

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 25 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460326

研究課題名(和文) 体内時計中枢ゲート機構の探求 位相特異的光照射情報遮断の仕組みに迫る一

研究課題名(英文) Exploration of gating against delivery of photic information to the mammalian central circadian clock

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：網膜において、光暴露によってもcFosの誘導が生じない、光入力ゲートされた位相の存在を確認した。さらに網膜神経節細胞のうちメラノプシンを含有する神経細胞(視交叉上核に投射する。)のみを観察し、cFosの発現に位相依存性があることが明らかになった。これは視交叉上核への光情報が網膜レベルで制御されていることを示唆する。また、マウスの明暗の日周変動をシフトさせ時差ぼけ状態を作り出し、ゲーティング位相のシフト様式を明らかにした。ゲートの位相シフト速度は視交叉上核背内側部(DMSCN)の概日リズムの位相シフトとよく一致した。この発見は、DMSCNがゲートの位相を決定することを示唆している。

研究成果の概要(英文)：In the retina, using cFOS as a marker for neural excitation, we found dead zone in which cFos induction does not occur even by light exposure. Furthermore, there is a phase dependency in the cFos induction even in ganglion cells expressing melanopsin that were projected to the suprachiasmatic nucleus. This suggests that the optical information delivered to the suprachiasmatic nucleus is regulated at the retinal level. We also clarified the shift pattern of the phase of the gating in the SCN. The manner of the phase shift of the gate is well corresponded with the phase shift of the circadian rhythm in the dorsal part of the suprachiasmatic nucleus (DMSCN). This finding suggests that the circadian clock in the DMSCN determines the phase of the gate.

研究分野：環境生理 時間生物学

キーワード：視交叉上核 体内時計 概日リズム 日内リズム 日周リズム 網膜 Gating Dead zone

1. 研究開始当初の背景

体内時計の中核は視床下部の視交叉上核に存在する。体内時計は振動現象であるから振幅、周期、位相によってその振る舞いが記述できる。一日 24 時間の各位相で短時間光を照射して行動リズムをもちいて体内時計がどの程度シフトするかをプロットした曲線が位相反応曲線である。この位相反応曲線で光照射への位相変位量を観察すると特異的な現象が生じている。すなわち、体内時計における昼、すなわち主観的昼においては、動物を暗闇において、突然の短時間光照射を行っても位相変位が生じない時間帯が存在する。これを Dead zone (不応期) と呼ぶ。またこの時間帯には光入力情報を遮るゲート機構が存在する。このような環境光に対する不応時間は生体が環境の明暗周期に対して体内時計中枢を同期させるために必須であると考えられる。すなわち Dead zone を構成するゲート機構が存在しない場合、主観的昼の照射量や時刻に依存し、体内時計のシフト量が日々大きく変動する。よって環境の時刻を内部に蓄えるという体内時計の役割を果たさない。Dead zone の必要性については数理的シミュレーションにおいても体内時計が環境の明暗サイクルに対して同調するために必須の仕組みであると考えられている (Carpenter 1983)。このデッドゾーンがどのような仕組みで成り立っているのか、現象が知られてすでに 50 年以上が経過しているが、その分子機構に着いてはまだ謎である。また、光入力の視交叉上核へ至る経路のどこで情報の遮断が生じているのか (もちろん網膜レベルで遮断されている可能性もある。) についても未だ不明である。

2. 研究の目的

今回申請者は、現在までの体内時計研究で培った技術を用い、この位相依存性入力制御機構の問題について取り組みたいと考えている。遮断が生じる可能性のある領域は網膜内、網膜神経節細胞の細胞内情報伝達系、神経節細胞の興奮、視神経軸索による興奮伝達、軸索末端からの神経伝達物質 (現在、位相変位を生じる神経伝達物質はグルタミン酸と PACAP であることが知られている。) の放出、視交叉上核概日リズム発振細胞表面の受容体へのリガンドの結合、細胞内情報伝達系の活性化、エンハンサーの活性化、Per1/Per2 の誘導と、多数の過程を経てのち位相変位が生じる。よって、これらのすべての経路について検討を行い光照射情報の遮断が行われている部位の決定を第一の目的とする。また、入力遮断の仕組みを探索することが第二の目的である。また、第三の目的は視交叉上核のどの領域がゲート機構の位相を決定しているのかを明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 視交叉上核以外の部位、とくに網膜における光反応性についての検索
当初計画：網膜における光入力マーカー分子の探索から時刻依存性の情報入力の有無を検討する。さらにメ

ラノプシン含有細胞を抗体にてラベルし、二重染色免疫組織化学法を用いて、cFos タンパクを観察した。

Wistar ラットを用いて SCN のどの領域がゲートの位相範囲を決定するのかわかるためにゲートの位相シフトとどのような位相シフトの様相があるかを調べた。我々は、DMSCN および VLSCN を解離するために環境 LD サイクル (12:12 時間) を 10 時間突然遅らせたことを観察した。シフトの 1 日後、3 日後および 7 日後に、夜間に光に暴露した後の VLSCN における Per1 および cFos の誘導を調べる。

4. 研究成果

(1) 現在までに視交叉上核において、明瞭に Dead zone をとらえることに成功した。それをマーカー遺伝子、マーカー蛋白発現レベルで検出できた。マーカーとしてはまず Per1, Per2 遺伝子、PER1, PER2 蛋白を用いた。最近我々の教室で PER1, PER2 抗体を用いて視交叉上核におけるこれらの時計関連蛋白の発現を検出することに成功した。視交叉上核における光感受性をこのような多様なマーカー蛋白を用いて検討できる基本的な手法を確立できた。さらに光応答のマーカー遺伝子として cfos が Dead zone の検出においては有効であることを確認した。cfos の網膜内局在を in situ hybridization やその翻訳産物である cFOS を免疫組織化学法で検出することによって、概日リズムがいかんして網膜や視交叉上核の応答を制御しているかについての知見を得ることができた。

(2) 網膜の光照射による応答の検索について大きな進歩があった。網膜に対するメラノプシンなどの光応答関連遺伝子発現の局在を in situ hybridization 法や免疫組織化学法を用いて検討する系を確立した。これによって網膜における光照射後の網膜神経節細胞における cFOS 発現に位相依存性があることが発見された。cFOS の発現における Dead zone の存在も確認できた。この細胞は視交叉上核に投射する細胞であり、網膜のレベルで光入力が概日リズム位相依存性に制御されていることを示している。(しかし、視交叉上核におけるゲート機構の存在を否定するものではない。ゲート機構が視交叉上核と網膜の両者に併存すると考えられる。)

夜間の光暴露は、視交叉上核 (SCN) の概日リズムをシフトさせる。逆に、シフトは日中にはより小さく、位相反応曲線上では、シフトのための光信号がほぼ完全にゲート制御されるときに不感帯と呼ばれる期間が存在する。SCN は、網膜神経節ニューロンからの直接投影の存在を介して、腹側 (VLSCN) 領域と背側領域 (DMSCN) に分けられる。以前は、明暗 (LD) 周期の急激なシフトによって DMSCN と VLSCN の同期が失われることを以前に報告している。(Nagano et al. J. Neurosci. 2003)。本研究では、Wistar ラットを用いて SCN のどの領域がゲートの位相範囲を決定するのかわかるためにゲートの位相シフトとどのような位相シフトの様相があるかを調べた。我々は、DMSCN および VLSCN を解離するために環境 LD サイクル (12:12 時間) を 10 時間突然遅らせたことを観察した。シフトの 1 日

後、3日後および7日後に、夜間に光に暴露した後の VLSCNにおける Per1 および cFos の誘導を調べる。ZT12、ZT14、ZT16、ZT18、ZT20、ZT22、または ZT24 では、ラットのグループに 30 分間光を照射し、脳のサンプルを光の開始から 2 時間後に収集した。その結果、時差ぼけが残る状態、すなわち LD サイクルのシフト後一週間程度の間、SCN において Per1 および cFos が光によって誘導されない、すなわちゲート現象を検出した。さらに、ゲートはゆっくりと位相が変位した。シフト速度は DMSCN の概日クロックの位相シフト速度とよく一致した。この発見は、DMSCN が VLSCN に影響をおよぼしゲートの位相を決定することを示唆している。体内時計の注すである視交叉上核自身が、光入力の調節を強力に行っていることを明らかにしたものである。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

- ① Temperature-Amplitude Coupling for Stable Biological Rhythms at Different Temperatures. Gen Kurosawa^{1,2}, Atsuko Fujioka³, Satoshi Koinuma³, Atsushi Mochizuki, Yasufumi Shigeyoshi Plos Comp Biol in press (査読有り)
- ② Establishment of an in vitro cell line experimental system for the study of inhalational anesthetic mechanisms. Nagamoto S, Iijima N, Ishii H, Takumi K, Higo S, Aikawa S, Anzai M, Matsuo I, Nakagawa S, Takashima N, Shigeyoshi Y, Sakamoto A, Ozawa H. Neurosci Lett. 2016 Apr 4;620:163-168. doi: 10.1016/j.neulet.2016. (査読有り)
- ③ Real-Time Recording of Circadian Per1 and Per2 Expression in the Suprachiasmatic Nucleus of Freely Moving Rats. Yamaguchi Y, Okada K, Mizuno T, Ota T, Yamada H, Doi M, Kobayashi M, Tei H, Shigeyoshi Y, Okamura H. J Biol Rhythms. 2016 Feb;31(1):108-11. doi: 10.1177/0748730415621412. (査読有り)
- ④ Reduction of translation rate stabilizes circadian rhythm and reduces the magnitude of phase shift. Nakajima M, Koinuma S, Shigeyoshi Y. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 14;464(1):354-9. doi: 10.1016/j.bbrc. (査読有り)

- ⑤ Tissue-specific post-translational modification allows functional targeting of thyrotropin. Keisuke Ikegami, Xiao-Hui Liao, Yuta Hoshino, Hiroko Ono, Wataru Ota, Yuka Ito, Taeko Nishiwaki-Ohkawa, Chihiro Sato, Ken Kitajima, Masayuki Iigo, Yasufumi Shigeyoshi, Masanobu Yamada, Yoshiharu Murata, Samuel Refetoff, and Takashi Yoshimura Cell Reports 9, 1-9 November 6, 2014 (Selected for cover picture) doi:10.1016/j.celrep.2014.10.006 (査読有り)

[学会発表] (計 8 件)

- ① 世界時間生物学会
クロックマウスの視交叉上核は高振幅の概日リズムを発振する。
重吉 康史
2015 年 7/31-8/7 「マンチェスター (イギリス)」
- ② 生物リズムに関する札幌シンポジウム
Underlying entraining mechanism from outside to inside of the suprachiasmatic nucleus
Yasufumi Shigeyoshi, Satoshi Koinuma, Mamoru Nagano and Koh-hei Masumoto
2014 年 7/24-28 「北海道大学(札幌市)」
- ③ 全米時間生物学会
Dorsomedial region of the SCN determines the phase of the dead zone
Yasufumi Shigeyoshi
2014 6/12-19 「ビッグ・スカイ (米国)」

[図書] (計 2 件)

- ① Shigeyoshi, Y., Koinuma, S., Nagano, M. and Masumoto, K. (2015) Underlying entraining mechanism intrinsic to the suprachiasmatic nucleus. In "Circadian clocks", ed. by Honma, K. and Honma, S., 北海道大学出版会, pp. 177-186.
- ② Shigeyoshi, Y., Asakawa, T., Masumoto, K., Koinuma, S. and Nagano, M. (2014) Mechanism and modeling of circadian phase wave in the mammalian circadian center. In "Dynamics of circadian oscillation in the SCN", ed. by Honma, K., 北海道大学出版会, pp. 51-67.

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.kindai.ac.jp/anato2/>

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

池上 啓介 (IKEGAMI, Keisuke)

近畿大学・医学部・助教

研究者番号：10709330

筋野 貢 (SUJINO, Mitsugu)

近畿大学・医学部・助教

研究者番号：30460843