

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19255

研究課題名（和文）哺乳類の昼行性・夜行性を決定する神経メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of the neural mechanisms that determine diurnal and nocturnal behavior in mammals

研究代表者

小野 大輔（Daisuke, Ono）

名古屋大学・環境医学研究所・講師

研究者番号：30634224

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000 円

研究成果の概要（和文）：概日時計の中核である視交叉上核から、睡眠・覚醒の行動への出力を考えた際、昼行性・夜行性動物では行動の時間帯が昼夜逆転しているにも関わらず、視交叉上核の神経活動は、同じように昼間に高まる事が知られている。本研究では、様々なイメージング技術を組み合わせ、昼行性・夜行性行動を担う神経メカニズムを明らかにすることを目的とする。これまでの所、発光イメージングツールの開発を通じ、特定の神経活動の計測が可能である事を検証した。しかし、昼行性・夜行性行動決定するメカニズムまでには至っていない。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現代社会において、24時間いつでも活動する事ができるようになった一方、睡眠障害を抱える人が年々増えてきている。いかにして概日時計のペースメーカーを整えるか、またそこからの出力を調節できるかが、睡眠障害を治療する上で重要な点となる。動物の昼行性・夜行性メカニズムを明らかにする本研究は、これらの多くの問題を解決する糸口になる可能性がある。本研究からこれらの新たな治療法の開発が期待される。

研究成果の概要（英文）：When considering the output from the suprachiasmatic nucleus to sleep-wake behavior, it is known that neural activity in the suprachiasmatic nucleus is enhanced during the daytime, even though the time zones of behavior are reversed between day and night in diurnal and nocturnal animals. This study aims to clarify the neural mechanisms responsible for diurnal and nocturnal behavior by combining various imaging techniques. So far, we have verified that it is possible to measure specific neural activities through the development of bioluminescence imaging tools. However, the mechanisms that determine diurnal and nocturnal behavior have not yet been elucidated.

研究分野：時間生物学

キーワード：概日リズム 神経回路 行動リズム 視交叉上核

1. 研究開始当初の背景

哺乳類では、睡眠・覚醒は約24時間ごとに繰り返され、この24時間周期のリズムを「概日リズム」と呼ぶ。また、脳内視床下部の「視交叉上核」が概日時計の中核として生体機能の時間的統合を行う (Ono et al., 2013 Nature Communications.; Ono et al., 2016 Science Advances)。概日時計の中核である視交叉上核から、睡眠・覚醒の行動への出力を考えた際、昼行性・夜行性動物では行動の時間帯が昼夜逆転しているにも関わらず、視交叉上核の神経活動は、同じように昼間に高まる事が知られている。つまり視交叉上核は、24時間のリズムを刻むペースメーカーとして機能し、その時間情報は脳内の神経回路を介して、昼夜反転することで、睡眠・覚醒のタイミングが調節されていると推測される。しかし、時刻情報変換に関わる神経回路は未同定のまま今日に至っている。申請者はこの問題に取り組み、視交叉上核の出力経路の探索を進めてきた (Ono et al., 2019 Commun. Biol., 責任著者)。その結果、視交叉上核の GABA が、室傍核 CRF 神経を昼間に抑制する事で、覚醒を調節している事を発見した (Ono et al., 2020 Science Advances, 責任著者)。

2. 研究の目的

本研究では、様々なイメージング技術を組み合わせ、昼行性・夜行性行動を担う神経メカニズムを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

特定の神経活動計測のため、発光タンパク質を用いたカルシウムプローブ (Okiluc-CaM) を開発した。この発光プローブの機能検証を行うため、視交叉上核に Okiluc-CaM を発現させ、同時に光感受性陽イオンチャネルである SSFO を発現させた。これにより、発光カルシウムプローブの機能検証を行った。

同時に、発光タンパク質を用いた cAMP プローブ開発 (Okiluc-aCT) も行った。上記同様に視交叉上核に Okiluc-aCT を発現させ、発光強度を計測する事で視交叉上核内の cAMP 濃度のリアルタイム計測を行った。同時に蛍光カルシウムプローブを発現させ、細胞内 cAMP およびカルシウムの同時計測を行い、その違いを検証した。

視交叉上核からの神経伝達の可視化を行うため、ペプチドイメージングプローブ (GRAB-VIP1.0) を視交叉上核に発現させた。これにより、視交叉上核からの神経ペプチドである VIP の放出リズムの有無を検証した。

マウスの行動リズムを夜行性から昼行性にシフトさせるためのいくつかの実験系をセットアップした。

4. 研究成果

視交叉上核に Okiluc-CaM と SSFO を発現させ、EMCCD カメラを用いて細胞内のカルシウム濃度を計測したところ、ロバスタな概日リズムが認められた。さらに青色光で視交叉上核の神経活動を上昇させたところ、カルシウム濃度の上昇が同時に観察された。この結果は、開発した発光カルシウムプローブから得られる発光輝度が、神経活動依存的に変化することを示す。したがって、蛍光カルシウムプローブだけでなく、発光カルシウムプローブを用いた神経活動計測が可能である事を示唆する。

次に、開発した Okiluc-aCT を用いて視交叉上核の cAMP の機能を検証した。沖縄産ホタルタンパク質を N 末と C 末に分け、その間に cAMP 結合ドメイン (PKA の cAMP 結合ドメイン) を挿入し、スプリット型 cAMP 発光プローブを作成した。発光波長はおよそ 610nm で、HeLa 細胞を用いて、cAMP 濃度依存的に発光強度が上昇する事を確認した。さらに、HEK 細胞にこの cAMP 発光プローブを遺伝子導入し、フォルスコリン投与により細胞レベルにおける cAMP の上昇を、光で計測する事に成功した。さらに、概日時計中核である視交叉上核の脳スライスを作成し、アデノ随伴ウイルスベクターを用い、cAMP 発光プローブと、蛍光カルシウムプローブ、GCaMP6s を遺伝子導入し、セカンドメッセンジャーとして重要な cAMP とカルシウムの同時タイムラプスイメージングに世界で初めて成功した。フォルスコリン投与において、cAMP 発光プローブのみ概日リズムが消失する事を明らかにした。また、両者の時空間パターンを比較したところ、概日時計中核の視交叉上核において、cAMP の概日リズムは全体として位相の分布が小さく、ほぼ同一位相でのパターンを示したのに対し、カルシウムの概日リズムは背側で最も位相が前進し、位相の分布も全体として幅広くなっていた。これらの事は、概日リズム振動において、cAMP とカルシウムはそれぞれ異なるメカニズムでの調節機構が存在する事を示唆している。

さらに、この神経ネットワークに関わる分子の同定を試みた。視交叉上核には複数の神経伝達物質が発現しているが、その中でも cAMP に関連を持つ vasoactive intestinal peptide (VIP) に着目した。VIP の受容体は Gs タイプの G タンパク質であることが知られている。VIP と cAMP リズムの関連性を明らかにするため、高濃度の VIP の投与、または VIP 受容体のアンタゴニストを投与し、細胞内の cAMP リズムに影響があるかを検証した。高濃度の VIP を投与すると、細胞

内 cAMP のリズムが消失する事が明らかになった。一方細胞内カルシウムリズムは影響を受けなかった。同様に、VIP 受容体のアンタゴニストの投与により、細胞内 cAMP の概日リズムは消失する事を確認した。これらの結果は、視交叉上核の cAMP の概日リズムは、神経ペプチドである VIP を介した神経ネットワークにより駆動していることを示す。

マウス行動リズムにおける夜行性・昼行性シフトの実験を行った。マウスを回転輸入りのケージで飼育し、回転輪の回転数に応じて餌を与える条件で長期間飼育した。徐々に回転数を上げていくと、マウスの活動時間が暗期から明期にシフトする事が明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 3件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Hung, J.C., Yamanaka, A., and Ono, D.	4. 巻 15:808754
2. 論文標題 Conditional knockout of Bmal1 in corticotropin-releasing factor neurons does not alter sleep/wake rhythm in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 808754
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnins.2021.808754	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 Nishide, S., Suzuki, Y., Ono, D., Honma, S., and Honma, K.	4. 巻 36(6)
2. 論文標題 The food-entrainable oscillator is a complex of non-SCN activity bout oscillators uncoupled from the SCN circadian pacemaker	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Rhythms	6. 最初と最後の頁 575-588
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/07487304211047937	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 Ono, D., Honma, K., Schmal, C., Takumi, T., Kawamoto, T., Fujimoto, K., Kato, Y., and Honma S.	4. 巻 11:19240
2. 論文標題 CHRONO and DEC1/DEC2 compensate for lack of CRY1/CRY2 in expression of coherent circadian rhythm but not in generation of circadian oscillation in the neonatal mouse SCN	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 19240
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-98532-5	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 該当する
1. 著者名 Myung, J., Nakamura, T.J., Jones, R.J., Silver, R., and Ono, D.	4. 巻 15:735007
2. 論文標題 Editorial: Development of Circadian Clock Functions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 735007
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnins.2021.735007	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 該当する

1. 著者名 Kolarski, D., Mir-Vinyals, C., Sugiyama, A., Srivastava, A., Ono, D., Nagai, Y., Iida, M., Itami, K., Tama, F., Szymanski, W., Hirota, H., and Feringa, L. B.	4. 巻 2.697222222
2. 論文標題 Reversible modulation of circadian time with chronopharmacology	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 3164
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-23301-x	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 該当する

1. 著者名 Ono, D., Honma, K., and Honma S.	4. 巻 15:650154
2. 論文標題 Roles of Neuropeptides, VIP and AVP, in the Mammalian Central Circadian Clock	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 650154
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnins.2021.650154	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5件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Ono, D.
2. 発表標題 Circadian output pathways from the suprachiasmatic nucleus that control sleep and wakefulness
3. 学会等名 第99回日本生理学会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小野大輔
2. 発表標題 中枢概日時計細胞の同期・非同期状態と生後発達
3. 学会等名 第72回コロナおよび界面化学討論会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ono, D., Mukai, Y., Hung, C. J, Chowdury, S., Sugiyama, T., and Yamanaka A.
2. 発表標題 The central circadian clock regulates wakefulness via CRF neurons in the hypothalamus
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小野大輔, Chi Jung Hung, 杉山崇, 山中章弘
2. 発表標題 Optical recording of intracellular cAMP rhythms in the mouse suprachiasmatic nucleus
3. 学会等名 第28回日本時間生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ono, D.
2. 発表標題 The suprachiasmatic nucleus regulates wakefulness via CRF neurons in the hypothalamus
3. 学会等名 5th Asian forum on chronobiology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究ユニットHP https://daiono14.wixsite.com/circadianrhythm

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
---------	---------