

機関番号：34419

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590202

研究課題名（和文）体内時計の中核である視交叉上核における光シグナル伝達経路の形態学的解明

研究課題名（英文）Morphological approach to the photo signal transduction pathway of the circadian clock

研究代表者

長野 護（NAGANO MAMORU）

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：80155960

研究成果の概要（和文）：視交叉上核(SCN)におけるシグナル伝達経路を明らかにするために、SCN におけるペプチド産生細胞とその受容体を持つ細胞の局在を調べた。視交叉上核の腹外側部(VLSCN)にはVIP細胞が、背内側部(DMSCN)にはVIPの受容体であるVPAC2細胞の局在を認めた。また、DMSCNとVLSCNに分離したスライス培養に、VIPを投与するとDMSCNのみ位相に大きなシフトを認めた。以上の結果からVLSCNからDMSCNにVIPがVPAC2受容体を介して位相情報の伝達を行っていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：We investigated the photo signal transduction pathway in the suprachiasmatic nucleus (SCN), the mammalian circadian centers. By using in situ hybridization technique, we examined the localization of vasoactive intestinal peptide (VIP) mRNA and VPAC2 mRNA (one of the VIP receptors)- expressing neurons in the rat SCN. We found that VIP mRNA was strongly expressed in the ventrolateral SCN (VLSCN). In contrast, VPAC2 mRNA was strongly expressed in the dorsomedial SCN (DMSCN). Moreover, to investigate regional response to VIP, VIP administration to the SCN slice culture after isolation of DM from VL by a knife showed the large phase shift in only separating-DM. It is highly probable that VLSCN regulate the phase of DMSCN by VIP- VPAC2R. The findings suggest that VIP acting via the VPAC2 receptor is implicated as a key signaling pathway from VLSCN to DMSCN.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：視交叉上核、概日時計

1. 研究開始当初の背景

哺乳類においては、行動、摂食、睡眠などをはじめ、さまざまな生理機能は約24時間の概日リズムを示す。そして、視交叉上核はこ

の体内時計の中核であると考えられている。この視交叉上核（中枢時計）が何らかの同調シグナルを末梢へ伝達して末梢組織（末梢時計）のリズム位相を同調させるといった上位

からのシグナルに同調させる階層的な支配によって多様な生理機能を時間的に制御していると考えられている。

近年、概日リズム研究において *in vitro* 実験が盛んに行われた結果、概日リズム発振の分子機構は明らかになりつつある。しかし、体内時計が網膜からの光情報入力に同調し、環境の時間的変化への適応（入力系とリセッティング機構）や体内時計の中枢から体内の多様な生理現象の概日リズムの制御（出力系）については、いまだ不明な点が多く残されている。これらの残された疑問点を解決するためには、やはり、*in vivo* での形態学的手法を用いての詳細な解析が必要となる。我々は、形態学的手法を用いて、視交叉上核において、光反応領域から非光反応領域への光情報伝達が時間依存的に行われていること (Nagano et al. J. Neurosci. 2003) や視交叉上核は幾つかの異なった機能を有する領域から構成されていることを明らかにした (Masamoto et al. European J. Neurosci. 2005)。これらのことから視交叉上核は機能的に異なる領域よりなる細胞集団であると考えられる。そこで、視交叉上核の機能解析には、これら複数の機能領域をすべて明らかにした上で各領域間の伝達機構を解明しなければならない。しかし、この解析には、関連する分子の特定、詳細な細胞間の相互作用の検索など、多大な時間を要することから未だ明確な研究報告はない。我々は、視交叉上核における有益な Gene Chip のデータ (Ueda et al. Nature 2002) を取得しており、また的確に発現細胞の局在を捉えられる優れた形態学的な技術も習得している。更に、プロテオーム解析によりタンパクの網羅的な検出やタンパクのリン酸化の振動を検討することで視交叉上核の機能解析における大幅な時間短縮が可能となると考える。そこで、

これらの優れた情報と技術により、視交叉上核内において各領域の特定を試み、その後、細胞領域間の相互作用を検討することで、視交叉上核におけるシグナル伝達経路の解明に繋げていきたいと考えた。

2. 研究の目的

(1) 光シグナルに対する視交叉上核のリズム形成分子機構の解明。

網膜からの体内時計の中枢である視交叉上核のリズム形成分子機構への光シグナルの影響を明らかにするため、まず日長の変化に対する視交叉上核のリズム形成分子機構への影響を時計遺伝子である Per1, Per2 遺伝子発現をマーカーとして検討する。次に、哺乳類において、夜間の光照射により、視交叉上核の腹外側部にのみ Per1, Per2 遺伝子の発現誘導が生じる。それによって体内時計の分子フィードバックループの位相が変位すると考えられている。しかしながら、Per1, Per2 遺伝子の発現と光同調との関係は明らかにされていない。そこで、光同調メカニズムにおける Per1, Per2 の役割について明らかにするため、T-cycle を用いて、前進、あるいは後退を必要とする明暗条件を作り、その際の Per1, Per2 発現を観察する。これらの研究成果より光シグナルに対する視交叉上核のリズム形成分子機構の解明を行う。

(2) 視交叉上核の小領域間のシグナル伝達経路の解明。

視交叉上核の小領域間のシグナル情報の流れを明らかにするため、まず、視交叉上核において網膜からの投射がある腹外側部から投射のない背内側部へ作用する伝達物質を各領域における包括的遺伝子解析により同定し、視交叉上核背内側部に有意に高く発現している遺伝子を検索する。次に、視交叉上

核における領域間同期機構を検討するために、視交叉上核におけるペプチド産生細胞とその受容体を持つ細胞の局在を調べる。さらに、視交叉上核のスライス培養系を用いて細胞領域間の伝達様式の検索を行う。これらの研究成果より視交叉上核の小領域間のシグナル伝達経路の解明を行う。

(3) タンパクの網羅的な検出やタンパクのリン酸化の振動を検討するためのプロテオーム解析の確立。

生物時計の分子機構を明らかにする上で、実際に生物現象を担うものはタンパク質であることから、概日時計の位相に依存してリン酸化、脱リン酸化されるタンパクのプロテオーム解析の確立を目指す。

これらの研究を遂行することで、視交叉上核において入力系、振動体、出力系に関わる異なった機能を持った小領域を明らかにし、視交叉上核の小領域間の相互情報伝達を検討し、小領域間の情報の流れを解明する。その後、視交叉上核における各領域細胞間のネットワークを介しての入力系、振動体、出力系に関わる一連の機構を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 光シグナルに対する視交叉上核のリズム形成分子機構の解明。

日長の変化に対する視交叉上核のリズム形成分子機構への影響を検討するため、明期 12 時間、暗期 12 時間の明暗条件下で飼育したラットを明期 16 時間、暗期 8 時間の長日条件または、明期 8 時間、暗期 16 時間の短日条件下に移し、視交叉上核における Per1, Per2 遺伝子発現を経時的に Digoxigenin-in situ hybridization 法を用いて観察する。次に、光同調メカニズムにおける Per1, Per 2

の役割について明らかにするため、明期 12 時間、暗期 12 時間の明暗条件（ラットの概日リズム周期は 24 時間より長いので概日リズム周期の前進を必要とする明暗条件下）および明期 12.5 時間、暗期 12.5 時間の明暗条件（概日リズム周期の後退を必要とする明暗条件下）で飼育した時のラット視交叉上核における Per1, Per2 遺伝子発現を経時的に観察する。

(2) 光シグナルが視交叉上核のリズム形成分子機構に影響を及ぼすシグナル伝達経路の解明。

視交叉上核において網膜からの投射がある腹外側部と投射のない背内側部の各領域における Gene Chip による遺伝子解析を行い視交叉上核背内側部に有意に高く発現している遺伝子を検索する。次に視交叉上核は、腹外側部には VIP、GRP 産生細胞が、背内側部には AVP 産生細胞が局在している。そこで、これらの受容体である VIP 受容体 (VPAC2)、AVP 受容体 (V1a)、GRP 受容体 (GRPR) の局在を Digoxigenin-in situ hybridization 法を用いてラット視交叉上核において経時的に観察する。その後、微弱発光測定装置を用いて Per2:: luc トランスジェニックラットの視交叉上核全体および小領域に分離したスライス培養への受容体の作動薬投与による薬剤応答領域を検証し、視交叉上核内部における情報伝達経路の同定を行う。

(3) タンパクの網羅的な検出やタンパクのリン酸化の振動を検討するためのプロテオーム解析の確立。

まず細胞系を用いてプロテオーム解析を行う。C6 細胞は、デキサメサゾン投与後、約 1 週間続く概日リズムが転写レベルで見られることより、C6 細胞を用いて解析を行う。タ

ンパクのリン酸化は等電点の変化を生じるため 2D DIGE において横に並ぶいくつかのスポットとして捉えられ、さらにリン酸化タンパク特異染色や細胞の抽出物を phosphatase で処理後、2D DIGE を行うことで概日リズムの位相依存性にリン酸化されるタンパクを検出する。その後質量解析によりタンパクを特定する。そして、細胞系を用いてプロテオーム解析を確立した後、視交叉上核を対象として検索を行う。

4. 研究成果

(1) 光シグナルに対する視交叉上核のリズム形成分子機構の解明。

長日条件下において、背内側部の脳室近傍領域における Per1 遺伝子の発現開始が早まり、それより外側の領域では、発現の終了が遅くなっていた。また長日の1日目では、腹外側部の Per1 遺伝子の誘導時刻が早まったのに加え、背内側部の脳室近傍領域における Per1 遺伝子の発現開始も早くなった。このことから、長日条件においては光条件の変化に伴い、背内側部の Per1 発現が修飾され、発現ピーク時刻のずれおよび発現の延長をもたらしていることが示唆された。

次に、体内時計を前進させなければならない環境下では、明期の始めに視交叉上核の腹外側部に Per1 の強い発現を観察し、一方、後退させなければならない条件下では、明期の終わりから暗期の始めに、腹外側部に Per2 の強い発現が観察された。このことから、主に Per1 が位相前進に、Per2 が後退といった使い分けが生じていることが示唆された。

(2) 光シグナルが視交叉上核のリズム形成分子機構に影響を及ぼすシグナル伝達経路の解明。

視交叉上核において腹外側部と背内側部の

各領域における Gene Chip による遺伝子解析で、VIP の受容体である VPAC2 遺伝子など 10 種類の遺伝子が視交叉上核背内側部に有意に強く発現していた。さらに、in situ hybridization 法によって VPAC2 mRNA 発現細胞は視交叉上核背内側部および腹外側部内の背側領域に密に存在することを確認した。視交叉上核腹外側部には VIP が強く発現していることから、これらの実験結果は腹外側部から背内側部に VIP が VPAC2 受容体を介して位相情報の伝達を行っていることを示唆している。また、V1a mRNA 発現細胞は主に視交叉上核背内側部に強く発現し、明期に高く、暗期に低い顕著な遺伝子発現リズムが認められた。また、GRPR mRNA 発現細胞は腹外側部に密に局在した。これらの結果は、AVP と GRP 産生細胞はそれぞれ背内側部および、腹外側部における autocrine または paracrine 機構による細胞間情報伝達に関与していることが示唆された。次に、視交叉上核全体のスライス培養と背内側部と腹外側部に分離したスライス培養に、VPAC2 作用薬である VIP を作動させると視交叉上核全体および分離した腹外側部に比べて分離した背内側部の位相に大きなシフトが認められた。これは、上記の VIP 産生細胞が腹外側部から背内側部への情報伝達の関与を支持する結果である。

(3) タンパクの網羅的な検出やタンパクのリン酸化の振動を検討するためのプロテオーム解析の確立。

タンパクのリン酸化は等電点の変化を生じるため 2D DIGE において横に並ぶいくつかのスポットとして捉えられ、さらにリン酸化タンパク特異染色や細胞の抽出物を phosphatase で処理後、2D DIGE を行うことで概日リズムの位相依存性にリン酸化されるタンパクを検出できた。その後質量解析に

よりタンパクを特定した。その結果、C6 細胞においてElongation factor2 (EF2)のリン酸化に概日リズムがあることが明らかになった。これらの手法を用いることで比較的容易に概日時計の下流でリン酸化、脱リン酸化されるタンパクの検出が可能である。

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 3 件)

- ① Masumoto KH, Ukai-Tadenuma M, Kasukawa T, Nagano M, Uno KD, Tsujino K, Horikawa K, Shigeyoshi Y, Ueda HR.
Acute induction of Eya3 by late-night light stimulation triggers TSH β expression in photoperiodism.
Curr Biol. 20:2199-2206, 2010 査読有
- ② Nagano M, Adachi A, Masumoto KH, Elizabeth Meyer-Bernstein, Shigeyoshi Y
rPer1 and rPer2 induction during phases of the circadian Cycle critical for light resetting of the circadian clock.
Brain Res. 1289:37-48, 2009 査読有
- ③ Kumaki Y, Ukai-Tadenuma M, Uno KD, Nishio J, Masumoto KH, Nagano M, Komori T, Shigeyoshi Y, Hogenesch JB, Ueda HR.
Analysis and synthesis of high-amplitude Cis-elements in the mammalian circadian clock.
Proc Natl Acad Sci U S A. 105(39):14946-51, 2008 査読有

[学会発表] (計 3 件)

- ① 長野 護
視交叉上核における領域間同期機構の探索-ペプチド産生細胞の働き-
第 17 回日本時間生物学会学術大会
2010 年 11 月 21 日 東京
- ② 長野 護
視交叉上核における領域間カップリング機構-哺乳類体内時計中枢固有の位相情報伝達様式-
第 115 回日本解剖学会全国学術集会
2010 年 3 月 29 日 岩手
- ③ 長野 護

日長が視交叉上核背内側部の Per1 発現に及ぼす影響

第 15 回日本時間生物学会学術大会
2008 年 11 月 9 日 岡山

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長野護 (NAGANO MAMORU)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号: 80155960

(2) 研究分担者

重吉康史 (SHIGEYOSHI YASUFUMI)

近畿大学・医学部・教授

研究者番号: 20275192

藤岡厚子 (FUZIOKA ATUKO)

近畿大学・医学部・准教授

研究者番号: 30077664