



Rhythmic expression of $ROR\beta$ mRNA in the mice suprachiasmatic nucleus

角, 泰雄

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2002-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2462

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002462>

※ 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。



【 9 8 】

氏 名・(本 籍) 角 泰雄 (兵庫県)

博士の専攻分野の名称 博 士 (医学)

学 位 記 番 号 博い第 1 4 2 0 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 1 4 年 3 月 3 1 日

【学位論文題目】

**Rhythmic expression of ROR β mRNA in the mice
suprachiasmatic nucleus**

(マウス視交叉上核における ROR β mRNA の
周期的発現の研究)

審 査 委 員

主査 教授 岡村 均

教授 黒田 嘉和

教授 寺島 俊雄

はじめに

哺乳類における多くの生理学的または行動学的な現象は、日々のサイクルにおいてリズムカルに起きている。このリズムは、視床下部の視交叉上核に存在する分子発振器によって引き起こされる。生物時計が分子レベルで解明されるにつれ、視交叉上核に位置し中心となる時計のコアになる発振原理が、一連の時計遺伝子の相互に作用するポジティブあるいはネガティブなフィードバック機構からなることがわかってきたが、その全貌はまだ解明されていない。

電気生理学的あるいは代謝系において、視交叉上核における強いリズム発現のキーとなる分子を発見するために、我々は以前から RT-PCR 法による differential RNA display 法を採用し、視交叉上核に発現する転写因子の候補をいくつか分離してきた。同時に我々は、DBP のような視交叉上核に発現する既知の転写因子の概日リズムも調べている。最近、transactivation domain、DNA-binding domain、ligand-binding domain からなる通常のもジュール構造を有する retinoid-related orphan receptor (ROR) の super family のひとつである ROR β が、ラットの視交叉上核に局在することがわかった。今回の研究において我々は、マウスの脳における ROR β の発現、さらにはその概日リズムを定量的な in situ hybridization の手法を用いて調べた。

対象と方法

生後 5 週の雄 Balb-C 系マウスを 12 時間・12 時間の明暗条件下で 2～4 週間飼育し最後の明暗サイクル後に、恒常暗条件下に移した。ROR β mRNA の発現は、最後の明暗サイクルと恒常暗サイクル 2 日目において

ZT0 (ZT = Zeitgeber time; ZT0 は明期開始時であり、ZT12 は明期終了時を示す)、CT0 (CT = circadian time; CT0 は主観的夜明けであり、CT 12 は主観的日暮れを示す) をスタート点とし 4 時間毎に調べられた (各 $n=5$)。光刺激に対する誘導実験は恒常暗条件下 2 日目の CT16 に 600 lux の光を 30 分間照射し、照射前、30 分後、60 分後、3 時間後にエーテル麻酔下に 4% パラホルムアルデヒドを左心房より注入して灌流・固定し、断頭した (各 $n=5$)。マウスの ROR β の cDNA 断片 (position 1518-1958) を PCR を用いて増幅し、cRNA 合成のプロトコールに従って 33P-UTP にてラベルした antisense 及び sense probe を作成し、浮遊法による in situ hybridization を行った。フィルムオートラジオグラフィの後、フィルム上の各視交叉上核の radioactivity を MCID を用いて定量した。各点 10 枚ずつの切片 (40 μ m) の視交叉上核の radioactivity を合計した。これらの値は、光照射を行っていない CT4 の平均値を 100 とした “relative RNA abundance” で表した。

結果

1) ROR β mRNA のマウスの脳における局在について

前脳部において、大脳皮質の IV-V 層に高レベルで発現していた。その発現は、体性感覚皮質、運動皮質、後頭皮質を含む新皮質で強かった。視交叉上核においても非常に強く発現していた。視床室傍核、内側膝状体、上丘の浅灰白層、脊髄後角においては、中等度のレベルで発現していた。視床前背側核、内側乳頭体核の外側部分、上部延髄の前庭神経核では、発現レベルは低かった。

2) 視交叉上核における ROR β mRNA の radioactivity の解析

視交叉上核では夜間より日中の方が高く、さらに定量的 in situ hybridization 方によって詳しく解析すると明確な概日リズムがみられた。明暗条件では、ROR β mRNA の量は午前中に着実に増加し、ZT4 で最も高くなった。その後、減少を始め ZT16 で最低となった。恒常暗条件においても ROR β mRNA の量には概日リズムがみられ、CT4 で最高値となり CT16 で最低値となった。ROR β mRNA の最高値は、最低値の約 1.6 倍であった。

3) 光刺激による ROR β mRNA の誘導性

光刺激から 1 時間以内では、ROR β mRNA の発現に変化はなかった。3 時間後における ROR β mRNA の増加の平均値は、光刺激のない通常の概日リズムにおける増加レベルと類似していた。

考察

ROR 受容体は、ROR α 、ROR β 、ROR γ からなる Superfamily を形成し、それらは Rev- α 、Rev-erb β によって形成される DNA 配列にモノマーとして結合する。ROR α 、ROR γ が末梢に多量に発現するにも関わらず、ROR β の発現は脳、網膜、松果体に限られている。今回、我々の研究で、ROR β は視交叉上核、大脳の新皮質の IV、V 層、内側膝状体、上丘、視床室傍核、脊髄後角を含む多くの脳の部分に発現することが解明された。このマウスの脳における ROR β の分布の結果は、ラットの脳における分布と大体一致していた。(ただし、内側乳頭体核の発現に関しては、ラットにおいては記載がない。)

今回の定量的 in situ hybridization の解析によって、マウスの視交叉上核における ROR β の明確な概日リズムの発現が示されたが、その

振幅はそれ程大きくはなかった。視交叉上核における ROR β mRNA は、明暗条件及び恒常暗条件のいずれにおいても昼間（主観的明期）に高く、夜間（主観的暗期）において低いということが分かった。周囲の明暗環境は視交叉上核における ROR β の発現には影響を及ぼさなかった。昼間に最高となり、夜間に最低となる視交叉上核における光刺激に左右されない発現パターンは、dbp、vasopressin といったいずれも時計によってコントロールされている遺伝子でも観察されている。さらに、松果体と網膜においてもリズムのある発現がみられていることから、おそらく転写因子と考えられている ROR β は、生体活動の中心部における概日リズムの生理的発現制御機構の一端を担っていると考えられた。

哺乳類の概日リズムの研究は近年著しい進歩を遂げ、遺伝子レベルでの解析が進んでいる。時計を発振する遺伝子とこれを修飾する遺伝子がお互いにフィードバックグループを形成することによって概日リズムが成立するわけである。マウスにおいて時計発振遺伝子と考えられているものは Per1、Per2 である。時計によりコントロールされる遺伝子であると考えられる、今回調べられた ROR β は、このような時計発振遺伝子の転写を修飾し、発振そのものに関与するのかもしれない。今後、この遺伝子と哺乳類の行動リズムのフィードバック機構の関係を探りたい。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲第 1435 号	氏 名	角 泰雄
論文題目	Rhythmic expression of RORβ mRNA in the mice suprachiasmatic nucleus マウス視交叉上核における RORβ mRNA の周期的発現の研究		
審査委員	主 査 岡村 均 副 査 黒田嘉和 副 査 寺島俊雄		
審査終了日	平成 14 年 2 月 22 日		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

電気生理学的あるいは代謝系において、視交叉上核における強いリズム発現のキーとなる分子を発見するために、我々は以前から RT-PCR 法による differential RNA display 法を採用し、視交叉上核に発現する転写因子の候補をいくつか分離してきた。同時に我々は、DBP のような視交叉上核に発現する既知の転写因子の概日リズムも調べている。最近、transactivation domain、DNA-binding domain、ligand-binding domain からなる通常のもジュール構造を有する retinoid-related orphan receptor (ROR) の super family のひとつである ROR β が、ラットの視交叉上核に局在することがわかった。今回の研究において我々は、マウスの脳における ROR β の発現、さらにはその概日リズムを定量的な in situ hybridization の手法を用いて調べた。

結果は以下のようである。

1) ROR β mRNA のマウスの脳における局在について

前脳部において、大脳皮質のIV-V層に高レベルで発現していた。その発現は、体性感覚皮質、運動皮質、後頭皮質を含む新皮質で強かった。視交叉上核においても非常に強く発現していた。視床室傍核、内側膝状体、上丘の浅灰白層、脊髄後角においては、中等度のレベルで発現していた。視床前背側核、内側乳頭体核の外側部分、上部延髄の前庭神経核では、発現レベルは低かった。

2) 視交叉上核における ROR β mRNA の radioactivity の解析

視交叉上核では夜間より日中の方が高く、さらに定量的 in situ hybridization 方によって詳しく解析すると明確な概日リズムがみられた。明暗条件では、ROR β mRNA の量は午前中に着実に増加し、ZT4 で最も高くなった。その後、減少を始め ZT16 で最低となった。恒常暗条件においても ROR β mRNA の量には概日リズムがみられ、CT4 で最高値となり CT16 で最低値となった。ROR β mRNA の最高値は、最低値の約 1.6 倍であった。

3) 光刺激による ROR β mRNA の誘導性

光刺激から1時間以内では、ROR β mRNA の発現に変化はなかった。

3時間後における ROR β mRNA の増加の平均値は、光刺激のない通常の概日リズムにおける増加レベルと類似していた。

ROR 受容体は、ROR α 、ROR β 、ROR γ からなる Superfamily を形成し、それらは Rev- α 、Rev-erb β によって形成される DNA 配列にモノマーとして結合する。ROR α 、ROR γ が末梢に多量に発現するにも関わらず、ROR β の発現は脳、網膜、松果体に限られている。今回の定量的 *in situ* hybridization の解析によって、マウスの視交叉上核における ROR β の明確な概日リズムの発現が示されたが、その振幅はそれ程大きくはなかった。視交叉上核における ROR β mRNA は、明暗条件及び恒暗条件のいずれにおいても昼間（主観的明期）に高く、夜間（主観的暗期）において低いということが分かった。周囲の明暗環境は視交叉上核における ROR β の発現には影響を及ぼさなかった。昼間に最高となり、夜間に最低となる視交叉上核における光刺激に左右されない発現パターンは、dbp、vasopressin といったいずれも時計によってコントロールされている遺伝子でも観察されている。さらに、松果体と網膜においてもリズムのある発現がみられていることから、おそらく転写因子と考えられている ROR β は、生体活動の中心部における概日リズムの生理的発現制御機構の一端を担っていると考えられた。

本研究は、ROR β の視交叉上核での発現を検討したものであるが、従来ほとんど行われなかった retinoid-related orphan receptor のリズムセンターでの発現機構を初めて明らかにした、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。