

学位論文題名

New reporter system for *Per1* and *Bmal1* expressions revealed self-sustained circadian rhythms in peripheral tissues

(時計遺伝子 *Per1* および *Bmal1* の遺伝子発現同時モニタリングシステムの構築と末梢組織における概日リズムの解析)

学位論文内容の要旨

哺乳類の生物時計は、主時計である視床下部視交叉上核(SCN)が各組織に存在する末梢時計を同調させることにより個体としてのリズムを形成する、階層構造をとると考えられている。概日リズムの細胞内分子機構としては、連動して回転する複数の時計遺伝子転写調節フィードバックループが提唱されている。近年、生物発光レポーター遺伝子を導入したトランスジェニック動物を用い、時計遺伝子発現を連続測定することが可能となり、これらの動物の組織培養の結果、SCNのみならず末梢各組織でも時計遺伝子の発現が自律振動していることが示された。しかし、これまでの研究では、単一遺伝子の発現しか連続測定できず、複数の遺伝子が関与する分子機構の解明は困難であった。また、末梢時計機構の解明には、発現リズムのより明瞭な遺伝子を連続測定する必要性があった。本研究は、発光機序の異なる二種のルシフェラーゼをレポーターとして使用し、二種の時計遺伝子 *Per1* および *Bmal1* 発現をリアルタイム測定できるトランスジェニックマウスを作製すると共に、中枢および末梢における遺伝子発現リズムの解析を目的とした。

[方法]

時計遺伝子レポーターマウスの作製

*Per1* プロモータ下流に分泌型のウミホタルルシフェラーゼ(VL)を、*Bmal1* プロモータ下流に非分泌型のホタルルシフェラーゼ(FL)を導入したベクターを構築し、C57BL/6J バックグラウンドのトランスジェニックマウス(PVBFマウス)を作製した。

自発行動および時計遺伝子発現にみられる概日リズムパラメータの測定

11-16週齢のPVBFおよび野生型マウスの自発行動リズムを感熱式センサーにて14日間、明期12時間、暗期12時間の明暗サイクル下で測定し、その後恒常暗条件(DD)においた。DD24日目のサーカディアンタイム(CT、活動期の開始位相をCT12とする相対時刻)14時(CT14)およびDD50日目のCT22に、それぞれ30分間、300ルクスの光パルス照射した。内因性時計遺伝子発現の検討は、PVBFおよび野生型のマウスを明暗条件下で4時間おきに断頭し、SCNを含む脳の前額凍結スライス切片を作製して *mPer1*、*mPer2*、*mBmal1* のオリゴプローブを用いた定量的 *in situ* ハイブリダイゼーション法により行った。

*Bmal1*-FL および *Per1*-VL の測定

PVBFマウスの前額断SCNスライス切片および末梢臓器(眼球、肺、心臓、大動脈、横隔膜、胃、肝臓、腎臓、精巣)の300 $\mu$ m切片を作成し、DMEM培地に0.1mMホタルルシフェリンを加え、37°Cで培養用メンブレ

ンを用いて気水界培養した。FL 発現はディッシュ型ルミノメータを用いて1分間の発光量を10分間隔で連続測定した。培養 SCN の *Bmal1*-FL 活性を上記の方法で測定中、培養翌日(1日目)の8時から2日目の20時まで4時間おきに測定を中断して培養液を全量採取し、測定終了後にサンプルにウミホタルルシフェリンを加えて発光量をルミノメータで測定した。

[結果と考察]

#### トランスジェニックマウスの概日リズムパラメータ

PVBF マウスの行動リズム位相・周期および光反応性は野生型に対し有意な差はみられなかった。また、SCN における時計遺伝子発現においても野生型と差はなく、本トランスジェニックマウスの生物時計には変異がないことが示された。

#### *Per1*-VL および *Bmal1*-FL の同時測定

同一の培養組織より *Per1* および *Bmal1* 発現を同時に連続測定することに初めて成功した。SCN における *Per1*-VL および *Bmal1*-FL の活性はともに明瞭な概日リズムを示し、その頂値位相は *Per1*-VL が主観的明期の後半、*Bmal1*-FL は主観的暗期の後半となり、逆位相の関係がみられた。過去の文献および今回の *in situ* ハイブリダイゼーション法による両遺伝子の発現も互いに逆位相であり、両遺伝子の内因性発現をリアルタイムでの確に示すことが明らかにされた。*Per1*-VL および *Bmal1*-FL の頂値位相は *in situ* ハイブリダイゼーション法による mRNA の頂値位相に比べてそれぞれ 6-8 および 4-6 時間遅れていた。この遅れは他のホタルルシフェラーゼレポーターを用いた研究においてもみられており、ルシフェラーゼタンパクが翻訳されるまでにかかる時間を反映していると思われる。また、VL については分泌型のためより多く時間がかかったと考えられる。

#### 末梢組織の *Bmal1* 発現リズム

測定した末梢各組織はいずれも明瞭な *Bmal1*-FL リズムを示した。SCN および末梢各組織の *Bmal1* 発現を、発光レポーターを用いて初めて連続測定することができた。眼球を除く全ての末梢組織で、リズム頂値位相は SCN の概日リズムと異なっていた。その生理学的意義は不明であるが、末梢時計の機能がそれぞれの末梢臓器の生理機能リズム発現にあることから、各々組織の機能が、明暗サイクルに同調した睡眠覚醒や摂食リズムなどと適切な位相関係を示すよう、中枢時計により同調を受けると考えられる。一方、リズム周期も各組織により異なっており、末梢組織が独自の概日振動体をもつことが示された。末梢組織の中から肝臓を選び、*Bmal1*-FL リズムを20日間以上にわたって測定することに成功した。肝臓の *Bmal1*-FL リズムは培養の日数を経ると次第に減衰したが、培養液交換により振幅は回復し、再び強い振動がみられた。このときの培地交換は位相依存的に *Bmal1*-FL リズムを変位させた。これらの結果は、末梢組織における振動機構も、SCN の中枢時計と同様、安定した自律的振動と、位相調節機能を有していることを示している。また、一例であるが肝臓の測定中、培養液交換により約8時間の周期をもつウルトラディアンリズムを観察した。このリズムは次の培養液交換により、概日リズムに変化した。このウルトラディアンリズムがレポーター系のアーチファクトであるか、あるいは肝臓の生理的な現象を反映しているかは不明であるが、背後の振動メカニズムを探る上で興味ある現象である。

[結論]

二時計遺伝子発現を同一組織から連続測定可能なトランスジェニックマウスを初めて作製し、その有用性を明らかにした。このマウスを用い、末梢各組織はそれぞれ独自の時計機構をもち、自律的な振動が持続することを明らかにした。

# 学位論文審査の要旨

主査 教授 八若保孝  
副査 教授 赤池 忠  
副査 教授 田村正人  
副査 教授 本間研一 (医学研究科)

学位論文題名

## New reporter system for *Per1* and *Bmal1* expressions revealed self-sustained circadian rhythms in peripheral tissues

(時計遺伝子 *Per1* および *Bmal1* の遺伝子発現同時モニタリングシステムの構築と末梢組織における概日リズムの解析)

審査は、審査担当者全員の出席の下に行われた。最初に申請者に提出論文の概要の説明を求めるとともに適宜解説を求め、次いでその内容および関連分野について試問を行った。

審査論文の概要は以下のとおりである。

近年、生物発光レポーターにより遺伝子発現の連続測定が可能となり、生物時計の中核である視交叉上核 (SCN) のみならず末梢各組織でも時計遺伝子の発現が自律振動していることが示されている。しかし、これまでの研究では、単一遺伝子の発現しか測定できず、複数の遺伝子が関与する分子機構の解明には充分効果的とはいえなかった。本研究では、発光機序の異なる二種のルシフェラーゼをレポーターとして使用し、二種の時計遺伝子 *Per1* および *Bmal1* 発現をリアルタイム測定できるトランスジェニック (TG) マウスを作製するとともに、SCN における生物時計機構の発達および末梢組織における遺伝子発現リズムの解析を行った。

*Per1* プロモータ下流に分泌型のウミホタルルシフェラーゼ (VL) を、*Bmal1* プロモータ下流に非分泌型のホタルルシフェラーゼ (FL) を導入したベクターを構築し、C57BL/6J バックグラウンドの TG マウスを作製した。初めに、TG マウスの自発行動と光反応性の測定および *in situ* ハイブリダイゼーション法を用いた内因性時計遺伝子発現の解析を行った。この TG マウスを用いて、SCN スライス切片を作成、気水界培養し、FL 発現を 10 分間隔で連続測定、VL 発現を 4 時間毎に培地を採取して連続測定した。次に、新生児および成獣の SCN を培養し、培地交換刺激に対する *Bmal1*-FL リズムの反応性の違いを比較した。また、末梢各組織のスライス切片を同様に培養し、*Bmal1*-FL リズムを測定した。

その結果、TG マウスの行動および SCN における時計遺伝子発現には野生型と有意差がみられず、本 TG マウスの有用性が示された。SCN における *Per1*-VL および *Bmal1*-FL の活性は、ともに明瞭

な概日リズムを示し、同一組織から二つの時計遺伝子発現を連続測定することに初めて成功した。各遺伝子発現の頂値位相は、*Per1*-VL が主観的明期の後半、*Bmal1*-FL は主観的暗期の後半であり、過去の文献とも矛盾しなかった。また、成獣 SCN が培地交換位相に関わらず位相がほとんど変位しないのに対し、新生児では位相依存的な位相変位が観察された。このことは、新生児と成獣 SCN におけるニューロン間のカップリングの強さの違いを反映していると思われる。一方、末梢各組織においても明瞭な *Bmal1* リズムが観察され、その位相周期は組織により異なっていた。肝臓の *Bmal1* リズムは次第に減衰したが、培地交換により回復した。培地交換は肝臓組織においても位相依存的に *Bmal1* リズムを変位させたが、その変位量は振動をリセットするには不十分であり、肝臓の振動が培地交換前後で持続していることが明らかとなった。この結果より、末梢各組織はそれぞれ独自の時計機構をもち、SCN と同様に自律的な振動が持続していると考えられる。

口頭試問では、本論文の内容とそれに関連した学問分野について質疑応答がなされた。

主な質問事項は、

- ①生体のリズムについて
- ②実験方法について
  - 1)タイムスケジュールについて
  - 2)培地交換について
- ③培地交換と位相前進との関係について
- ④母子同調のしくみについて
- ⑤二峰性のリズムの出現とその意味について
- ⑥レポーターとして使用したルシフェラーゼについて
- ⑦リズムが形成されるための条件について
- ⑧末梢臓器の独立の可能性を中心にした、マスタークロック（主時計）と末梢の臓器との関係について
- ⑨末梢臓器の機能と末梢臓器が持っているリズムとの関連について
- ⑩生きている動物からの遺伝子発現測定の可能性について
- ⑪今後の展望について

などであり、これらの質問に対し申請者から適切かつ明快な回答が得られた。

審査担当者との質疑応答をとおして、学位論文を中心とした関連する分野について幅広い知識を有し、実験手技についても詳細を熟知していることが明らかになり、さらに本研究の発展を見据えた今後の展望が示された。

以上のことから、審査担当者全員が、本研究が学位論文に十分に値し、申請者は博士（歯学）の学位を授与するのに十分な学識・資質を有しているものと認めた。