

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：37116

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790243

研究課題名(和文) 生体リズム形成における視交叉上核バゾプレッシンニューロンの役割解明と光遺伝学応用

研究課題名(英文) The role of the vasopressin neuron in the suprachiasmatic nucleus for circadian rhythm

研究代表者

丸山 崇 (MARUYAMA, Takashi)

産業医科大学・医学部・助教

研究者番号：20533194

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：バゾプレッシンは血圧や体液調節を担う神経ペプチドとして知られているが、視交叉上核の背内側部にも細胞体が存在し、生体リズム機構に何らかの役割を持っていると考えられている。本研究では、バゾプレッシン-改変緑色蛍光タンパク融合遺伝子トランスジェニックラットの視交叉上核ニューロンを急性単離し、緑色蛍光を指標にバゾプレッシンニューロンを同定した上でホールセルパッチクランプ法により電気生理学的特性を検討した。単離を行う時刻によって、アミノ酪酸(GABA)に対する電流の方向性に相違が認められた。バゾプレッシンニューロンの細胞内Cl<sup>-</sup>イオンに日内変動があり、GABAに対する反応性が変化していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Arginine vasopressin (AVP) is well known as a peptide concern to adjust body fluid and blood pressure. AVP neuron is also located in the dorsomedial parts of the suprachiasmatic nucleus (SCN) which is the central circadian rhythm generator and considered to have some role in generating circadian rhythm. We used the AVP-eGFP transgenic rat and investigated the electrophysiological property of AVP neuron in the SCN. Our study showed that AVP neurons response to GABA are different in case of dissociated time. It is possible that AVP neuron in the SCN has a electrophysiological circadian rhythm that depends on intracellular chloride ion concentration.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・環境生理学(含体力医学・栄養生理学)

キーワード：サーカディアンリズム バゾプレッシン 視交叉上核 GABA

### 1. 研究開始当初の背景

生体リズムの中核として知られる視交叉上核(Suprachiasmatic nucleus:SCN)は、視床下部に位置し、時計遺伝子が周期的に発現し、睡眠・覚醒や体温変化などの約 24 時間の概日リズム(サーカディアンリズム)を形成している。この SCN にはバゾプレッシン(AVP)、血管作動性腸管ペプチド(VIP)、ガストリン放出ペプチド(GRP)といった神経ペプチドを産生するニューロンが局在しており(図 1)、生体リズムの形成に何らかの役割を果たしていると考えられている。

私が特に注目した AVP は、視索上核や室傍核に局在する細胞体で産生され、下垂体後葉に投射した軸索終末より血中に分泌されて血压や体液調節を行うペプチドとして知られている。一方、AVP ニューロンの細胞体は SCN の背内側部にも局在し、生体リズムを制御する出力系の一つと考えられている(図 1)。しかし、その詳細は分かっておらず、機能解明が求められるところであった。

私の所属する研究室では、AVP-改変緑色蛍光タンパク(eGFP)トランスジェニックラットを作成し、GFP 蛍光を指標に AVP ニューロンの生理機能を解明してきた (Ueta et al., *Endocrinology* 2005)。これまでの研究により、SCN に局在する AVP ニューロンは、疼痛刺激や浸透圧刺激に対しては反応しない (Suzuki et al., *J Neurosci* 2009; Fujio et al., *J Neuroendocrinol* 2006)ことや、SCN における AVP mRNA および eGFP mRNA の発現は日内変動を持ち、時計遺伝子(Per1,Per2)との相関も野生型ラットと相違ないことを確認していた (Maruyama et al., *Peptides* 2010)。

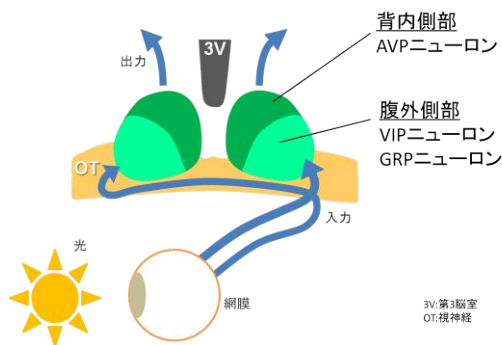


図 1. 視交叉上核(SCN)の構造(入力・出力)と SCN に存在する神経ペプチド産生ニューロン

### 2. 研究の目的

AVP-eGFP トランスジェニックラットを用いて SCN の AVP ニューロンを GFP 蛍光を指標として同定し、電気生理学的手法によって神経活動を観察し、SCN の AVP ニューロンの出力の生理機構を検討する。最終的には、生体リズムにおける SCN の AVP ニューロンの生理的役割を解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

成熟雄および雌性 AVP-eGFP トランスジェニックラットを 12 時間/12 時間の明暗サイクルの環境下で飼育して実験に用いた(明期の始まりである 7:00 を ZT0 とした)。頸椎脱臼後にラットの脳をすばやく取り出し、SCN を含む脳スライス標本を厚さ 500 $\mu$ m で作成した。SCN のみをパンチアウトし、酵素処理により急性単離を行った。単離ニューロンを培養し、その後、GFP 蛍光を指標として AVP ニューロンを同定し、ホールセルパッチクランプ法により電気的活動を記録した(図 2)。単離時刻を変えることにより、電気的活動の変化を観察した。特に アミノ酪酸(GABA)に対する電気的活動の変化を観察した。

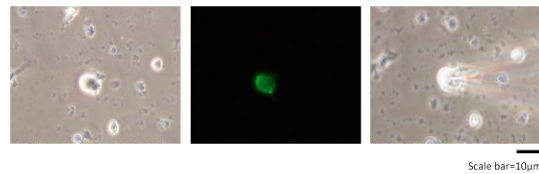


図 2. 緑色蛍光(GFP)による AVP ニューロンの同定とホールセルパッチクランプ法による記録

### 4. 研究成果

< 結果 >

#### 各単離時刻における AVP ニューロンの GABA への反応性の違い

GABA 60 $\mu$ M に対して、単離時刻 ZT2(9:00)では外向き電流(図 3)、単離時刻 ZT10(17:00)と ZT17(24:00)では内向き電流(図 4,5)が記録された。

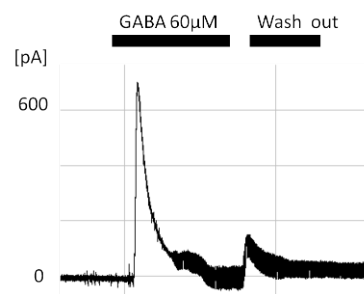


図 3. ZT2(9:00)に単離した AVP ニューロンの GABA に対する反応

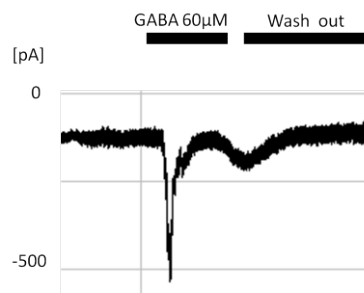


図 4. ZT10(17:00)に単離した AVP ニューロンの GABA に対する反応

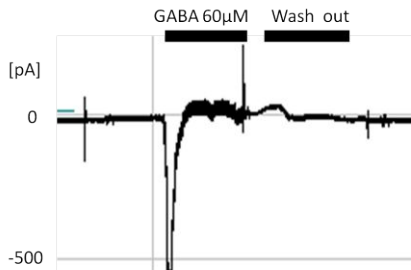


図5. ZT17(24:00)に単離した AVP ニューロンの GABA に対する反応

<結果>

Picrotoxin による GABA receptor の阻害

これらの GABA 電流は Picrotoxin(50μM)によって抑制された(図6)。

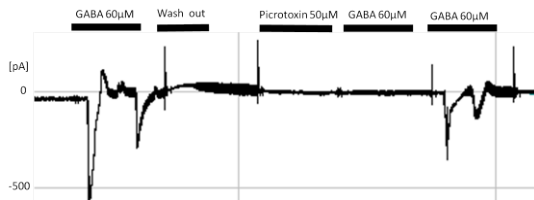


図6. Picrotoxin による GABA 反応の抑制

<考察>

今回の研究により、SCN に局在する AVP ニューロンは単離するタイミングによって GABA に対する反応性が異なることが分かった。GABA への反応性が異なる理由として、SCN の AVP ニューロンに存在する  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$  共輸送体の機能が時刻により変化することで SCN 細胞内の  $\text{Cl}^-$  濃度に日内変動がある(Choi et al., J Neurosci 2008)ためと考えられる。

細胞内  $\text{Cl}^-$  濃度が高い場合は、 $\text{GABA}_A$  receptor( $\text{Cl}^-$ チャネル)が開くと、 $\text{Cl}^-$ は細胞内から細胞外に移動し、細胞内  $\text{Cl}^-$ 濃度が低い場合は、 $\text{GABA}_A$  receptor( $\text{Cl}^-$ チャネル)が開くと  $\text{Cl}^-$ は細胞外から細胞内に移動するため、GABA に対する反応が脱分極する場合と過分極する場合がある(図7)。これにより GABA の反応性が変化していることが一つの要因として考えられる。

$\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$  共輸送体の機能が日内変動を持つことによって、AVP ニューロンの反応性が異なることで、SCN の腹外側からの情報入力に対して AVP ニューロンがゲート機能を持って生体リズムのコントロールに関わっていることが考えられる。

今回、SCN の AVP ニューロンにおいて単離する時刻により GABA への反応性の違いがあることが確認できた。しかし、どの時間に単離すれば内向き電流になるか、外向き電流になるかといった単離時間による反応の規則性は確認できなかった。AVP ニューロンの反応性の日内変動の規則性を確かめるためには、今後更にサンプル数を増やし、統計

的な傾向を検討する必要がある。なお、SCN 内では細胞がネットワークを形成してリズムを形成しているため、個々の細胞の活動性には違いがあることが考えられる。したがって、単離細胞での電気生理学的特性の検討には限界もあることが考えられた。

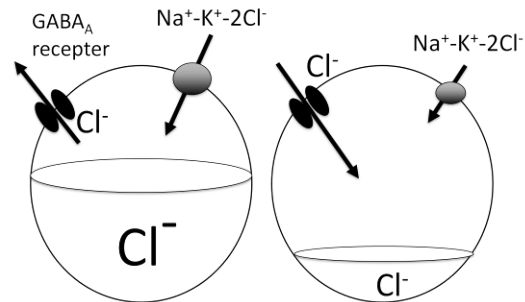


図7.  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$  共輸送体の機能変化と細胞内  $\text{Cl}^-$  の動態(仮説)

AVP の生体リズムへの関わりとしては、V1a 受容体および V1b 受容体のノックアウトマウスでは、明暗位相を前進あるいは後退させた際の時差ぼけ症状が少なく、行動や時計遺伝子の発現、体温の変動の概日リズムが新しい明暗環境に同調しやすいことが報告されている(Yamaguchi, Okamura et al., Science 2013)。AVP が生体リズムの乱れを防ぐ役割を果たす一方で、新しい明暗環境への同調を妨げるために、SCN や末梢の時計遺伝子の発現リズムと脱同調が生じ、時差ぼけ症状などの環境適応への障害が発生すると考えられる。今後、生体リズム構築における AVP ニューロンの役割や詳細なメカニズムが解明され、時差ぼけの治療やシフトワーク環境への早期適応、概日リズム障害の改善などへの応用が期待できる。

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)

〔学会発表〕(計1件)

丸山 崇、吉村充弘、松浦孝紀、大久保淳一、橋本弘史、上田陽一  
生体リズムにおける視交叉上核バゾプレッシンニューロンの役割解明～遺伝子改変動物を用いた検討～  
2013年10月26日  
産業医科大学学会(福岡県北九州市)

6. 研究組織

(1)研究代表者  
丸山 崇 (MARUYAMA, Takashi)  
産業医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 20533194

(2)研究協力者  
上田 陽一 (UETA, Yoichi)

産業医科大学・医学部・教授  
研究者番号：10232745