

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月20日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08222

研究課題名(和文) 物理的結合を介した時刻情報伝達機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the structures that deliver the circadian rhythm from suprachiasmatic nucleus to neighboring brain regions via physical connection

研究代表者

升本 宏平 (MASUMOTO, Koh-hei)

山口大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：60580529

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：体内時計の中樞は脳内視床下部に存在する視交叉上核である。時刻情報が視交叉上核から室傍核領域へどのような物理的結合を介して伝えられているか明らかにするために、Per2::lucノックインマウスの脳組織片を用いた組織培養系で室傍核領域と視交叉上核の発光振動測定を行った。その結果、室傍核領域と視交叉上核の同期には神経連絡を介した時刻情報の伝達が必要であることが示唆された。また室傍核領域と視交叉上核間の位相差にはGABAが重要であることが示唆された。今後はGABAが動物個体の概日振動の位相に与える影響を検証していくと共に、概日振動の振幅、周期の情報を担う物質の同定を進める予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

視交叉上核と室傍核間の時刻情報伝達機構を解明することによって、様々な脳領域間での伝達機構を解明し、脳全体として概日時計がどのように統合されているか明らかにすることができる。

本研究によってGABAは室傍核領域と視交叉上核間の概日振動の位相差に影響を与えていることが示唆された。夜行性・昼行性動物の視交叉上核における概日振動の位相は同じである一方で、視交叉上核外の概日振動の位相は夜行性・昼行性動物では逆転している。細胞内Cl⁻濃度によってGABA受容体の反応は興奮性/抑制性が変化することを加味すると今回得られた結果は、昼行性、夜行性動物の活動時刻逆転現象を解明する大きな手掛かりになったと言える。

研究成果の概要(英文)：The suprachiasmatic nucleus (SCN) is the center of circadian clock. In order to delineate what biological structures transmit circadian rhythm to paraventricular nucleus (PVN) and subparaventricular zone (SPZ) from the SCN via physical connection, we observed the coherence between the circadian rhythms in the SCN and PVN/SPZ by monitoring bioluminescence emitted from brain tissue slice from Per2::luc knock-in mice. Our present results suggest that the synchronization of the SCN and PVN/SPZ requires transmission of circadian rhythm via neural communication, and GABA is important for the phase difference between the two regions. In the future, we will reveal the effect of GABA on the phase of circadian oscillations of the mouse locomotor activity, and will identify factors involved in the amplitude and period of circadian oscillation.

研究分野：時間生物学

キーワード：神経連絡 軸索伸長 体内時計 視交叉上核 室傍核

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

研究代表者はこれまでに哺乳類の時間生物学について研究を行ってきた。哺乳類の体内時計中枢である視交叉上核の培養組織において体内時計の周期延長化合物の発見や、視交叉上核組織培養系における位相反応測定系を確立した。また生体マウスを用いて視交叉上核における振動遺伝子及び光応答遺伝子の網羅的発現解析を行った。さらにマウス脳 51 領域で網羅的遺伝子発現解析を行い、脳領域特異的発現遺伝子を明らかにした。研究代表者はこれらの研究を通じて、視交叉上核が各脳領域とどのようなネットワークを構築し、どのように各脳領域の概日振動を制御しているのか疑問を持つに至った。

室傍核領域(室傍核と室傍核下部領域)は視交叉上核の背側部に隣接し、視交叉上核からの投射が存在する。また視交叉上核からの制御が及ぶ領域の多くは室傍核領域を経由する。そのため室傍核領域は視交叉上核からの情報を受け、自身が発振する概日振動の位相を修飾し、他領域に出力していると考えられている。したがって、視交叉上核による脳領域の概日振動制御を解明するには、まず視交叉上核がどのように室傍核領域の概日振動を制御しているのかを明らかにする必要がある。

そこで視交叉上核から室傍核領域への時刻情報伝達機構を解明すべく、mPer2::Luc ノックインマウスの脳組織片を用いた組織培養系において発光振動を測定した。同一組織片において視交叉上核と室傍核領域の発光振動は逆位相であった。室傍核領域のみを培養すると発光振動は数日で減衰消滅したが、視交叉上核を移植し共培養すると室傍核領域に安定した長期の発光振動が現れた(Figure 1)。さらに室傍核領域で回復した発光振動は視交叉上核と逆位相であった。

これらの所見は共培養によって視交叉上核と室傍核領域の概日振動が同期したこと及び個体に存在する視交叉上核と周辺領域の同調に必要な情報伝達機構が再構成されたことを示唆する。この時、組織結合領域にはグリア細胞と軸索の伸長が確認された。また室傍核領域の振動の回復には視交叉上核移植後に日数を要することから、時刻情報伝達には液性因子ではなく物理的結合が重要であると考えられる。

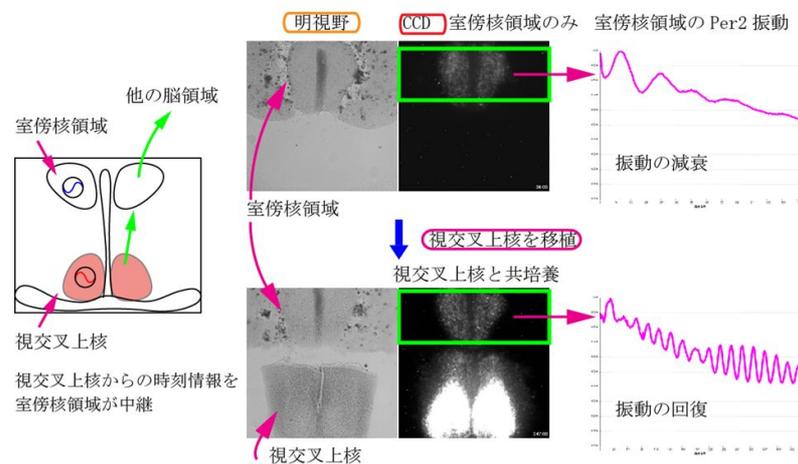


Figure 1 脳組織片移植培養系における概日振動回復

2. 研究の目的

本研究では視交叉上核と室傍核領域の物理的結合を介した時刻情報伝達機構について明らかにする。そのために移植実験後、室傍核領域と視交叉上核間の結合領域に存在する、神経連絡、グリア細胞がどのような機能を担っているのか明らかにする。具体的には時刻情報伝達機構が、概日振動の回復と維持、周期の同調、位相の同期から構成されると考え、神経連絡及びグリア細胞がそれぞれ何を制御しているのか明らかにする。また時刻情報伝達の中継及び受容に概日時計は必要であるかということも明らかにする。

3. 研究の方法

(1) グリア細胞の時刻情報伝達機構に対する影響の検証

時計遺伝子 Per2 のプロモータにルシフェラーゼを結合させた mPer2::Luc ノックインマウスから採取した室傍核領域組織片と視交叉上核組織片を同一メンブレン上で 1mm 程度の隙間を空けて共培養を行った。その後、室傍核領域組織片と視交叉上核組織片の隙間を埋めるように、mPer2::Luc ノックインマウスから採取したグリア細胞をまき、さらに共培養を行った。そして、高感度 CCD カメラ及び微弱発光測定装置を用いて室傍核領域および視交叉上核の発光振動の測定を行った。

(2) 網羅的遺伝子発現解析のデータベースを用いた候補遺伝子の探索

我々の研究で得られた脳 51 領域の網羅的遺伝子発現解析データベース (<http://brainstars.org/>) を参照して行った。これにはリガンド・レセプターの発現量に基づいて領域間の連絡を推測した情報が含まれるので、視交叉上核で発現し、その受容体が室傍核領域にあるものを候補とした。実際に受容体が室傍核領域で発現していることを確認するために *in situ* hybridization 法を用いた。

(3) 候補因子の機能検証

候補因子の機能検証のために、培養中の室傍核領域および視交叉上核を含んだ mPer2::Luc ノッ

クインマウス脳組織片に対して、受容体阻害剤または Cl^- トランスポーター阻害剤を添加し機能抑制を試みた。そして概日振動への影響を高感度 CCD カメラ及び微弱発光測定装置を用いて測定した。

4. 研究成果

(1) グリア細胞による時刻情報伝達機構の解明

神経連絡及びグリア細胞が時刻情報伝達機構の何を制御するか解明するために室傍核領域と視交叉上核の間に隙間を空けて共培養し、視交叉上核と室傍核領域由来のグリア細胞を添加、その後発光振動を測定した。その結果、室傍核領域全体の振動は回復せず、また一細胞レベルの振動もすぐに減衰、消失した(Figure 2)。このことから室傍核領域と視交叉上核の同期には神経連絡を介した時刻情報の伝達が必要であると考えられた。

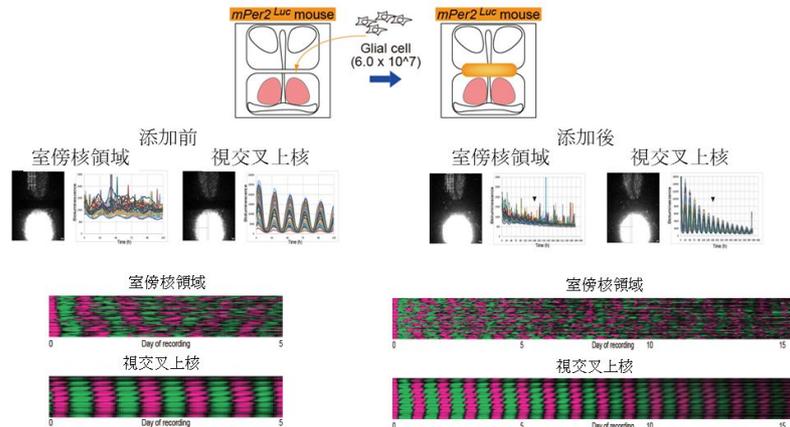


Figure 2 グリア細胞による時刻情報伝達機構に対する影響の検証

(2) 振動回復を担う候補因子の探索

次に神経連絡を介して振動の回復を担う候補因子の探索のために、網羅的遺伝子発現解析のデータベースを参照した。視交叉上核で発現し、且つその受容体が室傍核領域にあるものを検索した結果、 γ -aminobutyric acid (GABA) が候補として浮かび上がってきた。実際に GABA 受容体が室傍核領域に発現していることは報告されている。

(3) 候補因子の機能検証

受容体阻害剤による機能抑制

時刻情報伝達因子の候補として GABA に注目し、その機能検証のために受容体阻害剤による機能抑制を室傍核領域と視交叉上核を含んだ脳組織片に試みた。その結果、室傍核領域と視交叉上核間の振動の位相差が減少した(Figure 3)。このことは同定した因子が室傍核領域と視交叉上核間の位相差を作り出している事を示唆する。

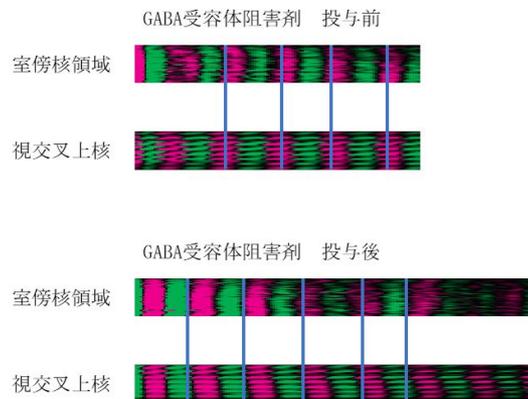


Figure 3 GABA受容体阻害剤による位相差の減少

細胞内 Cl^- 濃度の変化による影響

GABA 受容体の阻害剤投与実験から、GABA は室傍核領域と視交叉上核間の位相差に関与することが示唆されたので、さらに GABA について検証を行った。細胞内 Cl^- 濃度によって GABA 受容体の反応は興奮性/抑制性が変化することが知られている。そこで細胞内 Cl^- 濃度を変化させるのに重要な Cl^- トランスポーターの働きを、阻害剤を用いて抑制した。その結果、視交叉上核と室傍核領域の振動の位相差が減少した(Figure 4)。この Cl^- トランスポーターが室傍核領域および視交叉上核に発現していることを、*in situ* hybridization 法を用いて確認した。

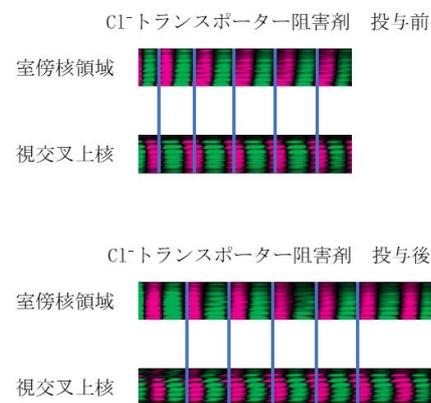


Figure 4 Cl^- トランスポーター阻害剤による位相差の減少

以上の結果、視交叉上核から室傍核領域への時刻情報伝達には神経連絡を介する必要があることが示唆された。また神経連絡を介して時刻情報を伝える因子として GABA が重要であることが示唆された。GABA は室傍核領域と視交叉上核間の概日振動の位相差に影響を与えており、このことは夜行性・昼行性動物の視交叉上核における概日振動の位相は同じである一方で、視交叉上核外の概日振動の位相は夜行性・昼行性動物では逆転しているという現象を説明する手がかりになる可能性がある。今後は GABA が動物個体の概日振動の位相に与える影響を検証してい

くと共に、概日振動の振幅、周期の情報を担う物質の同定を進める予定である。

<引用文献>

- Yasushi Isojima et al. CKI / -dependent phosphorylation is a temperature-insensitive, period-determining process in the mammalian circadian clock, Proc Natl Acad Sci U S A, Vol. 106, No. 37, 2009, pp.15744-9.
- Takeya Kasukawa, Koh-hei Masumoto et al. Quantitative Expression Profile of Distinct Functional Regions in the Adult Mouse Brain, PLoS one, Vol. 6, No. 8, 2011, e23228.
- Valérie S. Fénelon and Allan E. Herbison, Plasticity in GABAA receptor subunit mRNA expression by hypothalamic magnocellular neurons in the adult rat, Journal of Neuroscience, Vol. 16, No. 16, 1996, pp. 4872-80.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

- Wroblewski Gregory, Islam Md. Nabiul, Yanai Akie, Jahan Mir Rubayet, Masumoto Koh-hei, Shinoda Koh
Distribution of HAP1-immunoreactive Cells in the Retrosplenial-retrohippocampal Area of Adult Rat Brain and Its Application to a Refined Neuroanatomical Understanding of the Region
Neuroscience. 査読有、Vol. 394, 2018, pp. 109-126.
DOI: 10.1016/j.neuroscience.2018.10.029
- Yasutaka Niwa, Genki N. Kanda, Rikuhiko G. Yamada, Shoi Shi, Genshiro A. Sunagawa, Maki Ukai-Tadenuma, Hiroshi Fujishima, Naomi Matsumoto, Koh-hei Masumoto, Mamoru Nagano, Takeya Kasukawa, James Galloway, Dimitri, Perrin, Yasufumi Shigeyoshi, Hideki Ukai, Hiroshi Kiyonari, Kenta Sumiyama, Hiroki R. Ueda
Muscarinic Acetylcholine Receptors Chrm1 and Chrm3 Are Essential for REM Sleep
Cell Reports. 査読有、Vol. 24, No. 9, 2018, pp. 2231-2247.
DOI: 10.1016/j.celrep.2018.07.082
- Mitsugu Sujino, Takeshi Asakawa, Mamoru Nagano, Satoshi Koinuma, Koh-hei Masumoto, Yasufumi Shigeyoshi
CLOCK 19 mutation modifies the manner of synchrony among oscillation neurons in the suprachiasmatic nucleus
Scientific Reports. 査読有、Vol. 8, No. 1, 2018, pp. 854.
DOI: 10.1038/s41598-018-19224-1
- Atsuko Kubo, Mitsugu Sujino, Koh-hei Masumoto, Atsuko Fujioka, Toshio Terashima, Yasufumi Shigeyoshi, Mamoru Nagano
Profiles of Periglomerular Cells in the Olfactory Bulb of Prokineticin Type 2 Receptor-deficient Mice
Acta Histochemica et Cytochemica. 査読有、Vol. 50, No. 2, 2017, pp. 95-104.
DOI: 10.1267/ahc.17001

[学会発表](計7件)

- 升本宏平、マウス HAP1 陽性嗅覚遊走性胎生細胞の胎生期脳内移動形態と HAP1 欠損マウスにおける GnRH 陽性細胞脳内移動、第 124 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2019 年
- Islam Md Nabiul、Novel utility of HAP1-immunoreactivity in areal and laminar demarcation of the retrosplenial-retrohippocampal area in adult rat brain、第 124 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2019 年
- 篠田晃、STB/HAP1 のユビキチン プロテアソーム系阻害型細胞死に対する特異的神経細胞保護効果、日本解剖学会第 73 回中国・四国支部学術集会、2018 年
- Islam Md Nabiul、Effects of testosterone on androgen receptor expression and the dynamics of intrinsic plasticity in CA1 pyramidal neurons of male rat、日本解剖学会第 73 回中国・四国支部学術集会、2018 年
- 篠田晃、STB/HAP1 の神経細胞保護について、第 19 回 ORIGIN 神経科学研究会 夏のワークショップ 2018 in 淡路、2018 年
- 升本宏平、視交叉上核による時刻情報伝達機構の解明-共培養による神経連絡の回復-、第 7 回国際医療福祉大学学術大会、2017 年
- 升本宏平、視交叉上核による時刻情報伝達機構の解明、第 6 回国際医療福祉大学学術大会、2016 年

[図書](計0件)

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：篠田 晃

ローマ字氏名：SHINODA, Koh

研究協力者氏名：柳井 章江

ローマ字氏名：YANAI, Akie

研究協力者氏名：Md. Nabiul Islam

ローマ字氏名：Md. Nabiul Islam

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。