

鳥類および哺乳動物の生体時計機構と光同調機構の
分子細胞学的研究

(課題番号08660367)

平成8年度～平成9年度科学研究補助金(基盤研究 C)研究成果報告書

平成10年3月

研究代表者 村上 昇
(宮崎大学農学部獣医学科)

地球上のあらゆる生物は地球の自転や公転に伴う昼夜や季節など、周期的環境因子に曝されており、これに適応するための戦略として生体時計を具備した。18世紀半ばに生体内因性のリズムが存在することが発見されて以来、これまでに様々な分野でこのリズムに関する研究が行われて来た。十数年前にショウジョウバエの生体時計の遺伝子perが発見され、ようやく昨年哺乳動物でも時計遺伝子が3つ発見された。いずれもper遺伝子に相同性を有することから、この時計機構がいかに生物種を越えて遺伝子常に保持されていたかが伺える。このような遺伝子レベルの研究は、機能解析を飛び越えて先に到達した感じは拭いされない。なぜなら、遺伝子の塩基配列の決定のみでは、なぜ時計が光に同調するのか？なぜ時計のシグナルは種々のホルモンなどのリズムを駆動できるのか？あるいは時計遺伝子がどのようにして24時間のリズムを作り出せるのか？など基本的問題が山積しているからである。本研究はこのような背景のもとに、ヒヨコ松果体細胞を用いて、その入力系や出力系と時計機構がどの様に共役しているのかを一つのテーマとし、また、時計機構を人為的操作する手段としてメラトニンを用い、ラットやシマリスなどに対する時計の同調性を検討した。わずか2年間で、すべての時計機構を解明できるとは当初より思っていないが、今振り返ってみれば、期待以上の成果を収めたことに満足している。以下にその主な発見の一部を記してはしがきとする。

(1) ひよこ松果体細胞培養での時計機構の解析

ひよこ松果体細胞から分泌されるホルモン、メラトニンは明期に低く暗期に高い分泌パターンを示し、このリズムは恒常暗下でも自由継続する。すなわち、ひよこ松果体には光受容機構—時計機構—メラトニン合成機構が存在することが知られていた。しかし、これらの機構が松果体細胞一個一個に存在するのか、あるいは細胞間のなんらかの情報がリズム形成には必要なのかは明らかでなかった。そこで、一個一個の細胞をテラサキマイクロプレートに蒔き、一個の細胞から分泌されるメラトニンを微量測定した。その結果全ての細胞が明暗条件に同調したリズムを示し、また恒常暗下でもリズムを継続した。これらの結果、ひよこ松果体細胞はすべて光受容—時計機構—メラトニン合成機構を有していると結論された。次に、恒常暗下でのメラトニン分泌リズムがどのように時計のリズムを反映できるのかについて、その情報伝達機構を解析した。恒常暗下で時計のシグナルによってメラトニン分泌亢進が始まる時刻に種々の細胞伝達機構の阻害を行った結果、プロテインキナーゼAの阻害剤によってのみ、この分泌亢進を阻害できた。この結果、時計からの情報はアデニレートサイクラーゼを活性化し、cAMPを介してプロテインキナーゼAを活性化することによって伝達されると推測された。それでは時計のシグナルがなぜアデニレートサイクラーゼを活性化できるのか？が次の課題となった。そこで、種々検討を加えた結果、細胞内カルシウムキレーターのBAPTA-AMによってメラトニンと同時にcAMPを減少させることができた。この結果から、時計シグナルは細胞内カルシウムを動員し、アデニレートサイクラーゼを活性化し、cAMPを合成し、さらにプロテインキナーゼAを介してメラトニン合成を促進すると推察された。

以上の知見によって、ひよこ松果体の時計機構とメラトニン合成機構の共役機構が判明した。

(2) メラトニンによる哺乳動物の時計同調機構

恒常暗下で自由継続リズムを示すラットにメラトニンを毎日定刻に投与すると、投与時刻と行動開始時刻が一致した日から、行動リズムはこのメラトニン投与時刻に同調する。そこで、この同調機構を検討した結果、以下の事実が判明した。恒常明下でリズムを消失したラットにおいてはメラトニンによるリズムの回復はできない。しかし、恒常薄明下で自由継続リズムを示すラットでは、そのリズムの周期が短い時にのみメラトニンによって時計を同調できる。メラトニンをチューブに充填し、皮下に埋没し慢性投与を行うと、明暗条件を急に変化させた時の行動リズムの再同調速度が早くなる。昼行性動物のシマリスにおいて同様の実験を試みた結果、シマリスでは恒常明下において周期の短い自由継続リズムを示すにも関わらず、メラトニンの定刻投与は時計を同調できなかった。

以上の結果、メラトニンは時計を同調することができるものの、その機構は進化の過程で大きく変遷しており、昼行性動物では消失している可能性が高いことが推測された。

研究組織

研究代表者： 村上 昇（宮崎大学農学部獣医学科家畜生理学講座）

研究協力者： 中原桂子（宮崎大学農学部獣医学科家畜生理学講座）
福島 学（宮崎大学農学部獣医学科家畜生理学講座、現、和歌山県職員）

研究経費

平成8年度 1,300 千円

平成9年度 1,000 千円

研究発表

(1) 学会誌

N. Marumoto., N. Murakami., T. Katayama., H. Kuroda., T. Murakami
Effects of daily injections of melatonin on locomotor activity rhythms in rats maintained under constant bright or dim light.

Physiology & Behavior 60 (3): 767-773, 1996

N. Marumoto., N. Murakami., H. Kuroda., T. Murakami
Melatonin accelerates reentrainment of circadian locomotor activity rhythms to new light-dark cycles in the rat.

Japanese J. Physiology 46:347-351, 1996

H. Kuroda., M. Fukushima., M. Nakai., T. Katayama., N. Murakami
Daily wheel running activity modifies the period of free-running rhythm in rats via intergeniculate leaflet.

Physiology & Behavior 61 (5): 633-637, 1997

K. Nakahara., N. Murakami., T. Nasu., H., Kuroda., T. Murakami
Individual pineal cells in chick possess photoreceptive, circadian clock and melatonin synthesizing capacities/in vitro

Brain Research 774: 242-245 1997

N. Murakami., N. Marumoto., K. Nakahara., T. Murakami
Daily injections of melatonin entrain the circadian activity rhythms of nocturnal rats, but not diurnal chipmunks

Brain Research 775: 240-243 1997

K. Nakahara., N. Murakami., T. Nasu., H. Kuroda., T. Murakami
Involvement of protein/kinase A in the subjective nocturnal rise of melatonin release by chick pineal cells in constant darkness

Journal of Pineal Research 23: 221-229 1997

(2) 口頭発表

中原桂子、村上 昇、那須哲夫、黒田治門：恒常暗下での培養ヒヨコ松果体細胞におけるメラトニン分泌リズムの形成機序、第122回日本獣医学会、帯広、1996、8、29

村上 昇：動物のリズム 「サーカディアンリズムの分子機構：現状と展望」 大阪大学蛋白質研究所セミナー、大阪、1996、3、19

村上 昇：実験動物のサーカディアンリズムとクロノファーマコロジー「実験動物から人へー21世紀に向けてのより適正な医薬品開発をめざして」第110回薬物動態ワークショップ、東京、1996、4、25

Keiko Nakahara, Noboru Murakami, Tetsuo Nasu, Haruto Kuroda: Involvement of protein kinase A in the circadian oscillation of melatonin release by chick pineal cells cultured under constant darkness.

Asia Pacific Pineal Meeting. Hamamatu, 1997, 3, 28

N. Murakami, K. Nakahara, T. Nasu:

Comparative aspect of melatonin release and its role for circadian systems in nocturnal and diurnal rodents and birds. Asian Pacific Pineal Meeting, Hamamatu, 1997, 3, 31

幸野亮太、村上 昇、宮内奈奈美、片山哲郎、黒田治門：シマリスchipmunkの冬眠を夏期に誘発するための外部環境、第124回日本獣医学会、鹿児島、1997、10、12

中原桂子、村上 昇、那須哲夫、片山哲郎、黒田治門：鳥類松果体細胞内時計の、光による位相変位に対するチロシンキナーゼ阻害薬の効果、第124回日本獣医学会、鹿児島、1997、10、12

村上 昇：鳥類松果体細胞内時計の光同調および入出力機構について、「第21回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム」湯布院（大分）、1997、7、19

(3) 出版物

村上 昇、中原桂子 松果体の時計機構 深田吉孝、海老原史樹文編集「生物時計の分子生物学」Springer Verlag 出版、1997