

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 7 月 30 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22300108

研究課題名(和文)体内時計中枢における分子神経メカニズムの決定

研究課題名(英文)Molecular mechanisms for central circadian pacemaker regulations

研究代表者

池田 真行 (IKEDA, MASAYUKI)

富山大学・大学院理工学研究部(理学)・准教授

研究者番号：10288053

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円、(間接経費) 4,140,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、マウスおよびキイロショウジョウバエの体内時計細胞の長期安定培養を行い、時計遺伝子転写リズムと細胞内H⁺/Ca²⁺濃度リズムの相関を解析した。その結果、ハエの前胸腺細胞では、時計遺伝子PeriodとTimlessの挙動が乖離しうることや、哺乳動物の中枢ニューロンの場合とは異なり、神経系に依存的したCa²⁺スパイクリズムが存在することが明らかとなった。これらのことは、細胞種に依存した時計遺伝子や細胞内Ca²⁺濃度の振動が存在することを意味している。

研究成果の概要(英文)：Daily rhythms in diverse activities are governed by transcriptional/translational feedback loops in clock genes. Also, it has been suggested that the circadian dynamics of intracellular signaling messengers such as Ca²⁺ may be critical both for the cellular physiological activities and gene transcriptional cycles. Based on these, the present study analyzed the clock gene transcriptional rhythms as well as cytosolic H⁺/Ca²⁺ in diverse models including *Drosophila* endocrine oscillators and SCN progenitor cells. The results demonstrated presence of clock gene oscillations but lack of apparent circadian cytosolic Ca²⁺ waves in these modes. Thus, the present results demonstrate cell-type specific mechanisms for the circadian rhythm generations.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：キイロショウジョウバエ マウス バイオイメーjing 体内時計 分子細胞神経科学

1. 研究開始当初の背景

地球の自転周期で変動する数多くの生命現象は、体内に存在する自律的な振動機構により調節されている。そうした体内時計の研究領域では、約1日の周期で転写・翻訳が繰り返される「時計遺伝子」の同定や機能解析が、研究主軸として位置づけられている。時計遺伝子の転写リズムは、自己の遺伝子産物による転写フィードバック制御や、他の時計遺伝子産物とのタンパク質間相互作用において形成されることが示唆されており、また近年では、体内時計細胞に固有な Ca^{2+} 濃度リズムなど「生理学的なファクター」が、そうした分子フィードバックループ(コアループと呼ぶ)と相互作用することが提唱されている。動物の体内時計機構において、コアループの概念が定着したのは、ここ10年のことである。これは、ヒトやマウスのゲノムプロジェクトが完了し、キイロショウジョウバエの時計遺伝子の相同性配列として、哺乳動物の時計遺伝子のクローニングが成功したためである。しかし、時計遺伝子の機能が、ショウジョウバエと哺乳動物で全く同一のものであるかは、不明であった。その一つの理由として、ショウジョウバエの時計遺伝子は、遺伝子欠損による個体行動リズムの異常を指標に同定されたものがほとんどであり、体内時計細胞の生理学的な性質についてはほとんどわかっていないためである。

2. 研究の目的

本研究では、マウスおよびキイロショウジョウバエの体内時計細胞の長期安定培養を行い、これら培養モデルにおける時計遺伝子転写リズムと細胞内 Ca^{2+} 濃度リズムの相関を解析した。

3. 研究の方法

2003年にNeuron誌に発表したマウス体内時計(SCN)の組織培養法と、Yellow Cameleonを用いた長期カルシウムイメージング技法

と、体内時計研究分野で今日多用されるPer-luciferase発光イメージングを組み合わせ、ショウジョウバエの組織培養にこれらを応用した。またSCNプロジェニター細胞株(SCN2.2細胞)に対し、Yellow Cameleonを安定発現させた細胞株(SCN2.2YC)を作出し、これを長期イメージング技法で解析した。

4. 研究成果

キイロショウジョウバエの内分泌時計として知られる前胸腺細胞では、中枢ペースメーカーニューロンの場合と異なり、時計遺伝子PeriodとTimlessの挙動が乖離していることが明らかとなった。また、これらの細胞の、細胞内 Ca^{2+} 濃度リズムは、哺乳動物のペースメーカー(SCN)ニューロンで見られた概日 Ca^{2+} 振動を形成せず、中枢依存的な Ca^{2+} スパイク振動として観察されることが明らかとなった(*Nature Communications* 誌に発表)。また、SCNプロジェニター細胞においては、時計遺伝子Per1の転写リズムは存在するものの、概日 Ca^{2+} 振動が観察されなかった(*Scientific Reports* 誌に発表)。これらのことは、細胞腫や発生段階の異なる体内時計細胞においては、時計遺伝子や細胞内 Ca^{2+} 濃度の振動様相が、ペースメーカーニューロンの場合と大きく異なることを示唆している。

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12件)

1. Takeuchi K, Mohammad S, Ozaki T, Morioka E, Kim J, Jenog B, Hong JH, Lee KJ & Ikeda M^{CA} (2014) Serotonin-2C receptor involved serotonin-induced Ca^{2+} mobilisations in neuronal progenitors and neurons in rat suprachiasmatic nucleus. *Scientific Reports* 4:4106 (doi:10.1038/srep04106).
2. Unno K, Yamoto K, Takeuchi K, Kataoka A, Ozaki T, Mochizuki T, Honda K, Miura

- N & Ikeda M^{CA} (2014) Acute enhancement of non-REM sleep following drinking of water contaminated with cadmium chloride in rats. *Journal of Applied Toxicology* 34:205-213. (doi: 10.1002/jat.2853)
3. Ikeda M^{CA}, Tsuno S, Sugiyama T, Yamoto K, Takeuchi K, Hashimoto A, Kishi H, Mizuguchi H, Kohsaka S, Yoshioka T (2013) Ca²⁺ spiking activity caused by the activation of store-operated Ca²⁺ channels mediates TNF- α release from microglial cells under chronic purinergic stimulation. *Biochim Biophys Acta (Molecular Cell Research)* 1833:2573-2585.
 4. Ikeda M^{CA}, Takeda M & Yoshioka T (2013) Thermal dynamics of metabotropic glutamate receptor signaling revealed by subtraction microcalorimetric measurements on live cells. *Protocol Exchange* (doi:10.1038/protex.2013.061)
 5. Ohtani K, Yanagiba Y, Ashimori A, Takeuchi A, Takada A, Takada N, Togawa M, Hasegawa T, Ikeda M & Miura N^{CA} (2013) Influence of injection timing on severity of cadmium-induced testicular toxicity in mice. *Journal of Toxicological Science* 38:145-150.
 6. Ozaki T, Mohammad S, Morioka E, Takiguchi S & Ikeda M^{CA} (2013) Infant satiety depends on transient expression of cholecystokinin-1 receptors on ependymal cells lining the third ventricle in mice. *Journal of Physiology (London)* 591:1295-1312.
 7. Ikeda-Sagara M, Ozaki T, Shahid M, Morioka E, Wada K, Honda K, Hori A, Matsuya Y, Toyooka N & Ikeda M^{CA} (2012) Induction of prolonged, continuous slow-wave sleep by blocking cerebral H₁ histamine receptors in rats. *British Journal of Pharmacology* 165: 167-182.
 8. Unno K, Ozaki T, Mohammad S, Tuno S, Ikeda-Sagara M, Honda K & Ikeda M^{CA} (2012) First and second generation H₁ histamine receptor antagonists produce different sleep-inducing profiles in rats. *European Journal of Pharmacology* 683: 179-185.
 9. Morioka E, Matsumoto A & Ikeda M^{CA} (2012) Neuronal influence on peripheral circadian oscillators in pupal *Drosophila* prothoracic glands. *Nature Communications* 3: 909 (doi: 10.1038/ncomms1922).
 10. Mohammad S, Ozaki T, Takeuchi K, Unno K, Yamoto K, Morioka E, Takiguchi S & Ikeda M^{CA} (2012) Functional compensation between cholecystokinin-1 and 2 receptors in murine paraventricular nucleus neurons. *Journal of Biological Chemistry* 287: 39391-39401.
 11. Hirakura Y, Sugiyama T, Takeda M, Ikeda M, & Yoshioka T^{CA} (2011) Deuteration as a tool in investigating the role of protons in cell signaling. *Biochim Biophys Acta (General Subjects)* 1810: 218-225.
 12. Hong JH, Min CH, Jeong B, Kojiya T, Morioka E, Nagai T, Ikeda M & Lee KJ^{CA} (2010) Intracellular calcium spikes in rat suprachiasmatic nucleus neurons induced by BAPTA-based calcium dyes. *PLoS One* 5: e9634.
- [学会発表](計 22 件)
1. 池田真行、尾崎智也、池田正明: Bmal1 is an essential regulator for circadian cytosolic calcium rhythms in

- suprachiasmatic nucleus. 第43回北米神経科学大会, シンポジウム口演, 2013年11月9-13日, アメリカ合衆国(サンディエゴ)
2. Mohammad Shahid, 竹内公平, 片岡絢, 池田真行: Possible synergic interaction between leptin and cholecystokinin receptors in satiety controlling neurons. 第43回北米神経科学大会, ポスター発表, 2013年11月9-13日, アメリカ合衆国(サンディエゴ)
 3. 森岡 絵里, 池田真行: 昆虫体内時計細胞の蛍光・化学発光イメージング解析: Bio-imaging analysis for circadian oscillator cells in *Drosophila melanogaster*. 富山大学大学院生命融合科学教育部シンポジウム, ポスター発表 2012年1月12日(富山)
 4. 尾崎 智也, Mohammad Shahid, 池田真行: 哺乳期の満腹制御機構: The third ventricular ependymal cells control murine infant satiety via cholecystokinin-1 receptors. 富山大学大学院生命融合科学教育部シンポジウム, ポスター発表 2012年1月12日(富山)
 5. 角 沙樹, 池田真行: 損傷脳の回復過程: ミクログリアモデル細胞を用いたカルシウムイメージング解析. 富山大学大学院生命融合科学教育部シンポジウム, ポスター発表 2012年1月12日(富山)
 6. 尾崎智也, モハマド シャヒド, 瀧口総一, 池田真行: 第三脳室上皮細胞コレシトキニン 1 受容体シグナリングは乳児の満腹制御に重要である. 第89回日本生理学会, ポスター発表, 2012年3月29-31日(松本)
 7. 池田真行, 尾崎智也, モハマド シャヒド: CCK 受容体サブタイプ間の相補的遺伝子発現による室房核機能のスイッチング. 第89回日本生理学会, ポスター発表, 2012年3月29-31日(松本)
 8. 池田真行, 海野雄哉: Induction of slow-wave sleep and cancelation of REM sleep by pharmacological blocking of cerebral H₁ histamine receptors in rats. シンポジウム口演 第37回日本睡眠学会 2012年6月28-30日(横浜)
 9. 森岡絵里, 竹田真浩, 三浦伸彦, 小泉恵太, 東田陽博, 池田真行: 「キイロショウジョウバエ中枢時計ニューロンにおける細胞内 pH リズム」第19回日本時間生物学会学術大会, ポスター発表, 2012年9月15-16日, 札幌
 10. 海野雄哉, 本多和樹, 池田真行: 「中枢移行型第二世代 H1 ヒスタミン受容体アンタゴニストによる睡眠促進と概日位相前進」第19回日本時間生物学会学術大会, ポスター発表, 2012年9月15-16日, 札幌
 11. 池田真行, 海野雄哉, 竹田真浩, 矢本くるみ, 竹内公平, 片岡絢, 藤澤千里, 尾崎智也, 森岡絵里, 三浦伸彦: 「カドミウムイオンによる睡眠覚醒リズムの調節と毒性発現の分子時計依存性」第19回日本時間生物学会学術大会, ポスター発表, 2012年9月15-16日, 札幌
 12. 森岡絵里, 池田真行: Oscillatory profiles of peripheral and central circadian pacemakers in *Drosophila* organotypic culture models. 第42回北米神経科学大会, ポスター発表, 2012年10月13-17日, アメリカ合衆国(ニューオーリンズ)
 13. 尾崎智也, Mohammad Shahid, 池田真行: Cholecystokinin-2 receptor overexpression and functional compensation in the paraventricular nucleus in mice lacking cholecystokinin-1 receptors. 第42回

- 北米神経科学大会，ポスター発表，2012年10月13-17日，アメリカ合衆国（ニューオーリンズ）
14. 池田真行：抗ヒスタミン薬を介した睡眠誘発作用：第三脳室連続微小注入法を用いた検証．第一回睡眠研究会．2011年7月7-8日（岡崎）
15. Mohammad Shahid、尾崎智也、和田一真、海野雄哉、森岡絵里、瀧口総一、池田真行：Synergic functional interplay between cholecystinin-A and -B receptors in the posterior paraventricular nucleus. The 6th International Conference of Neurons and Brain Diseases，ポスター発表，2011年8月3-5日，富山（日本）
16. 尾崎智也、Mohammad Shahid、森岡絵里、瀧口総一、池田真行：Infant satiety depends on ependymal cholecystinin-A receptors. The 6th International Conference of Neurons and Brain Diseases，ポスター発表，2011年8月3-5日，富山（日本）
17. 森岡絵里、池田真行：Synaptic Influence on Peripheral Circadian Oscillators in Pupal Drosophila Prothoracic Glands. XII Congress of the European Biological Rhythms Society，ポスターおよび口頭発表 2011年8月20-26日，Oxford（UK）
18. 尾崎智也、Mohammad Shahid、森岡絵里、瀧口総一、池田真行：Infant satiety depends on ependymal cholecystinin-A receptors. 第41回北米神経科学大会，ポスター発表，2011年11月12-16日，Washington D.C. (USA)
19. 森岡絵里、池田真行：キイロショウジョウバエの末梢振動体の脆弱性は、細胞間の脱同調に起因しない.第18日本時間生

物学会学術大会，ポスター発表，2011年11月24-25日（名古屋）

20. 角沙樹、吉岡亨、杉山崇、池田真行：Intracellular Ca²⁺ dynamics underlying ATP-induced TNFalpha release in MG5 microglial cells. 第40回北米神経科学大会，2010年11月13-17日，アメリカ合衆国（サンディエゴ）
21. 川口香織、Kyoung Jin Lee、池田真行：Presence of clock gene oscillations but not dominant physiological outputs in SCN2.2 cells，2010年11月13-17日，アメリカ合衆国（サンディエゴ）
22. 森岡絵里、尾崎智也、池田真行：Ca²⁺/pH感受性タンパクセンサーを用いた体内時計ニューロンの生理活動解析．第17回日本時間生物学会．2010年11月20-21日（東京）

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1)研究代表者
池田 真行 (IKEDA, Masayuki)
富山大学・大学院理工学研究部(理学)・
准教授
研究者番号：10288053

(2)研究分担者

池田 正明 (IKEDA, Masaaki)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号： 80232198

(3)連携研究者

()

研究者番号：