

高等動物の光受容細胞、生体時計局在細胞
による計時機構と同調機構の解析

(課題番号：10460132)

平成10年～平成12年度科学研究費補助金「基盤研究(B)」

研究成果報告書

平成13年4月10日

研究代表者 村上 昇

(宮崎大学農学部獣医学科助教授)

はしがき

地球上のあらゆる生物が普遍的に有する生物時計に関する研究は、ここ数年間の内に飛躍的に進み、時計の遺伝子が相次いで同定された。遺伝子研究が進んだ背景には、分子生物学が極めて身近に行える分野になったこと、例えば殆どのステップが製品化されたキット類でまかなえることや、企業が委託して合成品を供給できるシステムが設立したことなどが上げられる。また、コンピューターによるデータベースの普及も、この分野の研究を促進している。一方、これらの遺伝子研究が進む中で、時計機構の制御や同調に関する生物学的研究は遅れを取っている。しかし、この分野の研究がなければ、時間治療学や人為的操作による生物時計の利用は期待できない。このような時勢の中で、本研究は生物時計の振動体がどのように生体リズムを駆動しているのか？あるいは光はどのようにして時計を同調しているのか？の大きな課題について生物学的な研究を行い、以下の結果を得ることができた。また、今回は生物時計と摂食機構の共役についても多くの研究を行い、その過程の中で、新規摂食関連物質のいくつかを発見することができた。以下にそれらの一部を記して、はしがきとしたい。

1) 生体時計はどのようにして生理機能のリズムを制御しているのか？

一部の例外を除いて全ての動物の松果体から分泌されるメラトニンは夜間に上昇し、日中に下降する極めて顕著な日内リズムを示す。鳥類の場合、松果体に時計があり、その松果体は神経出力を持たないので、メラトニンを介して時計のリズムを生理機能に伝達している可能性が推測される。このことは、メラトニンが、なぜ、夜間高くなり日中に低くなる必要があるのか？という疑問に結びついている。そこで、昼行性鳥類と夜行性鳥類で、メラトニンの作用を検討した。スズメやうずらにおいて自由継続リズムの状態ではメラトニンを毎日定刻投与すると、ラットではこのメラトニンによって時計が同調するのに対し（既に発表済み）、メラトニン投与時刻に時計は同調せず、自由継続リズムは変化しなかった。しかし、メラトニン投与後に明白な行動の中止（一定の休止期）が出現した。メラトニン投与によって静止状態が続く原因が体温の低下にあるのではないかと推測し、体温を測定した結果、この静止状態の間、急速な下降が認められた。この体温下降の程度もメラトニンの投与量に依存した。また、メラトニンによる体温下降は活動期の方が休息期に比較して顕著に現れた。一方、夜行性フクロウではメラトニン投与は行動抑制を起さなかった。以上のことから昼行性鳥類の生物時計のリズムは松果体のメラトニン分泌に反映され、夜間のメラトニン上昇を引き起こし、その結果、行動の抑制と体温の減少を来すものと考えられた。

2) 光から時計への細胞内伝達系は？

鳥類松果体には光受容器、時計、およびメラトニン合成機構が存在し、それらがリンクすることによって、光の明暗リズムに同調したメラトニン分泌リズムが作り出される。恒常暗下で松果体を培養すると、時計のリズムのみに支配されたメラトニン分泌リズムを見ることが出来る。この恒常暗下で光パルスを照射すると、照射時刻に依存してリズムの位相変位が起こる（光同調機構の原理）。そこで、この光情報がどのようにして時計のリズムを変化させるのか？換言すれば、光はどのような細胞内情報伝達を使って時計の位相変位を起こすのか？について解析した。光を CT18 時に照射すると、メラトニンリズムは約8時間の位相前進を起こした。このとき、細胞内 Ca の枯渇剤タプシガルジンを投与しておくとも光による位相前進は阻止された。さらに、小胞体 Ca のライアナジンレセプター阻害剤ダントロレン、あるいはルテニウムレッドを同時投与しても、光による位相前進を阻止できた。以上のことから、松果体においては、光は光受容器から小胞体へ情報が伝達され、小胞体内の Ca を一過的に放出することによって時計を同調していることが判明した。

3) 摂食機構と生体時計機構の共役について

近年、摂食機構は神経性支配から物質的支配へと変遷しつつある。我々は胃から単離された成長ホルモン促進物質グレリンが極めて強力な摂食促進物質であることを発見した。また、腸から単離されたニューロメジン U が摂食抑制物質であることを発見した。これらはいずれも脳室内、あるいは末梢投与で量依存性に効果を発揮し、それぞれの抗体投与によって、摂食量が抑制あるいは促進されることから、内因性に作用していることが判明した。さらに、ニューロメジン U の免疫染色の結果、時計部位である視交叉上核に染色細胞が分布していたことから、時計との関連性が示唆された。そこで、脳室内へパルス投与を行った結果、時刻依存性に時計のリズムを変位させた。以上の知見は、摂食を制御する内因性ホルモンが時計機構にも関連していることを示す証拠と考えられ、この両者がリンクしていることを強く示唆するものである。

最後に、本研究を遂行するにあたり協力していただいた中原助手、および林田、黒岩、井田君の3名の学生にお礼申し上げます。

平成13年4月10日
研究代表者 村上 昇

研究組織

研究代表者：村上 昇 (宮崎大学農学部獣医学科助教授)
研究分担者：塩田邦郎 (東京大学大学院農学生命科学研究科、教授)
研究分担者：那須哲夫 (宮崎大学農学部獣医学科助教授)

研究経費

平成10年度	4、700千円
平成11年度	3、600千円
平成12年度	1、800千円
計	10、100千円

研究発表

(1) 学会誌

1. M.K. Ashraf, N.Murakami
Effect of natal dispersal on the reproductive strategies of the young Misaki feral stallions.
Applied Animal Behaviour Science. 62:281-291,1999
2. K. Uchida, M. Murayama, Y.Horii, N.Murakami, R. Yamaguchi, S. Tateyama
Non-purulent meningoencephalomyelitis of a pacific striped dolphin (*Lagenorhynchus Obliquidens*).The first evidence of dolphin morbillivirus infection in the pacific ocean around Japan.
J. Vet. Med. Sci. 61(2) : 159-162, 1999
3. T. Ida, K. Nakahara, T. Katayama, N. Murakami and M. Nakazato
Effect of lateral cerebroventricular injection of appetite stimulating neuropeptide, orexin and neuropeptide Y, on the various behavioral patterns in rats.
Brain Research 821:526-529,1999
4. M.S. Mondal, M. Nakazato, Y. Date, N. Murakami, M. Yanagisawa, S. Matsukura
Widespread distribution of orexin in rat brain and its regulation upon fasting
Biochemical and Biophysical Research Communication 256(3):495-499,1999
5. M. K. Ashraf, N. Murakami
Factors affecting the harem formation process by young Misaki feral stallions.
J. Vet. Med. Sci. 61(6): 667-671, 1999,
6. M.S. Mondal, M. Nakazato, Y. Date, N. Murakami, R. Hanada, T. Sakata, S. Matsukura
Characterization of orexin-A and orexin-B in the microdissected rat brain nuclei and their contents in two obese rat models.
Neuroscience Letters 270; 1-4, 1999
7. R. Hanada, M. Nakazato, S. Matsukura, N. Murakami, H. Yoshimatsu, T Sakata
Differential regulation of melatonin-concentrating hormone and orexin genes in the agouti-related protein/melanocortin-4 receptor system
Biochemical and Biophysical Research Communication 268(1): 89-91, 2000
8. N Murakami, R Kono, K Nakahara, T Ida and H Kuroda
Induction of Unseasonable Hibernation and Involvement of Serotonin in Entrance into and Maintenance of Its Hibernation of Chipmunks *T. asiaticus*
Journal of Veterinary Medical Science.62 (7): 763-766, 2000
9. T Ida, K Nakahara, T Murakami, R Hanada, M Nakazato and N Murakami
Possible involvement of orexin in the stress reaction in rats
Biochemical and Biophysical Research Communications 270 (1): 318-323, 2000
10. T.Katayama, H. Kyan, M. Nakashima, E.Y. Rahayu, N. Murakami and H. Kuroda
Involvement of distinct signaling pathways in activin-induced increases in FSH secretion and enlargement of FSH cell population in the rat pituitary.
Endocrine Journal, 47 : 239-247、 2000
11. T.Katayama, M. Nakashima, H. Kyan, N. Murakami and H. Kuroda
A role of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) as a regulator of paracrine interactions between folliculo-stellate cells and gonadotropes through the control of activin-follistatin interactions.
J. Vet. Med. Sci.62:693-698, 2000
12. Y.Date, N.Murakami, M.Kojima, T.Kuroiwa, S.Matsukura and M.Nakazato
Central effects of a novel acylated peptide, ghrelin, on growth hormone release in rats.
Biochemical and Biophysical Research Communications 275:477-480,2000

13. T. Ida, K. Nakahara, T. Kuroiwa, M. Nakazato, T. Murakami and N. Murakami
Both corticotropin releasing factor (CRF) and neuropeptide Y (NPY) are involved in the effect of orexin (hypocretin) on the food intake in rats.
Neuroscience Letters 293(2):119-122, 2000
14. M.Kojima, R.Haruno, M.Nakazato, Y.Date, N.Murakami, R.Hanada, H.Matsuo, K. Kangawa
Purification and identification of neuromedin U as an endogenous ligand for an orphan receptor GPR66(FM3)
Biochemical and Biophysical Research Communications 276: 435-438, 2000
15. Nakazato M, Hanada R, Murakami N, Date Y, Mondal M. S., Kojima M, Yoshimatsu H, Kangawa K, Matsukura S:
Central effects of neuromedin U in the regulation of energy homeostasis. Biochem Biophys Res Commun, 277:191-194, 2000
16. N. Murakami, T. Kawano, K. Nakahara, K. Shiota
Effect of melatonin on the circadian rhythm, locomotor activity and body temperature in intact house sparrow, Japanese quail and owl.
Brain Res 889(1-2):220-224, 2001
17. M.Nakazato, N.Murakami, Y.Date, M.Kojima, H. Matsuo, K.Kangawa, S. Matsukura:
A role for ghrelin in the central regulation of feeding.
Nature 409:194-198, 2001
18. G Nishimura, K Nakahara, N Misaw, M Muranaka, K Uchida, H Kuroda and N Murakami,
Auto-immunization against intestinal bacterial endotoxin prevents alcoholic fatty liver.
J.Vet. Med. Sci. 63: 275-280, 2001
19. Y. Date, M. Nakazato, N. Murakami, M. Kojima, K. Kangawa, S. Matsukura
Ghrelin Acts in the Central Nervous System to Stimulate Gastric Acid Secretion
Biochem Biophys Res Commun 280(3):904-907,2001
20. K. Toshinai, M.S. Mondal, M. Nakazato, Y. Date, N. Murakami, M. Kojima, K. Kangawa. S. Matsukura
Upregulation of ghrelin expression in the stomach upon fasting, insulin-induced hypoglycemia and leptin administration
Biochem Biophys Res Commun 281:1220-1225,2001
21. K Nakahara, N Murakami, E Takigami, T Nasu, T Murakami and K Shiota
Intracellular Ca^{2+} signaling pathway is involved in light-induced phase advance, but may not be in phase delay, of circadian melatonin rhythm in chick pineal cell.
Journal of Pineal Research 30:234-242, 2001.
22. Hayashida, K. Murakami, K. Mogi, M. Nishihara, M. Nakazato, M. S. Mondal, Y.Hori, M. Kojima, K. Kangawa and N. Murakami.
Ghrelin in domestic animals: distribution in stomach and its possible role Domestic Animal Endocrinology 2001 in press

(学会発表)

- 1、井田隆徳、村上 昇、中原桂子、黒田治門、中里雅光
摂食亢進ホルモンーオレキシンの行動やストレスへの関与とその機序について
第128回日本獣医学会、熊本、1999、10月14日
- 2、瀧上恵理、中原桂子、村上 昇、那須哲夫、黒田治門、
鳥類と哺乳動物の生体時計に対する光の同調機構について：細胞内伝達機構の相違
第128回日本獣医学会、熊本、1999、10月15日

3、河野孝典、中原桂子、村上 昇、那須哲夫、黒田治門
スズメの自由継続リズムに対するメラトニンの定刻投与の効果（特に活動抑制と体温低下）
第128回日本獣医学会、熊本、1999、10月15日

4、永田志保、村上 昇、中原桂子、井田隆徳、内田和幸、黒田治門
新生児ラット網膜の三次元コラーゲン培養下での軸索伸張におよぼす諸因子について
第128回日本獣医学会、熊本、1999、10月15日

5、村上 昇
新規摂食関連ペプチドの摂食作用とその他の生理機能について
第130回日本獣医学会、大阪、2000、10月9日

6、阿部有利、村上 昇、中原桂子、那須哲夫、黒田治門
ヒヨコ松果体細胞の計時機構および光同調機構におよぼす pituitary adenylate cyclase-
activating polypeptide の効果
第130回日本獣医学会、大阪、2000、10月8日

7、河野孝典、村上 昇、中原桂子、那須哲夫、黒田治門
鳥類におけるメラトニンの体温低下および行動阻止校かの比較
第130回日本獣医学会、大阪、2000、10月8日

8、黒岩享俊、村上 昇、中原桂子、黒田治門、西原真杉、茂木一孝、中里雅光、寒川賢治
新規成長ホルモン分泌促進ペプチド、グレリンの作用と分泌についての検討
第130回日本獣医学会、大阪、2000、10月8日

9、林田貴裕、村上 昇、中原桂子、黒田治門、中里雅光、伊達 紫、寒川賢治
新規成長ホルモン分泌促進ペプチド、グレリンの胃と脳における細胞局在の検討
第130回日本獣医学会、大阪、2000、10月8日

10、村上 昇
哺乳類および鳥類の生体リズムに関する研究
第131回日本獣医学会、東京、2001、4月3日

著書、総説

1、村上 昇、中原桂子
生物時計の分子生物学 Springer Verlag, Tokyo, 海老原史樹文、深田吉孝
編1999、p150-158「鳥類松果体の時計機構」

2、村上 昇、中原桂子
単一松果体細胞の培養法 生体の科学 1999