

論文の内容の要旨

論文題目 Elucidation of Regulatory Mechanism for Mammalian Circadian Rhythms Using *Period1* Transgenic Animals

和訳 トランスジェニック動物を用いた哺乳類サーカディアン制御機構の解明

指導教官 榊 佳之 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成9年4月入学

医学博士課程

分子細胞生物学専攻

氏名 沼野 利佳

地球上での生物の行動や代謝などには一日を周期とする概日リズムが存在する。げっ歯類の視交叉上核(SCN)を破壊すると行動等すべての概日リズムが消失する。そして、視交叉上核破壊体に野生型のSCNを移植すると概日リズムが回復することから、哺乳類の概日リズムの中核はSCNに存在することが明らかになった。概日リズムは、SCNから下位への神経連絡、又は神経伝達物質を介して発生し、その位相はSCNへの網膜視細胞からの神経入力により環境の光サイクルに同調する。しかし、哺乳類の概日リズムの分子メカニズムの詳細は、まだ、解明されていない。

これまでに、哺乳類の概日リズム形成に関与する時計遺伝子はいくつか知られている。その中で *Period1*(*Per1*)は、明暗及び恒暗条件下でSCNにおいて自律的な転写日周リズムを持ち、網膜への光照射によりSCNで一過的に転写誘導される。また、*Per1*は末梢組織でも発現日周変動を示し、その位相はSCNにおけ

る位相に比べて数時間遅延している。これらの事実は、*Per1* 発現の日周振動及び光誘導が哺乳類概日リズム形成及び光サイクルへの同調に重要な機能を有することを示唆する。また、SCN を含む複数の組織で *Per1* 発現日周振動が見られることから、*Per1* 発現日周振動を概日時計中枢及び末梢組織の計時機能測定の良い指標として用い得ると考えられる。

本論文では、まず、概日リズム形成機構における *Per1* の機能を解析するために、*Per1* を強力なプロモーターにより強制発現させた形質導入動物を作製し、*Per1* 発現日周振動の失調が概日リズムに及ぼす影響を個体及び分子レベルで解析した。次に、*Per1* プロモーターとルシフェラーゼとの融合遺伝子を用いた形質導入動物を構築した。作製した *Per1::luc* 形質導入体の各種組織では、組織特異的な日周振動が観察された。この *Per1::luc* 形質導入体を用いて、光サイクルの位相変化に対する各組織の同調能の違いを明らかにすることができた。

1 *Per1* 強制発現形質導入トランスジェニック(Tg)動物

Per1 発現の日周振動が哺乳類概日リズム形成に機能するのであるならば、それが失われた場合、行動などの概日リズムに必ず影響を及ぼすと考えられる。発現の日周リズムが消失した変異体には、発現を常時抑制した遺伝子破壊体と、高レベルで維持させた強制発現体がまず考えられる。*Per1* には相同遺伝子としてやはり発現日周振動を示す *Per 2* や *Per 3* があるため、その内の 1 遺伝子の破壊体では他の野生型遺伝子が相互に補償した結果、表現型が出現しない可能性がある。そこで、*Per1* 強制発現体 Tg 動物を作製し、この変異体の概日リズムを個体及び分子レベルで解析を行った。

実際には、組織特異性のない強力な *EF1 α* (Elongation factor 1 α) Promoter と、神経特異的に発現する *NSE* (Neuron specific enolase) Promoter を *Per1* に連結させた形質導入体を作製した。いくつかの *EF1 α : : Per1* 及び *NSE : : Per1* Tg ラット系統において、恒暗条件で輪回し行動リズム、体温リズム、日周活動量リズムの周期が野生型に比べて 1 時間長くなった系統や、無リズムになった系統が得られた。また、体温リズム、日周活動量リズム周期では明暗条件下で相対的協調が観察されることから、これらの Tg 動物の概日時計は、光同調機能も低下していることが判明した。これら *Per1* 強制発現 Tg ラットでは、時計の中枢機構が

存在する SCN 及び眼球において *Per1* 遺伝子の転写量が常時、高いレベル（野生型の転写量ピークの 2 から 7 倍）に維持されていることを確認した。さらに、SCN 及び眼球での内在性 *Per 1*、*Per 2* の転写振動の振幅が減少し、常時、発現が抑制されていた。これらの結果により、哺乳類の概日リズムの形成には *Per1* の約 24 時間周期の自律的な発現振動が不可欠であること、また、概日リズムの光同調には、*Per 1* の SCN における一過的な発現が機能することが明らかとなった。*Per1* の強制発現により内在性 *Per 1* や *Per2* といった相同遺伝子の転写振動の振幅が野生型に比べて抑制され、常時低くなっていることから、*Per 1* は直接または間接的に *Per 1*、*Per 2* の発現を抑制することが明らかになった。また、*Per 1* 形質導入体では、*Per 1* の光による一過的な発現誘導が *Per 1* 強制発現により相殺されたために、明暗条件下でも自由継続リズムが観察されたと推論した。神経特異的な *Per1* 発現が確認された *NSE::Per1 Tg* ラットが、*EFl α ::Per1 Tg* ラットと同様な表現型を示すことから、少なくとも *Per1* の神経特異的な強制発現により概日リズム異常を誘導することが可能であることが示唆された。

2 *Per1::luc* Tg 動物

マウス *Per1* (*mPer1*) プロモーター依存的にルシフェラーゼ遺伝子を発現する *Per1::luc* Tg マウスとラットを構築した。この Tg ラットの SCN スライス培養では、約 24 時間周期のルシフェラーゼ発現振動が観察され、それは 32 日間維持された。一方、培養した肝臓、肺、骨格筋でも *in vivo* と同様、SCN に比べ約 7–11 時間遅れた約 24 時間周期のルシフェラーゼ発現振動を示した。しかし、この発現日周振動は SCN と違い 2–6 サイクルで減衰した。末梢組織における振動減衰は培養細胞の死滅によるものではない。なぜならば、振動が減衰した培養肝臓、肺組織の培地交換や骨格筋への血清添加により、やはり、2–6 サイクルで減衰する再振動を誘導することができるからである。この結果は、末梢組織の *Per1::luc* 発現日周リズムは、SCN からの神経連絡か未知の液性因子により維持されていることを示唆する。これに対し、SCN の *Per1::luc* 発現日周リズムは自律的で、他の組織非依存的に安定に維持される。

上で得られた結果は、*Per1::luc* 動物を用いて SCN 中枢及び末梢組織の計時機能を同時に、しかも同じ方法で測定可能であることを意味する。そこで、SCN

と末梢組織の外界光サイクル変化に対する反応を *Per1::luc* 動物を用いて解析した。*Per1::luc* Tg ラットの飼育光サイクル（明:暗=12時間:12時間）を6時間位相前進または位相後退させ、移行期の長さ（新たな光サイクルに同調するまでに要する期間）を行動リズム及び各組織の *Per1::luc* 発現日周リズムを指標に測定した。

まず、行動リズム解析の位相同調に要する期間は位相前進では約6日、位相後退では約2日であった。一方、SCNの *Per1::luc* 発現リズムは、6時間の位相前進と位相後退に対して1日後には位相が移行していることが判明した。ところが、各末梢組織は組織間で違いは見られるがものの、位相前進又は後退ともに1日後では再同調が完了せず、2から6日を要した。即ち、いわゆる時差ボケの現象は、SCN と他の末梢組織の概日リズムが脱同調した状態であると考えられる。

3 結論

本研究では、哺乳類概日リズムの形成や光同調機能には *Per 1* の日周発現が必要であることを *Per 1* 強制発現 Tg 動物の解析により明らかにした。また、*Per 1* の強制発現により *Per 1*、*Per 2* 日周発現リズムにも影響を及ぼすことを示した。次に、*Per 1* の発現振動を指標にした解析により、SCN は光環境変化に即座に反応する自律的な概日リズムオシレーターを有し、末梢のシグナル伝達系を介して末梢組織の概日リズムオシレーター日周発振を維持することがわかった。また、このシステムを用いて中枢と末梢組織の位相シフト能を同じ範疇で比較検討することにより、時差ボケをひきおこす原因を示唆した。

当研究で明らかになった哺乳類概日リズムの新知見は、中枢及び末梢での概日リズム形成とその同調機構の解明に利用できる。そして、現在、社会問題となっている精神疾患も含めて多くのリズム異常を伴う疾患、リズム障害や躁鬱病などの原因解明、診断、治療法の開発にも有効だと思われる。