

平成 21年 3月30日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19590235  
 研究課題名（和文） 迅速かつ効率的な遺伝子導入法を用いた概日リズム発振・同調メカニズムの解明  
 研究課題名（英文） Analyses of molecular mechanisms underlying circadian rhythm generation and synchronization by rapid and efficient gene transduction in vivo.  
 研究代表者 早坂 直人（HAYASAKA NAOTO）  
 近畿大学・医学部・講師  
 研究者番号：80368290

## 研究成果の概要：

GeneChipにより網羅的に採取した概日振動遺伝子群の中で、発現が組織特異的で且つ機能が特に注目される遺伝子改変動物を計7種類作製した。そのひとつRGS遺伝子の発現を抑制する2種の独立のノックダウンマウスを作製した。双方のマウスに共通して、活動リズムの周期変化、肝臓、膵臓の病理学的異常と糖代謝異常などを認めた。以上の結果より、概日時計に関与する新規のシグナル伝達系の存在が示唆された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・環境生理学

キーワード：生体リズム

## 1. 研究開始当初の背景

近年概日時計に関与する重要な遺伝子（時計遺伝子）が次々にクローニングされ、ノックアウトマウスや細胞を用いた解析などにより、機能の一部が明らかになって来た。一方で、中枢や末梢組織で行動や生理現象等多岐にわたる生命現象に概日リズムが関与していることが分かっているが、各リズム現象を制御する分子メカニズムの多くは不明で

ある。概日時計でリズム発振に必須の時計遺伝子群と、光その他の入力系、概日時計の制御を受けながら、各組織で機能発現する出力系に、実際に発現し機能している遺伝子群の多くは未だに明らかになっておらず、概日リズムが行動や代謝、その他の生命機能にどのように関与しているのか、どのような経路で概日語形の制御を受けているのか、といった点は、多くが未解明のままである。

我々は先に、GeneChipを用いて、概日時計

中枢 SCN と肝臓において発現に概日振動を示す遺伝子を網羅的に採取した。その中には、SCN と肝臓に共通して発現に概日振動がみられるものが 20 遺伝子含まれていた。これらの遺伝子群は、概日リズム制御系の入力系、概日振動体、出力系のいずれかに属し、各組織におけるリズム現象や、行動、代謝といった重要な機能に関与している可能性が考えられた。

網羅的遺伝子探索の次のステップとして、採取された候補遺伝子群の迅速な発現や機能解析などにより、各候補遺伝子群の中で機能的に重要な候補を絞り、更にそれらの遺伝子が、概日リズム制御システムの中でどのような位置づけで、どのような役割を担っているのかを明らかにするための、効率的な解析法が必要となる。そこで、我々は、採取した複数の新規遺伝子について、概日時計における機能解析を行うために、レンチウイルスベクターを用いた迅速かつ効率的な生体内遺伝子導入法を改良し、確立した。これにより、従来年単位を要した遺伝子改変マウスの作製と数代にわたる交配が必要なくなり、受精卵へのウイルス・インジェクションにより、数カ月で 10~20 匹の遺伝子改変マウスが作製可能で、直ちに解析を行えるようになった。

以上の背景から、複数の遺伝子を短期間に遺伝子操作することにより、効率的な機能スクリーニングを行うという研究が可能となった。

概日リズム研究において、極めて新しい発想として、SCN における自律的リズム発振、光刺激等による位相変位、あるいは細胞間のリズム同調に、アストロサイトが関与している、ということがある。これは、我々が培養アストロサイトで細胞間相互作用により位相が同期し続けるといった観察や、概日時計に重要な時計（関連）遺伝子の一部がアストロサイトに高発現している、といった結果から着想したものである。近年のグリア研究では、グリアが神経のシナプスと相互作用し、積極的に脳機能を制御しているという報告が増えてきている。概日時計がグリアと神経で生み出される、ということが検証できれば、今後のグリア機能研究の発展にも寄与するものとなる。

## 2. 研究の目的

我々が既に GeneChip で視交叉上核や肝臓から網羅的に採取した、概日振動遺伝子（時計関連候補遺伝子）群の、*in vivo* での概日時計への関与を解明すべく、我々が至適化したレンチウイルスによる効率的な遺伝子導入法で、過剰発現マウス、発現抑制マウスを、短期間に複数作製する。そして、行動リズムや遺伝子発現リズム、代謝リズムなどを指標と

して、各遺伝子の概日リズムに関わる機能を明らかにする。

以上の時計関連候補遺伝子群の効率的機能解析を通じて、多様な生体機能における概日リズム制御の分子基盤を明らかにすると同時に、個体、組織、細胞の各レベルにおける概日時計の存在意義を理解することも目的とする。

また、近年のグリア研究の進展で、脳機能には神経回路のみならず、グリアの主体的な関与が重要であることが分かって来た。また、我々のこれまでの研究でも、グリアがリズム発振や細胞間のカップリングに重要な役割を果たすことが示唆されている。そこで、概日リズム制御系における、グリアの関与について、遺伝子操作やイメージング等を駆使して解析を行うことを2つ目の目的とする。

## 3. 研究の方法

上述のように、既に我々が確立した改変型レンチウイルスベクターによる受精卵への効率的な遺伝子導入法を用いて、遺伝子の過剰発現、あるいは各遺伝子の shRNA を複数デザインし、それぞれを過剰発現させたノックダウンマウス（発現抑制マウス）を複数作製し、解析を行う。具体的には、行動リズムに関しては、明暗、恒暗、恒明、光パルスなど異なる光条件下で、回転輪や赤外線センサーを用いて行動量や行動リズムの位相（変位）等を測定し、行動リズム周期の変化（あるいは消失など）、光パルスによる位相変位の異常などについて解析を行う。また、SCN や肝臓の概日時計の異常については、時計遺伝子の発現リズムを、数時間ごとにサンプリングした組織のリズムを Real-time PCR で測定したり、時計遺伝子プロモーターにルシフェラーゼを連結したり reporter 遺伝子導入マウスを用いて、各組織や細胞で発光リズムを測定し、解析を行う。また、SCN 培養スライスを用いた多電極プローブ細胞外電位記録システム（アルファメッドサイエンス社、MED システム）での神経活動リズムの測定で、神経の電気活動のリズムについても検討する。代謝の異常については、耐糖能試験やインシュリン負荷試験やインシュリンの定量、高脂肪食負荷による体重や血糖値の変化、絶食後の血糖値測定、糖新生試験（ピルビン酸負荷試験）等を行う。

## 4. 研究成果

前述の手法を用いて、我々はこれまでに合計 7 種の遺伝子改変マウス（過剰発現マウス、ノックダウンマウス等）の作製に成功した。その中には、SCN と肝臓で共通して発現に概日振動を示す、Hmg4, Dusp4, RGS 各遺伝子

の過剰発現マウスと、RGS の 2 種と Dusp4 各遺伝子のノックダウンマウスが含まれる。そのうち、Hmg4 過剰発現マウスでは、発生前に異常があり、胎生致死になることが示唆された。また、Dusp4 過剰発現マウスでは、概日リズムその他に異常が観察されなかった。そこで Dusp4 ノックダウンマウスも作製したが、結果は同様であった。RGS 過剰発現マウスでは、明暗周期の位相前進に対する行動リズムの同調に有意に長時間を要することが明らかとなり、概日時計の光同調機構の異常が示唆された(投稿準備中)。

続いて、過剰発現でリズム異常が確認された RGS の機能欠損の影響を解析するため、RGS の発現を抑制する shRNA を 2 種類デザインし、それぞれを発現するノックダウンマウスを独立に作製した。その結果、双方のマウスに共通して、活動リズムの周期変化と光による位相変位の異常、肝臓、膵臓の病理学的所見の異常と糖代謝異常、リンパ球の遊走異常等を認めた。上流の GPCR 候補も一部同定し、概日時計に関与する新規のシグナル伝達系の存在が示唆された(過剰発現マウスの結果と併せて投稿準備中)。GPCR やそのリガンドの発現については、概日時計中枢でも既に報告があるが、GPCR を介したシグナル伝達経路に関与する制御因子の異常が、概日リズムに影響するという報告は、これまでには無かった。GPCR リガンドの特定と、そのリガンド GPCR を介したシグナル伝達系が、概日時計においてどのような役割を果たすのかを解明することが、今後のリズム研究では重要な鍵のひとつとなるであろう。

概日リズム制御システムにおいて、我々がもうひとつ注目したのは、制御中枢 SCN におけるアストロサイトの関与である。アストロサイトは SCN において、概日リズム振動や同調機構などに積極的に関与する可能性が我々の研究からも示唆されたので、神経の時計は正常で、アストロサイトの時計が正常に作動しないマウスでの概日リズムへの影響を解析することにした。既に報告のある、GFAP 遺伝子上流の 2.2kb の転写調節領域に Clock のドミナントネガティブ変異体(DN)を連結して、導入したマウスを作製した。F0 が相当数確保できたので、SCN での DN の発現を調べ、アストロサイト特異的な発現の見られることを確認した。現在、F1 を繁殖しながら、行動リズムその他の解析を進めている。

以上のように、複数の遺伝子改変マウスで概日リズム、代謝、免疫系などの異常を認め、概日振動遺伝子が複数の組織で重要な機能を担っていることが示唆された。

##### 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 2 件)

1. \*Hayasaka N, \*Akashi M, Yamazaki S, Node M. MAP kinase is a functional component of the autonomous circadian system in the suprachiasmatic nucleus. **J Neurosci.** 2008. 28(18): 4619-23.

(\*Co-first authors ; 査読有り)

2. Terazono H, Hamdan A, Matsunaga N, Hayasaka N, Kaji H, Egawa T, Makino K, Shigeyoshi Y, Koyanagi S, Ohdo S. Modulatory effects of 5-fluorouracil on the rhythmic expression of circadian clock genes: a possible mechanism of chemotherapy-induced circadian rhythm disturbances. **Biochem. Pharmacol.** 2008. 75(8): 1616-22. (査読有り)

[学会発表] (計 3 件)

1. Hayasaka N: Three-dimensional imaging of Neural networks in brain: An approach for studying localization, interaction and function of specific neurons in a single circuit. **20<sup>th</sup> Anniversary Meeting Society for Research on Biological Rhythms**, Florida, USA, 2008 年5月19日.
2. 早坂直人: 3Dイメージングを用いた特定神経局在・ネットワーク解析への新たなアプローチ  
日本時間生物学会, 2008年11月9日、岡山。
3. Hayasaka N : Predominant expression of circadian-related genes in the SCN-derived

astrocytes: implication of astrocyte functions  
in the circadian oscillator. **2<sup>nd</sup> World  
Congress of Chronobiology**, Tokyo, 2007年  
11月9日.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

早坂 直人 (HAYASAKA NAOTO)  
近畿大学・医学部・講師  
研究者番号：80368290

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

中島 芳浩 (NAKAJIMA YOSHIHIRO)  
独立行政法人産業技術総合研究所・セル  
エンジニアリング部門・主任研究員  
研究者番号：10291080

明石真 (AKASHI MAKOTO)  
佐賀大学・医学部・助教  
研究者番号：30398119