

Title	Gq/11-induced intracellular calcium mobilization mediates Per2 acute induction in Rat-1 fibroblasts
Author(s)	高嶋, 直敬
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/47511
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について〈/a〉をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	高嶋直敬
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第20750号
学位授与年月日	平成18年12月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科情報伝達医学専攻
学位論文名	Gq/11-induced intracellular calcium mobilization mediates <i>Per2</i> acute induction in Rat-1 fibroblasts. (Rat1細胞ではPer2の誘導はGq/11結合レセプター、細胞内カルシウムを介して行われる)
論文審査委員	(主査) 招へい教授 裏出 良博 (副査) 教授 杉田 義郎 教授 森本 兼曩

論文内容の要旨

〔 目 的 〕

哺乳類の生物時計の中核は視交叉上核 (SCN) に存在し、23-25 時間周期の自律的な振動を保っている。さらに SCN では夜間の光によって *Per1*、*Per2* の発現が誘導されこれらの遺伝子の振動の位相変位に関与することが報告されている。このメカニズムによって体内時計を外界の 24 時間周期にあわせていると考えられている。

さらに一部の細胞 (Rat1、NIH3T3 など) では高濃度の馬血清や、様々な薬剤で刺激することによって時計遺伝子の mRNA の一過性の発現誘導と 24 時間周期の概日リズムを誘導することが報告されている。このメカニズムについては *Per1* では血清のみならず種々の薬剤においても強い誘導を示すことから良く研究されている。しかし、*Per2* の誘導メカニズムについては良くわかっていない。本研究では Rat1 細胞をモデル細胞として馬血清における *Per2* の mRNA の誘導メカニズムについて検討した。

〔 方法ならびに成績 〕

Rat1 細胞に *Per2* の一過性の発現誘導とそれに続く、時計遺伝子の 24 時間周期の振動を誘導することが報告されている 50%馬血清を用いて誘導メカニズムについて検討した。血清刺激では刺激前のおよそ 5 倍の発現上昇を認めた。この発現上昇は細胞内カルシウムキレーター (BAPTA/AM) によって抑制された。*Per1* の発現誘導は同様の処理によって抑制されなかったことから、*Per1* とは異なったメカニズムによって *Per2* は発現誘導を受けていることが強く示唆された。さらに、細胞内カルシウムインジケータのカメレオンを用いて血清刺激における細胞内カルシウムの経時的変化を検討した。血清刺激によってきわめて強い一過性の細胞内カルシウムの上昇 (前期) とそれに続く緩やかな細胞内カルシウムの上昇 (後期) を認めた。さらに細胞内カルシウムキレーター (BAPTA/AM) で処理するときのカルシウムの上昇は両方とも消失した。

細胞内カルシウムについて詳細を検討した。細胞外カルシウムキレーター (EGTA) で処理すると前期のカルシウムの上昇は認めたが、後期は消失した。*Per2* の一過性の誘導もわずかに抑制された。一方、細胞内カルシウムを枯渇させる薬剤 (Thapsigargin) で処理したところ、細胞内カルシウムの上昇は前期、後期ともに完全に抑制された。ま

た Per2 の上昇も認めなかった。これらのことから細胞内カルシウムストアからの放出による前期と、それを刺激とする細胞外カルシウム流入による後期の両方が Per2 の誘導に関与していることが示唆された。さらに細胞内カルシウムストア依存的膜カルシウムチャンネル (SOC) の特異的阻害剤 (BTP2) によって細胞外カルシウムをキレートしたのと同様に後期のみが抑制され Per2 の誘導も同様に一部が抑制された。

細胞内カルシウムストアからの放出のメカニズムについて検討した。この経路はフォスホリパーゼ C (PLC) によって抑制されることがわかった。PLC をかいして細胞内カルシウム放出を誘導する Gq/11 結合型レセプターの関与について検討した。G タンパクの Gq/11 を抑制する薬剤 (YM-254890) によって前期、後期ともに細胞内カルシウム上昇が消失し、Per2 の誘導も抑制された。

Gq/11 結合型のエンドセリンレセプター ET-1 が Rat1 で発現していることが報告されていることから、エンドセリン刺激によってもこの Gq/11 レセプター、細胞内カルシウムを介して Per2 が上昇するか確認したところ、Gq/11 阻害剤及び細胞内カルシウムキレーターによって Per2 の発現誘導が抑制された。

[総括]

本研究によって血清刺激による Per2 の一過性誘導は Rat1 細胞においては Gq/11 結合型レセプター、細胞内カルシウム放出および、細胞内カルシウム放出によって誘導される SOC を介した細胞内カルシウム流入の両者によることが明らかになった。またこの経路は Per1 とは異なることも明らかにした。SCN での光誘導による Per2 の誘導および末梢組織での Per2 の誘導による位相変異にこれらのメカニズムが関与しているか、前期、後期の細胞内カルシウム上昇から転写にいたる経路については今後の研究が必要である。

論文審査の結果の要旨

Per1、Per2 の誘導が体内時計の位相を調節に重要であることは以前より報告されている。細胞系を用いて Per1 の発現誘導メカニズムはよく研究されており、発現誘導には cAMP、Cre の経路が重要であると考えられている。しかし、Per2 の発現誘導メカニズムは良くわかっていない。

申請者らは生物時計研究に広く用いられている Rat 胎仔線維芽細胞 (Rat1) を用いて検討した。この細胞は血清刺激によって Per1、Per2 が誘導され、その後、時計遺伝子の概日振動が起きることが報告されている。阻害剤等を用いた研究によって申請者らが G タンパク結合型レセプターの一つである Gq/11 coupled receptor を介した細胞内カルシウムの放出と、放出を契機とした store operated Ca channel を介した細胞外からのカルシウム流入の両方が Per2 の誘導に重要であることを明らかにした。

申請者らの研究は Per2 遺伝子の誘導に GPCR の関与を報告した初めての研究であり、学位に値するものと認める。