



博士(人間科学)学位論文 概要書

Per1 遺伝子発現動態を指標とした体内
時計の位相変化と老化の研究

Dynamics of *Per1* gene expression in the
phase-shift of circadian clock and the age-
related circadian rhythm disorder.

2003年1月

早稲田大学大学院 人間科学研究科

浅井 良

Asai, Makoto

研究指導教員： 柴田 重信

生物には概日リズムと呼ばれる約 24 時間を 1 周期とするリズム変動がある。概日リズムは体内時計によって刻まれる内因性リズムで、睡眠や体温などの生理現象で観察できる。哺乳類では、体内時計は脳の視床下部領域にある視交差上核 (suprachiasmatic nucleus: SCN) と呼ばれる神経核であることが知られている。現在、*Clock*、*BMAL1*、*Period (Per)*、*Timeless (Tim)* や *cryptochrome (cry)* などの体内時計遺伝子がクローニングされている。これらの体内時計遺伝子による概日リズム形成モデルとして、ネガティブフィードバックループモデルがある。

SCN は外界の明暗周期に同調する機構も備えている。中でも重要なのは光による概日リズムの位相変化 (光同調) である。光同調においてもリズム発振と同様に遺伝子レベルでの研究が進められている。行動で光同調の起きる時刻に光を照射することで、SCN における *mPer1*、*mPer2* mRNA の発現量が一過性に増加したという報告や、光照射による概日リズムの位相後退が *mPer1* のアンチセンスオリゴヌクレオチド投与によって阻害されたという報告がなされている。このことから、光同調には SCN における *mPer1* の一過性の発現が重要であると考えられている。そこで第一章では、*mPer1* のプロモーター領域を持つシフェラーゼ遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウスを用いて、概日リズムの位相変化における *mPer1* 遺伝子の発現の詳細を *in vitro* の実験系で検討した。

ところで、概日リズムにも老化による障害が現れる。老化によるリズム障害については、体内時計遺伝子の発現レベルでの研究はなされていない。そこで第二章では老齢動物を用い、各体内時計遺伝子の発現に対する老化の影響を検討した。

第一章の実験では、体内時計の位相が変化する時、*mPer1* 遺伝子の転写活性はどのような変化を示すのかを調べるため、培養した SCN に NMDA を投与した。培養した SCN からの発光のピークを調べ、その 6 時間後に NMDA を投与すると、次に現れる発光のピークは有意に遅れた。一方、発光のピークから 12 時間後に NMDA を投与すると、位相は前進した。NMDA の投与による位相変化の変化量や、位相が前進するか後退するかは、培養した SCN の概日リズム位相に依存していた。培養下の SCN の概日リズムが位相変化する時、*mPer1* 遺伝子の転写活性がどのように変化するかを検討するため、NMDA を投与して位相変化がおきている周期の生物発光と、その前の周期の通常状態での生物発光の波形を比較した。ピークから 6 時間後に NMDA を投与した時、生物発光の波形は NMDA 投与

後2時間以内に、2-3時間遅く現れた。ピークから12時間後にNMDAを投与した時、生物発光の波形はNMDA投与後2-3時間以内に、約1時間早く現れた。この結果は*mPer1*自身の転写活性のみならず、*mPer1*のプロモーターにおける転写活性の変化も急速であることを示しており、幾つかの体内時計遺伝子が形成している転写-翻訳後フィードバックループによる体内時計の振動のレベルで急速な同調が起こることを示唆している。

第二章の実験では、老齢ラットのSCNにおける*rPer1*, *rPer2*, *rCry1* mRNAの発現量の変動を*in situ* hybridization法によって調べた。また、SCNからの直接の出力が室傍核(paraventricular nucleus: PVN)を介して松果体のメラトニン分泌を制御していることが知られているので、この部位での*rPer1* mRNAの発現量の変動をreverse transcription-polymerase chain reaction法で調べた。その結果、ラットのSCNにおける*rPer1*, *rPer2* mRNAや、PVN、松果体における*rPer1* mRNAの発現に老化の影響は見られなかった。このことから、行動レベルでみられる老化によるリズム障害は、体内時計遺伝子によるフィードバックループにおける障害ではなく、時計に制御された下流の遺伝子発現などに障害が起こった可能性が考えられた。また、光同調における老化の影響を検討するため、SCNの*rPer1*, *rPer2* mRNA発現に対する、光の影響を調べた。その結果、若齢群では光照射によるSCNの*rPer1*, *rPer2* mRNAの急激な発現増加が見られたが、老齢群においては見られなかった。これは*Per*遺伝子の光による発現が老化によって障害されたことを示しており、SCNにおける光による*Per*遺伝子の発現の低下は、老齢動物に見られる行動レベルでの光同調障害の原因である可能性が示された。