

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590290

研究課題名(和文)哺乳類体内時計中枢の領域間および細胞間同期—構造多様性をふまえて—

研究課題名(英文)Regional and intercellular mechanism of oscillator synchrony in the mammalian circadian center.

研究代表者

重吉 康史 (SHIGEYOSHI, Yasufumi)

近畿大学・医学部・教授

研究者番号：20275192

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：視交叉上核発振細胞間の同期機構と位相波現象の機序の解明を目指した。視交叉上核の腹側部と背側部にて包括的遺伝子発現解析を行った。その結果、腹側ではVip遺伝子が背内側部ではVpac2遺伝子が最も特異性が高く、またおのおのの局在を形態学的に確認した。これはVIP/VPAC2受容体の視交叉上核内部における同期維持に対する重要性が示唆する。一方でラット視交叉上核のスライス培養を用いForskolinを加えて細胞間同期を破壊することができた。それによって異なる固有周期を持つ2領域を視交叉上核背内側部でつきとめることができた。さらに数値的シミュレーションにてこの領域周期差が位相波を作ることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We have investigated what systems maintain the synchrony in the SCN. We performed a microarray study to investigate the genes intrinsically expressed in dorsal and ventral region of the suprachiasmatic nucleus (SCN) and found that Vip gene and Vpac2 genes were specifically expressed in the DMS CN and VLSCN, respectively. This suggests that the synchrony among SCN oscillators depends on the VIP/VPAC2 receptor system. Then, we artificially disrupted the intercellular coupling among oscillating neurons in the SCN. The analysis divided the SCN into two regions: a medial region with periods shorter than 24 h (short period region, SPR) and another lateral region with periods longer than 24 h (long period region, LPR). Further, a mathematical model of the SCN based on the results faithfully reproduced the kinetics of the oscillators in the SCN. The findings suggest that the regional period difference in the SCN generates the phase

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・環境生理学(含体力医学・栄養生理学)

キーワード：視交叉上核 概日リズム 同期 日長 光周性 Per1 時計遺伝子 Forskolin

## 1. 研究開始当初の背景

視床下部に存在する視交叉上核は末梢臓器の時計と構成する体内時計の階層構造の最上位に位置する。視交叉上核から発振される概日リズムは通常約24時間を周期とし、周期ごとのぶれがほとんど無い。視交叉上核の細胞個々は概日リズムの発振能をもつことが知られている。また、Welsh (Neuron 1995), Honma (Eur J Neurosci 2000)らの報告によれば、視交叉上核の各々細胞の固有周期は大きく異なる。よって、生体の視交叉上核における概日リズム発振細胞では位相情報の伝達によって、視交叉上核全体での同期を達成している。さらに申請者らは時差症候群の機序を検討する過程でラット視交叉上核の小領域-背内側部と腹外側部-の脱同期から再同期にいたる過程を検出した。(Nagano et al. J. Neurosci. 2003) 視交叉上核の腹外側部には網膜からの直接の投射があり、環境の光情報を直接受ける。背内側部には直接の投射がほとんど存在しない。一時的に生じた体内時計と環境の明暗周期とのずれは5日から10日を要して最終的に解消される。これは腹外側部に局在する体内時計が位相情報を背内側部に伝える機構が存在することを示唆する。このような視交叉上核内細胞間、あるいは領域間での同期を達成している位相情報伝達の仕組みについては十分に明らかになっていない。その解明を目指してのプロジェクトが望まれていた。

## 2. 研究の目的

領域間の同期は、下部構造として個々の細胞間の同期機構を必要とする。この同期がどのようなメカニズムによって達成されているかを解明することを目的とする。視交叉上核は多様な形質をもつ細胞集団が同期することによって安定した視交叉上核の概日リズムを発振している。これを達成する基盤のひとつが同期現象であり、周期を均一化すると

同時に、安定したリズムを発することにも関与していると思われる。しかし、視交叉上核内部の細胞および機能の多様性をふまえたうえで、周期の異なる細胞群が位相情報を交換し最終的に同期を達成するためのメカニズムについての検討は殆どなされていないため、また、視交叉上核の内部の機能の異なる小領域である網膜投射部位(腹外側部)から網膜非投射部位(背内側部)に対して、位相情報を伝達するメカニズムについての知見も乏しい。これは主たる研究対象の位置にあったマウス視交叉上核においては、小領域であるシェルおよびコアの局在を確認しにくいことによる。よってこのプロジェクトでは形態的解析をラット視交叉上核にしばり背内側部、腹外側部に特異的に発現する受容体、リガンドに注目した。また、視交叉上核の発振細胞が非常に多様な形質を持つ集団であり、形質が同一の細胞群に特徴的なトランスクリプトームの情報がないため、情報伝達の方向性を特定することが困難であることが一つの大きな理由である。すでに、申請者はAVP, VIP, GRPを発現する各々の細胞群が小領域に限局して密に存在することに着目し、DNA chipを用いて小領域に限局して発現する遺伝子を抽出することに成功していた。この情報を起点として視交叉上核に内在する細胞間の情報伝達の方向性を明らかにし、細胞間の同期に貢献している分子を探り当てようと試みた。さらに、それらのリガンドが結合する受容体が活性化する細胞内情報伝達機構を阻害することによって細胞間同期を阻害し、それによって個々の発振細胞、視交叉上核内部小領域の特徴などを明らかにし、視交叉上核内部における情報伝達と視交叉上核に見られる、腹外側部と背内側部の脱同期と再同期、位相波、朝振動子と夜振動子の日長依存性などの現象の仕組みを明ら

かにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

視交叉上核内部の小領域間、細胞間の同期メカニズムを明らかにするため以下の検討を進めた。1. DNA microarray で抽出された遺伝子の視交叉上核における発現局在を *in situ hybridization* で検証した。2. ルシフェラーゼの発光によって概日リズムを検出できる Per2 プロモーター：ルシフェラーゼ遺伝子を導入したトランスジェニックラットの視交叉上核のスライス培養を用いて以下の検討を行った。2-I. 背内側部、あるいは腹外側部に遺伝子発現が限局する受容体に対するアゴニスト、アンタゴニストを用意し、視交叉上核スライス培養を用いて、概日リズムに対する影響を検出した。2-II. 視交叉上核に局在する個々の発振細胞の概日リズムを発光モニターにて捉え、その同期を阻害することを試みた。すなわち薬剤によって振動子間同期を阻害し、個々の細胞の振動の周期を解析し、視交叉上核内部における周期分布について検討した。2-III. これらの結果にて視交叉上核振動子における周期分布に領域性があることが想定された。よって、領域間に周期差が存在するかを明らかにするために視交叉上核を細切して切片ごとの周期を捉えた。3. 今回、我々はいくつかの方法によって視交叉上核内部の発振細胞間の同期を破壊することに成功した。その結果、領域間に周期差が存在し、短周期から長周期にいたるグラデーションが存在することを明らかにした。この周期分布の領域局在をもとに数値的シミュレーションを行い、視交叉上核内部に現れる位相波の精製機序について検討した(ソニー、浅川氏との共同研究)。

### 4. 研究成果

Vpac2, カルシトニン受容体、RGS16 遺伝子などの視交叉上核内部局在の検討を行った。こ

れらのいずれの遺伝子も背内側部に高発現していた。また、そのリガンドであるカルシトニン、VIP は腹外側部に発現していることも明瞭に捉えられた。これらのうちVIP の投与では明瞭な位相変位を検出できた。

このVIP受容体以降の細胞内情報伝達はcAMPを介して行われていることが知られている。さらに視交叉上核の発振細胞間においてはアデニレートサイクレースによって産生されるcAMPが同期達成のために必要とされるシグナル伝達の中核であることが知られている(Maywoodらによる。)。よって、cAMPをもちいたシグナル伝達系の操作によって同期を破壊することを考案した。Forskolin (FK) はアデニレートサイクレースの活性を上昇させてcAMPを弛張的に上昇させる。そこでFKを投与して領域を細分化して周期を計測すると、視交叉上核内部の同期が破壊され、内側に短周期の領域が外側に長周期の領域が存在することが明らかになった。その技術的進展を基盤とし、非同期となった視交叉上核における微少領域の解析によって周期の異なる2領域を視交叉上核背内側部でつきとめることができた。内側の短周期領域(short period region; SPR)、それより外側の周期の長い領域を(long period region; LPR)とした。

さらに、FKを用いない状態で領域間に周期差が存在するかを明らかにするために視交叉上核を細切して切片ごとの周期を捉えた。この周期差は吻尾側では尾側に24時間より短い領域が吻側に24時間より長い領域が存在した。また内外側方向では内側に短周期の領域が外側に長周期の領域が存在した。CCDカメラでの観察では細切された小領域のすべてが同期していることが明らかになり視交叉上核の発振細胞間の同期は微少領域で行われていることが明らかとなった。

この時点でこのSPRが位相波を作り出す仕組みを明らかにするために数値的シミ

ュレーションにて位相波の再現に成功した。ここで振動子を位相方程式で表現し10X10の格子に配置した。その際、同期を促進する結合は隣接する振動子間のみが生じるのみに存在するとして、結合の強度を変化させるとある強度において位相波を再現することができた。さらに振動子間の強度を変えて検討をさらに加えると、振動子間にある程度以上の結合強度がないと位相波が現れないことが明らかになった。また、短周期領域をランダムに配置しても生体で見られるような内側から外側に至る位相波は現れないことも明らかにした。

一方で視交叉上核内部に存在する朝振動子と夜振動子の検討で成果があった。長日条件と短日条件で in situ hybridization を用いて、Per1 遺伝子の発現領域を時系列で観察すると、SPR、LPR に相当する領域間の位相差が拡大する所見を得た。これは視交叉上核内部にて、日長情報が認識されていることを意味する。よって、この SPR、LPR が日長を認識する振動子である morning oscillator, evening oscillator であることを示唆している。

最終的に成果論文(Koinuma et al. 2013 EJM など)の発表にいたった。また、本プロジェクトを中心として著作を発表した。また、多くの学会におけるシンポジウム、研究会における招待講演などにおいてこの成果を発表した。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 19 件)

Helix-loop-helix protein Id2 stabilizes mammalian circadian oscillation under constant light conditions.

Adachi AA, Fujioka A, Nagano M, Masumoto

KH, Takumi T, Yoshimura T, Ebihara S, Mori K, Yokota Y, Shigeyoshi Y.

Zoolog Sci. 2013 Dec;30(12):1011-8. doi: 10.2108/zsj.30.1011. 査読有り

Regional circadian period difference in the suprachiasmatic nucleus of the mammalian circadian center.

Koinuma S, Asakawa T, Furukawa K, Sujino M, Masumoto KH, Nakajima Y, Hashimoto S, Yagita K, Shigeyoshi Y. Eur J Neurosci. 38(6):2832-41 2013 Jul 22.

doi: 10.1111/ejn.12308. 査読有り

Establishment of TSH real-time monitoring system in mammalian photoperiodism.

Tsujino K, Narumi R, Masumoto KH, Susaki EA, Abe T, Iigo M, Wada A, Nagano M, Shigeyoshi Y, Ueda HR. Genes Cells. 2013 Jul;18(7):575-88. doi:10.1111/gtc.12063 査読有り

Circadian expression and specific localization of a sialyltransferase gene in the suprachiasmatic nucleus. Hamada Y, Saigoh K, Masumoto KH, Nagano M, Kusunoki S, Shigeyoshi Y. Neurosci Lett. 2013 535:12-7

Doi;10.1016 査読有り

Differential Entrainment of Peripheral Clocks in the Rat by Glucocorticoid and Feeding.

Mitsugu Sujino, Keiichi Furukawa, Satoshi Koinuma, Atsuko Fujioka, Mamoru Nagano, Masayuki Iigo, and Yasufumi Shigeyoshi

Endocrinology 2012 53(5):2277-86. doi: 10.1210/en.2011-1794. 査読有り

他 14 件

[学会発表](計10件)

Singular point of circadian limit cycle oscillators in cultured cells

Yasufumi Shigeyoshi<sup>1</sup>, Koinuma Satoshi<sup>1</sup>,  
Isao Tokuda<sup>2</sup>, Kori Hiroshi<sup>3</sup>

ヨーロッパ日本時間生物学会

2013年8月17日～23日 (ミュンヘン)

Recognition of day length is associated with phase wave in the mammalian circadian center

重吉康史

第35回日本神経科学学会

2012年9月17日(名古屋市)

タイプ0位相反応曲線からタイプ1位相反  
応曲線の変遷

重吉康史

第19回日本時間生物学会

2012年 9月12日(札幌市)

他7件

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

重吉康史 (SHIGEYOSHI, Yasufumi)

近畿大学・医学部・教授

研究者番号: 20275192

### (2) 研究分担者

鯉沼 聡 (KOINUMA, Satoshi)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号: 10340770

筋野 貢 (SUJINO, Mitsugu)

近畿大学・医学部・助教

研究者番号: 30460843

升本宏平 (MASUMOTO, Kohei)

近畿大学・医学部・助教

研究者番号: 60580529