

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890001

研究課題名(和文)概日リズムの生後発達に関わる分子の探索

研究課題名(英文)Molecular mechanisms of the cellular coupling in the SCN during postnatal development

研究代表者

小野 大輔(Ono, Daisuke)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・特任助教

研究者番号：30634224

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は時計遺伝子Cry1, Cry2は視交叉上核の細胞レベルにおける概日リズムには必須ではないこと、Cry1, Cry2は生後発達に伴う視交叉上核の細胞間カップリングに関与することを明らかにした(Ono et al Nat. Commun. 2013)。また生後初期の恒常明がCRYの機能を補完し、行動リズムを生み出すことも明らかにした(Ono et al PLOS ONE. 2013)。生後初期におけるCryDKOマウス視交叉上核の細胞間カップリングにおけるVIPの役割を明らかにするために、CryDKOマウスとVIPレセプターKOマウスを掛け合わせ、概日リズムの評価を行った。

研究成果の概要(英文)：We found that Cry1 and Cry2 are not essential for the circadian rhythm generation in the SCN cells, and are necessary for the development of intercellular networks in the adult SCN (Ono et al Nat. Commun. 2013). We also found that neonatal exposure to constant light compensates CRY functions for the disruption of circadian behavioral rhythms under constant dark (Ono et al PLOS ONE. 2013). In order to understand the role of VIP signaling in the CryDKO SCN during development, CryDKO mice were bred with VIP receptor (VPAC2) KO mice. We measured PER2::LUC bioluminescence in the SCN from CryDKO-VPAC2KO mice.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・環境生理

キーワード：概日リズム 視交叉上核 時計遺伝子 生後発達 光イメージング

1. 研究開始当初の背景

地球上のほとんどすべての生命には 24 時間を 1 サイクルとした概日リズムが普遍的に存在する。この概日リズムは“概日時計”により駆動され、哺乳類では視床下部視交叉上核 (SCN) に概日時計の中核が存在する。SCN には片側約 1 万もの神経細胞が存在し、個々の神経細胞が約 24 時間のリズムを刻んでいる。今までの所、概日リズムは複数の時計遺伝子とよばれる遺伝子の転写・翻訳を介したネガティブフィードバックループにより形成されていると考えられている。すなわち、時計遺伝子 *Bmal1* および *Clock* の転写産物 (転写因子) がヘテロダイマーを形成して時計遺伝子 *Period (Per)* の転写を促進し、産生された PER 蛋白産物が時計遺伝子 *Cryptochrome (Cry)* の蛋白産物と共に、BMAL1/CLOCK の転写促進作用を抑制する。このフィードバックループが一回転するのに要する時間が約 24 時間であり、各々の時計遺伝子の発現量に約 24 時間の概日リズムが存在する。そして視交叉上核の概日リズムが最終的に行動リズムへと出力される。

最近、行動レベルで概日リズムが消失する時計遺伝子 KO マウスの視交叉上核に、概日リズムが存在する事が明らかとなってきた。申請者は CRY に依存した新たな細胞間カップリングシステムが生後発達の期間に形成される事を見出しているが、その細胞間カップリングの分子メカニズム、及びこれに関与する分子は全くの未知であり、これまでの所、世界のどのグループからも決定的なデータは得られていない。

2. 研究の目的

本研究課題では生後発達に伴う概日時計の中核である視交叉上核の細胞間カップリングと時計遺伝子 *Cry* を結ぶ因子を探索するところにある。

3. 研究の方法

(1) 共培養法と発光レポーターを組み合わせた概日リズム回復実験

発光レポーターとして、PER2::LUC マウスを用い、細胞内の PER2 の蛋白質変動をモニターする。レポーターの組み込まれた成獣 *Cry1^{-/-}/Cry2^{-/-}* (CryDKO) マウスの視交叉上核と、レポーターの組み込まれていない、野生型マウス視交叉上核を共培養する。その際、野生型は生後異なる時期の視交叉上核を用いる。

(2) 視交叉上核培養系を用いた阻害剤実験 (CRY 非依存的細胞間カップリングの検討)

新生児 *Cry1^{-/-}/Cry2^{-/-}* マウスの視交叉上核には、個々の細胞が同調したリズムが認められる。そこで、この CRY 非依存的細胞間カップリングがどのようなメカニズムで生じているのかを明らかにするために、各阻害剤を投与し視交叉上核の個々の細胞のリズムを

測定し、リズムの同期程度を計算する。測定は高感度 EM-CCD カメラを用い測定し、得られたイメージング画像から個々の細胞の発光輝度をデータ解析ソフトにて定量化する。定量化した時系列データから、個々の細胞のピーク位相と周期の有無を算出する。

アデニル酸シクラーゼ阻害剤 (MDL): 細胞内 cAMP は細胞間カップリングに重要である事が近年明らかになってきた。そこで、新生児 *Cry1^{-/-}/Cry2^{-/-}* マウスの視交叉上核の cAMP によるカップリングを阻害する。

カルシウムキレート剤 (BAPTA): 細胞内の Ca^{2+} も概日リズムを示す事が示唆されている。細胞内の Ca^{2+} 濃度を減少させることで、 Ca^{2+} を介したカップリングの有無を検討する。

VIP, AVP, GRP アンタゴニスト: これら三つのペプチドは傍分泌を介した細胞間カップリングに関与している事が示唆されている。これらのアンタゴニストを用い、CRY 非依存的細胞間カップリングへの影響を検討する。また、VIP のレセプターノックアウトマウスである、VPAC2KO マウスを用い、VIP の CRY 非依存的細胞間カップリングの影響を直接測定する。

4. 研究成果

(1) 共培養法と発光レポーターを組み合わせた概日リズム回復実験

成獣型 CryDKO マウスの視交叉上核を作成し、その上に野生型視交叉上核を生後 1, 7, 14, 21 日から取り出し共培養した。その結果 1, 7 日の野生型視交叉上核を共培養した時にのみ成獣 CryDKO マウスの概日リズムが回復した。これらの結果は成獣型 CryDKO マウスの視交叉上核には幼若期から分泌される液性因子により形成される細胞間ネットワークが残っていること、また幼若期の視交叉上核からは何らかの液性因子が作用して細胞間カップリングに働いていると考えられる。

(2) 視交叉上核培養系を用いた阻害剤実験 (CRY 非依存的細胞間カップリングの検討)

新生児 CryDKO マウスの細胞間カップリングの細胞内メカニズムを探るために、生後 4 日目に野生型あるいは Cry 欠損型マウスの視交叉上核を切り出し、生物発光を用い組織レベルの概日リズムを測定した。4-5 日後、細胞間カップリングに関与すると考えられているアデニル酸シクラーゼ阻害剤または細胞内カルシウムキレート剤を投与し概日リズムの変化を光電子増倍管にて評価した。両阻害剤ともに新生児期の CryDKO マウスの概日リズムを減弱させたが、アデニル酸シクラーゼ阻害剤のほうがより概日リズムを減弱させた。

次にこれら阻害剤における細胞単位における概日リズムを計測するために、CCD カ

メラを用いイメージングを行った。光電子増倍管にて得られた CryDKO マウスの概日リズムの減弱は、細胞単位におけるリズム消失ではなく、細胞間カップリングの減少によるものであることが明らかになった。その周期の分布は幅広く、成獣型の視交叉上核の細胞単位で認められるリズムに非常に近い性質を示すことが明らかになった。

次にこれらの細胞内シグナリング伝達経路の上流に位置する因子を探るため、視交叉上核に多く発現している神経ペプチドの一つである VIP に着目した。これまで VIP は視交叉上核における細胞間カップリングに重要な役割を果たすことが見出されているが、生後発達における細胞間カップリングの役割と Cry との関連性は明らかではない。また VIP の下流では cAMP や Ca といったシグナリング経路が明らかとなっている。そこで CryDKO マウスと VPAC2KO マウスを掛け合わせ、CryDKO マウスの新生児期における VIP シグナリングの役割について検討した。光電子増倍管を用いた視交叉上核全体の計測の結果、CryDKO マウスの新生児期に見られた概日リズムは CryDKO-VPAC2KO マウスでは消失していることが明らかとなった。現在細胞単位における概日リズムについて検討している。

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 6 件)

- 1, Ono, D., Honma, S., and Honma, K.: Postnatal constant light compensates *Cryptochrome1* and *2* double deficiency for disruption of circadian behavioral rhythms in mice under constant dark. ***PLOS ONE*** 20:8(11):e80615. doi: 10.1371/journal.pone.0080615 (2013) 査読有り.
- 2, Ono, D., Honma, S., and Honma, K.: Cryptochromes are critical for the development of coherent circadian rhythms in the mouse suprachiasmatic nucleus. ***Nature Communications*** 4:1666 doi: 10.1038/ncomms2670 (2013) 査読有り.
- 3, Enoki, R., Kuroda, S., Ono, D., Hasan, M. T., Ueda, T., Honma, S., and Honma, K.: Topological specificity and hierarchical network of the circadian calcium rhythm in the suprachiasmatic nucleus. ***Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*** 109:21498-21503 doi: 10.1073/pnas.1214415110 (2012) 査読有り.
- 4, Enoki, R., Ono, D., Hasan, M. T., Honma, S., and Honma, K.: Single-cell resolution fluorescence imaging of circadian rhythms detected with a Nipkow spinning disk confocal system. ***J. Neurosci. Methods.*** 207:72-79, doi:

10.1016/j.jneumeth.2012.03.004 (2012) 査読有り.

5, Yoshitane H, Honma S, Imamura K, Nakajima H, Nishide SY, Ono, D., Kiyota H, Shinozaki N, Matsuki H, Wada N, Doi H, Hamada T, Honma K, Fukada Y.: JNK regulates the photic response of the mammalian circadian clock. ***EMBO Rep.*** 13:455-461, doi: 10.1038/embor.2012.37 (2012) 査読有り.

6, Nishide, S. Y., Ono, D., Yamada, Y., Honma, S., and Honma, K.: De novo synthesis of PERIOD initiates circadian oscillation in cultured mouse suprachiasmatic nucleus after prolonged inhibition of protein synthesis by cycloheximide. ***Eur. J. Neurosci.*** 35:291-299. doi:

10.1111/j.1460-9568.2011.07952.x (2012) 査読有り.

[学会発表](計 10 件)

- 1, Ono, D., Honma, S., and Honma, K. Developmental changes of coherent circadian rhythms in the SCN of Cryptochrome deficient mice. Gordon research seminar, 2013, Newport, USA.
- 2, Ono, D., Honma, S., and Honma, K. Developmental changes of coherent circadian rhythms in the SCN of Cryptochrome deficient mice. Gordon research conference, 2013, Newport, USA.
- 3, Ono, D., Honma, K., and Honma, S. In vivo measurement of circadian gene expression rhythms in the suprachiasmatic nucleus in freely moving mice. The 11th international symposium for future drug discovery and medical care. Sapporo, 2013.
- 4, 小野大輔、本間さと、本間研一. 視交叉上核の生後発達と細胞間カップリング 第20回日本時間生物学会 11月8,9日, 2013, 近畿大学
- 5, 小野大輔、本間さと、本間研一. CRYPTOCHROME は生後発達における視交叉上核の概日リズムの細胞間カップリングに重要である. Neuro2013 6月20-23日, 2013, 京都.
- 6, Ono, D., Honma, S., and Honma, K. In vivo monitoring of circadian gene expression rhythms with an optic fiber in freely moving mice. International symposium and workshop on frontiers in sleep and biological rhythms research, Izmir, 2012.
- 7, 小野大輔、本間さと、本間研一. 光ファイバーを用いた無麻酔・無拘束マウス視交叉上核からの長期発光測定 第90回日本生理学会大会 3月27-29日, 2013, 東京.
- 8, 小野大輔、本間さと、本間研一. 中枢時計の発達と時計遺伝子機能 第19回日本時

間生物学会学術大会 9月15, 16日, 2012, 札幌

9, **小野大輔**、本間さと、本間研一. 概日時計の生後発達と時計遺伝子 *Cryptochrome* 第92回日本生理学会北海道地方会 9月1日, 2012, 札幌.

10, **小野大輔**、本間さと、本間研一. *Cry1/Cry2*ダブルノックアウトマウス視交叉上核の概日リズムの生後発達 第35回日本神経科学学会 9月18-21日, 2012, 名古屋.

〔図書〕(計 7件)

1, Honma S, **Ono D** and Honma K. Cellular oscillators in the suprachiasmatic nucleus for behavior rhythm expression in the mouse lacking CRYPTOCHROME. In: Honma K. ed. Dynamics of Circadian Oscillation in the SCN, Hokkaido Univ. Press, pp.79-89, 2014

2, **Ono D**, Kori H, Honma S, Daan S and Honma K. Cellular circadian rhythms in the suprachiasmatic nucleus: An oscillatory or a stochastic process? In: Honma K. ed. Dynamics of Circadian Oscillation in the SCN, Hokkaido Univ. Press, pp.21-32, 2014

3, Honma K, **Ono D**, Honma S and Tokuda I. Bout Oscillator: hypothetical circadian oscillators for activity bouts. In: Honma K. ed. Dynamics of Circadian Oscillation in the SCN, Hokkaido Univ. Press, pp.91-105, 2014

4, Tokuda I, Herzog H, **Ono D**, Honma S and Honma K. Oscillator Network modeling of the suprachiasmatic nucleus in *Cry1/Cry2* double deficient mice. In: Honma K. ed. Dynamics of Circadian Oscillation in the SCN, Hokkaido Univ. Press, pp.139-153, 2014

5, **小野大輔**、本間さと、本間研一: 時計遺伝子 *Cryptochrome* は生後発達に伴う視交叉上核の概日リズム形成に重要な役割を示す (Best article of the year) 北海道医学雑誌 2014, in press.

6, **小野大輔**、本間研一、本間さと: 生体リズムの分子機構, 最新臨床睡眠学、66巻増刊号 日本臨床社、東京、148-153, 2013

7, Honma S, **Ono D** and Honma K. Oscillator cell networks in the hypothalamic suprachiasmatic nucleus, the mammalian circadian clock. In "Advances in Cognitive Neurodynamics (III)", Y.Yamaguchi ed. Springer, Tokyo, pp.185-190, 2013. DOI 10.1007/978-94-007-4792-0_25, © Springer Science+Business Media

〔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
http://www.hokudai.ac.jp/news/131121_pr_med.pdf

http://www.hokudai.ac.jp/news/130412_pr_med.pdf

6. 研究組織

(1) 研究代表者
小野 大輔 (ONO DAISUKE)
北海道大学・医学研究科・特任助教
研究者番号: 30634224

(2) 研究分担者
()

研究者番号:

(3) 連携研究者
()

研究者番号: