

緒言

この地球に生存する生物は、その誕生から現在に至るまで、環境に適応するために進化を続けてきた。その進化の過程で、地球上の生物が普遍的に獲得した性質の一つに、概日リズムがある。これは、地球環境の1日周期のリズムに対応して作り出された、およそ1日（約24時間）周期の内因性リズムであり、睡眠、代謝、内分泌、行動リズムなど様々な生体现象に関与している事が知られている。明暗周期が変動する環境下では、生物は外界の明暗周期と一致する日周リズムにより生体现象を支配し、外界と同調することにより、より効率よく活動する事が可能となる。すなわち、恒暗条件下では概日リズムを、明暗条件下では日周リズムを示すことになる。

概日リズムの中核は、哺乳類においては視床下部の視交叉上核（suprachiasmatic nucleus: SCN）に存在することが分かっている[1,2,3]。概日リズムを示す体内時計は、概念的に①入力系、②振動体、そして③出力系から構成される。①から同調因子が入力され、②で細胞に信号が受け取られ、内因性リズムの発振位相を変え、③発振により生じたリズムが様々な信号として出力され様々な現象にリズムを引き起こす。②の概日リズム発振機構の特色は、その発振が遺伝子レベルから細胞レベルそして組織レベルで階層的に生起されている点にある（図1）。

現在までに、発振機構の中心をなす、遺伝子レベルでの発振に関わる様々な時計遺伝子が発見されている。哺乳類ではまず *Clock* がマウスから発見された[4]。それ以降、*Bmal1*、ショウジョウバエで発見されていた *Period(Per)*、*Timeless(Tim)*、*cryptochrome(Cry)*の哺乳類ホモログなどが発見されている[5-8]。これら様々な時計遺伝子群により概日リズム発振が行われていると考えられている。

哺乳類で提唱されているモデルとしては、BMAL1とCLOCKが蛋白質二量体を形成し、*Per*や*Cry*などの上流に存在するE-Boxに作用してその転写を促進するモデルである。転写された*Per*や*Cry*などのmRNAは核から細胞質に移動し、そこでリボソームによりPERやCRYなど蛋白質に翻訳される。PERやCRYは核内に移行しBMAL1とCLOCKの二量体による転写促進を抑制するネガティブフィードバックループを形成する。このネガティブフィードバックループにより*Per*や*Cry*などの時計遺伝子群に概日リズムが生まれるといったモデルが提唱されている[9]（図2）。

このようにして概日リズムが発振されるが、このリズムは光（光情報）やセロトニンなど（非光情報）により同調される。SCNへのもっとも強力な同調因子である光により、SCNにおける*Per1*や*Per2*の発現が上昇し、体内時計概日リズムを同調させる。しかし、時計遺伝子はSCN以外の末梢組織にも発現しており、繊維芽細胞培養実験から、血清刺激などにより数周期ではあるが時計遺伝子発現にリズムを形成することが可能である事が判っている[10]。またSCNの時計は光により急激に同調するのに対して、末梢組織である筋肉、肝臓などの時計の同調には、より長時間を必要とする事が判明している[11]。この同調に必要な時間のズレが時差ぼけなどによる体調不良の原因の一因

であると考えられる (図1)。

概日リズムの表出系の一つである摂食は、一方では末梢体内時計の強力な同調因子であることも判っている。マウスは夜行性のため、暗期に運動と摂食が活発になる。そこで普段マウスの活動が活発ではない明期の一定時間にのみ餌を提示する制限給餌 (restricted feeding: RF) を行うと、マウスはしだいに餌の提示時刻を認識し、給餌前に活発な活動を見せるようになる[12]。SCN を破壊すると、自由摂食条件下での摂食リズムは消失するが[13]、RF 条件下では前述と同様に、給餌前に活発な活動を見せるようになる[14]。これらの事実から、摂食性の概日リズム同調は SCN 非依存的なリズム形成機構であることが示唆されている。

摂食性のリズム形成には、餌に含まれる栄養成分が必須であると考えられている。事実、セルロースなど消化吸収されないものでは RF による同調は見られない。またサッカリンでは RF による同調は見られないことから、味覚などによる同調ではない事が判っている[15]。しかし、摂食による概日リズム同調機構を引き起こす因子が何であるかなど、その機構の詳細は不明のままである (図1)。

餌の成分は炭水化物、たんぱく質、脂質、ビタミンなどである。その成分中でも炭水化物は重要であり、アミラーゼなどの消化酵素によりグルコースに分解され、脳、各種臓器の細胞においてエネルギー源として利用される。

最近、広田らによりラット繊維芽細胞 Rat-1 へのグルコース添加が時計遺伝子 *Per1*、*Per2* mRNA を変動させるとの報告がなされた[27]。

広田らの報告は培養細胞を用いた *in vitro* の報告である。そこで本研究第1章はマウス *in vivo* におけるグルコース投与による末梢組織の時計遺伝子発現変化を調べた。

また、エネルギー代謝に伴う NADPH/NADP 比の変化が末梢組織におけるリズム形成にかかわるとの報告があり[34]、一方ではラット I 型糖尿病モデルにおいては、心臓の時計遺伝子発現が変調するという報告がある[36]。糖尿病とはグルコースを細胞内に取り込むインスリンが分泌されない、または正常に働かなくなることにより引き起こされる病気である。糖尿病になると血中グルコース濃度は高くなり、糖尿病状態になると体内時計のリセットが正常に行われなくなる可能性がある。

そこで第2章では、ストレプトゾトシン (STZ; ランゲルハンス島を破壊しインスリン減少を引き起こす薬物) 投与による I 型糖尿病モデルマウスを作成し、インスリン投与により血中グルコースが細胞に取り込まれることにより体内時計のリズム性が回復するか、あるいはインスリン自体が時計遺伝子発現に影響を与え、リズム性が回復するかを調べた。

第1章、第2章ともに末梢組織としては、摂食との深い関係ならびに均一な組織が大量に得られることに着目し、肝臓を選んだ。

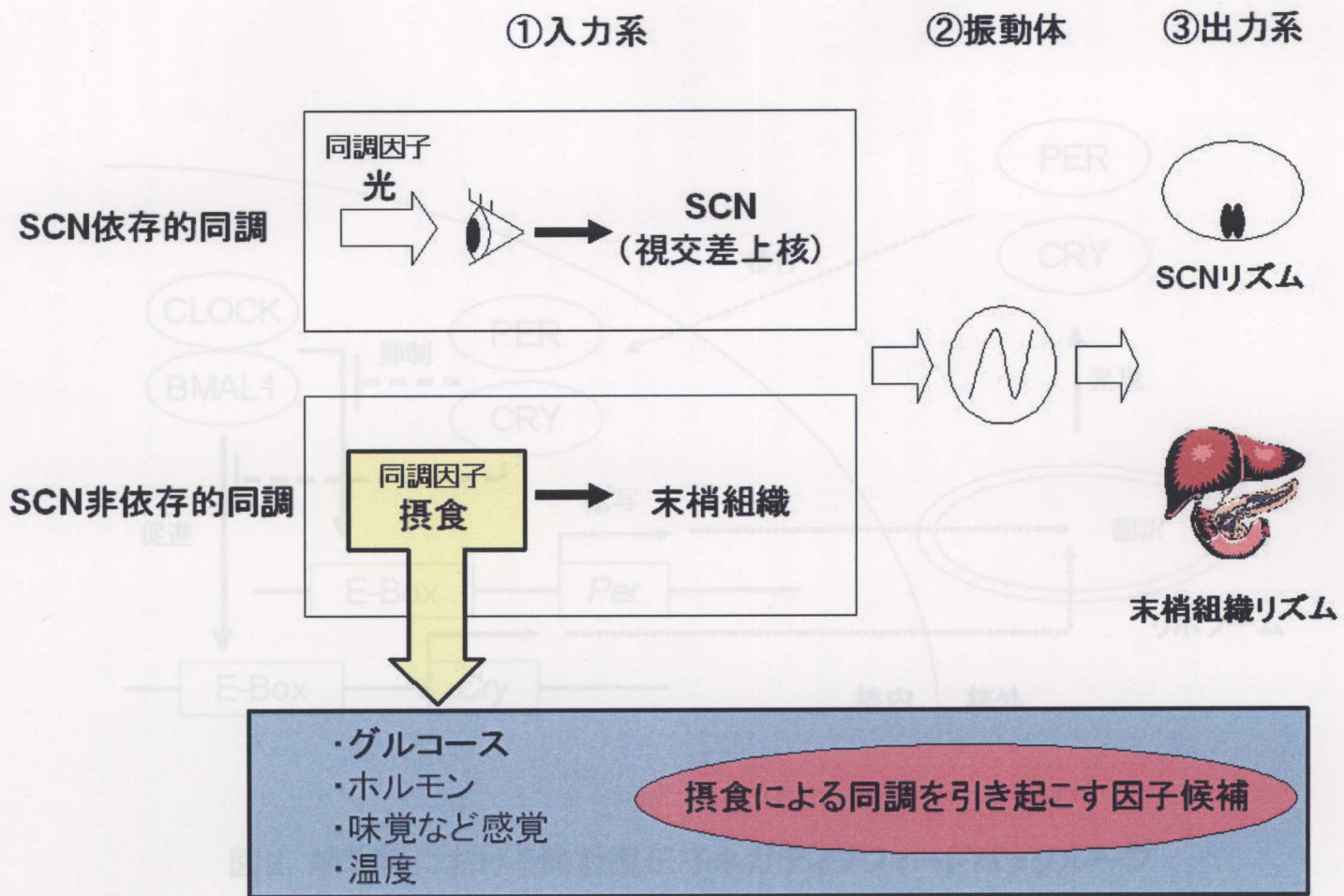


図1. 概日リズム発振機構概念

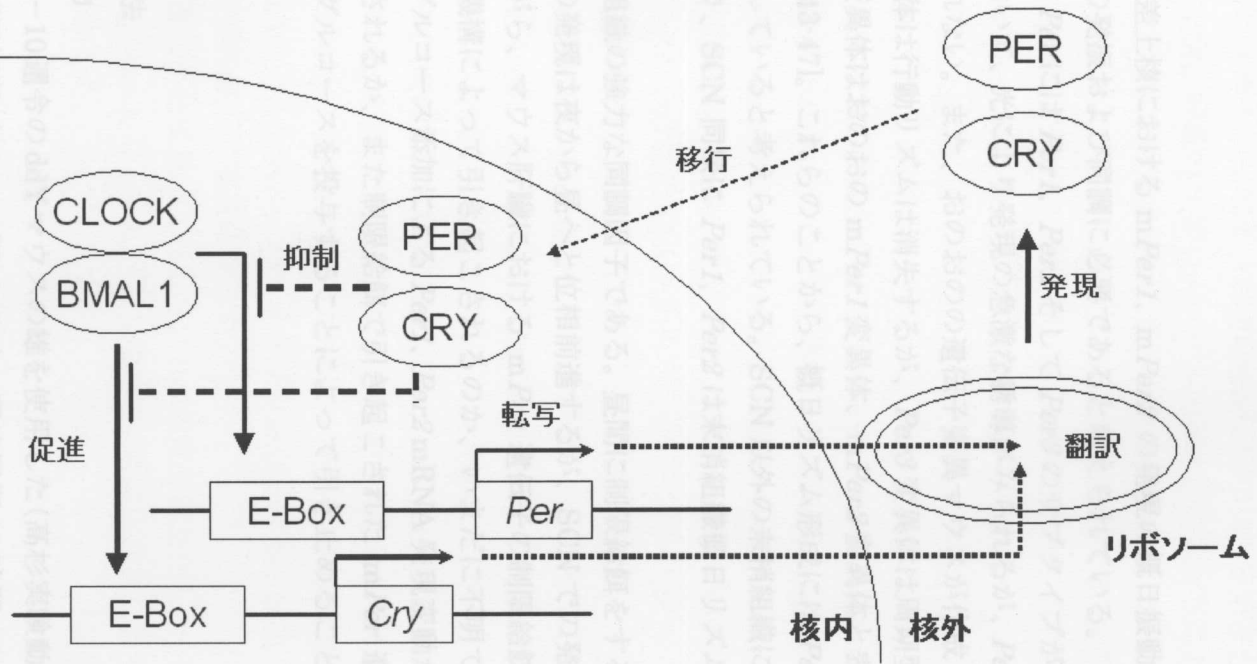


図2. 哺乳類における時計遺伝子ネガティブフィードバックループ

1-2. 実験方法
 (1) 実験動物
 実験には8-10週齢の動物を用いた。動物は全て恒温(室温 23±0.5°C, 50%)、明暗周期 12時間(12時間暗/12時間明)で飼育した。また実験使用前は自由採食、自由飲水条件下で飼育した。

(2) サブストラクチャ

実験はすべてオートトクレーン (121°C, 20分) による滅菌済みのものを用いた。マウスは麻酔後、未待した生理食塩水を右心室動脈から流し、血液を出来る限り除いた後、肝臓を採出した。