

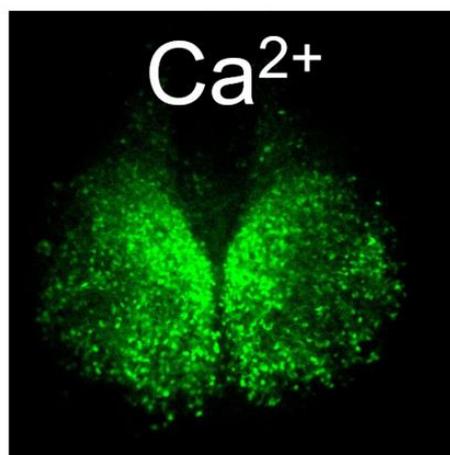
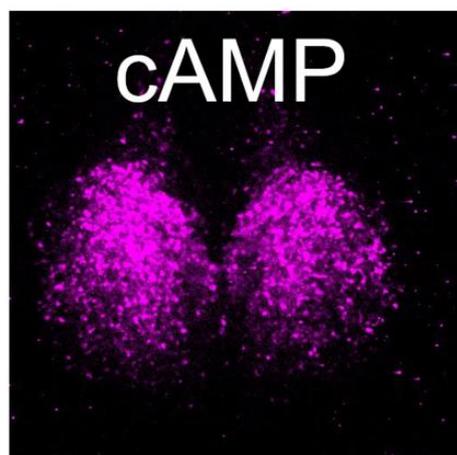
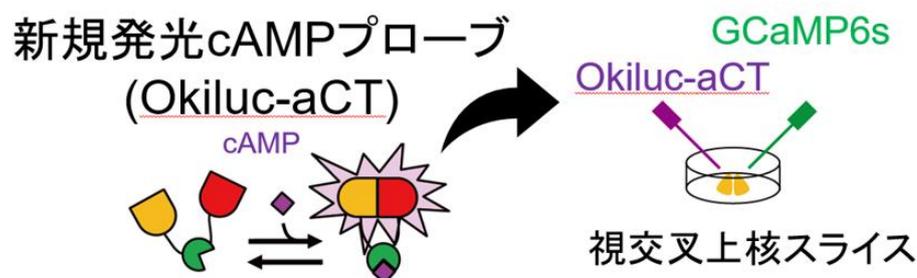
## 体内時計中枢における細胞内 cAMP の機能を解明

国立大学法人東海国立大学機構名古屋大学環境医学研究所の小野大輔講師らの研究グループは、体内時計中枢における細胞内 cAMP<sup>注1</sup>は神経ネットワークにより調節され、さらに 24 時間の生体リズムを制御していることを明らかにしました。

私たちは光や時刻の情報がない環境であっても、およそ 24 時間ごとに睡眠・覚醒を繰り返します。これは私たちの生体内に体内時計が存在するためです。体内時計はすべての細胞に存在し、その中枢が脳内の視交叉上核<sup>注2</sup>に存在することが分かっています。そしてこの生体リズムは時計遺伝子群の転写・翻訳によるメカニズムにより調節されていることが示唆されています。また、細胞内の cAMP は様々な細胞機能の調節に関わる極めて重要な分子であることが分かっていますが、cAMP と生体リズムとの関連性についてはあまり理解が進んでいませんでした。本研究では、細胞内 cAMP と細胞外ペプチドを可視化する新しい光計測プローブ<sup>注3</sup>を開発し、視交叉上核の cAMP、ペプチド分泌リズムイメージングに世界で初めて成功しました。さらに、この cAMP の生体リズムは、神経ペプチドを介した神経ネットワークによって生み出されていること、そしてこのネットワークによって生み出された cAMP が細胞内の分子時計を調節していることを明らかにしました。

これまで、生体リズムは時計遺伝子による転写・翻訳を介したメカニズムにより調節されていると考えられてきました。本研究成果は、細胞間のネットワークが生体リズム形成にも大きな役割があることを示した重要な知見と言えます。

本研究結果は、生体リズムを作り出す新たなメカニズムに解明に大きな可能性を示します。本研究成果は、2023 年 1 月 4 日付「Science Advances」でオンライン公開されました（日本時間 1 月 5 日午前 4 時）。



Okiluc-aCT を用いた生物発光イメージ

## ポイント

- 細胞内 cAMP、細胞外ペプチド分泌を可視化する新たな光イメージングプローブを開発した
- 体内時計中枢の視交叉上核に cAMP リズムは、神経ネットワークにより生み出される
- 細胞間ネットワークにより生じた cAMP リズムは、細胞内の分子時計を調節する
- 細胞間ネットワークにより生じた cAMP リズムは、自発行動リズムを調節する

## 1. 背景

地球上の生命は、24 時間ごとに繰り返される環境に合わせ、様々な細胞機能が 24 時間ごとに変動しています。このおよそ 24 時間のリズムを「概日リズム」と呼び、概日時計による調節を受けています。私たちの身体を構成する一つ一つの細胞にこの概日時計が備わり、時計遺伝子とよばれる一群の遺伝子の転写・翻訳を介したフィードバックループにより 24 時間の時間が刻まれていると考えられています。哺乳類では、概日時計の中枢が脳内視床下部に位置する「視交叉上核」に存在することが知られています。視交叉上核を破壊すると、様々な生理機能が消失することから、概日リズムに重要な神経細胞群であることが分かっています。

細胞外からのシグナルを細胞に伝達するシステムとしてセカンドメッセンジャーが知られています。その中でも cAMP は様々な細胞機能に関連する重要な分子として知られています。視交叉上核において、時計遺伝子の転写翻訳リズムが存在する一方、セカンドメッセンジャーとして機能する cAMP に概日リズムが存在することが示唆されていましたが、このリズムがどのようなメカニズムにより生み出されているのか、また時計遺伝子の転写翻訳リズムとどのような関係にあるのかは、これまでほとんど理解が進んでいませんでした。本研究では、細胞内 cAMP を可視化する新たなイメージングツールの開発に加え、cAMP の光操作技術を組み合わせることで、概日時計中枢における cAMP の機能解明に取り組みました。

## 2. 研究成果

視交叉上核における cAMP を可視化するために、沖縄産ホタル発光タンパク質を用い、新規発光 cAMP プローブを開発しました (Okiluc-aCT)。視交叉上核の脳スライスを作成し、Okiluc-aCT と蛍光カルシウムイオン ( $\text{Ca}^{2+}$ ) プローブである GCaMP6s を、アデノ随伴ウイルスを用いて発現させタイムラプスイメージング<sup>注4</sup>を行いました。その結果、これら二つのセカンドメッセンジャーに明瞭な概日リズムが観察されましたが、そのリズムパターンが異なっていました。このことは cAMP と  $\text{Ca}^{2+}$  は異なる機能を持つことを示唆します。そこで、膜電位依存性ナトリウムチャネルの阻害剤であるテトロドトキシン (TTX) を投与し、神経発火を阻害することで神経ネットワークの機能を阻害し、二つのリズム計測を行いました。その結果、 $\text{Ca}^{2+}$  のリズムはテトロドトキシン投与化でも見られたものの、cAMP のリズムは消失していました (図 1)。この結果は、 $\text{Ca}^{2+}$  は細胞内のメカニズムにより概日リズムが制御されている一方、cAMP は神経ネットワークにより制御されていることを示唆します。

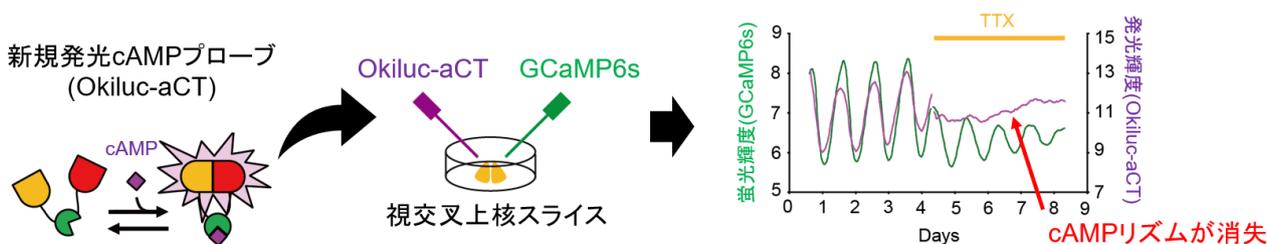


図 1 : 視交叉上核の cAMP と Ca<sup>2+</sup>のタイムラプスイメージング

次に、cAMP のリズムを調節する細胞外のシグナル分子の探索を行いました。視交叉上核には複数の伝達物質を発現する細胞が存在します。その中でも vasoactive intestinal peptide (VIP)に着目しました。この VIP の受容体は cAMP を調節する機能を持つことが知られています。そこで、VIP のシグナルを薬理的に阻害すると cAMP のリズムが消失しました。この結果は、細胞外の VIP によって細胞内の cAMP のリズムが調節されていることを示します。もしこれが正しいければ、VIP 分泌にも概日リズムが存在するはずですが。これを検証する為に、緑色蛍光タンパク質を用いた G-protein-coupled receptor-activation-based (GRAB) VIP sensor を導入しました。この GRAB センサーを視交叉上核に発現させ、タイムラプスイメージングを行ったところ、明瞭な概日リズムがみられました。さらにこの VIP 分泌リズムはテトロドトキシン投与により消失しました (図 2)。これらの結果は、神経活動リズム依存的に VIP が細胞外に分泌され、その分泌リズムにより細胞内の cAMP リズムが形成されていることを示します。

ペプチド分泌イメージングプローブ

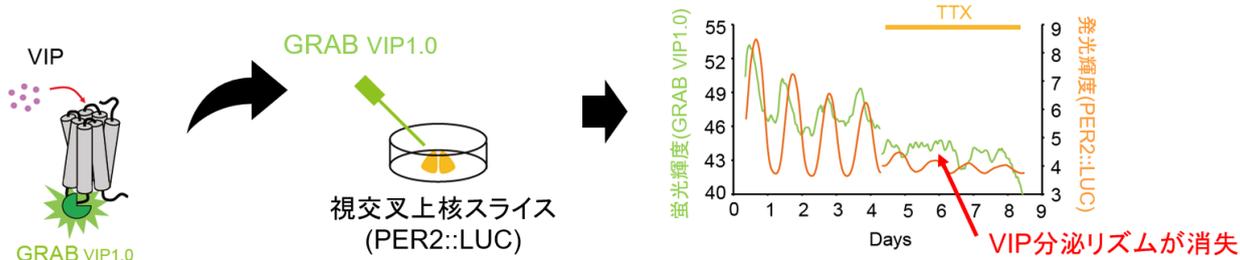


図 2 : VIP ペプチド分泌と分子時計のタイムラプスイメージング

最後に、この cAMP が細胞内の転写翻訳のリズムにどのような影響を与えているかを明らかにするために、光誘導性のアデニル酸シクラーゼ (bPAC)を導入しました。視交叉上核脳スライスに bPAC を発現させ、時計遺伝子 Per2 のタンパク質量を蛍光イメージングで計測し、青色光を照射し概日リズムに与える cAMP の影響を検証しました。その結果、青色光による細胞内 cAMP の操作により細胞内の転写翻訳リズムがシフトすることが分かりました。さらに自由行動下のマウスの視交叉上核に bPAC を発現させ、光ファイバーを介して cAMP のリズムを操作すると、行動リズムがシフトすることが分かりました。これらの結果は、細胞内の cAMP は時刻依存的に細胞内の転写翻訳のリズムに入力を持つことを示します (図 3)。

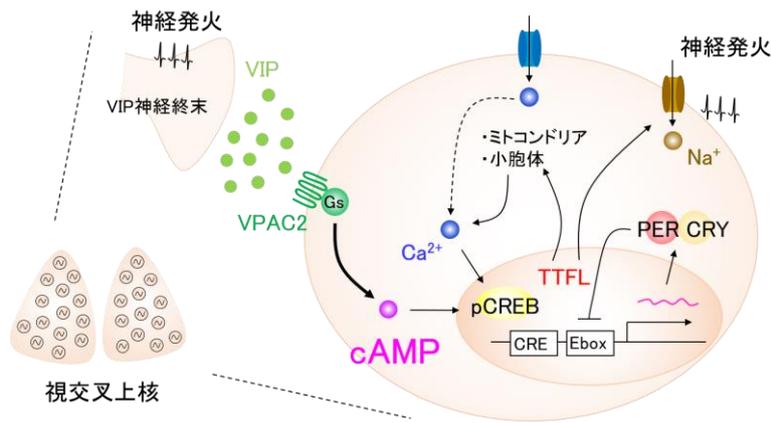


図3：視交叉上核の cAMP と Ca<sup>2+</sup> とネットワーク機構の概要

### 3. 今後の展開

これまで数多くの概日リズム研究から、時計遺伝子の転写翻訳機構の重要性が多く示されてきました。今回私たちのグループでは、神経ネットワークが細胞内の cAMP リズムを形成していること、そしてそのリズムが転写翻訳リズムに影響を与えていることを明らかにしました。cAMP のような細胞内セカンドメッセンジャーシステムは、様々な細胞機能に重要であることが数多く報告されています。今後は、時計遺伝子によらない、生命に普遍的に存在する祖先型概日時計の解明に取り組んでいきたいと考えています。

### 4. 用語説明

- (1) cAMP : Cyclic adenosine monophosphate の略。細胞内のシグナル伝達を担う分子。
- (2) 視交叉上核 : 視神経が交叉する視交叉の上に位置する神経細胞の集合。哺乳類における概日時計の中核。
- (3) 光計測プローブ : 生体内で生じる分子変動等を光で計測可能なタンパク質
- (4) タイムラプスイメージング : 経時的に細胞内イベントを光で可視化する技術。

### 5. 発表雑誌

掲雑誌名 : Science Advances

論文タイトル : Network-driven intracellular cAMP coordinates circadian rhythm in the suprachiasmatic nucleus

著者・所属 :

Daisuke Ono<sup>1,2</sup>, Huan Wang<sup>6</sup>, Chi Jung Hung<sup>1,2</sup>, Hsin-tzu Wang<sup>3,4,5</sup>, Naohiro Kon<sup>3,4</sup>, Akihiro Yamanaka<sup>6</sup>, Yulong Li<sup>7</sup>, and Takashi Sugiyama<sup>8</sup>

1. Department of Neuroscience II, Research Institute of Environmental Medicine, Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya 464-8601, Japan

2. Department of Neural Regulation, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya 466-8550, Japan

3. Institute of Transformative Bio-Molecules (WPI-ITbM), Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya 464-8601, Japan

4. Laboratory of Animal Integrative Physiology, Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya 464-8601, Japan
5. Department of Biological Sciences, School of Science, The University of Tokyo, Hongo 7-3-1, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan
6. Chinese Institute for Brain Research (CIBR), Beijing, 102206, China
7. State Key Laboratory of Membrane Biology, Peking University School of Life Sciences, Beijing, China
8. Advanced Optics & Biological Engineering, Evident Corporation, Tokyo, Japan

DOI : <http://www.science.org/doi/10.1126/sciadv.abq7032>

English ver.

[https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical\\_E/research/pdf/Sci\\_230105en.pdf](https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical_E/research/pdf/Sci_230105en.pdf)