

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26640021

研究課題名(和文) 緩やかな環境時間変化検出機構の解明

研究課題名(英文) Toward understanding the detection mechanism of the gradually changing time-information

研究代表者

山田 陸裕 (Yamada, Rikuhiro)

国立研究開発法人理化学研究所・生命システム研究センター・上級研究員

研究者番号：90469924

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：環境は明暗の日周期に代表されるような時間構造を持っていることが多く、生命システムはその変化を予測し適応する性質を備えている。多様な情報を効率良く内部に表現し、安定にそれを取りだして利用する性質は、生命システムの最も基本的な性質の一つであると考えられる。本課題では、生命システムが環境の中の一定のパターン(環境の情報構造)を検知し内部に表現するメカニズムとして哺乳類体内時計システムに着目し環境との同調メカニズムを研究対象とした。独自の観察系の構築と包括的な環境時刻伝達物質の調査の結果、体内時計システムが緩やかな環境時刻情報の変化を検出して内部表現するメカニズムに迫る基盤的知見を得ることに成功した。

研究成果の概要(英文)：The environment around the living-organisms exhibits many patterns including daily light/dark cycles. Living-organisms have the ability to utilize the pattern and predict the change to adapt to the environment. The ability to internalize, efficiently represent, and reliably use the various patterned information is one of the most essential properties of living-organisms. In this research project, I focused on the mammalian circadian clock system as a mechanism which detects and internalizes the environmental patterned information, especially on the synchronization machinery of the circadian clock system. I developed a unique perfusion culture system, and comprehensively investigated signaling molecules potentially involved in the synchronization and successfully obtained the fundamental knowledge on the mechanism underlying the circadian clock's ability to detect the gradual change of environmental time-information.

研究分野：システムズバイオロジー

キーワード：体内時計 視交叉上核 システムズバイオロジー

1. 研究開始当初の背景

生命を取り巻く環境は多様に变化するがその変化は完全に無秩序というわけではなく、一定のパターン(構造)を持っていることが多い。生命システムはパターンをもった環境情報に対してはその変化を予測し適応する性質を備えている。多様な情報を効率良く内部に表現し、再現性良くそれを取りだして環境を予測するというこの性質は、生命システムが多数の構成要素を複雑に組み合わせながらも調和を維持して多様な形態を実現する上で不可欠な性質であり、生命システムが正常に機能するための最も基本的な性質の一つであると考えられる。本課題では、生命システムが環境の中の一定のパターン(環境の情報構造)を検知し内部に表現するメカニズムとして哺乳類体内時計システムに着目し、特に体内時計と環境との同調メカニズムを研究対象とした。

2. 研究の目的

本課題では、環境との同調メカニズムとして特に、時間的に緩やかな環境変化を検知するメカニズムを解き明かすこと目指した。本課題の範囲で取り組むべき重点を環境時刻情報と比較される内部時刻情報の表現メカニズムの解明に置き、研究対象として哺乳類の体内時計システムを選択してマウスの体内時計中枢組織である脳組織(視交叉上核)を用いながら、以下を実施する：

- (1) 視交叉上核が環境の時間情報を受け取るために利用する因子をリストアップし、
- (2) それら因子のダイナミクスが視交叉上核の時間表現に与える影響を解析し、
- (3) 解析から示唆されるメカニズムを遺伝学的に改変してその役割を検証する。

これらのことを通して、生命システムが環境情報を内的に表現しその内部情報と環境を比較するために備える一般的な性質を理解する礎を築くこと目指した。

3. 研究の方法

方法は以下の3つに大別される。

- (1) 環境の時間情報を伝達する因子(環境時間因子)の同定: 環境時間因子を同定するため、培養マウス視交叉上核を候補物質で刺激し応答を解析する。

- (2) 同定された因子のダイナミクスが視交叉上核に与える影響の解析: 同定された環境時間因子のダイナミクスが視交叉上核の体内時間に与える影響を解析するため、独自開発した灌流培養系を用いて時計遺伝子の発現状態をリアルタイムで観察し視交叉上核が環境情報変化に応答する様子を解析する。

- (3) 環境時間情報が体内時間へ変換される

メカニズムの理解: 数個の遺伝子に標的を絞り、これらの Knock-out mouse を解析することで、環境時間と体内時間をつなぐ遺伝子を明らかにする。

本課題の期間内では特に(1)~(2)について次節に報告するような成果が得られた。(3)については、これらの成果の上に今後慎重に検討していく。

4. 研究成果

- (1) 環境サイクルの変化は視交叉上核の同調性を変化させる

マウスを長日・短日サイクルに5週間程度同調させた後で恒暗条件へ移行すると、移行後しばらく非対称な行動サイクルが持続することが報告されており(文献)、本課題の中でも確認された。次に非対称な環境サイクルが体内時計の中枢である視交叉上核に表現されているという仮説を実証するため、灌流培養系を作成して視交叉上核の組織培養を行った(Fig.1)。培地をポンプで絶えず入れ替えながら視交叉上核を培養しつつ、複数のポンプをコンピュータ制御することで任意の培養環境サイクルに視交叉上核を曝し

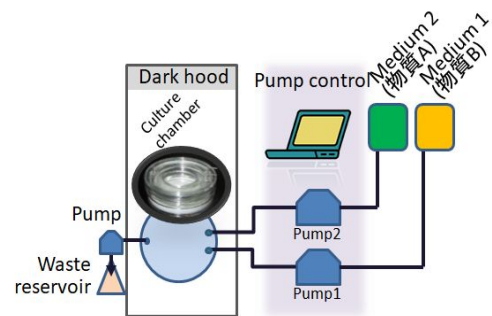
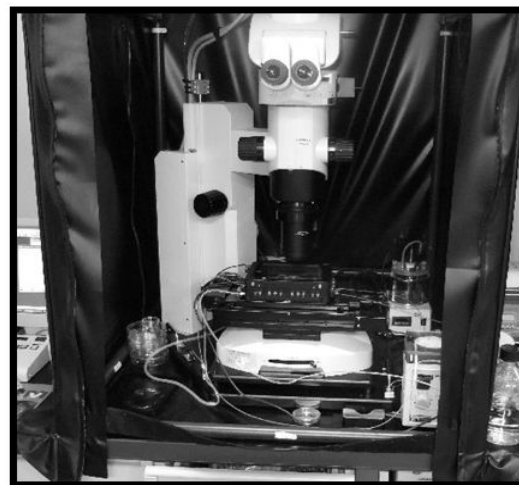


Fig.1 灌流培養系

た。また、灌流培養系を顕微鏡下に構築することで、リアルタイムに視交叉上核の環境サイクルへの応答を観察した。cAMP パスウェイの Activator である Forskolin で長日・短日の環境サイクルを再現しながら視交叉上核を培養し観察したところ、約1ヶ月の連続培

養観察の期間中に、長日サイクルでは振動の振幅が短日サイクルにくらべて小さくなるのが観察された。さらに、顕微鏡画像の解析により視交叉上核細胞の同調性を定量的に検討したところ、長日条件では視交叉上核の同調性が低下（位相分布が広がる）し、短日条件では上昇する（位相分布が狭まる）ことが確認できた。連続的に時間変化する環境時刻情報因子の効果を培養組織上で一細胞レベルの解像度で観察した初めての成果と言える。

(2) 時刻情報伝達物質の同定と分類

視交叉上核への関与が示唆されている神経伝達物質は神経ペプチドだけに注目しても約 20 種程度が知られており、それぞれが振動位相の形成に関してどのような作用を持つのかは大部分が未検証に残されている。そこで、過去の文献から視交叉上核での機能が示唆される神経ペプチドについて、それらが振動位相に与える影響を一つ一つ検証した。視交叉上核の培養スライスを用いて 10 日間のスライス培養観察を行い、期間中央の 5 日目に 30 分間、それぞれのペプチドで培養スライスを刺激し前後の位相変化を定量した。位相が異なる 24 サンプルを一度に刺激することで位相応答曲線を得た。またこの際同時に溶剤で刺激実験を行ってコントロールデータとして用いることで、Kendall's rank correlation 法により、神経ペプチドによる位相応答曲線が統計的にも有意な応答であることを評価した。この結果、安定的に位相応答を誘起できる物質数種が確認され、また位相応答のパターンは概ね視交叉上核を a. 昼にリセットするパターン、b. 夜にリセットするパターン、の 2 種類にまとめられることが明らかになった。

(3) 時刻情報の内部表現メカニズム

視交叉上核はその形態上の特徴から 2 つの領域に大別され、それぞれが相互作用することによって機能していると考えられている。一方で、ここまでの解析によって時刻情報伝達物質が主に 2 種類に分類できることがわかった。以上から、視交叉上核に位相分布を形成するメカニズムは、2 つの領域（振動子）が 2 つの神経伝達物質によって結合しているという単純化したモデルでとらえることが可能であると考えた。より具体的には、視交叉上核には背側(Dorsal 側)、腹側(Ventral)にそれぞれ 2 つの振動子があり、Ventral 側からは昼にリセットする物質が分泌して Dorsal 側の時計を調整し、Dorsal 側からは夜にリセットする物質が分泌して Ventral 側の時計を調整しているという仮定を置き、モデルを組み立てた(Fig.2)。さらに、過去文献から得られる情報を参考に、昼にリセットする物質と夜にリセットする物質のどちらも時刻 CT0(明期が始める時刻に対応する時刻)付近で分泌して作用していると仮定して

数値シミュレーションを行うと、実際に実験で観察される培養視交叉上核の位相関係が再現されることを確認した。すなわち、Dorsal 側の振動子が Ventral 側に 4 時間程度先行する。全体としては Dorsal 側から Ventral 側へ位相が流れるように見える Wave が観察される。実際の視交叉上核のタイムラプス撮影でも Dorsal 側から Ventral 側への Wave が発生しているような位相分布が観察されるので、提案モデルは実際の視交叉上核の構造の要点を的確に捉えていると考えられた。

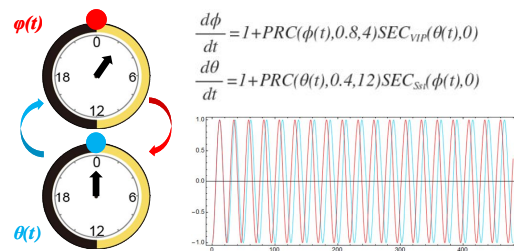


Fig.2 同定された時刻情報因子ダイナミクスの数値シミュレーションによる検証

(4) モデルの予測と検証

提案モデルは興味深い予想も提供した。昼にリセットする物質と夜にリセットする物質の分泌時刻をそれぞれ様々に変化させながらシミュレーションを行って 2 つの振動子の位相分布との関係をしらべると、通常観察される Dorsal 側から Ventral 側へ流れる位相分布とは逆の Ventral 側から Dorsal 側へ流れる位相分布が存在し得ることが予想されるというものである。

この予測を前述の灌流培養系を用いて検証した。昼にリセットする物質と夜にリセットする物質の濃度を 24 時間周期で一定の時間間隔で培養組織に与えながら一細胞レベルでのタイムラプス観察を実施したところ、視交叉上核においてもモデル予想に近い位相分布、すなわち、Ventral 側から Dorsal 側に Wave が流れる様子を観察することができ、提案モデルの妥当性を補強する結果となった。

(5) 2 物質の役割分担

本課題では以上から、視交叉上核の特徴的な位相分布が形成される上で、振動子が昼にリセットする物質と夜にリセットする物質といったリセット時刻の異なる神経伝達物質をそれぞれ特定の時刻に分泌させながら相互作用することが重要であることを示すことができた。一方で、これまでの文献などから本課題で注目した昼にリセットする物質や夜にリセットする物質の分泌には概日周期があって、ピークは CT0~4 にあると考えられている。昼にリセットする物質についてはリセット時刻がその分泌時刻に近いこと

から視交差上核の依存分布の幅を狭める方向に機能しており、夜にリセットする物質はリセット時刻と分泌時刻に 12 時間近い開きがあることから、位相分布を広げる方向に作用する働きがあると推測できる。視交差上核はこのような 2 つの相反する働きのある機構を組み合わせてバランスさせることで、環境の情報を内部に表現し、環境と内部の時刻の調整を行っていると考えられる。近年 GABA 作動性神経が類似の機能を持つことを示唆する報告があり(文献)、本成果はこのようなメカニズムが分泌性の神経ペプチドによっても担われていることを示す成果である。

<引用文献>

Inagaki N. et al., PNAS, 2007
Myung J., et al., PNAS, 2015

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)

Rikuhiro G. Yamada, Hiroki R. Ueda, Compass in the data ocean toward chronotherapy, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 査読有、2017, 114(20), 5069-5071

山田陸裕、洲崎悦生、上田泰己、生体リズム・発生現象における 1 細胞シーケンスを用いた細胞多様性の解明、*生体の科学*、査読無、2014 年、65、138-143

[学会発表](計 2 件)

山田陸裕、マウス視交叉上核における環境時間コーディングメカニズム、第 22 回日本時間生物学会学術大会、2015 年 11 月 21 日 東京大学本郷キャンパス 伊藤国際学術研究センター(東京)

Rikuhiro G. Yamada, In vitro SCN's response to environmental timing cues, 第 38 回 日本神経科学大会 (Neuroscience 2015) (国際学会), 2015 年 7 月 29 日 神戸国際展示場(神戸)

[図書](計 1 件)

Hitoshi Iuchi, Rikuhiro G. Yamada, Hiroki R. Ueda, "Metabolites as Clock Hands: Estimation of Internal Body Time Using Blood Metabolomics", *Epigenetic Methods in Neuroscience Research, Neuromethods*, Springer New York, 2016, Volume 105, 245-254

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

https://scholar.google.co.jp/citations?user=gl_AAyEAAAAJ

<http://www.qbic.riken.jp/syn-bio/jpn/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田陸裕 (YAMADA, Rikuhiro)

国立研究開発法人 理化学研究所・

生命システム研究センター・上級研究員

研究者番号：90469924