

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 4月30日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23650177

研究課題名（和文） リズム中枢特異的発現系の構築

研究課題名（英文） The expression system specific for the circadian center

研究代表者

内匠 透 (TAKUMI TORU)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・教授

研究者番号：00222092

研究成果の概要（和文）：24時間周期の概日リズムは、遺伝子と行動（脳機能）の関係を明らかにする上で非常に優れた系である。リズムの中枢は脳内視交叉上核（SCN）である事がわかっているが、SCNに特異的に発現する遺伝子・プロモーターは知られておらず、理想的な発生工学的手法は利用できない現況である。本研究は、SCNに強く発現する遺伝子群のプロモーターを複数利用し、Cre-loxP及びTet-on-off系を組み合わせる事により、あらたなリズム中枢（SCN）特異的遺伝子発現系を構築し、さまざまな遺伝子改変マウスの開発の基盤を作ろうとするものである。

研究成果の概要（英文）：The mammalian oscillator for circadian rhythm with a period of 24 hours is localized in the suprachiasmatic nucleus (SCN). Although the recent advance in genetic engineering methods provide different region-specific expression system, we have not obtained the specific expression system in SCN. The present study is to try to establish a system of SCN-specific expression using a combination of different promoters.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：脳科学

科研費の分科・細目：脳神経科学 神経解剖学・神経病理学

キーワード：遺伝子、細胞・組織、行動学、神経科学

1. 研究開始当初の背景

24時間周期の概日リズムは、ほとんどすべての生物に備わる基本的生命現象で、遺伝子と行動（脳機能）の関係を明らかにする上で非常に優れた系である。リズムの中枢は脳内視交叉上核（SCN）である事がわかっている

が、SCNに特異的に発現する遺伝子・プロモーターは知られておらず、理想的な発生工学的手法は利用できない現況である。

2. 研究の目的

本研究は、SCNに強く発現する遺伝子群のプ

ロモーターを複数利用し、Cre-loxP 及び Tet-on-off 系を組み合わせる事により、あらたなリズム中枢 (SCN) 特異的遺伝子発現系を構築し、さまざまな遺伝子改変マウスの開発の基盤を作ろうとするものである。

3. 研究の方法

研究の成果にもかかわらず、単一のプロモーターによる制御では、SCN 部位特異的発現制御は成功に至っていない。その中で、Scg2 プロモーターを用いた Tet-on-off 系のマウスとして比較的 SCN に強く発現する系の報告がある。しかし、実際には Scg2 プロモーターは、SCN 特異的ではない。そこで、複数のプロモーターを組み合わせることにより SCN 特異的発現制御法をあらたに開発する。

1) 第一の系として、SCN に比較的強く発現することがわかっている 3 つの遺伝子 (Per2, Oct2, Gad67) のプロモーター下に Cre を制御するラインのためのベクター構築を行う

第二の系として、scg2 プロモーター下に flox-STOP-(r)tTA を発現するラインのためのベクター構築を行う。

1) 上記にて、SCN 特異的発現制御系の開発に成功した場合は、第三のマウスの発展系として、SCN 特異的調節を行いたい遺伝子を導入したマウスを作製し、in vivo での応用に展開し、特異性の検証を行う。

2) 一方、神経細胞の神経伝達を可逆的に阻止する方法で TeNT マウスが開発され、既に入手済みである。TeNT を基本とした第三マウスを作製し、交配する事により、SCN 部位特異的に神経伝達を可逆的に制御できるマウスの作製を目指し、SCN での神経伝達を阻害した際に、リズム発振、出力がどうなるかを検討する。

4. 研究成果

我々は、トランスジェニックマウスを用いた視交叉上核特異的で可逆的な遺伝子操作を構築すべく、Cre-loxP および Tet テクノロジーを組み合わせたシステムの開発を行った。現在、Secretogranin II: loxP-stop-loxP: tTA(rtTA) のトランスジーンコンストラクト作製を終え、トランスジェニックマウスの作製を行っている。

また、GENSAT プロジェクトより Arginine vasopressin 神経細胞特異的に Cre を発現するトランスジェニックマウスを入手し、その視交叉上核における部位特異性について検討を行った。

SCN に強く発現する AVP 遺伝子のプロモーターを利用した Cre マウスと研究代表者らが発見した新規時計遺伝子である Chrono (ChIP-derived repressor of network oscillator) の flox マウスを交配することで、SCN 特異的に Chrono の発現をなくす、Chrono のコンディショナルノックアウトマウス (CKO) を作製した。本マウスの概日行動リズムを測定したところ、恒常暗条件下で、概日行動リズム周期の延長を示した (野生型は平均 23.83 時間、Chrono CKO は 24.00 時間)。

これらの結果は、Chrono がコアの時計遺伝子として働いていることを示唆している。また、本研究に用いた Avp-Cre マウスは SCN 特異的 Cre マウスとして有効である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

1. Nakamura, T., Takumi, T., Takano, A., Hatanaka, F. and Yamamoto, Y. Characterization and modeling of intermittent locomotor dynamics in clock-deficient mice. *PLoS ONE* 8: e58884,

2013. 査読有

2. Myung, J., Hong, S., Hatanaka, F., Nakajima, Y., De Schutter, E. and Takumi, T. Period coding of Bmal1 oscillators in the suprachiasmatic nucleus. *J. Neurosci.* 32, 8900-8918, 2012. 査読有

3. Mazzocchi, G., Francavilla, M., Paziienza, V., Piepoli, A., Benegiama, G., Vinciguerra, M., Giuliani, F., Yamamoto, T. and Takumi, T. Differential patterns in the periodicity and dynamics of clock gene expression in mouse liver and stomach. *Chronobiol. Int.* 29, 1300-1311, 2012. 査読有

4. Mazzocchi, G., Cai, Y., Liu, M., Francavilla, M., Giuliani, F., Piepoli, A., Paziienza, V., Vinciguerra, M., Yamamoto, T. and Takumi, T. REV-ERBa and the clock gene machinery in mouse peripheral tissues: a possible role as a synchronizing hng. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* 26, 265-276, 2012. 査読有

[学会発表] (計 10 件)

1. 第 85 回日本生化学会大会 2012 年 12 月 14-16 日 (福岡)

シンポジウム「Biochemistry of mind」

Toru Takumi

A molecular link between mood and circadian clock

2. 第 24 回日本脳循環代謝学会総会 2012 年 11 月 8-9 日 (広島)

教育講演

内匠透

概日リズムと医学研究

3. 第 34 回日本生物学的精神医学会 2012 年 9 月 28-30 日 (神戸)

シンポジウム「分子遺伝学の鍵分子からみた精神疾患」

内匠透

時計遺伝子 Per2 と気分

4. 第 19 回日本時間生物学会学術大会 2012 年 9 月 15-16 日 (札幌)

シンポジウム「精神疾患の時間生物学的基盤」

内匠透

リズムと気分

5. 1st Swiss Chronobiology Meeting, Sept 6, 2012 (Fribourg, Switzerland)

Toru Takumi

Molecular links between rhythm and mood

6. SRBR2012 2012 年 5 月 19-23 日 (Destin, FL, USA)

Toru Takumi

Circadian Network of Bmal1

7. 第 31 回リチウム研究会 2012 年 4 月 14 日 (東京)

特別講演

内匠透

気分障害と概日時計を結ぶリチウム

8. Worldsleap 2011, Oct 16-20, 2011, Kyoto Symposium

Toru Takumi

Rhythm and the blues

9. The 32nd Naito Conference, Hokuto, Yamanashi, Oct 18-21, 2011

Yousuke Yamawaki, Atsuko Takano, Toru Takumi

The phosphorylation of PERIOD2 via glycogen synthase kinase 3b has the possibility of the regulator in the depression-like behavior

10. 第 34 回日本神経科学大会 2011 年 9 月 14-17 日 (横浜)

Fumiyuki Hatanaka, Chiaki Matsubara, Jihwan Myung, Takashi Yoritaka, Naoko Uemura, Shuichi Tsutsumi, Akinori Kanai,

Yutaka Suzuki, Hiroyuki Aburatani, Sumio Sugano, Toru Takumi

Genome-wide profiling of the core clock protein BMAL1 targets reveals strict relationship with metabolism

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内匠 透 (TAKUMI TORU)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・教授

研究者番号：00222092

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：