

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2008～2010

課題番号：20249010

研究課題名（和文） 生物時計の階層的多振動体構造解析

研究課題名（英文） Analysis of multi-oscillator structure of biological clock

研究代表者

本間 研一（HONMA KEN-ICHI）

北海道大学・大学院医学研究科・特任教授

研究者番号：40113625

研究成果の概要（和文）：生物時計の中核である視交叉上核には多数の振動ニューロンが存在し、それらが相互同調して性質の異なる複数の領域振動体を形成している。領域振動体は視交叉上核の部位により役割が異なり、それらの相互作用によって活動期の長さが決まり、行動リズムの季節変動を作っている。一方、周期的制限給餌や覚醒剤の慢性投与で生じる生物時計の障害は、中枢時計と末梢時計との解離により生じ、行動リズムを駆動する末梢時計は中脳にあることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Oscillating neurons in the suprachiasmatic nucleus (SCN), the center of biological clock, constructs more than one regional pacemakers of different characteristics through mutual synchronization. The roles of regional pacemakers depend on the area of SCN, and their interaction determines the length of activity period, showing seasonal changes in behavioral rhythms. The function of biological clock is disrupted by restricted daily feeding or methamphetamine treatment, which is supposed to be due to desynchronization between the central and peripheral clocks. The peripheral clock(s) regulating behavioral rhythms is suggested to reside in the midbrain.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	21,800,000	6,540,000	28,340,000
2009年度	8,800,000	2,640,000	11,440,000
2010年度	8,800,000	2,640,000	11,440,000
年度			
年度			
総計	39,400,000	11,820,000	51,220,000

研究分野：生理学

科研費の分科・細目：環境生理学（含体力医学・栄養生理学）

キーワード：生物時計、時計遺伝子、システム、行動リズム、リズム同調

1. 研究開始当初の背景

（1）生物時計は、内因性振動である概日リズムを利用して生体機能の時間的恒常性を維持する機構であり、周期的に変化する環境において生命活動の時間的最適化を図る機

能をもつ。ほ乳類における生物時計の中核は視床下部視交叉上核に存在し、概日リズムを発振するとともに明暗サイクルに同調して、昼夜変化に対応した生体リズムを種々の生体機能に表出させる。

(2) これまでの分子生物学的研究により、概日リズムは4種類の時計遺伝子(*Per*, *Cry*, *Bmal1*, *Clock*) が関与する転写・翻訳のオート・フィードバックループにより発振される細胞内現象と考えられている。しかし、視交叉上核の個々の細胞振動は周期、位相が微妙に異なり、また個体レベルで見られる概日リズムと比較して安定性に欠けることから、細胞集団による概日リズムの安定化機構が存在すると考えられる。

(3) 視交叉上核振動体も複数のサブ振動機構からなることを明らかにされており、光刺激に反応する入力系の振動機構と行動リズムなどの生体リズム表出に関与する出力系の振動機構の解明が、生物時計の機能を理解するうえで重要である。

(4) 時計遺伝子発現の発光レポーター導入マウスを用いた解析により、内因性の概日リズムは視交叉上核以外の多くの組織にもみられ、生物時計が中枢時計である視交叉上核と各組織に存在する末梢時計の階層的多振動体システムからなり、安定した生体リズムの表出と柔軟な環境周期への同調を保證していることが明らかになった。この安定化には、下位振動体からの上位振動体へのフィードバックが関与している可能性がある。

2. 研究の目的

本研究の到達目標は、階層的多振動体からなる生物時計において、未だ不明な行動リズム(睡眠覚醒リズム)の発現に関する末梢時計の局在と振動機構を解明し、中枢時計である視交叉上核振動体による支配様式と、末梢振動体から中枢時計へのフィードバックの有無を、動物モデルを用いて明らかにする。本研究では以下の4項目を検討する。

(1) 視交叉上核内における入力系および出力系サブ振動機構の核内局在、機構を形成している振動細胞特性、入力系と出力系のコミュニケーション様式を、時計遺伝子発現や時

計タンパクの発光レポーター系導入動物(LucTG)を用いて明らかにする。

(2) 給餌を一日の一定時刻に限定する周期的制限給餌、さらに覚醒剤であるメタムフェタミン(MAP)慢性投与により中枢時計から乖離する行動リズムの振動局在を、培養系を用いて解明する。

(3) 中枢時計から行動リズムを支配する末梢時計への振動伝達に関与する神経系を明らかにし、当該神経系の刺激、あるいは伝達物質に対する末梢時計の位相依存性反応を解析する。

(4) 行動から中枢時計へのフィードバック機構に覚醒系のドパミンやヒスタミン神経が関与している可能性を、合成酵素や受容体ノックアウトマウスを用いて検証する。

3. 研究の方法

(1) 中枢時計の入力系および出力系解析

①入力系の振動機構

時計遺伝子、*Per1,2*, *Bmal1* の転写を発光での夜あるいは主観的昼に光を短時間照射する。照射前後に視交叉上核を取り出し、前額断あるいは水平断の連続脳切片を作成、培養系に移して視交叉上核レベル(連測測光システム)、あるいは細胞レベル(CCDカメラ)で生物発光を測定し、光入力系の3次元構造を明らかにするとともに、光情報伝達系を解明する。

②出力系の振動機構

LucTGマウスを短日、長日の明暗サイクル下で飼育し、行動リズムのE要素(活動期開始)とM要素(活動期終了)を分離する。視交叉上核を取り出し、前額断あるいは水平断の連続脳切片を作成、培養系に移す。CCDカメラにて細胞レベルで発光リズムを網羅的に測定し、光出力系の3次元構造を明らかにして、行動リズムの開始、終了位相と対応する細胞群を特定する。

(2) 行動リズムを駆動する末梢時計の局在と振動機構の解明

①メタンフェタミン (MAP) 慢性投与

MAP を LucTG マウスに慢性投与し、行動リズムと視交叉上核リズムを乖離させる。脳を取り出し、前額断又は水平断にて連続脳切片を作成して培養に移し、発光リズムを網羅的に測定、脳部位別の概日リズムマップを作成する。視交叉上核発光リズムと乖離する概日リズムを提示する脳部位を特定する。

②周期的制限給餌負荷マウスの解析

LucTG マウスに給餌を1日の一定時刻に制限する周期的制限給餌を負荷し、行動リズムと視交叉上核リズムを乖離させる。前額断又は水平断の連続脳切片を作成して培養系に移し、脳部位別の概日リズムマップを作成する。視交叉上核発光リズムと乖離する概日リズムを提示する脳部位を特定する。

(3) 中枢時計から末梢時計への支配様式

①概日リズム伝達系

視交叉上核から行動リズムに関する末梢時計に至る神経性伝達経路を解明する目的で、LucTG ラット視交叉上核の出力神経系をハラス型ナイフで部分切断し、その効果を行動リズムと培養脳切片の発光リズムで解析する。さらに当該ラットの脳を培養系に移し、発光リズムを指標として、視交叉上核からの出力先を同定する。

②末梢時計の位相反応特性と相互同調

PK2、BDNF、TGF α など、視交叉上核出力系の伝達物質と想定されている物質を視交叉上核培養系に添加し、脳部位別概日リズムの位相反応を測定する。

(4) 末梢時計から中枢時計へのフィードバック機構の解明

①強制運動の効果： LucTG マウスに回転輸による強制運動を負荷する。その後、連続脳切片を作成し、培養系にて発光リズムを測定する。視交叉上核および他の脳部位で、概日リズムに対する強制運動の効果を解析する。

②脳内覚醒系の役割：ドパミンやヒスタミンの合成酵素、受容体が欠損した遺伝子変異マウスに、LucTG マウスを掛け合わせ、時計遺伝子発光レポーター系を導入したマウスを作成する。回転輸による強制運動を負荷し、その後、連続脳切片を作成し、培養系に移して発光リズムを測定する。視交叉上核および他の脳部位の概日リズムに対する強制運動の効果を解析する。

4. 研究成果

(1) 中枢時計の入力系および出力系解析

①極端な明暗サイクル (LD2:22) に長期間暴露したマウスから視交叉上核を採取し、*in vitro*で*Per1*遺伝子発現リズムを解析した。その結果、極端な光周期下では行動リズムがスプリットし、光周期に同調したリズム要素と脱同調したリズムが観察され、2つのリズム要素に対応した*Per1*遺伝子発現リズムを同定した。

②ラット視交叉上核において、時計遺伝子*Per1*、*Dec1*および*Dec2*の発現リズムを指標として、光照射前後の視交叉上核内光信号伝達経路を解析し、視交叉上核の前後軸において中央からやや後方の腹外側部から入力し、背外側に広がる経路が確認された。

③長日 (LD18:6) 及び短日 (LD6:18) に同調したラットの視交叉上核*Per1*、*Per2*遺伝子発現リズムを視交叉上核部位別に網羅的に解析し、行動リズムの日長変化に対応した変化が*Per1*遺伝子発現リズムに顕著に認められた。光周期への同調において、*Per1*遺伝子と*Per2*遺伝子の機能差が示唆された。

④時計遺伝子*Per1*、*Per2* の発現リズムを指標として視交叉上核小領域を網羅的に解析し、行動リズムの開始と終了位相に対応する視交叉上核内の細胞群を同定した。

⑤マルチ電極デッシュ法により、行動リズムを構成する個々の要素に対応していると思われる視交叉上核内細胞集団を確認した。また領域振動体の総合同調に時計遺伝子*Cry1*、*Cry2*が関与していることを示唆した。

(2) 行動リズムを駆動する末梢時計の局在と振動機構の解明

①MAP慢性投与マウスから得た脳の培養系において、*Per1*遺伝子発現リズムを部位別に解析し、中脳の特定期神経核に行動リズムを駆動する末梢時計がある可能性を示した。

②視交叉上核概日リズムと行動リズムを強制的に脱同調させた場合、中脳の時計遺伝子発現リズムが行動リズムとともに視交叉上核概日リズムから脱同調し、中脳の末梢時計が存在することを示唆した。

③明暗サイクルの位相変位の際に、特定位相にマウスを新規環境に暴露すると、直ちには追従しない行動リズムの再同調が促進され、行動リズムを駆動する末梢時計が光以外の環境因子に反応することを示唆した。

④周期的制限給餌を負荷した LucTG マウスにおいて、給餌前行動ピーク位相と脳内各領域の *Per2::LUC* 発現リズム位相の解析から、行動を駆動する末梢時計はメタンフェタミン誘導性行動リズムと制限給餌誘導性リズムでは異なることを示唆した。

(3) 中枢時計から末梢時計への支配様式

①恒常暗で行動リズムが消失する *Cry1/Cry2* KOマウスに時計遺伝子光モニター系を導入し、視交叉上核の長期培養系において単一ニューロンの発射活動リズムと行動がかい離することを見出し、中枢時計から末梢時計の概日信号伝達は、視交叉上核におけるサブ振動体が行動を個別に制御している可能性があることを示唆した。

②明暗サイクルを8時間前進させた際の行動リズムと視交叉上核 *Per1* 遺伝子発現リズムの解析から、交叉上核概日リズムと行動リズムが解離することを見出すとともに、移行期において視交叉上核概日振動が2相性を示すことを明らかにした。この2相性振動は、それぞれ行動リズムの開始及び終了要素に対応し、異なる光位相反応を示すことが示唆された。

(4) 末梢時計から中枢時計へのフィードバ

ック機構の解明

①明暗サイクルを8時間シフトさせた場合、行動リズムの再同調が非光刺激（身体運動、新規環境）により促進されるが、その効果に位相依存性があり、さらに対象とする末梢振動体にも特異性があることを明らかにし、非光刺激による行動リズムの再同調促進は中枢時計と末梢時計の振動共役の強化にある可能性を示した。

②強制運動を一定周期でラットに負荷し、行動リズムから中枢時計へのフィードバックがあることを確認して、強制運動の効果には位相依存性があることを明らかにした。

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 10 件)

1. Yamanaka, Y., S. Hashimoto, Y. Tanahashi, S. Nishide, S. Honma, K. Honma. Physical exercise accelerates re-entrainment of human sleep-wake cycle but not of plasma melatonin rhythm to 8 h phase-advanced sleep schedule. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 298:R681-R691, 2010 [査読有]

2. Yamanaka Y., Suzuki Y., Todo T, Honma K and Honma S. Loss of circadian rhythm and light-induced suppression of pineal melatonin levels in *Cry1* and *Cry2* double-deficient mice. *Genes to Cells*, 10:1063-1071, 2010 [査読有]

3. Honma K and Honma S. The SCN-independent clocks, methamphetamine and food restriction. *Eur J Neurosci*. 30:1707-1717, 2009 [査読有]

4. Kuroshima, M., G.Takahashi, T.Suzuki, S.Hashimoto, K.Honma, T.Kachi. Effects of intracranial surgery on pineal lipid droplets, on other structures, and on melatonin secretion. *Anal Sci Int*, 84:17-26, 2009. [査読有]

5. Noshiro M., E.Usui, T.Kawamoto, F.Sato, A.Nakashima, T.Ueshima, K.Honda, K.Fujimoto, S.Honma, K.Honma, M.Makishima and Y.Kato. Liver X factors (LXR α and LXR β) are potent regulators for hepatic *DECI* expression. *Genes to Cells*, 14:29-40, 2009. [査読有]

6. Kononenko, N., S. Honma, F.D. Dudek, K. Honma. On the role of calcium and

potassium currents in circadian modulation of firing rate in rat suprachiasmatic nucleus neurons: Multielectrode dish analysis. *Neurosci. Research* 62:51-57, 2008. [査読有]

7. Nishide, S., S. Honma and K. Honma. The circadian pacemaker in the cultured suprachiasmatic nucleus from pup mice is highly sensitive to external perturbation. *Eur J Neurosci*, 27:2686-2690, 2008. [査読有]

8. Yamanaka, Y., S. Honma and K. Honma. Scheduled exposures to a novel environment with a running-wheel differentially accelerate re-entrainment of mice peripheral clocks to new light-dark cycles. *Genes to Cells*, 13: 497-507, 2008 [査読有]

9. Honma, S., T.Yasuda, A.Yasui, G.T.J. van der Horst and K.Honma. Circadian behavioral rhythms in Cry1/Cry2 double-deficient mice. *J Biol Rhythm*, 23:91-94, 2008 [査読有]

10. Baba, K., D.Ono, S. Honma and K. Honma. A TTX sensitive local circuit is involved in the expression of PK2 and BDNF circadian rhythms in the mouse suprachiasmatic nucleus. *Eur J Neurosci*, 27:909-916, 2008 [査読有]

[学会発表] (計 18 件)

1. K. Honma. Sleep and Circadian Rhythms, 11th Annual Meeting of Sleep Medicine, Ozsetleri, Antaiya, Turkey, November 9, 2010

2. N. Tokumaru, S. Honma and K. Honma. Spatiotemporal analysis of Clock gene Per1 and Per2 expression in the rat suprachiasmatic nucleus. The 87th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan Morioka, May 21, 2010

3. S. Nishide, S.Honma and K.Honma. Perturbation of circadian oscillation in cultured mouse suprachiasmatic nucleus by protein synthesis inhibitor The 87th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan , Morioka, May 21, 2010.

4. Y. Yamanaka, S.Honma and K.Honma. Acceleration of photic entrainment by non-photic time cues in mouse: effects of exercise and/or stress on central and peripheral clocks The 87th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, Morioka, May 21, 2010.

5. Yamanaka Y. Rapid shift of social schedule induces an internal desynchronization between sleep-wake cycle and plasma melatonin rhythm. The ASRS summit and symposium on sleep research and medicine, Abst., p.31, Nago (Japan),

October 31, 2009

6. Ono D. Honma S. and Honma K. Two differential molecular mechanisms for circadian oscillation in the suprachiasmatic nucleus. ASRS summit and symposium on sleep research and medicine, Abst., p.53, Nago (Japan), October 30, 2009

7. Nishida S. Honma S. and Honma K. Molecular events associated with resetting the circadian oscillation by protein synthesis inhibitor in mouse suprachiasmatic nucleus. ASRS summit and symposium on sleep research and medicine, Abst., p.54, Nago (Japan), October 30, 2009

8. Honma S., Yoshikawa T., Hashimoto S. and Honma K. Seasonality in sleep and wakefulness. 6th Congress of Asian Sleep Research Society, Symposium 'Sleep as a Biological Rhythm', Abstract p.99, Osaka (Japan), October 26, 2009

9. Yamanaka Y., Honma S. and Honma K. Non-photic time cues phase-dependently accelerate phase-shifts of mouse peripheral clocks. XI Congress of the European Biological Rhythms Society, Symposium 'Entrainment by non-photic cues', Abst. P.58, Strasburg (France), August 25, 2009

10. Nishide S., Honma S., Yamada Y. and Honma K. Molecular mechanism of circadian oscillation reset by prolonged treatment of cycloheximide in mouse suprachiasmatic nucleus. XI Congress of the European Biological Rhythms Society, Poster Session, Abst. P.124, Strasburg (France), August 25, 2009

11. Ono D., Honma S. and Honma K. Circadian firing rhythms in Cry1/Cry2 double-deficient mice in the cultured suprachiasmatic nucleus. XI Congress of the European Biological Rhythms Society, Symposium 'Exploring spatiotemporal organization of SCN circuits', Abst. P.64, Strasburg (France), August 24, 2009

12. Honma K. SCN-independent clocks: a possible mechanism of non-photic entrainment in humans. International Symposium on Biological Rhythm, Abstr..14, Sapporo (Japan), August 3, 2009

13. Nishide, S., Honma, S., Yamada, Y., Hamada, T. and Honma, K. Molecular mechanisms of terminating and restarting circadian rhythms in the mouse suprachiasmatic nucleus. 36th International Congress of Physiological Sciences, Poser Session, Kyoto (Japan). August 1, 2009

14. Yoshikawa T., Matsuno A., Yamanaka Y., Nishide S., Honma S. and Honma K.

Effects of ambient temperature during maternal deprivation on circadian rhythms of neonatal rats. 36th International Congress of Physiological Sciences, Poser Session, Kyoto (Japan). August 1, 2009

15. Yamanaka Y., Honma S. and Honma K. Re-entrainment of circadian rhythms after 8 h advanced light-dark cycles depends on the timing of exposure to novel environment in mice. 36th International Congress of Physiological Sciences, Poser Session, Kyoto (Japan). August 1, 2009

16. Ono D., Honma S. and Honma K. Differential responses of the circadian rhythms in mouse suprachiasmatic nucleus cells to protein synthesis inhibitor, cycloheximide. 36th International Congress of Physiological Sciences, Poser Session, Kyoto (Japan). August 1, 2009

17. Honma S., Yoshikawa T. and Honma K. Clock mechanisms in mammals encoding photoperiods. 36th International Congress of Physiological Sciences, Whole-day Symposium 'Temporal organization of physiology and behavior', Kyoto (Japan). July 30, 2009

18. Honma K. Circadian organization in humans: is there any oscillator(s) for behavioral rhythms independent of those in the SCN? 36th International Congress of Physiological Sciences, Whole-day Symposium 'Temporal organization of physiology and behavior', Kyoto (Japan). July 30, 2009

[図書] (計1件)

1. Honma, S., T. Yoshikawa, S. Nishide, D. Ono and K. Honma. Bioluminescent Imaging for Assessing Heterogenous Cell Functions in the Mammalian Central Circadian Clock. In: Molecular Imaging for Integrated Medical Therapy and Drug Development, (eds) N. Tamaki and Y. Kuge, Springer, Tokyo, pp.189-196, 2010.

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: ターゲット位置追跡装置およびターゲット発光検出装置

発明者: 石川正純、浜田俊幸、本間研一、本間さと

権利者: 北海道大学

種類: 特許

番号: 特願 2010-245624

出願年月日: 2010年11月1日

国内外の別: 国際

○取得状況 (計0件)

なし

[その他]

<http://babu.med.hokudai.ac.jp/~phys~lw/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本間 研一 (HONMA KEN-ICHI)

北海道大学・大学院医学研究科・特任教授

研究者番号: 40113625

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

棚橋 祐典 (TANAHASHI YUHSUKE)

北海道大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号: 50374228

西出 真也 (NISHIDE SHINYA)

北海道大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号: 40451398

仲村 朋子 (NAKAMUEA TOMOKO)

北海道大学・大学院医学研究科・特任助教

研究者番号: 30451397

山田 淑子 (YAMADA YOSHIKO)

北海道大学・大学院医学研究科・学術研究員

研究者番号: 10466451

安田 円 (YASUDA TSUBURA)

北海道大学・大学院医学研究科・技術職員

研究者番号: 50399820

首藤 美和子 (SHUDO MIWAKO)

北海道大学・大学院医学研究科・技術補助員

研究者番号: 20466452

山仲 勇二郎 (YAMANAKA YUHJIRO)

北海道大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号: 20528343

橋本 聡子 (HASHIMOTO SATOKO)

北海道大学・大学院医学研究科・博士研究員

研究者番号: 80374247

徳丸 信子 (TOKUMARU NOBUKO)

北海道大学・大学院医学研究科・博士研究員

研究者番号: 90567439