

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 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：2012～2014

課題番号：24590306

研究課題名(和文)哺乳類中枢時計に存在する短周期領域の解析

研究課題名(英文)Analysis of the short period region in the mammalian circadian center

研究代表者

鯉沼 聡 (KOINUMA, Satoshi)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：10340770

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、視交叉上核サブ領域間の非同期時に内側部では24時間よりも短い周期が、外側部では24時間よりも長い周期が現れるという領域固有の周期の存在を見出してきた。短周期領域は位相波(内側から外側への時計遺伝子の連続的な発現)の起点であることや、位相波が日長時間の延長に反応することから、本課題ではこの領域の重要性に着目した。期間中に、短周期領域が尾側で拡張した構造をもつこと、他の領域に比して細胞密度が高いこと、さらにトランスクリプトーム解析、組織化学的解析によって短周期領域周辺に局限した分泌性因子を同定するとともに、光パルス型の位相反応曲線を得ることで視交叉上核での位相調節機能について明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We had artificially disrupted the intercellular coupling among oscillating neurons in the suprachiasmatic nucleus (SCN) and observed regional differences in the periods of the SCN. The period analysis had divided the SCN into two regions - a region with periods shorter than 24 h (short-period region, SPR) and another with periods longer than 24 h (long period region). In this project, we focused on the SPR, since an endogenous phase wave (a propagation of the clock genes expression from the medial region to the lateral regions) seemed to start from the SPR, and importantly, the phase wave responds to a light-dark cycle change. We obtained several findings as follows, (1) a distribution of the SPR expands caudally, (2) cells are more densely packed in the SPR. Further, through a transcriptome and in situ hybridization analyses, we identified a ligand with an expression confined to an area around the SPR. Since the light-pulse type PRC was induced, it is likely an endogenous SCN signal.

研究分野：時間生物学

キーワード：視交叉上核 概日リズム 位相波 Per2 ルシフェラーゼ

1. 研究開始当初の背景

生物に備わっている内因性リズムは、光による明暗（昼と夜）、運動など様々によって環境の 24 時間周期に同調する。この中で光はもっとも強い同調因子であり、哺乳類ではまず網膜を通して視床下部に存在する視交叉上核腹外側部に刺激が伝わり、背内側部の細胞は腹外側部の細胞からの信号を受け取ることで同期を果たしている。視交叉上核は生体の中樞時計として概日の周期でリズムを発振し、単一の神経細胞の段階ですでに概日リズムの振動を創出していることが示されている (Welsh et al. 1995, Neuron)。細胞やサブ領域のもつ固有周期は不均一だが、同調シグナルによって視交叉上核は多階層にわたって強固に同期が達成され、一定の周期を保っている。

一方、同期中の振動の位相は視交叉上核内において大きく異なっている。時計遺伝子 *Per2* は視交叉上核の内側部から外側部に向かって波状に位相をずらしながら発現することが観察されており、視交叉上核内に方向性を持つ位相波が存在している。しかし、現在、位相波の生理学的な意義については解明されていない。

我々はこれまでに、視交叉上核内の腹外側部に神経ペプチドである VIP が発現し、その受容体である *Vpac2* が相補的に背内側部に発現するという一方向性のシグナル伝達経路が存在することを明らかにした。さらに、VIP-*Vpac2* 系の二次情報伝達物質である cAMP は視交叉上核内の同期シグナルとして重要な働きを持つことが報告されている (O'Neil et al. 2008, Science)。

このような背景から、我々は続いて cAMP シグナルの擾乱が視交叉上核内のネットワークに与える影響について調べた。*Per2::luc* ラットの視交叉上核組織スライスに、cAMP シグナルを活性化するホルスコリンを持続的に作用させることで視交叉上核内側部にある位相波の起点部位に 21~23 時間ほどの短い周期を持つ領域が存在していることを見出した。特徴的なことは、同期状態の周期が約 24 時間であるのに対し、ホルスコリン添加によって視交叉上核の周期が 24 時間よりも短い周期を持つ領域と、長い周期をもつ 2 領域に分離したことである。

このことは、視交叉上核内のネットワークを遮断した際に顕在化する 2 領域の固有周期が 24 時間を中心に短い周期と長い周期が存在することを示す。すなわち、それぞれの領域が環境の 24 時間周期に同調するために、位相を後退、および前進させていることが示唆され、位相前進および後退する 2 つのタイミングで環境に適応していると考えられた。

一方、時計遺伝子 *Per2* 発現のピークは明暗周期 LD12:12 から LD18:6 の長日条件下に変更すると、明期の延長に対応して内側部から外側部への伝播時間も延長することを、ラットの *in situ hybridization* の予備実験によ

って確認している。このことは視交叉上核の測時機構が位相波形成と密接に関連していることを示唆している。

2. 研究の目的

本課題の目的は、視交叉上核において異なる周期をもつサブ領域についての解析を進めることで、視交叉上核内の小領域の性質を明らかにするとともに、各領域間の情報伝達によって構成される視交叉上核全体の概日リズムの発振機構を理解することである。最終的には異なる周期を持つ領域が組み合わさることによって、摂動や日長変化に対して頑健で、かつ柔軟に対応できるようなリズム発振機構を形成し得るのかどうか、について明らかにすることを目指している。

3. 研究の方法

視交叉上核における短周期領域の局在、および位相反応曲線を得るために、視交叉上核の冠状組織スライスを作製した。まず、*Per2::Luc* トランスジェニックラットの新生児 (P3~5) 脳から 1 個体につき 3~4 枚の 300 μ m 厚の冠状切片を作製し、視交叉上核領域を切り出した。組織をメンブレン上に静置し、200 μ M ルシフェリン存在下で冷却 CCD カメラおよび微量光測定装置によってタイムラプス観察をおこなった。得られた波形をデトレンド処理した後に sine フィッティングをおこない、視交叉上核スライスの周期を算出した。

これまでに視交叉上核の短周期領域を含む背内側領域と、腹外側領域のそれぞれにおけるトランスクリプトーム解析をおこなってきた。この結果から、新たに背内側領域において高発現を示す分泌性の因子を同定し、視交叉上核内での位相調節における機能を確かめた。位相反応曲線を作成するため、上記の組織切片に対して、さまざまな位相においてこの分泌タンパク質を作用させ、視交叉上核内の情報伝達経路を検討した。さらに、この分子の視交叉上核での局在を調べるために、dig 標識した RNA プローブを作製し、*in situ hybridization* によって発現領域を検索した。また、視交叉上核を構成する細胞の形態学的な特徴について調べるために樹脂包埋切片を作製した。

4. 研究成果

視交叉上核における短周期領域の配置
Per2::Luc トランスジェニックラット視交叉上核の吻尾方向に異なるレベルにおいて組織切片を作製し、それらを内外側に切り分けることで、相互の信号伝達を遮断した状態で発光リズムを測定し、それぞれの周期を算出した。これまでホルスコリンの化学的な作用によって顕在化した短周期領域が、視交叉上核を内外側に物理的に切断することによっても同様に内在の周期が現れるかどうかについて検討した (図 1A、B)。その結果、切

断した内側領域の周期は 24 時間未満だったのに対して外側領域の周期は 24 時間以上であり、化学的な視交叉上核の情報遮断と同様に、内側領域に周期の短い領域が存在することが明らかになった(図 1C、D)。

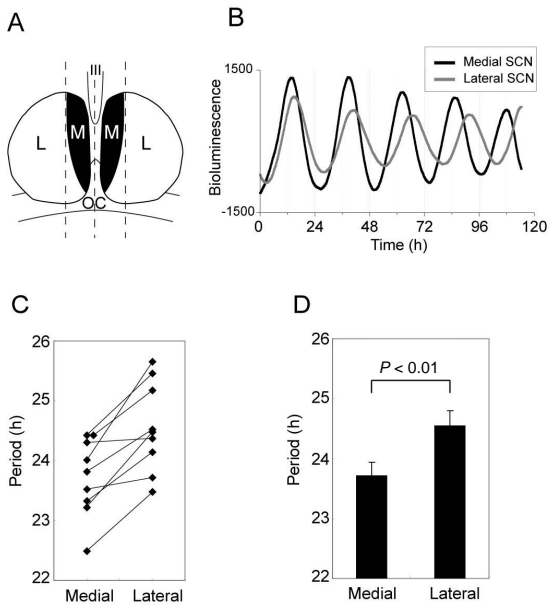


図 1 視交叉上核内外側領域の周期

また、吻尾方向に連続する 3 切片の周期を測定したところ、吻側から尾側に向かって 24.77 ± 0.21 h、 24.54 ± 0.12 h、 23.78 ± 0.50 h (いずれも $n=8$) と尾側で周期が短くなる傾向が観察され、短周期領域は尾側で拡張していることが示唆された。

短周期領域の形態学的解析

発光測定から得られた視交叉上核内の周期の差異が細胞の形態の違いとして特徴づけられるかどうかを調べるために、樹脂包埋した視交叉上核標本を作製した。視交叉上核を構成する細胞の形態や細胞密度に領域的な差が認められるかについて検討したところ、視交叉上核内の細胞密度は全体で一様ではなく、内側部においてより高密度に細胞が集積していることが観察された(図 2)。発光測定の結果から得られた短周期領域と細胞密度の高い領域が重複しているように観察されることから、今後、両者の関係性についての詳細な解析が必要である。

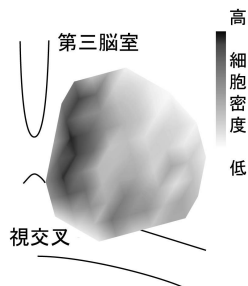


図 2 視交叉上核における細胞密度

視交叉上核内情報伝達

短周期領域を含む背内側領域と腹外側領域の DNA マイクロアレイによるトランスクリプトーム解析によって、SPR において限局した発現をもつような情報伝達系のシグナル分子を探索したところ、背側領域において腹側領域の 2 倍以上の発現を示す分泌性のタンパク質を同定した。その発現部位を in situ hybridization 法によって検索したところ、背内側の短周期領域と重なるように発現していることが明らかになった(図 3)。

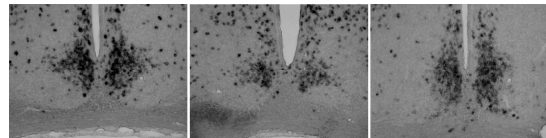


図 3 In situ hybridization による発現(左から右に吻側から尾側)

このタンパク質の SCN における機能を検討するために SCN スライス切片に、このリガンド分子を作用させ、位相反応曲線を作成したところ、光パルスタイプの位相反応を示した。今回、この因子の受容体については、発現領域を明確に同定できなかったが、リガンドの添加によって位相変位を生じることから、この因子が視交叉上核内在のシグナルとして位相調節に関連した機能を有していることが考えられた。また、発現領域との関連から短周期領域を特徴づける機能を持っていることも予想されるため、今後、拮抗薬を作用させた際の周期や位相波への影響を検討する予定である。

本課題の研究成果を基に論文報告をおこなった(雑誌論文)。

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)

Yoshihiko Fujita, Satoshi Koinuma, Marco A. De Velasco, Jan Bolz, Yosuke Togashi, Masato Terashima, Hidetoshi Hayashi, Takuya Matsuo, Kazuto Nishio
Melanoma transition is frequently accompanied by a loss of cytoglobin expression in melanocytes: A novel expression site of cytoglobin
PLoS One. 2014 Apr 10;9(4):e94772
doi: 10.1371/journal.pone.0094772
(査読あり)

Satoshi Koinuma, Takeshi Asakawa, Mamoru Nagano, Keiichi Furukawa, Mitsugu Sujino, Koh-Hei Masumoto, Yoshihiro Nakajima, Seiichi Hashimoto, Kazuhiro Yagita and Yasufumi Shigeyoshi
Regional circadian period difference in

the suprachiasmatic nucleus of the mammalian circadian center
European Journal of Neuroscience, Vol. 38, pp. 2832-2841, 2013
doi:10.1111/ejn.12308
(査読あり)

Mitsugu Sujino, Keiichi Furukawa, Satoshi Koinuma, Atsuko Fujioka, Mamoru Nagano, Masayuki Iigo, and Yasufumi Shigeyoshi
Differential entrainment of peripheral clocks in the rat by glucocorticoid and feeding
Endocrinology. 2012 May;153(5):2277-2286.
doi: 10.1210/en.2011-1794
(査読あり)

[学会発表](計12件)

升本宏平、長野護、鯉沼聡、筋野貢、重吉康史
視交叉上核から近傍脳領域への概日リズム伝達機構
第120回日本解剖学会総会・全国学術集会・第92回日本生理学会大会
2015年03月21日~23日
神戸国際会議場(神戸市)

鯉沼聡、郡宏、徳田功、八木田和弘、重吉康史
Limit cycle oscillator of the mammalian circadian rhythm ;
Characterization from computational and experimental approaches
第21回日本時間生物学会学術大会
2014年11月08日~09日
九州大学医学部 百年講堂(福岡市)

中嶋正人、鯉沼聡、重吉康史
Manipulating stability of the mammalian circadian clock
第21回日本時間生物学会学術大会
2014年11月08日~09日
九州大学医学部 百年講堂(福岡市)

升本宏平、長野護、鯉沼聡、筋野貢、重吉康史
Reproduction of the structure for the coherence between suprachiasmatic nucleus and other neighboring brain regions
第21回日本時間生物学会学術大会
2014年11月08日~09日
九州大学医学部 百年講堂(福岡市)

筋野貢、鯉沼聡、重吉康史
Analysis of PERIOD2::LUCIFERASE rhythms in the cultured

suprachiasmatic nuclei of Clock mutant mice
第21回日本時間生物学会学術大会
2014年11月08日~09日
九州大学医学部 百年講堂(福岡市)

鯉沼聡、郡宏、徳田功、八木田和弘、重吉康史
Experimental and mathematical analyses of limit cycle oscillators in mammalian cultured cells
生物リズムに関する札幌シンポジウム30周年記念集会
2014年07月25日~27日
北海道大学学術交流会館(札幌市)

鯉沼聡、郡宏、徳田功、八木田和弘、重吉康史
概日リズム発振培養細胞を用いた特異点の探索
第20回時間生物学会学術大会 サテライトシンポジウム"生物リズム現象の数理フロンティア"
2013年11月11日
近畿大学東大阪キャンパス(東大阪市)

升本宏平、長野護、鯉沼聡、筋野貢、重吉康史
視交叉上核と室傍核領域間の同調機構
第20回時間生物学会学術大会
2013年11月09日~10日
近畿大学東大阪キャンパス(東大阪市)

中嶋正人、鯉沼聡、重吉康史
哺乳類概日時計を構成する素反応への摂動が概日リズムの頑健性に与える影響の評価
第20回時間生物学会学術大会
2013年11月09日~10日
近畿大学東大阪キャンパス(東大阪市)

鯉沼聡、浅川剛、長野護、古河恵一、筋野貢、升本宏平、八木田和弘、重吉康史
視交叉上核における周期分布と位相形成
第19回日本時間生物学会学術大会
2012年09月15日
北海道大学学術交流会館(札幌市)

重吉康史、鯉沼聡、浅川剛、升本宏平、古河恵一、長野護、八木田和弘、橋本誠一
Regional difference in the endogenous period of circadian oscillators in the suprachiasmatic nucleus
Society for Research on Biological Rhythms
2012年05月21日
Sandestin Golf and Beach Resort, Destin, Florida (USA)

浅川剛、重吉康史、升本宏平、長野護、鯉沼聡

A mathematical model of the
suprachiasmatic nucleus as a multiple
oscillator system

Society for Research on Biological
Rhythms

2012年05月20日

Sandestin Golf and Beach Resort,
Destin, Florida (USA)

〔図書〕(計 1件)

重吉康史, 長野護, 升本宏平, 鯉沼聡
時間差を捉える哺乳類体内時計中枢 The
Mammalian Circadian Center Captures
Environmental Time and Time Length
顕微鏡 Vol. 47, No. 2 (2012)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鯉沼 聡 (KOINUMA, Satoshi)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号: 10340770

(2) 研究分担者

長野 護 (NAGANO, Mamoru)

近畿大学・医学部・准教授

研究者番号: 80155960