

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07234

研究課題名(和文) 視交叉上核における明暗環境変化に対する光入力への制御機構の解明

研究課題名(英文) The mechanism of photic input transmission in response to light and dark environmental changes in the suprachiasmatic nucleus.

研究代表者

長野 護 (Nagano, Mamoru)

近畿大学・医学部・准教授

研究者番号：80155960

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：体内時計の中核である視交叉上核の各領域内での細胞間や領域間における同期システムおよび明暗環境の変化に対する光入力伝達機構の解明を行った。その結果、視交叉上核において明暗環境の変化に対して、光反応領域と非光反応領域間の脱同期に加えて、非光反応領域においても領域間の脱同期を生じることが明らかとなった。また、吻側部の長周期領域は尾側領域の概日リズムを同調させ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

本研究成果は、時差症候群が生じるのかという疑問に対して、体内時計の中核である視交叉上核における単に光反応領域と非光反応領域間の脱同期のみならず、非光反応領域内においても領域間の脱同期が生じることを明らかにしたもので、時差症候群の原因解明および解消法の早期開発に繋がるものと考えられる。また、時差症候群の早期解消にとどまらず、体内時計の明暗環境への適応システムの解明に繋がり、リズム障害治療に大いに役立つとともにシフトワーカーの生活習慣病の治療薬などの開発につながるものとして期待される。

研究成果の概要(英文)：We have elucidated the inter-cellular and inter-regional synchronization system within each region of the suprachiasmatic nucleus (SCN), the center of the internal clock, and the mechanism of light input transmission in response to changes in light and dark environments. We found that light-dark changes cause not only desynchronization between light- and non-light-responsive regions but also interregional desynchronization in the non-photoresponsive region in the SCN. In addition, we found that the longer circadian rhythm of the rostral region appears to entrain the circadian rhythm in the caudal region in the SCN.

研究分野：体内時計

キーワード：視交叉上核 光同調 時差症候群

## 1. 研究開始当初の背景

体内時計の中核である視交叉上核が環境の明暗周期になかなか同期しないことが時差症候群の原因である。各分野で時差症候群の研究が進められており、概日リズム関連のノックアウトマウスの中で、明暗環境に対して同調が速くなるマウスは発見されている。しかし未だ、時差症候群の分子機構の解明に至っていない。哺乳類においては、視交叉上核が網膜からの光情報入力に同調し、環境の時間的変化への適応や体内の多様な生理機能の概日リズムの制御に関係している。この視交叉上核の個々の神経細胞は、非同期の状態では多様な周期の概日リズムを発振することが明らかになっている(Welsh et al. Neuron 1995)。よって、視交叉上核が単一周期を発振かつ安定したリズム維持のためには細胞間のコミュニケーションが必要である。視交叉上核内の情報伝達を担う分子としては、神経ペプチドが考えられ、光反応領域にはVIP、GRP細胞が、非光反応領域にはAVP細胞が局在する。また、視交叉上核の神経細胞は、位相にある程度のばらつきのある不均一な細胞集団で光に対する明瞭な時間依存的反応が生じることが知られている。そこで、このような視交叉上核における各細胞の光入力に対する反応性の観察、また、どのようなペプチド産生能やレセプターを持った細胞かを同定するには、形態学的なアプローチが必要となる。このことから分子生物学的な手法のみでは時差症候群の分子機構の解明は難しく、形態学的側面から、より詳細な明暗環境の変化に対する視交叉上核の同調機構における光入力の制御機構の解明が必須である。

## 2. 研究の目的

本研究では、動物実験に加えて、Per2::luc ノックイン動物の視交叉上核のスライス培養の冷却 CCD カメラ観察装置による発光系システムによる解析かつ ISH 法や免疫染色法による視交叉上核のスライス培養上での各細胞の同定を行う。この視交叉上核のスライス培養実験に、さらに形態学的手法を加えることで *in vivo* では難しいとされる細胞間のコミュニケーションの解明も *in vitro* で迅速かつ正確に行えることが期待される。よって、形態学的手法、分子生物学的手法およびスライス培養実験などにより、視交叉上核における同調機構とその光入力による制御機構を解明し、時差症候群の分子機構を明らかにするとともに時差症候群の早期に解消できる方策の確立を目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 視交叉上核内における明暗環境の変化に対する反応性の領域的な相違の検討

マウス(C57BL/6J)を明暗サイクル(明期 12h 暗期 12h)で飼育後、明暗サイクルを 10 時間後退させて、2 時間おきに明暗サイクルシフト後 7 日目までの脳を採取し、水平断切片で視交叉上核(SCN)における Per1、VIP 遺伝子発現を *in situ* hybridization(ISH)法で経時的に観察した。

また、Per2::luc ノックインマウス(Per2 プロモーターの制御下でルシフェラーゼ遺伝子を発現するコンストラクトを導入したマウス)を用いて、明暗サイクルの 10 時間後退 1 日目と 2 日目において SCN のスライス培養を作成し発光リズムを観察した。

### (2) Per1およびPer2遺伝子の光刺激の反応領域の同定

Per1 および Per2 のプロモーター領域の候補とされる CRE サイトを欠損させ、光照射による概日リズムの位相シフトおよび同調について検討した。

(3) SCNにおける周期長の異なる領域の同定および同期機構の検討

Per2遺伝子の制御エレメントで駆動されるルシフェラーゼレポーター遺伝子(Per2::dLuc)を持つトランスジェニックラットのSCNの水平スライス培養を作成して冷却CCDカメラ観察装置による発光系システムを用いて、SCNにおける周期長の異なる領域の同定および周期長の異なる領域間での同期機構について検討した。

(4) SCNにおける概日リズムの制御に関係する因子の同定

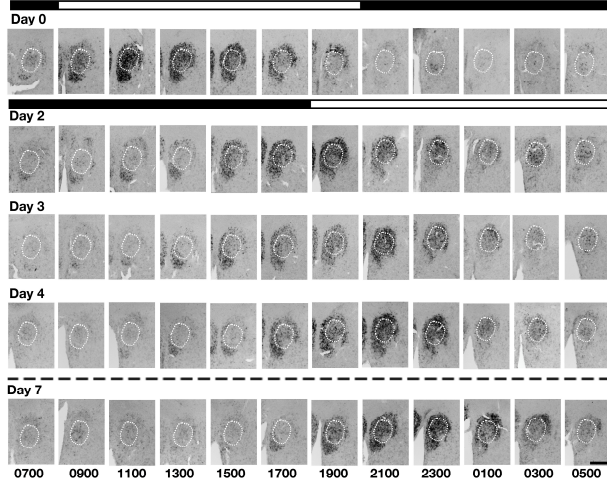
マウスSCNにおけるシナプトタグミン(syt)17の局在と機能についてISH法および免疫染色法を用いて観察した。さらに、Syt17欠損変異マウスを作成し行動リズムなどの観察を行った。

4. 研究成果

(1) 視交叉上核内における明暗環境の変化に対する反応性の領域的な相違の検討

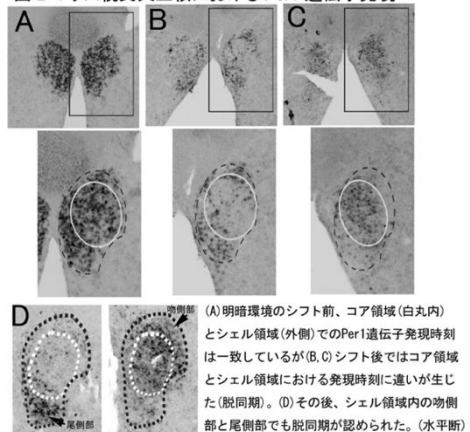
シフト後2日目において Per1 遺伝子発現のピークはコア領域では約8時間後退していたがシェル領域では約4時間のずれにとどまっておき、コア領域とシェル領域間の脱同期が観察された。その後シェル領域では Per1 遺伝子の発現位相は1日約2時間ずつゆっくり後退し再同期した。これらのことからマウスにおいても視交叉上核のコア領域とシェル領域間の内的脱同期が生じ、時差ボケを形成することが示唆された(図1)。さらに、詳細に水平断切片で Per1 遺伝子発現パターンを観察した結果、シェル領域において、吻側部の Per1 遺伝子発現のピークが尾側部より速く後退することが明らかとなった。このことから明暗環境の変化に対する反応性にシェル領域においても領域間の相違が生じることが明らかとなった(図2)。

図1 明暗サイクルを10時間後退させた際のマウス視交叉上核におけるPer1遺伝子発現



シフト後2日目においてPer1遺伝子発現のピークはコアでは約8時間後退していたがシェルでは約4時間のずれにとどまっておき、コアとシェル間の脱同期が観察された。その後シェルではPer1遺伝子の発現位相は1日約2時間ずつゆっくり後退し再同期した。

図2 マウス視交叉上核における Per1 遺伝子発現



(A) 明暗環境のシフト前、コア領域(白丸内)とシェル領域(外側)でのPer1遺伝子発現時刻は一致しているが(B, C)シフト後ではコア領域とシェル領域における発現時刻に違いが生じた(脱同期)。(D)その後、シェル領域内の吻側部と尾側部でも脱同期が認められた。(水平断)

また、Per2::luc ノックインマウスの SCN スライス培養を用いての発光リズムの観察で、コア領域とシェル領域間の脱同期が認められたが、シェル領域内において明確な脱同期を確認することはできなかった。

#### (2) Per1およびPer2遺伝子の光刺激の反応領域の同定

Per2 プロモーターでの欠損では光誘導に影響を与えなかったが、Per1 プロモーターでの欠損では SCN における Per1 遺伝子発現誘導を弱めたが、光照射による概日リズムの位相シフトおよび同調には影響しないことが明らかとなった。

#### (3) SCNにおける周期長の異なる領域の同定および同期機構の検討

Caudal medial regionと Rostro-lateral regionが、それぞれ24時間より短い周期(短周期領域:SPR)と長い周期(長周期領域:LPR)の概日リズムを生成していることが判明した。また、VIP 遺伝子発現ニューロンが密集するSCNのコア領域はLPRの一部を覆っており、SCNのシェル領域はSPRとLPRの残りの部分を含むことが明らかとなった。さらに、SCNにおいて、周期長の異なる領域間において吻側領域の長周期領域が尾側領域の概日リズムを同調させることが明らかとなった。

#### (4) SCNにおける概日リズムの制御に関する因子の同定

Syt17 遺伝子発現ニューロンは主にシェル領域に位置し、SYT17免疫陽性細胞体や神経線維はSCNのコア領域とシェル領域、そして脳室下帯(SPZ)で観察された。さらに、電子顕微鏡による解析では、神経細胞の粗面小胞体(rER)、ゴルジ装置(G)、大小の小胞にSYT17が存在することが明らかとなった。SCNにおけるSyt17 遺伝子発現は概日リズムを示し、夜間の光照射で遺伝子発現が抑制された。また、Syt17欠損変異マウスでは、運動活動リズムの自由走行期間が短縮された。これらのことから、Syt17が概日リズムの制御に関与していることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

|   |                             |
|---|-----------------------------|
| 1. 著者名<br>Y. Minami, T. Yoshikawa, M. Nagano, S. Koinuma, T. Morimoto, A. Fujioka, K. Furukawa, K. Ikegami, A. Tatemizo, K. Egawa, T. Tamaru, Y. Shigeyoshi | 4. 巻<br>53                  |
| 2. 論文標題<br>Transgenic rats expressing dominant negative BMAL1 showed circadian clock amplitude reduction and rapid recovery from jet lag                    | 5. 発行年<br>2021年             |
| 3. 雑誌名<br>Eur J Neurosci.   | 6. 最初と最後の頁<br>1783-1793     |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1111/ejn.15085  | 査読の有無<br>有                  |
| オープンアクセス<br>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<br>-                   |
| 1. 著者名<br>Ikegami K, Nakajima M, Minami Y, Nagano M, Masubuchi S, Shigeyoshi Y.   | 4. 巻<br>531                 |
| 2. 論文標題<br>cAMP response element induces Per1 in vivo.  | 5. 発行年<br>2020年             |
| 3. 雑誌名<br>Biochem Biophys Res Commun.   | 6. 最初と最後の頁<br>515-521       |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.bbrc.2020.07.105.  | 査読の有無<br>有                  |
| オープンアクセス<br>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<br>-                   |
| 1. 著者名<br>Takemura S, Nagano M, Isonishi A, Tanaka T, Tatsumi K, Yamano M, Minami Y, Shigeyoshi Y, Wanaka A.  | 4. 巻<br>727                 |
| 2. 論文標題<br>Circadian rhythms of sorting nexin 25 in the mouse suprachiasmatic nucleus.  | 5. 発行年<br>2020年             |
| 3. 雑誌名<br>Neurosci Lett.  | 6. 最初と最後の頁<br>134897        |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.neulet.2020.134897.  | 査読の有無<br>有                  |
| オープンアクセス<br>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<br>-                   |
| 1. 著者名<br>Fujioka A, Nagano M, Ikegami K, Masumoto KH, Yoshikawa T, Koinuma S, Nakahama KI, Shigeyoshi Y.   | 4. 巻<br>1798                |
| 2. 論文標題<br>ircadian expression and specific localization of synaptotagmin17 in the suprachiasmatic nucleus, the master circadian oscillator in mammals.     | 5. 発行年<br>2023年             |
| 3. 雑誌名<br>Brain Res.  | 6. 最初と最後の頁<br>148129-148137 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.brainres.2022.148129.  | 査読の有無<br>有                  |
| オープンアクセス<br>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<br>-                   |

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Morimoto T, Yoshikawa T, Nagano M, Shigeyoshi Y.  | 4. 巻<br>17              |
| 2. 論文標題<br>Regionality of short and long period oscillators in the suprachiasmatic nucleus and their manner of synchronization. 5.発行年 2022年 | 5. 発行年<br>2022年         |
| 3. 雑誌名<br>PLoS One.   | 6. 最初と最後の頁<br>e0276372. |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1371/journal.pone.0276372.   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                       | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)              | 備考 |
|-------|---|------------------------------------|----|
| 研究分担者 | 鯉沼 聡<br><br>(Koinuma Satoshi)<br><br>(10340770) | 近畿大学・医学部・講師<br><br><br><br>(34419) |    |
| 研究分担者 | 筋野 貢<br><br>(Sujino Mitsugu)<br><br>(30460843)  | 近畿大学・医学部・助教<br><br><br><br>(34419) |    |

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 |
|---------|---------|