

平成10年度厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）

研究課題名

生体リズム発振機構とリズム障害  
の分子基盤に関する研究

平成11年3月

主任研究者

岡村 均

(神戸大学医学部教授)

## 総括研究報告書

### 生体リズム発振機構とリズム障害の分子基盤に関する研究

主任研究者 岡村 均 神戸大学医学部教授

〔研究要旨〕 新しい時計遺伝子mPer3, mTimをマウス脳にて同定し、その発現を検索した。mPER3はmPER1, mPER2よりやや小さく、ショウジョウバエdPerの特徴とされるPASドメインと cytoplasmic localization domain構造が保存されている。mPer3は視交叉上核においては、明暗条件下、恒常暗条件下でもmPer1, mPer2と同様、「昼時計」型のリズムを示すが、mPer1, mPer2と異なり、夜にもかなり発現しており、昼夜での振幅は小さい。mTimの発現は、視交叉上核では一定であった。また、光刺激がどのようにしてリズムセンターのある視交叉上核の細胞の時間を動かすのかを報告した。

〔分担研究者〕 柴田重信（早稲田大学人間科学部教授）、井上慎一（山口大学理学部教授）

#### A. 研究目的

哺乳類の生体リズム発振機構を分子レベルで解明するとともに、リズム障害の分子機序を明らかにする。

#### B. 研究方法

ショウジョウバエ時計遺伝子Period, Timelessの哺乳類ホモログを単離し、その発現、生体リズムとの関連を追求する。

#### C. 結果

我々はまず新しい時計遺伝子mPer3, mTimをマウス脳にて同定した。mPer3はmPer1, mPer2と同様、機能ドメインとされるPAS, CLDは良く保存されていた。mPer3は視交叉上核においては、明暗、恒常暗両条件下でもmPer3は明期に高いが、発現のピークは著しくない。mTimは一日中発現は変動しなかった。光刺激は両遺伝子の発現に全く影響を与えなかった。さらに、アンチセンスプロンプの脳内注入により、光による行動位相の変動は防止できた。

#### D. 考察

以上の結果は、哺乳類リズム発振においてもmTimやmPer遺伝子群が中核的な働きをする可能性を示唆する。

#### E. 結論：

この哺乳類mTim, mPer遺伝子群の検索結果を端緒にして、新しい情報発振系、情報伝達系を伴う「時計遺伝子」機構の全貌を解明する事は十分可能であると想定される。

#### F. 研究発表（主任研究者論文発表）

1 Tamada Y, Tanaka M, Munekawa K, Hayashi S, Okamura H, Kubo T, Hisa Y, Ibata Y: Neuron-glia interaction in the suprachiasmatic nucleus: a double labeling light and electron microscopic immunocytochemical study in the rat. *Brain Res. Bull.*, 45: 281-287, 1998.

2 Takumi T, Matsubara C, Shigeyoshi Y,

Taguchi K., Yagita K, Maebayashi Y, Sakakida Y, Okumura K, Takashima N, Okamura H: A New Mammalian Period Gene Predominantly Expressed in the Suprachiasmatic Nucleus. *Genes Cells*, 3: 167-176, 1998.

3 Kitahama K, Ikemoto K, Jouvet A, Nagatsu I, Geffard M, Okamura H, Pearson J: Dopamine synthesizing enzymes in paraventricular hypothalamic neurons of the human and monkey (*Macaca fuscata*). *Neurosci. Lett.*, 243: 1-4, 1998.

4 Nishimura I, Uetsuki T, Dani SU, Ohsawa Y, Saito I, Okamura H, Uchiyama Y, Yoshikawa K: Degeneration in vivo of rat hippocampal neurons by wild-type Alzheimer amyloid precursor protein overexpressed by adenovirus-mediated gene transfer. *J. Neurosci.*, 18: 2387-2398, 1998.

5 Takumi T, Taguchi K, Miyake S, Sakakida Y, Takashima N, Matsubara C, Maebayashi Y, Okumura K, Takekida S, Yamamoto S, Yagita K, Yan L, Young ML, Okamura H: A light independent oscillatory gene *mPer3* in mouse SCN and OVL. *EMBO J.*, 17: 4753-4759, 1998.

6 Okuda S, Shigeyoshi Y, Hisa Y, Nagatsu I, Chihara K, Nagamatsu S, Okamura H: Forebrain expression of GLUT3 mRNA in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Biogenic Amines*, 14: 581-590, 1998.

7 Ibata Y, Okamura H, Tanaka M, Tamada Y, Hayashi S, Iijima N, Matsuda T, Takamatsu T, Hisa Y, Shigeyoshi Y, Amata F: Functional morphology of the suprachiasmatic nucleus. *Front. Neuroendocrinol.*, in press.

8 Yan L., Takekida S., Shigeyoshi Y. and Okamura H.: Per1 and Per2 gene expression in the rat suprachiasmatic nucleus: circadian profile and the compartment-specific response to light. *Neuroscience*, in press

9 岡村 均：時計遺伝子：生体リズムの分子機構。呼吸, 17, 1064-1071, 1998.

10 内匠透, 岡村 均：体内時計とその遺伝子。細胞工芸学, 17, 1954-1062, 1998.

11 重吉康史, 岡村 均：視交叉上核の細胞構築, 「生物時計の分子生物学」(海老原史樹文, 深田吉孝編), シュプリンガー・フェアラーク東京 159-168頁, 1999.

12 内匠透, 岡村 均：転写因子による生物時計の制御。実験医学, 1999, 17, 372-378.

13 岡村 均, 重吉康史, 内匠透, 山口瞬, 八木田和弘：哺乳類時計遺伝子mPer. *Molecular Medicine*, 1999 (印刷中)

## 分担研究報告書

### 生体リズム発振機構とリズム障害の分子基盤に関する研究

分担研究者 柴田 重信 早稲田大学人間科学部教授

**研究要旨** mPerアンチセンスオリゴヌクレオチドの光同調抑制作用の作用点が視交叉上核にあることを明らかにするため、グルタミン酸による視交叉上核神経活動の位相変化に対するmPer1アンチセンスオリゴヌクレオチドの効果を脳スライスを用いたin vitroの系で検討した。光照射による行動の位相変化がmPer1のアンチセンスオリゴヌクレオチド注入により拮抗されるか否かについて調べた。アンチセンスオリゴヌクレオチドの脳室内投与は用量依存的に光照射による位相後退を拮抗した。通常ZT16でグルタミン酸を作用させると神経活動のピークは2.5時間後退させるが、mPer1アンチセンスはこの位相変動を抑制した。従って、グルタミン酸のリセットはmPer1のリセットを伴うことが明らかとなった。

#### A. 研究目的

いぜん我々はmPer1, mPer2アンチセンスオリゴヌクレオチドの脳室内投与が光による行動リズムの位相変化を抑制することを見いだした。mPerアンチセンスオリゴヌクレオチドの光同調抑制作用の作用点が視交叉上核にあることを明らかにするため、グルタミン酸による視交叉上核神経活動の位相変化に対するmPer1アンチセンスオリゴヌクレオチドの効果を脳スライスを用いたin vitroの系で検討した。

#### B. 研究方法

Balb/c miceを用い、12時間12時間の明暗サイクル下で飼育し、明期前半で視交叉上核を含む脳スライスを作成し、インキュベートした。mPer1アンチセンスオリゴヌクレオチド20mMを含む栄養液中に移すことを行った。

#### C. 研究成果

アンチセンスオリゴヌクレオチドの脳室内投与は用量依存的に光照射による位相後退を拮抗した。通常ZT16でグルタミン酸を作用させると神経活動のピークは2.5時間後退させるが、mPer1アンチセンスはこの位相変動を抑制した。

#### D. 考察

光同調のみでなくグルタミン酸によるリズムの位相変動には、mPer1のmRNAのアンチセンスオリゴヌクレオチド投与により光同調が阻止されることにより、光が関与することが明らかとなった。

#### E. 結論

グルタミン酸のリセットはmPer1のリセットを紹介することが明らかとなった。

#### F. 研究発表

1. I.Hamada T., Kako T., Wakamatsu H., Shibata S., Watanabe S., Ishida N., Diurnal regulation of a DNA binding protein to the period repeat sequence in the SCN nuclear extract of rat brain. *Mol. Brain Res.*, 65:211-215, 1999

2. 柴田重信, 守屋孝洋, 生物時計の分子生物学, シュプリンガ-社「細胞内情報伝達」、178-188, 1999
3. Shishido Y, Furushiro M, Tanabe S, Taniguchi A, Hashimoto S, Yokokura T, Shibata S., Yamamoto T, Watanabe S Effect of ZTTA, a prolyl endopeptidase inhibitor, on memory impairment in a passive avoidance test of rats with basal forebrain lesions. *Pharm Res* 15:1907-10, 1998
4. 柴田重信, 光とメラトニン, *ファルマシア* 34, 45-49, 1998
5. Akiyama M., Moriya T, Takahashi S., Kouzu Y., Wakamatsu H., Shibata S., Inhibition of light- or glutamate-induced mPer1 expression represses the phase shifts into the mouse circadian locomotor and suprachiasmatic firing rhythms. *J. Neurosci.*, 19, 1115-1121, 1999
6. 柴田重信, 生体リズムと薬物, *日本精神神経薬理雑誌*, 印刷中, 1999
7. 柴田重信, 概日リズムと細胞内信号, *生体の科学*, 印刷中, 1999
8. Moriya T., Ikeda M., Yoshinobu Y., Akiyama M., Shibata S., Potentiating action of MKC-242, a selective 5-HT1A receptor agonist, on the photic entrainment of the circadian activity rhythm in hamsters. *Br. J. Pharmacol.* 125, 1281-1287, 1998.
9. 秋山正志, 守屋孝洋, 柴田重信, 生体時計の生理学的, 薬理学的, 分子生物学的解析 *日薬理誌*, 112, 243-250, 1998
10. 柴田重信, 記憶と生物時計, *科学*, 68, 160-164, 1998
11. Hamada T., Sonoda R., Watanabe A., Ono M., Watanabe S., Shibata S., NMDA-induced glutamate release from a rat suprachiasmatic nucleus in vitro. *Neurosci. Lett.*, 256, 93-96, 1998
12. Ikeda M., Asai M., Moriya T., Inoue S., Shibata S., Methylcobalamine amplifies melatonin-induced circadian phase shifts by facilitation of melatonin synthesis in the rat pineal gland. *Brain Res.*, 795, 98-104, 1998
13. Nishikawa Y., Shibata S., Shimazoe T., Watanabe S., N-methyl-D-aspartate receptors are indispensable for the formation of long-term potentiation in the rat suprachiasmatic nucleus in vitro. *Brain Res.*, 782, 303-305, 1998

## 分担研究報告書

### 生体リズム発振機構とリズム障害の分子基盤に関する研究

分担研究者 井上慎一 山口大学理学部教授

#### 研究要旨

ラットrPer1のアンチセンスを視交叉上核へのカニューレーションを介して直接マイクロインジェクションを行った。CT12からCT17の投与では行動リズムの位相が後退し、CT21からCT0では前進した。また、CT16の光パルスによる行動リズムの位相変化量について、アンチセンスオリゴヌクレオチドをCT14に投与しておいた場合、コントロール群との差は見られないが、CT10に投与しておいた場合、有意に小さくなった。これらの結果から、rPer1アンチセンスオリゴヌクレオチドは行動リズムの位相変化を引き起こし、また、光パルスによる位相後退を抑制することがわかった。

#### A. 研究目的

ショウジョウバエの体内時計遺伝子periodのホモログが哺乳類で発見された(mPer1)。この遺伝子のmRNA量は哺乳類の生物時計の中核である視交叉上核で、昼は高くよるには低いはっきりとした概日リズムを示す。また、主観的夜の光パルスによってmPer1 mRNA量は増加し、夜前半の光パルスでmPer1 mRNAのリズム位相が後退することも報告された。これらのことから、mPer1遺伝子は生物時計を構成する分子であり、重要な役割を果たしていることが予測される。そこで、我々はラットrPer1のアンチセンスを視交叉上核へのカニューレーションを介して直接マイクロインジェクションを行い、行動リズムに現れる影響を調べた。

#### B. 研究方法

実験にはWistar系ラットを用い、外科的手術によってカニューレガイドを視交叉上核付近まで挿入した。

#### C. 研究結果

CT12からCT17の投与では行動リズムの位相が後退し、CT21からCT0では前進した。また、CT16の光パルスによる行動リズムの位相変化量について、アンチセンスオリゴヌクレオチドをCT14に投与しておいた場合、コントロール群との差は見られないが、CT10に投与しておいた場合、有意に小さくなった。

#### D. 考察

これらの結果から、rPer1アンチセンスオリゴヌクレオチドは行動リズムの位相変化を引き起こし、また、光パルスによる位相後退を抑制することがわかった。

#### E. 結論

上記の結果は、アンチセンスオリゴヌクレオチドの性質から考えて、Per1遺伝子産物は、生物時計の概日リズムの生成機構または光情報の伝

達系に参与している可能性がある。

#### F. 研究発表

##### (1) 論文発表

Shinohara, K., Tominaga, K. and Inouye, S.-I. T. Luminance-dependent decrease in vasoactive intestinal polypeptide in the suprachiasmatic nucleus, *Neuroscience Letters*, 251, 21-24, 1998.

Shinohara, K., Tominaga, K. and Inouye, S.-I. T. Phase dependent response of vasoactive intestinal polypeptide to light and darkness in the suprachiasmatic nucleus, *Neurosci. Res.*, In press

井上慎一 生物時計の中核、視交叉上核。メディカルビューポイント3: 5, 1998.

井上慎一 サーカディアンリズム発現の分子機構。内分泌・糖尿病科6: 462-470, 1998.

井上慎一 視交叉上核1998. 日本時間生物学学会誌4: 2-8, 1998.

井上慎一 体内時計の分子機構 Annual Review 内分泌, 代謝1999:70-77, 1999.

井上慎一 物質変動 生物時計の分子生物学 (海老原, 深田編) シュプリンガーフェアラーク 東京・P169-178, 1999.

##### (2) 学会発表

濱本洋介、原田由美子、井上慎一、光情報の視交叉上核への伝達におけるVIP(vasoactive Intestinal Peptide)の役割、第21回日本神経科学第41回日本神経化学合同大会、抄録p401 *Neurosci. Res.* S22 1998, s216

原田由美子、井上慎一、ICERトランスジェニックマウスの松果体におけるメラトニンリズム、第21回日本神経科学第41回日本神経化学合同大会、抄録p403 *Neurosci. Res.* S22 1998, s219

T. Matsuo M. Kadota Y. Harada S. Shibata H. Okamura S. T. Inouye: Microadministration of Per1 antisense oligonucleotide into the SCN: Effects on the rat activity rhythms and c-fos induction by light, U.S./Japan workshop on Molecular Chronobiology, 1998, abstract p12