

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06422

研究課題名（和文）中枢時計視交叉上核におけるシナプス伝達の機能的性質と役割の解明

研究課題名（英文）Elucidation of a functional role of synaptic transmission in the central circadian clock, the suprachiasmatic nucleus

研究代表者

前島 隆司（Maejima, Takashi）

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：70399319

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：概日リズム形成の中枢時計として機能する視交叉上核（SCN）において、背内側に存在するバゾプレッシン産生GABA作動性神経細胞からのGABA伝達の性質と機能的役割について研究を行った。そのGABA放出確率は、昼に高く、夜に低い日内変動を示すことが明らかになり、さらにそのGABA伝達は、SCN回路の神経活動を概日リズムの適切な時間帯に限定させ、マウスの活動期と休息期を設定する役割を持つことが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

視交叉上核（SCN）におけるAVP産生神経細胞は、GABA伝達を介してSCN回路の神経活動を制御し、概日リズムにおける休息期と活動期の時間帯を設定するタイマー的な役割を果たすことが示された。この制御機構は、季節によって変化する昼夜の長さに合わせて、動物の体内時計を調節するSCNの回路機能と関連する。そのため、本研究で得られた知見は、季節性情動障害や概日リズム睡眠障害の予防と治療法の創出につながるものと期待できる。

研究成果の概要（英文）：We investigated the characteristic and functional role of GABA transmission from vasopressin-producing GABAergic neurons located in the dorsomedial region of the suprachiasmatic nucleus (SCN), which functions as a central clock for circadian rhythm formation. It has been revealed that the GABA release probability showed diurnal variation, which was high during the day and low at night. Furthermore, the GABA transmission has been shown to play a role in setting mouse's active and resting periods by restricting the neural activity in the SCN circuit to appropriate time windows of the circadian rhythm.

研究分野：神経生理学

キーワード：概日リズム 中枢時計 視交叉上核 GABA作動性伝達

1. 研究開始当初の背景

人を含む哺乳類は、多くの生物と同様、地球の自転に伴う 24 時間周期の環境変化に適応し、明暗サイクルをもとに活動期と休息期を設けて生活している。身体の各生理機能も行動様式に対応した調節がなされ、1 日を 1 周期とする変化、すなわち概日リズムを示す。哺乳類においては、脳の視床下部に存在する視交叉上核 (Suprachiasmatic nucleus : SCN) がそのような概日リズムを制御する中枢時計として機能する。SCN で作られた時刻情報は、神経接続と内分泌を介して全身に配信され、睡眠・覚醒の切り替えを促し、体内の各組織に存在する末梢時計を調節して、身体機能に時間的秩序をもたらしている。SCN は、共発現する神経ペプチドによって分類される複数種の GABA 作動性神経細胞で構成されている。主要な神経群としてアルギニンバゾプレッシン (AVP) を発現する群と血管作動性腸管ペプチド (VIP) を発現する群があり、それぞれ SCN の背内側と腹外側に分布している。SCN の個々の神経細胞は、時計遺伝子の転写翻訳ループにより自律的に概日リズムを生じるが、回路の構築によってそれらの振動体が組織化されることで一つの安定した時間情報が生成される。そして、その中には外界の明暗サイクルに対するリズム同調機構 (周期と位相の調節、昼夜の長さの符号化) が組み込まれている。しかしながら、これらの機能を発現させる SCN 回路の作動原理は十分に解明されていない。

2. 研究の目的

これまでに AVP や VIP などの神経ペプチドとその受容体について研究がなされ、時計遺伝子の発現や神経細胞の電気的活動に対し固有の作用をもつことが明らかになってきた。そのため同じペプチドを発現する細胞群をひとつの機能単位 (モジュール) とみなし、それら複数のモジュールによって構成される SCN の回路モデルが提案されている。当研究室においては AVP を発現する神経群 (AVP 神経) に着目し研究を行ってきた。先行研究では、AVP 神経特異的に時計遺伝子 *Bmal1* を欠損させた遺伝子改変マウス (AVP-*Bmal1*^{-/-}マウス) を解析し、AVP 神経は概日リズムの周期調節、個体の活動時間帯の制御、及び AVP 神経間の同調作用という機能的役割を果たすことを見出している。また、他の研究者による AVP 受容体欠損マウスの解析から、AVP ペプチドを介するシグナル伝達は、神経間の同調性を高め、外乱に抗して概日リズムの位相を維持する作用を持つことが示されている。このように神経ペプチドの機能解析が進む一方で、GABA 伝達の役割については、複数の先行研究がなされてきたものの明確な結論を得るには至っていない。その理由として、GABA が SCN 内の神経細胞に共通した伝達物質であり、ペプチドで分類される神経のタイプを考慮した解析がなされていなかった点あげられる。そこで本研究では、AVP 神経の GABA 伝達に着目し、その機能的性質と概日リズム形成に関わる機能的役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

実験では AVP 神経からの GABA 伝達を遮断した条件での機能変異を解析するため、シナプス小胞に GABA を取り込む作用を持つ「小胞体 GABA トランスポータ (Vgat)」を、Cre-loxP 遺伝子組み換え法により AVP 神経のみから特異的に欠損させた遺伝子改変マウス (AVP-*Vgat*^{-/-}マウス) を作成した。以下に記載するように、この改変マウスを用いて、脳スライス標本における電気生理学的解析と時計遺伝子発現解析、さらに生体マウスにおける細胞内カルシウム測定と電気的な神経活動計測を行った。

4. 研究成果

(1) GABA シナプス伝達の日内変動

まず SCN における GABA シナプス伝達について電気生理学的解析を行った。実験ではスライスパッチクランプ法を用い AVP 神経または非 AVP 神経から微小 GABA 作動性シナプス後電流 (mGPSC) を記録した (図 1)。日内リズムを調べるため、昼間と夜間に記録を行った。AVP-*Vgat*^{-/-}マウスにおいて mGPSC の発生頻度と振幅の関係を解析したところ、対照マウスと比較して昼の時間帯の記録においてのみ mGPSC の発生頻度が著しく減少することが見出された。また、振幅の小さい mGPSC が特異的に減少するという結果から、AVP 神経が作るシナプスは他のタイプの神経細胞が作るシナプスとは機能的に異なった性質をもつことが推察された。ま

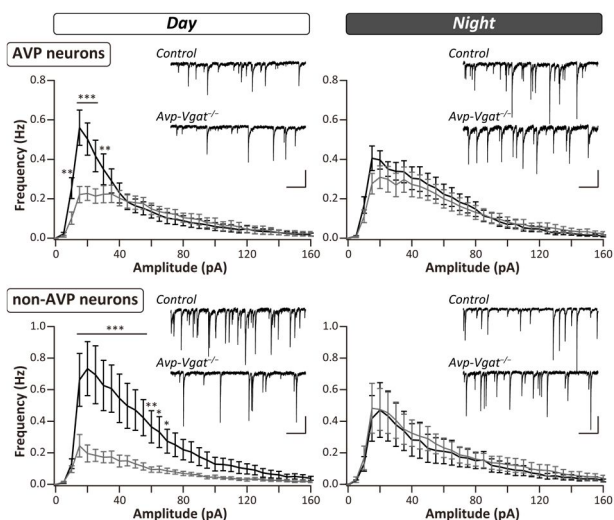


図 1. 微小 GABA シナプス後電流 (mGPSC) の解析
AVP-*Vgat*^{-/-}マウス (薄い線) では、記録した細胞種を問わず、昼間の記録において mGPSC の発生頻度が減弱した。

た、mGPSC の発生頻度はシナプス小胞の放出確率を反映するパラメータであるため、AVP 神経の軸索終末において昼の時間帯にシナプスの伝達効率を増大させる分子機構が働いていることが示唆された。

(2) AVP-Vgat^{-/-}マウスのフリーランリズム

次に AVP-Vgat^{-/-}マウスの自発性行動の概日リズムを解析した。明暗(12h:12h)サイクル下では、AVP-Vgat^{-/-}マウスは対照マウスと同様に、明期から暗期に切り替わる頃に行動を開始し、暗期から明期に転じる頃に行動を終了させた(図2)。しかしながら、対照マウスに比べその行動開始時刻は約50分早く、終了時刻は約1時間半遅くなっていた。そのため、活動時間が約2時間半延長した。この変異はマウスを恒暗条件下に置いた時にはより一層顕著になり、行動開始時刻はさらに前進し、終了時刻は後退して、最終的に活動時間が5時間半ほど延長した。しかし興味深いことに、フリーランリズムの周期は対照マウスと差が見られなかった。この結果は、AVP-Bmal1^{-/-}マウスにおいてフリーランリズムの周期と行動時間の両方が延長した結果とは対照的であり、AVP 神経からの GABA 伝達は行動時間帯の長さを制御する特異的な役割を持つことが示唆された。なお、アデノ随伴ウイルスベクターを用い AVP-Vgat^{-/-}マウスの SCN に Vgat 遺伝子を再導入すると、概日リズムは正常なリズムに回復した。つまりこのような概日リズムの制御には SCN 内の AVP 神経が特異的に関わっていることを示している。

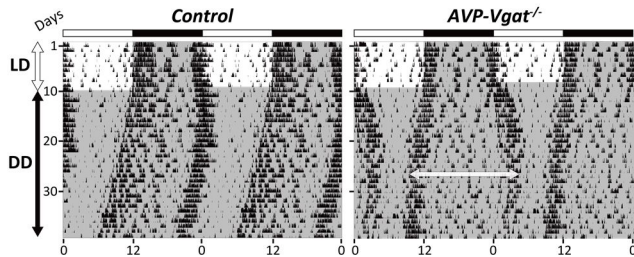


図2. マウスの自発行動リズム
AVP-Vgat^{-/-}マウスのフリーラン行動リズム(右パネル)。周期は変化せず、行動時間帯が約5時間半延長した(矢印)。

(3) 時計遺伝子発現の概日リズム

AVP-Vgat^{-/-}マウスの行動リズムが変異するため、GABA 伝達の欠損によって SCN 回路に機能変異が起きていることが考えられる。そこで、時計遺伝子の発現、細胞内カルシウム濃度、電気的神経活動の概日リズムを調べていった。まずスライス培養標本において、生物発光アッセイを用いた Per2 時計遺伝子のリアルタイム計測を行った(図3)。実験前にマウスを2週間以上恒暗下におき、フリーラン中の SCN における遺伝子発現リズムを調べた。当初の予想とは異なり、AVP-Vgat^{-/-}マウスにおける Per2 の発現リズムは対照マウスとほとんど差がなく、周期、振幅、背側-腹側部の位相関係について変化がなかった。しかしながら、ピーク位相が対照マウスに比べ約2時間遅れていることが認められた。この実験ではマウスの行動開始時刻を基準にして脳を摘出しているため、このピーク位相の差は、時計遺伝子の概日リズムと行動リズムの位相が乖離していることを示している。この結果から AVP 神経の GABA 伝達の欠損は時計遺伝子発現の概日リズムには影響を与えず、行動時間に変化をもたらすことが示唆された。

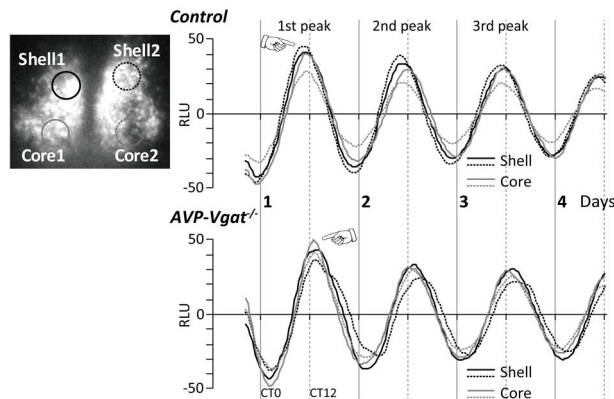


図3. 生物発光を用いた Per2 遺伝子の発現リズム解析
AVP-Vgat^{-/-}マウスの Per2 発現リズムは対照マウスと比べ位相が遅れている(矢印)。これはマウスの行動開始時刻が Per2 リズムに対して早まっていることを意味する。

(4) 細胞内カルシウム動態の概日リズム

次に *in vivo* ファイバーフォトメトリー法を用い AVP 神経のカルシウム動態とマウスの自発行動量を同時計測し、その相関関係を調べた。この手法は、蛍光カルシウムプローブ GCaMP を遺伝子導入した細胞に、脳内に埋め込んだ光ファイバーを介して励起光を当て、それによって発生した蛍光を検出して細胞内カルシウム濃度の変化を観測する方法である。AVP-Vgat^{-/-}マウス及び対照マウスともに、そのカルシウム動態は約24時間の周期で変移し、暗期の後半から上昇し始め、日の出の頃にピークが来る位相の日内リズムを示した。明暗サイクル下では AVP-Vgat^{-/-}マウスのピーク位相は約2時間遅れていたものの、恒暗下では対照マウスの位相が後退して互いに一致した。このようにカルシウム動態の日内リズムに差が無くなったにもかかわらず、上に述べたように AVP-Vgat^{-/-}マウスの行動リズムは大きく異なっていた。つまり、この実験から AVP 神経群のカルシウム動態はマウスの行動時間と相関するパラメータではないことが示された。

(5) SCN 回路における電気活動の概日リズム

in vivo マルチユニット記録法 (MUR) を用い、SCN 回路の電気活動とマウスの自発行動量を同時計測した。ここで用いた MUR は、2 本の記録電極 (100 μ m) を束ね、その先端を SCN に刺入し、細胞の活動電位に由来する細胞外の微弱な電位変化を観測する方法である。しかし、電極の先端径が大きい為、その応答は複数の細胞の活動に由来するものとなる。げっ歯類では、一部の例外を除き、夜行性・昼行性を問わず、SCN の回路は夜に比べ昼の時間帯に電気的活動を高めることが分かっている。対照マウスでは、確かに行動リズムとは逆位相の昼間に電気的活動が増加する単峰性の概日リズムが観察された (図 4)。しかし非常に興味深いことに、*AVP-Vgat*^{-/-} マウスでは夜間にも神経活動のピークが現れた。恒暗条件下ではさらに顕著になり、主観的昼と夜に同程度のピークができる二峰性の日内リズムを生じることが分かった。注目すべきことに、マウスの行動はその電気活動が低下するリズムの谷間に起きることが観察された。

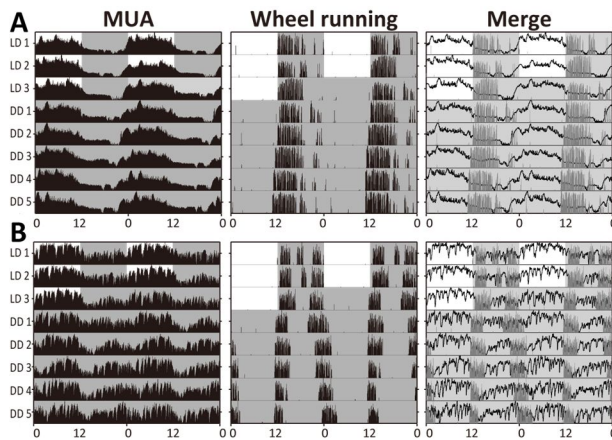


図 4 . *in vivo* マルチユニット記録
SCN 回路の神経活動 (MUA) と輪回し行動 (Wheel running) の概日リズム。対照マウス (A) は単峰性、*AVP-Vgat*^{-/-} マウス (B) は二峰性の MUA リズムを示した。そのリズムの谷間にマウスが行動していることがわかる (Merge)。

(6) 体内時計のオン・オフタイマー設定機構

以上のように、遺伝子工学的手法により SCN の背内側部に局在する AVP 神経から GABA 伝達を欠損させた条件を作り、マウスの概日リズムと SCN 回路の分子機構に生じる変異を解析した。SCN における時計遺伝子の発現は正常と同様な概日リズムを維持したが、電気的活動は昼と夜にピークができる二峰性のリズムを生じ、マウスの行動はそのリズムの谷間に起きることが観察された。これらの事から、AVP 神経は GABA 伝達を介して SCN 回路の電気的活動を制御し、細胞時計の概日リズムに即して適切な時間帯に動物の行動を「オン オフ」と切り替えるように作用するタイマー的な役割を担っていると考えられた。本研究により AVP 神経の GABA 伝達の機能的役割が示されたものの、未だその作用機序は十分に解明されたとは言えない。特に、SCN 回路の電気的活動が GABA 伝達の有無で単峰性から二峰性に変調される仕組みは非常に興味深い。これは、季節によって変化する昼と夜の長さを符号化し、動物の活動時間帯を調整する機能と関連するものと考えられる。今後正常マウスの回路において GABA 作動性伝達の日内リズムがその制御メカニズムとどのようにかわるか研究を進展させたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Islam Md Tarikul, Maejima Takashi, Matsui Ayako, Mieda Michihiro	4. 巻 15
2. 論文標題 Paraventricular hypothalamic vasopressin neurons induce self-grooming in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13041-022-00932-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Islam Md Tarikul, Rumpf Florian, Tsuno Yusuke, Kodani Shota, Sakurai Takeshi, Matsui Ayako, Maejima Takashi, Mieda Michihiro	4. 巻 32
2. 論文標題 Vasopressin neurons in the paraventricular hypothalamus promote wakefulness via lateral hypothalamic orexin neurons	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 3871 ~ 3885
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cub.2022.07.020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Roboon Jureepon, Hattori Tsuyoshi, Nguyen Dinh Thi, Ishii Hiroshi, Takarada-Iemata Mika, Kannon Takayuki, Hosomichi Kazuyoshi, Maejima Takashi, Saito Kengo, Shinmyo Yohei, Mieda Michihiro, Tajima Atsushi, Kawasaki Hiroshi, Hori Osamu	4. 巻 16
2. 論文標題 Isolation of ferret astrocytes reveals their morphological, transcriptional, and functional differences from mouse astrocytes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fncel.2022.877131	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tsuno Yusuke, Peng Yubo, Horike Shin-ichi, Yamagata Kanato, Sugiyama Mizuki, Nakamura Takahiro J., Daikoku Takiko, Maejima Takashi, Mieda Michihiro	4. 巻 -
2. 論文標題 AVP neurons act as the primary circadian pacesetter cells in vivo	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2022.08.04.502742	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tsuno Yusuke, Peng Yubo, Horike Shin-ichi, Wang Mohan, Matsui Ayako, Yamagata Kanato, Sugiyama Mizuki, Nakamura Takahiro J., Daikoku Takiko, Maejima Takashi, Mieda Michihiro	4. 巻 21
2. 論文標題 In vivo recording of suprachiasmatic nucleus dynamics reveals a dominant role of arginine vasopressin neurons in circadian pacesetting	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLOS Biology	6. 最初と最後の頁 e3002281
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pbio.3002281	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ohno-Shosaku Takako, Yoneda Mitsugu, Maejima Takashi, Wang Mohan, Kikuchi Yui, Onodera Kaito, Kanazawa Yuji, Takayama Chitoshi, Mieda Michihiro	4. 巻 532
2. 論文標題 Action Sequence Learning Is Impaired in Genetically Modified Mice with the Suppressed GABAergic Transmission from the Thalamic Reticular Nucleus to the Thalamus	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Neuroscience	6. 最初と最後の頁 87 ~ 102
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuroscience.2023.09.019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Onodera Kaito, Tsuno Yusuke, Hiraoka Yuichi, Tanaka Kohichi, Maejima Takashi, Mieda Michihiro	4. 巻 13
2. 論文標題 In vivo recording of the circadian calcium rhythm in Prokineticin 2 neurons of the suprachiasmatic nucleus	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-44282-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 前島隆司、津野祐輔、宮崎翔太、恒岡洋右、長谷川恵美、イスラムタリクル、榎木亮介、中村孝博、三枝理博
2. 発表標題 視交叉上核におけるバゾプレッシン産生細胞のGABA作動性神経伝達により中枢概日時計は動物の行動する時間帯を設定する
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------