

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：13201

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19330

研究課題名(和文) ナイルグラスラットを用いた昼夜行動選択の機構解明

研究課題名(英文) Analysis of switching mechanisms for diurnal and nocturnal behaviors using Nile grass rats

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) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：ナイルグラスラット(*Arvicanthis niloticus*)の国内唯一の実験コロニーを用いて、以下の成果を得た。(i)同種の脳地図を作製した。(ii)時計遺伝子*Per1*、*Per2*、*Bmal1*、*Clock*、*Cry1*、*Cry2*の配列決定しGenBankに登録した。また、視交叉上核(SCN)や海馬における遺伝子発現プロファイルを明らかにした。さらに、これらの配列を別系統グラスラット(*Arvicanthis ansorgei*)の時計遺伝子と比較し、高い相同性を明らかにした。(iii)SCNの活動電位リズムを解析し、双峰性リズムを明らかにした。さらに(iv)AAVベクター微量注入の手法を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

進化的に、ヒトを含めたいくつかの動物は、昼行性を獲得し、行動範囲を拡大してきたと考えられている。一方で、現代のヒトの行動時間は、もはや昼行性と呼ぶにはあまりに自由度が大きく、昼夜逆転の生活を常とする場合も少なくない。昼夜逆転の生活は、社会生活への不適合を招くばかりか、多様な疾病を併発する場合も多い。よって、昼夜行動選択のメカニズムの理解は、健康の維持増進にとっても重要な問題である。本研究では、昼行性グラスラットの遺伝子解析、脳地図作成、および電気生理学的な解析を可能とし、今後の波及的な研究のために必要な基礎データを取得した意味において、その学術的・社会的意義は大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Using our laboratory colony of Nile grass rats (*Arvicanthis niloticus*), the present study successfully cloned clock genes, *Per1*, *Per2*, *Bmal1*, *Clock*, *Cry1*, *Cry2* in these rats. Also, circadian expression profiles of these genes were manifested in the suprachiasmatic nucleus (SCN) and hippocampus. In addition, sequences of clock genes were compared with those in other grass rat species (*Arvicanthis ansorgei*). Striking similarity was found for functional elements of clock genes. Electrophysiological experiments using grass rat brain slices demonstrated bimodal rhythms in spontaneous firing frequencies in SCN neurons. It was unlike a pattern of nocturnal rat SCN neurons (unimodal rhythms peak in the middle of daytime) and rather consistent with the behavioral rhythms of grass rats. We established experimental method for AAV vector microinjection in the hypothalamus of grass rats by referring originally-made grass rat brain map.

研究分野：時間生物学

キーワード：体内時計 時計遺伝子 昼行性行動 脳地図 電気生理学

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

地球の自転周期で変動する数多くの生命現象は、体内に存在する自律的な振動機構(体内時計)により調節されている。哺乳動物においては、特に、脳内の一群の神経細胞(視床下部視交叉上核:SCN)が、体内時計システムの中核として機能している。動物行動の昼夜行性を問わず、SCNの集合電位は、昼に高く、夜に低い概日リズムを示すことが示唆されており、これは光情報を興奮性神経入力として受けとる神経核の活動としては、きわめて自然な振る舞いであろう。しかし、おそらくは動物種に依存しないSCNのリズム出力から、どのように動物行動時間の多様性が生まれるのかについては、まだよく分かっていない。昼行性・夜行性というダイナミックな行動の時間選択の相違は、SCNニューロンの投射先におけるシグナル伝達の問題であると考えられるが、その実態については、ほとんど解析が進んでいない。

### 2. 研究の目的

こうした問題を考えるにあたり、昼行性と夜行性のげっ歯動物の比較は、有用な研究アプローチであろう。アフリカ原産の昼行性げっ歯動物(ナイルグラスラット; *Arvicanthis niloticus*)は、通常の実験飼育環境において昼行性行動を示すげっ歯動物であり、ミシガン州立大学のLaura Smale教授らにより、米国の一部の研究室において1994年ころより系統維持が始まっている。そこで、本研究では、ナイルグラスラットの実験系統の確立と繁殖を日本で初めて開始する。さらに、ナイルグラスラットの脳座標の決定や、脳スライス実験を行い、昼夜行性の決定に係る神経ネットワークの同定にもチャレンジする。また、ナイルグラスラット脳室内に、Cl<sup>-</sup>トランスポーター阻害剤であるブメタニドの投与を行い、興奮性GABA-A受容体応答を抑制性応答に転じた場合に、昼夜の行動パターンに変化がみられるのかについて解析を行う。さらに、ナイルグラスラット遺伝子解析にも繋げる予定である。これらを通して、新たな実験スタンダードとなる昼行性げっ歯動物の系統確立と、昼夜の行動選択メカニズムの解明を目指す。

### 3. 研究の方法

#### ナイルグラスラットの脳座標の決定や、脳スライス実験

成体雄のナイルグラスラットの骨標本を作製した。プレグマ・ラムダ縫合の位置関係を明らかにしたうえで、凍結冠状脳切片(厚さ40 $\mu$ m, 400枚)を吻側から尾側へと作成し、クレシルバイオレット染色した。うち80枚の切片から画像を取得しドローソフトを用いて輪郭を得た。

電気生理学実験には、明暗12:12時間の環境で維持した生後17-35日齢のナイルグラスラットを用いた。麻酔下で脳を摘出し、リニアスライサーを用いて急性脳スライスを作成した。人工脳脊髄液(3または5mM KClを含んだもの)をかん流しながら、細胞外記録により自発的に変化する電位変化を記録した。それぞれのKClグループにおいて、200-300 unitsを異なった時刻において記録し、自発発火頻度の概日リズム性を解析した。

#### ナイルグラスラットの側脳室内へのブメタニド微量注入実験

記録に前もって側脳室にガイドカニューレをインプラントした成体雄のナイルグラスラットを用いた。明暗12:12時間の環境において、赤外線センサーを用いて自発行動を測定後、暗期3時間前に、シリンジポンプを用いて生理的食塩水を0.1 $\mu$ l/minの流量で4分間、側脳室に注入した。5日目には同じ手法でブメタニド(500 $\mu$ M)を、9日目にはブメタニド(1 mM)を投与した。さらに記録後3日間にわたり自発行動を測定した。

#### ナイルグラスラット時計遺伝子配列の決定と転写リズム解析

まず、ナイルグラスラットに発現する主要時計遺伝子(*Per1*, *Per2*, *Bmal1*, *Clock*, *Cry1*, *Cry2*)コード領域の全長塩基配列を決定した。凍結視床下部ブロックをサンプルとし、マウスの各時計遺伝子配列を参考に設計したプライマーを用い、各時計遺伝子コード領域をRT-PCR法により増幅した。PCR断片をクローニングベクターにライゲーションし、シーケンサー(ABI PRISM 310 システム)を用いて配列を決定した。

転写リズム解析には、決定した各時計遺伝子の塩基配列をもとに設計したプライマーを使用した。4時間おきに凍結冠状脳切片(厚さ約100 $\mu$ m, SCN:3-5枚, 海馬:10枚)からSCNおよび海馬をパンチアウトし、*GAPDH*を内部標準としてリアルタイムRT-PCRを行い、各時刻における時計遺伝子の発現量を比較定量した。

### 4. 研究成果

結果については、図として以下にまとめた。

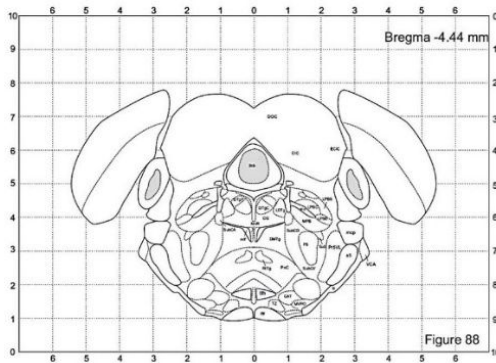
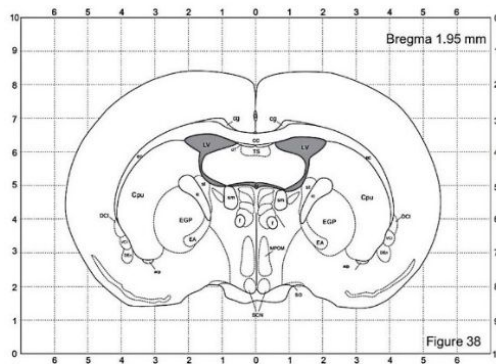
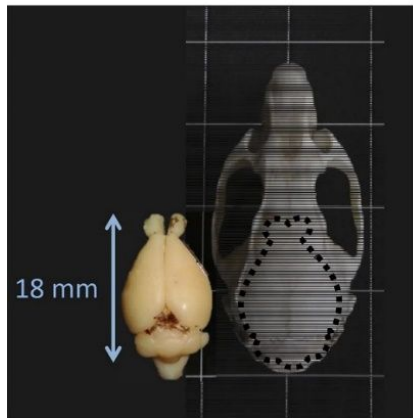


図1．ナイルグラスラット脳地図の作成．写真（左）の頭蓋骨標本を作製した。さらに連続脳切片を作成し、完成度の高い脳地図（右）を完成させた。ここでは2切片のドローモデル（右）を例示したが、こうした画像を計80枚作製している。

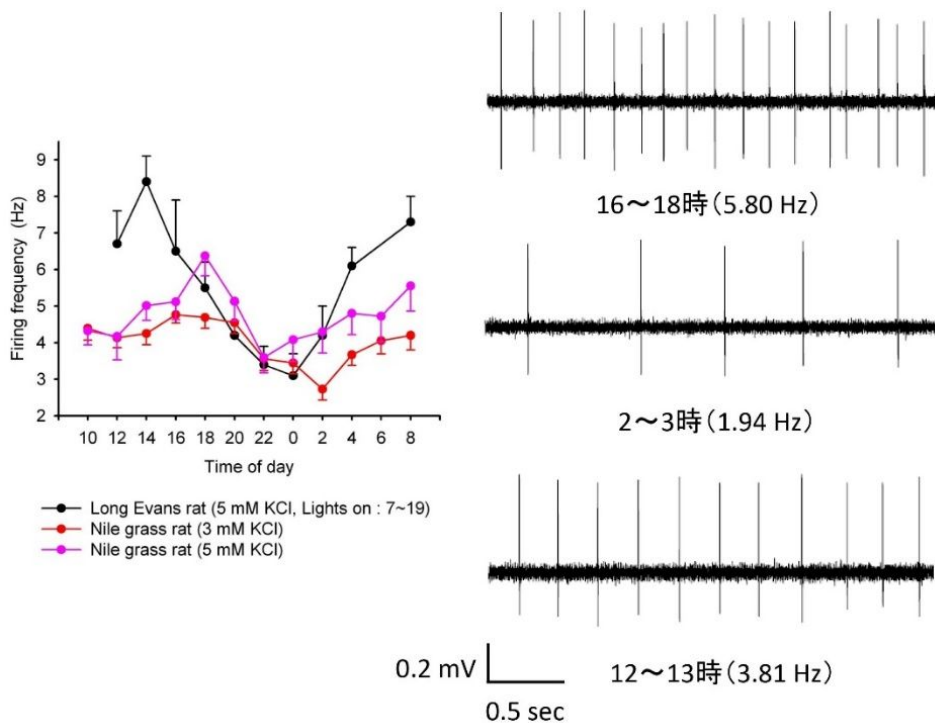


図2．ナイルグラスラット SCN スライス的活動電位自発発火リズム解析．夜行性の Long Evans ラットの発火リズム（黒線：Green & Gillette, 1982 より引用）に比べ、ナイルグラスラット（ピンクおよび赤線：本研究）では、周波数が低く、朝と夕の2つのピークを持つ概日リズムが観察された。

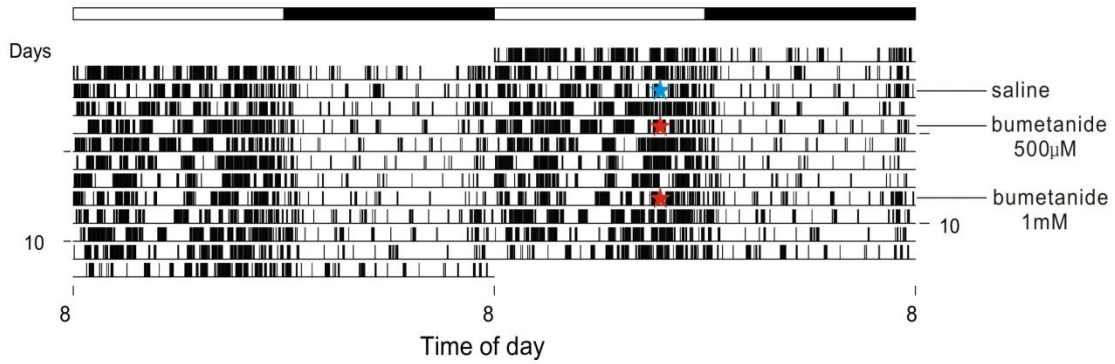


図3．ナイルグラスラット自発行動リズムのダブルプロット．赤い星印の時刻において、ブメタニドを側脳室に注入したが、昼夜行動のパターンに変化はなかった。この結果を受けて今後、塩素イオントランスポーターの特異的な発現阻害を目的としたAAVベクター注入を行う予定である。

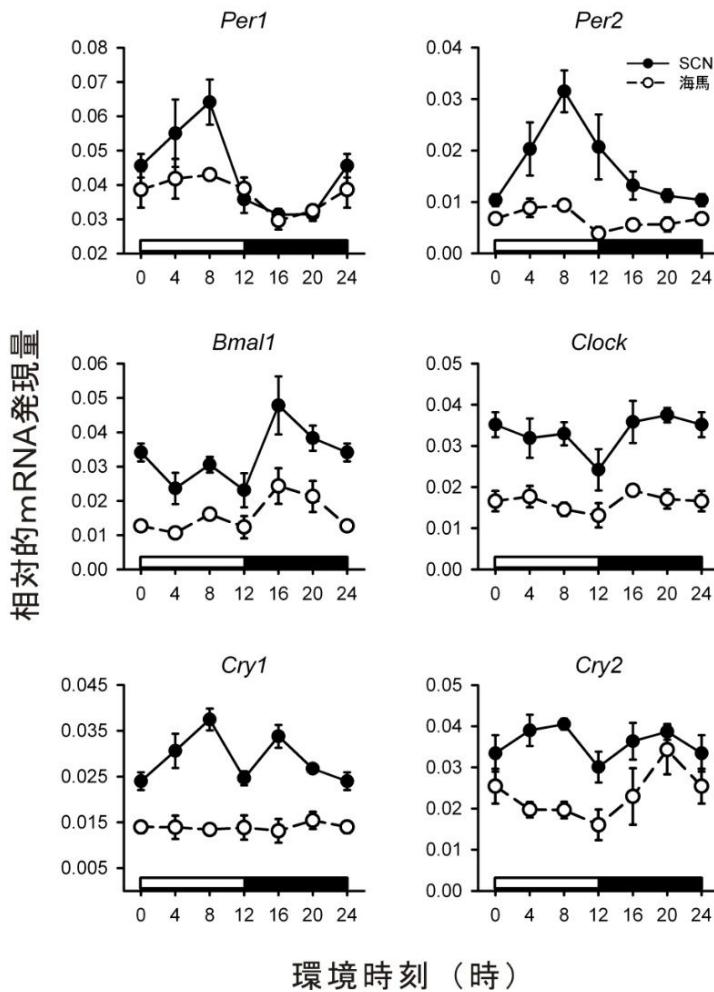


図4．ナイルグラスラット SCN および海馬における時計遺伝子転写リズム解析結果．SCN における昼にピークをもつ Per1/2 転写リズムや、その Bmal1 転写に見られる逆相のリズムについては、夜行性ラットやマウスにおける数々の報告と一致している。

- 決定したナイルグラスラット時計遺伝子 (*Per1, Per2, Bmal1, Clock, Cry1, Cry2*) 配列は、GenBank に登録し、一般公開されている。ここには登録した *Bmal1* 配列の様子を示した。

Nucleotide

GenBank

## Arvicanthis niloticus bmal1 mRNA for aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like protein 1, complete cds

GenBank: LC589366.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

[Go to:](#)

LOCUS LC589366 2564 bp mRNA linear ROD 16-OCT-2020  
 DEFINITION Arvicanthis niloticus bmal1 mRNA for aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like protein 1, complete cds.

ACCESSION LC589366  
 VERSION LC589366.1

KEYWORDS

SOURCE Arvicanthis niloticus (African grass rat)

ORGANISM *Arvicanthis niloticus*  
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Glires; Rodentia; Myomorpha; Muroidea; Muridae; Murinae; Arvicanthis.

REFERENCE 1

AUTHORS Morii, J., Koizumi, H., Koketsu, T., Konno, N., Yoshikawa, T., Morioka, E., Mochizuki, T., Challet, E., Hicks, D. and Ikeda, M.  
 TITLE Cloning and characterization of clock genes in two diurnal grass rat species, *Arvicanthis ansorgei* and *Arvicanthis niloticus*

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 2564)

AUTHORS Konno, N., Ikeda, M., Mochizuki, T. and Morioka, E.  
 TITLE Direct Submission  
 JOURNAL Submitted (14-OCT-2020) Contact: Norifumi Konno University of Toyama, Graduate School of Science and Engineering, 3190 Gofuku, Toyama, Toyama 930-8555, Japan URL : <http://www.u-toyama.ac.jp/>

FEATURES

source 1..2564  
 /organism="Arvicanthis niloticus"  
 /mol\_type="mRNA"  
 /db\_xref="taxon:61156"  
 /tissue\_type="hypothalamus"  
 gene 1..2564  
 /gene="bmal1"  
 CDS 178..2058  
 /gene="bmal1"  
 /codon\_start=1  
 /product="aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like protein 1"  
 /protein\_id="BCM23412\_1"  
 /translation="MADQRMDISSTISDFMSPGPTDLLSGSLGTSGVDCNRKRKGSATDYQESMDTDKDDPHGRLEYAEHQGRIGNAREAHSQIEKRRRDKMNSFIDELASLVPTCSAMSRKLDKLTVLRMAVQHMKTLRGATNPYTEANYKPTFLSDELKHLILRAADGFLFVVGCDRGLILFVSESVFKILNYSQNDLIGQSLFDYLHPKDIKVKQLSSSDTAPRERLIDAKTGLPVKTDITPGPSRLCSGARRSFFCRMKNRPSVKVEDKDFASTCSKKKADRKSFCTIHSTGYLKSWPPTKMGLEDNEPDNEGCNLSCLVAIGRLHSHMVPQVNGEIRVKSMEVSRHAIDGKVFVVDQRATAILAYLPQELLGTSCYEYFHQDDIGHLAECHROVLQTRKILTTNCKYFKIKDGSFITLRSRWFSPMNPWKEVEYIVSTNTVLANVLEGGDPTFPQLTASPHMSDMLPSGEGGPKRTHPTVPGIPGGTRAGAGKIGRMI AEEIMEIHRIRGSSPSSCGSSPLNITSTPPDASSPGGKKILNGGTPDIPSTGLLPQAOETPGYPYSDSSILGENPHIGIDMIDNDQSSSPSNDAAAMAVIMSLLEADAGLGGPVDFSDLPWPL"

ORIGIN

```

1 gccatgctg gatcgaagct tgagaactgt aacttcagat gtgggaattt ggtccagag
61 ggtgggagtg acagccocag tcaaatcctg tggactttgg agcccttga ggcocactgg
121 gcaaccctc ttcaccaggg ttggaagta gagtcccttg caagcactt ccttccaatg
181 gcggaccaga gaatggacat ttctcaaca atcagtgact tcatgtctcc tggccocacc
241 gaactgctct ctggttccct gggcaccagt ggtgtggact gcaatgcaa gaggaaaggc
...
```

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Koizumi Hayato, Mohammad Shahid, Ozaki Tomoya, Muto Kiyokazu, Matsuba Nanami, Kim Juhyon, Pan Weihong, Morioka Eri, Mochizuki Takatoshi, Ikeda Masayuki	4. 巻 10
2. 論文標題 Intracellular interplay between cholecystokinin and leptin signalling for satiety control in rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 12000
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-69035-6	査読の有無 無
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 森岡絵里, 池田真行	4. 巻 39巻5号
2. 論文標題 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 -

1. 著者名 望月貴年, 池田真行	4. 巻 14
2. 論文標題 時計遺伝子と睡眠覚醒	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 睡眠医療	6. 最初と最後の頁 73-78
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4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 森岡絵里, Todd C. Holmes, 池田真行
2. 発表標題 Mitochondrial LETM1 drives intracellular proton rhythm in Drosophila pacemaker neurons
3. 学会等名 第26回日本時間生物学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小泉隼人, 森玉早貴, 宮嶋梨沙, 村山望, 森岡絵里, 池田真行
2. 発表標題 Effects of mitochondrial LETM1 knockdown on cytosolic calcium dynamics
3. 学会等名 第26回日本時間生物学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 51.宮本翼、小泉隼人、瀧藤貴大、橋野昇敬、森岡絵里、池田真行
2. 発表標題 Histamine H1 receptors regulate sleep and circadian clock oscillations: Implication from model studies using rats and human cell lines
3. 学会等名 The 9th congress of Asian Sleep Research Society (ASRS) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 池田真行
2. 発表標題 Remaining issues for the circadian control of animal behavior.
3. 学会等名 Oriental International Sleep Medicine Summit Forum (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 池田真行	4. 発行年 2020年
2. 出版社 朝倉書房	5. 総ページ数 4
3. 書名 睡眠学 第2版 第4章 睡眠・覚醒調節の液性機構 4.1 睡眠物質の生理学	

〔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	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	松田 恒平  (Matsuda Kouhei)  (60222303)	富山大学・学術研究部理学系・教授    (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			
フランス	ストラスブール大学			
フランス	ストラスブール大学INCI			