

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 2 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590264

研究課題名（和文） 生体内部位特異的マルチ遺伝子サイレンシング法の開発と概日時計分子基盤の解明

研究課題名（英文） Elucidation of circadian clock machinery by development of an *in vivo* multi-gene silencing technique

研究代表者

早坂 直人（HAYASAKA NAOTO）

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：80368290

## 研究成果の概要（和文）：

これまでに、概日リズム制御機構に関与すると考えられる複数の遺伝子候補の機能を生体内で明らかにするために、レンチウイルスベクターを用いて shRNA を発現させたノックダウンマウスの作製してきた。本研究では、この手法をさらに発展させ、複数の遺伝子を同時にノックダウンするマウスの作製を試みた。その結果、2 種の遺伝子の shRNA を同時に発現するマウスの作製に成功した。一方、ノックダウン効率や世代間のノックダウン効果に著名な個体差を認めため、日米欧でバンク化の進むノックアウトマウスを用いて、複数遺伝子ノックアウトマウス、あるいは、マウスの一部で観察された胎生致死を回避するべく細胞特異的なコンディショナルノックアウトマウスを作製することにした。その結果、注目された複数の遺伝子のノックアウト個体で行動リズムに異常を認め、新たな概日リズム制御の分子メカニズムの一端が明らかになった。

## 研究成果の概要（英文）：

We have previously generated knockdown mice expressing shRNA of candidate genes involved in circadian rhythm regulation using a lentiviral vector. In this study, we further developed a technique to express two different shRNAs *in vivo* and successfully generated double knockdown mice. However, these mice exhibited significant individual differences in the knockdown efficiency and silencing effects among generations. Therefore, we next examined double knockout or cell type-specific knockout mice. Our data demonstrated abnormal circadian behavioral rhythms in different knockout mice strains and suggested involvements of novel candidate genes in the circadian clock machinery.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでに、レンチウイルスベクタ

ーを導入したロックダウンマウスを複数作製し、その成果の一部を論文化してきた (Hayasaka et al., 2011)。当初は、複数遺伝子を同時ロックダウンしたマウスを作製する計画で研究を進めてきたが、ロックダウン効率や世代を経たロックダウンマウスの維持等に問題を生じたため、ダブルロックアウトマウスやコンディショナルロックアウトマウスの作製により、計画していた研究を実施することにした。

## 2. 研究の目的

これまで、概日時計関連の単一遺伝子ロックダウン(KD)マウスや過剰発現マウスの解析を行ってきた。しかし、一部のマウスでは、特に異常を認めないものもあり、その中には、同一組織で複数のファミリー遺伝子が発現しているものがあつた。そこで、複数の遺伝子を生体内で同時に操作することを目的として、レンチウイルスベクターを用いてマルチ遺伝子 KD マウスの作製を試みた。

## 3. 研究の方法

各遺伝子の shRNA を発現する 2 種のレンチウイルスを同時に受精卵に感染し、複数遺伝子ロックダウンマウスを作製することに成功した。その結果、両遺伝子が安定的に組み込まれたマウスを得た。しかし、両遺伝子の発現量の制御は困難であり、個体差も大きかった。

そこで我々は、現在世界的にバンク化が進められているロックアウト(KO)マウス、特に時期、組織特異的に発現を制御可能なコンディショナルロックアウト(cKO)マウスに注目した。我々はまず、概日時計に必須である Bmal1 遺伝子の flox マウスと、神経と同様に概日時計機構の中心的役割を担う可能性があるアストロサイトで特異的に相同組み換えを起こす GFAP-Cre マウスを入手し、それらの交配により、アストロサイト特異的に時計遺伝子を欠損した KO マウスを作製した。これは、概日時計中枢(視交叉上核)で、神経の概日時計は正常であるが、アストロサイトでは時計が機能しないマウスである。このマウスの行動リズムをはじめとした概日リズムの解析を行うことにより、体内時計におけるアストロサイトの機能を *in vivo* で証明することを目的とした。

このような cKO マウスは、材料である 2 種のマウスが容易に入手可能になった今日では有効な手段である。また、我々がこれまで作製してきたマウスでは致死であったマウスでも、KO される組織を限局することにより、解析が可能となると考えられる。更に、所期の目的である複数遺伝子のマルチサイレンシングには、2 種の flox マウスと 1 種の Cre マウスとの交配で可能となる。

## 4. 研究成果

まず、RGS ファミリーの中で、概日時計中枢 SCN で概日振動が観察される Rgs16 と Rgs2 遺伝子のダブルロックダウンマウスを作製した。その結果、一部の個体で各々のシングルロックダウンマウスの表現型を合わせた相乗的なリズム異常が観察されたが、表現型の個体差が大きく、また、世代を経るとその異常が消失することが明らかになった。従って、生体内における複数遺伝子のロックダウンは可能であるが、技術上問題があることが示唆された。そこで、個体差や世代間の表現型の差異が見られない KO マウスを用いて概日リズム研究を実施することにした(上記の 2 遺伝子については、その後新たにダブルロックアウトマウスを作製し、解析を行っている)。

cKO マウス: SCN で神経と同様に活動や遺伝子発現に概日リズムを示すアストロサイトの機能を明らかにすべく、アストロサイト特異的 Bmal1 KO マウスの行動リズムを解析したところ、リズム周期や光同調機構の異常を見出した。このことから、概日時計中枢におけるアストロサイトの能動的な関与が示唆された。この成果は現在論文を投稿中であり、この成果を基に新たに提案したアストロサイトリズムに関する研究提案が JST さきがけに採択された。

続いて、体内時計による行動や代謝を制御する新たな遺伝子候補として、SIK 遺伝子ファミリーに注目した。このリン酸化酵素は機能がよく分かっていないが、脳内の体内時計中枢や肝臓などにおいて、約 24 時間周期で発現が変動しており、体内時計との関連が注目された。そこで、SIK 遺伝子の KO マウスを用いて、活動リズム、代謝リズムその他の解析を行った結果、マウスにおいて、活動や呼吸商のリズムに異常を見出すと共に、代謝の劇的な異常を観察した。また、光による概日リズムの位相変異や、夜間の活動リズム位相にも異常を認めた。更に、SIK によるリン酸化の異常が、時計遺伝子の発現リズム異常と相関していることも見出した。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 7 件)

1. Hayasaka N\*, Nagai N, Kawao N, Niwa A, Yoshioka Y, Mori Y, Shigeta H, Kashiwagi N, Miyazawa M, Satou T, Higashino H, Matsuo O, Murakami T. *In vivo* diagnostic imaging using micro-CT: sequential and comparative evaluation of rodent models for hepatic/brain ischemia and stroke.

- PLoS One, 7 : e32342, 2012 (\*責任作者). 査読有
2. Fukuda H, Tokuda H, Hashimoto S, Hayasaka N\*. Phase wave of gene expression in the mammalian central circadian clock network: quantitative analyses using cultured brain slices. PLoS One, 6 : e23568, 2011 (\*責任作者). 査読有
  3. Hayasaka N\*, Aoki K, Kinoshita S, Yamaguchi S, Wakefield JK, Tsuji-Kawahara S, Horikawa K, Ikegami H, Wakana S, Murakami T, Ramabhadran R, Miyazawa M, Shibata S. Attenuated food anticipatory activity and abnormal circadian locomotor rhythms in rgs16 knockdown mice. PLoS One, 6 : e17655, 2011 (\*責任作者). 査読有
  4. Hayasaka N\*, LaRue SI, Green CB. Differential contribution of rod and cone circadian clocks in driving retinal melatonin rhythms in Xenopus. PLoS One, 5 : e15599, 2010 (\*責任作者). 査読有
  - 5.

〔学会発表〕(計9件)

1. 早坂 直人、吉岡 芳親、東野 英明、松尾 理、竹森 洋、村上 卓道  
micro-CT、micro-MRI を用いた画像診断法の確立と脳卒中、肝傷害及び新規小脳変性疾患モデル研究への応用  
第 117 回日本解剖学会総会、2012 年 3 月.
2. Isao T. Tokuda, Hirokazu, Fukuda, Naoto Hayasaka. Quantitative analysis of phase wave of gene expression in the rat suprachiasmatic nucleus. International Symposium on Photonic Bioimaging, 2011 年 10 月.
3. 早坂直人、吉岡芳親、東野英明、松尾理、竹森洋、村上卓道 micro-CT、micro-MRI による脳疾患の非侵襲的画像診断法の確立と各種病態モデル研究への応用。  
第 20 回日本バイオイメージング学会学術集会、2011 年 9 月.
4. 早坂 直人、小浦美奈子、松田潤一郎、竹森洋  
リン酸化酵素が概日リズムの位相を決める。第 116 回日本解剖学会総会・全国学術集会 第 88 回日本生理学会大会合同大会シンポジウム、2011 年 3 月.
5. 早坂 直人 代謝と行動を共に制御する G タンパク質シグナル。第 17 回日本時間生物学会学術大会シンポジウム、2010 年 11 月.

6. Naoto Hayasaka. Attenuated food anticipatory activity and abnormal circadian rhythms in Rgs16 knockdown mice. 12th Biennial Meeting Society for Research on Biological Rhythms (SRBR)、2010 年 5 月.
7. 早坂 直人 概日リズム関連遺伝子 Rgs16 遺伝子ノックダウンマウスにおける行動及び代謝異常。第 24 回日本糖尿病・肥満動物学会、2010 年 1 月.
8. Naoto Hayasaka, Masaaki Miyazawa, Takamichi Murakami, Yoshihiro Nakajima and Shigenobu Shibata. Astrocytes as functional components of the central circadian pacemaker. Sapporo Symposium on Biological Rhythm, 2009 年 8 月.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等  
[http://www.neuronet.jst.go.jp/researcher/member\\_3rd.html](http://www.neuronet.jst.go.jp/researcher/member_3rd.html)

6. 研究組織

(1)研究代表者  
早坂 直人 (HAYASAKA NAOTO)  
近畿大学・医学部・解剖学・講師  
研究者番号：80368290

(2)研究分担者  
( )

研究者番号：