



無拘束マウスの脳内遺伝子発現のリアルタイム計測に成功

研究成果のポイント

- ・ 光ファイバーを用いて無拘束マウス脳内の遺伝子発現と自発行動の長期同時計測に成功。
- ・ 生体内における 3 種の時計遺伝子^{注1} 発現リズムは培養条件と比べ位相が異なる。
- ・ 自由行動下の視交叉上核^{注2}の時計遺伝子発現は約 24 時間と数時間の 2 種の異なる周期のリズムを示す。

研究成果の概要

睡眠・覚醒をはじめとして、生体の機能には約 24 時間のリズム（サーカディアンリズム）が存在し、哺乳類におけるその中枢（生物時計）は間脳視床下部の視交叉上核にあります。サーカディアンリズムは、複数の時計遺伝子とそれらの転写翻訳産物であるタンパク質で制御される分子フィードバックループ^{注3}により発振されると考えられています。近年の遺伝子操作技術により、時計遺伝子の発現パターンをホタルの発光酵素を用いて調べることが可能となりました。しかしながら、これまでは、自由に行動している無拘束動物の遺伝子発現を長期計測することは不可能でした。本研究では、光ファイバーによる微量発光計測系^{注4}と動物に負担をかけない測定システムを開発し、自由行動マウスの視交叉上核から 3 種の時計遺伝子の発現パターンを自発行動と同時に、リアルタイムで、3 週間以上連続して測定することに成功しました。その結果、生体内におけるこれら時計遺伝子の発現が、サーカディアンリズムを示すことを確認し、さらに、時計遺伝子発現には振動周期が数時間の短周期リズム（ウルトラディアンリズム）が存在することを世界で初めて明らかにしました。また培養条件下で見られるサーカディアンリズムが、生体内で見られるサーカディアンリズムよりも 2~3 時間ほど前進していることも分かりました。光ファイバーを用いた新たな手法により、生体の特定部位で発現する遺伝子レベルの動的変化をとらえることを可能とした本研究成果は、無麻酔・無拘束下での遺伝子発現を分単位の高時間分解能で解析する新たな研究基準を提示したと言えます。

本研究は、文部科学省 先端融合領域イノベーション創出拠点形成プログラム補助金により実施されました。

論文発表の概要

研究論文名 : Circadian and ultradian rhythms of clock gene expression in the suprachiasmatic nucleus of freely moving mice (自由行動中のマウス視交叉上核の時計遺伝子発現にみられるサーカディアンとウルトラディアンリズム)

著者 : 小野大輔 (北海道大学大学院医学研究科連携研究センター光バイオイメージング部門), 本間研一, 本間さと (北海道大学大学院医学研究科時間医学講座)

公表雑誌 : *Scientific Reports*

公表日 : 日本時間 (現地時間) 2015 年 7 月 22 日 (水) 午後 1 時 (米国東部時間 2015 年 7 月 21 日 (火))

研究成果の概要

(背景)

睡眠・覚醒, 体温などの様々な生理機能は 1 日の単位で変化しています。この現象をサーカディアンリズムと呼び, 哺乳類ではその中枢 (サーカディアン時計) が視床下部視交叉上核にあることが知られています。サーカディアンリズムは複数の時計遺伝子群の転写と, その産物 (タンパク質) が関与するネガティブフィードバックループにより発振されると考えられています。遺伝子工学技術の革新に伴い, ホタルの発光酵素を遺伝子導入したマウスの組織を用い, 発光輝度を計測することで遺伝子発現をリアルタイムでモニターすることが可能となりました。しかしながら, これまでの発光計測は, 培養組織, あるいは麻酔した個体からの断続的な計測に限られ, 無拘束で自由に行動する動物の遺伝子発現を経時的に測定し, 行動などの生理機能を同時に評価することはできませんでした。

(研究手法と結果)

私たちは, 自由行動マウスにおける遺伝子発現のリアルタイム計測に挑戦し, 活動している個体における遺伝子機能を明らかにする技術を開発しました。本研究では, ホタルの発光酵素を導入した遺伝子改変マウスの脳内に光ファイバーを挿入し, サーカディアン時計が存在する視交叉上核から遺伝子発現に伴って生じる光の量を, 光電子増倍管を用いて 1 分毎に連続計測しました。極めて微弱な生物発光を定量化するため, 光電子増倍管を冷却することで, 低ノイズかつ安定化し, バックグラウンドレベルを低く保ちました。このシステムを用い, 自由行動マウスの視交叉上核において主要な 3 つの時計遺伝子 *Per1*, *PER2*, *Bmal1* の発現リズムと行動の同時記録を連続 3 週間以上行うことに成功しました。無麻酔・無拘束マウスの視交叉上核時計遺伝子発現リズムに比較すると, 培養した脳スライスのリズムは, いずれも 2~3 時間位相が前進していることが分かりました。これは脳神経組織を培養条件下に移したことによるものと考えられます。驚いたことに, 自由行動マウスの視交叉上核では, 時計遺伝子発現に約 24 時間周期のサーカディアンリズムに加え, およそ 3 時間周期の短周期リズム (ウルトラディアンリズム) が存在し, その振幅は各遺伝子発現のサーカディアンリズムがピークを示す時間帯に増加することが分かりました。このウルトラディアンリズムは培養視交叉上核では認められないため, 生体内でのみ生じる現象であると考えられます。

(今後への期待)

睡眠・覚醒を含めた個体レベルで生じる生理現象を遺伝子, 細胞レベルで理解するためには, 培養実験だけでは不十分であり, 個体内 (*in vivo*) の実験が必須となります。本研究で用いた無麻酔・無

拘束マウスにおける遺伝子発現のリアルタイム計測法は、様々な生体機能の分子レベルの解明、疾病の発症や治療効果の長期にわたる判定を可能とし、生体における薬物動態や薬物スクリーニングなどの創薬研究に貢献できると考えます。

お問い合わせ先

北海道大学 未来創薬・医療イノベーション推進室 [広報担当：和田]

TEL: 011-706-7798 FAX :011-706-7799 E-mail: innovation@cris.hokudai.ac.jp

ホームページ : <http://www.cris.hokudai.ac.jp/cris/innovahome/index.html>

【用語解説】

注 1) 時計遺伝子 :

約 24 時間のサーカディアン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) 視交叉上核^{しこうきょうかく} :

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。

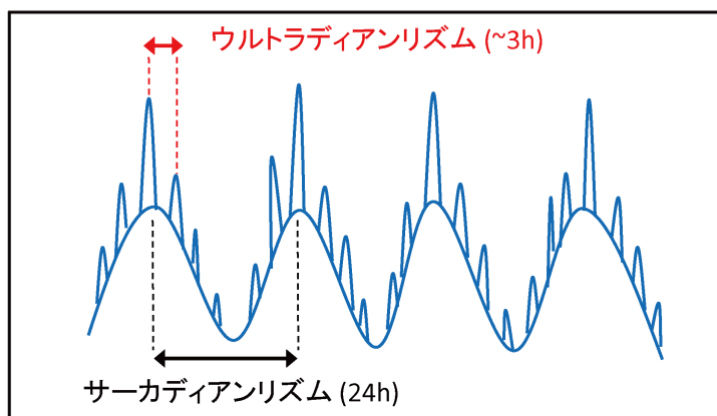
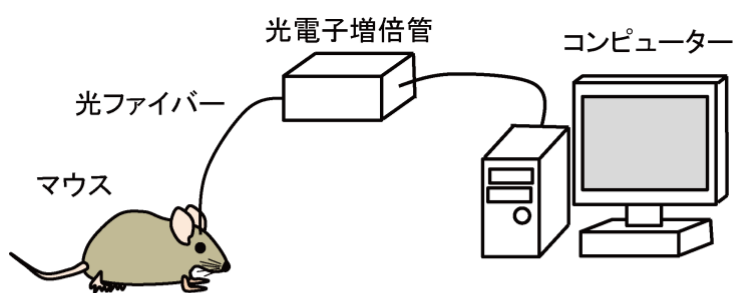
注 3) 分子フィードバックループ :

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こと。サーカディアン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 4) 微量発光計測系 :

ホタルが光るための発光反応を利用して、ある目的の遺伝子の転写活性を、光の強さを計測することでリアルタイムにモニターすることができる計測システム。

【概念図】



- (上) 光ファイバーを用いた無麻酔・無拘束マウス脳内視交叉上核からの時計遺伝子発現と自発行動のリアルタイム計測の概念図。
- (下) 個体内 (*in vivo*) では、時計遺伝子発現に約 24 時間周期のサーカディアンリズムと約 3 時間のウルトラディアンリズムが存在する。