Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-05

Per1 and Per2 gene expression in the rat suprachiasmatic nucleus : Circadian profile and the compartment-specific response to light

閻, 莉莉

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
2000-09-30
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲2173
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002173

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

【60】

氏　名・(本　籍)　閻　莉　莉（中　国）

博士の専攻分野の名称　　博　士　（医　学）

学　位　記　番　号　　博い第１２９８号

学位授与の　要　件　　学位規則第４条第１項該当

学位授与の　日　付　　平成１３年３月３１日

【学位論文題目】

***Per1* and *Per2* gene expression in the rat suprachiasmatic nucleus:**

Circadian profile and the compartment-specific response to light
（ラット視交叉上核における*Per1*及び*Per2*遺伝子の発現
：概実リズムと光による誘導）

審　査　委　員

主査　教授　岡村　均

教授　寺島　俊雄　　教授　久野　高義

序言

遺伝子の発現から行動様式の変動に至るまで、地球上に存在する生物は約 24 時間周期で変動する生命現象を示す。これをサーカディアンリズム（circa 約、dian 一日；約一日のリズム）と言うが、この時間の駆動機構、つまり生物時計（biological clock）が、哺乳類においては視床下部にある小さな神経核である視交叉上核（suprachiasmatic nucleus）に存在する事は、周知の事実である。哺乳類の体内時計の分子機構は長い間全く未解明の状態であったが、三年前 period , clock 等哺乳類時計遺伝子が相次いでクローニングされたことにより、時間現象を遺伝子レベルで検索する道がひらかれた。今回我々はラットの period 遺伝子群のうち rPer1、rPer2 をクローニングし、これらの遺伝子がの視交叉上核における時間特異的な発現と光による誘導発現を検索した。今回の検索においては、視交叉上核の部位特異性に着目し、リズム発振の新しい仮説を提示した。

方法

Wistar 系雄性ラット生後５週齢を、１２時間明（４００ルクス）/１２時間暗の明暗条件（LD）で２週間飼育した後、実験に供した。恒常暗条件の実験は、明暗条件から恒常暗条件（DD）に移した後、第２日目で実験を行った。日内変動は ZT0（ZT = Zeitgeber time、ZT0 は明期の開始点、ZT12 は暗期の開始点）、または、CT0（CT = Circadian time、CT0 は主観的明期の開始点、CT12 は主観的暗期の開始点）から４時間ごとに検索した。光パルスの実験は、恒常暗条件第２日目の CT16 から CT16.5 の 30 分間に６００ルクスの蛍光灯を照射し行った。試料採取は、照射開始後 25、45、60、75、90、150、270 分後行った。試料採取に当たっては、上記特定時間に、動物をエーテル深麻酔後、４％パラフオルムアルデヒド含有 0.1M リン酸緩衝バッファーで貫流固定し、１２時間浸漬固定を行った後、in situ hybridization を行った。定量的な実験は ^{33}P で標識した rPer1、rPer2 アンチセンス・プローブ を用いた。局所発現の実験は Digoxigenin 標識のプローブを用いた。プローブの特異性は以下の３方法で確かめた。1. 同部位のセンス・プローブ で標識が認められない、2. RNase 処理した切片で陽性シグナルは消失する、3. 同部位の非標識アンチセンス・プローブ を加えると、非標識プローブの濃度依存性にシグナルが減弱する。

結果

1. ラットSCNにおけるrPer1 geneの発現リズム

明暗条件と恒常暗条件で、rPer1 mRNAの視交叉上核での発現を検索すると、明暗条件ではrPer1 mRNAはZT4の時最高値をとり、ZT16で最低値を示す著明な日内リズムを示した。恒常暗条件ではrPer1 mRNAはCT8に最高値、CT16—CT20に最低値をとる著明なサーカデイアンリズムを示した。明暗条件でもと恒常暗条件でもrPer1 mRNAの最高値と最低値の間は約5倍差があり、最高値を示すZT4とCT8の値はほぼ同じレベルであった。この事は、行動リズムと同様、視交叉上核でのrPer1 mRNAの発振メカニズムは恒常暗条件似ても安定である事を示している。

2. ラットSCNにおけるrPer2 geneの発現リズム

rPer1と同じく明暗条件と恒常暗条件にて、rPer2 mRNAの視交叉上核での発現を検索した。rPer2 mRNAは明期（主観的明期）に入ると急速に上昇し始め、ZT12（CT12）にてピークに達し、暗期（主観的暗期）に入ると急速に降下する著名なリズムを示した。しかし、明期は発現量は暗期より多く、定量的統計学分析すると、約2倍差があった。rPer2 mRNAはLDにて、変動幅は約5倍あり、DD条件にて変動幅は約3倍であった。

3. 主観暗期におけるrPer1、rPer2 mRNA発現の光照射による変動

主観暗期CT16に３０分６００ルクスの光パルスを与えた時の視交叉上核におけるrPer1とrPer2 mRNAの発現を検索した。rPer1 mRNAは無処置ではCT16の時全く発現していないが、光パルスを与えて、２５分後発現し始め、７５分後ピークに達し、２７０分後光照射前のレベルに戻る。rPer2 mRNAはCT16では視交叉上核に低いレベルで発現しているが、光照射後75分から150分の間発現量が上昇するが、その発現の上昇程度はrPer1 mRNAに比し弱かった。

4. 光照射によるrPer1、rPer2 mRNA発現の視交叉上核での神経核内局在

視交叉上核においては、rPer1 mRNAはZT4ではほとんどの細胞に、神経核内サブデイビジョンなく一様に発現が認められた。ZT20で発現が認められ

た細胞はまばらであった。CT16 で光照射を行って１時間目に検索した群においては、視交叉上核の腹外側部に最も強く、背内側に行くに従って現弱しており、背内側部には全く認められなかった。光照射のない条件では、rPer2 mRNA は ZT12 では視交叉上核全体での発現が認められたが、ZT16 と ZT20 で発現が認められた細胞は背内側部に限局し、腹外側部での発現はなかった。光照射９０分後で発現は極大に達するが、光照射を行わなかったものとを比べて見ると、腹外側部における rPer2 mRNA の発現は著しく増強した。

考察

今回我々は、ラット視交叉上核における rPer1、rPer2 遺伝子発現の日内リズムと光による発現誘導を検索した。明暗条件と恒常暗条件にて、rPer1、rPer2 mRNA の発現は著名なリズムを示した。主観的暗期に３０分の光パルスを与えると、視交叉上核における rPer1,rPer2 mRNA の発現の上昇が認められ、視交叉上核内の細胞は光に反応するタイプと反応しないタイプ二種類に分けられる事が明らかにした。

ラット視交叉上核における rPer1、rPer2 の発現のパターンは、基本的にはマウスの相同遺伝子の発現パターンと同じであった。即ち、Per1 は Per2 より発現位相が少し早い事は同じである。しかし、恒常暗条件下ではピークの値は２—４時間ラットの方がマウスより遅い傾向があった。これは、暗期開始後２日目で実験しているので、サーカデイアンの周期の差（マウスは約 23.5 時間、ラットは約 24.5 時間）が反映しているのかも知れない。また、主観的暗期早期における光による Per1、Per2 の誘導はラットでも認められたが、その程度はマウスよりも弱かった。これは、行動位相の変動がサーカデイアン周期の短い動物では暗期早期の光に位相後退が起こりやすく、周期の長い動物は暗期後期の光刺激による位相前進が起こりやすい事と関係すると考えられる。

視交叉上核は、哺乳類の行動及び内分泌リズムの最高位中枢であり、この部位が破壊されると、これらは全く消失する。環境の明暗サイクルの変動は，光受容器（photoreceptor）（哺乳類では眼球の網膜の視細胞）が感受し電気信号に変換され、情報は網膜を出て、視神経中の retinohypothalamic tract (RHT)、geniculohypothalamic tract (GHT) を介して直接または間接に視交叉上核の体内時計に伝えられる。これにより、環境時間へ体内時計の時刻を同調（entrainment）させている。一般に哺乳類においては、１回の光照射によっては３時間以上位相変位が起こらないことが知られており、アカパンカビの様な大規模な時間の位相変位は起こさない。

今回、光パルスを与えると、視交叉上核内の時計遺伝子 rPer1 および rPer2 の誘導発現が腹外側部の細胞に局在し、背内側部の細胞に認めなかった。この非発現領域が内因性リズムを持つとされるバソプレッシンニューロンと、発現細胞が光り入力依存性の VIP 及び GRP ニューロンと一致する事は極めて興味深い。この事から、我々は、視交叉上核に2種類の時計細胞を想定し、位相変位機序に関する次のような仮説を考えている。一つは光非感受性の TypeA 時計細胞であり、もう一つは光感受性の TypeB 時計細胞である。通常の明暗サイクルや恒常暗条件下では、両者はシンクロナイズしながら、時計蛋白質によって決定された時間位相を、視交叉上核全体として他の脳部位へ時間の出力をする。光刺激による位相変異時は、TypeB 細胞の位相が一時的にずれるが、TypeA 時計細胞は通常通りの位相を示しているので、両者の電気的なカップリングで位相のずれは縮小され、出力が行われる。視交叉上核内の両者の局在を検証すると、TypeA 時計細胞は背内側部に、TypeB 時計細胞は腹外側部に存在する。この仮説が成立する前提としてには、ショウジョウバエやアカパンカビのように時計遺伝子から発現する蛋白質の量（この場合は rPer1 の量）が時計の位相を決定することを前提としている。今後、in vivo のみならず in vitro のリズム実験系を組み立て、この仮説を検証していきたい。

神戸大学大学院医学系研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 1299 号	氏　名	閻　莉莉
論文題目	*Per1* and *Per2* gene expression in the rat suprachiasmatic nucleus: Circadian profile and the compartment-specific response to light ラット視交叉上核におけるPer1及びPer2遺伝子の発現：概日リズムと光による誘導		
審査委員	主　査　岡村　均 副　査　寺島俊雄 副　査　久野高義		
審査終了日	平成 12 年 7 月 24 日		

（要旨は1，000字～2，000字程度）

地球上に存在する生物は約２４時間周期で変動する生命現象を示す。これをサーカディアンリズムと言うが、この時間を発振する生物時計（biological clock ）は、哺乳類においては視床下部にある小さな神経核である視交叉上核（suprachiasmatic nucleus）に存在する。視交叉上核における哺乳類の生物時計の分子機構は長い間全く不明であったが、三年前period , clock 等哺乳類時計遺伝子が相次いでクローニングされたことにより、この機序解明が急速に進展しはじめた。今回著者らはラットのperiod遺伝子群のうちrPer1、rPer2をクローニングし、リズムセンターである神経核内における時間特異的な発現と光による誘導発現を検索し、視交叉上核の部位特異性を発見し、リズム発振の新しい仮説を提示した。

[材料および方法]

Wistar系雄性ラット生後５週齢を、12時間明/ 12時間暗の明暗条件で２週間飼育した後、実験を行った。恒常暗条件の実験は、明暗条件から恒常暗条件に移した後、第２日目で実験を行った。日内変動はZT0（ZT = Zeitgeber time、ZT0は明期の開始点、ZT12は暗期の開始点）、または、CT0（CT = Circadian time、CT0は主観的明期の開始点、CT12は主観的暗期の開始点）から４時間ごとに検索した。光パルスの実験は、恒常暗条件第２日目のCT16からCT16.5の30分間に６００ルクスの蛍光灯を照射し行った。試料採取は、照射開始後25、45、60、75、90、150、270 分後行った。試料採取に当たっては、動物をエーテル深麻酔後、４％パラフオルムアルデヒド含有0.1Mリン酸緩衝バッファーで固定し、^{33}P標識またはDigoxigenin 標識の特異的 rPer1、rPer2 アンチセンス・プローブを用いた in situ hybridization を行った。

[結果および考察]

明暗条件と恒常暗条件で、rPer1 mRNAの視交叉上核での発現を検索すると、明暗条件ではrPer1 mRNAはZT4の時最高値をとり、ZT16で最低値を示す著明な日内リズムを示した。恒常暗条件ではrPer1 mRNAはCT8に最高値、CT16—CT20に最低値をとる著明なサーカディアンリズムを示した。明暗条件でもと恒常暗条件でもrPer1 mRNA の最高値と最低値の間は約５倍差があり、そして最高値を示すZT4とCT8の値はほぼ同じレベルであった。rPer2 mRNAは明期（主観的明期）に入ると急速に上昇し始め、ZT12（CT12）にてピークに達し、暗期（主観的暗期）に入ると急速に降下する著名なリズムを示した。以上のように、ラット視交叉上核におけるrPer1、rPer2の発現のパターンは、基本的にはマウスの相同遺伝子の発現パターンと同じであった。即ち、Per1はPer2より

発現位相が少し早い事は同じである。しかし、恒常暗条件下ではピークの値は２—４時間ラットの方がマウスより遅い傾向があった。これは、暗期開始後２日目で実験しているので、サーカデイアンの周期の差（マウスは約23.5時間、ラットは約24.5時間）が反映しているのかも知れない

主観暗期CT16に３０分６００ルクスの光パルスを与えた時の視交叉上核におけるrPer1とrPer2 mRNA の発現を検索した。rPer1 mRNAは無処置ではCT16の時全く発現していないが、光パルスを与えて、２５分後発現し始め、７５分後ピークに達し、２７０分後光照射前のレベルに戻る。rPer2 mRNAはCT16では視交叉上核に低いレベルで発現しているが、光照射後75分から150分の間発現量が上昇するが、その発現の上昇程度はrPer1 mRNAに比し弱かった。このラットにおける主観的暗期早期における光によるPer1、Per2の誘導程度はマウスよりも弱かった。これは、行動位相の変動がサーカデイアン周期の短い動物では暗期早期の光に位相後退が起こりやすく、周期の長い動物は暗期後期の光刺激による位相前進が起こりやすい事と関係すると考えられる。

視交叉上核においては、rPer1 mRNA はZT4ではほとんどの細胞に、神経核内サブデイビジョンなく一様に発現が認められた。ZT20で発現が認められた細胞はまばらであった。CT16で光照射を行って１時間目に検索した群においては、視交叉上核の腹外側部に最も強く、背内側に行くに従って現弱しており、背内側部には全く認められなかった。光照射のない条件では、rPer2 mRNA はZT12では視交叉上核全体での発現が認められたが、ZT16と ZT20で発現が認められた細胞は背内側部に限局し、腹外側部での発現はなかった。光照射９０分後で発現は極大に達するが、光照射を行わなかったものとを比べて見ると、腹外側部におけるrPer2 mRNA の発現は著しく増強した。

以上の結果から、視交叉上核に２種類の時計細胞を想定し、位相変位機序に関する次のような仮説を考えている。一つは光非感受性の背内側部のTypeA 時計細胞であり、もう一つは光感受性の腹外側部のTypeB時計細胞である。通常の明暗サイクルや恒常暗条件下では、両者はシンクロナイズしながら、時計蛋白質によって決定された時間位相を、視交叉上核全体として他の脳部位へ時間の出力をする。光刺激による位相変異時は、TypeB細胞の位相が一時的にずれるが、TypeA時計細胞は通常通りの位相を示しているので、両者の電気的なカップリングで位相のずれは縮小され、出力されると考えられる。

本研究は、概日リズムに伴う時計遺伝子Per1, Per2の発現を、時計発振センターである視交叉上核で詳細に検討したものであるが、従来ほとんど行われなかった視交叉上核における二種類の時計発振機構を明らかにした、重要な価値ある業績であると認められる。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。