

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 6 月 1 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790280

研究課題名（和文） 緑色蛍光蛋白導入ラットの視交叉上核での生体リズムの可視化と生理機能解明

研究課題名（英文） Visualization of circadian rhythm in suprachiasmatic nucleus using green fluorescent protein transgenic rats.

研究代表者

藤原 広明（FUJIHARA HIROAKI）

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：10369051

研究成果の概要（和文）：

マウスを用いて様々な波長の光が視床下部視交叉上核および室傍核におよぼす影響について検討した。その結果、青色 LED 光照射群において有意な Fos 免疫陽性細胞数の増加が観察された。また、AVP-eGFP トランスジェニックラットにおいて時差ぼけモデルを作成し、視交叉上核を採取して DNA マイクロアレイ解析を行った。サーカディアンリズムに関係する遺伝子では *Per3* 遺伝子が有意に増加していた。

研究成果の概要（英文）：

I examined the effect of LED light stimulus to the suprachiasmatic nucleus (SCN) and the paraventricular nucleus (PVN) in mouse. The Fos-ir cells were increased in the SCN and the PVN after blue LED light stimulus. I investigated the gene expression in jet lag model using arginine vasopressin (AVP)-eGFP transgenic rats. The *Per3* gene is increased in the SCN in the jet lag AVP-eGFP transgenic rats.

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	3,200,000	960,000	4,160,000

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：eGFP、視交叉上核、バゾプレッシン、サーカディアンリズム

1. 研究開始当初の背景

睡眠-覚醒に関わる大きな要因の一つにサーカディアンリズムがある。このリズムの崩壊は、非 24 時間睡眠覚醒症候群、睡眠相遅延症候群などにつながり、日本人成人の 5 人に 1 人がこのような何らかの睡眠障害があると言われている。睡眠-覚醒サイクルを制御するサーカディアンリズムについて研究することは非常に重要なことである。これまでの研究により当教室において、バゾプレッシン (AVP) 遺伝子に緑色蛍光蛋白 (enhanced Green Fluorescent Protein: eGFP) 遺伝子を挿入した AVP-eGFP トランスジェニックラットの作成に成功した (Transgenic expression of enhanced green fluorescent

protein enables direct visualization for physiological studies of vasopressin neurons and isolated nerve terminals of the rat. Ueta Y, Fujihara H, Serino R et al. *Endocrinology* 146:406-13, 2005 Epub 2004.)。この AVP-eGFP トランスジェニックラットは特異的に AVP 産生ニューロンに AVP と共に eGFP が発現する。サーカディアンリズムの中核である視交叉上核には、AVP 産生ニューロンが存在しており、本トランスジェニックラットでも視交叉上核に eGFP が発現している。視交叉上核で産生される AVP は浸透圧刺激などには影響を受けず、視交叉上核からのサーカディアンリズムを制御する出力系の 1 つとして AVP が作用している可能性

が考えられる。これまでの研究で我々は分子生物学的手法を用いて本トランスジェニックラットの視交叉上核の AVP-eGFP 融合遺伝子に日内リズムが存在すること、光刺激に対して鋭敏に反応することを報告した (Diurnal changes of arginine vasopressin-enhanced green fluorescent protein fusion transgene expression in the rat suprachiasmatic nucleus. Maruyama T, Ohbuchi T, Fujihara H, et al. Peptides 2010 Aug 19. [Epub ahead of print]). しかし、視交叉上核における AVP の機能に関する研究はほとんど無く、この部位における AVP の役割についてはいまだ不明な部分が多い。

2. 研究の目的

本研究課題では AVP-eGFP トランスジェニックラットを用いて、視交叉上核における AVP-eGFP ニューロンの生理機能について DNA マイクロアレイ法や siRNA による RNA 干渉を利用して検討し、AVP ニューロンの役割について解明することを目的とした。また、経時的に eGFP の緑色蛍光を観察できる *in vivo* eGFP モニタリングシステムを開発することにより、視交叉上核の AVP 産生を指標とした長期的なサーカディアンリズムの測定法の確立とその応用を目的とした。具体的には、本トランスジェニックラットで明暗サイクルの位相をずらした時差ぼけモデルを作成し、時差ぼけの視交叉上核での AVP-eGFP 発現への影響を調べることにより、位相変化が AVP 産生とサーカディアンリズムの関連にどのような影響を及ぼすかを検討する。本研究の成果は視交叉上核で産生される AVP が関わる睡眠障害の病態生理の解明の一助となることが期待される。

3. 研究の方法

すべての期間中、PCR 法により eGFP 遺伝子導入の確認を行う。具体的には本学動物センター SPF エリア内で繁殖・飼育している AVP-eGFP トランスジェニックラットの交配後、出産した仔ラットの耳片採取を行う。耳片組織より抽出した DNA を用いて PCR 法にて eGFP 遺伝子導入の有無 (ジェノタイプング) を調べる。この判定作業は繁殖毎に随時行う。

平成 23 年度

(1) *in vivo* eGFP モニタリングシステムの開発・セットアップを行う。

in vivo eGFP モニタリングシステムは eGFP 励起光をレーザーより光ファイバーを通して AVP-eGFP 細胞に照射し、励起された

蛍光をもう一方のファイバーを通して光電管に入力し、光情報を電氣的信号に変換し記録するシステムである。実験セットはほぼ完成しているが、分解能やゲインの調節等の微調整を行い、長時間の測定を可能にするシステムの構築を行う。

(2) 正常明暗サイクルおよび時差ぼけモデルにおいて、視交叉上核 AVP ニューロンにおける網羅的な遺伝子発現の変化を測定する。

eGFP 蛍光を指標に視交叉上核の AVP ニューロンのみをレーザーマイクロダイセクション法により抽出し、DNA マイクロアレイ法により AVP ニューロンにおける網羅的な遺伝子発現の変化を測定する。

平成 24 年度

(3) 正常明暗サイクルおよび時差ぼけモデルにおいて AVP-eGFP を指標とした視交叉上核におけるサーカディアンリズムの測定を行い比較検討する。

ウレタン麻酔下のトランスジェニックラットを定位脳固定装置に固定し、骨ドリルで頭蓋骨に穴を空けて、(1) のシステムを用いて視交叉上核にファイバーを挿入、励起光を照射し eGFP 蛍光の経時的測定を行う。正常明暗サイクル群および明暗サイクルの位相をずらした時差ぼけモデルと比較し、時差ぼけの視交叉上核への影響を検討する。

(4) siRNA による RNA 干渉を行い、遺伝子発現の抑制が AVP ニューロンにおよぼす影響について検討する。

(2) で変化した遺伝子をターゲットとして siRNA による RNA 干渉を行い、遺伝子発現の抑制が視交叉上核 AVP ニューロンにおよぼす影響について検討する。視交叉上核を含む脳切片を作成し siRNA による RNA 干渉を行い、視交叉上核 AVP ニューロンにおける AVP 遺伝子発現の変化を測定する。

4. 研究成果

平成 23 年度は、eGFP モニタリングシステムの小型化を行った。レーザー照射装置を固定式のものから、光ファイバーへの導光効率の良いレーザーダイオードに変更し、電源を電池に変更することによってラットの頭部に固定できる大きさにまで小型化した。現在、照射光の増強および光情報を関知するシステムの小型化を行っている。このシステムが完成すれば、麻酔下ではなく自由行動下の

eGFP 蛍光の変化を検出することが可能となる。

また、平成23年度は実験を行うのに必要なバズプレッシン-eGFP トランスジェニックラットを入手できなかったため、マウスを用いて様々な波長の光が視床下部視交叉上核および室傍核におよぼす影響について検討した。明暗サイクルは明期12時間(18時~6時)、暗期12時間(6時~18時)とした。赤、緑、青および白色LED光照射は暗期開始6時間後(12時)から60分間行い、コントロール群には何の照射も行わなかった。照射終了90分後に4%パラホルムアルデヒドによる灌流固定を行い、脳を採取した。クリオスタットを用いて脳薄切切片を作成し、Fosタンパクの免疫組織化学的染色を行った。切片は顕微鏡下で観察した後、Fos免疫陽性細胞数をカウントした。その結果、各LED光照射において視交叉上核および室傍核では他の群と比して青色LED光照射群において有意なFos免疫陽性細胞数の増加が観察された。このことは青色LED光で視交叉上核および室傍核の神経細胞が活性化したことを意味する。光刺激に対する生体の反応は青色光で最も強いことが報告されており、今回の結果はそれらの先行研究を支持するものであると考えられる。また、暗期中の光照射で生体リズムの位相変化が起こることはよく知られている。青色光はその変化が他群と比べて強い可能性が示唆された。

平成24年度はバズプレッシン-eGFP トランスジェニックラットにおいて時差ぼけモデルを作成し、視交叉上核を採取してDNAマイクロアレイ解析を行った。トランスジェニックラットは明期12時間(18時~6時)、暗期12時間(6時~18時)の環境下で飼育した。光環境の変化が視交叉上核での遺伝子発現におよぼす影響をみるため、ラットを2群に分け時差群は18時から8時間明期開始時刻を前進させた。コントロール群は通常の明暗サイクルで飼育を続けた。24時間後、脳を採取し両側の視交叉上核を摘出した。視交叉上核はホモジナイズし、mRNAを抽出した後、DNAマイクロアレイを行った。遺伝子発現を網羅的に解析するためfold changeを行いT-testにて検定を行った。その結果、24遺伝子において有意な遺伝子発現量の変化が観察された。サーカディアンリズムに関係する遺伝子ではPer3遺伝子が有意に増加していた。Per3

は細胞核外でPer1、Per2と共に二量体を形成し、時計遺伝子のネガティブフィードバックループ形成のための補助遺伝子として働くことが知られている。Per3は時差ぼけ時のリズム形成に関与している可能性が示唆された。しかし一方でPer3はサーカディアンリズムの形成に必須でないという報告もあり、さらなる検討が必要である。また、網膜の恒常性維持に関与しているAi pl1遺伝子も有意に増加していた。一方、バズプレッシン遺伝子およびeGFP遺伝子には変化が見られなかった。今後、これらのマイクロアレイ解析で選定された候補遺伝子においてReal time PCR法において定量的遺伝子発現解析を行い検討する予定である。

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8件)

①著者名 Ishikura T, Suzuki H, Yoshimura M, Ohkubo J, Katoh A, Ohbuchi T, Ohno M, Fujihara H, Kawasaki M, Ohnishi H, Nakamura T, Ueta Y.

論文表題 Expression of the c-fos-monomeric red fluorescent protein 1 fusion gene in the spinal cord and the hypothalamic paraventricular nucleus in transgenic rats after nociceptive stimulation.

雑誌名 Brain Res.

査読の有無 査読有り

巻 15;1479

発行年 2012

ページ 52-61

DOIコード 10.1016/j.brainres.2012.08.033

②著者名 Takei Y, Bartolo RC, Fujihara H, Ueta Y, Donald JA.

論文表題 Water deprivation induces appetite and alters metabolic strategy in *Notomys alexis*: unique mechanisms for water production in the desert.

雑誌名 Proc Biol Sci.

査読の有無 査読有り

巻 7;279

発行年 2012

ページ 2599-2608

DOIコード 10.1098/rspb.2011.2627

③著者名 Fujihara H, Sasaki K, Mishiro-Sato E, Ohbuchi T, Dayanithi G, Yamasaki M, Ueta Y, Minamino N.

論文表題 Molecular characterization and biological function of neuroendocrine regulatory peptide-3 in the rat.

雑誌名 Endocrinology

査読の有無 査読有り

巻 153

発行年 2012

ページ 1377-1386

DOIコード 10.1210/en.2011-1539

④著者名 Ohno M, Fujihara H, Iwanaga M, Todoroki M, Katoh A, Ohbuchi T, Ishikura T, Hamamura A, Hachisuka K, Ueta Y.

論文表題 Induction of arginine vasopressin-enhanced green fluorescent protein expression in the locus coeruleus following kainic acid-induced seizures in rats.

雑誌名 Stress

査読の有無 査読有り

巻 15

発行年 2012

ページ 435-442

DOIコード 10.3109/10253890.2011.637185

⑤著者名 Iwanaga M, Ohno M, Katoh A, Ohbuchi T, Ishikura T, Fujihara H, Nomura M, Hachisuka K, Ueta Y.

論文表題 Upregulation of arginine vasopressin synthesis in the rat hypothalamus after kainic acid-induced seizures.

雑誌名 Brain Res.

査読の有無 査読有り

巻 18;1424

発行年 2011

ページ 1-8

DOIコード 10.1016/j.brainres.2011.09.030

⑥著者名 Katoh A, Fujihara H, Ohbuchi T, Onaka T, Hashimoto T, Kawata M, Suzuki H, Ueta Y.

論文表題 Highly visible expression of an oxytocin-monomeric red fluorescent protein 1 fusion gene in the hypothalamus and posterior pituitary of transgenic rats.

雑誌名 Endocrinology

査読の有無 査読有り

巻 152

発行年 2011

ページ 2768-2774

DOIコード 10.1210/en.2011-0006

⑦著者名 Ohbuchi T, Yokoyama T, Saito T, Ohkubo J, Suzuki H, Ishikura T, Katoh A, Fujihara H, Hashimoto H, Suzuki H, Ueta Y.

論文表題 Possible contribution of pannexin channel to ATP-induced currents in vitro in vasopressin neurons isolated from the rat supraoptic nucleus.

雑誌名 Brain Res.

査読の有無 査読有り

巻 7;1394

発行年 2011

ページ 71-78

DOIコード 10.1016/j.brainres.2011.04.017

⑧著者名 A Yamamoto R, Akazawa H, Fujihara H, Ozasa Y, Yasuda N, Ito K, Kudo Y, Qin Y, Ueta Y, Komuro I.

論文表題 Angiotensin II type 1 receptor signaling regulates feeding behavior through anorexigenic corticotropin-releasing hormone in hypothalamus.

雑誌名 J Biol Chem.

査読の有無 査読有り

巻 17;286

発行年 2011

ページ 21458-21465

DOIコード 10.1074/jbc.M110.192260

〔学会発表〕(計2件)

①発表者名 藤原広明

発表標題 Neuroendocrine regulatory peptide-3 のラット視床下部における分布と生理機能

学会等名 第89回日本生理学会大会

発表年月日 2012年3月31日

発表場所 松本市総合体育館(長野県)

②発表者名 志内哲也

発表標題 摂食リズムが視床下部性代謝調節に及ぼす影響

学会等名 第90回日本生理学会大会

発表年月日 2013年03月29日

発表場所 タワーホール船堀(東京都)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤原 広明 (FUJIHARA HIROAKI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス

研究部・助教

研究者番号: 10369051