

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：12612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2011～2015

課題番号：23500478

研究課題名(和文) 神経系におけるAMPK新規機能の解明 概日時計及び感覚受容への関与

研究課題名(英文) A novel function of AMPK in nervous system, especially for circadian clock and sensory systems

研究代表者

仲村 厚志 (Nakamura, Atsushi)

電気通信大学・情報理工学(系)研究科・助教

研究者番号：50361829

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：概日時計とは一日周期の体内時計であり、その中枢は脳の視交叉上核に存在する。本研究では、AMP-activated protein kinase (AMPK) が、概日時計のリズム形成に深く関与する可能性について検討を行った。マウス視交叉上核を培養し、AMPKの活性化剤を投与しその効果について解析を行った結果、時計遺伝子発現リズムの周期は延長することを明らかにした。この結果から、AMPKが視交叉上核において概日リズムの形成に関与している可能性が示唆された。次に、視交叉上核について、免疫組織化学的解析を行ったところ、AMPKの基質分子が、視交叉上核の腹側部分に局在していることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：The circadian clock has an about 24 hour periods. The central circadian clock is located in the suprachiasmatic nucleus (SCN) of the hypothalamus, and controls many circadian rhythms. In this study, we examined the role of AMP-activated protein kinase (AMPK) in the regulation of the circadian rhythms. Addition of the activator of AMPK to the cultured SCN caused the elongation of the circadian period. This suggests the implication of AMPK for the circadian clockwork in the SCN. Next, we investigated the localization of the substrates for AMPK in the SCN by immunohistochemistry. They were found in the ventral region in the SCN.

研究分野：感覚受容

キーワード：概日時計 AMPK 視交叉上核

1. 研究開始当初の背景

(1) AMPK とは？

AMP-activated protein kinase (AMPK) は酵母からヒトにいたるまで進化的に保存された蛋白質リン酸化酵素であり、細胞内のエネルギー状態を感知してその恒常性を維持する働きが知られている。また AMPK はマウスの中樞神経系では摂食行動を制御するという機能があり、代表者は摂食制御の機構解明のあまり進んでいない昆虫でも、この事象があてはまるという予想した。

(2) クロキンバエにおける AMPK の解析

薬理的解析 薬理的解析の結果、AMPK の活性化状態に依存してクロキンバエの摂食行動が大きく変化することを見出した。この結果は、まだまだ謎に包まれている昆虫の摂食行動を明らかにする上で、哺乳類と共通のメカニズムが働いていることを示した結果である。

組織学的解析 頭部のどの部分において活性が大きく変化し摂食行動を制御しているのかを明らかにするために、組織学的解析を行ったところ、摂食中枢の存在と言われる食道下神経節に強い活性化がみられ、薬理的解析の結果と非常に整合性のある結果が得られた。ところが、全く予想外の結果として、口吻の味細胞や触角の嗅細胞、さらには、単眼及び視葉部分に強い活性が観察された。単眼や視葉は単に視覚だけでなく概日時計機能に重要であることが知られている部位である。概日時計とは約1日周期の体内時計であり、睡眠覚醒のリズムや、食事や体温、ホルモン量など、様々な体内の約24時間周期のリズムを制御している。これらの感覚受容器官や概日時計における AMPK の機能については、我々の知る限り報告がないものであった。

2. 研究の目的

(1) 視交叉上核における薬理的解析

AMPK が哺乳類(マウス)の概日時計機構において、どのような機能を担っているのかを明らかにするために、哺乳類の概日時計中枢の存在する、視床下部の視交叉上核(SCN)のリズムに対して、薬理的解析を行った。

(2) 感覚器官における組織学的解析

AMPK がマウスの感覚受容において、どのような機能を担っているのかを明らかにするために、免疫組織化学的解析を行った。

3. 研究の方法

(1) 生物発光による概日時計リズムの解析
概日時計細胞のリズムを解析するには、リズムを可視化するための遺伝子改変動物の利用が最も効率的である。時計遺伝子である *Per1* のプロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子を導入したトランスジェニックマウス(*Per1-luc*マウス)を用いた可視化システムを用いて解析を行なった。*Per1-luc*マウスより、哺乳類の概日時計中枢の存在する、視床下部の視交叉上核(SCN)を摘出して培養条件下におき、発光リズムを計測した。その際に薬剤を添加し、リズムの変化がみられるかをモニターした。

スより、哺乳類の概日時計中枢の存在する、視床下部の視交叉上核(SCN)を摘出して培養条件下におき、発光リズムを計測した。その際に薬剤を添加し、リズムの変化がみられるかをモニターした。

(2) 免疫組織化学的解析

AMPK の概日時計機能、および感覚受容への関与を調べるために、マウス SCN、網膜、及び嗅上皮について、免疫組織化学的解析を行った。マウスよりそれぞれの組織を摘出し、凍結切片を作製し、抗体反応を行った。抗体陽性像を、共焦点レーザー顕微鏡により蛍光観察により検出した。

4. 研究成果

(1) 視交叉上核における AMPK の機能解析

AMPK の概日時計への関与について調べるため、SCN のリズムに対して、薬理的解析を行った。*Per1-luc*マウスより摘出した SCN を培養し、AMPK 活性化剤を投与したところ、*Per1* 発現リズムの周期は延長し、位相は前進し、振幅については一時的な増大の後、減衰がみられることを明らかにした。周期や振幅に影響が見られたことから、AMPK が視交叉上核において概日リズムの形成に関与していることが示唆された。さらに位相にも変化が見られたことから、網膜から SCN への光入力機構にも関わっている可能性が示唆された。

(2) 視交叉上核における AMPK 基質分子の局在

マウス視交叉上核について、活性化(リン酸化)AMPK に対する抗体を用いて免疫組織化学的解析を行ったが、特異的な陽性像を得ることは出来なかった。また、網膜や嗅上皮についても、様々な条件検討を試みたが、同様に陽性像を得ることは出来なかった。そこで、AMPK の基質分子に対する抗体を用いて、視交叉上核について免疫組織化学的解析を行った。その結果、SCN の腹側部分に AMPK の基質分子が局在していることが明らかになった。この部分は、網膜からの入力がある部分のため、上記の光入力機構との関連と整合性のある結果が得られたといえる。これらの基質の発現量に概日変動が見られるのか、また、これらの分子の実態は何であるのかを、今後は明らかにする必要がある。また、SCN だけでなく、網膜や嗅上皮においてもこれらの分子が存在するのか、存在するならばそれらはどこに局在するのか、また、光刺激や匂い刺激によって発現量や存在箇所に変化がみられるのかについても、今後、明らかにしていかなければならない。

(3) 先行する知見との相違

中枢時計の存在する視交叉上核ではなく、肝臓に存在する概日時計や培養細胞を用いた実験より、AMPK が時計蛋白質の一つであるクリプトクロームをリン酸化し分解に導くことが 2009 年に Science 誌に報告された(引用)。AMPK の活性化剤投与により、時計蛋白質クリプトクロームの分解が促進され周期

が短くなり、リズムが減衰するというものであったため、AMPKの活性化によりリズムが増幅される我々の結果とは全く異なるものであった。我々の結果は時計蛋白質のリン酸化による分解促進ということでは説明が難しく、先行研究と結果の異なる理由として、その論文で扱われているいわゆる末梢時計は、我々の扱う中枢時計の存在するSCNと性質が大きく異なる可能性を考えている。これまで、末梢時計と中枢時計のリズム形成の根本メカニズムは基本的に同じと考えられてきたが、AMPKを研究対象としたアプローチにより本研究では両者が大きく異なる性質をもつことが示唆された。

<引用文献>

Lamia KA, Sachdeva UM, DiTacchio L, Williams EC, Alvarez JG, Egan DF, Vasquez DS, Juguilon H, Panda S, Shaw RJ, Thompson CB, Evans RM, AMPK regulates the circadian clock by cryptochrome phosphorylation and degradation, (2009) Science, vol. 326, pp. 437-440

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2件)

Nakamura T, Isobe Y, Seto M, Nakamura A, Morita S, Effect of sucrose concentration on the impulse amplitudes generated from brownfly sugar receptor cells (2014), The Japanese Journal of Taste and Smell Research, 査読有, vol. 21, pp. 265-266

Kon N, Yoshikawa T, Honma S, Yamagata Y, Yoshitane H, Shimizu K, Sugiyama Y, Hara C, Kameshita I, Honma K, Fukada Y. CaMKII is essential for the cellular clock and coupling between morning and evening behavioral rhythms. (2014), Genes Dev, 査読有, vol. 28, pp. 1101-1110

DOI: 10.1101/gad.237511.114

[学会発表](計13件)

中村整、視覚から始めた嗅覚・味覚研究、慶応大学講演会「味覚・嗅覚研究への提言」(招待講演)、2016年01月22日、慶応義塾大学(神奈川県・横浜市)

中村整、昆虫の味覚および関連する神経機構、京都大学ミニシンポジウム「動物生理現象の分子論的研究」(招待講演)、2015年11月08日、新都ホテル(京都府・京都市)

中村整、昆虫における苦味と甘味の対立的受容、日本動物学会第86回大会(招待講演)、2015年09月17日~2015年09月19日、朱鷺メッセ(新潟県・新潟市)

吉川朋子・中島芳浩・山田淑子・渡辺和人・山崎麻耶・崎村健二・本間さと・本間研一、Monitoring of circadian rhythm in arginine

vasopressin expression by a bioluminescence reporter、第92回日本生理学会大会、2015年03月21日~2015年03月23日、神戸市

嶋田のぞみ・仲村厚志・宮本武典・中村 整、クロキンバエ嗅覚味覚連合学習への一酸化窒素の関与、日本動物学会関東支部第67回大会、2015年03月14日、東京都新宿区

吉川朋子・黒田茂・高木清二・上田哲男・本間さと・本間研一、Multi-oscillatory system that controls behavioral and sleep/wake rhythms in mammals.、第21回日本時間生物学会学術大会、2014年11月08日~2014年11月09日、福岡市

中村 整・磯部 洋平・瀬戸 美星・仲村 厚志・森田 修司、クロキンバエ糖細胞のインパルス振幅に対する糖濃度の影響、日本味と匂学会第48回大会、2014年10月02日~2014年10月04日、静岡市

齋藤拓也・仲村厚志・中村整、嗅覚味覚連合学習におけるクロキンバエ頭部のShaker遺伝子発現、日本動物学会第84回大会、2013年09月26日~2013年09月28日、岡山大学津島キャンパス

大澤政洋・中村整・仲村厚志、イモリの嗅覚受容におけるリポカリンの役割、日本動物学会第84回大会、2013年09月26日~2013年09月28日、岡山大学津島キャンパス

森田修司・櫻井孝憲・仲村厚志・中村整、クロキンバエにおけるAMPキナーゼの概日時計への関与、日本動物学会第84回大会、2013年09月26日~2013年09月28日、岡山大学津島キャンパス

仲村厚志・吉川朋子・本間さと・中村整・本間研一、マウス視交叉上核におけるAMPKの概日時計機構への関与、第19回日本時間生物学会、2012年09月14日~2012年09月18日、北海道大学

仲村厚志、嗅神経特異的Gタンパク質Golfの細胞膜ラフトへの局在、第2回 先端味覚研究セミナー、2012年08月24日~2012年08月25日、日本女子大学

仲村厚志・吉川朋子・本間さと・中村整・本間研一、AMPKのマウス視交叉上核における概日時計への関与、日本動物学会第82回大会、2011年9月21日~2011年9月23日、旭川

[図書](計3件)

秋山(張)秋梅、安倍 学、蟻川謙太郎、安東宏徳、中村 整、その他、朝倉書店、光と生命の事典、2016年、436(265-265)

尾崎まみこ、岡田龍一、北條 賢、中村 整、その他、共立出版、鼻はにおいて電氣的興奮をする。“研究者が教える動物実験 第1巻 感覚”、2015年、210(34-37)

尾崎まみこ、岡田龍一、北條 賢、中村 整、その他、共立出版、嗅細胞の情報変換機構にせまる。“研究者が教える動物実験 第1巻 感覚”、2015年、210(38-41)

〔その他〕

ホームページ等

<http://kaeru.pc.uec.ac.jp/>

6．研究組織

(1)研究代表者

仲村 厚志 (NAKAMURA Atsushi)
電気通信大学・大学院情報理工学研究科・
助教
研究者番号：5 0 3 6 1 8 2 9

(2)研究分担者

中村 整 (NAKAMURA Tadashi)
電気通信大学・大学院情報理工学研究科・
教授
研究者番号：5 0 2 1 7 8 5 8

吉川 朋子 (YOSHIKAWA Tomoko)
北海道大学・大学院医学研究科・特任助教
研究者番号：3 0 4 5 1 3 9 7