

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06263

研究課題名(和文)発光イメージングによる昼行性行動の脳内決定部位の可視化

研究課題名(英文) Visualization of critical neuronal circuits for the determination of diurnal animal behaviors using bioluminescence imaging

研究代表者

池田 真行 (IKEDA, Masayuki)

富山大学・大学本部・理事・副学長

研究者番号：10288053

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：(1) 昼行性ナイルグラスラットのBmal1遺伝子プロモーター領域の下流にルシフェラーゼ遺伝子を挿入したレポーターを作成した。また、ナイルグラスラットの肺から単離した線維芽細胞にレポーターを安定発現させたモデル細胞株を樹立した。この細胞では約24時間周期の発光リズムが観察された。また、この細胞では、ヒトの光による位相反応と相似したアドレナリン刺激による位相反応が観察された。(2) SCNニューロンの1次投射先である室傍核下部領域の腹側(vSPZ)において、ナイルグラスラットのGABA応答性が強い抑制性の応答であるのに対し、夜行性マウスでは興奮性の応答が得られることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

(1) については論文発表準備中である。また、AAVベクターを用いた脳組織へのレポーター遺伝子の発現実験は継続中である。(2) については、夜行性と昼行性のスイッチング機構として、視床下部SPZ領域のGABA応答が重要であることを示唆している。この内容は、2023年の日本時間生物学会において優秀演題賞を受賞している。また現在、生物学分野のTOP10%論文に投稿しリバイズ中である。体内時計の仕組みは、これまで主に中枢振動体の振動機構を中心に研究されてきたが、本研究により、ヒトにおいて大きな社会問題として捉えることができる夜型行動が、視交叉上核の投射先のGABA興奮性により出現する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Reporter was created by insertion of luciferase gene at downstream of the Bmal1 gene promoter of diurnal Nile grass rats. In addition, fibroblast cells isolated from the lungs of Nile grass rats were cultured to establish a model cell line stably expressing this reporter. Bioluminescence rhythms with circa 24-hour cycles were observed in these cells. In addition, an adrenergic-stimulation induces phase responses similar to the human light-induced phase responses (type 0 phase response curve) in these cells. GABA responses were analyzed by Ca²⁺ imaging and cell-attached voltage-clamp recordings in hypothalamic circuits receiving SCN projections in Nile rats and mice. We identified differential GABA functions in the subparaventricular zone (SPZ); GABA induced greater Ca²⁺ increases in nocturnal mice, whereas it caused greater inhibition of spontaneous firing in diurnal Nile rats. Thus, we suggest a key role of GABA functions in the phylogenesis of diurnal behaviors.

研究分野：時間生物学

キーワード：体内時計 バイオイメージング ガンマアミノ酪酸 昼行性行動 ナイルグラスラット

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

哺乳動物の概日行動リズムを調節する体内時計の中核が、視床下部視交叉上核 (SCN) に存在することや、SCN ニューロンの自律振動を形成する仕組みとして、時計遺伝子の転写翻訳リズムが存在することは広く認められている。一方で、動物の行動リズムの表現型は、昼行性、夜行性、あるいは朝と夕に2つのピークを持つ双峰性といった多様性が存在するが、この行動表現型を決定する仕組みについては理解されていない。例えば、行動の昼・夜行性を問わず、SCN ニューロンの活動リズムや時計遺伝子の転写リズムの位相はほぼ一定であることが報告されているものの、SCN ニューロンのコア振動が、どの脳神経回路を介して行動リズム位相を決定しているのかについては、まったく未解決の問題であった。

2. 研究の目的

本研究では、日本で先駆けて実験系統を確立したナイルグラスラット (*Arvicanthis Niloticus*) を用いて、昼行性行動リズムの発現機構を発光イメージングにより解析する。

3. 研究方法

先行研究 (挑戦的研究 [萌芽] 18K19330) により、ナイルグラスラット時計遺伝子 (*Per1,2/Bmal1/Clock*) 配列などのゲノム情報を解読しているため、本研究ではさらに、ナイルグラスラットの時計遺伝子ルシフェラーゼレポーターを作成し、これを用いて発光イメージング解析を進めた。またカルシウムイメージング法も用いて昼行性と夜行性動物の脳内位相転換点を明らかにすることを試みた。

4. 研究成果

(1) 昼行性ナイルグラスラットの *Bmal1* 遺伝子プロモーター領域の下流にルシフェラーゼ遺伝子を挿入したレポーターを作成した。また、ナイルグラスラットの肺から単離した線維芽細胞にレポーターを安定発現させたモデル細胞株を樹立した。この細胞では約 24 時間周期の発光リズムが観察された。また、この細胞では、ヒトの光による位相反応と相似したアドレナリン刺激による位相反応が観察された。

(2) SCN ニューロンの 1 次投射先である室傍核下部領域の腹側 (vSPZ) において、ナイルグラスラットの GABA 応答性が強い抑制性の応答であるのに対し、夜行性マウスでは興奮性の応答が得られることが明らかとなった。

(1) については論文発表準備中である。また、AAV ベクターを用いた脳組織へのレポーター遺伝子の発現実験は継続中である。

(2) については、夜行性と昼行性のスイッチング機構として、視床下部 SPZ 領域の GABA 応答が重要であることを示唆している。この内容は、2023 年の日本時間生物学会において優秀演題賞を受賞している。また現在、生物学分野の TOP10% 論文に投稿しリバイズ中である。体内時計の仕組みは、これまで主に中枢振動体の振動機構を中心に研究されてきたが、本研究により、ヒトにおいて大きな社会問題として捉えることができる夜型行動が、視交叉上核の投射先の GABA 興奮性により出現する可能性が示唆された。

ここではいくつかの代表的な結果について図示する。

(1) ナイルグラスラット *Bmal1* レポーターを強制発現させたナイルグラスラット由来モデル細胞の作製と解析

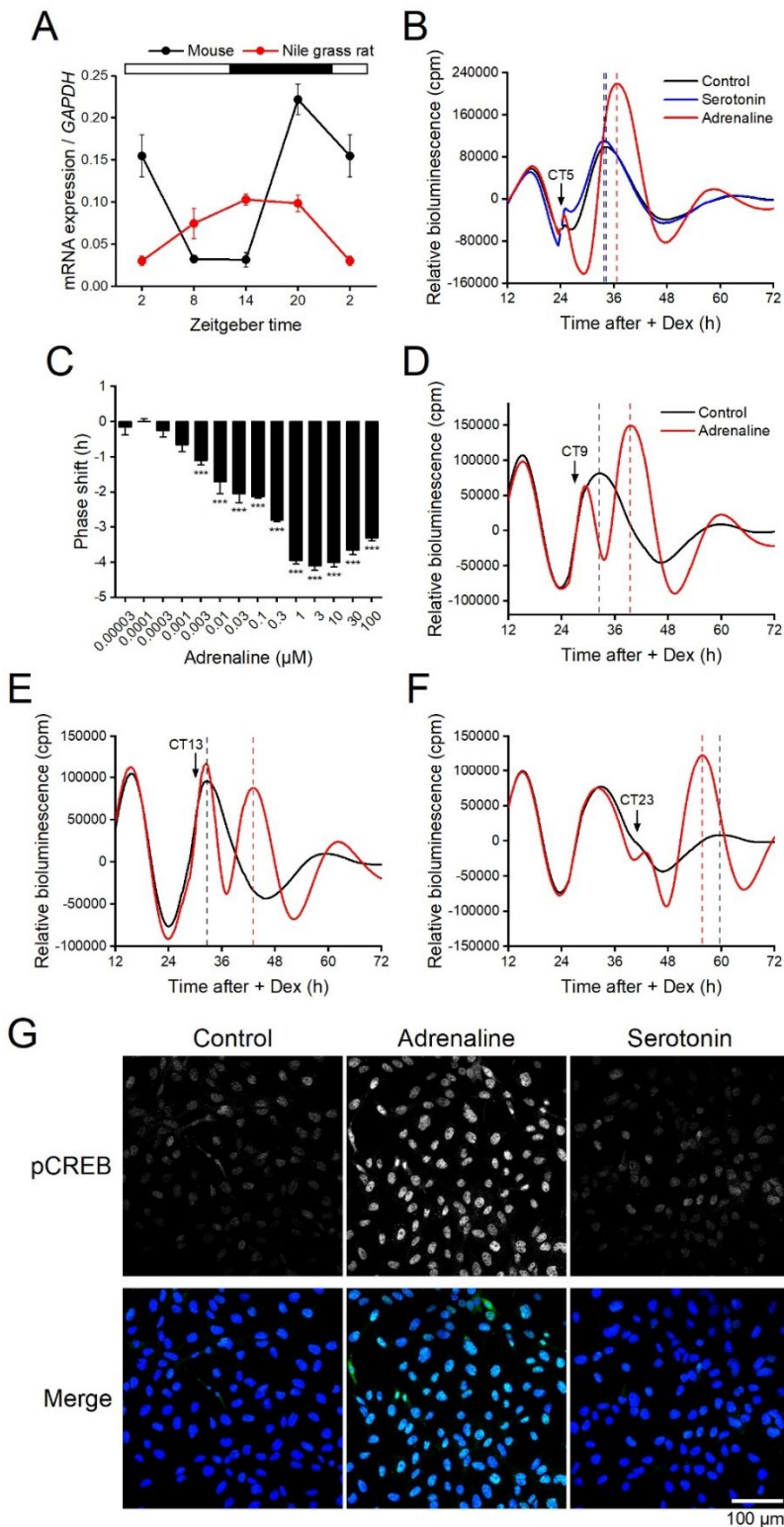


図1 A. マウスとナイルグラスラットの肺組織の Bmal1 の転写リズムの比較．ほぼ逆相の転写リズムが観察される．B. 作成した肺線維芽細胞の Bmal1 転写リズムを発光レポーターで解析した．デキサメタゾン (Dex) 処理後に約 24 時間のリズムが観察される．なお CT5 時でのアドレナリン刺激は転写リズムを後退させた．C. 位相変異に対するアドレナリンの用量依存性．D, E のように主観的昼から夜の前半でのアドレナリン刺激は位相を後退させるのに対し，F のように主観的夜の後半での刺激は位相を前進させる．G. なお，アドレナリン刺激は転写因子 CREB のリン酸化を引き起こすこともあきらかとなった．位相変異を惹起しないセロトニンの刺激ではリン酸化 CREB の上昇は見られなかった．

(2) ナイルグラスラット視床下部 GABA の可視化と応答解析

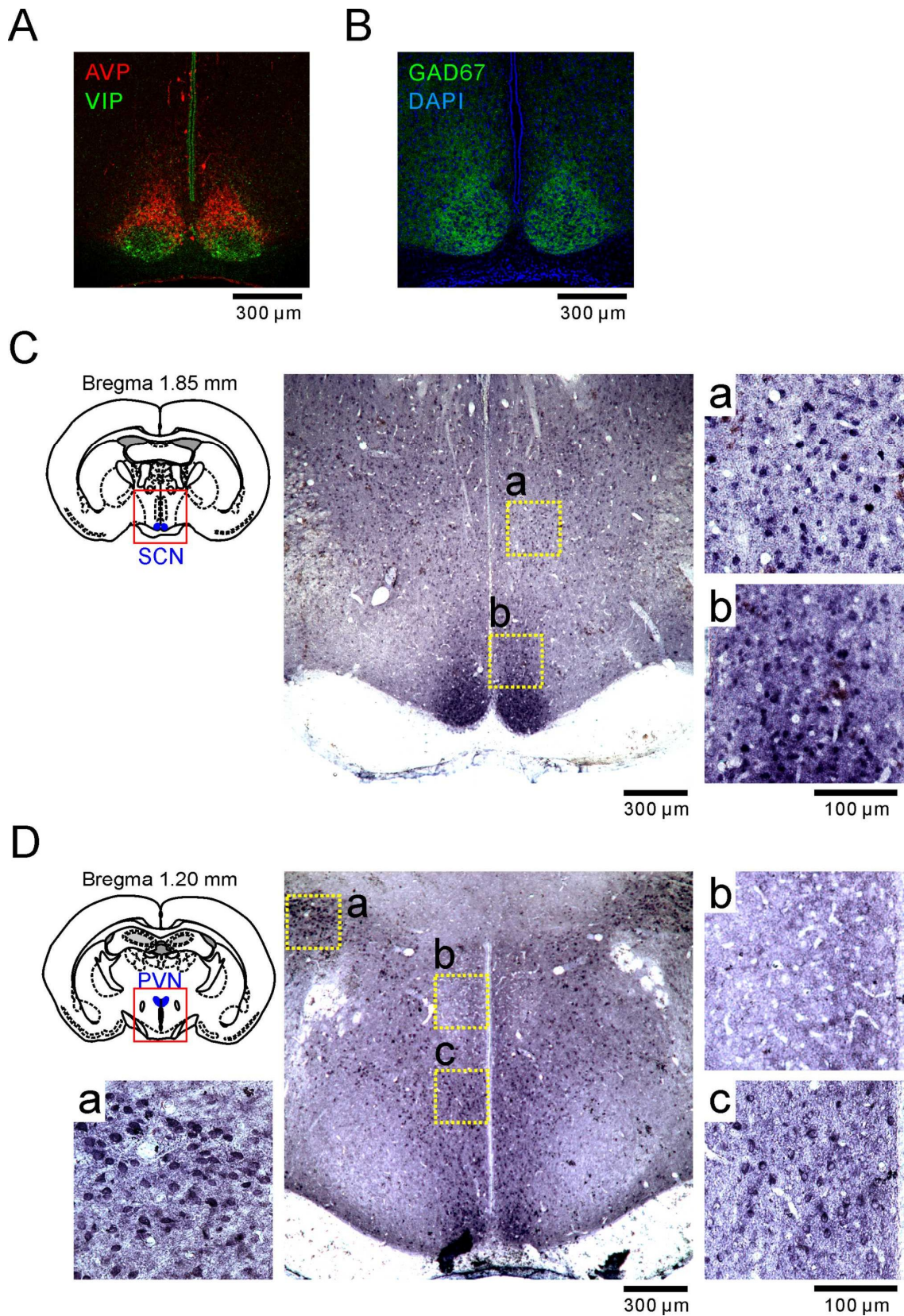


図2 ナイルグラスラット視床下部の免疫組織学的解析 . A . 抗 AVP/VIP 抗体を用いた免疫蛍光 2 重染色画像 . B . GABA 合成酵素 (GAD67) 抗体を用いた免疫蛍光画像 . C-D . 抗 GABA 抗体を用いた免疫染色画像 . SCN は GABA の合成酵素が局在し、GABA を神経伝達物質として内包することがわかる . また、SCN の 1 次投射先として知られる室傍核 PVN (D-b) は GABA をほとんど内包しないが、その下部領域である SPZ (C-a, D-c) は内包するニューロンが点在することがわかる .

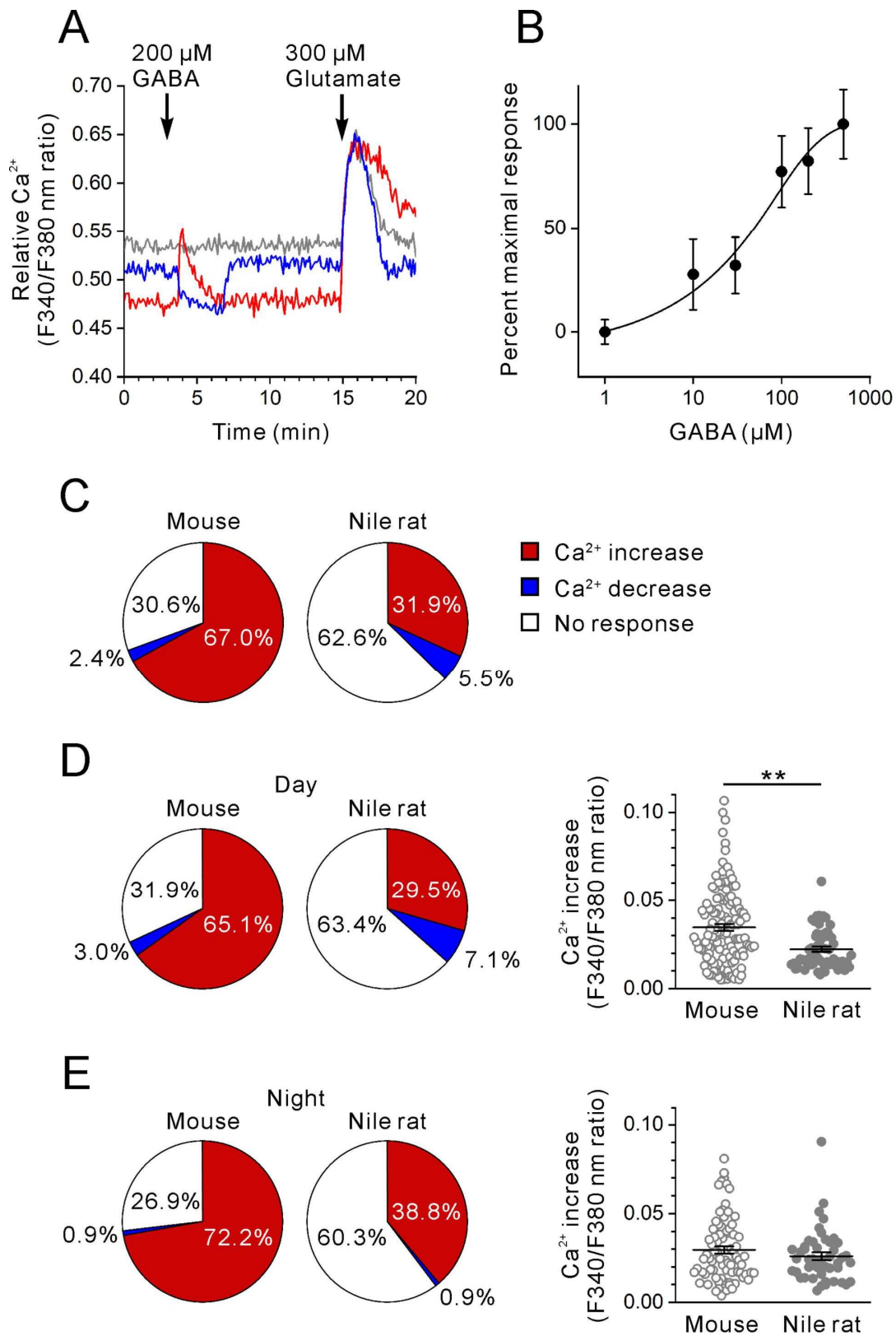


図3 SPZ 脳スライスのカルシウムイメージング結果 . Fura-2 カルシウムイメージングにより GABA 応答を解析した。A. ナイルグラスラット SPZ では GABA 刺激は細胞内 Ca^{2+} の増加応答と減少応答を引き起こすことが明らかとなった。B. は増加応答における GABA 濃度依存性を示している。実験は 2 次的な応答を抑えるためにすべて TTX 存在下で行った。C. 夜行性マウスと昼行性ナイルグラスラットでの応答数の割合比較。夜行性では Ca^{2+} 増加応答が大きいことがわかる。これらの応答を昼 (D) および夜間 (E) に観察した場合の割合を示した。種差による応答性の違いは、昼夜を問わず観察されることがわかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Morioka E, Kasuga Y, Kanda Y, Moritama S, Koizumi H, Yoshikawa T, Miura N, Ikeda M, Higashida H, Holmes TC and Ikeda M	4. 巻 39
2. 論文標題 Mitochondrial LETM1 drives ionic and molecular clock rhythms in circadian pacemaker neurons	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 110787
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2022.110787	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 Morioka E, Miyamoto T, Tamogami S, Koketsu T, Kim J, Yoshikawa T, Mochizuki T, and Ikeda M	4. 巻 792
2. 論文標題 Action potential firing rhythms in the suprachiasmatic nucleus of the diurnal grass rat, <i>Arvicanthis niloticus</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Neuroscience Letters	6. 最初と最後の頁 136954
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neulet.2022.136954	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 森岡絵里, 池田真行	4. 巻 Vol. 39 No. 5.
2. 論文標題 <個人差の理解へ向かう肥満症研究～GWAS、エピゲノム、腸内細菌、栄養学的知見から多様な病態を解明しPrecision Medicineをめざす> 第2章 2. 摂食抑制ペプチドとしてのコレシストキニンとレプチンの相互作用.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 実験医学 増刊.	6. 最初と最後の頁 66-71
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 2件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Tamogami S, Koizumi H, Kasuga Y, Nakagawa S, Igarashi M, Morioka E, Yoshikawa T, Mochizuki T and Ikeda M
2. 発表標題 Physiological and comparative analysis of suprachiasmatic nucleus neurons in the diurnal grass rat, <i>Arvicanthis niloticus</i> .
3. 学会等名 Sapporo Symposium on Biological rhythm 2022（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tamogami S, Nakagawa S, Kasuga Y, Morioka E, Yoshikawa T, Mochizuki T and Ikeda M
2. 発表標題 Differential GABAergic Ca ²⁺ responses in the hypothalamic ventral subparaventricular zone of the diurnal grass rat, <i>Arvicanthis niloticus</i>
3. 学会等名 The Society of Neuroscience Annual Meeting (北米神経科学会2022) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田母神さくら, 桶屋美帆, 天野広夢, 小泉隼人, 森岡絵里, 望月貴年, 池田真行
2. 発表標題 明期照明強度が昼行性グラスラット (<i>Arvicanthis niloticus</i>) の睡眠覚醒行動に及ぼす影響
3. 学会等名 第29回日本時間生物学会学術大会 (ポスター発表)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 池田真行
2. 発表標題 ミトコンドリアLetm1による体内時計ペースメーカーニューロンの振動制御: その発見に至るまで
3. 学会等名 第29回日本時間生物学会学術大会 (シンポジウム講演) (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 池田 真行
2. 発表標題 カドミウム毒性から考える体内時計と金属毒性制御との密接な関係
3. 学会等名 日本毒性学会 生体金属部会主催 メタルバイオサイエンス研究会2021 講演 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森井 文湖, 小泉 隼人, 五十嵐 美久, 多母神 さくら, 今野 紀文, 森岡 絵里, 望月 貴年, 池田 真行
2. 発表標題 Cloning and characterization of clock genes in African grass rat (<i>Arvicanthis niloticus</i>)
3. 学会等名 第28回日本時間生物学会学術大会 (ポスター発表)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 春日 佑介, 池田 翔也, 中川 修造, 中込 華加, 森岡 絵里, 望月 貴年, 池田 真行
2. 発表標題 Behavioral and neuronal activity rhythms in African grass rat (<i>Arvicanthis niloticus</i>)
3. 学会等名 第28回日本時間生物学会学術大会 (ポスター発表)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 池田 翔也, 中込 華加, 田母神 さくら, 桶屋 美帆, 小泉 隼人, 森岡 絵里, 望月 貴年, 池田 真行
2. 発表標題 アフリカ原産ナイルグラスラット (<i>Arvicanthis niloticus</i>) の睡眠覚醒行動と脳内c-Fos発現の解析
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会 (ポスター・オンライン発表)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 池田 真行, 森岡 絵里
2. 発表標題 ミトコンドリア・カチオンアンチポーターLetm1を介した 体内時計ペースメーカーの振動制御
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会公募シンポジウム「体内時計の静的持続性と動的適応性を基盤とする生理機能」講演
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
研究分担者	仲村 朋子 (吉川朋子) (Nakamura Tomoko) (30451397)	富山大学・学術研究部教育研究推進系・准教授 (13201)	
研究分担者	今野 紀文 (Konno Norifumi) (50507051)	富山大学・学術研究部理学系・講師 (13201)	
研究分担者	森岡 絵里 (Morioka Eri) (80756122)	富山大学・学術研究部理学系・助教 (13201)	

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