

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 18 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2015

課題番号：15K12776

研究課題名(和文)自由行動下動物のSCN細胞における概日リズム変動のリアルタイム計測

研究課題名(英文) In vivo real-time recording of circadian Per1 and Per2 expression in the rat suprachiasmatic nucleus

研究代表者

山口 賀章 (Yamaguchi, Yoshiaki)

京都大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：30467427

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：多くの生理現象は、約24時間周期のリズムを示す。この概日リズムの中枢は、脳の視交叉上核(SCN)である。概日リズムの分子機構は、時計遺伝子Per1やPer2などによる転写・翻訳を介したネガティブフィードバック機構である。これらの発現振動は、行動リズムに反映される。そこで私たちは、Per1あるいはPer2のプロモーターでルシフェラーゼを発現する2種類のトランスジェニックラットを用いて、自由行動下のラットSCNに光ファイバーを挿入し、長期間にわたってPer1とPer2の転写発現リズムをリアルタイムでモニターすることに成功した。今後は、これらの転写変動と行動リズム変動の関連を解明したい。

研究成果の概要(英文)：In a variety of neuroscience research fields, in vivo real-time monitoring of gene activity in the brains of freely behaving animals offers a challenging issue. Circadian gene expression in the neurons of the suprachiasmatic nucleus (SCN), a bilateral and small nucleus in the hypothalamus, is reflected in locomotor activity. Intracellularly oscillating gene expression is generated by a negative transcription-translation feedback loop by clock genes including two representative oscillatory genes, Per1 and Per2. In this study, we have succeeded in real-time monitoring of Per1 and Per2 transcription separately by detecting the bioluminescence of luciferase (luc) reporters using a plastic optical fiber inserted into the SCN of freely moving rats. Studies of in vivo transcriptional states of clock genes in freely moving animals should improve our understanding of how clock gene expression is reflected in behavioral rhythm.

研究分野：時間生物学

キーワード：視交叉上核 時計遺伝子 概日リズム リアルタイム計測 光ファイバー

### 1. 研究開始当初の背景

46億年間、地球は自転し昼と夜を生み出し続けた。その結果、生物は約24時間周期の概日リズム、体内時計を獲得した。私達はこの体内時計のおかげで睡眠、血圧、体温、食餌のリズムをコントロールできる。体内時計の中樞は脳の視交叉上核 (suprachiasmatic nucleus: SCN) である。SCN の細胞内では、他の脳領域や末梢組織と同様に、時計遺伝子の転写・翻訳によるネガティブフィードバック機構により、24時間のリズムが形成されている。これらの時計遺伝子の中でも、特に Per1 や Per2 の振動が中核をなすものとして注目されている。興味深いことに、これらの時計遺伝子の発現振動パターンは概日行動リズムにまで反映される。しかし、自由に行動できる動物の SCN から継続して時計遺伝子の発現振動をモニタリングし、概日行動リズムとの関連にアプローチする研究はこれまでになされていなかった。

### 2. 研究の目的

コルチゾルやメラトニンといったホルモン分泌や血圧・体温の変動など、私たちの多くの生理現象は、約24時間周期のリズムを示す。この概日リズムは、脳の視交叉上核 (Suprachiasmatic nucleus: SCN) と呼ばれる小さな神経核が、恒常的に時間情報を全身に発信することにより、形成されている。概日リズムを形成する基盤となる分子メカニズムは、時計遺伝子 Per1 や Per2 などによる転写・翻訳を介したネガティブフィードバック機構である。転写活性化因子である CLOCK と BMAL1 は、Per1 や Per2 遺伝子のプロモーター上にある E (E') -box に作用し、Per1 や Per2 の転写を促進する。その後、タンパク質へと翻訳された PER1 と PER2 は、同じく抑制因子である CRY と共に、CLOCK と BMAL1 の転写活性化因子を阻害する。この結果、Per1 と Per2 の転写は減弱される。このようなサイクルを一日単位で繰り返すことで、Per1 や Per2 は、概日振動を示す。興味深いことに、これらの発現振動は、概日行動リズムにまで反映される。したがって、私たちは、無麻酔・無拘束下の動物の SCN から Per1 と Per2 の転写発現をリアルタイムでモニターすることを試みた。

### 3. 研究の方法

Per1 あるいは Per2 のプロモーターでルシフェラーゼ (luc) を発現する2種類のトランスジェニックラット (Per1-luc ラットおよび Per2-luc ラット) を用いた。自由行動下のこれらのラット SCN に光ファイバーを挿入し、ルシフェラーゼの基質であるルシフェリンを浸透圧ポンプにより直接 SCN に持続投与した (図1、図2)。ラットが自由に行動できるように、光ファイバーをシーベルで連結した。また、生体発光の計測は、恒暗条件下で行った。

リアルタイム PCR に用いた SCN のサンプルは、レーザーマイクロダイセクション法を用いて、SCN のみを単離し、RNeasy micro kit により RNA を精製し、逆転写反応により cDNA を得た。

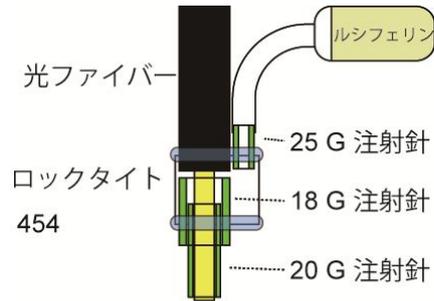


図1 光ファイバーの概略図

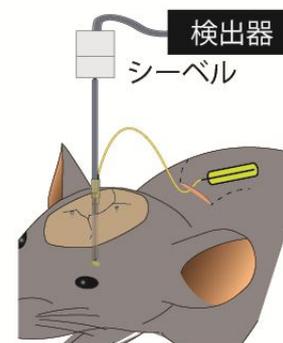


図2 光ファイバー留置の概略図

### 4. 研究成果

Per1-luc ラットおよび Per2-luc ラットのどちらを用いた場合でも、長期間にわたって明瞭な概日リズムを示す生体発光を計測した (図3)。

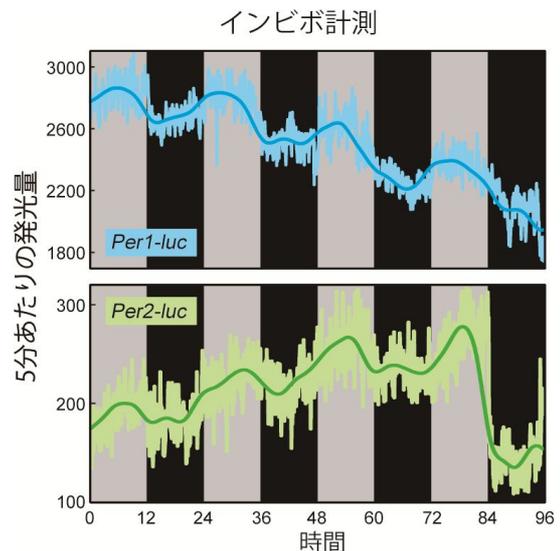


図3 SCN における発光の概日振動

これらの発光リズムを解析したところ、振動の大きさは共におよそ2倍であり、周期長はどちらも24時間であった。しかし、振動の

ピーク時刻は異なっており、Per1-luc の発光ピークは主観的明期中頃に、Per2-luc の発光ピークはそれより 3 時間程度遅れていた (図 4)。

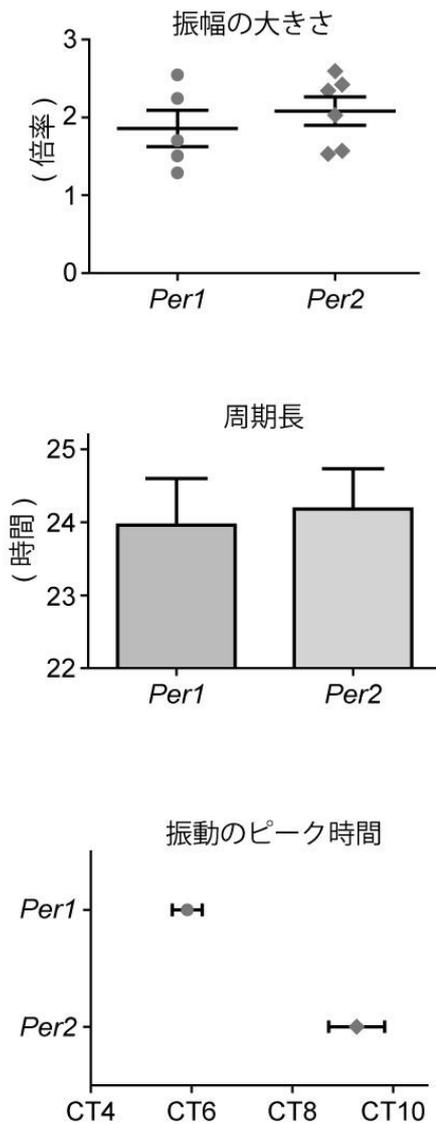


図 4 発光振動の振幅、周期長、ピーク時間

これらのピーク時間の違いは、Per1-luc ラットおよび Per2-luc ラットの SCN サンプルを用いたリアルタイム PCR 法による定量によっても示された (図 5、図 6)。

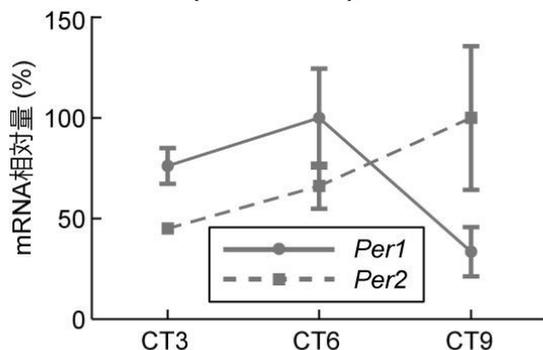


図 5 Per1-luc ラット SCN における mRNA 量

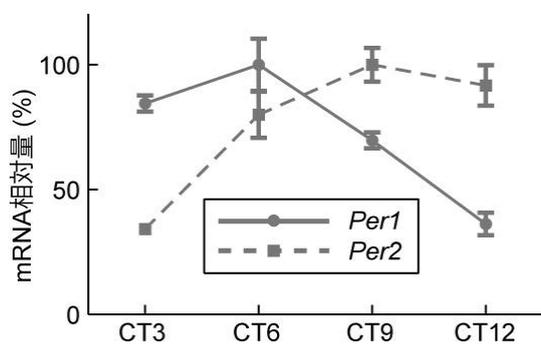


図 6 Per2-luc ラット SCN における mRNA 量

今後は、時差のような SCN の時間恒常性が破綻するような環境下で、Per1 や Per2 がどのように変動するか、あるいは短期間の光パルスによる概日行動リズムの位相変動における Per1 や Per2 の発現変動をモニターし、これらの再同調過程や行動リズム位相変動との関連を解明したい。

### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Yamaguchi Y, Okada K, Mizuno T, Ota T, Yamada H, Doi M, Kobayashi M, Tei H, Shigeyoshi Y, Okamura H\*: "Real-Time Recording of Circadian Per1 and Per2 Expression in the Suprachiasmatic Nucleus of Freely Moving Rats." J Biol Rhythms 31, 108-111, 2016. 査読有  
DOI: 10.1177/0748730415621412

山口 賀章: "時差消失マウスの開発による概日リズムの頑強性を担う分子神経機構の解明." 薬学雑誌 135, 1265-1272, 2015. 査読有  
DOI: 10.1248/yakushi.15-00206

〔学会発表〕(計 7 件)

山口賀章、「概日リズムの頑強性を担う視交叉上核バソプレッシン神経結合」、第 62 回 日本生化学会近畿支部例会、2015 年 5 月 16 日、「立命館大学びわこ・くさつキャンパス (滋賀県・草津市)」

Yoshiaki Yamaguchi, 「The role of arginine vasopressin V1a and V1b receptors in the cellular circadian oscillations of the suprachiasmatic nucleus」、Gordon Research Conference, Chronobiology, 2015 年 7 月 1 日 2 日、「Girona (Spain)」

山口賀章、「行動・摂食リズムの時差再同調における視交叉上核バソプレッシン受容体の役割 Vasopressin receptors in the SCN regulating reentrainment of behavior and feeding rhythms during jet lag」、第 38 回日本神経科学大会 Neuroscience 2015、

2015年7月30日、「神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)」

山口賀章、「バソプレッシン V1a/V1b 受容体による概日リズム形成」、第42回日本神経内分泌学会 第23回日本行動神経内分泌研究会 合同学術集会プログラム、2015年9月18日、「仙台市戦災復興記念館(宮城県・仙台市)」

山口賀章、「概日リズムの頑強性を担う視交叉上核の分子神経機構 バソプレッシン V1a/V1b 受容体欠損マウスは時差症状を示さない」、第65回日本薬学会近畿支部総会・大会、2015年10月17日、「大阪大谷大学(大阪府・富田林市)」

山口賀章、「自由行動下ラットの視交叉上核における時計遺伝子概日リズム変動のリアルタイム計測」、第22回日本時間生物学学会学術大会、2015年11月21-22日、「東京大学情報学環・福武ホール(東京都・文京区)」

山口賀章、「視交叉上核バソプレッシン受容体の細胞概日振動における役割」、第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会 合同大会、2015年12月1日、「神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)」

〔図書〕(計 2件)

Okamura H, Yamaguchi Y, Suzuki T, Mizoro Y: "Vasopressin receptors and jet lag." in *Circadian Clocks* (eds Ken-ichi Honma and Sato Honma) 41-50 (Hokkaido University Press: Sapporo, 2016)

岡村 均, 山口 賀章: "脳内バソプレッシンと時差." *Annual Review 糖尿病・代謝・内分泌 2015*, 寺内 康夫, 石橋 俊, 伊藤裕 (編), 中外医学社, 143-151, 2015.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

京都大学大学院薬学研究科 医薬創成情報科学専攻 システムバイオロジー分野 ホームページ

<http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp//system-biology/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

山口 賀章 (YAMAGUCHI, Yoshiaki)  
京都大学・大学院薬学研究科・助教  
研究者番号: 30467427

### (2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者  
該当なし