

培養神経細胞による生体時計機構の解析 と時計におよぼす薬物の検索

[課題番号 04660326]

平成5年度科学研究費補助金（一般研究C）研究報告書

平成6年3月

研究代表者 村上 昇

(宮崎大学農学部 助教授)

研究組織

研究代表者 村上 昇 (宮崎大学農学部助教授)

研究経費

平成4年度 1、100千円

平成5年度 1、100千円

計 2、200千円

研究発表

(1) 学会誌等

M. Taniguchi, N. Murakami, H. Nakamura, T. Nasu, S. Shinohara and T. Etoh (1993)

Melatonin release from pineal cells of diurnal and nocturnal birds. *Brain Research* 620:297-300

R. Nishi, N. Murakami, N. Marumoto, T. Nasu and T. Etoh (1994)

Circadian oscillation of 64KDa polypeptide in the rat suprachiasmatic nucleus. *Journal of Veterinary Medical Science*. 56:321-324

N. Murakami, H. Nakamura, N. Marumoto and T. Nasu

Comparison of circadian oscillation of melatonin release in pineal cells of house sparrow, pigeon and Japanese quail using cell perfusion system. *Brain Research* in press.

(2) 口頭発表

那須哲夫、中井雅晶、村上 昇

はと松果体の血管構築

第87回日本畜産学会 1993、3月

谷口美紀、村上 昇、赤熊 修、篠原秀作、江藤禎一

夜行性（ふくろう）及び昼行性（にわとり）鳥類の松果体メラトニン分泌の相違について

第112回日本獣医学会 1993、4月

中村久江、村上 昇、那須哲夫、黒田治門

ひよこ松果体細胞における光のメラトニン分泌抑制機序について：
プロテインキナーゼCの関与

第117回日本獣医学会 1994、4月

赤坂敬史郎、村上 昇、那須哲夫、黒田治門

ひよこ松果体細胞のメラトニン合成におけるRNA合成と蛋白質合成の経時的関与

第117回日本獣医学会 1994、4月

あらゆる生物に存在する生体時計機構を、その時計の存在が明確な鳥類の松果体細胞、およびラットの視交叉上核神経細胞を用いて解析した。以下にそれぞれについて得られた結果の概要を説明した。

1. 鳥類間における松果体の生体時計の有無および光同調機構の有無の比較

鳥類の生体時計は松果体に存在すると一般に考えられているが、松果体を摘出してリズムが消失しない例も報告されている。そこで、種々の鳥の松果体細胞を培養し、これを還流することによって放出されるメラトニンホルモンを経時的に回収した後、そのリズムの存在の有無を検討した。ハト、スズメ、ヒヨコ、ウズラを用いたが、明暗交代条件下ではすべての松果体細胞で明期に低く、暗期に高い分泌リズムがしめされた。このことは、これらの鳥類の松果体細胞には光同調機構が存在することを示唆している。次に、恒常暗下で細胞還流を行うと、ハト、スズメ、ヒヨコの松果体細胞はメラトニン分泌リズムを継続したが、ウズラの松果体細胞はリズムの消失を起こした。このことは、ウズラの松果体には時計の発信体が存在しないか、存在しても非常に微弱であることを示唆している。以上のことから、鳥類の種によって松果体細胞の時計機構には差がある事が判明した。

2. 松果体細胞の光同調機構

鳥類の松果体に光を照射するとメラトニンの急激な分泌低下が起こる。この機序としてプロテインキナーゼC (PKC) の関与の可能性について検討した。TPA (フォルボルエステル的一种) を細胞培養に添加すると、添加量依存的に光と同様にメラトニン分泌低下を誘起した。PKCの阻害薬スタウロスポリンを光照射と同時に添加するとメラトニン低下を阻止した。以上のことから松果体細胞の光によるメラトニン分泌低下にはプロテインキナーゼCの関与が考えられる。

3. ラット視交叉上核の時計関連蛋白質について

ラットの視交叉上核の神経細胞を明暗条件化で3時間間隔で調整し、3時間の培養中に合成される蛋白質を2次元電気泳動法、およびイメージスキャナーで検索した。その結果、64KDaの蛋白質が時刻依存的に合成されること、また他の神経細胞では合成されないことが判明した。このことからこの蛋白質は時計機構に関係していることが示唆された。