



## 哺乳類の体内時計を構成する2つの概日リズム振動機構の発見

### 研究成果のポイント

- ・ 自由行動下マウスの脳内時計遺伝子<sup>注1)</sup> *Per1*, *Bmal1* 発現リズムの計測に成功。
- ・ マウス活動リズムの活動開始は *Per1* 発現リズムと、休息開始は *Bmal1* 発現リズムと一致して変動。
- ・ 哺乳類の体内時計は、*Per1* と *Bmal1* 遺伝子が各々関与する2つの分子時計とそれらを同調させる神経ネットワークからなる。
- ・ 2つの分子時計の発見は、時差ボケや睡眠リズム障害の原因解明や治療法の開発に貢献。

### 研究成果の概要

睡眠・覚醒をはじめ、ヒトの体の機能は約24時間周期のリズムを示します。このリズムは「概日リズム」と呼ばれ、複数の時計遺伝子の分子フィードバックループ<sup>注2)</sup>により制御されていると考えられています。これまで、時計遺伝子はいずれも同一のリズム周期を示すと考えられてきましたが、今回、本間客員教授らの研究グループは、無麻酔・無拘束マウスを用い、概日時計が存在する視交叉上核<sup>注3)</sup>の *Per1*, *Bmal1* と呼ばれる2つの遺伝子発現を長期間計測し、光刺激によってリズム位相が変化する際に両遺伝子のリズムが乖離すること、また培養視交叉上核で両遺伝子が異なるリズム周期を示すことを発見しました。さらに夜行性のマウスの行動リズムにおける活動開始は *Per1* リズムと、休息開始は *Bmal1* リズムと一致して変動することを明らかにし、*Per1* は生物時計を構成する夕時計（活動開始を制御）、*Bmal1* は朝時計（休息開始を制御）の構成要素であることを示しました。本研究は、自由行動中のマウス脳内の遺伝子計測と、発光・蛍光イメージングと電気活動計測を組み合わせた多機能同時計測システムの開発により、哺乳類の概日時計に関わる2つの時計遺伝子が独自の振動機構を持つことを明らかにした世界で初めての研究成果であり、概日リズム振動機構理解の進展と、睡眠覚醒の制御メカニズムに迫る成果であると言えます。

### 論文発表の概要

研究論文名 : Dissociation of *Per1* and *Bmal1* circadian rhythms in the suprachiasmatic nucleus in parallel with behavioral outputs (一日の活動リズムの開始・終了は、視交叉上核における時計遺伝子 *Per1* と *Bmal1* の概日リズムと一致して変動する)

著者 : 小野大輔 (名古屋大学), 本間さと (北海道大学), 中島芳浩 (産業技術総合研究所), 黒田 茂 (北海道大学), 榎木亮介 (北海道大学), 本間研一 (北海道大学)

公表雑誌： *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*（米国科学アカデミー紀要）

公表日：2017年4月18日(火)午前4時（米国東部時間2017年4月17日(月)午後3時）

## 研究成果の概要

### （背景）

ヒトを含め地球上のほぼすべての生物には、1日24時間のリズムが存在します。これを「概日リズム」と呼び、睡眠覚醒をはじめとする様々な生理現象が周期的に繰り返されます。哺乳類の場合は、脳内の視床下部に位置する「視交叉上核」が体内時計中枢として概日リズムを調節し、細胞レベルでは複数の時計遺伝子の転写・翻訳を介した分子フィードバックループによりおよそ24時間のリズムが形成されていると考えられています。その中でも *Period (Per)* 遺伝子と *Bmal1* 遺伝子は約12時間の位相差のあるリズムを刻むことが明らかにされています。これまでの研究から *Per* を中心としたフィードバックループに対し、*Bmal1* のフィードバックループが協調的に作用し、一つのリズムが形成されると考えられてきました。

### （研究手法と成果）

本間客員教授らの研究グループは、異なる波長で発光する2種の生物発光タンパク質を用い、時計遺伝子 *Per1* と *Bmal1* の遺伝子発現量を、自由行動下マウスの視交叉上核から計測すると同時に、外界の光環境変化によりマウスの体内時計をシフトさせました。光により活動リズムが後退シフトする場合は、活動開始時間は外界の環境変化にすぐ適応するのに対し、睡眠開始時間は数日をかけて適応することが分かっていますが、その際 *Per1* 発現リズムは活動開始時間と一致して、*Bmal1* 発現リズムは睡眠開始時間と一致して変化することを発見しました（図1）。この結果は、2つの遺伝子発現が外界の光環境変化に対して一時的に乖離し、さらに *Per1* は活動の開始を制御する夕時計に、*Bmal1* は休息開始を制御する朝時計に、それぞれ関与していることを示します。

次に本間客員教授らの研究グループは、発光波長が異なる2つの発光酵素タンパク質を用い、発光量の変動を測定することで *Per1* と *Bmal1* の2遺伝子の発現量を測定できる遺伝子改変マウスを作成し、2つの遺伝子発現リズムを視交叉上核で同時に計測しました。その結果、*Per1* と *Bmal1* の概日リズムの周期が異なることを発見しました（図2）。さらに発光タンパク質だけでなく、蛍光カルシウムセンサーの遺伝子導入と、多数の神経細胞から電気活動を測定できる多電極ディッシュ<sup>注4</sup>を用い、時計遺伝子 *Per1*, *Bmal1* 発現量、細胞内カルシウムの変化量、神経活動の4つの機能の同時計測を世界で初めて行いました。その結果、細胞内で発振されたリズムの出力信号として知られている細胞内カルシウムと神経活動の概日リズムは同じ周期を示し、かつ *Per1*, *Bmal1* のどちらにも一致せず中間の周期を示すことが分かりました。

### （今後への期待）

本研究から、生物時計の振動原理と考えられている時計遺伝子のフィードバックループに、異なる2つの振動系が関与していること、また、視交叉上核の神経活動や細胞内カルシウムは分子フィードバックループだけでなく、神経ネットワークの概日リズムの影響を強く受けることが明らかとなりました。体内時計中枢が、分子レベル、ネットワークレベルで階層的な構造を持つことが初めて明らかになり、今後の体内時計や睡眠研究の進展が期待できます。また多機能を同時に計測する本研究手法は、今後の生命科学分野の研究を大きく飛躍させる手法と言えます。

## お問い合わせ先

北海道大学脳科学研究教育センター 客員教授（招聘教員）本間 さと（ほんま さと）

TEL : 011-706-4778 FAX : 011-706-4737 E-mail : sathonma@med.hokudai.ac.jp

ホームページ : <https://www.chronomedicine-sapporo.com/>

### [用語解説]

#### 注1) 時計遺伝子 :

約24時間の概日リズムを形成するために必要と考えられている遺伝子群。

#### 注2) 分子フィードバックループ :

時計遺伝子の転写と翻訳により生じたタンパク質が自らの転写を抑制することで、自律的にタンパク質合成に約24時間のリズムが生じるメカニズム。概日リズムを形成する分子メカニズムとして考えられている。

#### 注3) 視交叉上核 :

脳底部で視神経が交叉する視交叉の上に位置する神経細胞の集合。哺乳類における体内時計の中核。

#### 注4) 多電極ディッシュ :

アルファメッドサイエンティフィック社から販売されている神経活動計測用の培養皿。中心部位に64個の電極が敷き詰められており、神経細胞を培養しながら神経活動を計測することが可能。

[参考図]

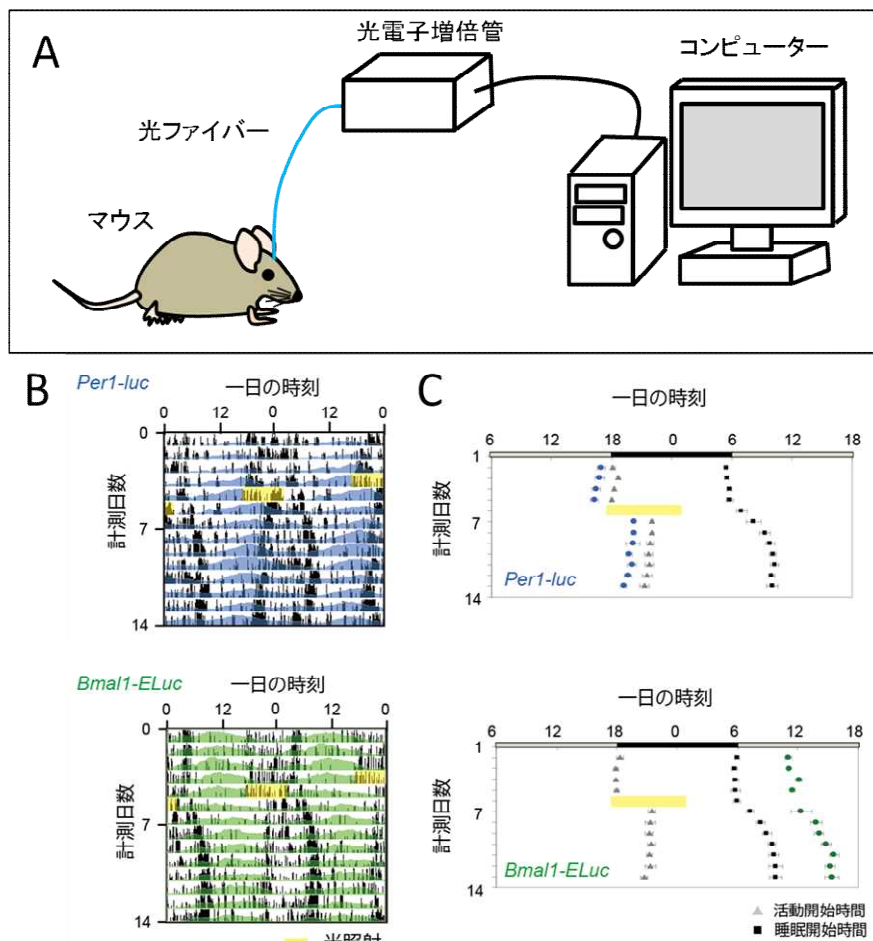


図 1 : 自由行動下マウス脳内の時計遺伝子発現計測

(A) 光ファイバーを用いた *in vivo* (生体内) 遺伝子発現計測の模式図。

(B) 視交叉上核の時計遺伝子 *Per1* (青) と *Bmal1* (緑) と行動量 (黒) の同時計測。黄色い網掛けは光照射の時間を示す。

(C) 活動開始時間を灰色三角, 睡眠開始時間を黒色四角, *Per1* 遺伝子発現リズムを水色丸, *Bmal1* 遺伝子発現リズムを緑丸で示す。活動開始と *Per1* 発現は同じように変化し, 睡眠開始時間と *Bmal1* 発現は同じように変化している。

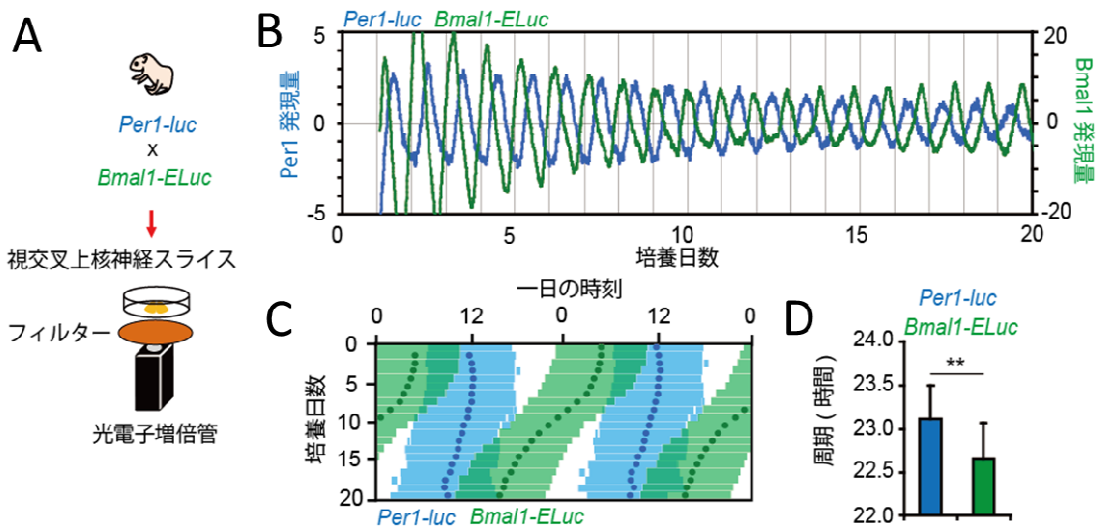


図 2 : 自由行動下マウス脳内の時計遺伝子発現計測

- (A) *Per1-luc*と*Bmal1-ELuc*の2つの遺伝子が入ったトランスジェニックマウス視交叉上核からの*Per1*, *Bmal1* 遺伝子発現計測の模式図。
- (B) 視交叉上核からの*Per1* (青), *Bmal1* (緑) 発現計測結果。
- (C) 視交叉上核からの*Per1* (青), *Bmal1* (緑) 発現計測をダブルプロットで表示。それぞれの遺伝子のピーク位相を丸でプロットしている。培養期間中, *Per1* と *Bmal1* のリズム位相が乖離している。
- (D) *Per1* と *Bmal1* の概日リズム周期。両者は異なる周期を示す。