

## EIIRISプロジェクト研究計画書(2020年度)

系・センター名 環境・生命工学系

氏 名 沼野 利佳

□新規 ■継続

研究課題	概日リズムの異常による脳活動の変化を計測する
研究目的	<p>(EIIRIS・VBLの研究テーマとの関連、および施設・設備使用目的を明らかに)</p> <p>24時間周期の体内時計で制御された概日リズムは、地球上の全生物にとって普遍的なシステムである。現代人をとりまく情報化社会では概日リズムがくずれ、肥満、ストレスの増加に伴ううつ病など精神疾患、循環器系疾患などの様々なリズム障害病が多発し、健康問題が生じている。本研究は、概日リズムを発振する中枢である視交叉上核(SCN)の時計遺伝子の発現がみだれることで、概日リズムに異常をきたした組み換えマウスの脳計測を、豊橋プローブにて実施する。この中枢時計の異常がひきおこす感覚野や運動野のアウトプットの神経生理学的な変化をマウスの個体レベルで生きたまま長期に観察する知見により、全体のリズムがどう制御されるのかを解明する。さらに外部から神経活動を操作する独自の実験系で、神経を特異的に刺激することで、脳全体のリズムの統合性が崩れるのか、またさらなる刺激で調節させることができるかを探る。現代人のリズム障害がどのように脳機能に影響を及ぼすかについて調べ、健全な脳活動には概日リズムが重要であることを示す。</p> <p>ペースメーカー神経の機能を遺伝子の変化をEIIRISにある共焦点顕微鏡や発光顕微鏡でリアルタイムを観察する。また、ペースメーカー神経の電気生理学的な変化をVBLで作製したデバイスを用いた生理実験を観察する。また、遺伝子の機能変化や、異常なリズムの組換えマウス動物を飼育するSPF環境(指定の微生物がない環境)の飼育環境が必要である。</p> <p>また、数<math>\mu</math>l液滴中に細胞とDNAを封入して直流電界を印加し、細胞内に効率よくDNAを導入できる独自開発の簡便液滴エレクトロポレーション法を用いて、VBLで作製されたマイクロ流路内で、iPS細胞の樹立を高効率で簡便かつ連続的に行い、iPS細胞樹立の自動化、ハイスループット化と低コスト化を目指す。さらに、本方法を、遺伝子治療に寄与する遺伝子修復を連続的に行うため、多量のサンプルに対し、ゲノム編集による形質転換を実現するシステムにも応用する。</p>
研究計画及び方法	<p>(過去の経過、研究準備状況等)</p> <p>哺乳類の概日リズムの中枢のSCNでは、<i>Period1</i>遺伝子(<i>Per1</i>)の発現が日周変動し、目からの光情報により<i>Per1</i>発現誘導がおこる。本研究は、概日リズムを規定する時計遺伝子のひとつである<i>Per1</i>遺伝子を用いて、2000年に応募者が独自で開発した<i>Per1</i>遺伝子発現を指標にしたイメージング技術で、各組織の概日リズムを時空間的に観察できる実験系を用いて行う。<i>Per1</i>発現制御領域で発光遺伝子やGFP遺伝子を発現するトランスジェニック動物を作り、このマウスのSCNスライスや各組織を培養しながら<i>Per1</i>発現を反映している光シグナルを細胞レベルで顕微鏡イメージングした。これにより、時計遺伝子レベルでのマウス個体の組織別の概日リズムの異常が検知できる実験系が確立した。豊橋技術科学大学で作成した直径数百ナノメートルサイズのマイクロ電極プローブ(豊橋プローブ)が開発され、この超低侵襲である豊橋プローブを野生型のマウスの脳表に移植し、生きたマウスから1細胞レベルで神経活動も測定可能となった。</p> <p>さらに、3<math>\mu</math>l液滴中に細胞とDNAを封入して直流電界を印加し、細胞内に効率よくDNAを導入できる独自開発の方法である簡便液滴エレクトロポレーション法を確立している。さらに、往復運動を伴わない再現性の高い方この超低侵襲である豊橋プローブ法に改善も行っている。</p> <p>(今後の研究計画及び方法、利用希望設備など、EIIRIS教員と打合せている場合はその状況)</p> <p>豊橋プローブにて、脆弱な時差ボケマウスなどの疾患モデルマウスにおける安定的な脳計測を実施する。研究で用いられている<i>Bmal1</i>KOマウスを皮切りに、<i>Per1</i>、<i>Per2</i> KOなど様々な時計遺伝子のKOマウスが報告されているが、<i>Bmal1</i>KOホモマウスの形質は恒暗条件下ですぐにリズムが完全に消失するという、1つの遺伝子の欠損マウスのフェノタイプとしては非常に強い形質をしめすマウスであるため、感覚野におけるフェノタイプも生じやすいのではないかと考える。そのため、脆弱で容易に時差ボケとなる<i>Bmal1</i> KOマウスに、視覚野の感覚神経の活動電位を、豊橋プローブにて脳計測を実施する。</p> <p>さらに、特定のペースメーカー神経や、それを含んだ神経回路を刺激しつつ、刺激が成功しているか、そしてそれに伴い概日リズムが変化したかを細胞レベルで確認する。使用するツールとしては、</p> <p>1) ペースメーカー神経で概日リズムを規定している時計遺伝子の働きをモニターできる実験系を組み合わせ、概日リズムに関連する脳神経回路の神経活動を高性能センサーチップで測定しつつ、時計遺伝子の発現変化を同時に観察し、さらに神経細胞を光刺激して外部操作する。</p> <p>また、細胞レベルでの変化を、蛍光たんぱく質および免疫組織化学的手法を用いて観察するため、共焦点顕微鏡の利用が必要である。また、SPF環境の飼育した、遺伝子の機能変化が可視化できる組み換えマウスや、異常なリズムの組換えマウス動物を用いてアイリスのイメージングや電気生理実験を観察する。液滴エレクトロポレーションを実施し、細胞を培養し観察する設備を使用する。</p>

EIIRIS・VBL内で研究プロジェクトを行う理由

厚みのあるサンプルの蛍光シグナルを観察するには共焦点顕微鏡を利用する必要がある。概日リズムを観察したり、異常な概日リズムを示す組換え動物(マウス)、脳活動計測、生体内遺伝子発現の確認にて、サンプルを取得・観察するには組み換えマウスを飼育するSPF条件やコンベンショナル条件のマウス飼育部屋を利用し、脳活動計測、生体内遺伝子発現の確認する必要があるため。これらの実験において、インキュベ施設を含むアイリスの設備・機器を使用するため。EIIRIS教員である鯉田准教授、インキュベ施設で共同利用研究をしているテクロプロR&Dの研究者、イノベーションプロジェクトで共同研究しているネッパジーン株式会社の松本 光二郎と、すでに研究活動は実施している。

	研究者氏名	所属・職名	役割分担
研究組織	(研究代表者名の後ろに◎を付す)		
	沼野 利佳 ◎	環境生命工学・准教授	研究計画・実施・発表・特許取得・学生指導
	松尾 美奈子	4系沼野研・技術補佐員	細胞研究実施・学生指導
	鈴木 一基	4系沼野研・技術補佐員	動物実験研究実施・学生指導
	横山 翔平	4系沼野研・研究員	動物実験研究実施
	中澤 和雄	4系沼野研・D3	動物実験研究実施
	篠崎 竜登	4系沼野研・D1	細胞実験研究実施
	柴田 隆行	機械工学・教授	μ流路デバイス作成
	河野 剛士	電機電子工学・准教授	電極デバイス制作
	栗田 弘史	環境生命工学・助教	液滴エレクトロポレーションの計画・実施
松本 光二郎	ネッパジーン株式会社	液滴エレクトロポレーションの研究計画・実施・発表	

研究期間: 2019 年 4 月 ~ 2022 年 3月(原則として3年間)

(研究期間の始期は、研究を開始した年を記入する。終期は原則として、開始した年から3年後を記入する。)