



自由に動いているマウスの複数の遺伝子発現リズムを連続測定するシステム の開発に成功～体内時計遺伝子による健康状態の可視化技術～

研究成果のポイント

- ・動体追跡技術と光イメージング技術を融合させ、自由行動マウスの複数組織における遺伝子発現の同時定量解析に成功。
- ・時差ボケ、睡眠障害などの原因である生体リズムの内的脱同調現象を遺伝子レベルで可視化することに成功。
- ・生体リズム疾患の原因解明及び新しい予防法、治療法開発が加速的に進むことに期待。

研究成果の概要

独自に開発した動体追跡技術と光イメージング技術を融合した *in vivo* 4D イメージング装置を開発し、自由行動マウスの複数組織における時計遺伝子発現リズムを、同時に連続して定量測定することに成功しました。その結果、各組織の時計遺伝子発現リズムが新しい環境に同調するまでの変化を1個体レベルで詳細に解析でき、体の健康状態（生理活動）の基準化が可能となりました。

本研究は、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の浜田俊幸特任准教授が中心となって実施し、医学研究科時間生理学分野の本間研一教授（現名誉教授）、本間さと教授（現招聘教授）、保健科学研究所の石川正純教授、医学研究科放射線医学分野の白土博樹教授らとの共同研究により行われたもので、Nature Communicationsに発表されました。本研究は、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により実施された研究です。

論文発表の概要

研究論文名： *In vivo* imaging of clock gene expression in multiple tissues of freely moving mice
（自由行動マウスの生体複数部位における時計遺伝子発現の *in vivo* 定量イメージング）

著者：浜田俊幸，ケネス リー サザランド，石川正純，宮本直樹，本間さと，白土博樹，本間研一
（北海道大学）

公表雑誌：Nature communications

公表日：日本時間（現地時間）2016 年 6 月 10 日（金）午後 6 時（英国時間 2016 年 6 月 10 日（金）午前 10 時）
（オンライン公開）

研究の概要

（背景）

近年、昼夜の区別なく 24 時間活動することが体内時計¹の乱れ（恒常性維持機構の乱れ）を誘発し、様々な疾患の発症に関係することが報告されています。体内時計の乱れは、生体各組織の時計遺伝子発現リズムを光イメージングの技法を用いて、同時計測することが可能です。これまでの研究では、遺伝子発現を長期間連続計測するには、組織を培養して観察する方法しかなく、この方法では、疾患の発症や治療効果を個体レベルで検討することはできませんでした。

今回、自由に行動する動物の遺伝子発現リズムを2つのカメラを用いて長期間連続測定する新しい方法を開発し、異なる組織でみられる時計遺伝子リズムが外界の刺激に対して異なる反応を示すことを個体レベルで初めて実証しました。この発見は、体内時計の乱れから疾患発症に至る過程を解明する手がかりとなるものです。

（研究成果）

今回の研究は、自由に動く動物で測定しようとする組織部位を3次元空間的に同定することと、遺伝子発現のレポーターとして用いている生物発光²の定量的解析の2つを組み合わせることで、自由に行動するマウスの時計遺伝子発現リズムを計測可能としました。その結果、脳内嗅球³、左右大脳皮質、左右耳介、背側正中皮膚の時計遺伝子 *Period1* (*Per1*) 発現は、安定した条件ではすべて夕方に最大、朝方に最低となる概日リズムを示しました。次に、夜間に8時間の光パルス⁴を与えたところ、マウスの行動リズムは翌日には約5時間位相後退を示しましたが、上述の6部位の *Per1* 遺伝子発現リズムは部位により特徴のある動きを示しました。つまり、嗅球では行動リズムと同様に、翌日には位相変化が完了しましたが、その他の5部位ではリズムの位相変化は直ちには起こらず、1日遅れて完了しました。この結果は、夜間の光により生体内の概日リズムの同調が一時的に崩れることを示しています。

（今後への期待）

今回の結果は、生物発光を利用した時計遺伝子の4D解析により、体内時計の乱れる過程を個体内で観察した世界最初のもので、今後この技術を用いることにより、脳にある体内時計の中枢が内分泌や免疫機能を支配する末梢組織のリズムをどのように調節しているのか、また、体内時計の乱れがそれらにどのような影響を与え、疾患へと進展させるのかの理解につながることが期待されます。

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放射線医学分野

特任准教授 浜田 俊幸（はまだ としゆき）

TEL：011-706-4780 FAX：011-706-7871 E-mail：toshi-ha@med.hokudai.ac.jp

【用語説明】

1. 体内時計（生物時計）

環境サイクルの長さ に似た周期で自律的に振動し、種々の生理機能に作用して概日リズムを発現させるはたらきを持つ。概日リズムを支配する生物時計（circadian clock：概日時計）の所在として、哺乳類のげっし類（ネズミの類）では視床下部の suprachiasmatic nuclei（視交叉上核）が知られている。自立性振動をつくり出す時計遺伝子は視交叉上核だけではなく、全身の細胞にも発現している。視交叉上核は、脳内各組織、末梢のほとんどの臓器に存在する振動体のリズム位相や振動を制御している。

2. 生物発光

ホタルの光に代表される生物発光を用いたイメージング手法 (Bioluminescent Imaging: BLI)。ルシフェラーゼ (発光酵素) と発光基質ルシフェリンによる反応により発光が生じる。

3. 嗅球

匂いを感知する神経系で嗅覚情報処理に関わる脳の組織。

4. 光パルス (光刺激)

体内時計にとって夜間の前半に光パルスを照射すると、体内時計を遅らせ、夜間の終わりに照射すると体内時計を早める。本研究では夜の初めから 8 時間の光パルスをマウスに照射することで、マウスの行動開始リズムの位相を約 5 時間後退させる効果があった。

【参考図】

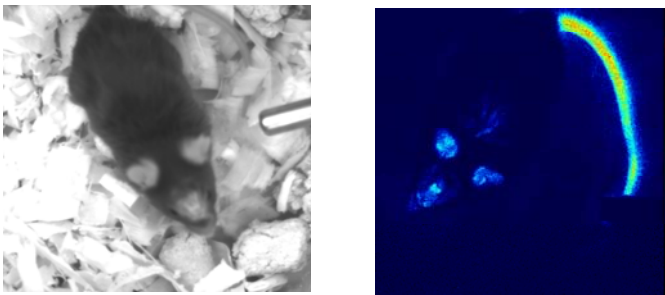


図 1. *In vivo* 生物発光イメージング

Per1-luc トランスジェニックマウス (C57Black/6 background) の明視野 (左) 及び暗視野 (右) での撮影例。時計遺伝子 *Per1* 発現部位が可視化できる (嗅球, 耳, 尾部位など)。

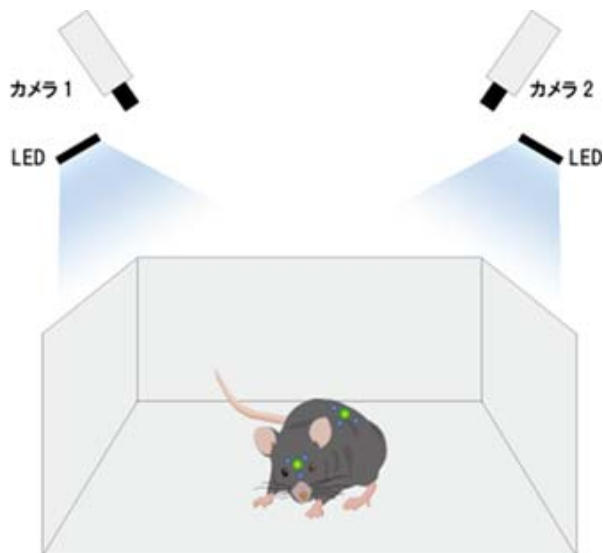


図 2. ステレオ撮影による *in vivo* イメージング

測定ケージ内を自由に行動しているマウスの嗅球と背中皮膚における時計遺伝子 *Per1* の測定のイメージ図。頭部と背中にシンチレータ (●) をそれぞれ 3 つ取り付け、3 次元空間内でのポジションマーカとして使用している。シンチレータは、非常に弱い LED ライトの光 ($<0.01\text{lux}$) により光る (最大蛍光波長, 425nm)。このシンチレータの光は各組織の生物発光 (*Per1* 遺伝子発現) に影響せず、無視できる。またパターンマッチング法により頭部と背中のシンチレータは、大きさが違うことで区別できる (頭部

シンチレータ直径 2mm, 背中シンチレータ直径 3mm)。頭部と皮膚の 3 つのシンチレータの 3 次元座標情報とパターンマッチング法により, 嗅球と背中皮膚の *Per1* 発現部位 (●) が同定され, 追跡される。嗅球と背中皮膚の 3 次元座標情報により, 3 次元空間での発光量補正が可能となり, 嗅球と背中皮膚での *Per1* 遺伝子発現量が自動定量できる。

シンチレータ: 電子などの荷電粒子が通過すると蛍光を発するものの総称。本研究ではプラスチックシンチレータを用いており, 非常に弱い LED の光 (<0.01lux) でシンチレータを光らせ (最大波長 425nm の青色の蛍光), 3 次元空間内のマウスの位置マーカーとして使用している。

パターンマッチング: 2 次元画像において, モデル画像と入力画像を比較して, 最も類似する位置を検索し, 相関値の高いものを同定する。

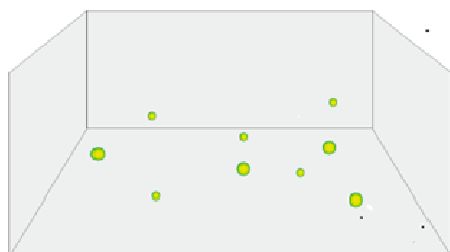


図 3. カメラで撮影される発光量 (●) のターゲットからの距離と遺伝子発現リズムによる影響ターゲットとの距離と遺伝子発現リズムより影響を受ける発光体 (遺伝子発現を表す) のイメージ図。発光量はカメラからの距離の 2 乗に反比例するため, ケージ内の位置により発光量は変化する。また遺伝子発現にリズムを持つもの (常に安定した発現を持たないもの) は測定時刻により発光量は変化する。そのため 3 次元空間で発光量補正をせず, また時間による発現の変化を考慮しなければ, ターゲット部位の遺伝子発現量の定量は困難になる。

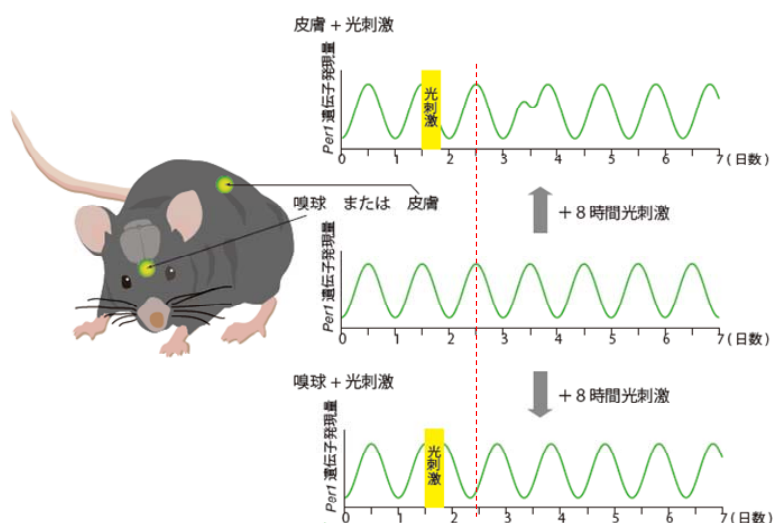


図 4. マウス生体内脱同調現象形成過程の可視化

嗅球と背中皮膚の *Per1* 遺伝子発現リズム (生物発光リズム) の例。嗅球と背中皮膚の *Per1* 遺伝子発現

リズムは夕方高く、朝低いリズムを持つ。夜間に 8 時間の光パルス（光刺激）をマウスに与えると、マウスの行動リズムは翌日には約 5 時間遅れて開始する。嗅球の *Per1* 遺伝子発現リズムは行動リズムと同様、翌日には *Per1* 遺伝子発現リズムのピーク時刻が、約 5 時間遅れる。しかしながら背中皮膚の *Per1* 遺伝子発現リズムは、翌日には影響を受けず、光照射 2 日後遺伝子発現リズムのピーク時刻が、約 5 時間遅れる。その他、左大脳皮質、右大脳皮質、左耳、右耳の *Per1* 遺伝子発現リズムは背中皮膚の *Per1* 遺伝子発現と同様、光照射 2 日後遺伝子発現リズムのピーク時刻が、約 5 時間遅れる。今回、本研究の遺伝子発現追跡定量システムを用いて、上記にみられる、同一個体内での時計遺伝子の発現リズムの乖離現象の形跡過程及び再同調過程を、世界で初めて観察することに成功した。