

# 研究報告書

## 「自発行動リズムを制御する体内時計神経回路基盤の解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成22年10月～平成26年3月

研究者: 中村 渉

### 1. 研究のねらい

神経機能は周期性をもって変動することにより、生体が暴露される環境イベントに対して効率よく適応することを可能にする。とりわけ、一日周期で昼夜が訪れる地球上では、光環境や温度環境が24時間周期で変動し、生物は生命活動を維持するため約一日(サーカディアン)周期の体内時計機能を内在している。哺乳類において、視床下部・視交叉上核を実験的に破壊すると、生体におけるあらゆる生理機能や睡眠覚醒サイクルに認められるサーカディアンリズムが消失することから、視交叉上核はサーカディアンペースメーカーであると考えられる。視交叉上核は単一神経細胞内に概日リズムを刻む分子機構を内在した概日時計神経細胞の集合体であり、環境の周期的入力によって同調し、安定した時間情報を出力する。一方、雌性げっ歯類にみられる数日周期の性周期はサーカディアンペースメーカー視交叉上核破壊によって消失し、数時間周期のウルトラディアンリズムはサーカディアンリズムの消失に伴い顕在化する。すなわち、約一日周期のサーカディアンリズムと、その他の長周期性、短周期性リズムの間には相互作用が存在し、相互依存的に機能することが想定される。本研究では明瞭なサーカディアンリズムと共にさまざまな周期性が表出する自発行動に着目し、自発行動リズムを制御する神経回路の動作原理を明らかにすることを目的とした。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

マウス自発行動に表出される周期性を指標に、行動リズムとそれに対応して変動を示す生理機能リズムを制御する神経回路を明らかにするため、以下のテーマについて研究を行った。

研究テーマA「摂食タイミング予知行動のサーカディアン制御機構」

研究テーマB「視交叉上核細胞間カップリングに作用する因子の探索」

研究テーマC「視交叉上核の加齢変化と生理機能制御」

これらの課題に対して自発行動リズムを測定することで体内時計神経回路の特性を推測するアプローチ法が採られてきたが、本研究では、個体行動と共に周期的神経出力を長期間測定する技術を用い、行動リズムと神経活動動態を直接対比することで神経制御機構を明らかにすることを試みた。

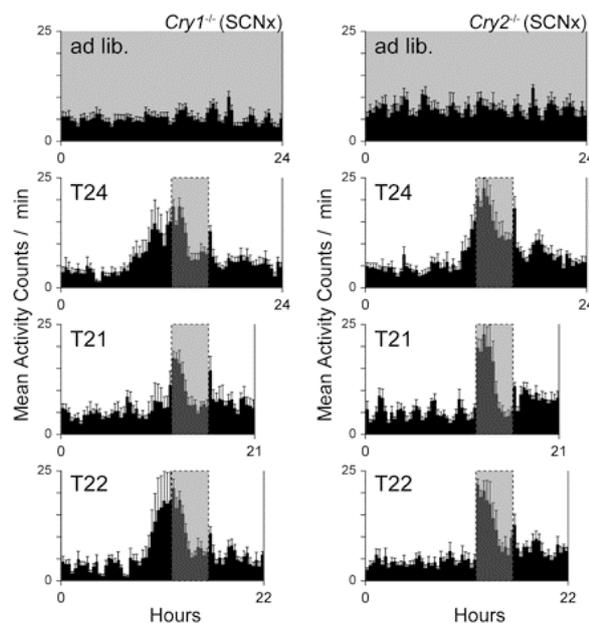
#### (2) 詳細

研究テーマA「摂食タイミング予知行動のサーカディアン制御機構」

一日の摂食タイミングは視交叉上核が規定しており、マウスは行動が活発になる夜間の直前に目をさまし摂食・飲水を行うことで活動期に備えている様子が観察される。一方、摂食可能な時間帯を一日のうち昼間の定刻一定時間に制限すると、本来活動休止期であるにもかかわらず、給餌時刻の数時間前に目をさまし活動を始める「摂食予知行動」を示す。予知行

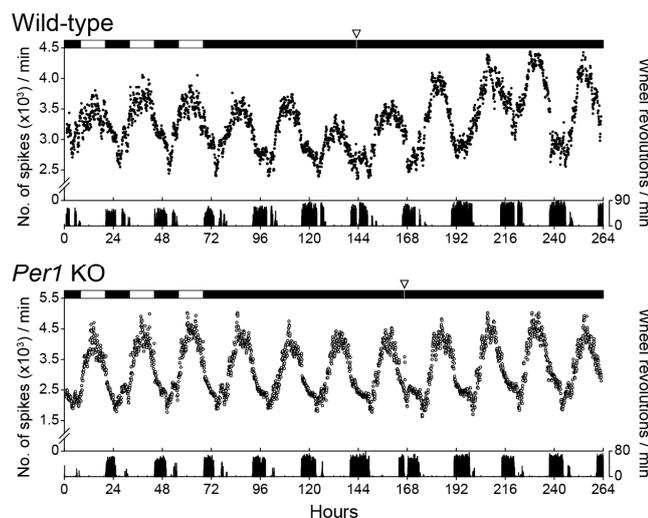
動は給餌の有無にかかわらず概日周期で生じることから、概日ペースメーカーに制御される行動リズムであると考えられてきた。さらに、視交叉上核破壊動物でも摂食予知行動リズムが生じることから、視交叉上核非依存的に制御するペースメーカーの存在が想定されている。一方、全身的に時計遺伝子の必須要素を欠損させたKOマウスでも、この行動リズムが出現することが報告され (Mistlberger et al. Science 2008, Storch et al. PNAS 2009)、摂食予知行動を制御するメカニズムは明らかでなかった。

我々は摂食予知行動リズムに関する時計遺伝子の関与を明らかにするため、22.5時間の短周期を示す *Cry1* KO マウスと24.5時間の長周期を示す *Cry2* KO マウスを用い、周期的時間制限給餌を行った。摂食予知行動を示す時間制限給餌の周期(時間間隔)は1日に近い範囲に規約されており、*Cry1* KO マウスの方がより短時間周期に反応し、摂食予知行動リズムの周期決定には時計遺伝子 *Cry* が関与することが明らかになった。一方、サーカディアンリズムを示さない *Bmal1* KO マウスではサーカディアンリズムの範疇を超えた15時間周期の時間制限給餌に対して摂食予知行動を示した。すなわち、*Bmal1* KO マウスが示す給餌前行動はサーカディアンリズムに規約されておらず、時間間隔の学習等、リズム振動とは別のメカニズムに拠るものと考えられる。以上より、摂食予知行動のリズム形成には既知の時計遺伝子群が関与していると結論した(論文2)。



#### 研究テーマB「視交叉上核細胞間カップリングに作用する因子の探索」

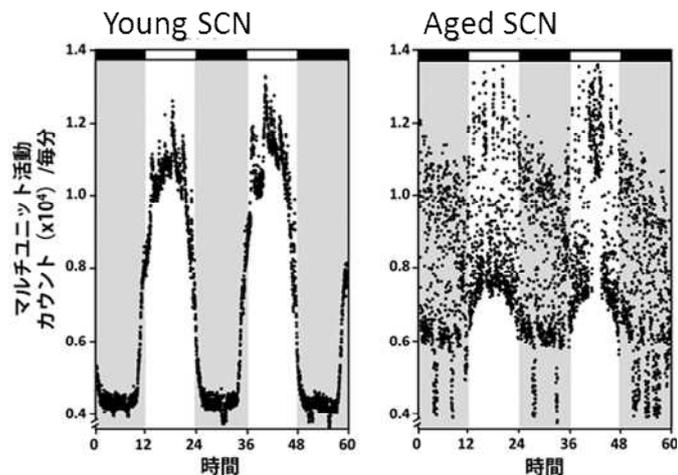
視交叉上核は片側で約 8000 個の神経細胞が緊密に集めた神経核であり、個々の神経細胞内にサーカディアンリズム機構を内在している。8000 個の視交叉上核細胞が独自の周期でリズムを刻むと、全体としてのリズムは減衰することが予想され、神経核回路として機能するためには神経細胞間リズム同期が必須である。我々は細胞間リズム同期因子の検討のため、*Per1* KO マウスをモデルとして用いた。*Per1* KO 視交叉上核組織切片を ex vivo 環境下で観察すると、個々の細胞レベルでサーカディアンリズムが認



められるが、まさに細胞間リズム同期が失われ、各々が独自の周期を刻むために総体としてのサーカディアンリズム発振は減弱する(Pendergast et al. J Neurosci. 2009)。in vivo 多神経活動記録法により輪回し行動リズムと視交叉上核神経活動リズムの同時測定を行ったところ、in vivo Per1 KO 視交叉上核リズムは野生型と遜色なく、頑強なサーカディアンリズムを示した。この結果は ex vivo では生じない細胞間リズム同期が in vivo では何らかの要素を介して達成されていることを示す(論文1)。

#### 研究テーマC「視交叉上核の加齢変化と生理機能制御」

行動リズムには加齢変化があり、加齢に伴う活動期・休止期のメリハリが低下すること、活動開始・終了時刻の不整・不明瞭化、さらにリズム周期の変化が知られている。これらの加齢変化は体内時計中枢・視交叉上核のサーカディアンリズム出力の低下に起因するとの仮説があったが、実際、時計遺伝子発現を指標とする報告では明瞭な加齢変化は検出できなかつた。我々は in vivo 多神経活動記録法を加齢マウスに適用し、視交叉上核の加齢変化検出を試みた。時計遺伝子産物 PER2 の発現量変動を指標とした場合、視交叉上核のリズム発振に差は認められなかつたのに対し、in vivo 神経活動リズムでは顕著な加齢変化を検出し、活動期と休止期のメリハリが低下しており結果としてリズム出力の振幅が低下していた(論文3, 4)。



### 3. 今後の展開

マウス個体行動に表出する周期性(リズム)の観点から 24 時間のサーカディアンリズムに軸足を置き全身を制御する神経回路機構にアプローチした。今後は、摂食タイミングを制御するサーカディアン振動体の同定、サーカディアン振動体細胞間カップリングに作用する因子の同定、体内時計の加齢変化を生じる分子機構と生理機能制御に作用する加齢変化を明らかにする。動物個体レベルの生体制御を考える場合、一細胞内における分子の動態から、注目する特定の機能に直接作用する神経回路、さらには二次的に関連する神経回路との相互作用を考慮する必要性が改めて浮き彫りになった。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

マウス個体レベルのサーカディアン行動リズムは多様な機能神経回路が統合された最終出力系の一つであり、研究テーマに据えた3つの系について研究成果を挙げることができた。さきがけ研究期間中に最終年度を迎えた若手研究者独立支援テニュアトラックプログラムにて、所属機関および国内外の外部評価者の審査をクリアし、独立研究室を主宰するテニュア准教

授として昇任したことは、さきがけ神経回路領域の研究支援体制の賜物である。定期領域会議の場で多様な研究テーマの関連性が不明瞭になったこと、また基幹となる研究到達目標であるウルトラディアンリズム発振領域の同定に至らなかったことは反省点である。しかしながら、それぞれの研究テーマにおいて発表論文に加え新たなデータの蓄積ができたことは、今後の発展性が期待できる。

## (2) 研究総括評価

哺乳類概日リズムのマスタークロックとされる視交叉上核内の機能回路およびそこから周期的行動に至る神経回路についてはなお多くが不明である。本研究では3つの角度からマウス視交叉上核の機能に解析を加え、時計遺伝子 *Per1* の欠損下でも視交叉上核には電気活動の概日リズムが保たれること、給餌時間制限下の摂食時間予知行動を *Cry1* 等3個の時計遺伝子ノックアウトマウスにおいて解析して本行動リズムにこれらの遺伝子群が関与すること、また視交叉上核内の多神経活動記録法により加齢動物では顕著なリズムの乱れがあることを明らかにできたことは興味深い成果である。今後は3つの角度から得られた知見の統合的な理解が進めば、このような視交叉上核の機能リズムにおけるウルトラディアンリズムの関与、およびこのような現象に関わる神経伝達物質等機能分子やリズム形成の機構の解析が進展し、長期的には概日リズムの変調と各種疾患の関係が明らかになることが期待される。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Takasu NN, Pendergast JS, Olivas CS, Yamazaki S, Nakamura W.\* In vivo monitoring of multi-unit neural activity in the suprachiasmatic nucleus reveals robust circadian rhythms in period1<sup>-/-</sup> mice. *PLoS ONE* (2013) 8:e64333.
2. Takasu NN, Kurosawa G, Tokuda IT, Mochizuki A, Todo T, Nakamura W.\* Circadian regulation of food-anticipatory activity in molecular clock-deficient mice. *PLoS ONE*. (2012) 7: e48892.
3. Tanaka M, Yamaguchi E, Takahashi M, Hashimura K, Shibata T, Nakamura W, Nakamura TJ. Effects of age-related dopaminergic neuron loss in the substantia nigra on the circadian rhythms of locomotor activity in mice. *Neurosci Res* (2012) 74: 210-215.
4. Nakamura TJ, Nakamura W, Yamazaki S, Kudo T, Cutler T, Colwell CS, Block GD. Age-Related Decline in Circadian Output. *J Neurosci* (2011) 31: 10201-10205.

### (2) 特許出願

研究期間累積件数: 0件

### (3) その他の成果(主要な学会発表)

1. 中村 渉: 摂食タイミングのサーカディアン制御, 第91回日本生理学会大会シンポジウム『生理機能と時間』(2014年3月17日, 鹿児島)
2. 中村 渉: 明日への履歴, 第20回日本時間生物学会学術大会シンポジウム『時間生物学のこれまでと今後』(2013年11月10日, 東大阪)

3. 中村 渉： 体内時計中枢・視交叉上核の機能的入出力と概日行動リズム制御機構，第 117 回日本解剖学会シンポジウム（2012 年 3 月 26 日，山梨）
4. 中村 渉： げっ歯類の食事サイクル同調の特徴と性質，第 19 回日本時間生物学会シンポジウム『末梢臓器振動体の臓器特異性、同調、相互作用』(2012 年 9 月 15 日，北海道)
5. 中村 渉： 食事前行動のサーカディアンリズム制御機構，第 64 回日本自律神経学会総会ワークショップ（2011 年 10 月 27 日，秋田）