

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 24 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：26460284

研究課題名(和文) 体内時計中枢である視交叉上核における光入力制御に係わるゲート機構の解明

研究課題名(英文) The gating system of responses to light in the suprachiasmatic nucleus, the circadian center

研究代表者

長野 護 (NAGANO, Mamoru)

近畿大学・医学部・准教授

研究者番号：80155960

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類の視交叉上核における光入力制御に係わるゲート機構を検討した。その結果、ラット視交叉上核において光照射にて遺伝子誘導が生じる腹外側部のゲートの位相が背内側部によって規定されていることが明らかとなった。さらに、ラット網膜の神経節細胞層において昼間に光入力情報を抑制するゲート機構が存在することが示唆された。また、マウス視交叉上核においてもシェル領域により、光照射にて遺伝子誘導が生じるコア領域のゲートの位相が規定されていることが明らかとなった。さらに、マウス網膜においても昼間に光入力情報を抑制するゲート機構が存在することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)： We investigated the mechanisms of gating system of responses to light in the suprachiasmatic nucleus (SCN), mammalian circadian center. We got several new findings. (1) In the rat, the circadian oscillator in the dorsomedial SCN (DMSCN) determines the phase of the gate, which regulate responses to photic signal in the ventrolateral SCN (VLSCN). Then the gating system also locates in the retinal ganglion cell layer. (2) In the mouse, the circadian oscillator in the shell region within SCN also determines the phase of the gate in the SCN. In addition, the retinal gating system resides in the intrinsically photosensitive retinal ganglion cells (ipRGCs).

研究分野：医歯薬学

キーワード：視交叉上核 ゲート機構 網膜

## 1. 研究開始当初の背景

哺乳類の体内時計を環境の明暗周期に同期させるものは光であり、体内時計中枢である視交叉上核の概日リズムをシフトさせる最大の入力である。夜間の光照射では体内時計が発振する概日リズムの位相変位が生じるが、昼間の光照射ではほとんど変位が生じない。すなわち視交叉上核への光入力が抑制されており、ゲート機構が働いている。この機構は明暗条件下で体内時計の安定性の維持や環境の明暗サイクルへ同期するのに必須の機構であり、長年に渡り注目されている。この現象は、視交叉上核における最早期遺伝子 *c-fos* や時計遺伝子 *Per1*, *Per2* の発現が光照射によって生じない位相と連動しており、“どうして光照射によってこれらの遺伝子が誘導されないか”という問題に還元されている。しかし、このゲート機構の分子機序については今だ、明らかになっていない。

我々は、哺乳類の体内時計がこのゲート機構により環境の明暗周期を認識して、環境の明暗サイクルに同期することを明らかにした(Nagano et al. *Brain Res.* 2009)。また最近、視交叉上核の背内側部で時計遺伝子の発現に内側から外側へ位相波が生じ、ここにあられる位相差が日長時間の認識に重要な役割をもつことを明らかにした(Koinuma et al. *Eur J Neurosci.* 2013)。光入力は網膜からの投射がある腹外側部を介して背内側部に伝えられることから、腹外側部への光入力の変化は、位相波に影響をおよぼすことが推測される。したがって、視交叉上核での光入力を制御し光情報の流れの調節に係わるゲート機構は、生物が明暗環境に適応して生きていく上で必要不可欠のシステムであると思われる。

末梢時計は背内側部の位相変位に従うことが知られておりゲートが存在する候補部位は網膜、光受容を行うメラノプシン含有神経細胞が視交叉上核の概日リズム発振細胞

と形成するシナプス、視交叉上核内部の情報伝達系に絞られる。どの領域で光入力が遮断されているかという問題に対して形態学的手法を用いて取り組む。

## 2. 研究の目的

視交叉上核への光入力の抑制に係わる領域および制御する分子を解明して、光入力制御に係わるゲート機構の解明に取り組むものである。この機構解明のため、*in situ hybridization (ISH)* 法や免疫染色などの形態学的手法・組織培養での発光測定系や神経発火測定系を用いて解析を進める。まず視交叉上核におけるゲート位相を規定している領域を明らかにして、次にゲート機構が視交叉上核あるいは網膜にあるかを明らかにする。その後、視交叉上核への光入力抑制に係わる分子の検索に取り組み、視交叉上核における光入力制御に係わるゲート機構を明らかにするものである。

## 3. 研究の方法

### (1) ラットにおけるゲート機構の解明。

以前、我々は急激な明暗サイクルのシフトによりラット視交叉上核において背内側部と腹外側部間の内的脱同期が起こることを明らかにした。この系を用い、ラットにおけるゲートの位相を規定している領域の同定を行った。ラットを明暗サイクル(明期 12h 暗期 12h)で飼育した後、明暗サイクルを 10 時間後退および 6 時間前進させて新しい明暗サイクルの暗期で 2 時間おきに 30 分間の光照射後、明暗サイクルシフト後 7 日目までの脳を採取して視交叉上核における *c-fos*、*Per1* 遺伝子発現を経時的に観察した。

次に、恒暗条件下で 2 時間おきに 30 分間の光照射後、ラット網膜を採取して、*c-Fos* タンパク発現を経時的に観察した。

### (2) マウスにおけるゲート機構の解明。

マウスを明暗サイクル(明期 12h 暗期 12

h)で飼育した後、明暗サイクルを10時間後退させて明暗サイクルシフト後7日目まで2時間おきに脳を採取して視交叉上核におけるPer1遺伝子発現を経時的に観察した。次に、急激な明暗サイクルのシフトによりマウス視交叉上核においてもシェル領域とコア領域間の内的脱同期が生じることを確認し、この系を用いて、マウスにおいてこのゲートの位相は視交叉上核のシェル領域により規定されているかを検討した。マウスの明暗サイクルを10時間後退させて新しい明暗サイクルの暗期で2時間おきに30分間の照射後、明暗サイクルシフト後7日目までの脳を採取して視交叉上核におけるcfos、Per1遺伝子発現を経時的に観察した。次に、明暗サイクル(明期12h暗期12h)で飼育したマウス脳を4時間おきに採取して、視交叉上核におけるグルタミン酸受容体(AMPA受容体)の活性化の経時的な変動を検討した。さらに、恒暗条件下で2時間おきに30分間の照射後、マウス網膜を採取して、c-Fosタンパク発現を経時的に観察した。

#### 4. 研究成果

##### (1) ラットにおけるゲート機構の解明。

ゲート機構の機序の解明のため、ラットにおいて、ゲートの位相を規定している領域を検討した。ラットにおいて急激な明暗サイクルの変化により視交叉上核の腹外側部と背内側部を脱同期させた後、光による視交叉上核におけるcfos、Per1遺伝子発現の誘導を経時的に観察した。その結果、明暗サイクルを10時間後退させた時には、背内側部におけるPer1遺伝子発現サイクルの位相は1日約2時間の位相変位を示した。また、光による腹外側部でのcfos遺伝子発現誘導も同様な位相変位を示した。また、明暗サイクルを6時間前進させた時には、背内側部において明暗サイクルシフト後3日間はほとんど位相変位が認められなかったが、その後明暗サイクルを後退させた時よりもゆっくりとし

た位相変位が認められた。光による腹外側部でのcfos遺伝子発現誘導も同様な位相変位を示した。このことから、ラットにおいて光照射にて遺伝子誘導が生じる腹外側部のゲートの位相が背内側部によって規定されていることが明らかとなった。

次に、ラット網膜に光入力情報を抑制するゲート機構が存在するかを検討した。恒暗条件下で2時間おきに30分間の照射後、ラット網膜を採取して、cfosタンパクと遺伝子発現を観察した。その結果、1日間すべての時間でラット網膜の神経節細胞層において照射によるcfosタンパクと遺伝子発現細胞が認められたが、主観的明期と主観的暗期では陽性細胞数に差が認められた。特に、CT4~CT8において陽性細胞数の減少が認められた。このことから、ラット網膜において光入力情報を抑制するゲート機構が存在することが示唆された。

##### (2) マウスにおけるゲート機構の解明。

マウスにおいてもラットと同様に視交叉上核のシェル領域(ラットの背内側領域に相当する領域)によりゲートの位相が規定されているかを検討した。

マウスにおいては、コア領域(ラットの腹外側領域に相当する領域)とシェル領域間での明確な脱同期が報告されていない。そこで、我々は、明暗サイクルをシフトさせた時にマウス視交叉上核においてもコア領域とシェル領域の脱同期が生じるかを検討した。マウス(C57BL/6J)で明暗サイクルを10時間後退させて視交叉上核の吻側から尾側にわたりPer1遺伝子発現を経時的に観察した。その結果、明暗サイクルシフト後3日目ではPer1遺伝子発現のピーク位相がコア領域では約10時間シフトして、すでに新しい明暗サイクルに同期していたが、シェル領域では約6時間のみシフトして、まだ新しい明暗サイクルに同期していなかった。これらのこと

からマウスにおいても急激な明暗サイクルのシフト後、コア領域とシェル領域間での脱同期が生じることが明らかとなった。

次にマウスにおいてゲートの位相を規定している領域を検討した。マウスにおいて急激な明暗サイクルの変化により視交叉上核の腹外側部と背内側部を脱同期させた後、光による視交叉上核における *cfos*、*Per1* 遺伝子発現の誘導を経時的に観察した。その結果、明暗サイクルを 10 時間後退させた時には、背内側部における *Per1* 遺伝子発現サイクルの位相は 1 日約 2 時間の位相変位を示した。また、光による腹外側部での *cfos* 遺伝子発現誘導も同様な位相変位を示した。このことから、マウスにおいてもラットと同様に視交叉上核のシェル領域により光照射にて遺伝子誘導が生じるコア領域のゲートの位相が規定されていることが明らかとなった。

次に、マウス視交叉上核に投射していることが知られている網膜の網膜神経節細胞においてゲート機構が存在するかを検討した。まず、マウス視交叉上核におけるグルタミン酸受容体 (AMPA 受容体) の活性化を検討した結果、視交叉上核において AMPA 受容体の活性化は暗期に高く明期に低下していた。これはマウス網膜の網膜神経節細胞から視交叉上核におけるグルタミン酸の分泌あるいは AMPA 受容体の感受性に概日リズムがあることが示唆された。次に、恒暗条件下で 2 時間おきに 30 分間の光照射後、マウス網膜を採取して、*c-Fos* タンパク発現を観察した。その結果、網膜神経節細胞において明期に低く暗期に高い明瞭なリズムが観察された。これらの結果からはマウス網膜においても昼間に光入力情報を抑制するゲート機構が存在することが明らかとなった。

#### 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 1 件)

Atsuko Kubo, Mitsugu Sujino, Koh-hei Masumoto, Atsuko Fujioka, Toshio Terashima, Yasufumi Shigeyoshi and Mamoru Nagano

Profiles of Periglomerular Cells in the Olfactory Bulb of Prokineticin Type 2 Receptor-deficient Mice

Acta Histochem. Cytochem. 50 (2): 95-104, 2017

doi: 10.1267/ahc.17001

(査読有り)

[学会発表](計 6 件)

池上啓介、長野護、杉本典明、西郷和真、重吉康史

Gating mechanism of responses to light in murine inner retina.

第 23 回日本時間生物学会学術大会

2016 年 11 月 12, 13 日 名古屋大学

(愛知県・名古屋市)

長野護、池上啓介、重吉康史

An abrupt shift in the LD cycle causes desynchrony of core and shell in the mouse suprachiasmatic nucleus

第 22 回日本時間生物学会学術大会

2015 年 11 月 21, 22 日 東京大学

(東京都)

長野護、升本宏平、重吉康史

視交叉上核における光入力制御機構の局在

第 21 回日本時間生物学会学術大会

2014 年 11 月 8, 9 日 九州大学

(福岡県・福岡市)

Mamoru Nagano, Koh-hei Masumoto,

Yasufumi Shigeyoshi

Dorsomedial region of the SCN

determines the phase of dead zone.

Sapporo Symposium on Billogical

Rhythm

2014年7月26、27日 北海道大学

(札幌市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長野 護 (NAGANO, Mamoru)

近畿大学・医学部・准教授

研究者番号：80155960

(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

升本 宏平 (MASUMOTO, Kohei)

近畿大学・医学部・助教

研究者番号：60580529