

第1章 抽出

マウス肝臓の時計遺伝子発現に対するグルコース投与の影響

1-1. 序論

マウス視交差上核における *mPer1*、*mPer2* の発現の概日振動は、SCN 依存性の概日振動リズムの発振および同調に必要であると考えられている。

時計遺伝子 *Per* には *Per1*、*Per2* そして *Per3* のサブタイプが存在する。*Per1*、*Per2* は SCN において、光により発現の急激な誘導がみられるが、*Per3* は光による誘導はほとんど見られない。また、おのおのの遺伝子変異マウスが作成されているが、*mPer1*、*mPer2* 変異体は行動リズムは消失するが、*Per3* 変異体は周期型で、*Per1&3* 変異体、*mPer2&3* 変異体はおのおの *mPer1* 変異体、*mPer2* 変異体と表現形において差が見られなかった[43-47]。これらのことから、概日リズム形成には *Per1*、*Per2* 遺伝子の機能に強く依存していると考えられている。SCN 以外の末梢組織においても *Per* 遺伝子は発現しており、SCN 同様に *Per1*、*Per2* は末梢組織概日リズム形成に重要であると考えられる。

餌は末梢組織の強力な同調因子である。昼間に制限給餌をすることによって、肝臓で *Per* 遺伝子の発現は夜から昼へと位相前進するが、SCN での発現は変化しない。

しかしながら、マウス肝臓における *mPer* 遺伝子の制限給餌による同調がどのようなシグナル機構によって引き起こされるのか、いまだに不明である。この実験では、*Rat-1* へのグルコース添加による *Per1*、*Per2* mRNA 発現変動が、マウス個体でも同様に引き起こされるか、また制限給餌で引き起こされた *mPer* 遺伝子発現の前進を、餌の代わりにグルコースを投与することによって引き止めることが可能であるかを検証した。

1-2. 実験方法

(1) 実験動物

実験には8-10週令の ddY マウスの雄を使用した(高杉実験動物株式会社より購入)。動物は全て恒温恒湿 (23±0.2°C、55%)、明暗周期 12 時間 : 12 時間で飼育した。また実験使用前は自由摂食、自由飲水条件下で飼育した。

(2) サンプルング

試薬はすべてオートクレーブ (121°C、20 分) にて滅菌済みのものを用いた。エーテルで麻酔後、氷冷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、肝臓を摘出した。

(3) RNA 抽出 (スケジュール1参照)

抽出した肝臓の一部を TRIZOL (BRL, MD, USA) 内でホモジナイズした。TRIZOL の 1/5 量のクロロホルムを加え、15000rpm(4°C)で 20 分間遠心した後、上清を回収した。回収した上清と同量の 2-プロパノールを加え、よく上下にチューブを振る事により攪拌した後、-20°Cで 1 時間静置した後、15000rpm(4°C)で 20 分間遠心し上清を取り除いた。上清に 80%エタノールを加え、15000rpm(4°C)で 20 分間遠心し上清を取り除き沈殿物を室温で風乾させた。沈殿物を 10 μ l の DEPC-水で溶かした後、吸光度計で RNA 量を測定し、100ng/ μ l になるように調整した。

(4) RT-PCR 法 *Per1*, *mPer2*, β -actin の発現量を調べた。

A One-Step RT-PCR System Platinum Version (Invitrogen, CA)を用いて、100ng の total RNA をそれぞれのプライマーで増幅した。RT-PCR の条件は reverse transcription (50°C、30 分)、{denature (94°C、15 秒)、annealing (55°C、30 秒)、extension (68 °C、60 秒)} \times 28 cycle で行った。プライマーの配列は、*mPer1*: 5' - CAAGTGGCAATGAGTCCAAAG-3' (an group)、および 5' - CGAAGTTTGAGCTCCCGAAGTG-3' (H (289bp))、*mPer2*: 5' - CAGACTCATGATGACAGAGG-3' および 5' - GAGATGTACAGGATCTTCCC-3' (381bp)、*mBmal1*: 5' - CACTGACTACCAAGAAAGTATG-3' および 5' - ATCCATCTGCTGCCCTGAGA-3' (344bp)、そして β -actin: 5' - GAGGGAAATCGTGCGTGACAT-3' および 5' - ACATCTGCTGGAAGGTGGACA-3' (452bp)である。得られた PCR 産物は 3%アガロースゲルに泳動し、100 μ g エチジウムブロマイド/200ml 蒸留水で 10 分染色後、十分量の蒸留水中で 10 分洗い、バックグラウンドとなる余分なエチジウムブロマイドをおとした後に紫外線下で写真撮影した。

写真上の各遺伝子発現量は DNA バンドの濃度で定量化した。DNA のバンドの定量には、EDAS-290 system (Kodak, NY)を用いた。数値化された各バンドの濃さは、 β -actin との比として表した。

(5) テレメトリーによる体温測定

麻酔薬(ketamine 50mg/kg、xylazine 20mg/kg)の腹腔内投与下において、マウス腹腔内に radio-telemetry transmitter (DSI, MN)を埋め込んだのち、縫合し 1-2-(1) 実験動物と同様の条件で 1 ヶ月間飼育した。同システムで体温をモニター・記録し、5 分毎にデータとしてコンピュータに送られるように設定した。

(6) 実験スケジュール

A. マウス肝臓におけるグルコースもしくは餌による *mPer1*, *mPer2* mRNA 発現タイム

コース (図3. スケジュール1 参照)

マウスを24時間絶食後、翌日のZT5 (Zeitgeber time; ZT 0 は light-on、ZT 12 は light-off) に給餌(Food group)、もしくはグルコース(5.0g/kg; Glucose group)を処置した。餌は固形の餌をケージに置き、サンプリング時刻まで自由摂食させた。グルコースは0.5g グルコース/1ml 水のグルコース溶液を作成し、5.0g/kg の用量でゾンデを用いて経口投与した。同時に無処置(Intact group)、絶食後ゾンデを挿入しただけのもの (Handling group)、絶食後水を投与したもの(Water group)も調べた。水はグルコースと同用量、ゾンデにより経口投与した。処置1時間後であるZT6、2時間後であるZT7そして4時間後であるZT9に、エーテル麻酔下で肝臓をサンプリングし、RNA抽出後RT-PCRにて *mPer1*、*mPer2*、 β -*actin* の発現量を調べた。

B. マウス肝臓におけるグルコース、マンノースもしくは CMC による *mPer1*, *mPer2* mRNA 発現への影響 (図4. スケジュール2 参照)

マウス24時間絶食後、ZT5に経口投与により、グルコース(0.5g/kg, 2.0g/kg or 5.0g/kg; Glu group)、マンノース(5.0g/kg; Man group)、カルボキシメチルセルロース(0.5%; CMC group)を処置した。ハンドリング (Handling group) は24時間絶食後、ゾンデを挿入しただけの群である。

マウスはZT6.5にエーテル麻酔下でサンプリングし、RNA抽出後RT-PCRにて *mPer1*、*mPer2*、 β -*actin* の発現量を調べた。

C. 制限給餌に伴うマウス肝臓における時計遺伝子発現の位相変化に対するグルコース連日投与の影響

I. 制限給餌スケジュール (図5. スケジュール3 参照)

RF group マウスはDay1に24時間の絶食を施した。その後Day2-10までZT5-9の時刻に制限給餌を行った。Day10のZT23、Day11のZT5、ZT11、ZT17にエーテル麻酔下で肝臓をサンプリングし、RNA抽出後、RT-PCRにて *mPer1*、*mPer2*、 β -*actin* の発現量を調べた。

II. 水およびグルコース連日投与スケジュール (図6. スケジュール4 参照)

Water group および glucose group マウスはDay1に24時間の絶食を施した。その後Day2-7までZT5-9の時刻に制限給餌を行った。Day8-9においてはZT5に各groupに、水もしくは0.5g/kg グルコースを経口投与し、暗期ZT12-24にケージ上に餌を戻し自由摂食できるようにした。Day10においてはZT5に各groupに、水もしくは0.5g/kg グルコースを経口投与し、餌による影響を除くため暗期ZT12-24に絶食を行った。

Day10のZT23、Day11のZT5、ZT11、ZT17にエーテル麻酔下で肝臓をサンプリングし、RNA抽出後、RT-PCRにて *mPer1*、*mPer2*、 β -*actin* の発現量を調べた。

D. 腹腔体温に対するグルコースおよび給餌の影響 (図7. スケジュール5 参照)

無処置群(Intact group)以外のマウスは、24時間の絶食後、翌日の ZT5 に各処置を施した。ZT5- ZT9 まで給餌した群 (Food group)、5.0g/kg グルコース経口投与群 (Glucose group)、水経口投与群(Water group)、絶食継続群(Fasting group)、ゾンデを挿入しただけのハンドリング群(Handling group)について体温を調べた。

(7) 統計解析

各ポイント間の相違を算出する際には、Turkey Kramer test にて決定した。

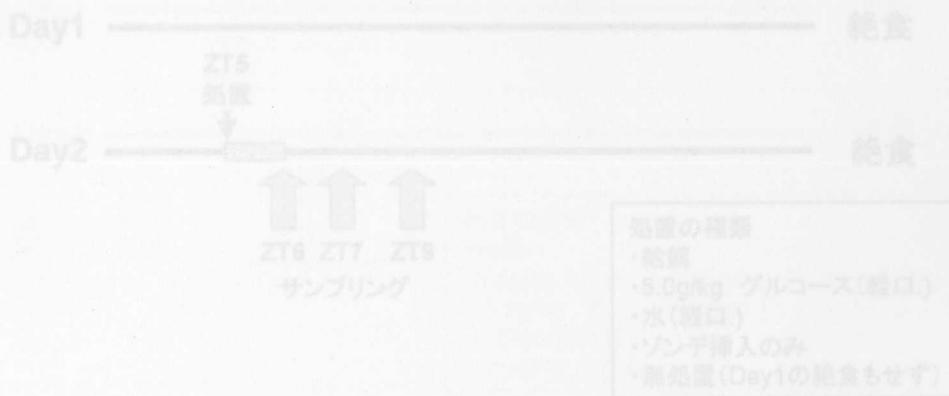


図3. スケジュール1

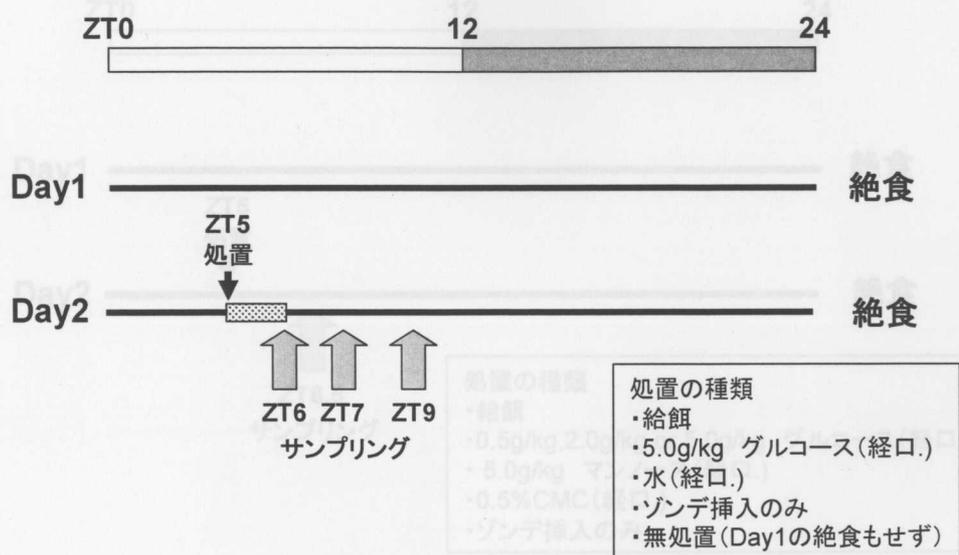


図3. スケジュール1

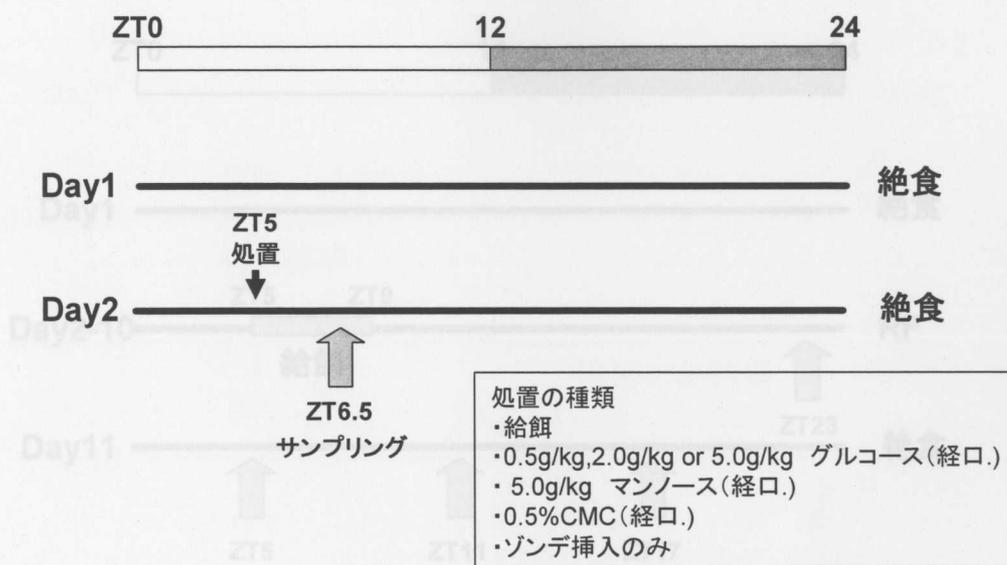


図4. スケジュール2

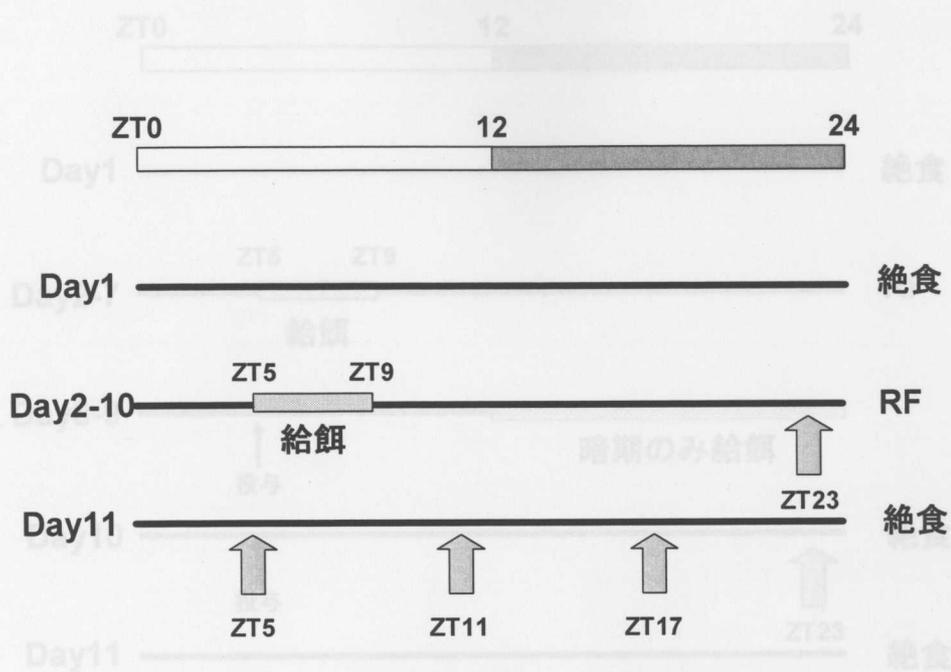


図5. スケジュール3

給餌の種類
 ・5.0g/kg グルコース(経口)
 ・水(経口)

図6. スケジュール4

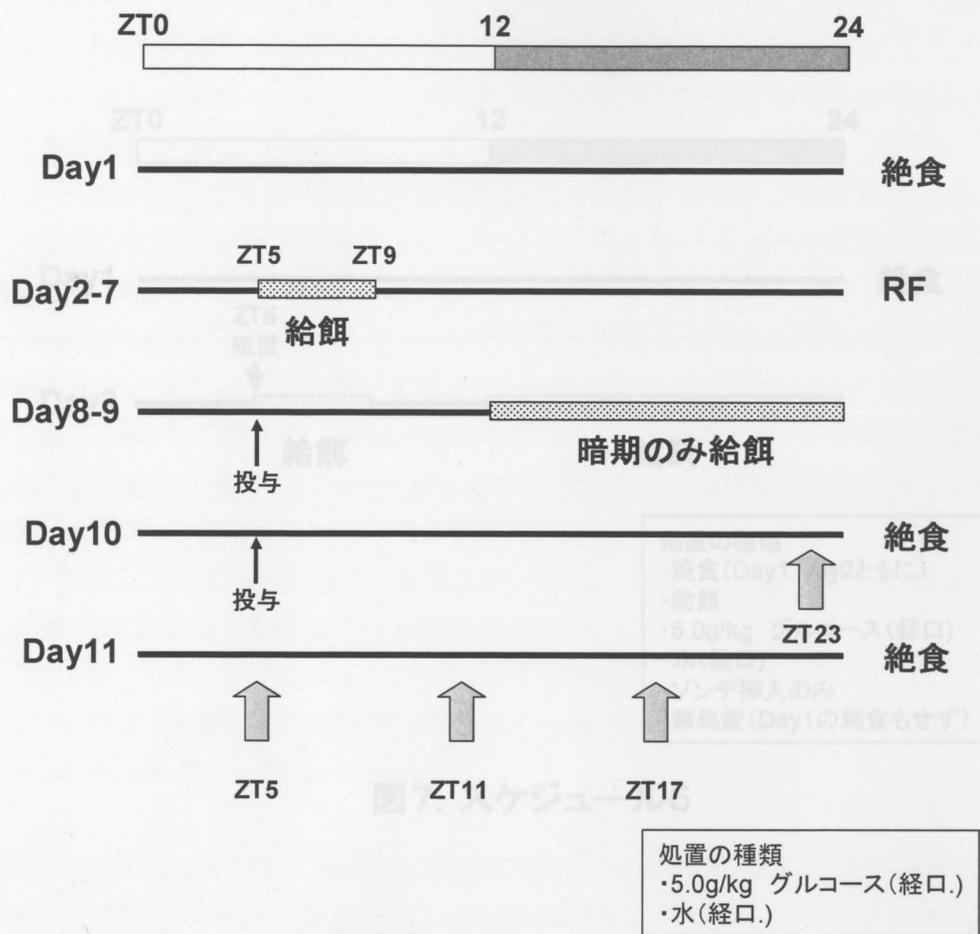


図6. スケジュール4

1-3. 結果

1-3-1. マウス肝臓におけるグルコースもしくは餌による *mPer1*, *mPer2* mRNA 発現タイムコース

これまでの研究から、日中4時間の制限給餌によって、マウス肝臓における *mPer* 遺伝子発現変動を引き起こす事が出来ることが判明している[16]。よって、一過的な給餌による、マウス肝臓における *mPer* 遺伝子発現への影響を確認する事にした。

Food group において *mPer1* は1時間後、*mPer2* は1時間そして2時間後において発現の上昇が確認された(図8B)。

グルコースは餌による体内時計発振調節のための因子であるとの報告があることから[17]、一過的なグルコース投与による、マウス肝臓における *mPer* 遺伝子発現への影響を確認した。

Glucose group において、*mPer1* も *mPer2* も1時間そして2時間後において発現上昇が確認された。また、*mPer1* のみでの *Food group* における *mPer* への発現への影響

は見られなかった(図8C)。Water group において、*mPer1* で1時間後に発現上昇が見られた。Food group と Glucose group を比較すると、*mPer2* 発現誘導において給餌がより強い影響力を持っていることが判明した。

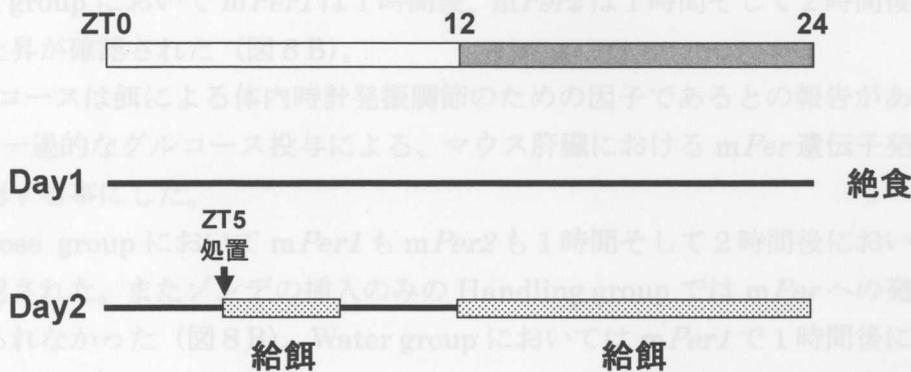
マウス肝臓における *mBmal1* の発現においては、Food group と Glucose group どちらも顕著な変化が見られなかった(data not shown)。

1-3-2. マウス肝臓におけるグルコース、マンノースもしくは CMC による *mPer1*, *mPer2* mRNA 発現への影響

図8. に示したように、Water group において、*mPer1* で1時間後に発現上昇が見られた。このことから、マンノースおよびカルボキシメチル・セルローズ(CMC)のような非栄養性の化合物の *mPer* 遺伝子発現に対する影響を検討した。さまざまな用量のグルコース、マンノースもしくは CMC 投与によって *mPer1* に発現上昇が見られた(図9B and C)。対照的に、*mPer2* は Glu 2.0g/kg group ($P<0.01$) もしくは 5.0g/kg group ($P<0.01$) にもみ発現上昇がみられ、Man group および CMC group では変化が見られなかった。

1-3-3. 制限給餌に伴うマウス肝臓における時計遺伝子発現の位相変化に対するグルコース連日投与の影響

図8および9から、給餌およびグルコース投与によって、マウス肝臓中の *mPer1* および *mPer2* 遺伝子発現上昇を引き起こすことが判明した。したがって次の実験で私たちは、ZT5(RF開始時間)におけるグルコース連日投与が、RFにより引き起こされた時計遺伝子発現リズム位相変化を維持するかどうか確認した。



- | 処置の種類 | |
|-------|--------------------|
| • | 絶食 (Day1, Day2ともに) |
| • | 給餌 |
| • | 5.0g/kg グルコース(経口) |
| • | 水(経口) |
| • | ゾンデ挿入のみ |
| • | 無処置 (Day1の絶食もせず) |

図7. スケジュール5

1-3. 結果

1-3-1. マウス肝臓におけるグルコースもしくは餌による *mPer1*, *mPer2* mRNA 発現タイムコース

これまでの研究から、日中4時間の制限給餌によって、マウス肝臓における *mPer* 遺伝子発現振動を引き起こす事が出来ることが判明している[16]。よって、一過的な給餌による、マウス肝臓における *mPer* 遺伝子発現への影響を確認する事にした。

Food group において *mPer1* は1時間後、*mPer2* は1時間そして2時間後において発現の上昇が確認された (図 8 B)。

グルコースは餌による体内時計発振調節のための因子であるとの報告があることから [17]、一過的なグルコース投与による、マウス肝臓における *mPer* 遺伝子発現への影響を確認する事にした。

Glucose group において *mPer1* も *mPer2* も1時間そして2時間後において発現上昇が確認された。またゾンデの挿入のみの Handling group では *mPer* への発現への影響は見られなかった (図 8 B)。Water group においては *mPer1* で1時間後に発現上昇が見られた。Food group と Glucose group を比較すると、*mPer2* 発現誘導において給餌がより強い影響力を持っていることが判明した。

マウス肝臓における *mBmal1* の発現においては、Food group と Glucose group どちらも顕著な変化が見られなかった (data not shown)。

1-3-2. マウス肝臓におけるグルコース、マンノースもしくは CMC による *mPer1*, *mPer2* mRNA 発現への影響

図 8. に示したように、Water group において、*mPer1* で1時間後に発現上昇が見られた。このことから、マンノースおよびカルボキシメチル・セルローズ(CMC)のような非栄養性の化合物の *mPer* 遺伝子発現に対する影響を検討した。さまざまな用量のグルコース、マンノースもしくは CMC 投与によって *mPer1* に発現上昇が見られた (図 9 B and C)。対照的に、*mPer2* は Glu 2.0g/kg group ($P<0.01$) もしくは 5.0g/kg group ($P<0.01$) にのみ発現上昇がみられ、Man group および CMC group では変化が見られなかった。

1-3-3. 制限給餌に伴うマウス肝臓における時計遺伝子発現の位相変化に対するグルコース連日投与の影響

図 8 および 9 から、給餌およびグルコース投与によって、マウス肝臓中の *mPer1* および *mPer2* 遺伝子発現上昇を引き起こすことが判明した。したがって次の実験で私たちは、ZT5(RF 開始時間)におけるグルコース連日投与が、RF により引き起こされた時計遺伝子発現リズム位相変化を維持するかどうか確認した。

図 1 0 A は RF group の実験スケジュールを示す。RF group の *mPer1*、*mPer2* および *mBmal1* の発現ピークはそれぞれ、ZT11 から ZT5、ZT17 から ZT11 そして ZT5 から ZT23 へと前進した (図 1 0 B)。

図 1 0 C は、RF 後に水(Water group)かグルコース (Glucose group) 投与を行う実験スケジュールを示す。Two-way-ANOVA 分析(各遺伝子中の処理 x 時間コース)から、Intact group と RF group 間において、*mPer1*($F(3, 28)=15.4$ および $P<0.01$)、*mPer2*($F(3, 28)=21.7$ および $P<0.01$) および *mBmal1*($F(3, 28)=26.9$ および $P<0.01$) と著しく異なる発現を示す事が判明した。したがって、RF により時計遺伝子発現リズム位相変化がおこった事が確認された。

同様に Two-way-ANOVA 分析(各遺伝子中の処理 x 時間コース)から、Water group と Glucose group 間で、*mPer1*($F(3, 30)=5.4$ および $P<0.01$)、*mPer2*($F(3, 30)=3.1$ および $P<0.05$) および *mBmal1*($F(3, 30)=10.0$ および $P<0.01$) と著しく異なる発現を示す事が判明した。Glucose group は RF によって引き起こされた位相を維持する傾向があった一方、Water group 中の時計遺伝子発現は、Intact group のそれに類似することが判った。

1-3-4. 腹腔体温に対するグルコースおよび給餌の影響

Damiola ら[18]は、餌により引き起こされる熱産生が、末梢における RF 性概日リズム発振を引き起こすことができる要因 1 つであることを提案した。したがってこの実験では、グルコース投与が熱産生を引き起こすか否かを確認した。

自由摂食状態におけるマウスの体温は、夜行性動物であるため昼低く夜高い(図 1 1 A)。ところで図 1 1 B は、24 時間絶食したマウスの体温プロフィールである。自由摂食状態におけるマウスの体温同様に、24 時間絶食したマウスの体温は、暗期前半に体温が高いが暗期後半では急激に体温が低下した。

24h 絶食マウスにおいて、ZT 5 に 2 時間給餌 (Food group)、グルコース投与 (Glucose group)、水投与 (Water group) あるいはハンドリング (Handling group) をそれぞれ行った。Handling group と Water group においては体温に顕著な変化は見られなかった(図 1 1 C and D)。Glucose group は、投与後におよそ 1 時間の体温上昇が見られた(図 1 1 E)。Handling group あるいは Intact group と比較して、Food group は摂食期間に著しい体温上昇が見られた(図 1 1 F)。

図 1 1 G は、処理後 120 分間の各群体温変化を示したものである。給餌およびグルコース投与によりそれぞれ約 3° および 1.5° の体温上昇が確認された。Food group および Glucose group の体温上昇と比較して、Intact group そして Water group の温度変化は軽微であった。

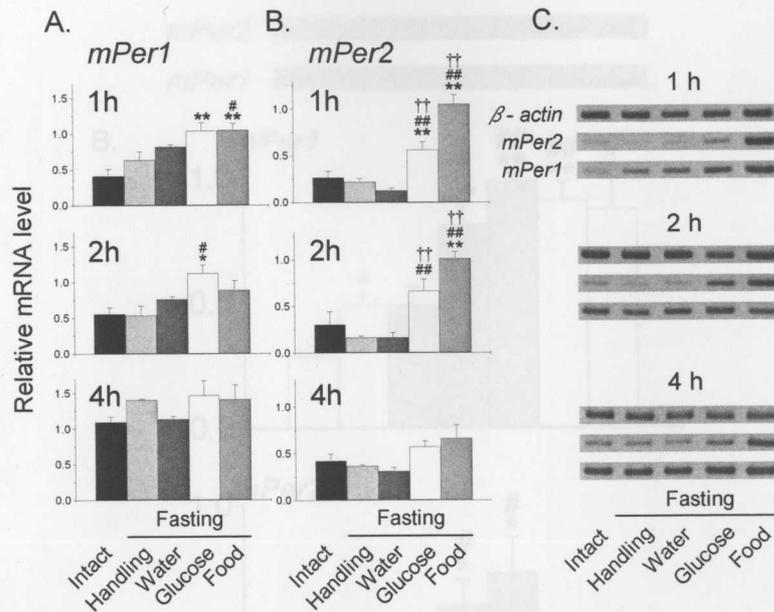


図8. マウス肝臓におけるグルコースもしくは餌によるmPer1,mPer2 mRNA 発現タイムコース
 マウスを24時間絶食後、ZT5に給餌(Food)、もしくはグルコース(5.0g/kg; Glucose group)を処置した。同時に無処置(Intact group)、絶食後ゾンデを挿入しただけ (Handling group)、絶食後水を投与した (Water group)も用意した。マウスの肝臓をZT6(1hr)、ZT7(2hrs)、ZT9(4hrs)にサンプリングし、RNA抽出後、RT-PCRにてmPer1、mPer2、 β -actinの発現量を調べた。
 (A)(B). Relative mRNA levelsをおのおのmPer1、mPer2と β -actinとの比として示した。
 (C). 電気泳動によるmPer1、mPer2、 β -actinの発現量。
 *P<0.05, **P<0.01 vs. Intact. #P<0.05, ##P<0.01 vs. Handling. + P<0.05, ++P<0.01 vs. Water. (Turkey-Kramer).

図9. マウス肝臓におけるグルコース、マンノースもしくはCMCによるmPer1,mPer2 mRNA 発現への影響
 マウスを24時間絶食後、ZT6により、グルコース(0.5g/kg, 2.0g/kg or 5.0g/kg; Glu group)、マンノース(0.0g/kg; Man group)、カルボキシメチルセルロース(0.5%; CMC group)を経口投与した。ハンドリング (Handling group)は24時間絶食後、ゾンデを挿入しただけの群である。マウスはZT6.5にサンプリングしてRNA抽出後、RT-PCRにてmPer1、mPer2、 β -actinの発現量を調べた。
 (A) 電気泳動によるmPer1、mPer2、 β -actinの発現量。
 (B)(C). Relative mRNA levelsをおのおのmPer1、mPer2と β -actinとの比として示した。
 *P<0.05, **P<0.01 vs. Intact. #P<0.05, ##P<0.01 vs. Handling (Turkey-Kramer).

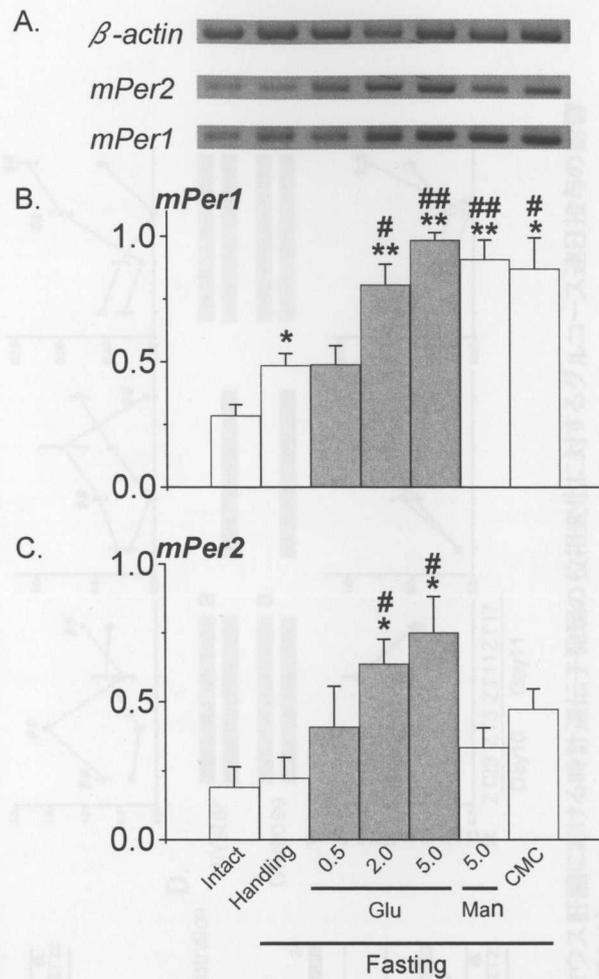


図9. マウス肝臓におけるグルコース、マンノースもしくはCMCによる*mPer1*, *mPer2* mRNA発現への影響

マウスを24時間絶食後、ZT5により、グルコース(0.5g/kg, 2.0g/kg or 5.0g/kg; Glu group)、マンノース(5.0g/kg; Man group)、カルボキシメチルセルロース(0.5%; CMC group)を経口投与した。ハンドリング(Handling group)は24時間絶食後、ゾンデを挿入しただけの群である。

マウスはZT6.5にサンプリングしてRNA抽出後、RT-PCRにて*mPer1*、*mPer2*、 β -*actin*の発現量を調べた。

(A) 電気泳動による*mPer1*、*mPer2*、 β -*actin*の発現量。

(B)(C). Relative mRNA levelsをおのおの*mPer1*、*mPer2*と β -*actin*との比として示した。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. Intact. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs. Handling (Turkey-Kramer).

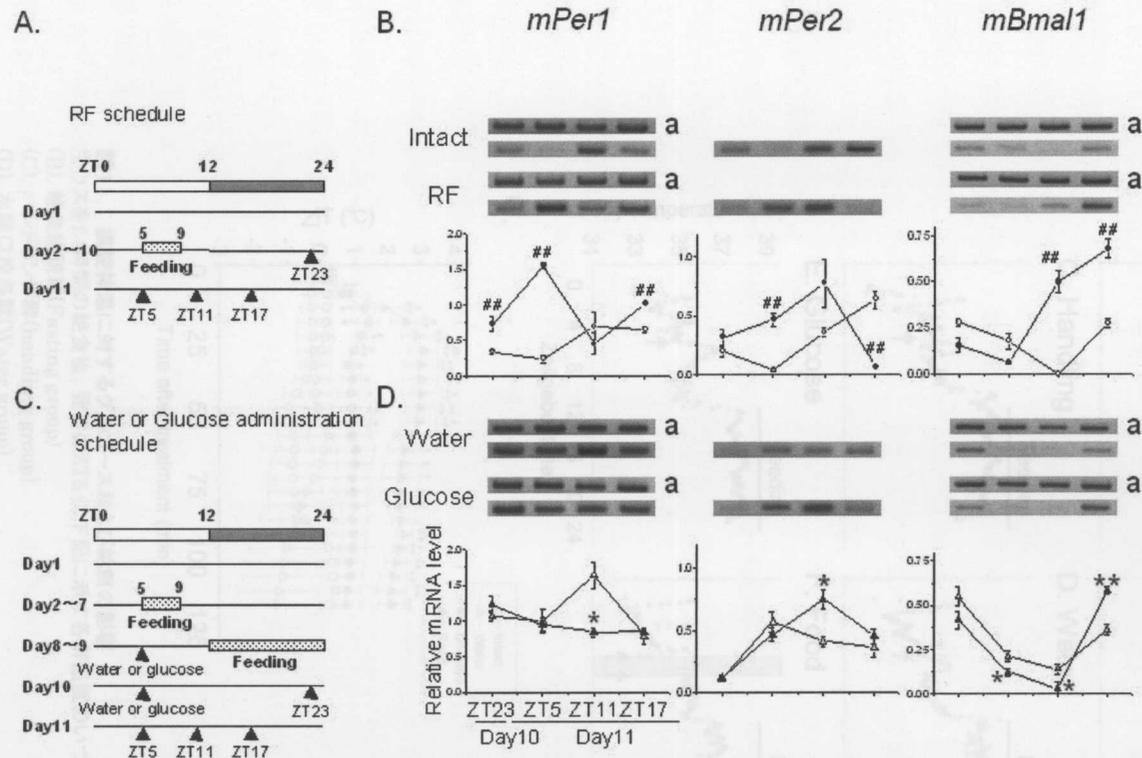


図10. 制限給餌に伴うマウス肝臓における時計遺伝子発現の位相変化に対するグルコース連日投与の影響

(A). 制限給餌(RF group)スケジュール

(C). 水(Water group)およびグルコース(Glucose group)処置スケジュール

無処置(Intact group)を除く全てのgroupはまずスケジュール(A)に従い、Day1からDay7までと同様に処置した。その後、RF groupはスケジュール(A)に従いRFを続け、Water groupおよびGlucose groupはスケジュール(C)に従いDay8-10のZT5にそれぞれ水もしくはグルコースを連日投与した。

(B)(D). マウスはDay10ZT23、Day11ZT5、ZT11、ZT17にサンプリングしてRNA抽出後、RT-PCRにて *mPer1*、*mPer2*、 β -actin(a)の発現量を調べ、Relative mRNA levelsは β -actin(a)との比として *mPer1*、*mPer2*、*mBmal1*について示した(B: ○ = Intactと● = RF group, D: △ = Waterと▲ = Glucose group)。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. Intact (Turkey-Kramer).

1-4. 考察

マウス肝臓における *mPer1* および *mPer2* 発現は、それぞれ ZT 11 および ZT 17 と暗期に発現ピークをもつリズムを示し、以前の報告とも一致した[16、19]。RF スケジュール後である Day11 における *mPer1* と *mPer2* の発現パターンを検討すると、肝臓中の *mPer1* および *mPer2* 発現ピークは、ZT5 から ZT11 に前進しており、以前の研究結果[16]一致した。

今回の実験では、事前に形成された RF スケジュールによるマウス肝臓における時計遺伝子発現位相変化が、RF 終了後も 3 日間の周期的なグルコース投与により維持しうる事が示唆された。Stephen and Davidson [17]の報告によると、RF スケジュールを施した SCN 除去マウスにおいて、RF スケジュールより 8 時間遅れた時間に 2-3 日間グルコースもしくはセルロース投与を行った時、グルコース投与群のみが、8 時間遅れた給餌予知行動を示す。

したがって、今回の結果と合わせて、毎日定時のグルコース摂取は、給餌予知行動および *mPer* 遺伝子発現リズム同調を引き起こす重要な化学的信号を生産するのではないかと考えられる。

しかしながら、自由摂食下にて飼育された無処置マウスに、3 日間定時にグルコース投与を行っても、肝臓における *mPer1* および *mPer2* 発現は変化しなかった(data not shown)。以上のことから、摂食後のグルコース上昇は同調因子ではあるが、単独では末梢時計機構同調の為の十分な因子とはなりえず、一方摂食はそれのみで十分な末梢時計機構同調因子となりうると思われる事ができる。事実、摂食は身体中のグルコースおよびインシュリン、CCK およびセクレチンだけでなく、ガストリンのような胃腸のホルモンの増加および体温上昇などの複数の因子の活性化を引き起こす。

今までのいくつかの報告では、STZ 投与、カプサイシン(交感神経求心路遮断薬)投与、あるいは迷走神経切断術を行った動物においても、ほとんど正常な RF 性給餌予知行動を示した。また RF 性給餌予知行動リズムあるいは遺伝子発現リズムにはインシュリン増加あるいは副交感神経などの関与は弱いと考えられている [20、21、22]。しかしながら、RF 性給餌予知行動に伴って血清コルチコステロンレベルの上昇が見られたとの報告がある[23]。更に、副腎摘除マウスの摂食時間を暗期から明期に変えた時、末梢組織における時計遺伝子発現変化が加速したとの報告もある。したがって、コルチコステロンは RF 性リズム発振にかかわる物質である可能性がある[24]。Balsalobre らは[25]、末梢組織における概日リズムがグルココルチコイドシグナリングによってリセットされることを示した。しかしながら、副腎摘除によって RF 性発振同調が妨げられないことから[26]、末梢シグナルとしてのコルチコステロン機構が中枢 RF 性時計システムを伝達する可能性は少ないと思われる。以上のように給餌性リズム形成にかかわる分子機構は不明なままである。

現在のところ、グルコース連日定時投与による、マウス肝臓における *mPer1* および

*mPer2*の発現同調メカニズムは不明のままである。最近、広田らは、Rat-1 繊維芽細胞においてグルコース添加により *Per1* と *Per2* mRNA 発現レベルが減少することを報告したが[27]、今回の実験では、急性的グルコース投与によりマウス肝臓における *mPer1* および *mPer2* 発現は用量依存的に増加した。広田らの実験においては、*Per1* と *Per2* mRNA 発現レベル減少に新しい RNA およびタンパク質合成の開始を必要としたが、ピルビン酸合成および NADH/NAD⁺比の変化は必要ではなかった。したがって広田らと今回の結果の相違は、in vivo と in vitro のような異なる実験条件によってもたらされたものではないかと考えられる。

今回の実験から、マウス肝臓において、RF による *mPer1* および *mPer2* 発現位相変化は、水投与では維持できず、また RF そしてグルコース誘導性末梢時計発振開始には、グルコースによる *mPer2* 発現上昇が重要であるとの仮説を得た。この仮説は、近年の *mPer1*、*mPer2* ノックアウトマウスによる、SCN の概日コア発振器同調もしくは光による行動位相変化には *mPer1* ではなく *mPer2* が必須である、という報告からも支持される[29, 30]。また今回の実験では、水またはマンノース、CMC 投与により、*mPer2* 遺伝子発現には影響が無かったが、*mPer1* の発現上昇を引き起こした。我々の研究室では、拘束および強制水泳ストレスは、視床下部、末梢肝臓組織および室傍核において *mPer2* 遺伝子発現へは影響を与えず、*mPer1* の発現上昇を引き起こす事を報告した[28]。これらの事から、投与という行為そのものによるストレスが、*mPer1* 遺伝子発現上昇を引き起こした可能性が考えられる。

SCN におけるコア時計機構は、CLOCK と BMAL1 が促進因子、*Per* と *Cry* が抑制因子とされる転写ネガティブフィードバックループを形成すると考えられている[31,32]。また、近年の報告から BMAL1: CLOCK のヘテロダイマー形成は、NADH と NADPH により促進されるが判った[33]。したがって、酸化還元状態は、肝臓のような末梢組織のリズム発振を調節する重要な因子であると考えられる。中枢時計発振メカニズムでは、*mPer1* および *mPer2* など E-Box によって調節される時計遺伝子が、BMAL1:CLOCK によって調節されていると思われる。さらに Diaz-Munos らは、制限給餌されたマウスにおける乳酸塩/ピルビン酸塩の異化優勢状態およびベータヒドロキシブチレート/アセト酢酸塩比率縮小から、肝臓新陳代謝中における細胞質の酸化とミトコンドリアのレドックス状態を示し、これらの変化が給餌後に逆転することを報告した[34]。以上の事から、今回のグルコース投与後の肝臓においては、グルコース上昇により細胞質およびミトコンドリア酸化還元状態が酸化に傾き、BMAL1:CLOCK のヘテロダイマー形成が促進され、*mPer1* および *mPer2* の転写を促進したと考えられる (図 1 2)。

図 1 1. から、絶食はエネルギー消費から暗期から明期まで低体温症を引き起こしたが、摂食もしくはグルコース投与により体温は上昇した。RF スケジュール後連日定時的グルコース投与時にみられた位相変化維持は、摂食による熱産生が末梢概日発振に間

接的に関与し、グルコース投与による熱産生が同様に関与した可能性も考えられる。人間において、炭水化物に富んだ朝食ととると、高体温状態となり体内時計位相が前進する事も実証されている[35]。

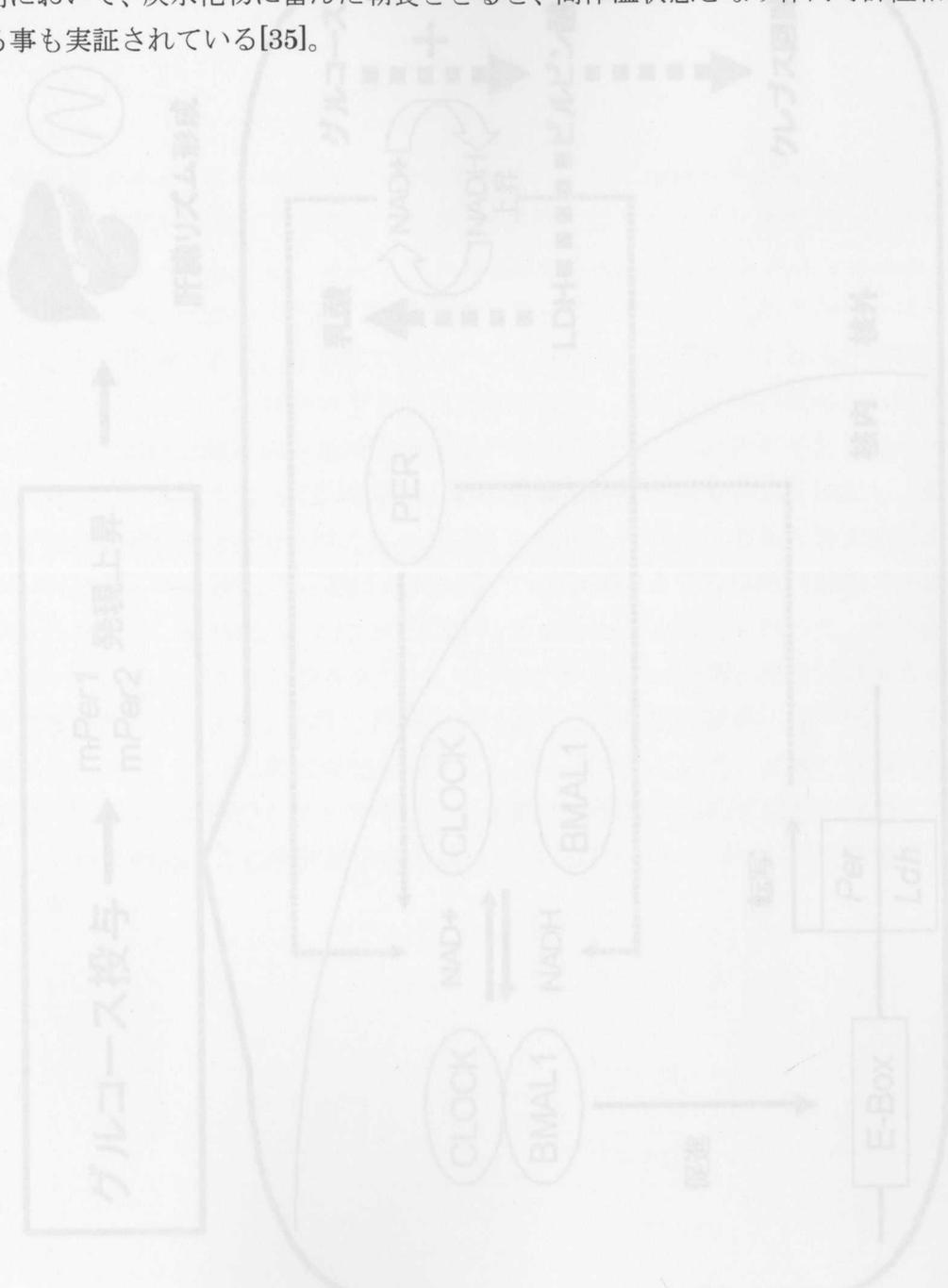


図12. 第1章の実験結果概要

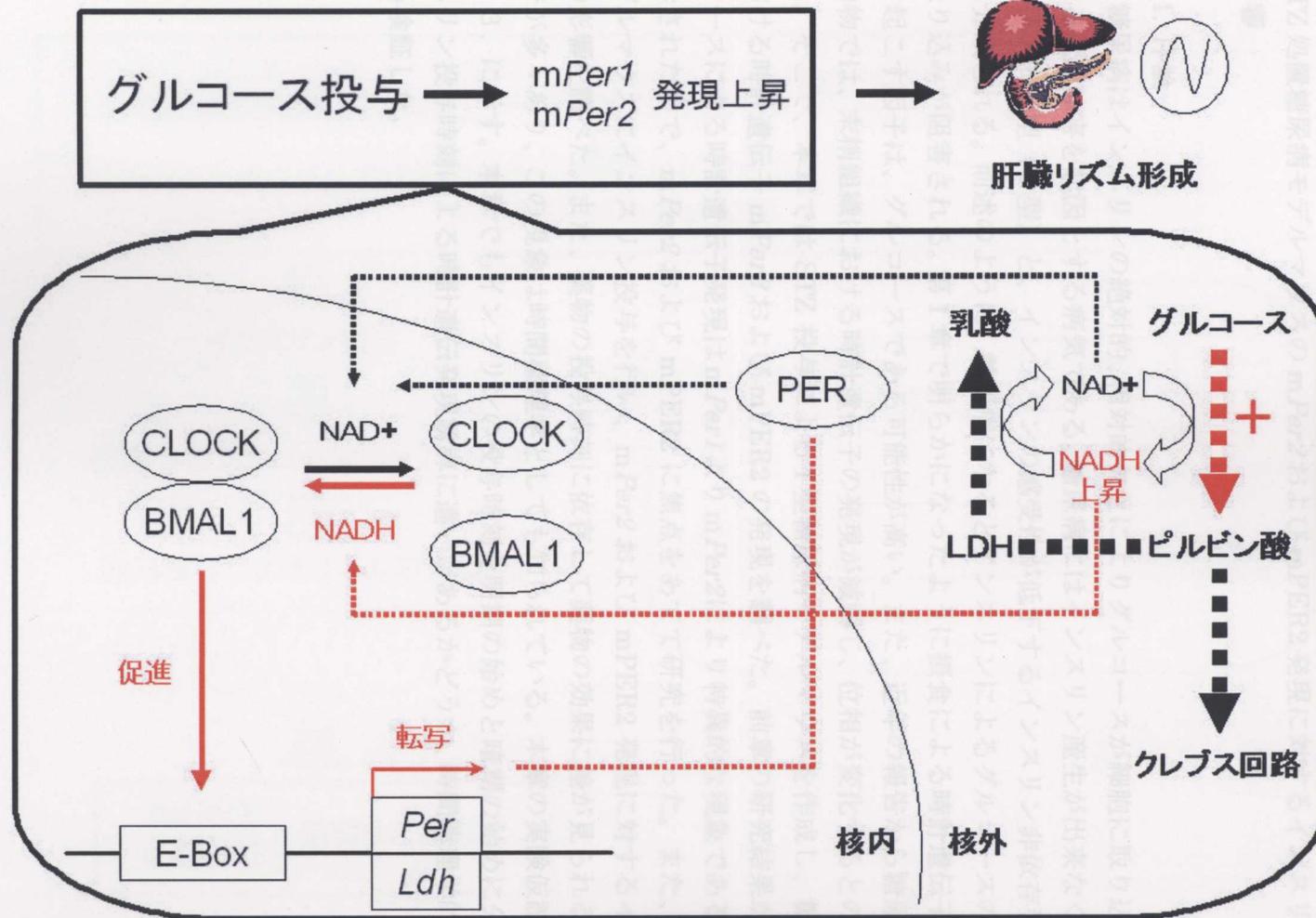


図12. 第1章の実験結果概要