

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23790277

研究課題名（和文） 視交叉上核による室傍核下部領域の体内時計制御機構の解明

研究課題名（英文） The mechanism of circadian clock in the subparaventricular zone by the suprachiasmatic nucleus

研究代表者

升本 宏平 (MASUMOTO KOHEI)

近畿大学・医学部・助教

研究者番号：60580529

研究成果の概要（和文）：mPer2Luc ノックインマウスから採取した脳組織切片培養により、体内時計中枢である視交叉上核とその概日リズムの最大中継領域である室傍核下部領域の発光リズムが逆位相であることを見いだした。視交叉上核から室傍核下部領域に至る概日リズム伝達機構を解明するために、室傍核下部領域単独培養後、視交叉上核と共培養した。室傍核下部領域単独培養では発光リズムはすぐに消失したが、視交叉上核との共培養により室傍核下部領域の発光リズムが回復することを発見した。

研究成果の概要（英文）：The suprachiasmatic nucleus (SCN) is the circadian center and subparaventricular zone (SPvZ) is the primary relay point of the circadian rhythm delivered from the SCN. Using mPer2promoter::Luciferase knock-in mice, we have found that SPvZ in the cultured brain slice containing SCN generated the bioluminescence rhythm antiphasic to that of the SCN. When SPvZ were culture alone, the bioluminescence rhythm in the SPvZ attenuated immediately, however, afterward co-culture with SCN recovered the rhythm of SPvZ. Now we are utilizing this system and found some requisites to keep the circadian bioluminescence rhythm in the SPvZ.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・環境生理学（含体力医学・栄養生理学）

キーワード：生体リズム

1. 研究開始当初の背景

行動や睡眠・覚醒、体温、血圧等の生理現象は約 24 時間周期のリズムを持つが、視交叉上核が破壊されるとこれらのリズムは失われる。視交叉上核で刻まれた時刻情報が生理機能を司る脳領域へ伝わり、視交叉上核と各脳領域の時計が同調することで生理現象の周期性が維持される。しかしながら、視交叉上核の時刻情報がどのように周辺脳領域

に伝わり、各脳領域の時計を制御しているのか未だ明らかにされていない。

室傍核下部領域は視交叉上核の背側部に隣接した領域である。室傍核下部領域は視交叉上核からの投射がある主要な領域である。また視交叉上核からの投射がある領域の多くは室傍核下部領域からの投射もある。そのため室傍核下部領域は視交叉上核からの情報を調節する役割を持つと考えられている。

実際、室傍核下部領域を破壊すると行動リズムは減衰することが知られている(Lu et al. J Neurosci. 2001)。これらのことから視交叉上核の時刻情報がどのように生理機能を司る脳領域に伝わるのか明らかにするためには、視交叉上核が室傍核下部領域の時計をどのように制御しているか明らかにすることが必要である。

2. 研究の目的

本研究では視交叉上核が室傍核下部領域の時計をどのように制御しているか明らかにすることで、視交叉上核が生理機能を司る脳領域の時計をどのように制御し周期的な生理現象を引き起こしているのかという未だ明らかにされていない問題へと展開する基盤となる研究を行う。研究期間内には以下のことを明らかにする。

(1) 視交叉上核と室傍核下部領域の時計同調機構の解明

- ①室傍核下部領域の振動が視交叉上核無しでは維持できないことを確認する。
- ②視交叉上核と室傍核下部領域の同調が液性因子で達成されているか確認するために、物理的な切断を行ない2領域の振動を測定する。

(2) 視交叉上核が室傍核下部領域の時計を逆位相で制御する機構の解明

- ①室傍核下部領域における位相反応曲線の作成。
- ②室傍核下部領域で刺激に反応する遺伝子を Genechip を用いて明らかにする。

(3) 時刻情報伝達物質の同定

- ①視交叉上核の時刻情報を伝える時刻情報伝達物質を特定するために培養液をサンプルとし MALDI-TOF/MS 法を用いる。
- ②時刻情報伝達物質候補を用いて室傍核下部領域の時計を制御する。
- ③時刻情報伝達物質をマウスに投与し室傍核下部領域の時計を制御することで行動への影響を観察する。

3. 研究の方法

視交叉上核が室傍核下部領域の時計をどのように制御しているか明らかにするために、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 mPer2Luc ノックインマウスの脳組織片を用いて、視交叉上核と室傍核下部領域の発光リズムを測定することを軸として研究を行った。

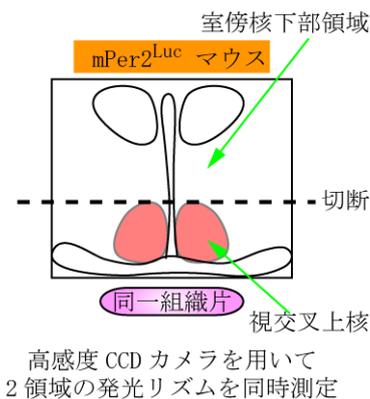
(1) 室傍核下部領域の振動が視交叉上核無しでは維持できないことの確認。

室傍核下部領域が発光リズムを維持する

ためには、視交叉上核からのなんらかのシグナルが必要であることを確認するために、室傍核下部領域を単独で培養し高感度 CCD カメラを用いて振動を測定した。

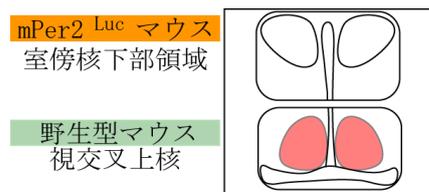
(2) 物理的な切断後の2領域の振動測定。

視交叉上核と室傍核下部領域の同調が液性因子で達成されているか確認するために、同一組織片上で視交叉上核と室傍核下部領域の発光リズムを高感度 CCD カメラを用いて2領域同時に測定する。2領域の発光リズムが継続していることを確認しながら物理的に神経連絡を切断し、2領域の振動がどうか確認した。



(3) 視交叉上核との共培養による室傍核下部領域の振動回復。

室傍核下部領域の振動には視交叉上核からのシグナルが必要であることを確認するために、まず室傍核下部領域単独で培養し発光リズムを測定。発光リズムの振幅が減衰したのを確認した後に視交叉上核と共培養を行い、室傍核下部領域の発光リズムが回復するか確認した。



室傍核下部領域と視交叉上核を共培養

室傍核下部領域の発光振動が回復するか？

この実験は実験効率を高めるために同時に8サンプルを測定できる微弱発光測定装置を用いることで行った。

4. 研究成果

(1) 視交叉上核と室傍核下部領域の発光リズムは逆位相であった。

視交叉上核と室傍核下部領域の時刻情報伝達機構を解明するために、mPer2Luc ノックインマウスから視交叉上核と室傍核下部領

域を含んだ脳組織片を作製し、高感度 CCD カメラを用いて 2 領域の発光リズムを同時に測定した。その結果、視交叉上核と室傍核下部領域の発光リズムが逆位相で振動していることを確認した (図 1)。視交叉上核では背内側部より発光リズムの振動が (図中、2、赤線)、遅れて腹外側部の振動が起こる (図中、3、黄線)。さらに遅れて室傍核下部領域の振動が起きていることが分かった (図中、1、紫線)。これらの領域の発光リズムは位相関係を保ったまま 5 日以上継続することが確認された。

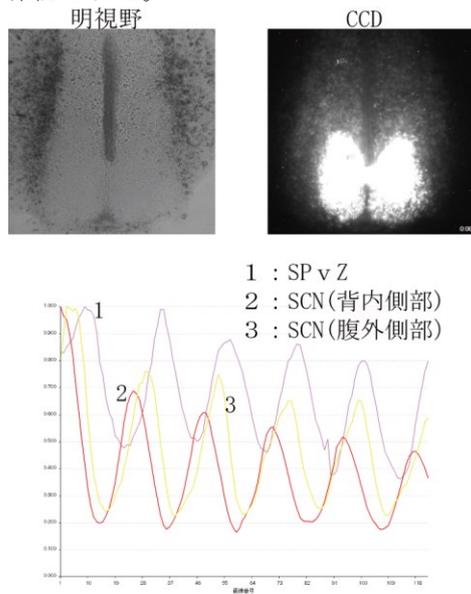


図 1 SPvZとSCNの発光振動

視交叉上核と室傍核下部領域の発光リズムの位相関係はこれまでに報告されてきた電気活動等の位相関係を酷似していた。

(2) 室傍核下部領域の単独培養は発光リズムを維持できない。

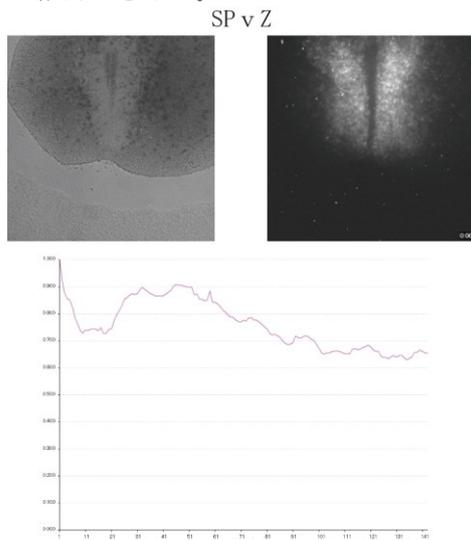


図 2 SPvZの発光振動

室傍核下部領域が発光リズムを維持するためには、視交叉上核からのシグナルが必要であることを確認するために、室傍核下部領域を単独で培養し高感度 CCD カメラを用いて振動を測定した。その結果、室傍核下部領域の発光リズムは弱い振動を示し、その振動はすぐに減衰した (図 2)。

(3) 物理的な切断後の視交叉上核と室傍核下部領域の振動測定。

視交叉上核と室傍核下部領域の同調が液性因子で達成されているか確認するために、まず同一組織片上で視交叉上核と室傍核下部領域の発光リズムを高感度 CCD カメラを用いて 2 領域同時に測定し、2 領域の発光リズムが継続していることを確認した。その後、物理的に 2 領域間を切断し、2 領域の振動が継続されるか確認した。その結果、切断前では視交叉上核背内側部、視交叉上核腹外側部、室傍核下部領域は一定の位相関係を維持して発光リズムを示していたが (図 3、左)、切断後すぐに視交叉上核と室傍核下部領域の発光リズムの位相関係は崩れた (図 3、右)。また室傍核下部領域の発光リズムの振幅は徐々に減衰していき、切断後 4 日目で発光リズムは消失した。一方で、視交叉上核背内側部と視交叉上核腹外側部の発光リズムの位相関係は組織切断前後で変化しなかった。また、視交叉上核背内側部と視交叉上核腹外側部の発光リズムに振幅についても大きな変化を確認することはできなかった。

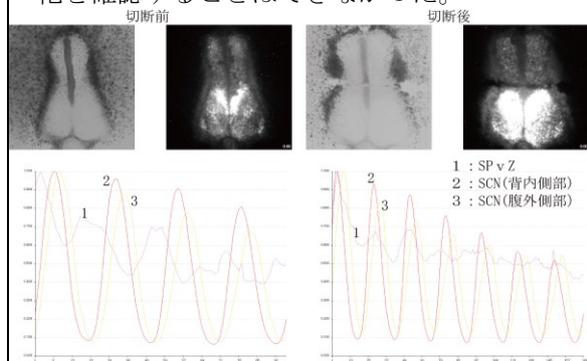


図 3 組織切断後のSPvZとSCNの発光振動

これらの結果から、室傍核下部領域の発光リズムの消失は、正常な振動を刻む視交叉上核からのシグナルが物理的な切断によって伝わらなくなったことで引き起こされたと考えられる。つまり、視交叉上核が室傍核下部領域の時計を制御している機構は、神経連絡を介した機構、グリア細胞を介した機構、または物理的接触による電気刺激を介した機構ではないかと考えることができる。

(4) 視交叉上核との共培養による室傍核下部領域の発光リズムの振動回復。

室傍核下部領域単独培養では発光リズム

はすぐに消失してしまい、また視交叉上核との物理的連絡を切断することによっても室傍核下部領域の発光リズムは消失した。そこで、さらに室傍核下部領域の振動には視交叉上核が必要であることを確認するために、発光リズムが消失した室傍核下部領域を視交叉上核と共培養することによって発光リズムの回復を試みた。

この実験には実験の効率化を図るために8サンプルを同時に測定できる微弱発光測定装置を用いた。これはサンプル全体の発光量を測定するため、室傍核下部領域はmPer2Lucノックインマウスより採取し、視交叉上核は野生型マウスより採取して実験を行った。

まず室傍核下部領域を単独で培養し発光リズムを測定したところ、図2と同様に、やはり弱い振動しか示さず、その振動はすぐに減衰して発光リズムを示さなくなった(図4、左)。次に発光リズムを計測していた室傍核下部領域に、発光しない野生型マウスの視交叉上核を並べて共培養を行った。共培養開始から1週間後、発光リズムの測定を再開したところ、室傍核下部領域は単独培養と比較して大きな振幅の発光リズムを示し、その振動は5日以上継続した(図4、右)。

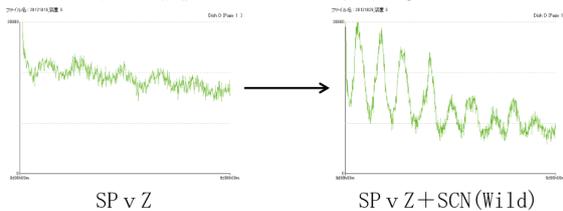


図4 SCN共培養によるSP v Zの発光振動回復

この結果から、やはり室傍核下部領域の振動には視交叉上核からのシグナルが必要であることが確認された。

視交叉上核との共培養後の室傍核下部領域の発光リズムの回復には約1週間要した。このことは共培養開始後、すぐに発光リズムを測定することによっても確認された(図5)。視交叉上核との共培養による室傍核下部領域の発光リズム回復には日数を必要とすることから、これら2領域間のネットワークは、やはり単純な液性因子によるものだけでなく、物理的接触を伴ったものであることが示唆された。

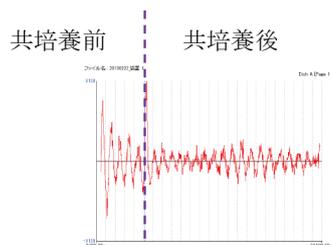


図5 SCN共培養前後のSP v Zの発光振動

以上の結果より、共培養することによって再構築された視交叉上核と室傍核下部領域間のネットワークに時刻制御機構が存在していることが示唆された。

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1件)

① Yukihiro Hamada, Kazumasa Saigoh, Koh-hei Masumoto, Mamoru Nagano, Susumu Kusunoki, Yasufumi Shigeyoshi, Circadian expression and specific localization of a sialyltransferase gene in the suprachiasmatic nucleus, *Neuroscience Letters*, 査読有、535、2012、12-17
DOI : 10.1016/j.neulet.2012.12.032

[学会発表] (計1件)

① 升本宏平、マウス視交叉上核における光応答プログラム、第19回日本時間生物学会学術大会、2012年09月15日、北海道大学学術交流会館(北海道)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

升本 宏平 (MASUMOTO KOHEI)

近畿大学・医学部・助教

研究者番号：60580529

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：