

脳スライス培養系からの極微弱光測定を用いた概日リズム発信機構の解析

Analysis of oscillation mechanism of circadian rhythm by detecting ultraweak bioluminescence from brain slice

磯島康史

大阪大学蛋白質研究所代謝部門, 学術振興会特別研究員

Yasushi ISOJIMA

Research Fellow of the Japan Society for the Promotion of Science

Division of Protein Metabolism, Institute for Protein Research, Osaka University

From any kind of living organisms, very weak spontaneous light emission without excitation light (ultraweak bioluminescence) is observed. We succeeded to detect ultraweak bioluminescence from a rat hippocampal slice preparation and showed the correlation between the intensity of ultraweak bioluminescence and neural metabolic activity.

In this research, I succeeded to detect circadian rhythm in the intensity of ultraweak bioluminescence from the organotypic slice culture of the suprachiasmatic nucleus (SCN), which is the oscillator of circadian clock in mammals, for as long as 5 days. The pattern of circadian rhythm of the bioluminescence is similar to that of vasopressin release from the slice.

研究目的

生物時計の中で、約24時間を周期とする概日リズムは単細胞生物から哺乳類にいたるまで普遍的に存在しており、その生存を左右する摂食、睡眠などの行動の発現に深く関っている。哺乳類における概日リズムの時刻発信中枢が視床下部視交叉上核であることが知られているが、その時刻発信のメカニズムについては未だわかっていない。視交叉上核はスライス培養系に移しても *in vivo* と同様に約24時間周期の神経活動のリズムを維持しているため、概日リズム発信機構の解明のための有用な手段として用いられているが、従来の電気生理学的手法では長期間の連続計測は不可能であった。

申請者は極微弱生化学発光計測を新たな神経活動計測法として用いることを海馬

スライスを用いた研究で示していた。この極微弱生化学発光計測は培養スライス組織にとって完全に無侵襲な神経活動計測法であるので、申請者は、この計測法が視交叉上核のスライス培養系における概日リズムの検出に適していると考えた。本研究では、この手法を用いて視交叉上核スライスからの概日リズムの長時間連続検出を試み、次いで概日リズム発信機構の解明を目指すことを目的とした。

研究経過

まず視交叉上核の organotypic slice culture による長期培養系の確立を行なった。これまでの報告では視交叉上核の slice 培養は旋回培養系で行われてきた (Tominaga, K. et al. *Neuroscience* 59, 1025-1042 (1994)) が、この方法では極微弱光を光検出器に送るための光ファイバーの設置が困難なため、多孔質膜上で静置培養する方法

(Stoppini, L. et al. *J. Neurosci. Meth.* 37, 173-182 (1991)) を用いた。

下図 1a,1b は培養開始後 8 日目の視交叉上核スライス培養からの vasopressin 分泌量の時間変動を測定した結果を表わし、図 1a が無血清培地、1b が血清 (fetal bovine serum 10%) 含有培地で培養した sample である。両方とも vasopressin 分泌に概日リズムが存在していることがわかった。

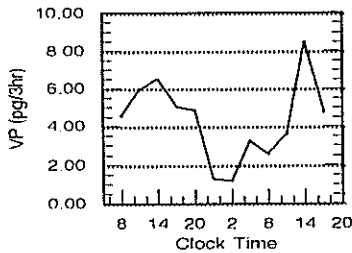


図 1a

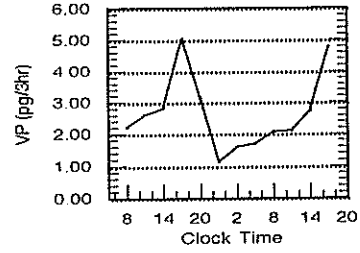


図 1b

次に、この視交叉上核の静置培養系を用いて、極微弱生化学発光の概日変動の検出を試みた。本研究で用いた極微弱光検出システムのブロックダイアグラムを図 2 に示した。slice 培養用の CO₂-incubator を暗箱としても用いた。slice からの発光は、より広い範囲からの光を検出するために入力端にマイクロレンズを装着した光ファイバーを用いた (入力端レンズ径 2mm, 出力端ファイバー径 100μm)。他の部分については以

前発表したシステムと同じである (Isojima, T., Isojima, Y. et al. *Rev. Sci. Instrument* 66, 2922-2926 (1995), Isojima, Y., Isojima, T. et al. *Neuroreport* 6, 658-660 (1995))。

この系を用いて SCN slice からの極微弱生化学発光強度が概日変動を示す結果を得た (図 3)。また、同じ slice を用いて引き続き 3 時間毎の vasopressin 放出量を測定した所、発光と vasopressin は似た概日変動パターンを示すことがわかった (図 3)。

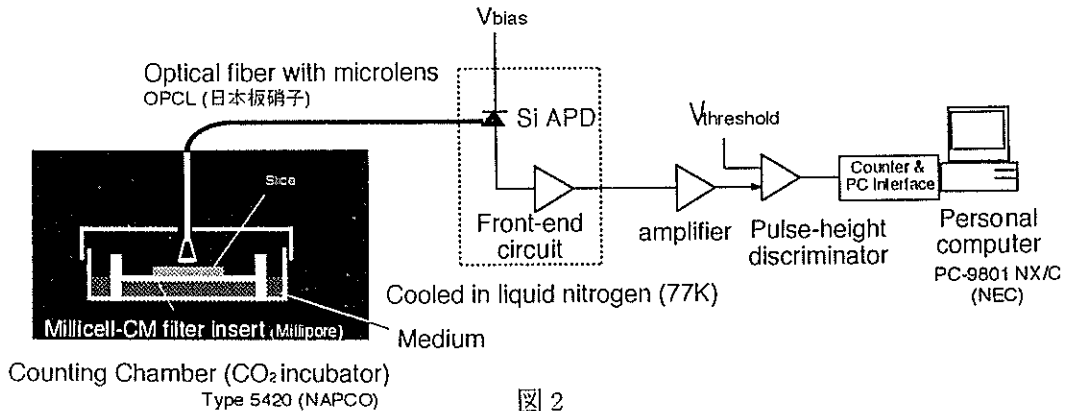


図 2

続いて、この極微弱生化学発光測定を用

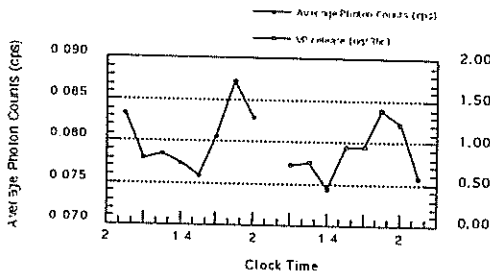


図 3

いた概日リズムの長期連続検出を試み、最長連続5日間にわたる発光強度の概日変動を観測することに成功した。図4はその一例を示したもので、発光強度は30分毎に集計し、各点で前後各1.5時間のデータと平均してスムージングをかけたものである。時間経過につれて、peakがはつきりしなくなり、分裂してくる傾向を示したが、約24時間周期の発光強度の落ち込み(矢印)は計測開始5日後でも明瞭に判定できた。図4bは図4aのデータを χ^2 -periodgramで周期解析したもので、23.5時間周期があることが示されている。

研究成果

視交叉上核スライスの多孔質膜上での静置培養にて1週間以上概日リズムを維持する系を確立した。

上記の系と、極微弱生化学発光検出システムを組み合わせることにより、視交叉上核スライス培養からの極微弱光の概日変動を最長5日間検出することに成功し、この極微弱光の概日リズムと vasopressin 分泌の概日リズムのパターンが類似していることを示した。

以上の成果により、極微弱光検出を用いて視交叉上核における概日リズム発信機構の解明を行なうための基盤が整ったといえる。

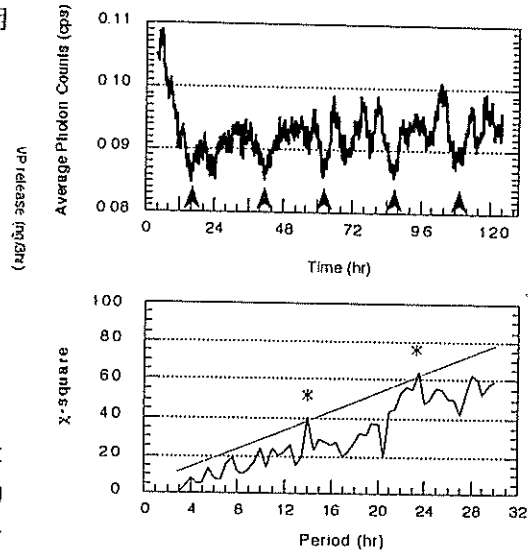


図 4a (上図)、図 4b (下図)

今後の課題と発展

今後まず行なうべきこととして、研究計画に記載して、助成期間中にできなかった薬理学的手法との組み合わせによる、視交叉上核内での概日リズム統合機構の解明に取り組む予定である。

極微弱生化学発光検出のための単一光子計数システム(図2)は非常に高感度のシステムではある(Isoshima, T., Isojima, Y. et al. *Rev. Sci. Instrument* 66, 2922-2926 (1995))が、スライスからの発光量が極めて微弱なため、検出が困難であり、時間分解能もよくない。現在は概日リズムの検出は連続5日間までしかできていないが、さらに長期間の検出を行なおうとすれば、光検出器の感度向上が必要である。

現在、新しいアヴァランシェフォトダイオードを用いて感度向上を試みている。

検出器の感度向上により時間分解能が上げられれば、二次元画像化や他の脳部位のスライス培養系への応用も考えたい。

発表論文リスト

(proceedings)

Isojima, Y. and Isoshima, T.: Tetrodotoxin resistant component of circadian rhythm from rat suprachiasmatic nucleus slice detected by biochemiluminescence, *Soc. Neurosci. Abst.* 22, 2052 (1996)

Isojima, Y., Isoshima, T., Tashiro, H. and Nagai, K.: Circadian change in the intensity of ultraweak biochemiluminescence from rat suprachiasmatic nucleus slice, *Jap. J. Physiol.* 47 (suppl.) , in press (1997)