

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 21 日現在

機関番号：13904

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21790298

研究課題名（和文）

概日リズムが確立する時期についての研究

研究課題名（英文）

The timing to establish the circadian rhythms in development

研究代表者

沼野 利佳 (NUMANO RIKA)

豊橋技術科学大学・エレクトロニクス先端融合研究所・特任准教授

研究者番号：30462716

研究成果の概要（和文）：概日リズム中枢の視交叉上核(SCN)で、リズムの発振がいつ確立し、外界の刺激で変化するかを、培養 SCN 神経細胞の分裂で観察する。細胞周期の G1 期を橙色で、S-M 期を緑蛍光で標識できる FucciTg マウスと、概日リズムを時計遺伝子 *Per1* 発現を蛍光で可視化した *per1:luc* マウスで観察した。SCN 神経細胞は、DM 部は、VL 部に比べて分化が早く、生後 1 日目の SCN は、リズムは弱い。母マウスをほかの雄と飼育すると、生後 1 日目の VL では、S-M 期の細胞が多く、リズム確立には妊娠母への異常な刺激を避けることの重要性を示唆した。

研究成果の概要（英文）： The neurons in the SCN were developed gradually from fetal to adult by observing cell cycle indicator Fucci Tg mouse. The Dorso Medial in the SCN as pacemaker was developed faster than the Ventro lateral to reset the phase of circadian rhythms. This result was consistent that the circadian rhythms oscillated autonomously since 1week after birth from *Per1:luc* Tg mice. The SCN differentiation in pups were compared after pregnant mother mice was kept with mating male or other male. Development in pups SCN tends to be affected by irregular stimulation to mother mice. It suggests that it is important to keep mother in normal environment for establishing pups circadian rhythms.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医化学一般

科研費の分科・細目：医歯薬学・基礎医学・医化学一般

キーワード：概日リズム、トランスジェニックマウス、視交叉上核、細胞分裂、発生

1. 研究開始当初の背景

地球上での生物の行動や代謝などには一日を周期とする概日リズムが存在する。げっ歯類の SCN を破壊すると行動等すべての概日リズムが消失し、そこに野生型の SCN を移植するとリズムが回復することから、哺乳類の概日リズムの中核は SCN に存在することが明らかになっている。哺乳類概日リズムを規定する時計遺伝子のクローニングから、生理学が主であった概日リズムの研究に、分子論的なアプローチがさかんになってきている。SCN で自律的な転写日周リズムを持つ *Period1(Per1)* 遺伝子が近年クローニングされ、SCN 内の日周転写振動が、概日リズムの維持に重要な時計遺伝子であることが示された。時計遺伝子のプロモーター領域にルシフェラーゼ (*luc*) レポーターを連結させた融合遺伝子を導入した *Per1::luc* トランスジェニック (Tg) 動物を作製し、その SCN を用いて、*Per1* の発現をリアルタイムで測定・観察できる *in vitro* の実験系の構築に成功した。*Per1::luc* 動物の培養 SCN において、約 24 時間周期の *luc* の発現オシレーションが数ヶ月にわたり持続される。この系は、連続的に SCN の概日リズムを測定し、SCN と筋肉、肝臓、肺などの末梢組織のリズムを同一手法で測れるということで画期的である。

また、培養 SCN スライス全体のイメージングを行ったさいに、24 時間の *Per1* 発現周期を維持する部位 (DM 付近) と、*Per1* 発現振動の位相が遅く振幅が小さい外部からの刺激が網膜から投射する部位 (VL 付近) に分けられ、SCN のリズム発振機構には部位別の極性があることがわかった。

近年、生まれたばかりのマウス乳児の視覚経験が、大脳視覚野での視神経回路の可塑性を促すという報告がなされ、乳児への外部刺

激が、脳にどのような影響を与えるかが注目されている。概日リズム研究においても、生後 1 日目マウスの SCN では、母親の SCN と異なり、母親が行動している時間帯に影響されて概日リズムの位相が変化する、つまり、親とのコミュニケーションが乳児の概日リズムの位相をリセットすることが示された。親子をとりまく光条件などの外界の環境変化が、胎児や乳児の概日リズムの形成・性質にどのように影響するかは非常に興味深い問題である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、哺乳類概日リズムの中核である視交叉上核 (SCN) において、約 24 時間の自律的な周期リズムの発振が発生段階のいつ確立するかを、SCN スライスを顕微鏡下で培養しながらの imaging により、神経細胞の分化する様子を同時に観察しつつ、明らかにする。また、母や個体の環境変化などの外界の刺激で、胎児や乳児の概日リズム発振機構の確立する時期が、どのような影響を受けるかを同様の手法で調べる。

3. 研究の方法

細胞周期を、G1 期の細胞を橙色蛍光蛋白で、S-G2-M 期の細胞を緑蛋白蛍光で標識し、その時間的な比率変化で観察できる Fucci Tg マウスと、概日リズムの進行を蛍光シグナルでリアルタイムで可視化できる *per1::luc* マウスの SCN スライス培養を用いて、SCN の発生・分化と概日リズムを異なる発生ステージで観察した。

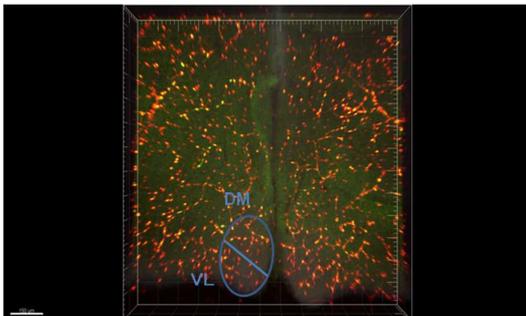
また、母への環境影響が、子供の SCN 発生・分化に影響するかを、妊娠中の母マウスを mating ペアと異なる雄とともに飼育し、環境を変えて、個別飼育した母の子供の SCN 発生

を比較するという実験を行なった。

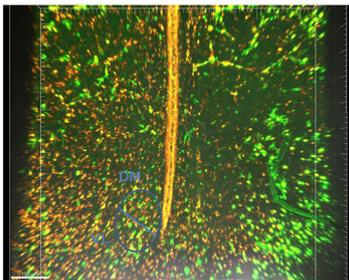
4. 研究成果

生まれた直後のマウスのSCNの神経細胞分裂は、成体と比べて、S-G2-M期の細胞を緑蛋白蛍光で標識された細胞の割合が多く、生後1, 3, 8日後、成体と、発生が進行につれ、赤蛋白蛍光のG1期にある細胞の割合が増える。このことは、生後から、成体になるまで、SCNの細胞が分化し、G1期からG0期に入る割合が多くなることを示す。また、Ventreo lateral (VL)と Dorso Medial (DM)を比べると、生後すぐはDMのほうがVLに比べて、G1 (G0)期にある細胞の割合が多く、分化がより早く進行していることが考えられる。SCNのDMはリズムオシレーターであり、VLは外界の刺激に対して位相をリセットする機構を担うと考えられているが、SCNでは、DMのほうがVLに比べて発生初期は分化が早く、VLは生まれて8日後ほどから急速に分化が進むのではないかと考えられる。(図1)

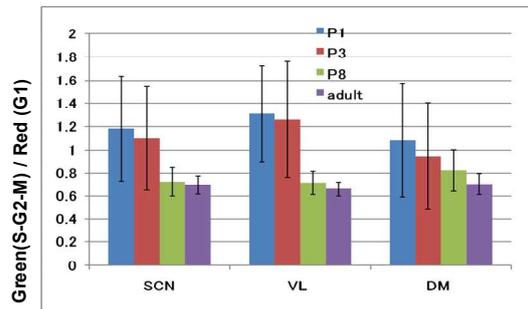
図1 Adult Fucci mouse のSCN スライスイメージ



生後1日 Fucci mouse のSCN スライスイメージ



Green(S-G2-M) / Red (G1)の細胞の比

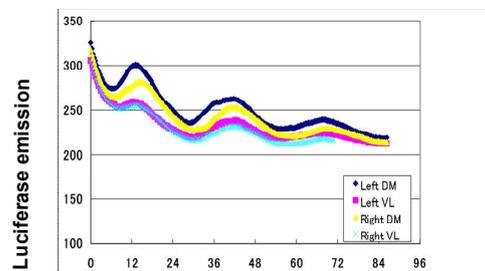


また、SCNの細胞が分化進行中である生後1日後では、時計遺伝子 *Period1* の発現振動は、ホタルの発光をレポーターに観察すると、成体のリズムと比べて振幅が小さく、リズムは発振機構は確立していないことがわかる。

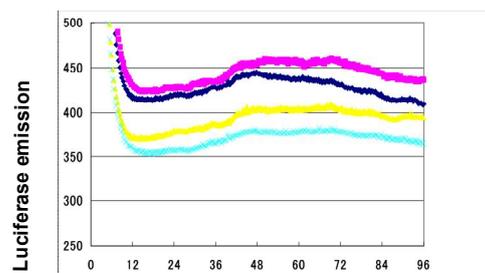
(図2)

図2

成体 *Per1::luc* 動物の培養 SCN



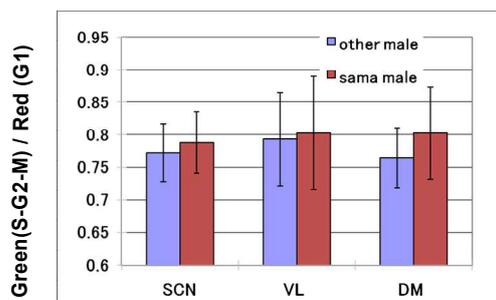
生後1日目 *Per1::luc* 動物の培養 SCN



さらに、妊娠中の母マウスを mating したほかの雄マウスと同ケージで飼育すると、その子供 mouse が、母が個別飼育の子供と比べて、SCN、DM、VL ともに S-G2-M 期の細胞を緑蛋白蛍光で標識された分裂中の細胞の割合がわずかながら多く、DM のほうが VL に比べて、さらに分裂中の細胞が多い傾向がある (図 3)。これは、SCN の発達には、母の妊娠中の異常な刺激をうけると、神経細胞の分化が遅くなり、リズムの発振機構の分化・発達にも影響する可能性を示唆する。

図 3

生後 1 日目の Green(S-G2-M) / Red (G1) の細胞の比



本研究は、発生初期の個体のリズムを健全な状態に保つために、妊娠中の異常な刺激を避けることの重要性を示唆したという点で意義を持つ。

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 2 件)

1

Nakane A, Numano R, Sugiyama M, Sato H, Makino Y, Watanabe T, Takagi Y, Yamaguchi A, Iimura T
J Bone Miner Metab, 印刷中

2

Nakane A, Numano R*, Takagi Y, Yamaguchi A, Iimura T*
骨形態計測学会雑誌, 21, p41-50, 2011

[学会発表] (計 10 件)

発表者 (代表) 名、発表標題、学会等名、発表年月日、発表場所

1

Numano R

Clock genes of circadian rhythms have significant effects on cell cycle,
TOYOHASHI University of Technology
Symposium, 平成 24 年 2 月 21 日, 愛知県・豊橋市

2

C. Uehara, S. Kikuchi and Numano R

Melanopsin resets circadian rhythms in fibroblast cell by inducing clock gene *Period1*, The Asia-pacific

Interdisciplinary research Conference

2011, 平成 23 年 11 月 23 日, 愛知県・豊橋市

3

沼野 利佳

哺乳類概日リズム制御機構の研究及び神経活動を光調節する実験系の確立、独立行政法人国立環境研究所セミナー、平成 23 年 7 月 19 日、茨城県・つくば市

4

沼野 利佳, 宮脇敦史, 概日リズム時計遺伝子

発現は cell cycle 進行に影響する,

第 15 回日本時間生物学会学術大会

平成 22 年 11 月 20, 21 日, 東京・早稲田大学

5

Numano R

Mysteries of the Mammalian Clock

- Adjustment of circadian rhythms using photo-switched bio-nano-machine in

pacemaker neuron-

International Symposium on EIIRIS , 平成22年11月16日, 愛知県・豊橋市

6

Numano R

光で神経活動を調節するナノマシンの開発について (依頼講演)

第41回中部化学関係学協会支部連合秋季大会,

平成22年11月6日, 愛知県・豊橋市

7

沼野 利佳、概日リズム制御機構の研究及び神経活動を光調節する実験系の確立、ワークショップ“生命科学研究の今後”、平成22年8月11日、徳島・徳島大学

8

沼野 利佳, 生命環境科学系生命情報学セミナー(招待講演)、平成22年7月14日、東京・東京大学

9

沼野 利佳, 哺乳類概日リズム制御機構の研究及び神経活動を光調節する実験系の確立 GCOEセミナー(招待講演)、平成22年3月24日、東京・慶應大学

[その他]

ホームページ等

<http://www.tut.ac.jp/teach/main.php?mode=detail&article=677>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

沼野 利佳 (NUMANO RIKA)

豊橋技術科学大学・エレクトロニクス先端融合研究所・特任准教授

研究者番号：30462716

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：