

末梢組織における体内時計制御機構の解明

Investigation of the regulation of circadian
clock system in mouse peripheral tissues

2013 年 2 月

早稲田大学大学院 先進理工学研究科

電気・情報生命専攻 薬理学研究

田原 優

目次

第1章 緒言	2
第2章 マウス肝臓における食餌性同調機構の解明	
1. 序論	7
2. 実験材料及び方法	9
3. 結果	16
4. 考察	25
5. 小括	26
第3章 <i>in vivo</i> imaging を用いたマウス末梢時計測定法の確立とその応用	
1. 序論	27
2. 実験材料及び方法	31
3. 結果	
3.1. 末梢時計測定法の確立	36
3.2. SCN 破壊マウスの末梢時計解析	47
3.3. 食餌パターンの変化による末梢時計同調	57
4. 考察	62
5. 小括	64
第4章 総括	65
謝辞	67
掲載されたジャーナル	68
引用文献	69

第 1 章 緒言

私たちは体内時計を持っている。なぜなら私たちは、時刻の分からない一日中薄暗い空間においても、約 24 時間の周期で睡眠—覚醒リズムを維持出来るからである。この現象を「自由継続」または「フリーラン」という。つまり、時計や外の明るさなどが分からなくても、体が体内時計を使って時刻を判断できるのである。一方、疾患や症状の発症にも時刻依存性がある事が知られている。喘息は夜間に症状が出やすく、アレルギーや心筋梗塞、脳梗塞などは朝方に起こりやすい。また、朝方は血中コルチゾール値が最大になり、夜間就寝時には血中メラトニン濃度が上昇することで深部体温が下がり睡眠作用を誘発する。こうした時刻依存的な生理学的イベントのほとんどは、我々が持っている体内時計により制御されていると考えられている。

哺乳類の体内時計は、脳視床下部にある視交叉上核 (Suprachiasmatic nucleus, SCN) が主時計として機能している。SCN は視神経・グルタミン酸受容体を經由して送られてきた外界の明暗情報を受容し、SCN 内の体内時計の時刻を微調整し、その情報を体全体に送る。SCN から末梢臓器にある体内時計 (末梢時計) への情報伝達には、交感・副交感神経系、ホルモンなどの液性因子などを經由する (図 1)。第 3 章で詳しく述べるが、マウスやラットの SCN の破壊実験は様々な生体内の日内変動を消失させる。睡眠—覚醒リズム、コルチコステロンなどのホルモン分泌リズムなどがそうである。つまり、SCN は主時計として重要な役割を担っている (Mohawk et al., 2012; Albrecht, 2012)。

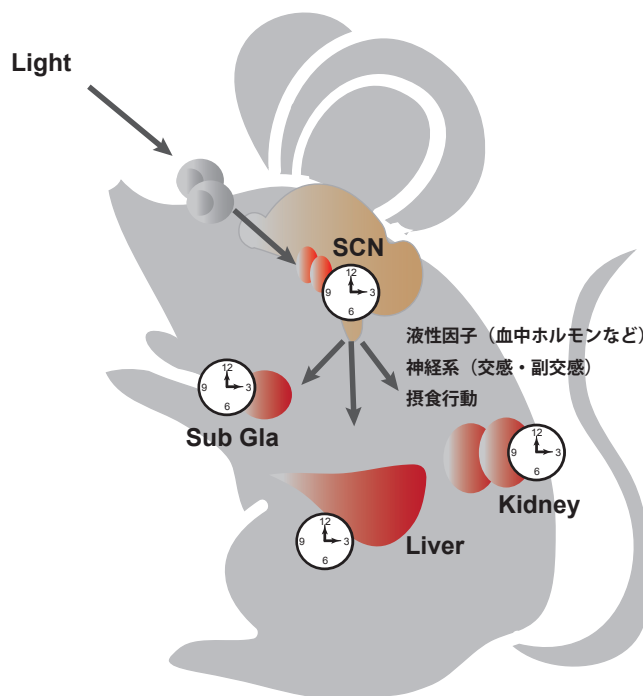


図 1 哺乳類の体内時計概略図

外界からの光情報が主時計である SCN に伝わり、液性因子、神経系、摂食行動などに日内リズムを作り出すことで、それぞれの末梢組織にある時計に情報を送っている。

SCN の体内時計、または末梢時計では、時計遺伝子群が発現することで時計の歯車を回し、時刻を正確に刻んでいる。哺乳類の時計遺伝子は 1990 年代後半にクローニングされ、現在では数十の遺伝子が複雑に機能することでリズムを作り出している事が分かっている。それらの中核は、転写・翻訳による負のフィードバック・ループであり、主要な時計遺伝子群を図 2 に示した。DNA 結合領域である bHLH と、分子相互作用領域である PAS ドメインを持つ CLOCK と BMAL1 が二量体となり、*Period* (*Per*) や *Cryptochrome* (*Cry*) のプロモーター領域にある E-box 配列に結合し、転写の活性化を促す。転写・翻訳された PER と CRY は核内に移行し、CLOCK/BMAL1 に結合し、それらの転写活性を自ら抑制する。その結果 *Bmal1*、*Per*、*Cry* は、mRNA やタンパク質に日内変動が生まれる。また、転写によるリズム調節は

E-box だけでなく、Dbp による D-box、ROR による RORE にも転写活性にリズム性があり、それらのプロモーター領域を持つ遺伝子は時計の下流遺伝子として、実際の生理機能にリズム性を生み出している (Mohawk et al., 2012; Albrecht, 2012)。SCN や肝臓、心臓などの時刻別のサンプルを用いたマイクロアレイの結果、約 10% の遺伝子の mRNA 量に 24 時間の日内変動があると報告され、それらは体内時計の制御下にあると考えられた。一方近年のトランスクリプトームなどの解析により、転写後修飾、翻訳後修飾のリズム性制御の重要性も分かってきており、24 時間の強固なリズムを作り出す機構はさらに複雑性を増してきている (Koike et al., 2012)。この時計遺伝子はほぼ全ての臓器・細胞で機能しているが、それぞれの臓器で時計遺伝子の制御下にある遺伝子は異なっている。また、臓器全体ではなく、1 細胞内でも、24 時間の振動現象が機能していることが、発光レポーターを用いた実験により明らかになっている (Welsh et al., 2004)。

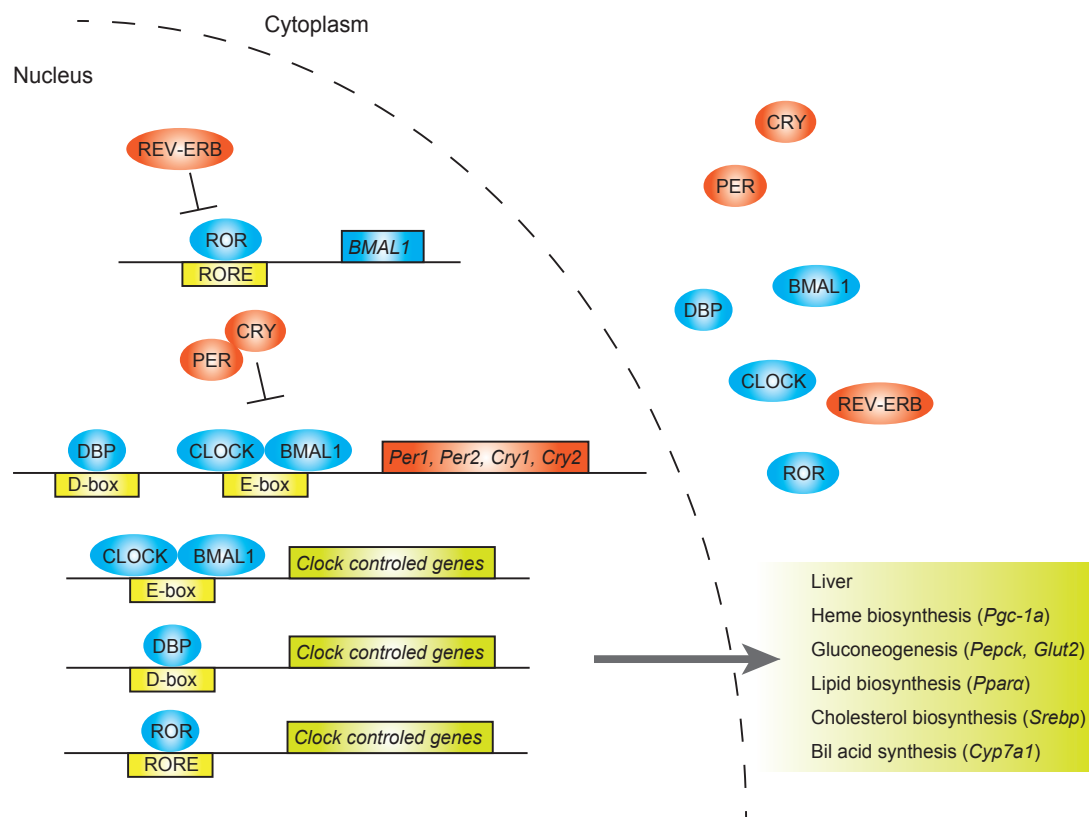


図 2 時計遺伝子による負の転写・翻訳フィードバックループ概要図

CLOCK/BMAL1 により転写・翻訳された PER/CRY が自ら CLOCK/BMAL1 の転写活性を抑制することで 24 時間のリズムを作り出している。それらが、E-box、D-box、RORE などの転写調節領域の活性に日内変動を作り出し、時計の下流遺伝子を制御している。図には肝臓における時計制御下にある遺伝子の代表例を示した。

特に肝臓などの代謝器官では、脂質・糖質などの代謝経路の律速酵素や、代謝関連遺伝子の転写を制御する核内受容体などにリズム性制御が報告されている。それらを図 2 に時計遺伝子の下流遺伝子として示した。その結果、時計遺伝子 *Bmal1* のノックアウトマウスでは、血中のグルコースやトリグリセリド量の日内変動が減弱し、糖新生の障害が起き、さらに耐糖障害を引き起こす事が報告されている (Lamia et al., 2008)。肝臓特異的な *Bmal1* のノックアウトマウスでは、グルコース代謝関連遺伝子である *Pepck* や *Glut2* の発現リズムが消失し、かつ発現量が低下、その結果、低血糖状態になっていた (Lamia et al., 2008)。また、膵臓のランゲルハンス島特異的な *Bmal1* の欠如は、ランゲルハンス島の成長を抑制し、インスリン (insulin) 分泌機能の低下を引き起こしていた (Marcheva et al., 2010)。また、時計遺伝子 *Clock* の変異マウスにおいても、高血糖、高 insulin 血症、高レプチン血症、高脂血症、脂肪肝が報告されている (Turek et al., 2005)。つまり、体内時計と肥満・代謝は密接な繋がりがある事が分かる。

我々の体内時計は、常に外界の状況に合わせて時刻を調節している。外界の状況として、明暗環境がもっとも大きな因子となっている。時刻を調節することを「同調」といい、調節因子のことを「同調因子」という (石田ら、2008)。光以外の同調因子として、食餌や温度、ストレスなどが挙げられる。また、内因性の同調因子として、ホルモンなどの液性因子や神経伝達物質、栄養素などがある。体内時計は

常にこれらの同調因子により、それぞれの組織で、時刻合わせを、行なっている。また、この同調という作業は組織内の細胞間でも行われている。上述した、1細胞レベルの時計遺伝子発現リズム解析により、細胞一つ一つの体内時計の周期はかなりバラつきがあることが分かっており、それらのバラつきを同調という作業で常に揃えていると考えられている。例えば SCN の組織培養においては、Ca²⁺、神経ペプチド (VIP、AVP、GRP) などが細胞間の同調因子として機能しており、VIP のノックアウトマウスは SCN 培養におけるリズム性の維持能力が弱る事が分かっている (Colwell, 2012)。つまり細胞集団として、組織集団としてのリズムの維持には、細胞間、組織間の同調作用がとても重要な役割を担っていると考えられる。

本研究では、まず第二章にて、食餌による末梢時計の同調因子、同調機構の解明を、マウス肝臓を用いて明らかにした。また第三章では、*in vivo* における体内時計の新しい測定法を確立し、SCN 破壊した行動リズム消失マウスにおける末梢時計を観察した。さらに、異なる食パターンへの末梢時計同調についても *in vivo* で調べた。

第 2 章 マウス肝臓における食餌性同調機構の解明

1. 序論

夜行性のマウスに昼間のみ食餌をさせる実験を制限給餌実験という。このような状態において、マウスは内在性の時計システム Food entrainable oscillator (FEO) を機動し、食餌時間の 2-3 時間前に予期行動 (Food anticipatory activity, FAA) とよばれる食餌探索行動を示すようになる (Mistlberger, 2009; Hughes et al., 2009)。この FAA はとても正確で、マウスは食餌の時間を、FEO を使って知ることが出来ると考えられている。しかし、SCN を破壊したマウスでもこの FAA は出現することから、FEO は SCN には存在しないと考えられている。一方、FAA と共に、末梢組織や SCN 以外の脳内の時計遺伝子発現リズムも、食餌時間に同調する事が知られている

(Damiola et al., 2000; Hara et al., 2001; Wakamatsu et al., 2001)。また、コルチコステロンや体温などの日内リズムも制限給餌に同調する (Mistlberger, 2009)。FAA は制限給餌開始後 3-4 日程度で出現してくるが、肝臓や大脳皮質の時計遺伝子発現リズムは 1-2 日後には同調し始めている事が、当研究室の先行研究により報告されている (Hara et al., 2001; Hirao et al., 2009)。また、当研究室は、摂食中枢

(mediobasal hypothalamus) 破壊マウスで FAA 形成が減弱したマウスにおいても、肝臓の食餌同調が起きる事を報告している (Tahara et al., 2010)。これらを総合して考察すると、肝臓における制限給餌性のリズム同調は、中枢や行動に関係なく早い段階で起こる事が分かる。

制限給餌実験の開始一日目、つまり夜間絶食後の昼間の再給餌で、肝臓における時計遺伝子発現が変化するという論文は既に 2 報、報告されている。Vollmers ら

(2009) は再給餌後の肝臓 mRNA をマイクロアレイにかけ、*Per1* の mRNA 量減少、*Per2* の mRNA 量増加を報告している。Wu ら (2010) は、再給餌により、肝臓で *Per2* と *Dec1* の mRNA 量が増えたと報告している。

食後に時計遺伝子発現が変化する要因として、膵臓の β 細胞から分泌される血糖低下作用を持つ *insulin* が候補として考えられる。というのは、*insulin* を投与することで肝臓の *Per2* 発現が上昇することを、当研究室が報告しているからである

(Kuriyama et al., 2004)。また、GI 値の高い炭水化物がより肝臓の *Per2* 発現リズムを動かす事を当研究室が報告している (Hirao et al., 2009)。FAA の形成に関しては、グルコースでも誘発できるという報告がある (Stephan and Davidson, 1998)。よって、糖分、またはそれにより分泌される *insulin* は食餌性同調に関与している可能性がある。

これらを踏まえて本研究では、制限給餌による同調過程における主要な時計遺伝子の発現プロファイルを作製し、再給餌後の急性の遺伝子発現変化と早い位相の変化を示した遺伝子を探索した。その結果、2つの時計遺伝子 *Per2*, *Rev-erba* が重要であると判断した。*Per2* は先行研究の通り *insulin* に依存的に発現が変化し、*Rev-erba* も *insulin* 依存的であった。また、PER2::LUCIFERASE knock-in (PER2::LUC) マウスを用いた実験により、*insulin* の腹腔内投与のみでも肝臓の時計が動く事が分かった。さらに、PER2::LUC マウスから採取したマウス胎児由来線維芽細胞 (MEFs) で *insulin* の効果を検討した結果、*insulin* が直接細胞の *Per2* 発現リズムを変化させることを証明した。これらの結果より、昼間の摂食により分泌された *insulin* が直接肝臓の *Per2*, *Rev-erba* を介して、食餌に同調されたと考察した。

2. 実験材料及び方法

実験動物と飼育環境

5 週齢のオス ICR マウス（東京実験動物株式会社）、または 5-12 週齢の PER2::LUC マウス（Dr. Joseph Takahashi, University of Texas Southwestern Medical Center より頂いた、Yoo et al., 2004）を用いて実験を行った。PER2::LUC マウスはルシフェラーゼアッセイの実験のみに使用し、他の実験は ICR マウスを用いた。マウスは 22 ± 2 度、湿度 $60 \pm 5\%$ 、明期：暗期 = 12 時間:12 時間（午前 8 時から午後 20 時までが明期）の環境で飼育した。実験は自由飲水下で行い、餌は実験動物用飼料（MF、オリエンタル酵母 株式会社）を用い、実験スケジュール開始までは自由摂食させた。実験動物の取り扱いには早稲田大学・先進理工学研究科の実験動物倫理委員会の許可（#09A11）に基づいて行った。

RNA 抽出と Real-Time RT-PCR 法

RNA の抽出は Phenol（Omega Bio-tek Inc.）を用いて行った。50ng の RNA、One-Step SYBR RT-PCR Kit（Takara）、Step One Plus リアルタイム PCR システム（Applied biosystems）を用いて、mRNA の発現量を調べた。また、プライマーは Primer3 ソフト（version 0.4.0）を用いて設計し、メルトカーブにより配列の特異性を確認した。また、一部の増幅産物はゲル電気泳動により長さを確認した。使用したプライマー情報は表 1 に示した。全ての PCR データは、 β -actin の RNA 量により補正した。

Gene	Primer Sequence
<i>B-actin</i>	5'-tgacaggatgcagaaggaga-3'
	5'-gctggaaggtgacagtgag-3'
<i>Per1</i>	5'-caagtggcaatgagtccaacg-3'
	5'-cgaagttgagctcccgaagtg-3'
<i>Per2</i>	5'-tgtgtgcttacacgggtgctcta-3'
	5'-acgttggtttgcgcatgaa-3'
<i>Bmal1</i>	5'-ccacctcagagccattgataca-3'
	5'-gagcaggttagttccactttgtct-3'
<i>Clock</i>	5'-aagattctgggtctgacaat-3'
	5'-ttgcagcttgagacatcgct-3'
<i>Cry1</i>	5'-atccgctgcgtctatatcctc-3'
	5'-cccgaatcacaacagacg-3'
<i>Dbp</i>	5'-ccgtggagtgctaatgacct-3'
	5'-cctctgagaagcggtgcct-3'
<i>Npas2</i>	5'-tcgagtggaaaggagacagg-3'
	5'-agtgcattaaagggtgtgg-3'
<i>Rev-erba</i>	5'-cttccgtgacctttctcagc-3'
	5'-cagctcctcctcggttaagtg-3'
<i>Dec1</i>	5'-ccaggcggggaataaac-3'
	5'-ttcagctgggcaatgcactc-3'
<i>Dec2</i>	5'-ggatacctacaagttaccgcac-3'
	5'-gacttctttggcgcaggttga-3'
<i>Rora</i>	5'-ggaagagctccagcagataacg-3'
	5'-gctgacatcagtacgaatgcag-3'
<i>Rory</i>	5'-tgcaagactcatcgacaagg-3'
	5'-aggggattcaacatcagtgc-3'

表 1 PCR で用いたプライマー配列情報

使用薬剤と投与方法

ストレプトゾトシン (STZ, 200 mg/10 ml, 0.1 ml/10 g of body weight, Sigma-Aldrich) を腹腔内投与することにより、膵臓 β 細胞破壊による insulin 欠乏マウスを作製した。コントロールマウスには生理食塩水を投与した。血中グルコース濃度 (血糖値) は、マウス尾静脈より採取した血液を Glucose PILOT kit (Aventir Biotech) により測定した。STZ 投与マウスは、試薬投与二日後に血糖値が 300 mg/dL を超えていた個体を選別して実験に使用した。insulin (Sigma-Aldrich) は 5 U/kg of body weight でマウス腹腔内に投与した。グルコース (glucose) は経口投与 (1 g/mL/mouse) した。

ルシフェラーゼアッセイを用いた PER2 タンパク量測定法

PER2 のタンパク量を間接的に測定する方法として、PER2::LUC マウスの臓器破碎液と ONE-Glo Luciferase assay system (Promega) を用いた *ex vivo* のルシフェラーゼアッセイを行った。200mg 程度の肝臓切片を PBS 中でホモジナイズし、Passive Lysis Buffer (Promega) と混合することで、酵素活性の失活を防いだ。2000 xg で遠心後、上清とアッセイ試薬を混合し、GloMAX96 micro plate luminometer (Promega) で発光値を測定した。また、発光値はそれぞれの組織破碎液のタンパク濃度を測定する事により、採取した組織サイズを補正した。

肝臓または胎児由来繊維芽細胞 (MEFs) を用いた発光リズム測定

肝臓、または細胞レベルにおける *Per2* の発現リズムを測定するために、PER2::LUC マウスの肝臓、またはライン化した MEFs と、発光測定器 Lumicycle (Actimetrics) を用いて実験を行った。肝臓は ZT 3 に PER2::LUC マウスより採取し、すぐに 4 度に冷やした Hank's balanced salt solution (pH 7.2, Sigma-Aldrich) に移した。肝臓切片をさらに 1 mm 四方にカットし組織培養した。培地は 1.3 ml の DMEM 培地 (Invitrogen) 中に、NaHCO₃ (2.7 mM)、HEPES (10 mM)、Kanamycin (20

mg/L)、Insulin (5 µg/mL)、Putrescine (100 µM)、Human transferrin (100 µg/mL)、Progesterone (20 nM)、Sodium selenite (30 nM)、D-luciferin sodium salt (0.1 mM) を調整し使用した。培地、組織を入れたディッシュはパラフィルムで密閉し、37 度に設定したインキュベーター内に設置した Lumicycle の中で発光測定した。発光は 10 分おきに 1 分間露光し 3-5 日間連続で測定した。

MEFs は PER2::LUC マウスの胎児より採取した線維芽細胞を使用した。発光測定中の培地は、2 ml の DMEM 培地 (Invitrogen) 中に、NaHCO₃ (2.7 mM)、HEPES (10 mM)、Kanamycin (20 mg/L)、D-luciferin sodium salt (0.1 mM) を調整し使用した。FBS は insulin 刺激の効果を弱めないために、培地には入れなかった。細胞、培地を入れたディッシュはパラフィルムで密閉し、37 度に設定したインキュベーター内に設置した Lumicycle の中で発光測定した。

発光リズムの位相評価方法

組織または細胞培養により得られた発光リズムデータ (Raw data) から 24 時間分の移動平均値を引くディトレンド処理を行い、その後 2 時間分の移動平均値で平滑化処理を行った。処理後の発光リズムデータから、それぞれの発光の peak 値を算出し、Peak 時刻の比較を行った。

実験スケジュール：実験 1 (図 3a)

自由摂食群 (free feeding, FF)、絶食群 (no feeding, NF)、再給餌群 (re-feeding, RF)、制限給餌群 (restricted feeding, ResF) の 4 群に分けて実験を行った。FF 群は自由摂食条件において zeitgeber time (ZT) 6, 7, 8, 10, 14, 18, 24 にマウス肝臓を採取した。また、ZT 0 は明期の始まりで午前 8 時とした。食後の遺伝子発現をより詳細に調べるため、ZT 6-14 に関しては採取時間を増やした。NF 群は day 0 の ZT 6 より絶食し、次の日 (day 1) の ZT 6, 7, 8, 10, 14, 18, 24 で肝臓を採取した。RF と ResF 群

も同じく day 0 の ZT 6 から絶食を開始し、RF は day 1 の ZT 6 に 1g の餌を、ResF 群は day 1, day 2 の ZT 6 にそれぞれ 1g の餌を与えた。RF は day 1 の ZT 6, 7, 8, 10, 14, 18, 24 と day 2 の ZT 6 に、ResF は day 2 の ZT 6, 7, 8, 10, 14, 18, 24 と day 3 の ZT 6 に肝臓を採取した。先行研究により ZT 6 における制限給餌により、肝臓の時計遺伝子発現リズムが前進することがわかっていたため、本研究でも ZT 6 に餌を与えた。与えた餌は 9 割のマウスが 15 分以内に食べ切った。食べきらなかった残りの 1 割のマウスは実験群より除外した。マウスは FF 群では各時刻で n = 3 ずつ、他の群では各時刻 n = 3-6 ずつ用いて行った。

採取した肝臓は RNA 抽出後、リアルタイム RT-PCR 法により時計遺伝子群の mRNA 量を測定した。時計遺伝子群は、*Per1*, *Per2*, *Bmal1*, *Clock*, *Cry1*, *Dbp*, *Npas2*, *Rev-erba*, *Dec1*, *Dec2*, *Rora*, *Rory* を調べた。

実験スケジュール：実験 2 (図 3b)

絶食群 (non-treatment, NT)、再給餌群 (food)、insulin 投与群、glucose + insulin 同時投与群 (glucose + insulin) の 4 群を、day 0 に生理食塩水 (saline) 投与または STZ を投与するマウスでそれぞれ作製した。全てのマウスは day 3 の ZT 6 より絶食を開始し、NT 群以外は day 4 の ZT 6 に餌、insulin 投与、または glucose + insulin 投与を行った。ZT 8 に全てのマウスの肝臓を採取し、同時に血糖値の測定を行った。採取した肝臓より RNA を抽出し *Per2*, *Rev-erba* の mRNA を調べた。

実験スケジュール：実験 3 (図 3c)

PER2::LUC マウスを用いて、無処置群 (NT)、ZT 0 に saline 投与群、ZT 6 に insulin 投与する群、ZT 0 に insulin 投与する群を、saline 投与マウスまたは STZ 投与マウスでそれぞれ作製した。Saline または STZ は day 0 に投与し、day 4, 5 にそれぞれ

れの群の処置を行い、day 6 の ZT 3 に肝臓を採取し、組織培養、発光リズム測定を行った。

実験スケジュール：実験 4 (図 3d)

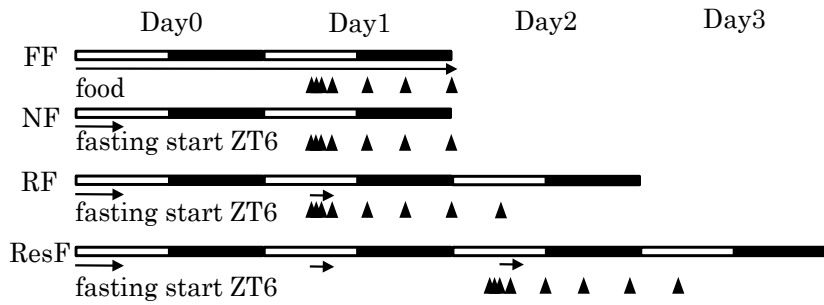
35 mm ディッシュに撒いた PER2::LUC MEFs にデキサメサゾン (Dex, 200 nM) を投与し、二時間後に新しい培地に交換し、発光リズム測定を開始した。測定開始 40 時間後に vehicle (滅菌水)、insulin 100 nM、または insulin 1 μ M を投与した。

insulin の投与方法は、まず元の培地 2 ml から 1 ml を取り出して 1.5 ml チューブに保存しておき、ディッシュに残った 1 ml の培地に insulin を投与した。30 分間 37 度のホットプレート上に静置し、その後チューブに保存していた培地に交換し、パラフィルムで密閉し発光測定器に戻した。発光は 120 時間測定した。

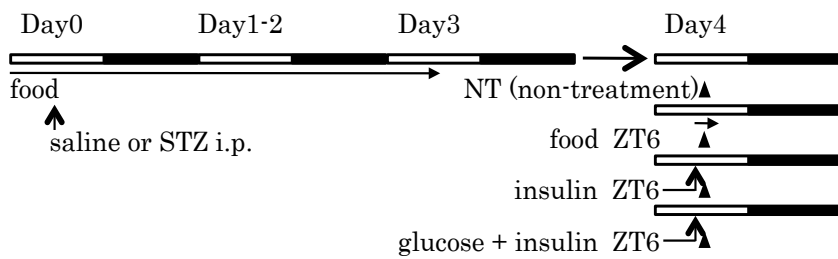
統計

時計遺伝子発現リズムの位相はコサイナー法 (Acro.ese, version 3.5, designed by Dr. Refinetti,) により解析した。統計は Student's *t*-test、1-way ANOVA または 2-way ANOVA で評価した。多重検定は 2-way ANOVA により検定を行った後、Fisher's PLSD test で群間比較した。また、遺伝子発現データに日内変動があるかどうかは、1-way ANOVA で $p < 0.05$ であればリズム有りと判断した。統計ソフトは Stat view (SAS Institute) を用いた。全てのデータは平均値 \pm 標準誤差で表した。

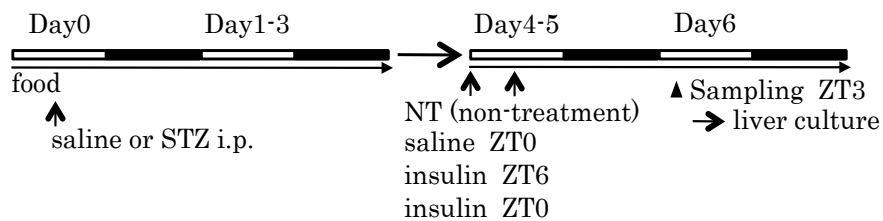
a <実験1>



b <実験2>



c <実験3>



d <実験4>

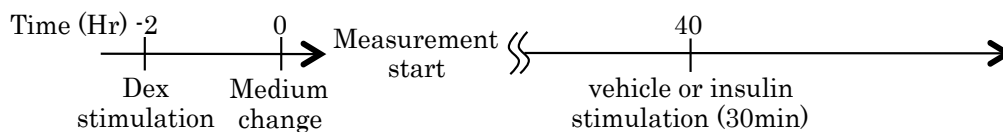


図 3 実験スケジュール

a、実験 1。 b、実験 2。 c、実験 3。 d、実験 4。 四角形の白いバーは明期を、黒いバーは暗期を意味する。 水平方向の矢印は餌を食べられる期間、黒い三角形はマウスの肝臓を採取した時刻を表す。 それぞれの実験スケジュールの詳細は方法欄に記した。

3. 結果

実験 1 : 食餌誘発性の遺伝子発現変化と位相変化に重要な時計遺伝子の探索

実験 1 として、肝臓の食餌性時計同調メカニズムを理解するために、昼間の再給餌における時計遺伝子の発現変動を詳細に調べた。実験スケジュールは、方法の実験 1、または図 3a に記した。それぞれの群で得られた PCR 結果はコサイナー法により位相を、1-way ANOVA によりリズム性を評価した。結果を表 2 に示した。また、位相をそれぞれの群で比較し、位相差を表 3 にまとめた。FF、NF 群の両方と比較して (NF→RF、または FF→RF)、一日目の制限給餌で位相が前進した時計遺伝子は、*Rory*、*Rev-erba*、*Per2*、*Cry1*、*Dec1* であった。代表例として *Rev-erba* を図 4a に、*Per2* を図 5a に示した。*Rev-erba* に関しては、自由摂食下で ZT 6 にあった peak が、一日の昼間の給餌により ZT 2 に前進した ($F_{1,6} = 13.6$, $p < 0.001$, between NF and RF; 2-way ANOVA)。 *Per2* に関しては、自由摂食下で ZT 13.2 にあった peak が、一日の昼間の給餌により ZT 9.6 に前進した ($F_{1,6} = 3.4$, $p < 0.01$, between NF and RF; 2-way ANOVA)。二日目の給餌で、*Per2* はさらに 2.4 時間前進し、合計で 7.2 時間前進した。*Npas2* と *Dbp* は二日目の給餌により 4 時間以上前進した。代表例として *Npas2* のデータを図 4b に示した。*Npas2* の遺伝子発現プロファイルは、二日目の給餌により有意に変化した ($F_{1,6} = 14.9$, $p < 0.001$, between NF and ResF; 2-way ANOVA)。また、日内変動が見られた時計遺伝子全てにおいて、NF 群に比べて ResF 群で位相の前進が起きていた。

次に、一日目の給餌による急性の遺伝子発現変化を NF 群と RF 群の day 1, ZT 8 のデータで比較した (図 4c)。再給餌により、*Per2* mRNA 量が増え、*Rev-erba*、*Rora* の mRNA 量は減少した。これらの結果を統合した結果、再給餌後の急性の遺伝子発現変化、またそれによる一日目の位相前進の両方を示した *Per2* と *Rev-erba* が食餌同調に重要ではないかと考えた。また、*Per2* の発現プロファイルでは、再給餌後の発

現量の上昇が給餌 1 時間後、2 時間後に見られ、4 時間後 (ZT10) から低下する事で、NF と比較すると早い peak 位相が現れた (図 5b)。また、PER2::LUC マウスを用いた肝臓 PER2 タンパク量の測定においても、NF 群は ZT 14 に向けて高くなるのに対し、RF 群は ZT 10 に高くその後下がっていった (図 5c)。よって *Per2* の日内変動は、一日の制限給餌で mRNA、タンパクレベルで位相の前進が起きている事が示された。

gene	FF		NF		RF		ResF	
	Acrophase	P	Acrophase	P	Acrophase	P	Acrophase	P
<i>Per1</i>	12	0.005	10	0.005	(8.4)	0.152	6	0.005
<i>Per2</i>	14.4	0.013	13.2	<.001	9.6	<.001	(7.2)	0.14
<i>Bmal1</i>	22.4	<.001	18.8	0.002	20	<.001	19.6	<.001
<i>Clock</i>	19.6	0.05	(2)	0.328	19.6	<.001	17.2	0.045
<i>Cry1</i>	19.2	0.008	17.6	<.001	14.8	0.023	14	<.001
<i>Dbp</i>	10	0.004	6.8	<.001	6.8	0.002	2	<.001
<i>Npas2</i>	23.2	0.002	0	<.001	23.6	<.001	18	<.001
<i>Rev-erba</i>	6	0.005	6	<.001	2	<.001	0	<.001
<i>Dec1</i>	(12.8)	0.053	12	<.001	(9.2)	0.155	6	0.028
<i>Dec2</i>	(9.2)	0.054	6.4	<.001	6	<.001	6	0.016
<i>Rora</i>	(20)	0.142	18.4	<.001	0	0.039	0.4	0.008
<i>Rory</i>	18	0.023	17.2	<.001	12.4	<.001	(14.4)	0.251

表 2 実験 1 におけるそれぞれの遺伝子発現リズムの位相、リズム性

位相はコサイナー法により算出した。リズム性の有無は、1-way ANOVA により解析した。1-way ANOVA の結果が $p > 0.05$ の群は、peak 位相を括弧付けで示した。

gene	NF → RF Δ phase (h)	FF → RF Δ phase (h)	RF → ResF Δ phase (h)	FF → ResF Δ phase (h)
<i>Per1</i>	(-1.6)	(-3.6)	(-2.4)	-6
<i>Per2</i>	-3.6	-4.8	(-2.4)	(-7.2)
<i>Bmal1</i>	1.2	-2.4	-0.4	-2.8
<i>Clock</i>	(-6.4)	0	-2.4	-2.4
<i>Cry1</i>	-2.8	-4.4	-0.8	-5.2
<i>Dbp</i>	0	-3.2	-4.8	-8
<i>Npas2</i>	-0.4	0.4	-5.6	-5.2
<i>Rev-erba</i>	-4	-4	-2	-6
<i>Dec1</i>	(-2.8)	(-3.6)	(-3.2)	(-6.8)
<i>Dec2</i>	-0.4	(-3.2)	0	(-3.2)
<i>Rora</i>	5.6	(+4.0)	0.4	(+4.4)
<i>Rory</i>	-4.8	-5.6	(+2.0)	(-3.6)

表 3 実験 1 における各群の位相差比較

RF または ResF の位相時刻を NF または FF と比較した。1-way ANOVA にて有意なり
ズム性が確認できなかった群は括弧付きで示した。

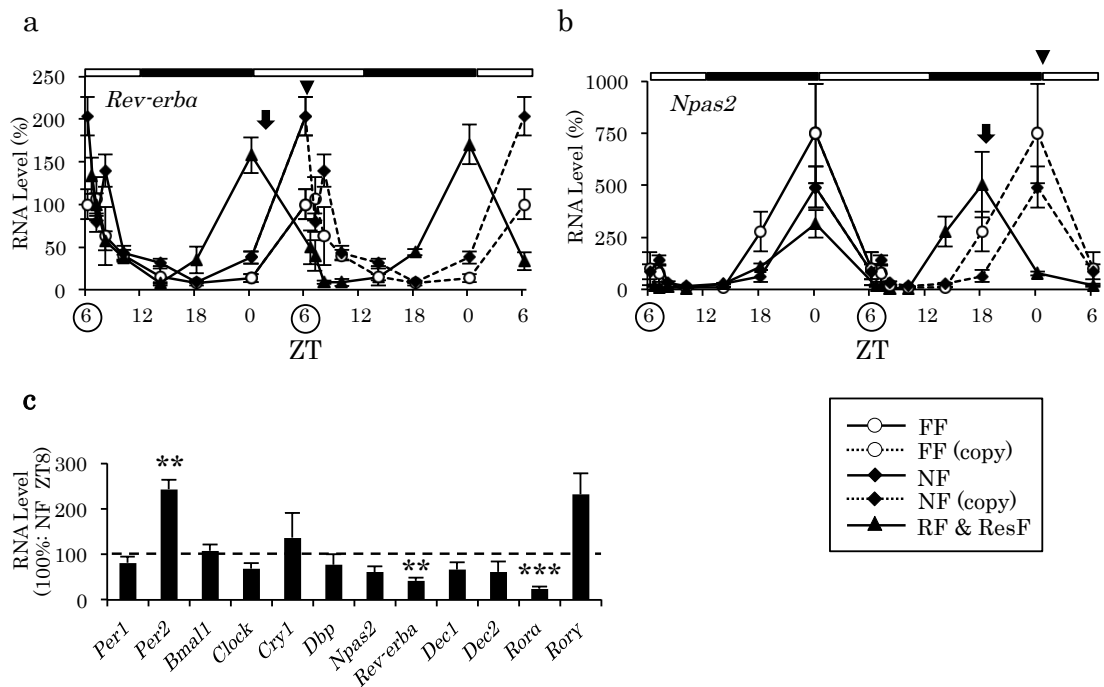


図 4 時計遺伝子発現プロファイルの代表例と急性的な遺伝子発現変化

実験方法は図 3a を参照。a、再給餌一日目に位相が変化した遺伝子。代表例として

Rev-reba を示した。b、給餌二日目に位相が移動した遺伝子として *Npas2* を示した。

四角形の白いバーは明期を、黒いバーは暗期を意味する。黒い矢印は RF または

ResF 群の位相を示す。黒い三角は NF 群の位相を示す。FF、NF 群の二日目の遺伝子

発現結果は、一日目の結果を破線でコピーした。結果は相対値で示し、FF 群の ZT 8

の発現量を 100% として補正した。丸で囲んだ ZT6 で一日目、二日目の給餌を行っ

た。c、RF 群と NF 群の ZT8 における mRNA 量比較。RF 群の mRNA 量を、NF 群の

mRNA 量を 100% として補正して示した。それぞれの結果は平均値 \pm SEM で表した。

** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ between NF and RF by Student's *t*-test。FF 群 $n = 3$ 、NF, RF,

ResF 群 $n = 3-6$ 。

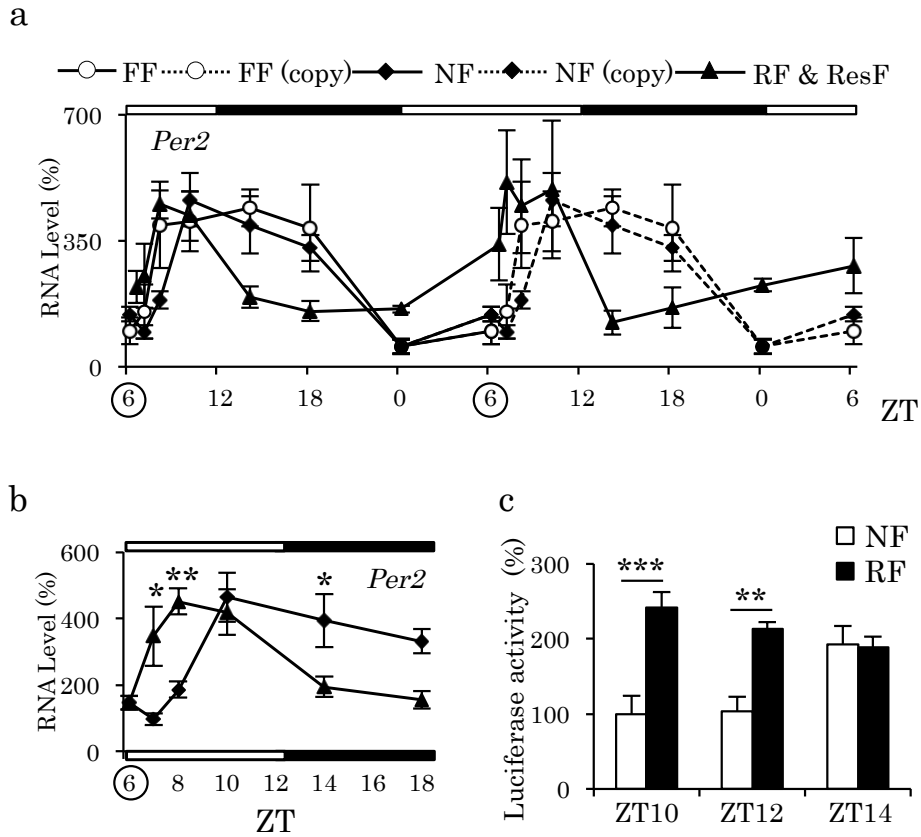


図5 再給餌による *Per2* 遺伝子発現変化

実験方法は図3aを参照。a、b、*Per2*の遺伝子発現プロファイル。bは再給餌一日目のZT6からZT18までの拡大図。四角形の白いバーは明期を、黒いバーは暗期を意味する。FF、NF群の二日目の遺伝子発現結果は、一日目の結果を破線でコピーした。結果は相対値で示し、FF群のZT8の発現量を100%として補正した。丸で囲んだZT6で一日目、二日目の給餌を行った。FF群 n = 3、NF, RF, ResF群 n = 3-6。c、PER2:LUCによる肝臓ルシフェラーゼアッセイ。各群 n = 3。それぞれの結果は平均値 ± SEM で表した。*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, between NF and RF by Fisher's PLSD test。

実験 2 : insulin 依存的な *Per2* 発現上昇と *Rev-erba* 発現減少

STZ 投与による insulin 欠乏マウスを用いて、食後の *Per2*, *Rev-erba* の発現変化に対する insulin の影響を検討した。実験のスケジュールは方法の実験 2、または図 3b に記した。STZ 投与により day 3 の血糖値は control 群に比べて有意に上昇した (control 群 : 143 ± 11 mg/dL, STZ 群 : 464 ± 43 mg/dL, $p < 0.01$, Student's *t*-test) 。摂食により control 群は 2 時間後に血糖値が上昇したが、STZ 群の血糖値は変化しなかった (図 6a) 。また、insulin 投与は、control 群、STZ 群どちらにおいても血糖値を低下させた。

まず、*Per2*, *Rev-erba* の NT 群における mRNA 量は control 群、STZ 群で差は見られなかった。control 群において、food、または insulin 投与は *Per2* の発現上昇、*Rev-erba* の発現減少を引き起こした (図 6b, d) 。しかしこれらの food、insulin による遺伝子発現変化は STZ 群では見られなかった (図 6c, e) 。insulin 投与は STZ 群においても、control 群と似た遺伝子発現変化を誘導した。また、insulin 分泌による血中 glucose 取り込みの影響も検討するため、glucose と insulin の同時投与群も作製した。結果、glucose 投与は insulin 投与による発現上昇にさらなる変化を及ぼさなかった。よって、食後の insulin が直接 *Per2*, *Rev-erba* の発現を変化させたと考えた。

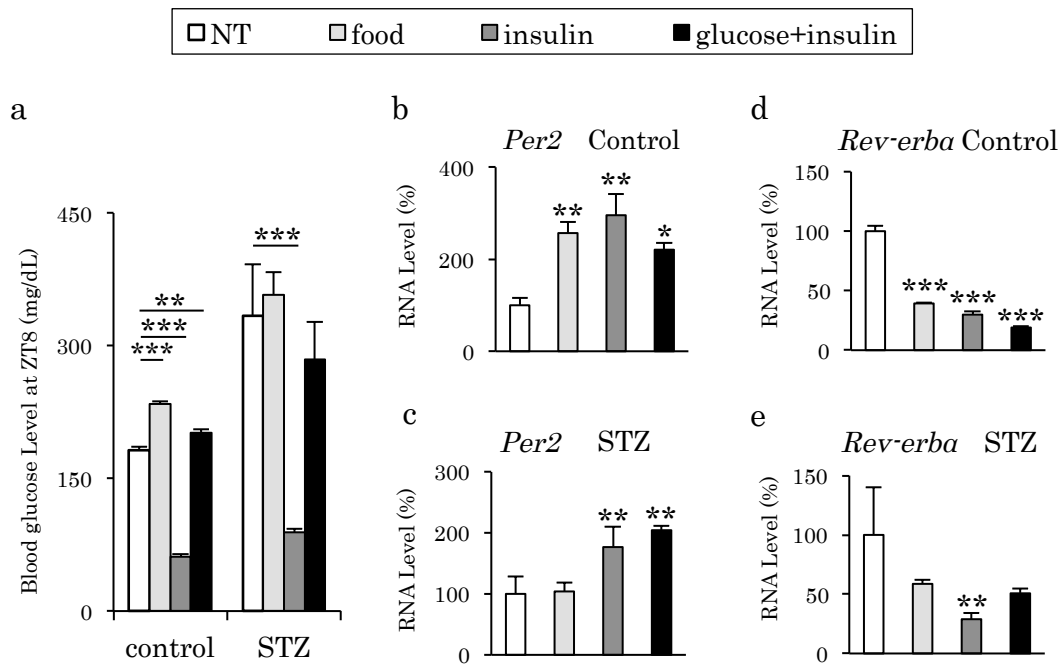


図 6 食餌、insulin による *Per2*、*Rev-erba* の遺伝子発現変化

実験方法は図 3b を参照。a、ZT 8 における各群の血糖値。b、c、control 群、STZ 群の *Per2* mRNA。d、e、control 群、STZ 群の *Rev-erba* mRNA。NT の発現量を 100% として他のデータを補正した。NT 群 n = 3、他の群 n = 4。それぞれの結果は平均値 ± SEM で表した。*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, vs. NT by Fisher's PLSD test.

実験 3： insulin 投与による肝臓 *Per2* 発現リズムの位相前進効果

実験 2 において、insulin 投与で食餌と同じ mRNA 量の変化を誘導できたので、STZ または control 群を用いて ZT 6 または ZT 0 に insulin 投与をすることで、肝臓 *Per2* の発光リズムの位相が前進するかを調べた。実験スケジュールは方法の実験 3 と図 3c に記した。Control 群、STZ 群のどちらも、無処置 (NT) では位相に差は見られなかった (図 7a, b)。また、二日間の insulin 投与はどちらの群においても位相の前進が見られた。前進効果は ZT 6 よりも ZT 0 の方がより大きく前進した。よって、insulin が肝臓の時計を動かす効果がある事を確認できた。

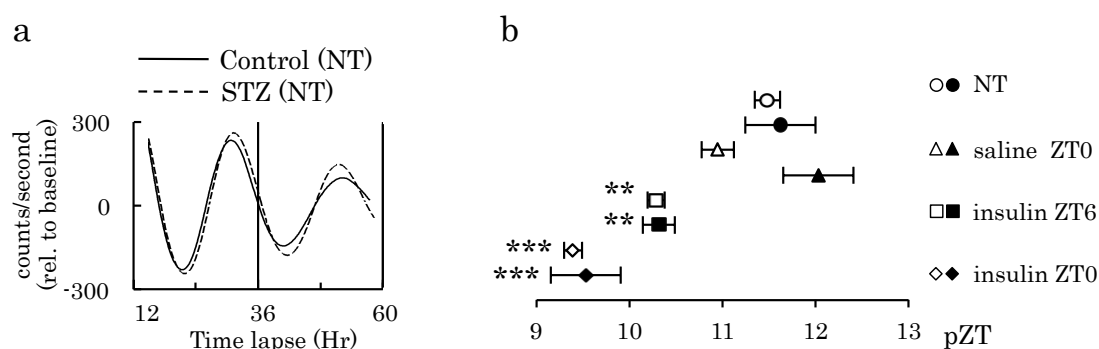


図 7 insulin 投与による肝臓 *Per2* 発現リズムの位相前進効果

実験方法は図 3c を参照。a、control 群、STZ 群の NT おける肝臓 *PER2::LUC* 発光リズムの代表例。b、*PER2::LUC* 発光リズムの位相比較。各群 $n = 3$ 。白い印は control 群、黒い印は STZ 群を表す。横軸は培養開始時刻から算出した ZT (pZT) で示した。それぞれの結果は平均値 \pm SEM で表した。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, vs. NT by Fisher's PLSD test。

実験 4： insulin 投与による細胞 *Per2* 発現リズムの位相前進効果

最後に、PER2::LUC マウスから採取した MEFs を用いて、*in vitro* での直接の insulin 刺激効果を検証した。insulin は、肝臓の *Per2* 発現データ、再給餌の時刻を参考に、発光値が一番低くなった直後（測定開始 40 時間後）に 30 分間刺激し、その後培地を元の培地に交換し発光値の計測を続行した（図 3d）。結果、投与直後の Peak 位相が insulin 投与群で vehicle 群に比べて有意に前進した（ $p < 0.01$, 1-way ANOVA）（図 8a, b）。また、その peak における発光値が insulin 投与群で有意に増加していた（vehicle, 87 ± 11 ; insulin 100 nM, 170 ± 19 ; 1 μ M, 185 ± 14 photon counts/sec; $p < 0.01$ vehicle vs. insulin 100 nM, $p < 0.001$ vehicle vs. insulin 1 μ M by Fisher's PLSD test）。RT-PCR により、insulin 刺激 2 時間後の MEFs の *Per2*, *Rev-erba* の発現量を調べた結果、*Per2* は 62%上昇、*Rev-erba* は 62%減少し、肝臓と同じ効果が見られた（data not shown）。よって、これらの結果は insulin が直接細胞内の時計システムに影響を与えている事を示している。

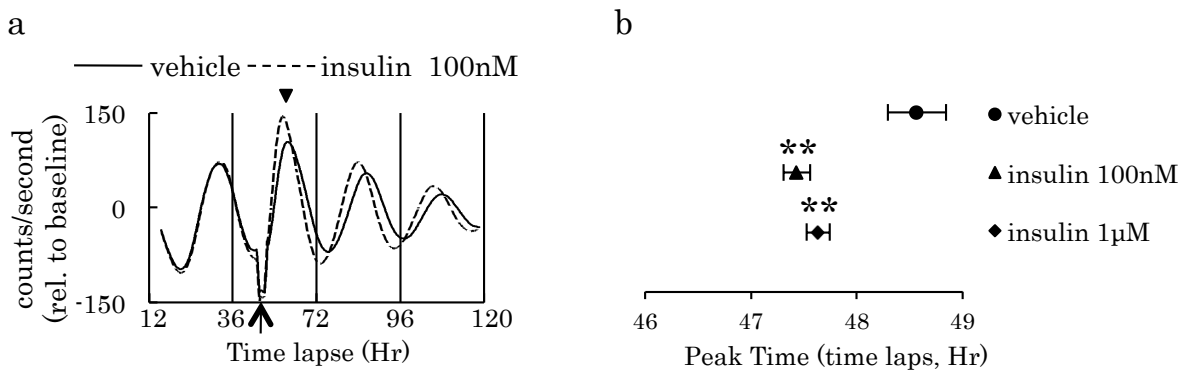


図 8 insulin 投与による細胞 *Per2* 発現リズムの位相前進効果

実験方法は図 3d を参照。a、vehicle 群、insulin 100 nM 群の PER2::LUC 発光リズムの代表例。矢印の時刻にそれぞれの試薬を投与した。黒い三角は解析した peak 位置を示した。b、peak 位相の解析結果。横軸は発光リズム測定開始からの経過時間を示した。それぞれの結果は平均値 \pm SEM で表した。** $p < 0.01$, vs. vehicle by Fisher's PLSD test。

4. 考察

本研究により、肝臓の *Per2*, *Rev-erba* が主要な時計遺伝子の中でより食餌に反応し、急性の発現変化、位相同調作用を示す事が分かった。また、食後に分泌される *insulin* 依存的に *Per2* の発現増加、*Rev-erba* の発現減少が起きる事が分かった。*Per2* に関しては、再給餌後の早い発現上昇、それによる早い peak の出現、またその後の早い発現低下、により位相が前進していく過程を、*in vitro*、*in vivo* で可視化することに成功した。*Per2* は先行論文でも摂食による発現上昇が報告されており

(Vollmers et al., 2009)、今回の我々のデータと合わせて、*Per2* は食餌同調に強く関与していると考えられる。SCN における光同調は、光刺激による *Per1, 2* の急性の発現上昇がもとになって、*Per1, 2* の位相シフトが起こることが知られており

(Colwell, 2012)、肝臓の時計もそれに似た機構で位相がズレるという現象が見られた。

Per2, *Rev-erba* 共に、*insulin* による遺伝子発現変化のメカニズムはまだよく分かっていない。*Per2* のプロモーター領域には CREB の結合配列である CRE サイトがあり、リン酸化 CREB により転写が活性化されることが知られている。しかし、食後は副交感神経系の亢進によりリン酸化 CREB の減少が起き、同じ CRE サイトを持つ *Per1* は発現低下することが報告されている (Vollmers et al., 2009)。よって、*Per2* はそれ以外のメカニズムにより *insulin* 依存的な発現上昇を起こすと推測される。それらの経路の解明は今後の課題である。

insulin が時計遺伝子の mRNA 量に影響があるという報告は Rat-1 fibroblasts で 2000 年に (Balsalobre et al., 2000)、マウス肝臓で 2004 年に報告されている

(Kuriyama et al., 2004)。また、*insulin* 受容体カスケードの RNAi による阻害実験は、多くの分子の阻害により体内時計の周期が変動することが報告されている

(Zhang et al., 2009)。特に glycogen synthase kinase 3 (GSK3 β)、mitogen-

activated protein kinase (MAPK) は体内時計に影響を及ぼす事が分かっている。

GSK3 β は *PER2*, *REV-ERB α* をリン酸化し、*PER2* の核内移行促進、*REV-ERB α* の安定化を行う。GSK3 β の RNAi 阻害やインヒビターを用いた阻害は、体内時計の周期を短くする (Hirota et al., 2008)。よって、insulin が体内時計に影響を及ぼす可能性は大いにあるだろう。

insulin が食餌同調において重要な因子である事は事実だが、一方で insulin は食餌同調に必須ではないと考えられる。というのは、Davidson ら (2002) が STZ 投与した *Per1-luc* ラットを用いて、コントロールラットと変わらない FAA の形成能力、また肝臓の *Per1* リズムの食餌同調ができること、を報告している。実際に、同じ実験を *PER2:LUC* マウスで行ったが、STZ 投与マウスが弱ってしまったことにより、肝臓培養において綺麗な発光リズムが得られなかった (data not shown)。FAA 形成における主要な脳部位は脳内の DMH という神経核であるが、DMH の破壊により FAA 形成能は低下するものの、全く FAA が出現しないわけではない (Tahara et al., 2010)。餌を食べるという行為は生きていくために必須の行為であり、そこには複雑な代償機構が存在しているのだろう。末梢時計の食餌同調においても、insulin 以外の同調経路がある可能性は十分に考えられる。

5. 小括

- ① 肝臓における食餌性リズム同調は、食後の insulin 分泌により、*Per2* mRNA の増加、*Rev-erba* mRNA の減少により起こる位相の変化が重要である。
- ② insulin は直接肝臓に作用し、何らかの経路で *Per2* の発現・位相変化を起こす。

第 3 章 *in vivo imaging* を用いたマウス末梢時計測定法の確立とその応用

1. 序論

哺乳類の体内時計システムは視床下部の視交叉上核 (SCN) に位置する主時計と、それぞれの組織にある末梢時計のネットワークにより支配されている (Bass and Takahashi, 2010; Kalsbeek et al., 2010)。SCN 破壊 (SCNx) 試験による行動リズムの消失、または SCNx 後の SCN 移植による行動リズムの回復実験などから、SCN は古くから時計システムの中核だと考えられてきた (Moore and Eichler, 1972)。しかし、培養細胞や発光レポーターを用いた組織培養の実験などから、それぞれの細胞・臓器には自律的にリズムを刻む能力がある事が分かってきた (Yamazaki et al., 2000)。実際に、SCNx マウスの末梢臓器を培養した結果、PER2::LUC 発光リズムがとても綺麗に観察されている (Yoo et al., 2004)。この結果は、SCN が無くても末梢時計がリズムを維持できる事を意味する。この発光レポーターを用いた時計遺伝子発現リズム測定系のおかげで、体内時計研究は飛躍的に進歩してきた。しかし、マウスから臓器を採取し培地に移す作業自体に、体内時計を同調させる効果があるのではないかという懸念があった。実際に、恒明条件下で一ヶ月飼育したマウスで、6 時間おき、違う時刻に肝臓を採取し発光リズムを測定してみると、培養開始から 24-30 時間後に必ず peak 位相が来ることが分かった (図 9)。通常の明暗環境で飼育したマウスでは、培養開始時刻に依存した peak 位相が見られた。つまり、恒明条件下では培養開始時刻に時計がリセットされ、その時点から時計が刻み始めている事が考えられた。そこで、*in vivo* で体内時計を測る方法を確立することで、このような疑問を解決できるのではないかと考えた。一方、SCNx マウスの肝臓を 6 時間おきに数匹ずつ採取し、PCR により時計遺伝子の mRNA 量を調べた結果、振幅が減弱していた、あるいはリズム性を失っていたという報告があった (Hara et al., 2001; Terazono et al., 2003; Akhtar et al., 2002)。これらの結果は、先に述べた発光レポーターを用いた結

果とは異なる。では、SCNx マウスの末梢時計は各自でリズムを維持しているのだろうか。しかし、どちらの測定方法も欠点があり、組織培養は上述のリセット効果の可能性もある。後述の PCR 法は、多数のマウスを集合したデータであり、一頭ではリズムがあったかもしれないが分からない。そこで今回新しい測定系を立ち上げる事で、これらの問題点を解決し、SCNx マウスの末梢時計について改めて解析を行った。

本研究ではさらに、食餌パターンと末梢時計についてもこの新しい測定法により解析を行った。前章で述べたように末梢時計は食餌に強く同調し、食後の時計遺伝子の変化が鍵となり位相の変化が起こる。しかし、通常ヒトやマウスは一日数回の食事を食べるが、その複数の同調刺激にいかに関与しているかはあまりよく分かっていなかった。また、1日2回の食事では *Per2* の発現リズムは2つピークを持つ可能性も考えられる。当研究室の先行研究により1日2回の食餌で飼育した *PER2::LUC* マウスの肝臓を組織培養した結果、24時間周期に発光リズムが得られたが、それは先に述べた培養時のリセットが起きていた可能性も考えられる (Hirao et al., 2010)。そこで、様々な食餌パターンで飼育したマウスの末梢時計について、*in vivo* で解析を行った。

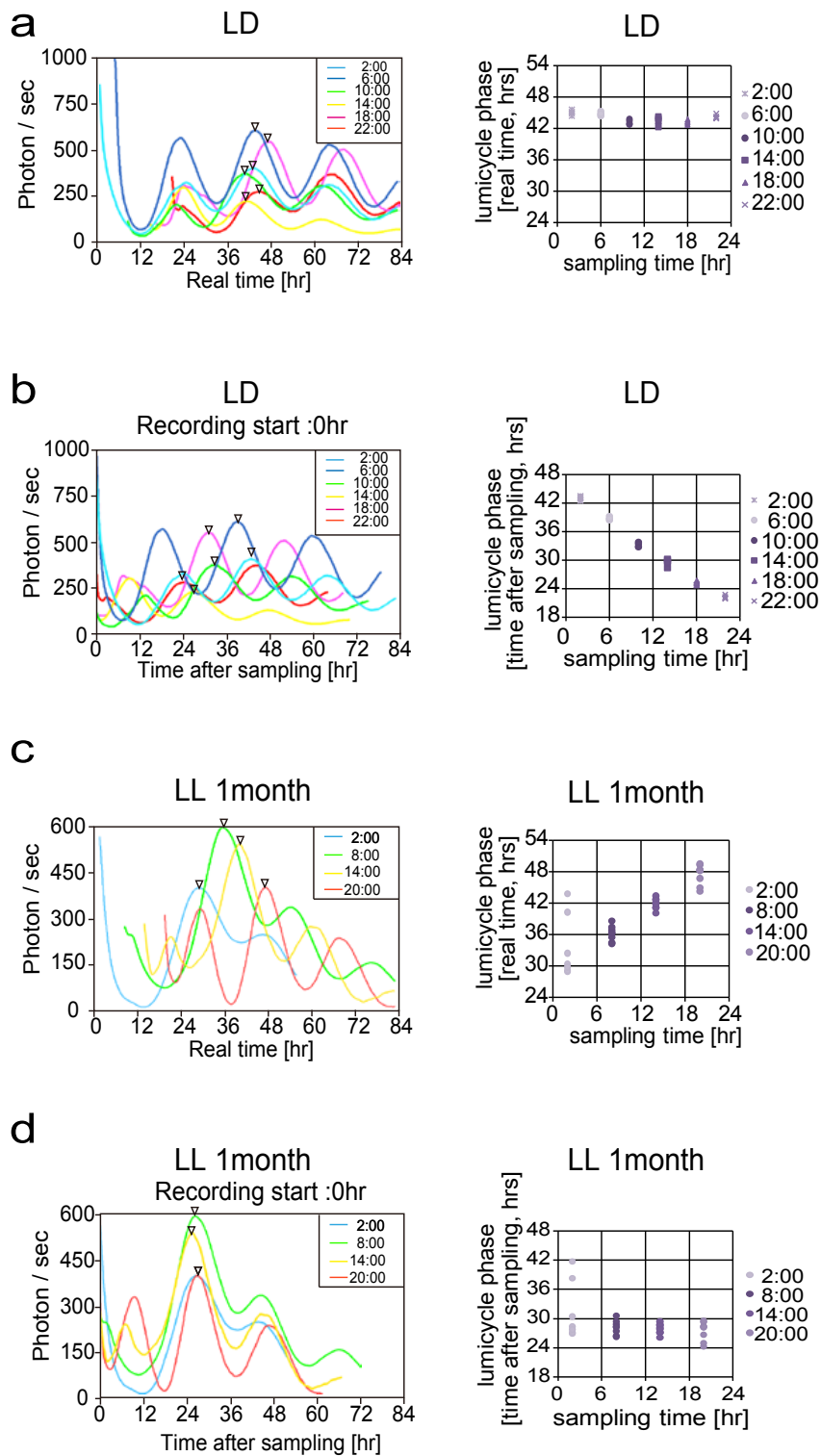


図 9 明暗 (LD) または恒明 (LL) 条件飼育マウスにおける肝臓組織培養後の時計リセット効果

a、b: LD 飼育マウス、c、d: LL 飼育マウス。左側にそれぞれの群の代表例の

PER2::LUC 発光リズムの波形を、右側に臓器採取時刻と peak 時刻の相関図を示した。

a、c は実時刻を横軸に、b、d は測定開始からの経過時間を横軸に表した。LD 群は 2, 6, 10, 14, 18, 22 時に肝臓を採取した。LL 群は 2, 8, 14, 20 時に肝臓を採取した。発光リズムの波形には白三角でそれぞれの peak 位相に印を付けた。

2. 実験材料及び方法

実験動物

PER2::LUC マウス (Dr. Joseph Takahashi, University of Texas Southwestern Medical Center より頂いた C57BL/6J 系統) は、ICR マウス (東京実験動物) と 5 回以上交配して、白毛の mixed background マウスを作製し PER2:LUC transgene の Homozygous を使用した。黒毛は発光を吸収し *in vivo imaging* には適していなかったため、白毛マウスにした。ジェノタイプは PCR により先行論文に添って行った (Yoo et al., 2004)。PER2::LUC マウスは 8-15 週齢を用いて実験した。*Bmal1-ELuc* マウス (産総研、中島先生より頂いた、Noguchi et al., 2010; Nakajima et al., 2010) は約 1 年齢のメスを用いて実験を行った。マウスは 23 ± 1 度の室温で、かつケージ内が 23 ± 0.5 度になるように調節できる小動物飼育用チャンバー (LP-80CCFL-6CTAR, 日本医科機械製作所) で飼育した。光環境は、明期 : 暗期 = 12 時間 : 12 時間 (午前 8 時から午後 20 時までが明期) で、光強度は 100-150 lux で飼育した。実験は自由飲水下で行い、餌は実験動物用飼料 (MF、オリエンタル酵母 株式会社) を用い、実験スケジュール開始までは自由摂食させた。実験動物の取り扱いは早稲田大学・先進理工学研究科の実験動物倫理委員会の許可 (#2011-A104, 2011-A049) に基づいて行った。

光環境

SCN 破壊実験では、偽破壊 (sham) 群、SCNx 群のマウスを ZT 12 より恒暗条件に移した。制限給餌を行った実験では、SCN 破壊オペ 5 日後の ZT 12 より、制限給餌開始と共に恒暗条件に移した。

行動リズム測定

自発活動量は温度感知性の赤外線センサー（F5B, オムロン）を用いた。行動データ（actogram）は6分間隔でカウント数を統合してダブルプロット・アクトグラムとして示した。行動リズムの解析はCLOCKLAB software（Actimetrics）内にある χ^2 乗検定を行い、 $p = 0.01$ を閾値として設定した。行動周期の計算は、行動 onset 時刻を実験開始日と終了日で比較することで算出した。

PER2::LUC 発光リズム測定

生体内の発光測定は *in vivo* imaging system（IVIS kinetics; Caliper Life Sciences）を用いた。測定の流れは図 11a に示した。麻酔はイソフルラン（Mylan Inc.）、濃縮酸素供給装置（SO-005B; Sanyo Electronic Industries Co., Ltd）、吸入麻酔装置（XGI-8; Caliper Life Science）を用いて、暗箱の中で行った。その後マウスを imaging 装置内に移し、発光基質であるルシフェリン（D-luciferin potassium salt、Promega, 15 mg/kg; 30 mg/1 ml in PBS, 0.05 ml/ 10 g body weight）をマウスの背中に皮下投与した。luciferin 投与後 6 分、8 分の時点で背側を、10 分、12 分で腹側を撮影した。撮影は白黒写真を撮影したのち、発光測定は 1 分間露光した。測定結果は 8 分と 10 分のものを使用し、6 分、12 分のデータは予備データとした。12 分の撮影終了後、直ちにマウスを吸入麻酔器から外し、飼育ケージに戻した。マウスは飼育ケージに戻されて 1, 2 分ほどで覚醒した。実際の麻酔時間は 1 回あたり 20 分程度であった。この作業を、通常の LD 環境下では ZT 11, 15, 19, 23, 3, 7 に、恒暗条件下では 19:00, 23:00, 3:00, 7:00, 11:00, 15:00 に連続して行う事で、PER2 の発光リズムを測定した。luciferin 投与方法の検討実験（図 13a-c）は、腹腔内投与（15 mg/kg; 30 mg/10 ml, 0.05 ml/10 g body weight）、またはポンプを用いた連続投与（ALZET mini-osmotic pump, model 2002, Durect Corp.; 0.1 M luciferin, 0.5 μ l/h 14 days）により行った。ポンプは麻酔下で背中の皮下に挿入し、オペ後 5 日目に発光リズムを測定した。

PER2::LUC 発光リズムデータ解析

撮影した発光データは、Living Image 3.2 software (Caliper Life Sciences) によりそれぞれの臓器から出た photon 数を解析した。それぞれの組織は図 10a に示す ROI (region of interest) で囲み、それぞれの ROI 内から検出した photon 数を photon/sec として解析に使用した。また、全ての実験結果において、ROI の大きさをそれぞれの組織で統一した。腎臓の発光値は左右の腎臓の発光値の合計を使用した。Raw data として photon/sec の値を使用し、relative activity として一日の発光値の平均を 100% として比較した相対値を解析に使用した。発光リズムの位相と振幅はコサイナー法により決定した (Acro.exe, by Dr. Refinetti)。解析時の周期設定は 24 時間に固定して行い、リズム性の有無の指標としてソフトが算出してくる goodness of fit 値 (コサインカーブに fit しているかの指標) を使用した (Refinetti et al., 2007)。

SCN 破壊

ミダゾラム/キシラジンで麻酔したマウスを、小動物固定台 (Narishige Co.) を用いて頭蓋骨を固定した上で、SCN を電極により熱破壊した。電極 (直径 0.35 mm) は、ブレグマから前側に 0.5 mm、左右それぞれ 0.2 mm、深さ 5.8 mm の位置に挿入し、55 度 7 秒で左右の SCN をそれぞれ破壊した (RFG-4A, Muromachi)。偽破壊群 (sham 群) は、頭蓋骨を開くところまで手術を行い、電極は挿入しなかった。全ての実験終了後、脳を取り出し 4% パラホルムアルデヒドに 3-4 日間漬け、60 μ m の厚さでスライスを作製し、ニッスル染色により細胞核を可視化し顕微鏡で撮影した (BX51, Olympus)。破壊の確認により、SCN が明らかに残っていた個体は解析から外した (38 匹中 13 匹)。

制限給餌

図 19, 20 では、2 週間、恒暗条件下にて 20 時から 8 時まで、または 8 時から 20 時までの 12 時間のみ給餌を与えた。制限給餌実験は、自動給餌装置（夏目製作所に依頼して作製）により給餌時間を制御した。

図 21-23 では、1 pellet 45 mg の粒状餌を使用する専用の給餌装置（Pellet Dispenser 45 MG, Med-associates）を用いて食餌量と食餌時刻を制御した。20 %の食餌制限群は 1 日あたり 3.24 g（72 pellets）を、25 %の食餌制限群は 2.7 g（60 pellets）を、40 %の食餌制限群は 2.43 g（54 pellets）を給餌した。また、図 21 で行った 1 日 6 食給餌する実験では、実験開始一週間後、マウスはそれぞれの時刻で、給餌後 3 分以内に食餌を完食していることをビデオ撮影により確認した。また、10 %の食餌制限では食べ残すマウスがいたため、実験は 20 %以上の食餌制限で行った。また、その際の食餌時刻は ZT 0, 4, 8, 12, 16, 20 にし、食餌量はそれぞれの時刻で等量に分割して与えた。図 22-23 では、全ての実験群で一日あたり 3.24 g の食事量（20 %の食餌制限）に統一して実験を行った。図 21-23 の全ての実験は、食餌パターンの制御開始 2 週間後に発光リズムを測定した。

体温測定

自動記録式のタブレット型温度センサ（3650, Hioki）を麻酔下にて腹腔内に挿入した。測定は手術 1 週間後から 3 分間隔で 5 日間測定した。直腸温はスティック型の温度計により直接肛門に挿入し測定した（TD-300, Shibaura Electronics Co., Ltd.）。

ルシフェラーゼアッセイを用いた PER2 タンパク量測定法

第二章の実験方法と同じ。

肝臓組織培養による発光リズム測定

第二章の実験方法と同じ。

血中 luciferin 量の測定

血中 luciferin 量は、ルシフェリン・ルシフェラーゼアッセイにより間接的に測定した。イソフルラン麻酔下でノーマルな ICR マウスに luciferin を皮下投与（15 mg/kg）し、*in vivo* imaging 装置内にマウスを静置。ZT 7, 19 共に luciferin 投与 10, 20, 30, 60, 120 分後に、ヘパリン入りチューブに血液を採取し、すぐに遠心し（2000 xg, 5 min）、上清を採取した。10 ul の血漿に 100 ul の ATP-Mg²⁺ buffer（0.5 mM for ATP, 1.3 mM Mg²⁺）と 100 ul のリコンビナント・ルシフェラーゼ（0.5 µg/ml, Wako）を混ぜ、すぐにルミノメーターで発光を測定した（GloMAX 96, Promega）。10 nM から 100 µM の luciferin で検量線を作製した結果、R² 値は 0.99 であった（data not shown）。

統計

全てのデータは平均値 + 標準誤差または ± 標準誤差で表した。統計解析は、StatView（version 5.0, SAS Institute）により、1-way, 2-way repeated measures ANOVA を用いて行った。または Paired/unpaired Student's *t*-test を用いて行った。多重検定は 2-way ANOVA により検定を行った後 Fisher's PLSD test で群間比較した。表 4 では、two proportions Fisher's exact test（Java Script star ver.5.5.7j）の片側検定で統計した。

3. 結果

3.1. 末梢時計測定法の確立

末梢組織の PER2::LUC リズム測定

PER2::LUC マウスに luciferin を皮下投与し、腹側、背側の発光をそれぞれ撮影した結果、腎臓 (Kidney)、肝臓 (Liver)、顎下腺 (Submandibular gland, 図では Sub Gla と表記) のみ、発光している組織として外部から確認する事が出来た。また、これらの発光は摘出または血管の結紮により消失した事から、発光がこれらの臓器から出てきているものと判断した (図 10a)。luciferin 投与後の発光は、ZT 7, 19 どちらの時刻においても、それぞれの組織で、luciferin 投与後 5-12 分後付近に最大となった (図 10b)。また、その発光は 2 時間後には消失した。よって、それぞれの時刻で luciferin 投与後、8 分後に腎臓を、10 分後に肝臓、顎下腺を撮影することにした (図 11a)。発光リズムを測定した結果、ZT 19 に最大発光値、ZT 7 に最小発光値を示す日内リズムが得られた (図 11b)。3 匹の発光リズムの photon/sec と相対値をグラフにして図 11c, d に示した。相対値は一日の平均発光値を 100%として補正した。3 匹の発光リズムはそれぞれの組織において、個体差が少なく、また相対値で表すことでより個体差が減少した。また、通常の LD 環境で 1 ヶ月飼育した後で、同じマウスの発光リズムを測定しても、1 ヶ月前と同様の発光データが得られた (図 11e)。よってこれらの結果より、*in vivo imaging* システムを用いた発光リズム測定法は、個体差が少なく、安定、かつ何度も同じマウスから測定出来る方法である事がわかった。

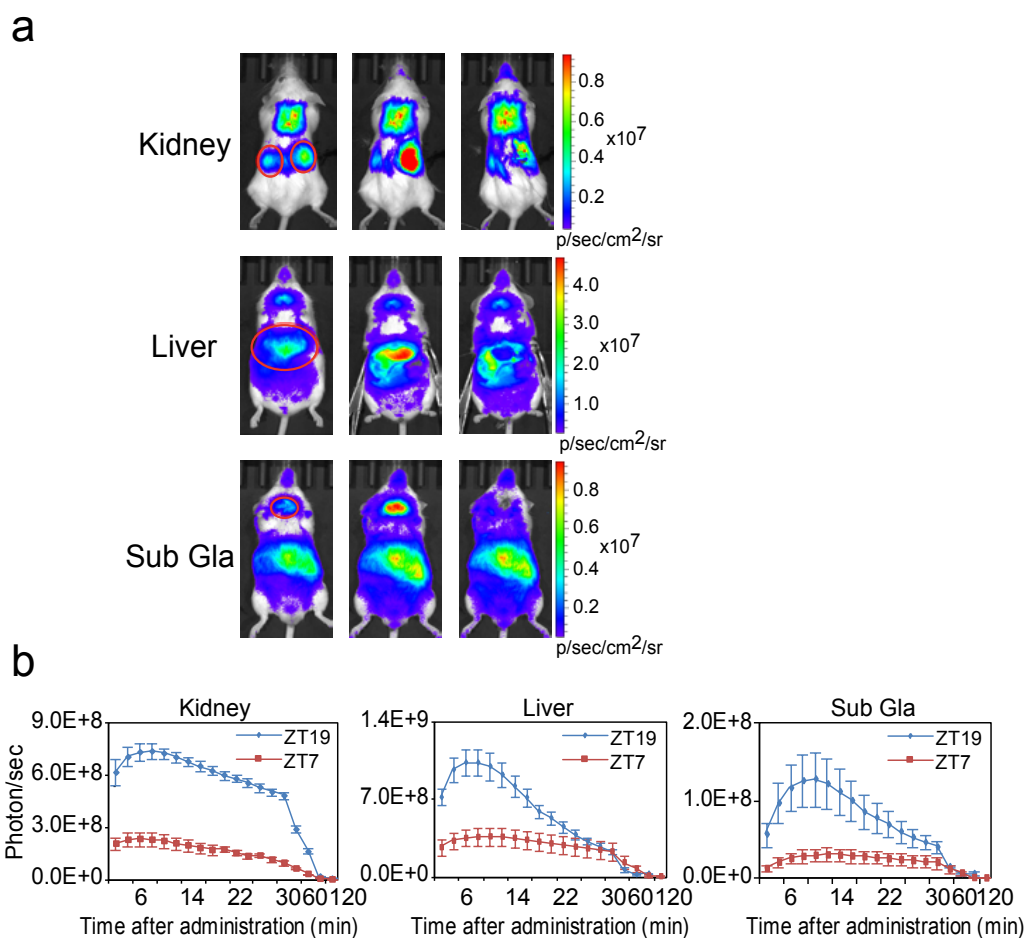


図 10 発光臓器の確認と発光値の時間経過

a、左は通常の発光撮影写真、真ん中は開腹後の発光撮影写真、右は腎臓・肝臓の結紮後、顎下腺の切除後の発光撮影写真。腎臓は片側を、肝臓は一番大きい葉を結紮した。b、それぞれの組織の発光値の推移。ZT 7 と ZT 19 における発光値を示した。各群 $n = 3$ 。

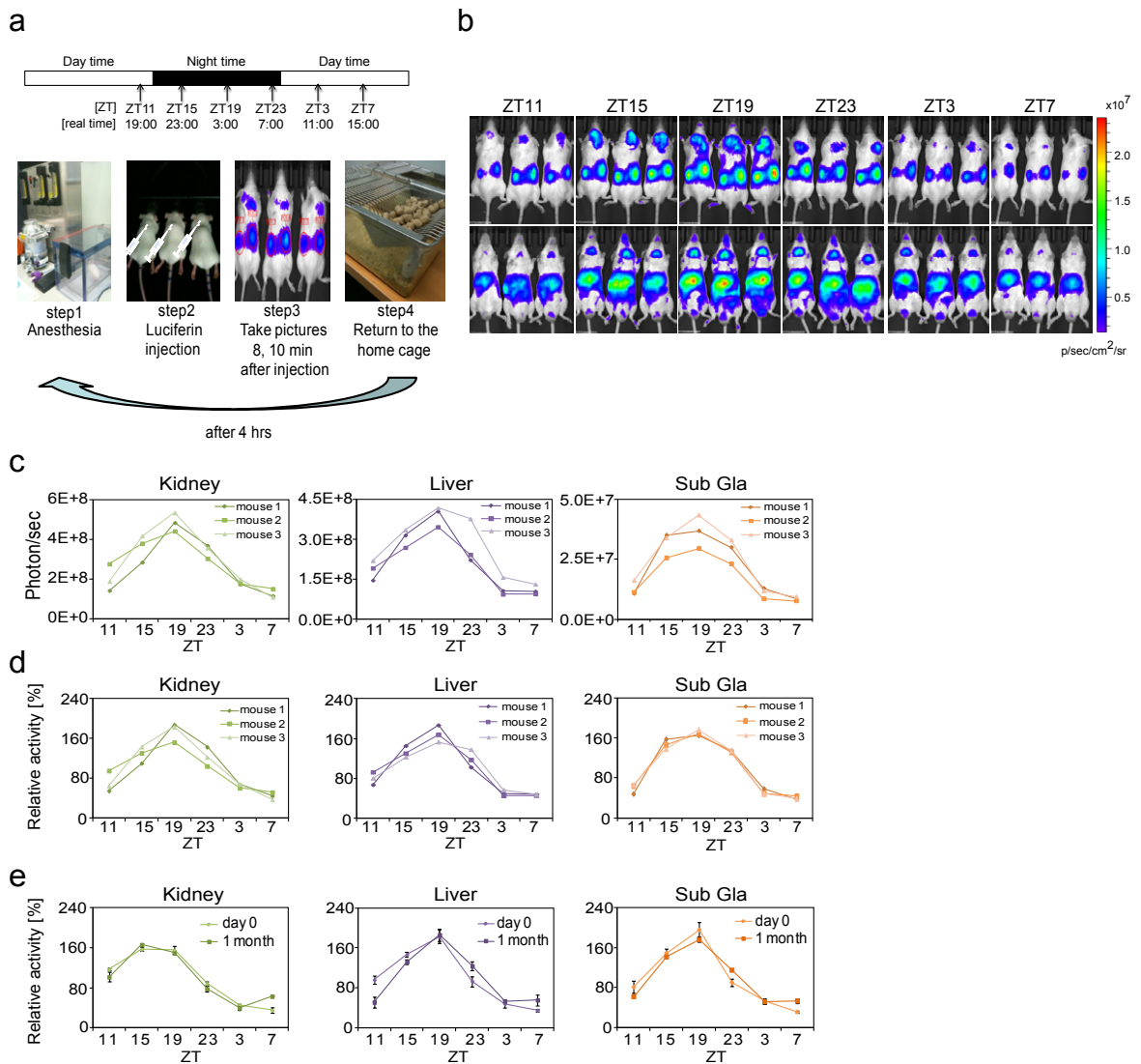


図 11 PER2::LUC マウスにおける末梢組織発光リズム

a、発光リズム測定方法の概略図 b、発光リズム測定結果。三匹同時に撮影した。

上部に腎臓を、下部に顎下腺と肝臓を示した。c、三匹それぞれの発光リズムを発光

値で示した。d、一日の発光値の平均を 100%として、相対的に発光リズムを示した。

e、同一個体で一ヶ月通常飼育後に、もう一度発光リズムを測定した結果。n = 3。

発光リズム測定法確立のための予備実験

図 11 より測定方法の有用性は示せたが、発光リズムを調べる上で日内変動を持つ生理的因子が影響を及ぼさないか検討した。特に体温の日内変動が発光値の温度依存性に及ぼす影響、または血圧の日内変動が luciferin の臓器への到達時間に及ぼす影響などは考慮すべき問題であった。生物発光には温度依存性がある事が知られている。そこで発光リズム測定中の体温を、腹腔内に挿入した小型センサを用いて調べた結果、昼夜関わらず撮影中は麻酔により体温が下がる事が分かった (図 12a)。また、その下がり方には日内変動が存在し、一日で約 1.5 度異なる事が分かった。そこで体温が最も低い ZT 7 において、ホッカイロによるマウスの体温上昇が腎臓の発光値に及ぼす影響を調べたが、発光値にはほとんど影響はなかった (図 12b)。次に、皮下投与後の luciferin の血中濃度を、ルシフェラーゼアッセイにより間接的に調べた。結果、ZT 7 と ZT 19 で血中 luciferin 濃度に差は無く、120 分後にはほぼゼロに近くなった (図 12c)。次に、luciferin の投与方法の検討を行った。皮下投与、腹腔内投与、ポンプを用いた連続的な投与を比較してみたが、どの測定方法でも発光リズムの測定に成功し、ZT 19 付近にピークが見られた (図 13a-c)。ポンプは挿入手術が必要で手間がかかる事、腹腔内投与に比べて皮下投与は安定かつ投与部位を肝臓や腎臓から遠ざけられる事、などの理由から実際の実験は全て皮下投与により行った。また、組織破碎液によるルシフェラーゼアッセイでも、皮下投与で得られた発光リズムと似た結果が得られた (図 13d)。得られた発光リズムは、LUCIFERASE に分解配列が付いていない事、肝臓のウエスタンブロットによる PER2 タンパク質のリズムと同じ位相である事から、PER2 タンパク質のリズムを見ていると考えられる。一方、個体別の体重と一日の平均発光値をそれぞれの組織で比較してみたが、同じ体重でも発光値の個体差が大きく、体重との相関が見られなかった (図 14a)。逆に、同じ個体で luciferin 投与量を変えた結果、平均発光値は luciferin

量に依存して変化したが、発光のリズムに変化は見られなかった（図 14b, c）。よって、発光リズムは luciferin 量に依存せず安定的に測定できることが分かったが、発光値による発現量の比較は難しい事が分かった。また、肝臓の発光リズムにおいて、ROI の大きさを小さくして解析してみたが、相対的なリズムには変化は見られなかった（図 14d）。さらに、ZT 23 から発光リズムの測定を開始した結果でも、ZT 19 付近にピークが来たことから、測定開始時刻は発光リズムに影響しない事も分かった（図 14e）。これらの結果は、今後この測定法をより活用していくために、とても重要な参考データになると考えられた。

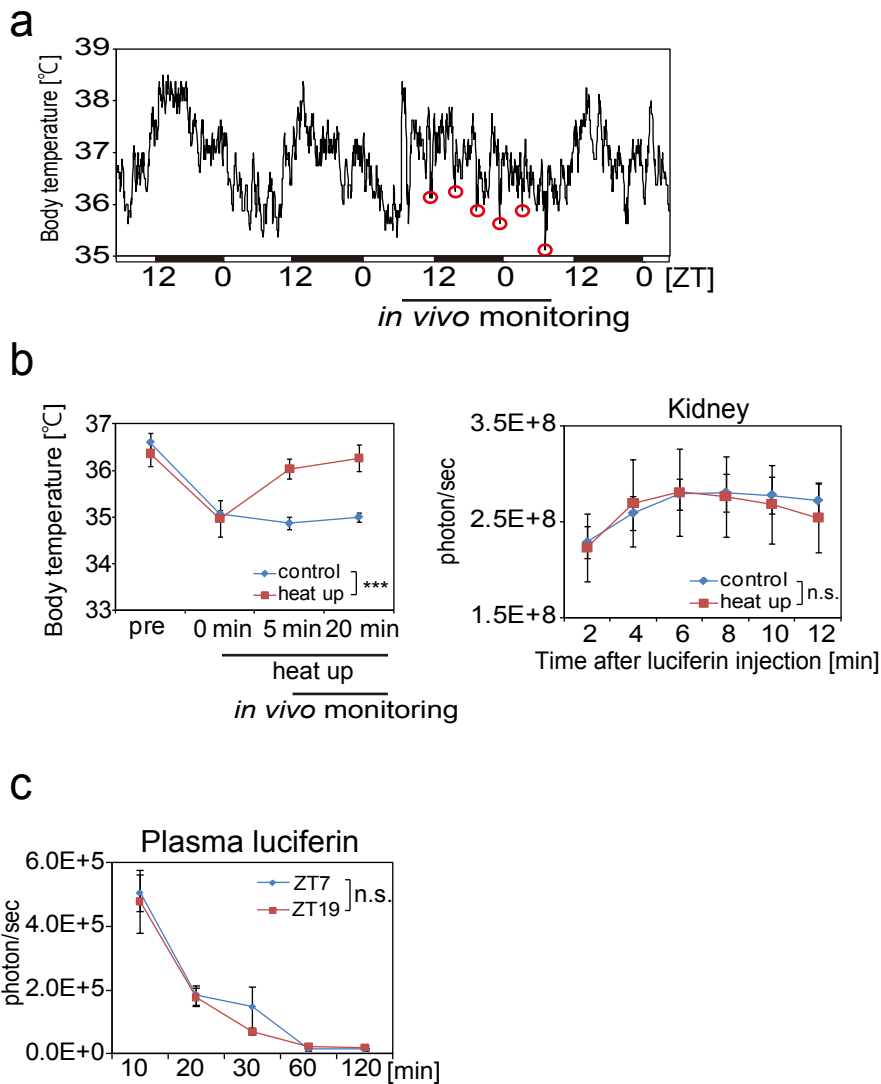


図 12 発光リズム測定における体温と血中 luciferin 濃度の影響

a、発光リズム測定中のマウスの深部体温。二日間の通常飼育後、赤い丸で示した時刻に発光測定を行った。b、ホッカイロによるマウス体温上昇が腎臓の発光値に与える影響。左は実験中の直腸温、右は腎臓の発光値。0 min からホッカイロをマウスの下に敷き、5 min に luciferin を皮下投与した。同一個体で体温上昇の影響を調べた。n = 3。***p < 0.001 for temperature changes between heated and non-heated 群、p > 0.05 for bioluminescence data by 2-way repeated-measures ANOVA。 c、luciferin 投与後の ICR マウスを用いたルシフェリン・ルシフェラーゼアッセイによる血中 luciferin 量測定。各群、10 min のデータのみ n = 7、他は n = 3。p > 0.05 by 2-way ANOVA。

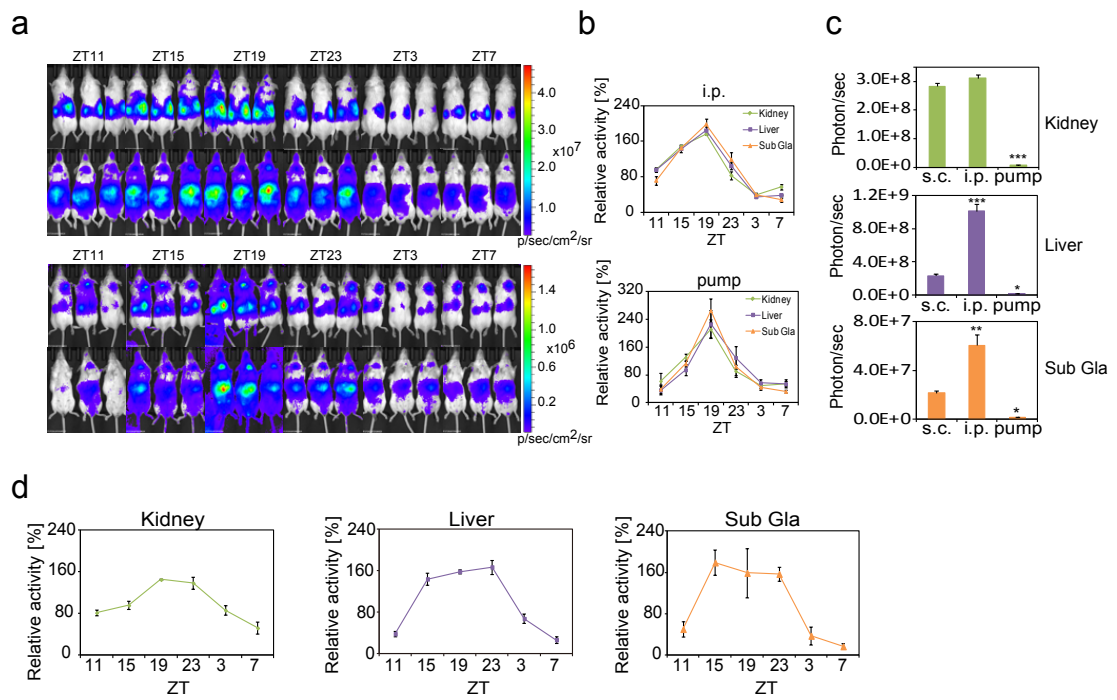


図 13 luciferin 投与方法の検討

a、luciferin の腹腔内投与（上部、i.p.）と皮下ポンプ挿入による連続投与（下部、pump）で測定した発光リズム写真。b、それらの発光リズム相対値。c、皮下投与（s.c.）、i.p.、pump の発光平均値の比較。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. s.c. by Fisher's PLSD test。d、PER2::LUC マウスの臓器を用いた *ex vivo* ルシフェラーゼアッセイ。発光値の平均値を 100% に補正。各時刻で $n = 3$ 。

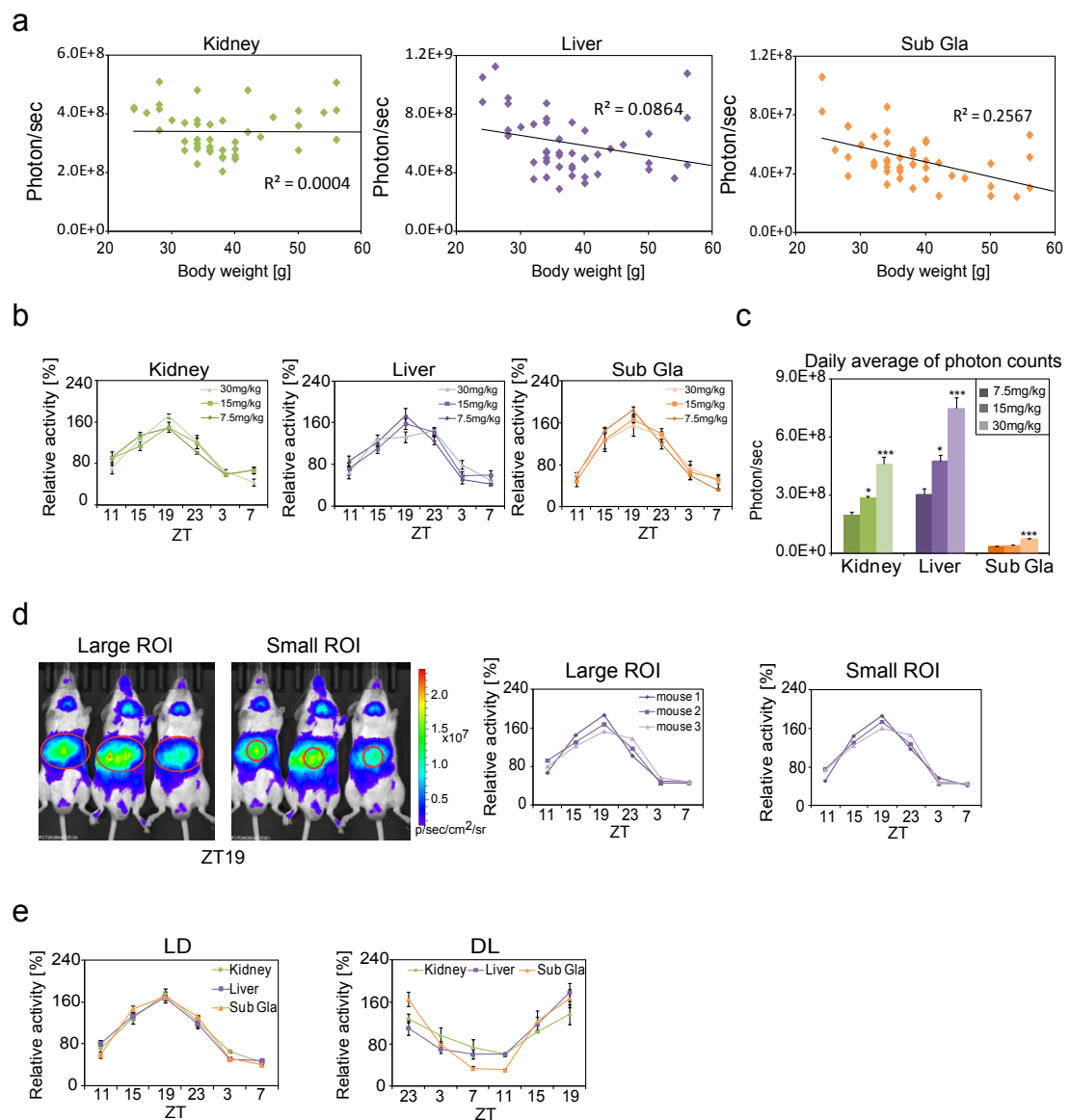


図 14 その他の予備実験結果

a、体重と平均発光値の相関図。回帰直線と R^2 値もグラフ内に記した。b、c、
luciferin 量の比較。同一個体 ($n = 3$) で luciferin 投与量を 7.5 mg/kg, 15 mg/kg, 30
mg/kg に変えて発光リズムを測定した。相対的な発光リズムを b に、平均発光値を
c に示した。* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs. 7.5 mg/kg by Fisher's PLSD test。d、肝臓にお
ける ROI (測定範囲) の比較。通常 (Large ROI) と小さい ROI (Small ROI) を用い

て同じ発光データで解析した。e、測定開始時刻の検討。左に図 11d のデータを、右に測定開始時刻を ZT 23 にしたデータを示した。各群 $n = 3$ 。

***Bmal1-ELuc* マウスの末梢組織発光リズム測定**

次に *Bmal1-ELuc* マウスを用いて発光リズムを測定することで、*PER2::LUC* マウスと逆位相に発光リズムのピークが来るかどうか検証した。このマウスは黒毛だったため、測定部位を除毛してから撮影した。結果、*PER2::LUC* マウスと同じく綺麗な発光リズムが得られ、発光のピーク時刻は腎臓で $ZT 2.4 \pm 0.3$ 、肝臓で $ZT 3.1 \pm 0.3$ 、顎下腺で $ZT 3.6 \pm 1.2$ であった（図 15）。これは *PER2::LUC* マウスで見られた $ZT 19$ 付近のピークとは逆の位相であり、他の文献と比較しても *Bmal1* の発現リズムと似た位相であった。よって、これらの結果はこの測定法の妥当性をさらに裏付けするデータとなった。

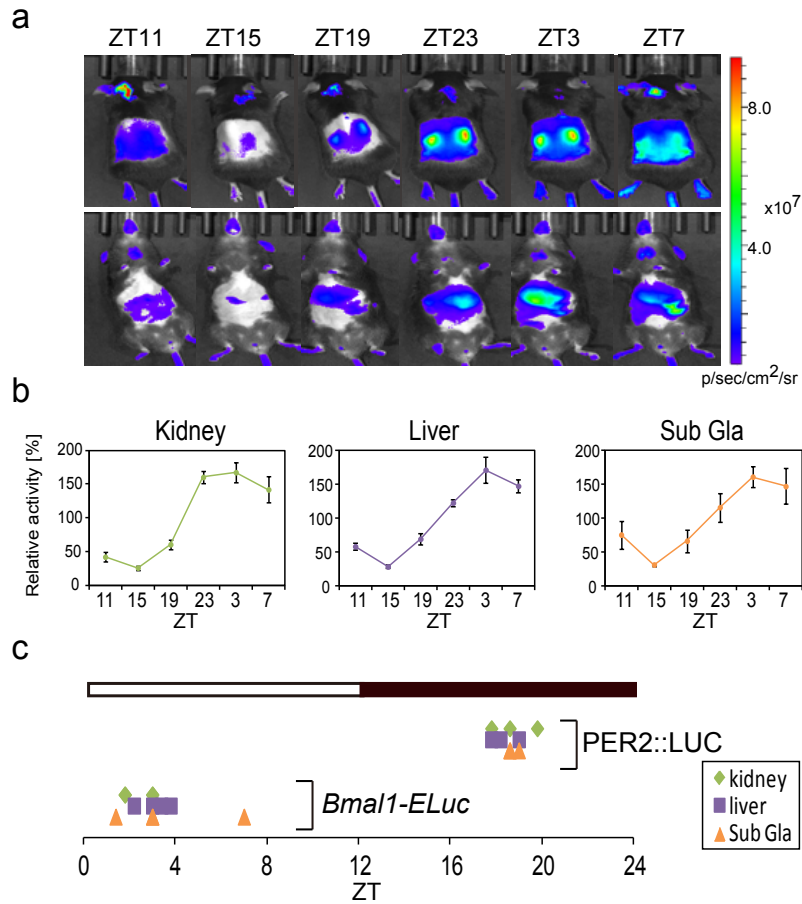


図 15 *Bmal1-ELuc* マウスの末梢組織発光リズム

a、発光リズム測定結果。上部に腎臓を、下部に顎下腺と肝臓を示した。マウスは事前に発光測定部位付近を除毛し使用した。b、発光リズム解析結果。一日の発光平均値を 100%にして補正。c、PER2::LUC マウス (n = 3)、*BMAL1-ELuc* マウス (n = 4) の末梢時計の位相比較。それぞれの個体のデータを示した。

3.2. SCN 破壊マウスの末梢時計解析

SCNx マウスの末梢時計

この発光リズム測定法を用いて、SCNx マウスの末梢組織の時計を調べた。SCN は麻酔下で電極を用いて熱破壊を行い、コントロールとして sham 群も作製した (図 16a)。破壊手術後はその日のうちに恒暗条件に移し、行動測定を行いながら一ヶ月間飼育した。Sham 群の行動はリズムを維持したままフリーランしたが、SCNx 群の行動リズムは消失した (χ 二乗検定により、図 16b)。手術 1 ヶ月後に末梢組織の発光リズムを *in vivo imaging* により測定した。測定結果の代表例を図 16c に示した。発光リズムは相対値として示し、コサイナー法により振幅、ピーク時刻、リズム性を評価した。リズム性は *goodness of fit* 値を指標とし、図 17a にそれぞれの個体の振幅・*goodness of fit* 値の相関図を示した。通常飼育マウスの発光リズムは、全ての個体で、*goodness of fit* 値が 0.1 以下、かつ振幅が肝臓、顎下腺で 50 %以上、腎臓で 40 %以上だったため、その値をリズム性の有無、振幅の低下の基準値にした。Sham 群の発光リズムはほぼ全てのマウス、臓器で、これらの基準を達成した。しかし、#28 以外の SCNx マウスでは、振幅がほぼ全ての個体、臓器で基準値を下回っていた (表 4、図 17b)。一方、*goodness of fit* 値は、半分の SCNx マウスの臓器でリズム性を持っていた (表 4)。SCNx マウスの臓器で、*goodness of fit* 値が 0.1 を下回ったもの (リズム性有り)、上回ったもの (リズム性無し) で分けて、発光リズムの平均値をグラフにした結果、sham 群の全ての臓器と、SCNx 群で 0.1 を下回った群の腎臓と顎下腺において、有意なリズム性 ($p < 0.05$, 1-way ANOVA) を検出できた (図 17c)。しかし、リズム性無しの SCNx 群では全ての臓器で 1-way ANOVA による有意なリズム性は検出されなかった。さらに、破壊部位と末梢時計のリズム性について検討を行ったが、相関は得られなかった (data not shown)。

発光リズムの peak 時刻は、sham 群と、goodness of fit 値でリズム性有り と判断した SCNx 群の間で、差は見られなかったが、SCNx 群の方が標準誤差は大きかった (図 18a)。それぞれの peak 時刻は、sham 群、SCNx 群の順に、腎臓で 15.3 ± 0.5 hr, 14.8 ± 0.6 hr、肝臓で 15.5 ± 0.5 hr, 16.4 ± 1.7 hr、顎下腺で 15.8 ± 0.8 hr, 15.6 ± 1.5 hr であった。また、goodness of fit 値でリズム性無し、と判断した SCN 破壊群の組織の peak 時刻を、図 18a 中に×で記した結果、リズム性有りの臓器と比べ、もっと幅広く分布していた。それぞれの個体の行動リズムと、末梢時計のリズム性の有無についても相関が無いか調べたが、特に相関は見られなかった (data not shown)。また、発光リズムの測定による行動リズムへの影響も特に見られなかったことから、測定による体内時計のリセット効果はほぼ無いと考えた (図 18b)。

Ex vivo のルシフェラーゼアッセイにおけるリセット効果を検討するため、SCNx マウスでリズム性が残っていた #28 の肝臓と、リズム性が無くなっていた #33 の肝臓を採取し、組織培養による発光リズムの測定を行った。結果、どちらの肝臓からも綺麗な発光リズムが得られたことから、SCNx マウスの肝臓では組織培養に移す際に、時計がリセットされてしまった事が分かった (図 18c)。これらの実験より、SCNx マウスの末梢時計は振幅が低下していたが、それでもまだリズム性を維持していた個体があった事、また組織培養によるリセット効果が起こっていた事が分かった。

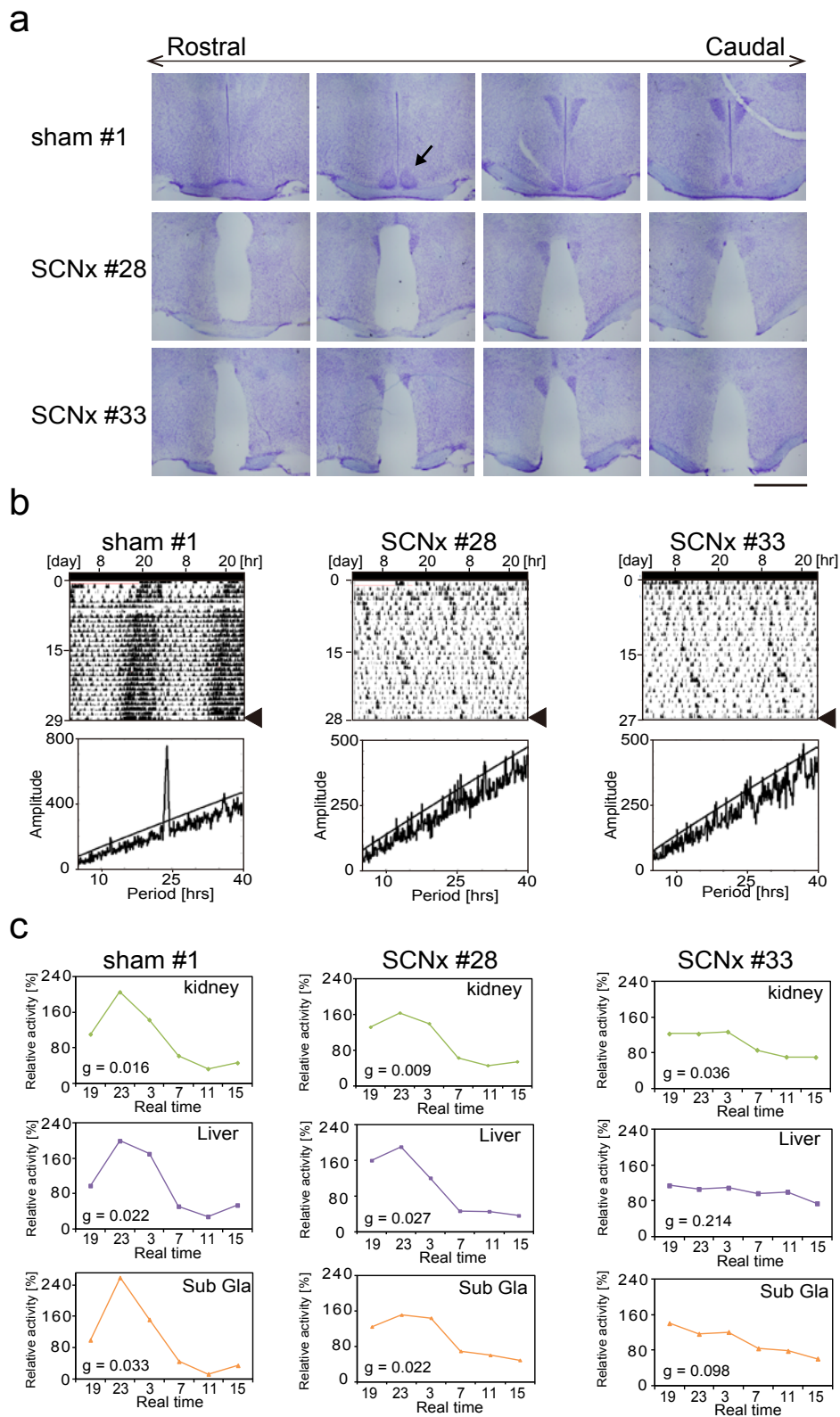


図 16 SCNx マウスの確認と末梢組織発光リズム

a、Sham マウス、SCNx マウスの脳切片画像代表例。スライス厚は 60 μ m で作成し、ニッスル染色を行った。右下の黒いバーは 1 mm を示す。矢印で SCN の位置を示し

た。b、Sham マウス、SCNx マウスの行動データとカイ二乗検定結果。マウスは手術後すぐに恒暗条件で一ヶ月間飼育した。黒い三角は発光リズムを測定した日を示す。

c、sham マウス、SCNx マウスの発光リズム測定データ。左下に goodness of fit 値 (g) を記した。

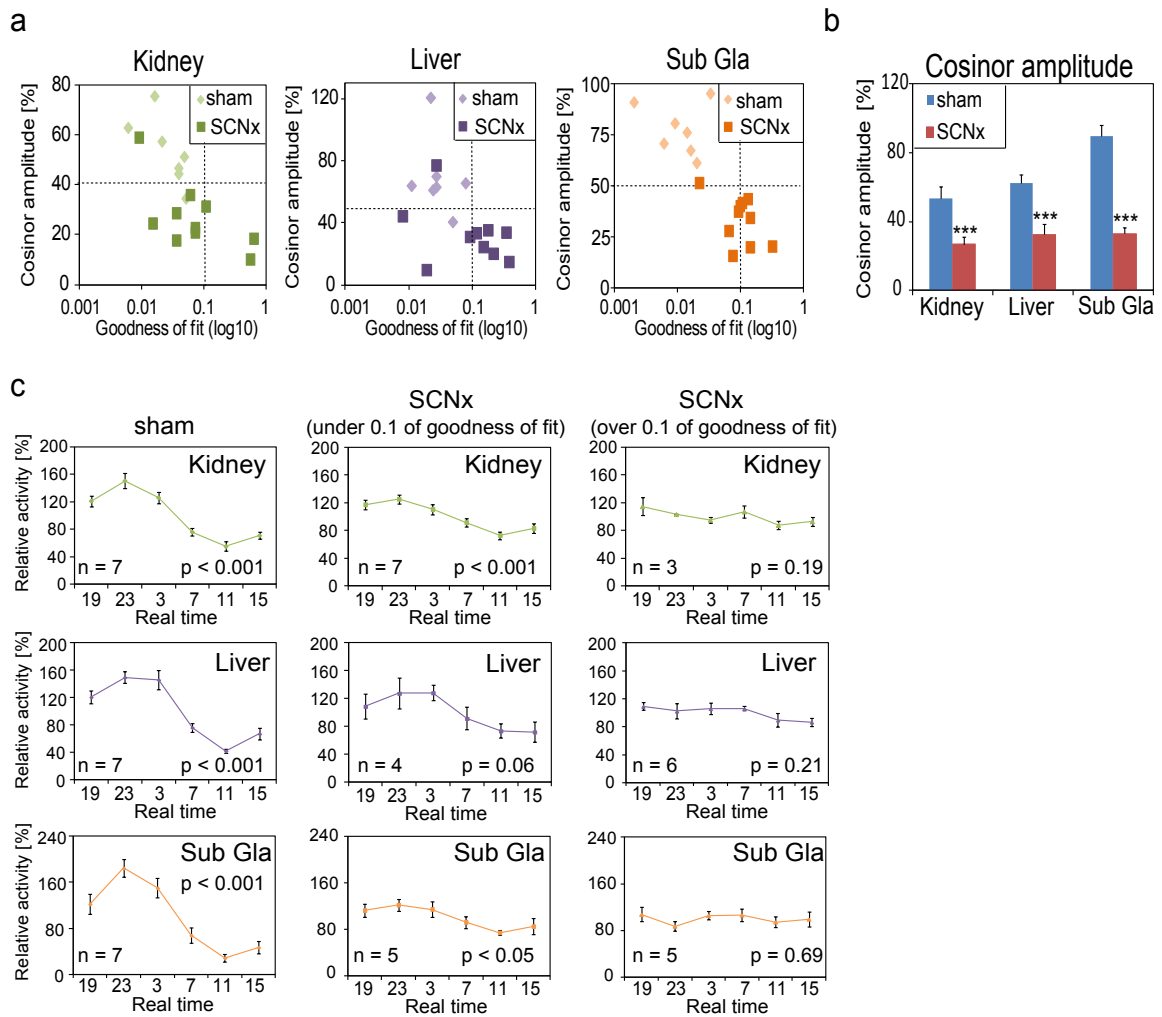


図 17 SCNx マウス発光リズムの振幅とリズム性

a、sham マウス (n = 7)、SCNx マウス (n = 10) の振幅と goodness of fit 値の相関図。個体ごとにプロットした。腎臓は 40%、肝臓・顎下腺は 50% を振幅の基準線に、goodness of fit 値 0.1 をリズム性有り無しの基準線として破線で示した。b、振幅の比較。***p < 0.001 vs. sham by Student's t-test。c、発光リズムのグループ平均データ。SCNx マウスはそれぞれの臓器で、goodness of fit 値が 0.1 以上、または 0.1 以下で分けて解析した。それぞれのグラフ内、左下に臓器の n 数、右下に 1-way ANOVA によるリズム性の検定結果を示した。それぞれの結果は平均値 ± SEM で表した。

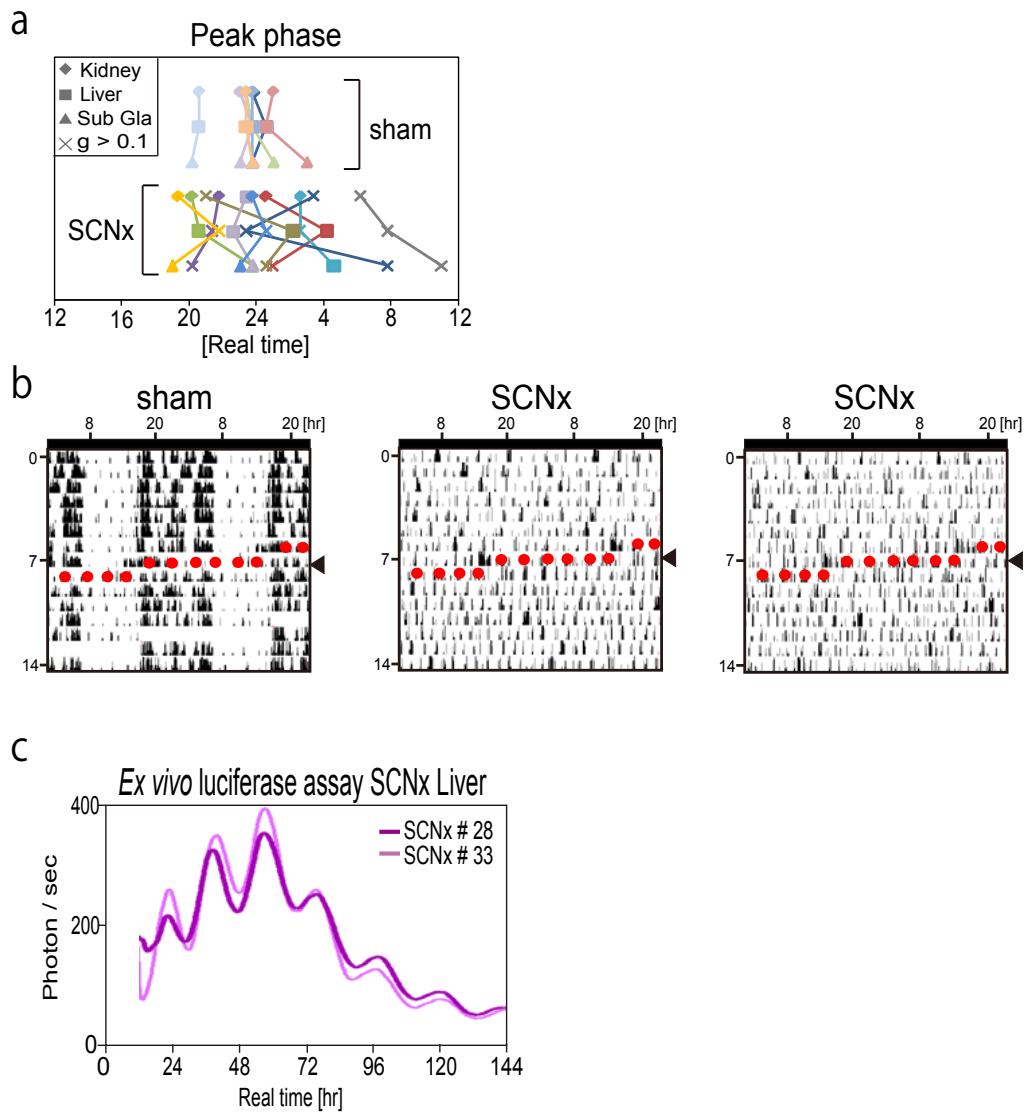


図 18 SCNx マウスの末梢組織発光リズムの位相、行動、肝臓組織培養

a、sham マウス (n = 7)、SCNx マウス (n = 10) の発光リズムの位相。それぞれの臓器を違う形で、同一個体の臓器を同じ色で、goodness of fit 値が 0.1 以上だった臓器を×で示した。b、発光リズム測定期間の前後一週間の行動データ。赤丸で示した位置で発光測定した。c、図 16 で示した代表例 SCNx #28、33 の肝臓の組織培養による発光リズム測定結果。

SCNx マウスの末梢時計のフリーラン周期

図 16-18 は、SCNx マウスの末梢時計は振幅が低下するものの、リズム性をしばらく維持しているという結果だった。そこで SCNx マウスを用いて、生体内における末梢時計のフリーラン周期を測定した。周期を調べる方法として、SCNx マウスに制限給餌実験を行い、末梢時計を同調させてから発光リズムを測定し、その後自由摂食に戻してから再度発光リズムを測定した。自由摂食に戻すことで末梢時計がフリーランすると考え、末梢時計の周期はそれぞれの発光リズムの peak 位相の差から算出した。12 時間の食餌制限は SCN 破壊マウスの末梢時計の振幅を sham 群と同程度まで回復させ、また食餌時間に依存した peak 位相を示した (図 19a-c)。食餌制限により行動リズムもリズム性を表したが、自由摂食に戻して 1-2 日後にはリズム性を消失した (カイ二乗検定、図 20a)。自由摂食に戻して 2 週間目に発光リズムを測定した結果、ほとんどの臓器で goodness of fit 値が 0.1 以下を示した (図 20b, c, 表 4)。しかし、振幅は有意に減弱していた (図 20d)。Peak 時刻は、それぞれの個体内で臓器間のばらつきが少なく、また RF 時の位相は個体差が少なかった (図 20e)。リズム性有りと判断した組織のみのデータで、FF と RF における Peak 時刻の差よりフリーラン周期を算出してみると、腎臓で 23.71 ± 0.06 hr (n = 8)、肝臓で 23.68 ± 0.04 hr (n = 6)、顎下腺で 23.70 ± 0.04 hr (n = 5)であった。臓器間で違いは見られなかった (1-way ANOVA.)。また、この末梢組織のフリーラン周期は、図 16b で見られた恒暗条件下での sham 群の行動フリーラン周期 (23.73 ± 0.03 hr, n = 7) ととても似ていた。しかし、肝臓の組織培養によるフリーラン周期 (20.7 ± 0.3 hr, n = 6) とは大きく異なっていた。

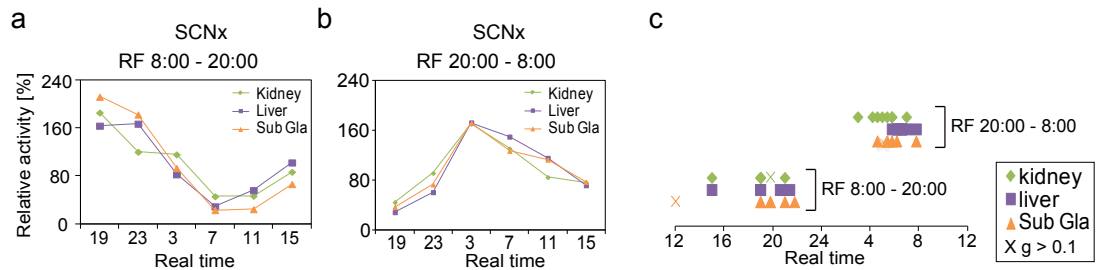


図 19 SCNx マウスにおける制限給餌 (RF) 同調

a、SCNx マウスに 8:00-20:00 の 12 時間のみに食餌を与え続け、2 週間後に発光リズムを測定した結果。b、SCNx マウスに 20:00-8:00 の 12 時間のみに食餌を与え続け、2 週間後に発光リズムを測定した結果。c、発光リズムの位相比較。Goodness of fit 値が 0.1 以上だった臓器を×で示した。

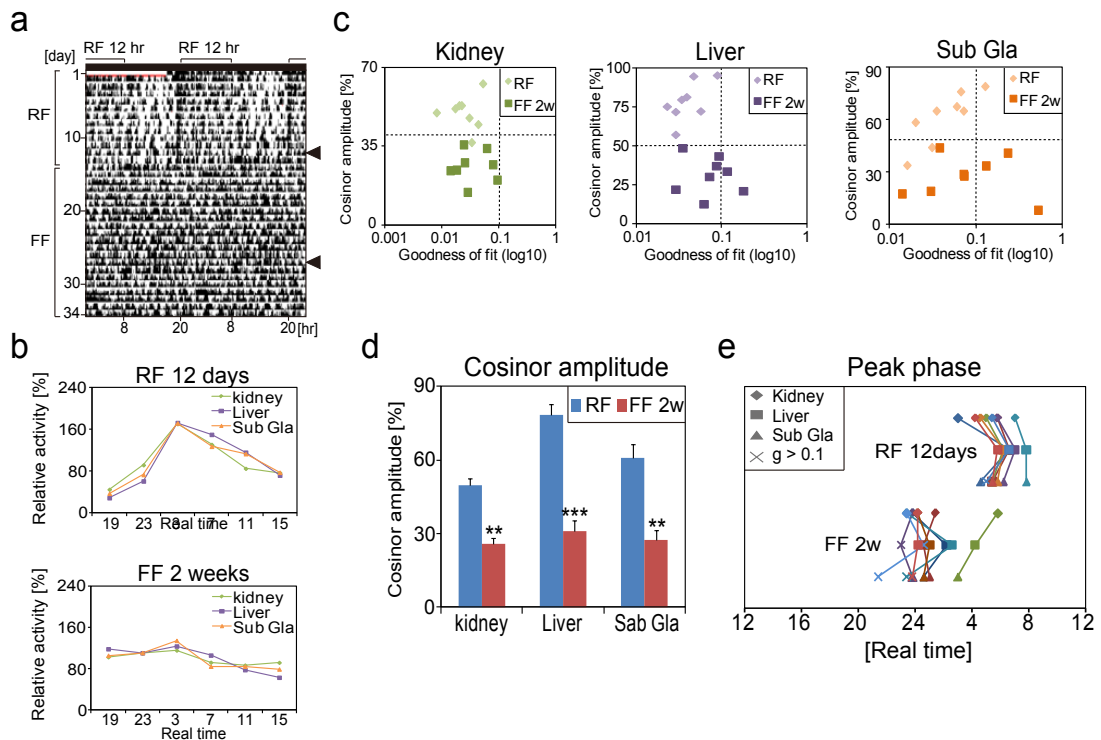


図 20 SCNx マウスの末梢時計のフリーラン周期

a、行動データの代表例。恒暗条件で、SCNx マウス (n = 8) を、制限給餌 (RF) 20:00-8:00 で 12 日間行い、その後自由摂食 (FF) に変え 3 週間飼育した。黒い三角は発光リズムを測定した日を示した。b、RF 12 日目と FF 2 週間目における発光リズムの代表例。c、RF と FF 2w における発光リズムの振幅と goodness of fit 値の相関図。個体ごとにプロットした。腎臓は 40%、肝臓・顎下腺は 50% を振幅の基準線に、goodness of fit 値 0.1 をリズム性有り無しの基準線として破線で示した。d、振幅の比較。それぞれの結果は平均値 \pm SEM で表した。** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. RF by Student's *t*-test。e、発光リズムの位相比較。それぞれの臓器を違う形で、同一個体の臓器を同じ色で、goodness of fit 値が 0.1 以上だった臓器を×で示した。

	Kidney				Liver				Sub Gla			
	Amplitude (>40%)		goodness of fit (<0.1)		Amplitude (>50%)		goodness of fit (<0.1)		Amplitude (>50%)		goodness of fit (<0.1)	
	hit / total	p value	hit / total	p value	hit / total	p value	hit / total	p value	hit / total	p value	hit / total	p value
sham	6/7		7/7		6/7		7/7		7/7		7/7	
SCNX	1/10	0.004**	7/10	0.176	1/10	0.003**	4/10	0.016*	1/10	<0.001***	5/10	0.040*
RF	7/8		8/8		8/8		8/8		6/8		7/8	
FF 2w	0/8	<0.001***	8/8	0.999	0/8	<0.001***	6/8	0.233	0/8	0.003**	5/8	0.284

表 4 SCNx 実験における振幅、goodness of fit 値の基準値を超えた臓器数の比較

振幅は腎臓で 40 %以上、肝臓・顎下腺で 50 %以上、goodness of fit 値は 0.1 以下になった臓器数を、（基準値をクリアした n 数 / 全体の n 数）で表した。また、two proportions Fisher's exact test で片側検定を行った。

3.3. 食餌パターンの変化による末梢時計同調

食餌量の制限による末梢時計同調

新しく確立した発光リズム測定法を利用して、食餌パターンと末梢時計の関係を *in vivo* で調べた。マウスの食パターンを制御するにあたり、全体の摂食量を制限する事で、それぞれの食餌時刻で餌を完食させる必要があった。そこでまず、食餌量の制限と末梢時計の関係を調べた。食餌時刻による同調効果の影響を排除するため、ヒトの体内時計研究によく用いられるコンスタント・ルーチン実験（等しい間隔で1日6食与える方法）を採用した。食餌量の制限は20%、25%、40%で行い、2週間後に末梢組織の発光リズムを測定した。結果、食事の制限度合いに依存して、末梢時計の位相が有意に前進する事が分かった（図21）。食餌制限による前進効果を最小限に抑えるため、その後の実験は20%の食餌制限で行った。

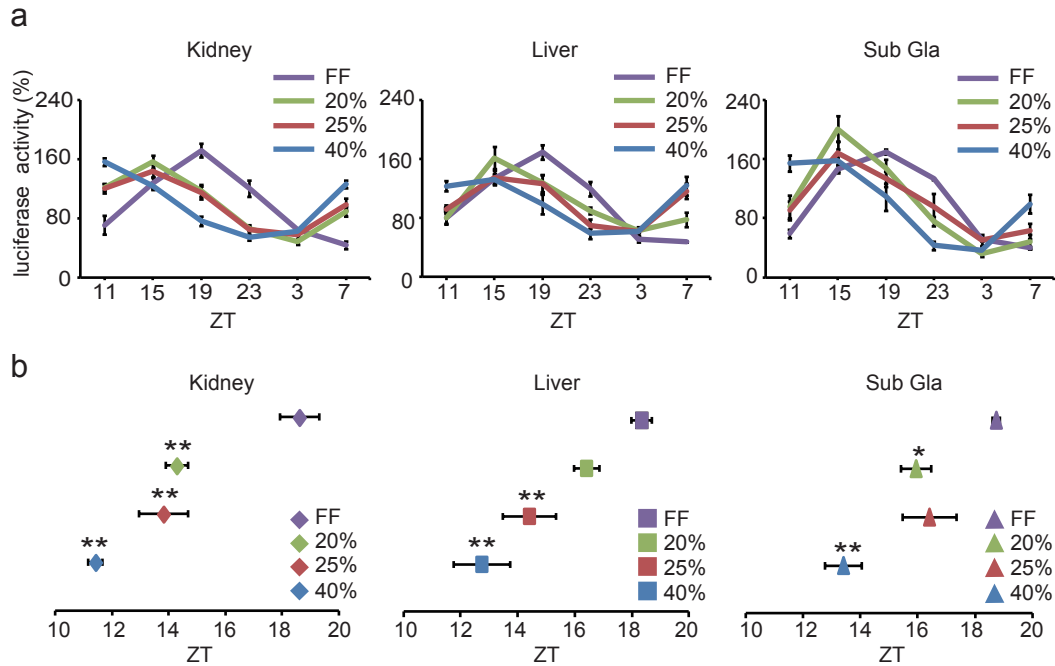


図 21 食餌量の制限による末梢時計同調

LD 環境下において、1 日 6 食、ZT 0, 4, 8, 12, 16, 20 に等量摂食させて、2 週間後に発光リズムを測定した。摂食量は 1 日のトータル量を 20, 25, 45 %制限した。FF は自由摂食群。a に発光リズムの相対値の平均値を、b にそれぞれの群の位相を示した。それぞれの結果は平均値 \pm SEM で表した。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. FF by Tukey-Kramer test。各群 $n = 3$ で行った。

食餌間隔の等しい食パターンによる末梢時計同調

次に食餌時刻の間隔は均等にしたまま、食餌の回数を1日6回から4、3、2回と減らしていき、末梢時計の位相変化を解析した。その結果、末梢時計はどの組織においても位相は変化しなかった（図22、one-way ANOVA, 腎臓 : $F(3, 20) = 1.94, p = 0.15$ 、肝臓 : $F(3, 20) = 0.44, p = 0.72$ 、顎下腺 : $F(3, 20) = 0.01, p = 0.99$ ）。よって、間隔が等しい食餌は末梢時計に影響を与えない事が分かった。

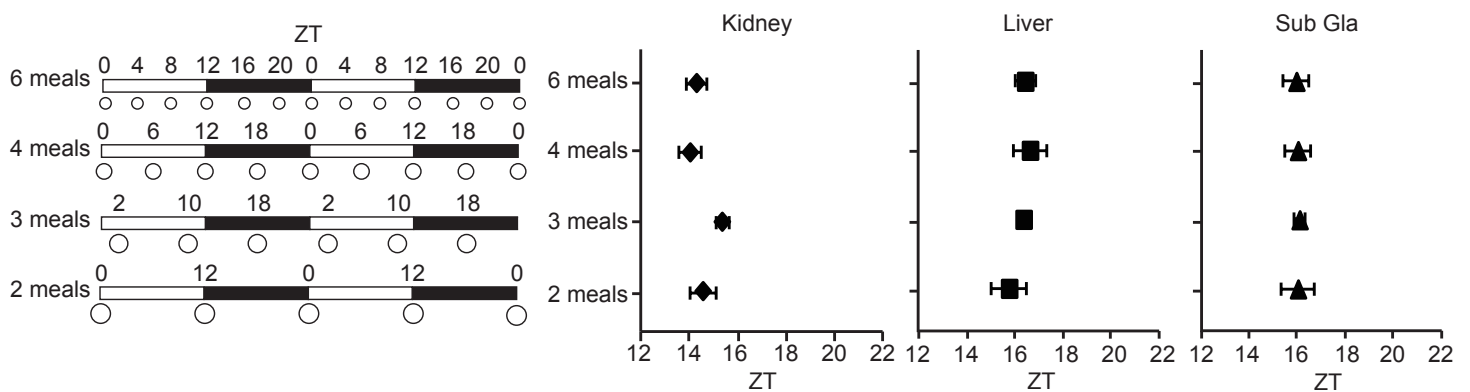


図22 食餌間隔の等しい食パターンによる末梢時計同調

食餌スケジュールを左に示した。食餌のタイミングを等間隔にしたまま1日6, 4, 3, 2食と変えて飼育し、2週間後に発光リズムを測定した。食餌を白丸で、餌の量に応じて大きさを変えて示した。それぞれの結果は平均値 \pm SEM で表した。各群 $n = 6$ で行った。

ヒトに近い食パターンによる末梢時計同調

ヒトに近い食餌パターンを検討するため、マウスに1日3回の食餌を与えた。まず、ZT 12, 18, 0 または ZT 0, 6, 12 という食餌パターンで飼育し、活動期の食餌 (ZT 6) と非活動期の食餌 (ZT 18) の影響を調べた。その結果、ZT 6 に摂食した群は ZT 18 の群に比べて有意に末梢時計の位相が変化・前進することが分かった (図 23A)。また、夜間に食餌をした ZT 12, 18, 0 の群の末梢時計は図 21 の自由摂食群における末梢時計と似た位相であった。

次に、1日3食の食餌を、朝食 (ZT 12, 0.9 g, 27 % of total volume)、昼食 (ZT 17, 1.2 g, 36 %)、夕食 (ZT 1, 3, or 4, 1.2 g, 36 %) にして実験を行った。この食餌時間をヒトに当てはめると、朝食が朝7時、昼食が昼12時、夕食が20時または22、23時となる。現代社会において夕食が仕事により遅くなりやすいこと、また遅い夕食に依存して肥満傾向になるという疫学調査があることから、この実験スケジュールを行った。結果、夕食を ZT1 に摂った群の末梢時計は ZT 12, 18, 0 に食べさせた群と似た位相になった (図 23B)。それに対し、夕食を ZT 3 または 4 に摂った群の末梢時計は ZT 0, 6, 12 に食べさせた群と似た位相になった。つまり、遅い夕食は体内時計を前進させてしまった。

最後に、遅い夕食 (ZT 4) を食べさせていたマウスで、夕食を ZT 0 と ZT 4 の二回に半分に分けて、さらに2週間飼育して発光リズムを測定した。その結果、前進していた末梢時計は顎下腺において有意に後退した (図 23C)。また、腎臓、肝臓においても後退傾向が見られた。よって、遅い夕食を2回に分けることは体内時計の位相変化を抑える効果があることが分かった。

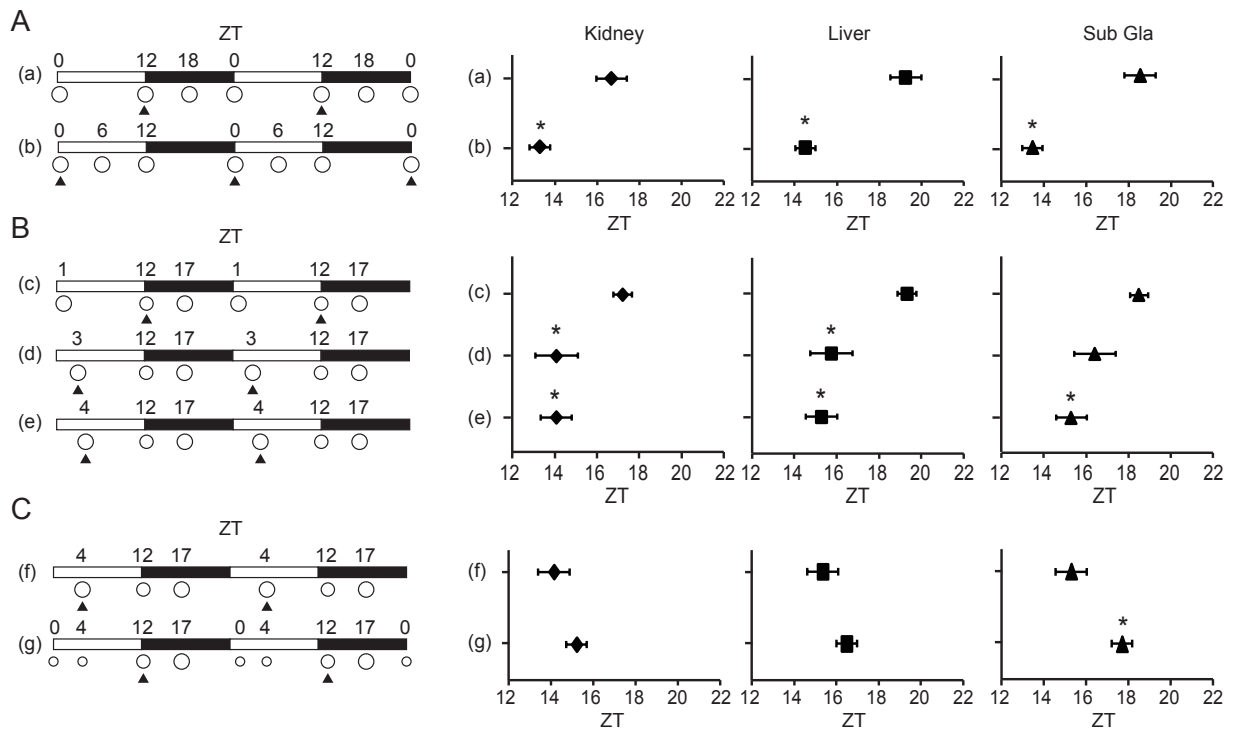


図 23 ヒトに近い食パターンによる末梢時計同調

左側に示した実験スケジュールにてマウスを飼育し、2週間後に末梢時計の発光リズムを測定した。白い丸は食餌時刻を示した。Bでは、ZT 12を朝食（0.9 g）、ZT 17を昼食（1.2 g）、ZT 1, 3, 4を夕食（1.2 g）とした。e, f, gは同じマウスで実験を行い、gでは、ZT 0に0.6 g、ZT 4に0.6 g食餌を与えた。また、eとfは同じ結果を再度示した。a (n=6)、b (n=6)、c (n=4)、d (n=6)、e, f, g (n=6)。それぞれの食餌パターンで測定した末梢組織発光リズムの位相を右側に示した。それぞれの結果は平均値 ± SEM で表した。* $p < 0.05$, vs. (c) or (f) by Tukey-Kramer test。1日の中で一番間隔が空いた後の食餌を（▲）で示した。

4. 考察

本研究により、新しい体内時計の測定系を確立した。この方法は、個体差が少なく、簡便、安定、かつ何度も同じマウスから測定出来る、とても有用な方法であった。発光レポーターを用いた *in vivo* におけるラット・マウスの測定法は過去に 2 報出ている。1 報目は、*Per1-luc* マウスの SCN に光ファイバーを挿入し、*luciferin* を osmotic ポンプで投与する事で、SCN の発光リズムを *in vivo* で測定している

(Yamaguchi et al., 2001)。2 報目は、*Per1-luc* ラットを用いて嗅球上部の頭蓋骨をガラス窓にして、嗅球の発光リズムを測定している (Abraham et al., 2005)。どちらの方法も測定前に手術が必要であり、発光リズム自体も個体差が大きかった。それに対し今回の方法は、とても安定で個体差が少ないものであり、また予備実験により不安定要素を全て排除出来た。

新しい測定法を用いて、マウスの体内時計システムにおける SCN の重要性を改めて証明することができた。つまり、SCN の破壊により、マウスの睡眠・覚醒リズムは失われ、それと同時に末梢組織の体内時計の振幅も減弱している事が分かった。この結果は PCR による集団サンプリングの結果と似ていたが (Hara et al., 2001; Terazono et al., 2003; Akhtar et al., 2002)、本研究ではさらに SCN 破壊後の末梢時計がフリーランしている可能性も示した。これは、SCN 破壊により乱れた組織間の情報伝達、つまりホルモンや神経系の日内リズムの乱れが、それぞれの臓器内における細胞間の同調を狂わせ、その結果振幅の低下を起こしたと考えた。また、制限給餌により同調された末梢時計は、自由摂食という時計への入力因子が無くなった状態においてフリーランした。フリーラン開始 2 週間後では、振幅の低下が見られたものの、リズム性を維持した組織がほとんどだった。よって末梢時計も、組織培養で見られる発光リズムと同様に、フリーランし、かつ徐々に脱同調を起こしていったと考えた。また、そのフリーラン周期は行動リズムと似ており、マウス個体がも

つ内在性の時計周期は、どの臓器でも等しいだろうと考えた。一方、組織培養における短周期は、培地による影響が強いと考えた。

新しい発光リズム測定法を用いて、ヒトに近い食餌パターンに末梢時計が感度良く適応している事を証明できた。また、摂食量を減らすと末梢時計が前進することも分かった。Mendoza ら (2008) は 1 日 6 食による摂食量制限により、行動リズム、SCN の時計遺伝子発現リズムが前進することを報告している。よって、末梢時計で見られた前進作用は、SCN の位相前進によるものと考えられた。また、腎臓はより前進効果が強かった。AMPK は血中グルコース濃度に依存して活性を変化させ、さらに体内時計の周期にも影響することが報告されている (Lamia et al., 2009)。食餌制限による位相前進作用が AMPK によるものであれば、臓器特異的に効果が違った可能性も十分考えられる。しかし、二章でも述べたが食餌同調には様々な機構があると考えられるのでさらなる研究が必要である。

図 21-23 では、等間隔の食パターンでは末梢時計は影響せず、間隔の異なるヒトに近い食パターンでは、末梢時計が変化する事を明らかにした。まず、1 日 2 食では発光リズムは一つのピークしか持たなかった。これは組織培養の結果と等しかった。次に、当研究室の先行研究により (Hirao et al., 2010)、間隔が長く空いた後の食餌は同調効果が強い、という結果が PER2::LUC 肝臓を用いた組織培養の実験で明らかになっている。今回の結果はその知見をさらに *in vivo* で実証するものとなったと考えた。実際に、図 23 で (▲) で示した食餌は、直前の食餌から最も長く間隔が空いた後の食餌であり、その食餌に引っ張られるように末梢時計の位相が変化しているのが分かる。特に、図 23C で遅い夕食を ZT 4 から ZT 0 と ZT 4 に分けることにより、ZT 4 の前に最も間隔が空いていたのを ZT 0 により抑えることができる。その結果、ZT 4 に引っ張られて前進していた末梢時計は、その効果を弱めて後退した。現代社会において朝食の欠落や遅い夕食、または夜食摂取傾向になることがよく問

題として取り上げられている。特に遅い夕食と睡眠時間の短縮により、肥満へのリスクが高まる事が報告されている (Hsieh et al., 2011)。また、夜 8 時以降の夕食も肥満との相関が高いと報告がある (Baron et al., 2011)。マウスにおいても、非活動期の明期のみ摂食させた群は暗期のみ摂食させた群に比べて太る事がわかっており (Arble et al., 2009)、食のタイミングと肥満はとても関連があることがわかる。今回の結果は、そういった食パターンが体内時計の位相を狂わせてしまうこと、またその乱れた体内時計が肥満に繋がることを示唆したデータであった。

5. 小括

- ① 個体差が少なく、安定で、連続測定可能な一個体のマウス末梢時計を *in vivo* で測定する方法を確立した。
- ② SCN 破壊により末梢時計はフリーランしたが、振幅は減弱した。
- ③ SCNx マウスの肝臓組織培養による発光リズムは、培養開始時に時計のリセットが起きていた。
- ④ 食餌量の制限により末梢時計は前進した。
- ⑤ 間隔が長く空いた後の食餌は強い同調効果を持つ。

第4章 総括

第2章では、肝臓の食餌同調に重要な時計遺伝子を見つけるにあたり、「急性の遺伝子発現変化」と「早い位相同調」の両方が起こる遺伝子を探索し、*Per2*と*Rev-erba*に辿り着いた。また、それらが *insulin* 依存的であること、また *in vitro* でもこの位相同調が再現できた事は幸運であった。その後の当研究室の研究により、食後の *insulin* 作用を増強する事で、より早い、大きな位相の変化を起こす事が分かった (Hirao ら, unpublished)。よって、*insulin* 機能に注目することにより、今後さらに体内時計に作用を及ぼす食品・薬品が見つかる可能性は多いにあり、今後もそういった食品・薬品を探索していきたいと思う。また、*insulin* 以外の食餌同調経路は存在し、それらの新しい経路を追求することにより、新しい体内時計に効く創薬・健康食品等の開発に繋がるだろう。

第3章では、新しいマウス体内時計測定法を確立することが出来た。今後、このような *in vivo* での体内時計の位相変化、または振幅変化などを測定していく予定である。特に末梢時計が弱っている状態、例えば時差ボケやシフトワークをさせたマウス (Castanon-Cervantes et al., 2010) の体内時計は、SCNx マウスと同様に測定が難しいという問題があるので、この発光リズム測定法で末梢時計を測定することが効果的だと考えている。また、序論で述べた組織間・細胞間の同調機構において、同調因子として分かっているものは既に数多く報告されているが、それが実際に *in vivo* でどのように体内時計に働きかけ、どのように組織間の時刻合わせを行なっているかは、まだよく分かっていない。また、その同調因子のリズムが破綻した時に、体内時計がどのように乱れていくのかをもっと深く *in vivo* で理解する必要がある。この疑問を解決するのに、今回確立した発光リズム測定法は有用であると考えており、今後、他の時計遺伝子の発光レポーターマウスを用いたり、他の臓器を測定で

きるようにすることで、さらなる「体内時計の同調」について解明していきたいと考えている。

謝辞

本論文の作製にあたり、ご指導とご鞭撻を賜りました早稲田大学大学院先進理工学研究科 柴田重信教授に甚大なる謝意を表します。また、本論文の作成に際し、ご助言とご高闊を賜りました早稲田大学大学院先進理工学研究科 岩崎秀雄教授、並びに早稲田大学大学院先進理工学研究科 岡野俊行教授に謹んで感謝致します。また、本研究の遂行に際し、ご協力頂きました柴田研究室の皆様にご心より感謝いたします。

本学位論文は、下記の原著論文を基に作成され、早稲田大学大学院先進理工学研究科に提出されたものである。

- 1 . Tahara Y, Otsuka M, Fuse Y, Hirao A, Shibata S. (2011) Refeeding after fasting elicits insulin-dependent regulation of Per2 and Rev-erb α with shifts in the liver clock. *J Biol Rhythms.*, 26: 230-240.
- 2 . Tahara Y, Kuroda H, Saito K, Nakajima Y, Kubo Y, Ohnishi N, Seo Y, Otsuka M, Fuse Y, Ohura Y, Komatsu T, Moriya Y, Okada S, Furutani N, Hirao A, Horikawa K, Kudo T, Shibata S. (2012) In vivo monitoring of peripheral circadian clocks in the mouse. *Curr Biol.*, 22: 1029-1034.
- 3 . Kuroda H, Tahara Y, Saito K, Ohnishi N, Kubo Y, Seo Y, Otsuka M, Fuse Y, Ohura Y, Hirao A, Shibata S. (2012) Meal frequency patterns determine the phase of mouse peripheral circadian clocks. *Sci Rep.*, 2: 711.

引用文献

- Abraham U, Prior JL, Granados-Fuentes D, Piwnica-Worm DR, Herzog ED. (2005) Independent circadian oscillations of Period1 in specific brain areas in vivo and in vitro. *J Neurosci.* 25, 8620-1626.
- Akhtar RA, Reddy AB, Maywood ES, Clayton JD, King VM, Smith AG, Gant TW, Hastings MH, Kyriacou CP. (2002) Circadian cycling of the mouse liver transcriptome, as revealed by cDNA microarray, is driven by the suprachiasmatic nucleus. *Curr Biol.* 12, 540-550.
- Albrecht U. (2012) Timing to perfection: the biology of central and peripheral circadian clocks. *Neuron.* 74: 246-260. Review.
- Arble DM, Bass J, Laposky AD, Vitaterna MH, Turek FW. (2009) Circadian timing of food intake contributes to weight gain. *Obesity (Silver Spring).* 17: 2100-2102.
- Balsalobre A, Brown SA, Marcacci L, Tronche F, Kellendonk C, Reichardt HM, Schutz G, Schibler U. (2000) Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. *Science.* 289: 2344-2347.
- Baron KG, Reid KJ, Kern AS, Zee PC. (2011) Role of sleep timing in caloric intake and BMI. *Obesity (Silver Spring)* 19: 1374-1381.
- Bass J, Takahashi JS. (2010). Circadian integration of metabolism and energetics. *Science.* 330, 1349-1354. Review.
- Castanon-Cervantes O, Wu M, Ehlen JC, Paul K, Gamble KL, Johnson RL, Besing RC, Menaker M, Gewirtz AT, Davidson AJ. (2010) Dysregulation of inflammatory responses

by chronic circadian disruption. *J Immunol.* 185: 5796-5805.

Colwell CS. (2011) Linking neural activity and molecular oscillations in the SCN. *Nat Rev Neurosci.* 12: 553-569.

Damiola F, Le Minh N, Preitner N, Kornmann B, Fleury-Olela F, Schibler U. (2000) Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev.* 14: 2950-2961.

Davidson AJ, Stokkan KA, Yamazaki S, Menaker M. (2002) Food-anticipatory activity and liver *per1-luc* activity in diabetic transgenic rats. *Physiol Behav.* 76: 21-26.

Hara R, Wan K, Wakamatsu H, Aida R, Moriya T, Akiyama M, Shibata S. (2001) Restricted feeding entrains liver clock without participation of the suprachiasmatic nucleus. *Genes Cells.* 6: 269-278.

Hirao A, Tahara Y, Kimura I, Shibata S. (2009) A balanced diet is necessary for proper entrainment signals of the mouse liver clock. *PLoS One.* 4: e6909.

Hirota T, Lewis WG, Liu AC, Lee JW, Schultz PG, Kay SA. (2008) A chemical biology approach reveals period shortening of the mammalian circadian clock by specific inhibition of GSK-3 β . *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105: 20746-20751.

Hsieh SD, Muto T, Murase T, Tsuji H, Arase Y. (2011) Association of short sleep duration with obesity, diabetes, fatty liver and behavioral factors in Japanese men. *Intern Med.* 50: 2499-2502.

Hughes ME, DiTacchio L, Hayes KR, Vollmers C, Pulivarthy S, Baggs JE, Panda S, Hogenesch JB. (2009) Harmonics of circadian gene transcription in mammals. *PLoS Genet.* 5: e1000442.

Kalsbeek A, Yi CX, La Fleur SE, Fliers E. (2010). The hypothalamic clock and its control of glucose homeostasis. *Trends Endocrinol Metab.* 21, 402-410. Review.

Koike N, Yoo SH, Huang HC, Kumar V, Lee C, Kim TK, Takahashi JS. (2012) Transcriptional architecture and chromatin landscape of the core circadian clock in mammals. *Science.* 338: 349-354.

Kuriyama K, Sasahara K, Kudo T, Shibata S. (2004) Daily injection of insulin attenuated impairment of liver circadian clock oscillation in the streptozotocin-treated diabetic mouse. *FEBS Lett.* 572: 206-210.

Lamia KA, Storch KF, Weitz CJ. (2008) Physiological significance of a peripheral tissue circadian clock. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105: 15172-15177.

Lamia KA, Sachdeva UM, DiTacchio L, Williams EC, Alvarez JG, Egan DF, Vasquez DS, Juguilon H, Panda S, Shaw RJ, Thompson CB, Evans RM. (2009) AMPK regulates the circadian clock by cryptochrome phosphorylation and degradation. *Science.* 326: 437-440.

Marcheva B, Ramsey KM, Buhr ED, Kobayashi Y, Su H, Ko CH, Ivanova G, Omura C, Mo S, Vitaterna MH, Lopez JP, Philipson LH, Bradfield CA, Crosby SD, JeBailey L, Wang X,

- Takahashi JS, Bass J. (2010) Disruption of the clock components CLOCK and BMAL1 leads to hypoinsulinaemia and diabetes. *Nature*. 466: 627-631.
- Mendoza J, Drevet K, Pévet P, Challet E. (2008) Daily meal timing is not necessary for resetting the main circadian clock by calorie restriction. *J Neuroendocrinol*. 20: 251-260.
- Mistlberger RE. (2009) Food-anticipatory circadian rhythms: concepts and methods. *Eur J Neurosci*. 30: 1718-1729.
- Mohawk JA, Green CB, Takahashi JS. (2012) Central and peripheral circadian clocks in mammals. *Annu Rev Neurosci*. 35: 445-462. Review.
- Moore RY, Eichler VB. (1972) Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res*. 42: 201-206.
- Refinetti R, Lissen GC, Halberg F. (2007) Procedures for numerical analysis of circadian rhythms. *Biological Rhythm Research* 38: 275-325.
- Stephan FK, Davidson AJ. (1998) Glucose, but not fat, phase shifts the feeding-entrained circadian clock. *Physiol Behav*. 65: 277-288.
- Tahara Y, Hirao A, Moriya T, Kudo T, Shibata S. (2010) Effects of medial hypothalamic lesions on feeding-induced entrainment of locomotor activity and liver *Per2* expression in *Per2::luc* mice. *J Biol Rhythms*. 25: 9-18.

Terazono H, Mutoh T, Yamaguchi S, Kobayashi M, Akiyama M, Udo R, Ohdo S, Okamura H, Shibata S. (2003) Adrenergic regulation of clock gene expression in mouse liver. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100: 6795-6800.

Turek FW, Joshu C, Kohsaka A, Lin E, Ivanova G, McDearmon E, Laposky A, Losee-Olson S, Easton A, Jensen DR, Eckel RH, Takahashi JS, Bass J. (2005) Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice. *Science.* 308: 1043-1045.

Vollmers C, Gill S, DiTacchio L, Pulivarthy SR, Le HD, Panda S. (2009) Time of feeding and the intrinsic circadian clock drive rhythms in hepatic gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106: 21453-21458.

Wakamatsu H, Yoshinobu Y, Aida R, Moriya T, Akiyama M, Shibata S. (2001) Restricted-feeding-induced anticipatory activity rhythm is associated with a phase-shift of the expression of mPer1 and mPer2 mRNA in the cerebral cortex and hippocampus but not in the suprachiasmatic nucleus of mice. *Eur J Neurosci.* 13: 1190-1196.

Welsh DK, Yoo SH, Liu AC, Takahashi JS, Kay SA. (2004) Bioluminescence imaging of individual fibroblasts reveals persistent, independently phased circadian rhythms of clock gene expression. *Curr Biol.* 14: 2289-2295.

Wu T, Ni Y, Kato H, Fu Z. (2010) Feeding-induced rapid resetting of the hepatic circadian clock is associated with acute induction of Per2 and Dec1 transcription in rats. *Chronobiol Int.* 27: 1-18.

Yamaguchi S, Kobayashi M, Mitsui S, Ishida Y, van der Horst GT, Suzuki M, Shibata S, Okamura H. (2001) View of a mouse clock gene ticking. *Nature.* 409: 684.

Yamazaki S, Numano R, Abe M, Hida A, Takahashi R, Ueda M, Block GD, Sakaki Y, Menaker M, Tei H. (2000) Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science*. 288: 682-685.

Yoo SH, Yamazaki S, Lowrey PL, Shimomura K, Ko CH, Buhr ED, Slepka SM, Hong HK, Oh WJ, Yoo OJ, Menaker M, Takahashi JS. (2004) PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101: 5339-5346.

Zhang EE, Liu AC, Hirota T, Miraglia LJ, Welch G, Pongsawakul PY, Liu X, Atwood A, Huss JW 3rd, Janes J, Su AI, Hogenesch JB, Kay SA. (2009) A genome-wide RNAi screen for modifiers of the circadian clock in human cells. *Cell*. 139: 199-210.

石田直理雄、本間研一 編、2008、時間生物学辞典、朝倉書店、54-65