

学位論文題名

Circadian pattern, light responsiveness and localization of *rPer1* and *rPer2* gene expression in the rat retina

(ラット網膜における *rPer1*, *rPer2* 遺伝子発現のサーカディアン変動, 光反応性及び発現部位)

学位論文内容の要旨

[はじめに]

睡眠覚醒、ホルモン分泌など、様々な生体機能にみられるサーカディアンリズムは間脳視床下部視交叉上核 (SCN) に存在する生物時計に支配されている。

ショウジョウバエにおいてサーカディアンリズムに異常をもつ変異体より発見された時計遺伝子 *Period* (*Per*) の相同遺伝子群 (*Per1*, *Per2*, *Per3*) が哺乳類でクローニングされ、哺乳類のサーカディアンリズムの形成に重要な役割を果たしていると考えられている。一方、変異誘発剤投与により得られたリズム変異マウスより時計遺伝子 *Clock* がクローニングされ、bHLH/PAS 型転写因子をコードすることが明らかにされた。さらに、同じく bHLH/PAS 型転写因子をコードする時計遺伝子 *BMAL1* 遺伝子が発見され、これら時計遺伝子産物がヘテロダイマーを形成し、*Per* 遺伝子の転写を促進することが明かにされた。また、*Per* 遺伝子産物は *CLOCK/BMAL1* の作用を阻害することにより、*Per* 遺伝子自身の発現を抑制することが明らかになった。このネガティブフィードバックループが、サーカディアンリズムの発現に必須であると考えられている。これらの時計遺伝子は、SCN において、それぞれ固有のサーカディアン変動をもって発現している。

一方、培養条件下において、ハムスター網膜はメラトニン分泌にサーカディアンリズムを示すことが報告され、ハムスター網膜には視交叉上核とは異なるサーカディアン振動体が存在することが示唆された。さらに、時計遺伝子は、視交叉上核以外の脳部位や網膜、抹消組織にも発現していることが明かとなり、部位特異的なサーカディアン振動体として機能している可能性がある。そこで、時計遺伝子の網膜における役割を検証するために、網膜における時計遺伝子 *rPer1* と *rPer2* の発現局在、サーカディアン変動及び光反応性を検討した。

[方法]

明暗条件下 (明期 6~18 時) で飼育した 2 ヶ月齢のウイスター系雄ラットを恒常暗条件下に移し、3 日後に実験を行った。光照射群は 6 時点 (4, 8, 12, 16, 20, 24 時) で 300 lux の光を 30 分間照射し、照射終了 30 分後に断頭した。非光照射対照群は 3 日間恒常暗条件下に移した後、前述の 6 時点で光照射することなしに断頭した。非光照射対照群、光照射群とも断頭後直ちに眼球を摘出し、ドライアイスにて急速凍結した

(各時点で $n=4\sim 5$)。また、光照射後の遺伝子の発現量の時間経過を検討する目的で、ラット ($n=3$) を 20 時の時点で 300 lux、30 分の光照射を行い、照射開始 15、30、60、90、120、180 分後に断頭し、眼球を摘出した。摘出した眼球より網膜を剥離し、網膜から total RNA を抽出して、ノーザンブロット法により、各時計遺伝子の定量的解析を行った。

さらに、同一処理を行った別のラットを用い、視神経系を含む眼球の連続凍結切片を作製、*rPer1* 及び *rPer2* mRNA の *in situ* hybridization を ^{35}S オリゴヌクレオチドプローブを用いて行った。10 時間 42°C ハイブリ反応後、感光乳剤により感光し、網膜内遺伝子発現部位を検討した。

[結果]

rPer2 の遺伝子発現には主観的暗期の前半にピークを持つサーカディアンリズムがみられたが、*rPer1* にはリズム変動は確認されなかった。また、各時刻における光照射への反応性を検討したところ、*rPer2* は 8 時のみに光照射による発現の誘導が確認された。一方、*rPer1* は主観的明期 (8、12、16 時) と 20 時に光による遺伝子発現の誘導が見られた。光照射による発現の時間経過は、*rPer1* mRNA は光照射開始から 60 分、90 分で光照射前に比べ有意な増加を示した。一方、*rPer2* mRNA は、この時刻にける光照射には反応しなかった。*in situ* hybridization による、*rPer1* と *rPer2* mRNA の網膜内発現部位については、*rPer1* mRNA は内顆粒層と外顆粒層にみられたが、神経細胞層には殆どみらず、*rPer1* mRNA は内顆粒層と神経細胞層にみられたが、外顆粒層にはみられなかった。

[考察]

網膜において、*rPer2* mRNA は明確なサーカディアン変動を示したが、*rPer1* mRNA は変動を示さなかった。SCN においては、*rPer1* mRNA は主観的明期にピークをもつ明確なサーカディアン変動を示すことが知られている。従って、*rPer1* は、網膜においてはサーカディアン振動発現に関わっていない可能性がある。しかし、mRNA が変動していない場合でも、蛋白レベルが変動し、リズム発現に重要な働きを示す可能性は残される。また、光反応性については、SCN においては、*rPer1*、*rPer2* とも、主観的暗期に強い反応を示すことが知られているが、網膜においては、*rPer1* は主観的明期と 20 時に、*rPer2* は 8 時のみに有意な反応性を示した。このことから、*rPer1* と *rPer2* は網膜の光受容において、異なる機能を示すことが考えられる。これらの結果から、網膜におけるサーカディアン振動体の振動発現機構は SCN とは異なる可能性が示唆された。

また、*in situ* hybridization により、網膜における *Per1* と *Per2* の発現分布を調べた結果、*rPer1* mRNA は内顆粒層と外顆粒層にみられ、*rPer2* mRNA は内顆粒層と神経細胞層にみられた。このことから、*rPer1* と *rPer2* は異なる役割をもつ可能性が示唆された。また、*rPer1* と *rPer2* の両方が発現しているのは内顆粒層のみであることから、網膜の概日リズム発現において、内顆粒層が重要な役割を果たしていることが考えられた。

[結論]

網膜において、時計遺伝子 *rPer1* と *rPer2* は各々独立して機能していることが示唆された。また、網膜におけるサーカディアン振動の発現機構は SCN とは異なることが示された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 福 島 菊 郎
副 査 教 授 本 間 研 一
副 査 教 授 渡 辺 雅 彦

学 位 論 文 題 名

Circadian pattern, light responsiveness and localization of *rPer1* and *rPer2* gene expression in the rat retina

(ラット網膜における *rPer1*, *rPer2* 遺伝子発現のサーカディアン変動,
光反応性及び発現部位)

睡眠覚醒、ホルモン分泌など、様々な生体機能にみられるサーカディアンリズムは間脳視床下部視交叉上核 (SCN) に存在する生物時計に支配されている。ショウジョウバエにおいてサーカディアンリズムに異常をもつ変異体より発見された時計遺伝子 *Period* (*Per*) の相同遺伝子群 (*Per1*, *Per2*, *Per3*) が哺乳類でクローニングされ、哺乳類のサーカディアンリズムの形成に重要な役割を果たしていると考えられている。一方、変異誘発剤投与により得られたリズム変異マウスより時計遺伝子 *Clock* がクローニングされ、bHLH/PAS 型転写因子をコードすることが明らかにされた。さらに、同じく bHLH/PAS 型転写因子をコードする時計遺伝子 *BMAL1* 遺伝子が発見され、これら時計遺伝子産物がヘテロダイマーを形成し、*Per* 遺伝子の転写を促進することが明かにされた。また、*Per* 遺伝子産物は *CLOCK/BMAL1* の作用を阻害することにより、*Per* 遺伝子自身の発現を抑制することが明らかになった。このネガティブフィードバックループが、サーカディアンリズムの発現に必須であると考えられている。これらの時計遺伝子は、SCN において、それぞれ固有のサーカディアン変動をもって発現している。一方、培養条件下において、ハムスター網膜はメラトニン分泌にサーカディアンリズムを示すことが報告され、ハムスター網膜には視交叉上核とは異なるサーカディアン振動体が存在することが示唆された。さらに、時計遺伝子は、視交叉上核以外の脳部位や網膜、抹消組織にも発現していることが明かとなり、部位特異的なサーカディアン振動体として機能している可能性がある。そこで申請者は、時計遺伝子の網膜における役割を検証するために、網膜における時計遺伝子 *rPer1* と *rPer2* のサーカディアン変動及び光反応性をノーザンブロット法で検討し、さらに *in situ* hybridization により網膜内の発現局在を検討した。

ノーザンブロット法による解析の結果、*rPer2* の遺伝子発現には主観的暗期の

前半にピークを持つサーカディアンリズムがみられたが、*rPer1*にはリズム変動は確認されなかった。また光反応性実験において、照射開始1時間後の各遺伝子の mRNA 発現を測定したところ、*rPer1*は主観的明期(8、12、16時)と20時に光による遺伝子発現の誘導が見られた。*rPer2*は8時のみに光照射による発現の誘導が確認された。さらに、20時における光照射による発現の時間経過は、*rPer1* mRNAは光照射開始から60分、90分で光照射前に比べ有意な増加を示した。*rPer2* mRNAは、この時刻にける光照射には反応しなかった。さらに、*in situ* hybridizationによる、*rPer1*と*rPer2* mRNAの網膜内発現部位については、*rPer1*の発現は内顆粒層と外顆粒層にみられたが、神経節細胞層には殆どみらず、一方、*rPer2*の発現は内顆粒層と神経節細胞層にみられたが、外顆粒層にはみられなかった。

これらの結果から、網膜におけるサーカディアン振動体の振動発現機構はSCNとは異なることが示され、さらに網膜におけるサーカディアン振動体において*rPer1*と*rPer2*は異なる役割をもつことが示された。

公開発表において、副査の渡邊教授からは、網膜におけるメラトニン分泌リズムと*rPer1*、*rPer2*発現リズムの位相関係について、また、*rPer2*が内顆粒層のどの細胞で発現していると考えられるかについて質問があった。また、副査の本間教授からは網膜の*rPer1*、*rPer2*発現リズムに対する視交叉上核からの影響、及び、神経節細胞層での*rPer2*の発現にサーカディアンリズムがあることの根拠についての質問があった。主査の福島教授は、光受容における*rPer1*の具体的な役割について、及び、*Per*ノックアウトマウスにおける光受容について質問があった。申請者はいずれの質問に関しても自身の解析結果と文献的考察をもとに概ね妥当な解答をなした。

本論文は網膜における*rPer1*と*rPer2*の役割の違いを始めて示したことが高く評価され、今後、哺乳類の網膜のサーカディアン振動体の解明に貢献することが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位等も併せ申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。