

視交叉上核に発現する  
アセチルコリン受容体の機能に関する研究

2018

堂上 久美子

# 目次

要旨 .....	1
第一章 視交叉上核スライスカルチャー系におけるカルバコールによる時計遺伝子 発現リズムの位相変位について .....	3
結果 .....	5
考察 .....	11
第二章 SCN に発現するニコチン性アセチルコリン受容体の生理機能について... 14	
結果 .....	15
考察 .....	19
実験材料と方法.....	20
引用文献 .....	24
謝辞 .....	28

# 要旨

ヒトを含むほとんどの生物には約 24 時間周期の概日時計が備わっている。概日時計は、睡眠や体温などの様々な生理機能に日内変動を与える重要な役割を持つ。哺乳類における概日時計の中心振動体は視交叉上核 (Suprachiasmatic nucleus, SCN) であり、SCN に発現する時計遺伝子の規則的な転写翻訳のネガティブフィードバックループによって約 24 時間周期の概日リズムが形成される。ところが、この概日リズムは、概日という名が示すように正確には 24 時間周期ではないため、地球の自転に伴う外界の 24 時間とは完全に一致しない。そこで、SCN は明暗環境とのずれを日々補正することで正確な 24 時間リズムを発振する。

哺乳類における同調因子は光同調と非光同調に分類される。光情報は概日時計を環境の明暗リズムに同調させる重要な因子の 1 つであり、網膜のメラノプシン含有網膜神経節細胞で受容され、グルタミン酸作動性の網膜視床下部路を介して SCN の概日リズム位相を変位させる。一方、非光同調因子には食事や運動、社会的ストレスなどがあるが、これまで SCN での作用機構を含め、その神経分子機構はほとんど解明されていない。

私は、アセチルコリン受容体のアゴニストであるカルバコールが、行動リズムの位相を変位させる事に注目し、非グルタミン酸性非光同調因子候補としてのアセチルコリンの役割について研究を行った。本研究の第一章では、カルバコールが概日時計中枢である SCN に作用するか検証した。具体的には、時計遺伝子 *Per1* のプロモーターにルシフェラーゼ (luciferase) を結合した *Per1-luc* トランスジェニックマウスから作成した SCN 器官培養系を用いた。その結果、SCN においてカルバコールが、従来から知られているグルタミン酸受容体アゴニストである NMDA や AMPA とは異なる位相で、時計遺伝子発現の概日リズム位相を、位相依存的に変位させることを明らかにした。また、このカルバコールの作用は、ムスカリン受容体アンタゴニストであるアトロピンによって阻害され、ニコチン受容体アンタゴニストであるメカミラミンやコノトキシン MII により増大した。この結果は、SCN に発現するムスカリン受容体とニコチン受容体が異なる作用機序で、位相変位を制御する可能性を示唆している。

そこで、第二章では SCN に発現するアセチルコリン受容体を同定し、そのノックアウトマウスを作出することで、概日機能におけるアセチルコリン受容体の生理的

意義の解明を試みた。まず、SCNにおいて高発現する2種のニコチン受容体サブユニットを見出し、それぞれの全身ノックアウトマウスを作出したが、いずれも低体重など発達に障害があり、これらの変異マウスを用いての概日リズム機能の検討は困難であった。そこで、それぞれの受容体のSCN特異的ノックアウトマウスを作出することで、ニコチン受容体の概日リズム制御機構について調査した。ニコチン受容体のSCN特異的ノックアウトマウスにおいて、概日行動リズムの基本的な特質である、内因性の概日周期を示す恒常暗期における行動周期長、光感受性を示す主観的暗期の前半または後半の短時間光照射による行動位相変位量、そして概日リズムの安定性を示す新しい明暗環境への再同調スピードは、全て正常であった。したがって、SCNに発現するニコチン受容体は、概日リズム発振機構および光同調機構には必須ではないことがわかった。今後、これらの変異マウスを用いた非光同調機構におけるニコチン受容体の概日機能の調査が求められる。

食事や運動、社会的ストレスなど概日時計の非光同調因子による位相制御機構を明らかにすることは、現代社会を生きるヒトの生活リズムを維持する上で極めて重要であるが、その大部分はいまだ明らかとなっていない。アセチルコリンはリズム中枢のSCNで働く非光同調の主要物質として、その機能解明が必要とされており、本研究がその端緒となると期待される。

## 第一章

# 視交叉上核スライスカルチャー系におけるカルバコールによる 時計遺伝子発現リズムの位相変位について

### 序論

地球上におけるほぼ全ての生物には約 24 時間周期の概日時計が備わっている。ヒトを含む哺乳類の概日時計の中心振動体は視床下部の視交叉上核 (Suprachiasmatic nucleus, SCN) である(1, 2)。SCN に発現する時計遺伝子の規則的な転写翻訳フィードバックループによって約 24 時間周期の概日リズムが形成され、睡眠覚醒、ホルモン分泌や代謝などを調律している。しかし、このリズムは正確な 24 時間ではないため、概日リズム位相は外界の明暗位相と日々ずれを生じてしまう。そこで、SCN は概日リズム位相を地球の自転に伴う昼夜の明暗周期へ同調させることで、正確な 24 時間を刻んでいる。

哺乳類における同調因子は光同調因子と非光同調因子に分類される(3-5)。光刺激による概日リズム位相の同調機能については、齧歯類を用いた研究が進んでいる。個体を恒暗条件 (DD) の下で飼育し、主観的夜 (マウスは夜行性なので、恒暗条件下での活動期をこのように表現する) の前半に短時間の光照射を行うと、翌日の行動位相は後退する。一方、主観的夜の後半に光照射を行うと、行動位相は前進する。このように、概日時計は位相の中でいつ光照射を受けるかによって、時計を前進させたり後退させたりして、位相依存的に位相を変位させ、外界の明暗周期と同調する働きを持つ。

光刺激は、網膜の内因性光感受性網膜神経節細胞 (intrinsically photosensitive retinal ganglion cells, ipRGC) で受容される。ipRGC から SCN までは網膜視床下部路 (Retinohypothalamic tract, RHT) が直接投射しており(6, 7)、主要な伝達物質としてグルタミン酸が想定されている。SCN 細胞に発現する *N*-methyl *D*-aspartate (NMDA) 受容体を介したカルシウム流入によって、下流の mitogen-activated protein kinase (MAPK) や cAMP responsive element-binding protein (CREB) 経路が活性化する(8)。最終的に、時計遺伝子のプロモーターに存在する CRE 配列を介して時計遺伝子発現を誘導することで、時計遺伝子発現が位相変位し、生体内の概日時計の概日リズム位相は環境の明暗周期に同調すると考えられている(9)。実際にグルタミン酸受容体のアゴニストである NMDA をハムスターの SCN へ直接投与すると、光刺激と同様に概日行動リズムの位相は変位する(10)。さらに、SCN 急性スライスを用いて、SCN 神経細胞の発火頻度における概日リズム位相が NMDA によって変位することも報告さ

れている(11)。

一方で、非光同調因子としては食事や運動、社会的ストレスなどがあげられるが、上述の光同調システムと比べ、これまで SCN での作用機構を含め、その神経分子機構はほとんど解明されていない(4, 12-14)。非光同調システムとして想定されているのは、SCN 周囲の視床下部の諸核や、視床の視床傍室傍核や外側膝状体、さらには脳幹の縫線核から SCN へ投射する神経経路である。これらの神経伝達物質とされるセロトニンや神経ペプチド Y は、光同調システムと比べて、位相変位効果が低い。また、効果のあるリズム位相は大きく異なり、主観的昼に働き位相前進を引き起こす(15, 16)。

ところが、アセチルコリン受容体の作動薬であるカルバコールは、光同調因子ではないにもかかわらず、非常に強い位相変位能力を持ち、さらに従来の規則に従わない位相変位効果を持つことが注目される。すなわち、カルバコールを齧歯類の脳室内へ投与すると、主観的夜を中心とする位相で行動リズムが後退・前進する。その位相は光刺激と類似しており、変位効果の強さは光刺激に比肩することが知られる(17-21)。しかし、これまで生体において、カルバコールがどのような作用機序で概日リズムに作用するのか、またその神経分子機構については、不明なままであった(21-23)。

本章では、この特徴的な性質を持つ、強力なリズム位相変位物質であるカルバコールに着目し、まず中枢時計である SCN において時計遺伝子の発現リズムを変位させる効果を検索した。時計遺伝子 *Per1* の発現モニター系である *Per1-luc* トランスジェニックマウスから作成した SCN 器官培養(スライスカルチャー)系を用いて解析した(24-26)。さらに、カルバコールの作用をアセチルコリン受容体アンタゴニストを用いて薬理的に解析した。

## 結果

### 1.1. カルバコールは SCN において位相依存的に時計遺伝子 *Per1* の発現リズムを位相変位させる

冷却 CCD カメラを用いて *Per1-luc* マウスの SCN スライスを撮影すると、*Per1* の概日リズムを発光リズムとして、数周期にわたって安定的に観察することができた。そこで、観測される概日リズムの 2 つ目のピークを Time 0 として、Time 0 から 3 時間後 (Time 3) と Time 12 にカルバコールを投与した。カルバコール投与前と投与後の発光リズムの周期長はほぼ同等であることから、カルバコールは周期長自体を変化させるのではなく、位相変位を起こすことが示唆された。また、カルバコール投与を Time 3 で行うと位相後退が、Time 12 で行うと位相前進が確認された (Fig. 1 A, B)。対照群の vehicle 投与では *Per1* のリズム位相の変位は見られなかった (Fig. 1 C, D)。

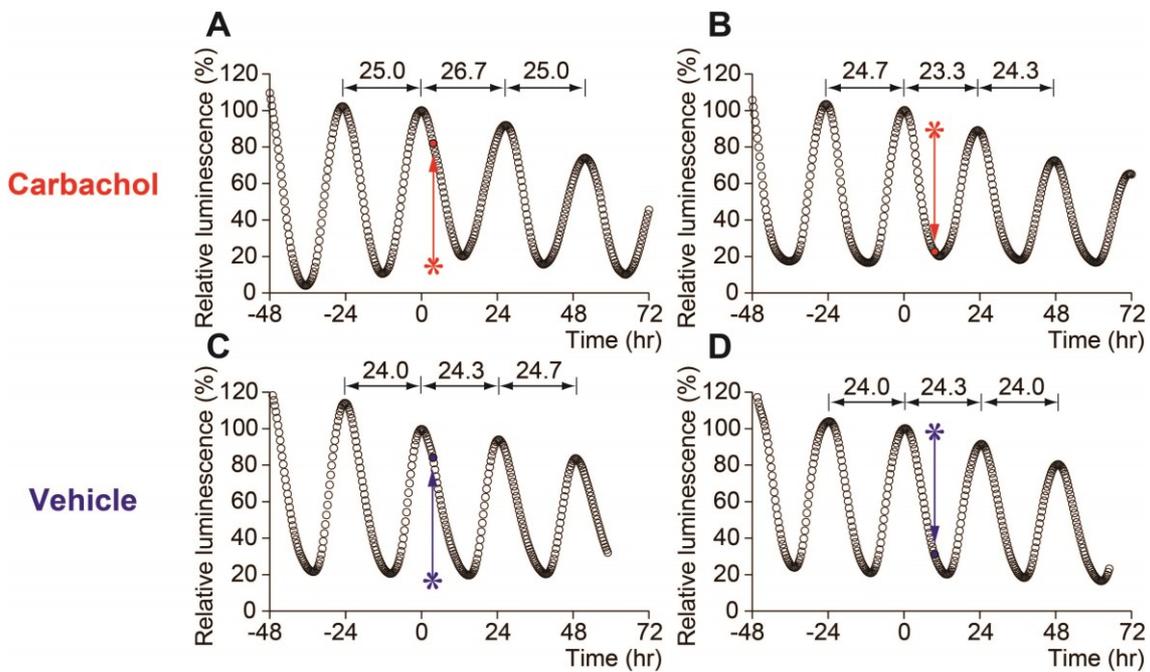
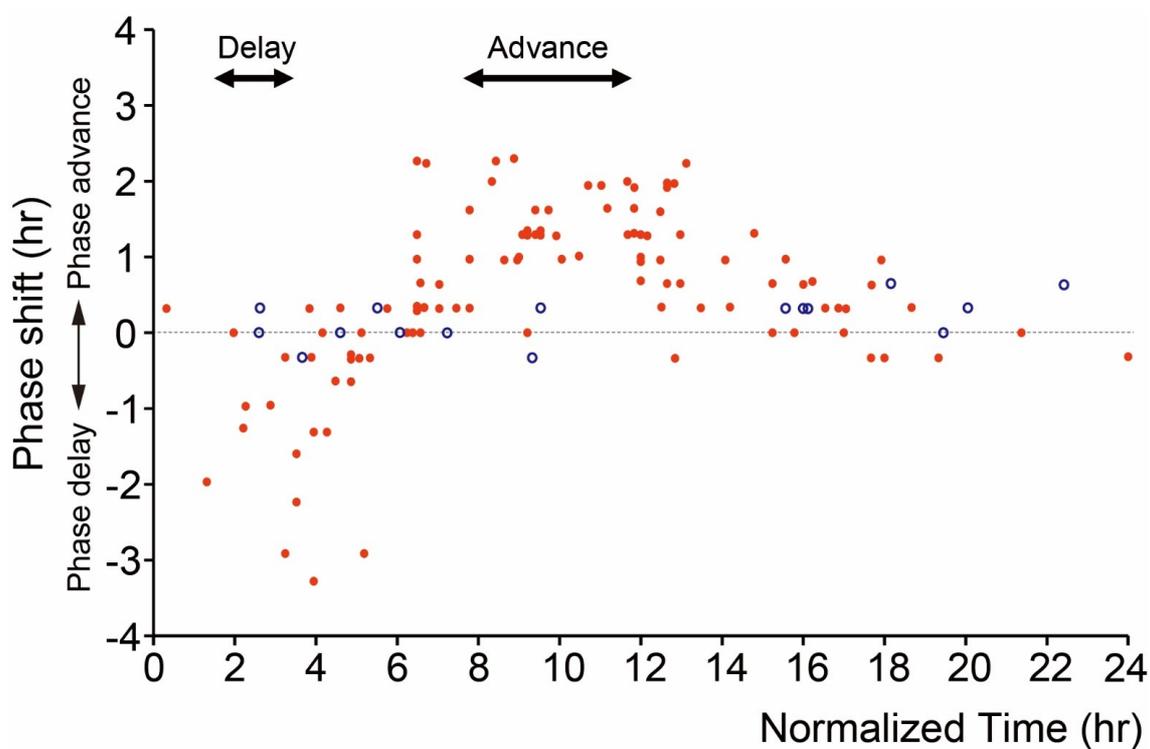


Fig. 1. カルバコール投与による *Per1-luc* リズムの位相依存的な位相変位

(A), (B) 2 つ目の発光ピークを Time 0 とした時にカルバコールを Time 3 と Time 12 に投与した代表的な結果。(C), (D) 対照群として vehicle を Time 3 と Time 12 で投与した代表的な結果。矢印はカルバコールと vehicle を投与した時間を示す。また、Time 0 での発光量を 100% とした。

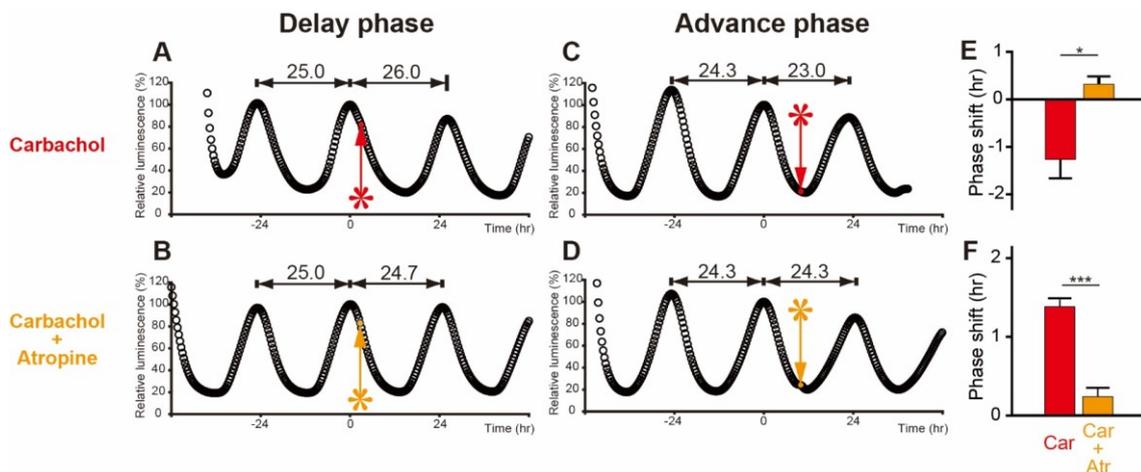
さらに、ピーク後様々な時間においてカルバコールを投与し、位相依存的なカルバコールの作用を検証した。その結果、Time 2 から Time 4 の間 (Time 2-4) で位相が後退し、Time 10-12 では位相が前進し、Time 15-24 では位相が変動しないことが明らかとなった (Fig. 2)。



**Fig. 2. カルバコール投与による *Per1-luc* 発光リズム位相変位の位相反応プロット**  
 ●はカルバコール投与 (n = 108) を示しており、○は対照群の vehicle 投与 (n = 16) を示す。x 軸は 2 回目の発光ピークの時間を 0 とした時のピークからの経過時間を、発光リズムの周期を 24 等分した Normalized time で示す。y 軸は発光リズムの位相変位時間を示しており、正と負にそれぞれ位相前進と後退を示す。

## 1.2. カルバコールによる *Per1-luc* の位相依存的位相変位作用はムスカリン受容体を介する

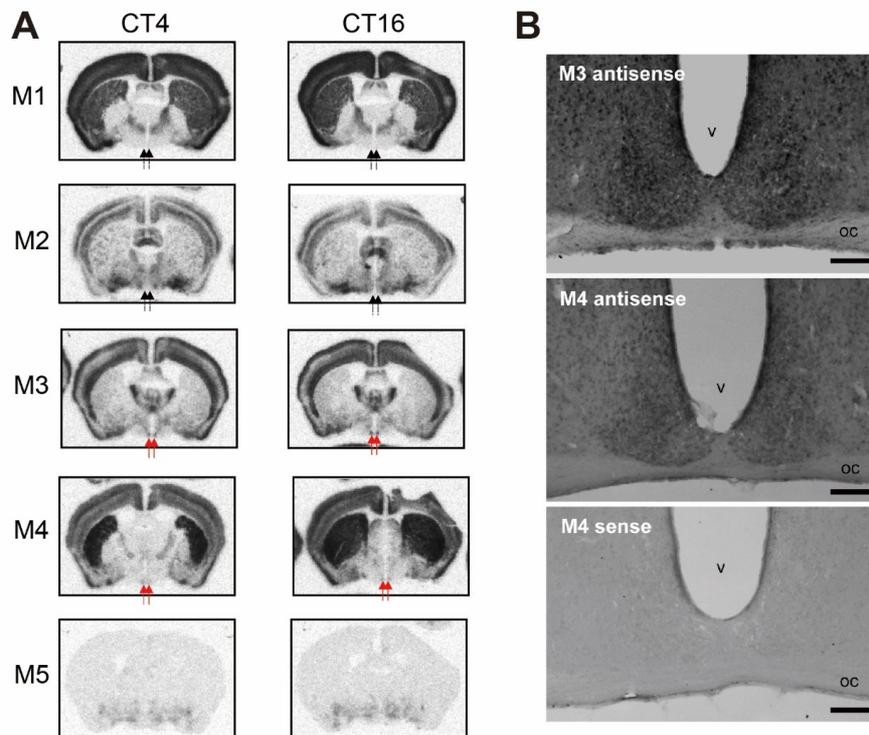
次に、カルバコールによる位相後退および前進がアセチルコリン受容体のうち、ニコチン受容体とムスカリン受容体のどちらに作用しているのかを調べるため、それぞれのアンタゴニストの投与を行った。位相後退の起こる Time 3 でムスカリン受容体のアンタゴニストであるアトロピンをカルバコールと同時に加えると、カルバコールによる位相後退は阻害された (Fig. 3 A, B)。また、位相前進の起こる Time 12 においても同様に、アトロピンの同時投与によって位相前進が阻害された (Fig. 3 C, D)。したがって、位相後退・前進どちらにおいてもカルバコールはムスカリン受容体に作用して *Per1* の発現リズムの位相変位を起こしていることが示唆された (Fig. 3 E, F)。



**Fig. 3. カルバコールによる *Per1-luc* の発光リズムの位相変位に対するムスカリン受容体アンタゴニストの効果**

Time 3 と Time 12 における (A), (C) カルバコール投与と、(B), (D) カルバコールとアトロピンの同時投与時の発光リズムの位相変位について代表的な例を示す。(E) 位相後退を起こす位相 (Time 2-4) と (F) 位相前進を起こす位相 (Time 8-12) におけるカルバコール投与群 (Car) (E: n = 11, F: n = 30) とアトロピンの同時投与群 (Car + Atr) (E: n = 4, F: n = 8) の位相変位量をグラフにしたものを平均値±標準誤差で示す。それぞれの群の比較には t 検定を用いた (\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ )。

そこで私は、SCN でのムスカリン受容体の発現を、概日リズムの有無を検討するため、主観的昼である CT4 (Circadian time (CT) とは個体の恒暗条件下における主観的な時間であり、恒常暗条件下では、行動開始点を CT12 と定義する。従って CT4 は体内時計の夜明けである CT0 の 4 時間後を示す)、主観的夜である CT16 (行動開始から 4 時間後) の 2 点での測定を行なった。ムスカリン受容体サブユニットについて  $^{33}\text{P}$  標識プローブを用いた *in situ* ハイブリダイゼーション法によりフィルムオートラジオグラフィーで検出した結果、SCN におけるシグナルは M3 が強く、M4 は弱く検出され、M1、M2、M5 のシグナルは検出されなかった。また、M3 と M4 はどちらも CT4 と CT16 とで発現量に差はなかった (Fig. 4 A)。さらに、SCN 内で M3 と M4 の分布を digoxigenin (DIG) 標識プローブを用いた *in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて細胞レベルで観察したところ、M3 と M4 の SCN 内の局在においては、どちらも SCN 全域にわたって発現していることが明らかとなった (Fig. 4 B)。



**Fig. 4. SCN におけるムスカリン受容体サブユニットの発現**

(A)  $^{33}\text{P}$  標識プローブを用いたフィルムオートラジオグラフィーによる *in situ* ハイブリダイゼーション法によって観測されるムスカリン受容体の代表例。CT4 (主観的昼) と CT16 (主観的夜) の結果を示す。矢印の先は SCN を示し、赤い矢印で示す M3 と M4 が SCN に発現している。(B) Dig 標識プローブを用いた *in situ* ハイブリダイゼーション法によって観測される M3 と M4 の代表例。v は第三脳室を示し、oc は視交叉を示す。バーは 100  $\mu\text{m}$  を示す。

### 1.3 カルバコールによる *Per1-luc* の位相変位はニコチン受容体を介して抑制される

次に、カルバコールが惹起する位相前進や位相後退に対するニコチン受容体の効果を検索した。まず Time 3 の後退位相では、ニコチン受容体アンタゴニストであるメカミラミンをカルバコールと同時投与すると、カルバコールの単独投与と比べると、位相後退量は優位に増大した (Fig. 5 A-C)。次に Time 12 の前進位相では、カルバコールの単独投与と比べて、メカミラミンとカルバコールの同時投与によって前進量は増大傾向を示し、別のニコチン受容体アンタゴニストであるコノトキシシン MII の同時投与により優位に増大した (Fig. 6 A-D)。したがって、カルバコールによる *Per1* の発現リズムの位相変位は、ニコチン受容体を介して抑制されている可能性が示唆された。

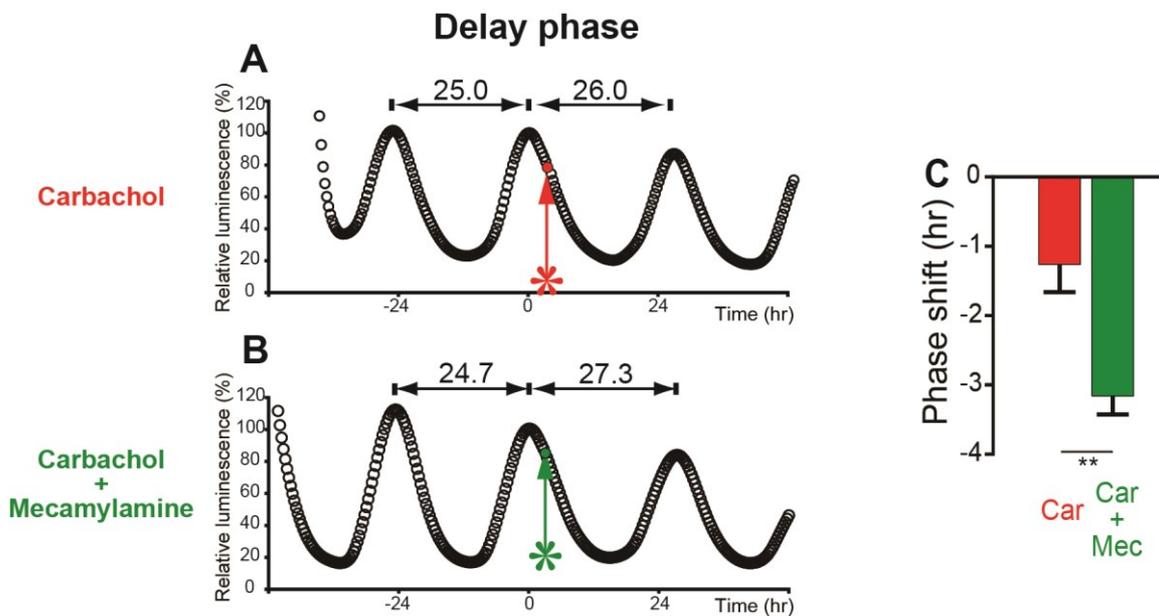
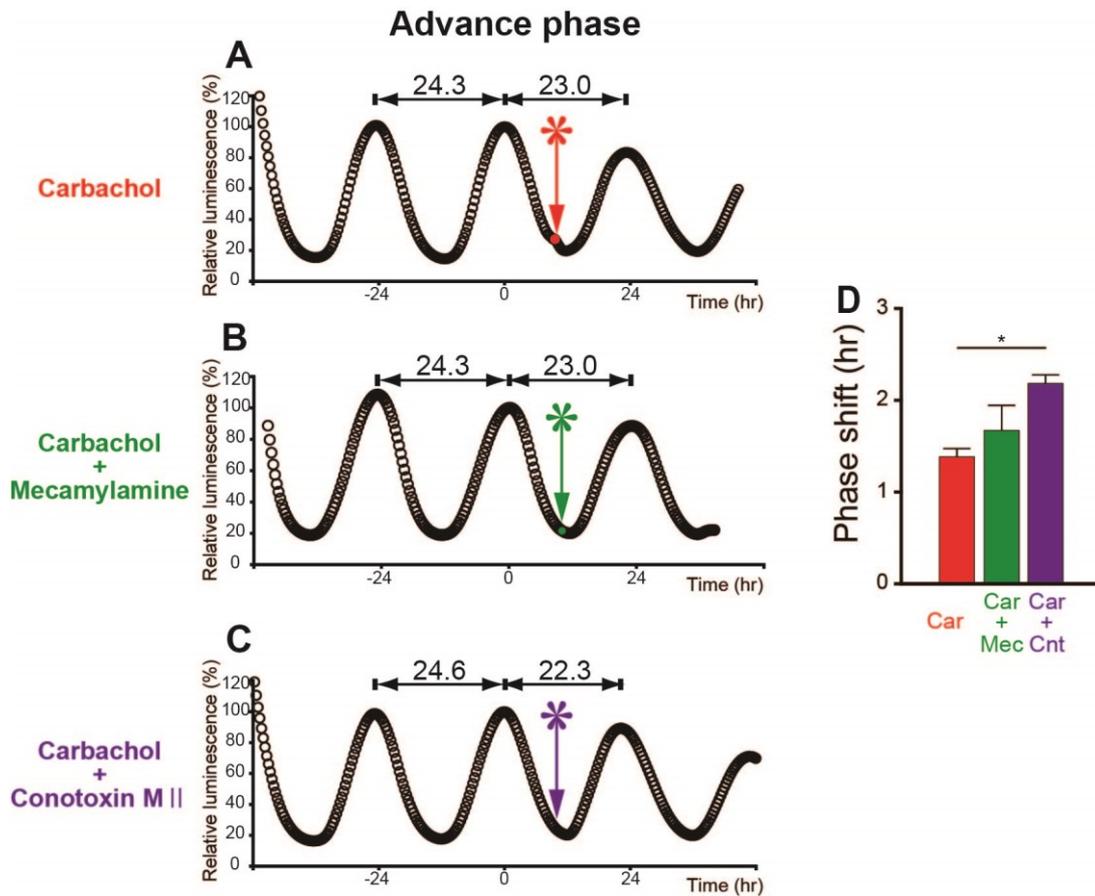


Fig. 5. カルバコールによる *Per1-luc* の発光リズムの位相後退に対するニコチン受容体アンタゴニストの効果

Time 3 における (A) カルバコール単独投与、(B) カルバコールとメカミラミンの同時投与時の発光リズムの代表的な例を示す。(C) 位相後退を起こす位相 (Time 2-4) におけるカルバコール単独投与群 (Car) ( $n = 11$ ) とカルバコールとメカミラミンの同時投与群 (Car + Mec) ( $n = 4$ ) の位相変位量をグラフにしたもの。平均値 $\pm$ 標準誤差で示す。それぞれの群の比較には t 検定を用いた (\*\* $p < 0.01$ )。



**Fig. 6. カルバコールによる *Per1-luc* の発光リズムの位相前進に対するニコチン受容体アンタゴニストの効果**

Time 12 における (A) カルバコール単独投与、(B) カルバコールとメカミラミンの同時投与、(C) カルバコールと conotoxin M II の同時投与時の発光リズムの位相変位の代表的な例を示す。

(D) 位相前進を起こす位相 (Time 8-12) におけるカルバコール投与群 (Car) (n = 30)、メカミラミンの同時投与群 (Car + Mec) (n = 7)、conotoxin M II (Car + Cnt) (n = 4) の同時投与群の発光リズムの位相変位量をグラフにしたもの。平均値±標準誤差で示す。それぞれの群の比較には One-way ANOVA を用い、その後 Post hoc 検定として Turkey 検定を用いた (\* $p < 0.05$ )。

## 考察

脳内カルバコール投与が行動リズム位相を強く変位させることは以前より報告されていた。しかし、その結果は、主観的夜において位相前進のみ惹起されるという報告や(27, 28)、位相依存的に後退・前進が両方とも観測されるという報告があり、一定していない(17-22, 29)。さらに、その効果があるとされる時間位相もさまざまな報告があり定まっていない。このように結果が異なる理由として、これまで、投与量や投与ルートの違いによる作用点の差や、動物種による差が示唆されてきた(23, 30)。カルバコールはアセチルコリン受容体の非特異的なアゴニストとして知られ、複数のアセチルコリン受容体に働く。さらに、アセチルコリン受容体は中枢神経系の様々な箇所が存在し、リズム中枢である SCN のみならず、リズム制御に関するとされる外側膝状体、視床下部腹内側核、縫線核などの活動にも影響を与えることが考えられる。

私はカルバコールの強力なリズム位相変位効果の神経機構を解明するため、行動リズムを決定する中枢として知られる SCN における時計遺伝子発振リズムに与える効果を検証した。本研究では *Per1-luc* トランスジェニックマウスから作成した SCN のみを器官培養する SCN スライスカルチャー系を用いた。この手法は既に、グルタミン酸受容体作動薬である、NMDA や AMPA を培養液中に投与する研究において、生体リズム形成の原点である時計遺伝子のリズムを直接、位相依存的に位相変位をさせることが報告されている(25, 31)。本研究においてカルバコールは、Time 2-4 で時計遺伝子 *Per1* の概日リズム位相を後退させ、Time 10-12 で位相を前進させ、Time 15-22 では効果を示さなかった。これは、カルバコールが SCN の時計機能に直接働いていることを強く示唆している。さらに、脳室内投与の報告(17, 19, 21)で観測されるようなカルバコールによる行動リズムの位相依存的位相変位は、SCN を介して起こることを強く支持するものである。しかし、脳室内投与結果の中には、位相依存的位相変位を示さない場合や、効果を持つ時間位相についても異なる場合がある。この差は、前述のような SCN 外の脳領域にカルバコールが作用し、これを介して間接的に SCN に働くことで行動リズム位相に影響を及ぼしている可能性が考えられる。

他の多くの研究グループと異なり、Gillette らのグループは、*in vitro* においても *in vivo* においても、SCN へのカルバコール投与は位相後退は引き起こさず、位相前進のみ引き起こすと報告している(23, 27)。彼らは、*in vitro* 実験においては、急性 SCN スライスを用いた神経細胞の自発発火リズムを電気生理的に計測した実験系を用い、*in vivo* 実験では、生体の SCN にカルバコールを微量投与して行動リズムを検出する実験系を用いている。そして、どちらの手法においてもカルバコール投与により、位相前進

のみを引き起こしたと報告している。Gillette らの研究において位相後退が観測されなかった理由としては、彼女らが用いたカルバコール濃度が非常に低濃度であることが考えられる。その研究では、生体内投与では SCN に 50  $\mu\text{M}$  のカルバコールを 0.3  $\mu\text{l}$  (つまり 15 pmol) 微量注入しており、Wee ら(27)や Basu ら(32)の使用したカルバコールの量と比べて投与量は低い(29)。SCN 急性スライスにおいても、この研究では 100  $\mu\text{M}$  のカルバコールを左右の SCN に 1  $\mu\text{L}$  ずつ滴下し、5 分後に wash するというものであった(27)。本論文の私の研究では SCN スライスカルチャーを用いて、培養液中の最終濃度が 100  $\mu\text{M}$  になるようにカルバコールを加え、位相依存的位相後退・前進を報告した(33)。急性スライスとスライスカルチャー系では手法が異なるため、直接的な比較はできないものの、*in vitro* においてもカルバコール濃度の違いによって位相変位の結果が異なった可能性が考えられる。

私が所属している研究室では以前、SCN の *Per1-luc* スライスカルチャー系を用いて光同調因子のグルタミン酸受容体作動薬である NMDA と AMPA による位相変位の誘導時間が調査されているが、位相後退が Time 4-7 で、位相前進が Time 9-13 であった(25, 31)。カルバコール投与と比べて位相後退は 2、3 時間ほど遅く、位相前進は同じ時間帯に起こることが注目される(25, 31)。前述の通り、光情報はグルタミン酸作動性神経の RHT より伝達されるが、アセチルコリンの投射経路は RHT ではないと現在では考えられており、SCN へは前脳基底核(34, 35)や中脳橋被蓋部(36)からの投射、または視床下部のローカルなコリン作動性ニューロンが考えられる(6)。光照射後 30 分後にアセチルコリン濃度が SCN に限局して急増する(37)ことから、コリン作動性神経が SCN や視神経に働きかけている可能性や、光同調にも何らかの関わりを持っている可能性が考えられるが、詳しいメカニズムは解明が待たれる。

本研究では SCN スライスカルチャーにおいて、ムスカリン受容体アンタゴニストのアトロピンをカルバコールと同時投与することにより、カルバコールによる位相依存的位相変位を阻害した。従って、SCN の細胞に発現するムスカリン受容体がカルバコール投与による *Per1-luc* の位相変位の主体であることを示唆する。ムスカリン受容体のサブユニットについては、これまでにラットの急性 SCN スライスを用いた電気生理実験において、M1 特異的アンタゴニストであるピレンゼピンがカルバコールによる神経細胞の自発発火リズムの位相前進効果を阻害したことから、M1 が位相変位(前進)に関与すると考えられていた(27, 28)。本研究も、アトロピンを共投与することでカルバコールによる *Per1* の発光リズムの位相変位効果が阻害されたことから、ムスカリン受容体が位相変位に寄与する可能性を支持している。しかし、本研究において *in situ* ハ

イブリダイゼーションを用いた受容体検索では M1 の陽性シグナルは検出されなかった。近年 Basu らは、M1/M4 アゴニストである McN-A-343 を主観的昼の中頃に投与すると、SCN 急性スライスにおける神経細胞の自発発火の概日リズム位相は前進するが、M2/M3 のアゴニストであるベタネコールでは概日リズムの位相変位は見られなかったと報告している(32)。従って本研究を軸に考えると、M4 が *Per1-luc* の位相前進に重要であると示唆される。

また今回、ニコチン受容体アンタゴニストの同時投与により、カルバコールによる *Per1* の発現リズムの位相変位量は、ニコチン受容体を介して抑制されている可能性が示唆された。カルバコールの位相前進に対する効果がニコチン受容体アンタゴニスト間で異なる理由として、それぞれが拮抗するサブユニットが異なることが考えられる。メカミラミンはニコチン受容体の非特異的アンタゴニストであるのに対して、コノトキシン MII はニコチン受容体サブユニットの *Chrn2* と *Chrna3* で構成されるニコチン受容体の特異的アンタゴニストと言われる(38, 39)。次章ではこれらの受容体サブユニットのノックアウトマウスを作出し、その概日行動リズムにおける生理的意義を追求した。

本章において、カルバコールは、SCN において位相依存的に時計遺伝子 *Per1* の発現リズムを位相変位させること、および、カルバコールの時計遺伝子の位相依存的位相変位作用はムスカリン受容体を介することを明らかにした。また、SCN においてムスカリン受容体サブタイプのうち M3 と M4 が恒常的に発現することを明らかにした。さらに、ニコチン受容体アンタゴニストの投与実験から、カルバコールによる位相変位量はニコチン受容体を介して抑制されることが示唆された。本研究によって明らかとなったカルバコールによる、中枢時計 SCN の概日リズムにおける位相依存的な位相前進及び後退作用は、従来想定されていなかった新規の概日時計の調整剤の開発につながる可能性があり、概日リズムが乱れがちな「明るい夜」に生きる現代人にとって意義深いと考える。

## 第二章

### SCN に発現するニコチン性アセチルコリン受容体の生理機能について

#### 序論

第一章での SCN スライスカルチャーにおけるカルバコール投与の実験において、ニコチン受容体はカルバコールによる位相変位を増強させることが明らかとなった。ニコチン受容体は神経系や筋肉などの組織に広く存在し、陽イオンを細胞内にとりこむリガンド開閉型イオンチャネルである。内因性神経伝達物質のアセチルコリンや、外因性リガンドであるニコチンやカルバコールによって開閉を制御される。Chrna1、Chrna2、Chrna3、Chrna4、Chrna5、Chrna6、Chrna7、Chrna9、Chrna10、Chrnb1、Chrnb2、Chrnb3、Chrnb4、Chrnd、Chrne、Chrng の 16 種類のサブユニットが報告されており、骨格筋では Chrna1 が 2 つと Chrnb1、Chrnd、Chrng (または Chrne) が 1 つずつの 5 量体が形成される。神経系においては Chrna7 と Chrna9 がそれぞれホモ 5 量体を形成し、Chrna2-6 と Chrnb2-4 は Chrna サブユニットと Chrnb サブユニットがそれぞれ 2 つと 3 つまたは 3 つと 2 つずつのヘテロ 5 量体を形成することが知られている。特に、視床下部では Chrna4/Chrnb2 のヘテロ 5 量体と Chrna7 のホモ 5 量体形成が主であると言われている(39, 40)。

私の所属研究室では、レーザーマイクロダイセクション法にて採取した SCN サンプルについて、16 種類のニコチン受容体サブユニットの発現を DNA マイクロアレイにより解析し、Chrnb2 サブユニットの発現が 32% と最も多く、Chrna3 サブユニットの発現が 28% で 2 番目に多いという結果を得た (未発表)。Chrnb2 と Chrna3 サブユニットはそれらのみで 5 量体を形成することが知られている(41, 42)。

本章では SCN で多く発現するニコチン受容体サブユニット Chrnb2 と Chrna3 の 24 時間リズムを詳しく解析するとともに、遺伝子改変マウスにより概日機能における Chrnb2 と Chrna3 の生理的意義の解明を試みた。

## 結果

### 2.1. SCN に発現するニコチン性アセチルコリン受容体サブユニット

DNA マイクロアレイの結果で得られた、最も SCN で発現の多いニコチン受容体サブユニット *Chrn2* について、定量 PCR 法により解析した。マウスを LD 条件に 2 週間同調させた後、恒常暗期 (DD) にして 2 日目に 6 時間毎に 4-5 匹のマウスの脳を採取した。SCN での *Chrn2* の発現量は 1 日を通して一定であった (Fig. 1)。また、<sup>33</sup>P 標識プローブを用いた *in situ* ハイブリダイゼーション法による解析においても、*Chrn2* はどの時刻においても SCN で恒常的に発現しているという結果を得た。SCN において 2 番目に発現の多い *Chrna3* はどちらの手法においても CT8 をピーク、CT20 をトラフとする概日リズムが観測された。以上の結果より、SCN においてニコチン受容体は *Chrn2* と *Chrna3* とが SCN で多く発現していることが明らかとなった。

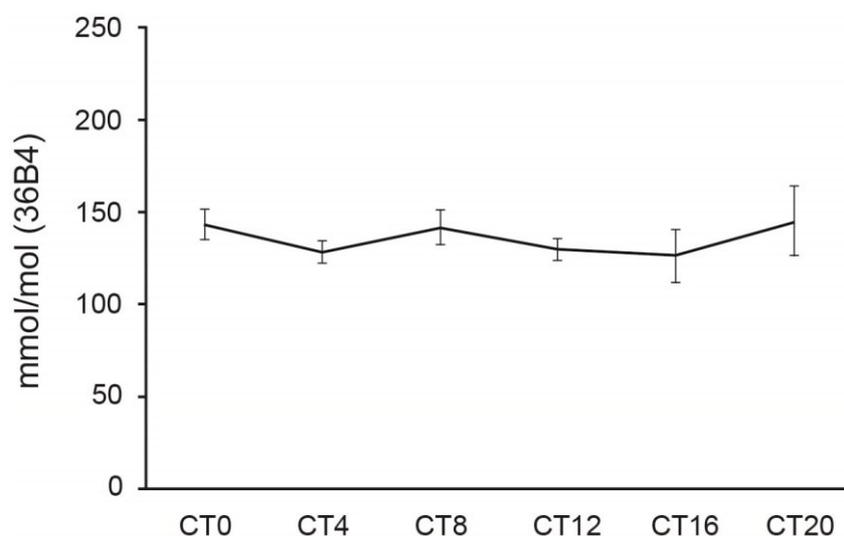


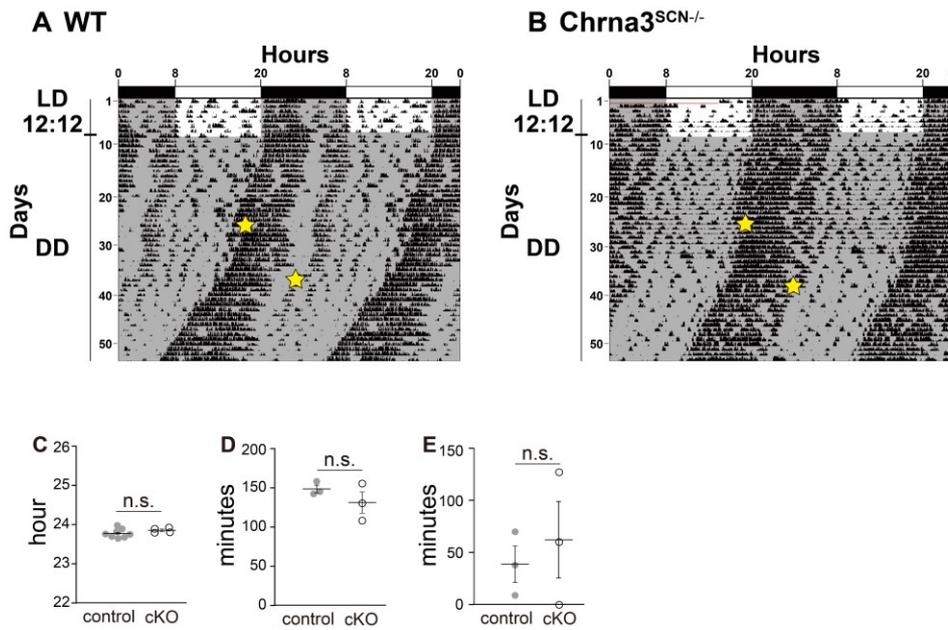
Fig. 1. *Chrn2* の SCN における mRNA 発現

恒暗条件で飼育したマウスの SCN に発現する *Chrn2* の mRNA 量を 4 時間毎に定量 PCR 法により求めた。x 軸はサンプリングした概日時間を示し、y 軸はハウスキーピング遺伝子である 36B4 を用いた相対値を示す。CT0-16 は  $n = 4$ 、CT20 は  $n = 5$  の平均値  $\pm$  標準誤差を示す。

## 2.2. SCN 特異的な *Chrna3* ノックアウトマウス (*Chrna3*<sup>SCN-/-</sup>) および SCN 特異的な *Chrnb2* ノックアウトマウス (*Chrnb2*<sup>SCN-/-</sup>) の行動解析

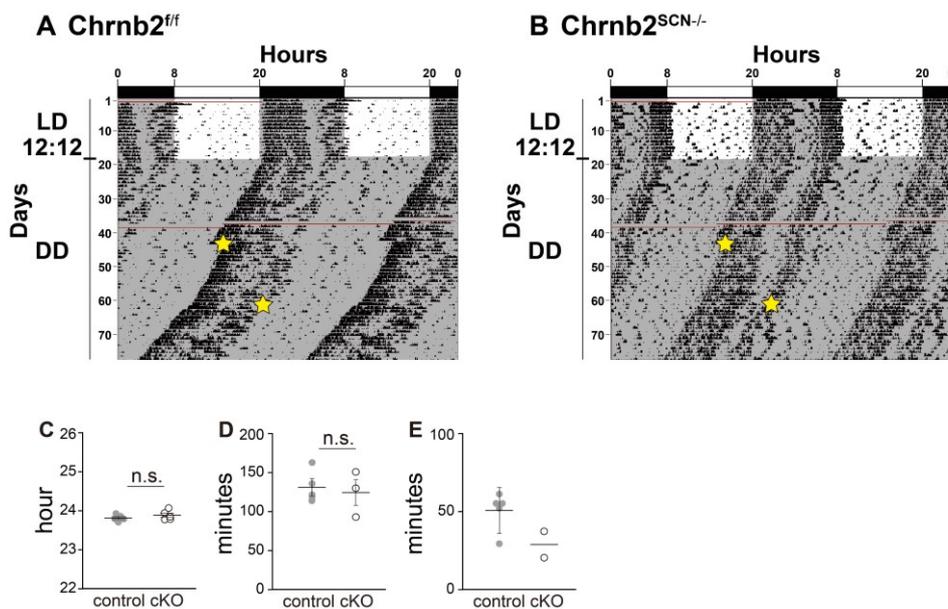
ニコチン受容体において *Chrna3* サブユニットは *Chrnb* サブユニットの *Chrnb2* や *Chrnb4* と 5 量体を形成することがこれまで知られており (40, 43)、SCN では *Chrna3/Chrnb2* の 5 量体を形成する可能性が最も高いことが示唆された。すなわち、*Chrna3* が概日リズムを持って SCN に発現することで、*Chrna3* と *Chrnb2* で形成されるニコチン受容体が概日リズムを持って SCN で機能していると推察した。そこで、私はニコチン受容体の概日行動リズムにおける生理的意義について調査するため、まず *Chrna3* と *Chrnb2* のそれぞれの全身ノックアウトマウス (*Chrna3*<sup>-/-</sup>、*Chrnb2*<sup>-/-</sup>) を作成した。*Chrna3*<sup>-/-</sup> は、対照群である同腹のヘテロマウスや野生型マウスと比べて著しい成長異常が見られ、生後 4 週間までに全て死亡した。また、*Chrnb2*<sup>-/-</sup> においてもヘテロ同士の交配から生まれるノックアウトマウスはメンデルの法則から考えられる匹数を下回り、さらに成長後も子孫を残すことができなかった。したがって、それぞれの全身ノックアウトマウスを用いた概日行動測定は理想的ではないと考え、SCN 特異的なノックアウトマウスの作成を行うこととした。

SCN 特異的に Cre を発現するマウスを用いて、*Chrna3*<sup>SCN-/-</sup> と *Chrnb2*<sup>SCN-/-</sup> を作出した。これらのマウスにおいては全身ノックアウトマウスで確認されたような成長異常や繁殖異常は確認されなかったため、次に概日行動リズムの測定を行った (Fig. 2 A, Fig. 3 A)。まず、*Chrna3*<sup>SCN-/-</sup> と *Chrnb2*<sup>SCN-/-</sup> において恒常暗期における行動周期長を調べたところ、*Chrna3*<sup>SCN-/-</sup> と対照群である野生型 (WT) マウスの間で有意な差は観測されなかった (Fig. 2 C)。また、*Chrnb2*<sup>SCN-/-</sup> と対照群である *Chrnb2*<sup>fl/fl</sup> の間では有意な差は見られなかった (Fig. 3 C)。次に、光感受性を調べるため、主観的夜の前半と後半における短時間光照射の実験を行ったが、概日行動リズムの位相変位量は対照群と比べて著明な差は見られなかった (Fig. 2 D, E, Fig. 3 D, E)。



**Fig. 2. *Chrna3* の SCN ノックアウトマウス (*Chrna3*<sup>SCN-/-</sup>) の行動解析**

(A) 野生型マウス (WT)、(B) *Chrna3*<sup>SCN-/-</sup> の代表的な行動リズム。星は 30 分の光照射時点を示す。(C) 内因性周期長 (WT: n = 8, *Chrna3*<sup>SCN-/-</sup>: n = 4)、(D) CT14 (n = 3, n = 4)。それぞれについて平均値±標準誤差を示す。それぞれの群の比較には t 検定を用いた。(E) CT22 (n = 3, n = 2) における短時間光照射による位相変位置量。

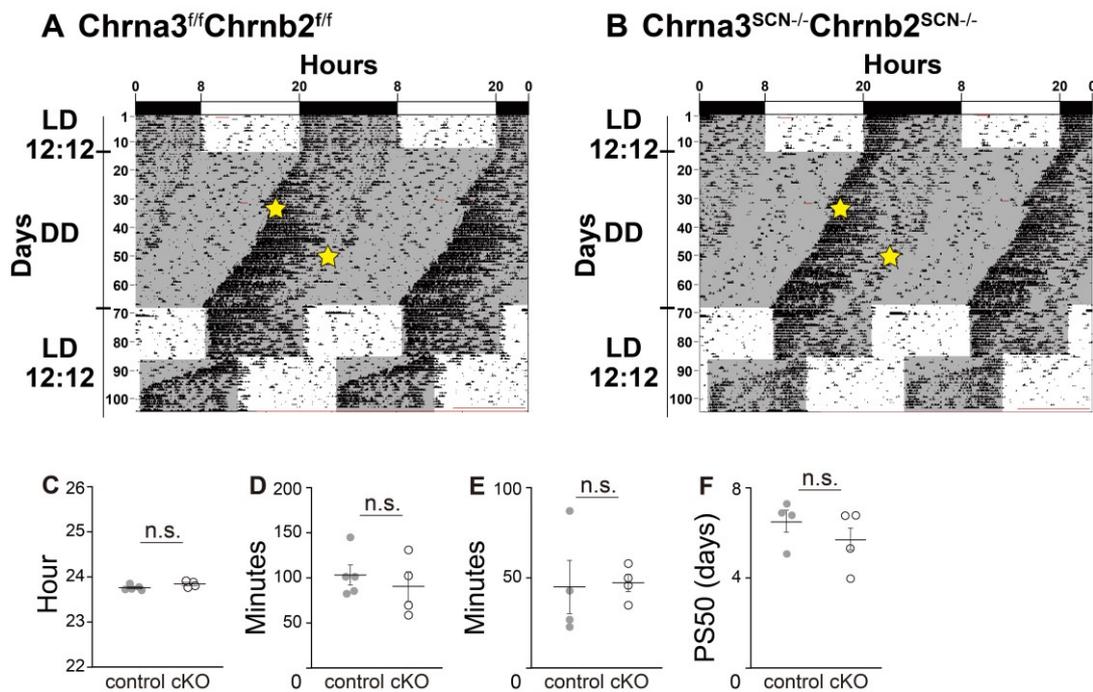


**Fig. 3. *Chrnb2* の SCN ノックアウトマウス (*Chrnb2*<sup>SCN-/-</sup>) の行動解析**

(A) *Chrnb2* flox マウス (*Chrnb2*<sup>fl/fl</sup>)、(B) *Chrnb2*<sup>SCN-/-</sup> の代表的な行動リズム。星は 30 分の光照射時点を示す。(C) 内因性周期長 (*Chrnb2*<sup>fl/fl</sup>: n = 5, *Chrnb2*<sup>SCN-/-</sup>: n = 5) (D) CT14 (n = 5, n = 3)。それぞれについて平均値±標準誤差を示す。それぞれの群の比較には t 検定を用いた。(E) CT22 (n = 5, n = 2) における短時間光照射による位相変位置量。

### 2.3. SCN 特異的な *Chrna3*、*Chrbn2* ダブルノックアウトマウス (*Chrna3*<sup>SCN-/-</sup>*Chrbn2*<sup>SCN-/-</sup>) の行動解析

次に SCN で *Chrna3* と *Chrbn2* を両方欠損させた *Chrna3*<sup>SCN-/-</sup>*Chrbn2*<sup>SCN-/-</sup> の行動解析を行った (Fig. 4 A, B)。それぞれの SCN 特異的ノックアウトマウスと同様に恒常暗期における行動周期長 (Fig. 4 C) と光感受性について調べたところ、対照群との有意な差は見られなかった (Fig. 4 D, E)。さらに、概日リズム産生の安定性を見るために明暗周期を 8 時間前進させる時差実験を行ったところ、新しい明暗に再同調するのに要する日数に、対照群との有意な差は見られなかった (Fig. 4 F)。



**Fig. 4 *Chrna3/Chrbn2* SCN ノックアウトマウス (*Chrna3*<sup>SCN-/-</sup>*Chrbn2*<sup>SCN-/-</sup>) の行動解析**

(A) *Chrna3/Chrbn2* flox マウス (*Chrna3*<sup>f/f</sup>*Chrbn2*<sup>f/f</sup>) と (B) *Chrna3*<sup>SCN-/-</sup>*Chrbn2*<sup>SCN-/-</sup> の代表的な行動リズムを示す。星は 30 分の光照射時点を示す。*Chrna3*<sup>f/f</sup>*Chrbn2*<sup>f/f</sup> と *Chrna3*<sup>SCN-/-</sup>*Chrbn2*<sup>SCN-/-</sup> の (C) 内因性周期長 (*Chrna3*<sup>f/f</sup>*Chrbn2*<sup>f/f</sup>: n = 5, *Chrna3*<sup>SCN-/-</sup>*Chrbn2*<sup>SCN-/-</sup>: n = 4)、(D) CT14 (n = 5, n = 4) と (E) CT22 (n = 4, n = 4) における短時間光照射による位相変位量、(F) Jet-lag 実験での再同調スピード (n = 4, n = 4) を示す。また、それぞれについて平均値±標準誤差を示す。それぞれの群の比較には t 検定を用いた。

## 考察

現在までのところ、*Chrna3*<sup>SCN-/-</sup>、*Chrb2*<sup>SCN-/-</sup>、*Chrna3*<sup>SCN-/-</sup>*Chrb2*<sup>SCN-/-</sup>における内因性行動リズムの周期長及び行動リズムの光応答性と、*Chrna3*<sup>SCN-/-</sup>*Chrb2*<sup>SCN-/-</sup>における概日リズム産生の安定性のいずれにおいても、対照群のマウスと比べて顕著な異常は示さなかった。その理由の1つとして、SCNに存在する他のサブユニットの代償が可能性としてあげられる。実際に*Chrna3*や*Chrb2*は他のサブユニットとも複合体を形成することが知られており(43)、SCNにおけるDNAマイクロアレイの結果より、*Chrna3*や*Chrb2*と比べて発現量は低いものの、*Chrna4*や*Chrna7*のSCNにおける発現も確認されている。また、行動リズムの同調能力を調べる手法として従来用いられてきた光刺激が、アセチルコリンのような非光同調システムと強く関係あるとされるシグナルに対する機能検索にはふさわしくない可能性もある。非光同調の手法は現在も確立したものが存在しないため、今後非光同調の手法として、メラトニン刺激、セロトニン刺激、暗刺激、食餌刺激、運動刺激などの手法を新たに考案して検索することが必要とされる。

近年、シフトワーク及び夜間勤務や、夜型生活によって概日時計が破綻する機会が増えている。結果として、同調機能障害及び概日時計と環境の明暗周期の慢性的なずれによる、睡眠障害や生活習慣病などの疾病のリスクが上昇している。光のみに頼って新しい明暗環境への再同調には数日を要するため、非光同調系を含めた効率の良い再同調法の確立が必要とされている。前述のように非光同調研究の手法には現在も確立したものが存在しないため、本章で作出したニコチン受容体ノックアウトマウスを用いて手法の確立が求められる。

## 実験材料と方法

### 動物と行動解析

*Chrna3* の受容体機能に重要なドメイン構造をコードするエクソンを loxP で挟んだ配列と薬剤耐性遺伝子配列を両方持ったターゲティングベクターを作成する。次に、このターゲティングベクターを ES 細胞へと導入し、薬剤によるセレクションを行った後、マウス胚盤胞へ ES 細胞をインジェクションし、キメラ胚を得る。この仮親から生まれたキメラマウスを正常マウスと交配させ、F1 ヘテロノックアウトマウスを作成する。続いて全身で Cre を発現する全身 Cre マウスと交配して、*Chrna3* ノックアウト (*Chrna3*<sup>-/-</sup>) マウスを作出した。さらに、SCN 特異的に Cre を発現する SCN-Cre マウスをかけあわせて、SCN 特異的に *Chrna3* が欠損したマウスを作出した (*Chrna3*<sup>SCN-/-</sup>)。また、*Chrb2* マウスにおいては MT マウスを MGI より購入した (HEPD0739\_7\_H05)。このマウスでは変位挿入の有無を選別するための薬剤耐性遺伝子が FLP 配列で挟まれており、受容体機能に重要なドメインが loxP 配列で挟まれている。まず、+/MT マウスをフリップパーゼマウスと掛け合わせて薬剤耐性遺伝子を除いた flox マウスを得る。続いて全身 Cre マウスと交配して、*Chrb2* ノックアウト (*Chrb2*<sup>-/-</sup>) マウスを作出した。次に、SCN-Cre マウスとかけあわせて *Chrb2* が SCN 特異的に欠損したマウスを作出した (*Chrb2*<sup>SCN-/-</sup>) を得た。さらに *Chrna3*<sup>SCN-/-</sup> と *Chrb2*<sup>SCN-/-</sup> を掛け合わせて SCN 特異的に *Chrna3* と *Chrb2* が欠損したマウス (*Chrna3*<sup>SCN-/-</sup> *Chrb2*<sup>SCN-/-</sup>) を得た。なお、全身 Cre マウスと SCN-Cre マウスは使用前に戻し交配により遺伝的背景を C57BL/6 近交系マウスに揃えている。

行動実験に使用したマウスは 12 時間明期 : 12 時間暗期の明暗条件下、自由摂食および自由飲水条件にて、2 週間以上予備飼育した後、実験に使用した。マウスの行動は、赤外線センサー (Omron) を用いて計測した。計測データは、Chronobiology kit (Standford Software Systems) を用いて解析した。マウスの行動リズムは、Clocklab (ActiMetrics) を用いて解析した。行動計測を初めて 1 週間以上後に恒常暗期にして内因性の行動周期長を調べた。次に、光感受性を調べるため、行動開始点から 2 時間後に 30 分の短時間光照射を行い、位相後退量を求めた。さらに、行動開始点から 10 時間後に 30 分の短時間照射を行い、位相前進量を求めた。また、再度 12 時間明期 : 12 時間暗期の明暗条件でマウスを飼育し、2 週間が経過したところで明暗周期を 8 時間前進させる時差実験を行い、新しい明暗環境に同調するまでにかかった日数の半分を PS50 として求めた。

スライスカルチャーの実験には *Per1* プロモーターにルシフェラーゼを結合したトランスジェニックマウス (*Per1-luc*) を用いた(24)。

本研究における動物実験は全て、京都大学実験動物委員会の承認を得ており、「京都大学における動物実験実施に関する規定」に従って行った。

### SCN スライスカルチャー

生後 4-7 日齢の、新生仔 *Per1-luc* マウスを用いた。断頭して脳を素早く摘出した後、氷上でトリミングし、Mellwain ティッシュチョッパーを用いて 400  $\mu\text{m}$  厚の冠状切片を作成した。次に、双眼実態顕微鏡下で両側 SCN を摘出し、24-well プレート内に 240  $\mu\text{l}$  の培養液 (50% Minimum Essential Medium、25% Hanks' Balanced Salt Solution、25% Horse Serum、36 mM グルコース、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  penicillin、streptomycin) を入れ、メンブレン上にて 35°C で一週間以上培養した。SCN スライスはその後、1 mM ルシフェリン含有培養液に移し、高感度冷却 CCD カメラにて 20 分毎のルシフェラーゼ発光を経時的に測定した。Image J にて SCN 全体の画像解析を行い、*Per1-luc* の発光強度のリズム位相を求めた。

### SCN スライスカルチャーへの薬物投与

薬物投与は *Per1-luc* の発光リズムの 2 回目と 3 回目のピークの間に行った。培養液 240  $\mu\text{L}$  に対して 2.4  $\mu\text{L}$  量のカルバコール (ナカライテスク) (記述がなければ最終濃度 100  $\mu\text{M}$ ) と対照群としてカルバコールの代わりに同量の vehicle を培養液中に投与した。また、一部のスライスには、カルバコールとともに、アトロピン (ナカライテスク) (最終濃度 10  $\mu\text{M}$ ) またはメカミラミン (Sigma) (最終濃度 52.6  $\mu\text{M}$ ) またはコノトキシシン M II (Tocris) (カルバコール最終濃度 10  $\mu\text{M}$  に対し、コノトキシシン M II 最終濃度 52.6  $\mu\text{M}$ ) を投与した。

### *in situ* ハイブリダイゼーション法

まず、下記の mRNA 配列特異的なアンチセンスプローブを作成した。

*mAChR1*: 1961-2520 bp (NM\_001112697.1)

*mAChR2*: 1101-1620 bp (NM\_203491.3)

*mAChR3*: 2561-3100 bp (NM\_007699.2)

*mAChR4*: 851-1360 bp (NM\_007699.2)

*mAChR5*: 763-1301 bp (NM\_205783.2)

目的の cDNA 断片をクローニングし、アンチセンス cRNA プローブ合成の鋳型として使用した。各 cRNA プローブは、digoxigenin 標識 UTP (Roche) または  $^{33}\text{P}$  標識 UTP (PerkinElmer) を用いて合成した。

*in situ* ハイブリダイゼーションは浮遊切片法により行った<sup>(9)</sup>。深麻酔下において 4% パラホルムアルデヒドで灌流固定を行い、2 日間の浸漬固定を行った。20% スクロース液に一晩浸して凍結保護を行った後、ドライアイスで瞬間凍結した脳からクリオスタットで 40  $\mu\text{m}$  厚の冠状切片を作成した。2 $\times$ SSC 溶液で切片を洗浄した後、1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  proteinaseK 溶液 (0.1 M Tris buffer、50 mM EDTA pH8.0) で 37 $^{\circ}\text{C}$  で 10 分間透過処理を行い、4%PFA/0.1 M PB を加えて反応を止めた。室温で 5 分振盪した後、無水酢酸を含むアセチル化溶液 (0.25% acetic anhydride、0.1 M triethanolamine) で室温で 10 分間のアセチル化処理を行った。続いて 2 $\times$ SSC 溶液で 2 回 (各回 5 分間) 洗浄した後、標識 cRNA プローブを含む 1.8 mL ハイブリダイゼーションバッファー (55% ホルムアミド、10%デキストランサルフェート、10 mM Tris HCl、1 mM SDS、10 mM DTT、pH8.0) 中に切片を移し、60 $^{\circ}\text{C}$  で一晩反応させた。プローブ量は 1.8  $\mu\text{L}$  (1 $\times$ ) と 7.2  $\mu\text{L}$  (4 $\times$ ) の 2 条件で反応させた。反応後、脳切片を 2 $\times$ SSC/50%ホルムアミドを用いて、60 $^{\circ}\text{C}$  で 2 回 (各回 15 分間) で洗浄した。その後、10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  RNase 溶液 (10 mM Tris-HCl、1 mM EDTA、0.5 M NaCl、pH8.0) にて 37 $^{\circ}\text{C}$  で 60 分間処理し、ハイブリダイズされなかったプローブを断片化した。続いて 2 $\times$ SSC/50%ホルムアミドを用いて 60 $^{\circ}\text{C}$  で 2 回 (各回 15 分間) 洗浄し、0.4 $\times$ SSC 溶液で 60 $^{\circ}\text{C}$  で 30 分間洗浄した。

DIG 標識 *in situ* ハイブリダイゼーション法は、まず 0.4 $\times$ SSC 溶液洗浄の後に、Blocking 試薬の入った瓶に切片を移し、室温で 60 分間以上振盪した。アルカリフォスファターゼ標識抗 DIG 抗体の Fab 断片 (Roche Diagnostics) で 4 $^{\circ}\text{C}$  で 2、3 日間抗体反応を行った。反応後、室温で 3 回 (各回 20 分間) 洗浄した後、NBT (0.34 mg/ml, Roche Diagnostics) と BCIP (0.18 mg/mL, Roche Diagnostics) を含む反応液で、室温にて発色させ、反応が完了したら TE バッファーに浸して反応を止めた。最後にゼラチンコートされたスライドガラスに貼り付け、エタノールで段階的に脱水し、エンテラン (Merk Chemicals) を用いて封入した。

RI 標識 *in situ* ハイブリダイゼーション法は、0.4 $\times$ SSC 溶液洗浄後に、ゼラチンコートされたスライドガラスに貼り付け、よく乾燥させた後、 $^{14}\text{C}$ -acrylic Standard (Amersham) とともに 5 日間、BioMax film (Kodak) に感光させフィルムオートラジオグラフィーを行った。

RI 実験に関しては、京都大学放射性同位元素等専門委員会の定める「京都大学にお

ける放射線障害の防止に関する規定」に従い行った。

#### 定量 PCR 法

野生型マウスを明期 12 時間：暗期 12 時間の LD 条件に 2 週間同調させ、恒常暗期 (DD) にして 2 日目に 4 時間ごと 6 点の 24 時間サンプリングを行った。クリオスタットにより脳切片を作成し、レーザーマイクロダイセクション法を用いてマウスの SCN 領域をサンプルとして回収し、RNA 抽出・逆転写反応によって cDNA を合成した後、定量 PCR 法を用いて mRNA を定量した。サンプルと同時に増幅配列をクローニングしたプラスミドで希釈系列をつくり、検量線を引くことで mRNA の絶対量を求めた。

## 引用文献

1. M. H. Hastings, E. S. Maywood, M. Brancaccio, Generation of circadian rhythms in the suprachiasmatic nucleus. *Nat Rev Neurosci* **19**, 453-469 (2018).
2. J. A. Mohawk, J. S. Takahashi, Cell autonomy and synchrony of suprachiasmatic nucleus circadian oscillators. *Trends Neurosci* **34**, 349-358 (2011).
3. N. Mrosovsky, Locomotor activity and non-photoc influences on circadian clocks. *Biological Reviews* **71**, 343-372 (1996).
4. R. E. Mistlberger, D. J. Skene, Nonphotoc entrainment in humans? *J Biol Rhythms* **20**, 339-352 (2005).
5. C. M. Greco, P. Sassone-Corsi, Circadian blueprint of metabolic pathways in the brain. *Nat Rev Neurosci*, (2018).
6. R. Y. Moore, N. J. Lenn, A retinohypothalamic projection in the rat. *J Comp Neurol* **146**, 1-14 (1972).
7. S. Hattar, H. W. Liao, M. Takao, D. M. Berson, K. W. Yau, Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science* **295**, 1065-1070 (2002).
8. D. Ginty *et al.*, Regulation of CREB phosphorylation in the suprachiasmatic nucleus by light and a circadian clock. *Science* **260**, 238-241 (1993).
9. Y. Shigeyoshi *et al.*, Light-induced resetting of a mammalian circadian clock is associated with rapid induction of the mPer1 transcript. *Cell* **91**, 1043-1053 (1997).
10. E. M. Mintz, C. L. Marvel, C. F. Gillespie, K. M. Price, H. E. Albers, Activation of NMDA receptors in the suprachiasmatic nucleus produces light-like phase shifts of the circadian clock in vivo. *J Neurosci* **19**, 5124-5130 (1999).
11. J. M. Ding *et al.*, Resetting the biological clock: mediation of nocturnal circadian shifts by glutamate and NO. *Science* **266**, 1713-1717 (1994).
12. F. K. Stephan, The "other" circadian system: food as a Zeitgeber. *J Biol Rhythms* **17**, 284-292 (2002).
13. R. E. Mistlberger, D. J. Skene, Social influences on mammalian circadian

- rhythms: animal and human studies. *Biological Reviews* **79**, 533-556 (2004).
14. Y. Tahara *et al.*, Entrainment of the mouse circadian clock by sub-acute physical and psychological stress. *Sci Rep* **5**, 11417 (2015).
  15. H. E. Albers, C. F. Ferris, Neuropeptide Y: role in light-dark cycle entrainment of hamster circadian rhythms. *Neurosci Lett* **50**, 163-168 (1984).
  16. M. Medanic, M. U. Gillette, Serotonin regulates the phase of the rat suprachiasmatic circadian pacemaker in vitro only during the subjective day. *J Physiol* **450**, 629-642 (1992).
  17. M. Zatz, M. A. Herkenham, Intraventricular carbachol mimics the phase-shifting effect of light on the circadian rhythm of wheel-running activity. *Brain Res* **212**, 234-238 (1981).
  18. D. J. Earnest, F. W. Turek, Role for acetylcholine in mediating effects of light on reproduction. *Science* **219**, 77-79 (1983).
  19. D. J. Earnest, F. W. Turek, Neurochemical basis for the photic control of circadian rhythms and seasonal reproductive cycles: role for acetylcholine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 4277-4281 (1985).
  20. J. H. Meijer, E. van der Zee, M. Dietz, The effects of intraventricular carbachol injections on the free-running activity rhythm of the hamster. *J Biol Rhythms* **3**, 333-348 (1988).
  21. B. E. Wee, K. D. Anderson, N. S. Kouchis, F. W. Turek, Administration of carbachol into the lateral ventricle and suprachiasmatic nucleus (SCN) produces dose-dependent phase shifts in the circadian rhythm of locomotor activity. *Neurosci Lett* **137**, 211-215 (1992).
  22. C. S. Colwell, C. M. Kaufman, M. Menaker, Phase-shifting mechanisms in the mammalian circadian system: new light on the carbachol paradox. *J Neurosci* **13**, 1454-1459 (1993).
  23. G. F. Buchanan, M. U. Gillette, New light on an old paradox: site-dependent effects of carbachol on circadian rhythms. *Exp Neurol* **193**, 489-496 (2005).
  24. S. Yamaguchi *et al.*, The 5' upstream region of mPer1 gene contains two promoters and is responsible for circadian oscillation. *Curr Biol* **10**, 873-876 (2000).
  25. M. Asai *et al.*, Visualization of mPer1 transcription in vitro: NMDA induces a

- rapid phase shift of mPer1 gene in cultured SCN. *Curr Biol* **11**, 1524-1527 (2001).
26. S. Yamaguchi *et al.*, Synchronization of cellular clocks in the suprachiasmatic nucleus. *Science* **302**, 1408-1412 (2003).
  27. C. Liu, M. U. Gillette, Cholinergic regulation of the suprachiasmatic nucleus circadian rhythm via a muscarinic mechanism at night. *J Neurosci* **16**, 744-751 (1996).
  28. M. U. Gillette *et al.*, Role of the M1 receptor in regulating circadian rhythms. *Life Sci* **68**, 2467-2472 (2001).
  29. M. Zatz, M. J. Brownstein, Intraventricular carbachol mimics the effects of light on the circadian rhythm in the rat pineal gland. *Science* **203**, 358-361 (1979).
  30. K. G. Bina, B. Rusak, Muscarinic receptors mediate carbachol-induced phase shifts of circadian activity rhythms in Syrian hamsters. *Brain Res* **743**, 202-211 (1996).
  31. Y. Mizoro *et al.*, Activation of AMPA receptors in the suprachiasmatic nucleus phase-shifts the mouse circadian clock in vivo and in vitro. *PLoS One* **5**, e10951 (2010).
  32. P. Basu, A. L. Wensel, R. McKibbin, N. Lefebvre, M. C. Antle, Activation of M1/4 receptors phase advances the hamster circadian clock during the day. *Neurosci Lett* **621**, 22-27 (2016).
  33. K. Dojo *et al.*, Carbachol induces phase-dependent phase shifts of Per1 transcription rhythms in cultured suprachiasmatic nucleus slices. *J Biol Rhythms* **32**, 101-108 (2017).
  34. Z. R. Rao *et al.*, Distribution of cholinergic neurons and fibers in the hypothalamus of the rat using choline acetyltransferase as a marker. *Neuroscience* **20**, 923-934 (1987).
  35. T. Ichikawa, Y. Hirata, Organization of choline acetyltransferase-containing structures in the forebrain of the rat. *J Neurosci* **6**, 281-292 (1986).
  36. K. G. Bina, B. Rusak, K. Semba, Localization of cholinergic neurons in the forebrain and brainstem that project to the suprachiasmatic nucleus of the hypothalamus in rat. *J Comp Neurol* **335**, 295-307 (1993).
  37. N. Murakami, K. Takahashi, K. Kawashima, Effect of light on the

- acetylcholine concentrations of the suprachiasmatic nucleus in the rat. *Brain Res* **311**, 358-360 (1984).
38. S. A. Kaiser, L. Soliakov, S. C. Harvey, C. W. Luetje, S. Wonnacott, Differential inhibition by alpha-conotoxin-MII of the nicotinic stimulation of [3H]dopamine release from rat striatal synaptosomes and slices. *J Neurochem* **70**, 1069-1076 (1998).
  39. D. C. Perry *et al.*, Measuring nicotinic receptors with characteristics of  $\alpha 4\beta 2$ ,  $\alpha 3\beta 2$  and  $\alpha 3\beta 4$  subtypes in rat tissues by autoradiography. *Journal of Neurochemistry* **82**, 468-481 (2002).
  40. C. Gotti, M. Zoli, F. Clementi, Brain nicotinic acetylcholine receptors: native subtypes and their relevance. *Trends Pharmacol Sci* **27**, 482-491 (2006).
  41. J. Boulter *et al.*, Functional expression of two neuronal nicotinic acetylcholine receptors from cDNA clones identifies a gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 7763-7767 (1987).
  42. C. W. Luetje *et al.*, Neurotoxins distinguish between different neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit combinations. *J Neurochem* **55**, 632-640 (1990).
  43. C. Gotti, F. Clementi, Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Prog Neurobiol* **74**, 363-396 (2004).

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、熱心なご鞭撻を賜り、素晴らしい研究環境を提供してくださいました京都大学薬学研究科 岡村 均教授に心より感謝申し上げます。

また、実験手法や結果の考察、論文作成にあたり、細部まで様々な形でご助言・ご指導くださった京都大学薬学研究科 土居 雅夫教授および山口 賀章講師に、深く感謝申し上げます。

そして、様々なご支援および日々の激励やご助言を賜りました京都大学薬学研究科 フスタ ジャン ミシェル准教授および三宅 崇仁助教をはじめとするシステムバイオロジー分野の先輩方、同期、後輩の皆様に深く御礼申し上げます。

最後に、常に温かく見守り、今まで支え続けてくれた父、母をはじめ家族一同に心より感謝申し上げます。

2019年 3月  
堂上 久美子