. Tsujimoto, Y. Okuno, M. Doi and H. Okamura: "Mice genetically deficient in vasopressin V1a and V1b receptors are resistant to jet lag," *Science*, **342** (2013) 85–90.
 - 16) M. Brancaccio, E. S. Maywood, J. E. Chesham, A. S. Loudon and M. H. Hastings: "A Gq-Ca^{2+} axis controls circuit-level encoding of circadian time in the suprachiasmatic nucleus," *Neuron*, **78** (2013) 714–728.
 - 17) Y. F. Chang, Y. Arai and T. Nagai: "Optogenetic activation during detector "dead time" enables compatible real-time fluorescence imaging," *Neurosci. Res.*, **73** (2012) 341–347.
 - 18) K. Saito, Y. F. Chang, K. Horikawa, N. Hatsugai, Y. Higuchi, M. Hashida, Y. Yoshida, T. Matsuda, Y. Arai and T. Nagai: "Luminescent proteins for high-speed single-cell and whole-body imaging," *Nat. Commun.*, **3** (2012) 1262.

(2013年10月28日受理)