

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790073

研究課題名（和文）視交叉上核内局所神経回路の体内時計機能における生理的役割の解明

研究課題名（英文） Physiological role of SCN micro-circuit on circadian clock

研究代表者

山口 賀章（YAMAGUCHI YOSHIAKI）

京都大学・薬学研究科・助教

研究者番号：30467427

研究成果の概要（和文）：

私達は、体内に約24時間周期の時計を持つ。この体内時計は、ホルモン分泌、血圧、体温、代謝等のリズムを制御する。しかし、体内時計の周期は完全に24時間ではない。そのため日々、地球の自転に伴う24時間周期の明暗リズムに、自身の体内時計を合わせる必要がある。本研究において、私は、グルタミン酸受容体であるAMPA型受容体を活性化させると、マウスの概日行動の位相を変化させることを見出した。この成果を元に、種々の睡眠障害の改善や、夜間労働者の疾病への罹患予防に発展させたい。

研究成果の概要（英文）：

The glutamatergic neurotransmission in the suprachiasmatic nucleus (SCN) plays a central role in the entrainment of the circadian rhythms to environmental light-dark cycles. Although the glutamatergic effect operating via NMDAR is well elucidated, much less is known about a role of AMPAR in circadian entrainment. Here I show that in vivo microinjection of AMPA in the SCN during the early subjective night phase-delays the behavioral rhythm. These data demonstrate that activation of AMPAR is capable of phase-shifting the circadian clock both in vivo and in vitro, and are consistent with the hypothesis that activation of AMPA receptors is a critical step in the transmission of photic information to the SCN.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：体内時計、視交叉上核、グルタミン酸受容体、時計遺伝子、サーカディアンリズム

ム

1. 研究開始当初の背景

ヒトも含めほぼ全ての生物は、自身の体内に約 24 時間周期の固有の時計を持つ。この体内時計は、*Per1* 等の時計遺伝子の自律した転写翻訳リズムにより生み出され、ホルモン分泌、血圧、体温、代謝のリズムを制御する。しかし、体内時計の周期は完全に 24 時間ではない。そのため、私たちは日々、地球の自転に伴う 24 時間周期の明暗リズムに、自身の体内時計を合わせる必要がある。この調律作用を、体内時計の同調機能という。同調機能の失調は、睡眠障害や代謝障害など様々な疾病の原因となるため、その詳細なシグナル伝達機構の解明が待たれていた。

2. 研究の目的

同調機能も含め、体内時計を制御する最高位中枢は、脳の視交叉上核 (SCN) である。網膜に到達した光刺激は、メラノプシン神経節細胞を介し、直接 SCN に伝達される。この経路がグルタミン酸作動性であり、SCN の神経細胞が AMPA 型のグルタミン酸受容体を発現していることから、同調機能に AMPA 受容体シグナルの関与が示唆されていた。そこで私は、マウスの概日行動リズム並びに時計遺伝子の概日発現リズムを測定し、AMPA 受容体シグナルが体内時計の同調機能を担うかを検討した。

3. 研究の方法

赤外線センサーを用いて、マウスの概日行動リズムを測定した。マウスを常時真っ暗な状態 (恒暗条件下) で飼育すると、マウスの体内時計は約 23.6 時間周期であるので、その行動リズムは日々少しずつ前進していく (図 1)。マウスは夜行性であるため、恒暗条件下においては、その活動期を主観的夜と表現する。主観的夜の早い時間に光刺激を与えると、

以降のマウスの行動位相は 1~2 時間程度遅れる (図 1)。マウスは「既に夜になった」と思い行動を開始していたが、光があたると「実はまだ夕方、夜になっていなかったのだ！」と認識を改め、翌日からは 1~2 時間ほど遅れて (夜だと思ふ時間まで待って) から行動を開始する、と解釈されている。この背景をふまえ、私は恒暗条件下で、主観的夜の早い時間に、マウスの SCN に直接 AMPA を局所投与した。局所投与は、事前に SCN の直上に設置したカニューレを用いて、1 μ L の 250 μ M AMPA 溶液を 5 分間かけて行った。

また、主観的夜における光刺激は、マウスの SCN において、時計遺伝子 *Per1* の発現を誘導する。そこで、マウスの SCN に AMPA

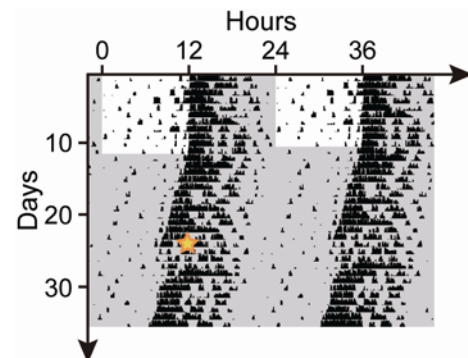


図 1 マウスの行動位相は、光刺激で変動する

マウスの行動量を、縦軸に日数、横軸に時刻を 2 日分とり示したもので、灰色は暗闇であることを示す。マウスは夜行性で、暗期に活動する。主観的夜の初期 (☆) に光をあてると、行動位相は後退する。

を直接局所投与することで、同様に *Per1* の発現を誘導するかを、³³P ラベルした *Per1* プロンプを用いて、in situ hybridization 法により検討した。

続いて、時計遺伝子 *Per1* の転写発現の概日リズムに対する AMPA 受容体シグナルの効果を検証した。*Per1* のプロモーターでルシフェラーゼを発現するトランスジェニックマ

ウスから SCN を取り出し、組織スライス培養系においてルシフェラーゼによる発光 (*Per1* の転写量を示す) をリアルタイムで検出し、種々の時間帯において、培地中に終濃度 5 μ M となるように AMPA を投与し、以後の *Per1* の転写振動リズムの位相の変化を解析した。

4. 研究成果

恒暗条件下で行動しているマウスの主観的夜の初期の時間 (マウスが行動を開始してから 2 時間後) に AMPA を SCN に局所投与した。すると翌日から、そのマウスの行動リズムの位相が、約 70 分間後退した。一方、生理食塩水 (Vehicle) を投与したマウスでは位相後退はみられなかった (図 2)。この AMPA 局所投与による位相後退は、AMPA 受容体のアンタゴニストの同時投与で消失した。また、時計遺伝子の *Per1* は、主観的夜の光刺激によって急激に発現が誘導されることが知られている。そこで私は、主観的夜の初期の時間に AMPA を SCN へ局所投与した。すると 1 時間後に、*Per1* の発現が急速に誘導された。

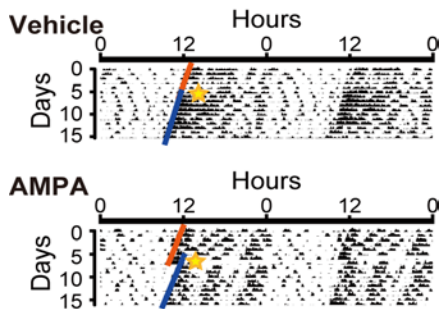


図 2 主観的夜の初期 (☆) に AMPA を SCN に局所投与すると、マウスの行動位相は後退する

続いて私は、*Per1* の転写発現の概日リズムに対する AMPA 受容体シグナルの効果を検証した。*Per1* のプロモーターでルシフェラーゼを発現するトランスジェニックマウスから SCN を取り出し、組織スライス培養系においてルシフェラーゼの発光 (*Per1* の転写量を示す) をリアルタイムで観察すると、その発光

量は約 24 時間周期で振動する (図 3)。この振動のピーク時点から 6 時間後 (主観的夜の初期に相当) に AMPA を投与すると、次の発光リズムの位相は約 3 時間後退した (図 3-A)。一方、ピーク時点から 14 時間後 (主観的夜の後期に相当) に AMPA を投与すると、位相は約 2 時間前進した (図 3-C)。さらに、AMPA 投与を様々な時刻において行い、AMPA 受容体活性化による時計遺伝子 *Per1* の発現リズムの位相-反応曲線を作製した (図 3-E)。この組織スライス培養系で得られた *Per1* の転写リズムの位相-反応曲線は、光刺激によるマウスの行動リズム変化の位相-反応曲線と極めて一致した。

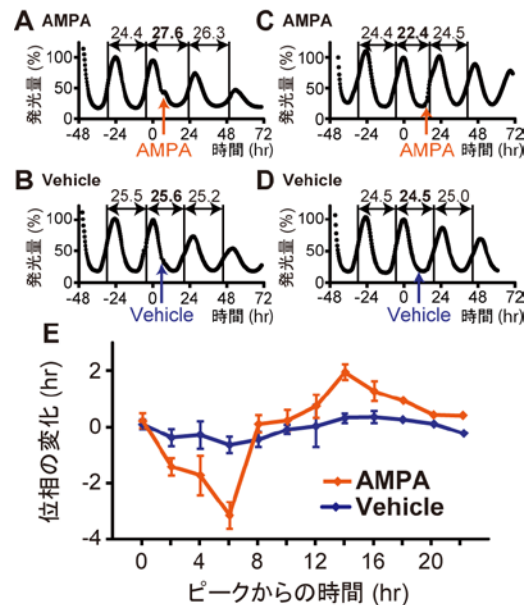


図 3 AMPA 刺激は、*Per1* 遺伝子発現の日周リズムを、位相依存的に変化

これらの実験結果から、外界の明暗リズムに自身の体内時計を合わせる同調機能の分子メカニズムにおいて、AMPA 受容体のシグナル経路が重要な役割を果たしていることがわかった。この研究成果は、SCN 内の同調機能における分子メカニズムを解明するのみならず、これまでは、単なる NMDA 受容体の補佐的機能を持つのみと考えられていた AMPA 受容体が、実はマウスの行動を規定

する、生理的に極めて重要な機能を有する因子であることを示すものであり、非常に獨創性に富んでいる。

平成13年度の厚生労働省の調査によると、15.6%もの一般労働者が深夜業に従事しており

(http://www.jil.go.jp/kisya/kkinjkatei/20020524_03_kj/20020524_03_kj_fhyou4.html)、この割合は近年増加の一途を辿っている。これに伴い、深夜業従事者の疾病リスク増加に関する研究報告が相次いでなされている。例えば、国際線客室乗務員はガン発症のリスクが高い。これは、自身の体内の「昼と夜」が外界の「昼と夜」と乖離し、SCNにおける時計遺伝子の発現リズムパターンが狂うからと考えられている。よって、AMPA受容体シグナルが体内時計の同調機能を担うことを示す本研究は、この経路を調節する薬剤が、夜間労働者の種々の疾病への羅漢を予防することを示唆するものである。私の今後の目標は、本研究で得られた知見に加え、更に他のSCN内シグナル経路の体内時計機能を明らかにすることで、深夜労働者の健康を守り、睡眠リズム障害の分子治療にアプローチすることである。

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7件)

①Okamura H, Doi M, Yamaguchi Y, Fustin JM. Hypertension due to loss of clock: novel insight from the molecular analysis of cry1/cry2-deleted mice. *Curr Hypertens Rep* **13**: 103-108 (2011). 査読有

②Sato M, Mizoro Y, Atobe Y, Fujimoto Y, Yamaguchi Y, Fustin JM, Doi M, Okamura H. Transportin 1 in the mouse brain:

Appearance in regions of neurogenesis, cerebrospinal fluid production/sensing, and circadian clock. *Journal of Comparative Neurology* **519**: 1770-1780 (2011). 査読有

③Doi M, Ishida A, Miyake A, Sato M, Komatsu R, Yamazaki F, Kimura I, Tsuchiya S, Kori H, Seo K, Yamaguchi Y, Matsuo M, Fustin JM, Tanaka R, Santo Y, Yamada H, Takahashi Y, Araki M, Nakao K, Aizawa S, Kobayashi M, Obrietan K, Tsujimoto G, Okamura H. Circadian regulation of intracellular G-protein signalling mediates intercellular synchrony and rhythmicity in the suprachiasmatic nucleus. *Nat Commun* **2**: 327 (2011). 査読有

④Okamura H, Doi M, Fustin JM, Yamaguchi Y, Matsuo M. Mammalian circadian clock system: Molecular mechanisms for pharmaceutical and medical sciences. *Advanced Drug Delivery Reviews* **62**: 876-884 (2010). 査読有

⑤Mizoro Y, Yamaguchi Y, Kitazawa R, Yamada H, Matsuo M, Fustin JM, Doi M, Okamura H. Activation of AMPA receptors in the suprachiasmatic nucleus phase-shifts the mouse circadian clock in vivo and in vitro. *PLoS One* **5**: e10951 (2010). 査読有

⑥Tanioka M, Yamada H, Doi M, Bando H, Yamaguchi Y, Nishigori C, Okamura H. Molecular clocks in mouse skin. *Journal of Investigative Dermatology* **129**: 1225-1231 (2009). 査読有

⑦Nishinaga H, Komatsu R, Doi M, Fustin JM, Yamada H, Okura R, Yamaguchi Y, Matsuo M, Emoto N, Okamura H. Circadian expression of the Na⁺/H⁺ exchanger NHE3 in the mouse renal medulla. *Biomedical Research* **30**: 87-93 (2009). 査読有

[学会発表] (計1件)

①山口賀章, 溝曾路祥孝, 岡村 均, AMPA 受容体シグナルによる体内時計調節機構、第60回 日本薬学会近畿支部総会・大会、2010年10月30日、摂南大学

[図書] (計1件)

①山口賀章, 岡村均. 【季節変動と日内変動】体内時計とは? 体内時計について教えてください. *Q&A でわかる肥満と糖尿病* **9**: 197-199 (2010)、丹水社

[その他]

ホームページ等

<http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/system-biology/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 賀章 (YAMAGUCHI YOSHIAKI)

京都大学・薬学研究科・助教

研究者番号：30467427

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：