

視交叉上核における概日時計の
時刻調節システムの研究

2013

溝曾路 祥孝

目次

要旨	2
第一章：SCN の AMPA 受容体を介した概日リズム位相の調節	
序論	3
結果	
1_1：SCN における AMPA 受容体の発現局在	6
1_2：SCN への AMPA の直接投与はマウスの概日行動リズム位相を時刻依存的に変動させる	7
1_3：SCN への AMPA 局所投与は SCN において <i>Per1</i> の発現を誘導する	10
1_4：AMPA は SCN スライス培養における時計遺伝子の発現リズムを位相依存的に変動させる	11
考察	13
第二章：SCN の AVP-V1aV1b 局所神経回路の概日時計における機能	
序論	15
結果	
2_1：SCN スライス培養系を用いた AVP-V1aV1b 局所神経回路の機能の解析	17
2_2：数理モデルを用いた解析	19
2_3：SCN の AVP 神経細胞間の結合は細胞振動間に位相差を与える	21
考察	24
材料と方法	26
引用文献	30
謝辞	34

要旨

地球上のほぼすべての生物は、自身の体内に約 24 時間の周期を刻む、概日時計 (体内時計) を持っている。この概日時計は、体温や血圧などに日周性のリズムを与えている。しかしながら、概日時計の周期は、地球の自転に伴う 24 時間の明暗周期と完全には一致しない。そのため、私達は日々、自身の概日時計の時刻を外界の明暗周期の時刻に合わせる必要がある。これを、概日時計の同調機能と呼ぶ。この同調機能の失調は様々な疾患の原因とされているが、その分子メカニズムは十分には解明されていない。

概日時計の中樞は、視床下部にある視交叉上核 (suprachiasmatic nucleus: SCN) である。網膜に到達した光情報は、グルタミン酸作動性の網膜視床下部路を介して SCN に直接伝達されるが、SCN におけるシグナル伝達機構は不明であった。そこで私は、時間生物学の手法を用いた解析を行い、SCN の網膜視床下部路の終末領域において AMPA 型グルタミン酸受容体の *GluR2* と *GluR4* が高発現していることや、SCN への AMPA 局所投与が光刺激と同様に概日リズムの位相を位相依存的に変動させることを見出した。これらの結果は、光刺激による SCN の同調機能に、AMPA 受容体が重要な役割を担うことを示している。

SCN は、また、SCN のみを摘出したスライス培養系であっても、何か月にも渡って安定した概日振動を生み出す。このことから、この神経核は外部から全く入力がなくとも、自律的にリズム発信能力を持つことがわかる。日常生活では、外界の明暗周期と体内時計の位相は完全に同調しているため、私達は自身の時計の存在を自覚することはない。しかし、欧米へのジェット機旅行等により外界の明暗周期の位相が急激に変化すると、概日時計はその驚異的な安定性のため、新明暗周期に対してすぐには同調できず、外界の明暗周期と体内時計の位相が乖離し、睡眠障害や内臓機能失調といった時差症候群を発症する。この時差の分子メカニズムは長らく不明であったが、当研究室は SCN をターゲットとした時差スクリーニングにより、arginine vasopressin (AVP) の受容体である V1a と V1b のダブルノックアウトマウスが、明暗環境を前進あるいは後退させた時差環境下においても、瞬時に再同調することを見出した。AVP 発現細胞は SCN 最大のニューロン系であると同時に、その受容体である V1 受容体を発現することで、SCN 内で局所神経回路を構成している。私は、SCN スライス培養系を用いて、個々の SCN 細胞の概日振動をリアルタイムで解析することで、AVP-V1aV1b 局所神経回路が正常に機能すると、リズム攪乱因子の存在下でも安定した概日リズムを維持できることを見出した。この SCN の安定性が仇となり、時差環境下ではすぐに新明暗周期に馴染めず、時差症候群を発症するものと考えられる。

第一章

SCN の AMPA 受容体を介した概日リズム位相の調節

序論

地球上の多くの生物は自身の体内に約24時間の周期を刻む時計 (概日時計・体内時計) を持つ。この自律振動する時計は、生物の体温や血圧、ホルモン分泌などの様々な生命機能に、約24時間の周期性を与えている (Reppert and Weaver, 2002 ; Ko and Takahashi, 2006)。また、心筋梗塞は早朝から昼にかけて多く発症し、喘息の症状は早朝に増悪するなど、多くの疾患に好発時間帯が存在することが知られている。ここ十数年の研究により、時計遺伝子と呼ばれる一群の遺伝子による転写・翻訳のネガティブフィードバックループ機構が、概日時計を生み出す分子基盤であることが明らかになった (図1) (Dunlap, 1999 ; Reppert and Weaver, 2001)。この分子時計機構を説明すると、まず、転写活性化因子である CLOCK と BMAL1 がヘテロダイマーを形成し、ゲノム上の E/E'-box に結合することで、Period (*Per1* と *Per2*) と Cryptochrome (*Cry1* と *Cry2*) の転写を活性化する。翻訳された PER と CRY は、続いてヘテロダイマーを形成し、CLOCK と BMAL1 による転写活性を阻害する。その結果、PER や CRY タンパクの量が減少し、CLOCK と BMAL1 は PER と CRY による抑制から解除され、再び *Per* と *Cry* の転写を活性化する。この転写・翻訳のネガティブフィードバックループ機構は、時計タンパク質の安定性を制御することで、24時間で1回転するように調節されている。

哺乳類において、概日時計の中樞は視床下部の視交叉上核 (suprachiasmatic nucleus : SCN) であるが、この分子時計のシステムは、SCNのみならず、ほぼ全身の細胞でも同様に機能している。すなわち、各細胞はそれぞれ独自に概日リズムを刻むことができる。マイクロアレイを用いた網羅的な解析から、5-10%程度の遺伝子発現が概日リズムを持つことや、リズムに発現する遺伝子は、例えば肝臓では代謝回路の律速酵素といったように、各末梢臓器で独自の生理機能を担う遺伝子群であることが示された (Panda *et al.*, 2002 ; Storch *et al.*, 2007)。従って、概日時計が一個体における生理機能を根本的に制御していると考えられる。

しかしながら、この概日時計はその名の通り完全な 24 時間周期ではない。そのため、私達は日々、自身の概日時計の時刻を地球の自転に伴う 24 時間の明暗周期の時刻に合わせる必要がある。これを概日時計の同調機能という。概日時計の同調機能は、齧歯類を用いて広範に研究されてきた。例えば、マウスを恒暗条件下で飼育すると、マウスの体内時計の周期は約 23.7 時間であるので、そ

の概日行動リズムの位相は日々少しずつ前進する。マウスは夜行性であるため、恒暗条件下における活動期を主観的夜と表現する。主観的夜の早い時間に光を照射すると、以降のマウスの概日行動リズムの位相は 1~2 時間程度後退する。目的論的に考えれば、この概日行動リズムの位相変化は、マウスは概日時計の命令により「既に夜になった」と思い行動を開始していたが、光があたることで「実はまだ夕方であった」と認識を改め、翌日からは 1~2 時間ほど遅れて (夜だと思いう時間まで待つ) 行動を開始する、と理解すればわかりやすい。一方で、主観的夜の遅い時間に光を照射すると、以降のマウスの概日行動リズムの位相は、1 時間程度前進することが知られている。このように、光照射による概日リズムの位相変動には、その変動量や前進後退の向きにおいて、時刻依存性が存在する。

哺乳類の同調機能において、外界の明暗周期情報は、網膜の光感受性神経節細胞 (メラノプシン陽性神経節細胞) で受け取られる。この神経節細胞は、直接 SCN へ投射しており、網膜視床下部路を構成している (Moore and Lenn, 1972 ; Güler *et al.*, 2008)。これまでの研究から、この経路がグルタミン酸作動性であることや (Liou *et al.*, 1986 ; van den Pol, 1991 ; de Vries *et al.*, 1993)、SCN にある投射先の細胞においてイオンチャネル型グルタミン酸受容体である α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid (AMPA) 受容体と *N*-methyl D-aspartate (NMDA) 受容体が発現していることが報告されていた (Gannon and Rea, 1994)。

これらの受容体のうち、NMDA受容体を介した概日時計の位相変動については、すでに多くの研究がなされている。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を変動させることが示された (Mintz *et al.*, 1999)。SCNスライスを用いた*in vitro*の実験系では、NMDA投与によって、ニューロンの自発発火頻度に見られる概日リズムの位相が変動することが報告されている (Ding *et al.*, 1994 ; Shibata *et al.*, 1994)。*Per1*のプロモーターで luciferase を発現するレポーターマウス (*Per1-luc*) から作製したSCNスライスを用いた実験でも、NMDAによる概日リズムの位相変動が確認されている (Asai *et al.*, 2001)。さらに、マウスとハムスターにおいて、NMDA受容体のアンタゴニストの事前投与が、光刺激による位相変動を抑制することが示された (Colwell *et al.*, 1991 ; Colwell and Menaker, 1992)。これらの研究から、光刺激による概日リズムの位相の同調には、NMDA受容体の活性化が深く関与していると考えられる。

一方で、概日時計の同調機能におけるAMPA受容体の役割については、未確定のままである。AMPA受容体のアンタゴニストの事前投与が、光照射による位相変動を抑制することが示されたことから (Colwell and Menaker, 1992)、AMPA受容体シグナルが光照射による概日時計の同調に関与していると考えられている。

しかし、AMPA受容体アンタゴニストは、NMDAによる位相変動に対して部分的にしか抑制作用を示さないことから (Mintz *et al.*, 1999)、AMPA受容体はNMDA受容体を介した作用に部分的にしか関わっていないとされている。これは、一般的に知られているグルタミン酸を介した神経連絡 (Cooke and Bliss, 2006 ; Nowak *et al.*, 1984)、すなわち、AMPA受容体の活性化によって細胞の膜電位が脱分極し、これによりNMDA受容体のチャンネルポアを塞いでいるマグネシウムが取り除かれることで、細胞内にカルシウムが流入する一連の流れとも矛盾しないため、概日時計の同調機能においても、AMPA受容体はNMDA受容体の活性化に必要なだけだと考えられていた。しかしながら、SCNスライスを用いた*in vitro*の実験系において、AMPA投与も、NMDAと同様に、ニューロンの自発発火頻度の概日リズムの位相を変動させうることが示された (Shibata *et al.*, 1994)。そこで私は、概日行動リズムや時計遺伝子の発現リズムの位相変動におけるAMPA受容体の役割を決定するために、1) マウスSCNにおけるAMPA受容体のサブユニットの発現局在の解析、2) マウスSCNへのAMPA直接投与による概日行動リズムの*in vivo*位相変動実験、3) *Per1-luc* SCNスライス培養系を用いた*in vitro*位相変動実験を行った。

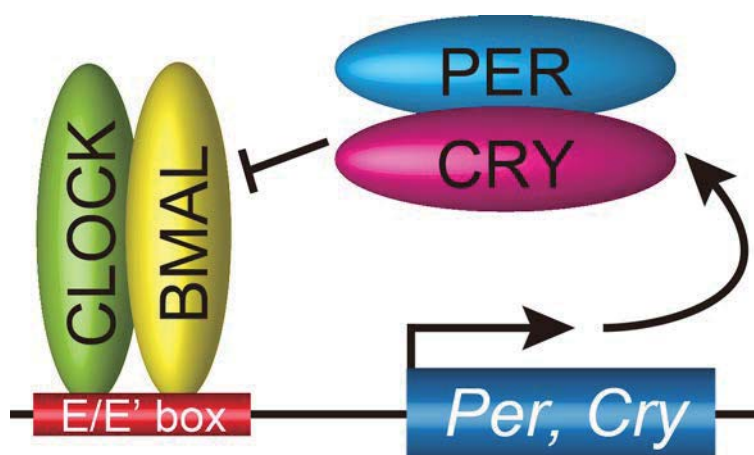


図 1 分子時計の基盤である時計遺伝子によるフィードバックループ機構 (コアループ)

結果

1_1 : SCN における AMPA 受容体の発現局在

AMPA 受容体の各サブユニットの発現局在を、digoxigenin 標識プローブを用いた *in situ* hybridization 法を用いて検討した。その結果、*GluR2* および *GluR4* の mRNA が、SCN の中央から腹外側にかけて強く発現していた (図 2)。また、*GluR1* は、背側部で中程度、腹側部でまばらに発現していた。*GluR3* は発現が確認できなかった。*GluR2* および *GluR4* が、網膜視床下部路の終末である SCN の腹側部において豊富に発現していることから (Abrahamson and Moore, 2001 ; Lee *et al.*, 2003)、この 2 つのサブユニットが概日時計の同調機能に関わっていると考えられる。

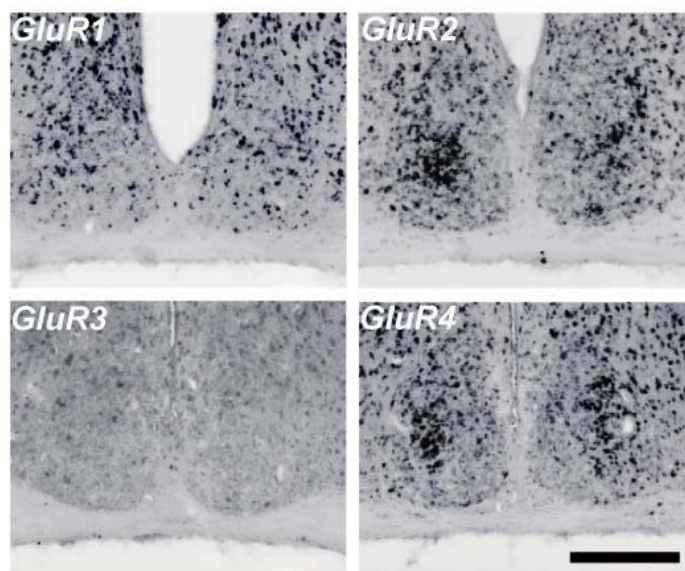


図2 マウスSCNにおけるAMPA受容体の各サブユニット (*GluR1*、*GluR2*、*GluR3*、*GluR4*) のmRNAの発現局在を、digoxigenin標識プローブを用いた*in situ* hybridization 法により解析した。スケールバーは200 μm 。

1_2 : SCN への AMPA の直接投与はマウスの概日行動リズム位相を時刻依存的に変動させる

前節において、マウスSCNの光応答領域に、AMPA受容体の*GluR2*および*GluR4*が発現していることを示した。続いて、実際にAMPA受容体の活性が、マウスの概日行動リズムにおける同調機能に関与するかを検討するために、留置カニューレを通して、恒暗条件下で行動を観察しているマウスのSCNにAMPAを直接投与した。本研究で用いたC57BL/6マウスでは、主観的夜の初期の光刺激が、行動リズムの位相を最も大きく変動させる (Schwartz and Zimmerman, 1990)。そこで、AMPAをCT14 (Circadian Time : 恒暗環境下での主観的な時間であり、概日行動リズムの開始点をCT12と定義したもの。CTの1時間は、概日リズムの周期を24等分したもの。従ってCT14は、主観的夜になってから約2時間後の主観的夜の初期に相当する。) に投与したところ、概日行動リズムの位相が有意に後退した (AMPA、 -67.8 ± 4.6 min、 $n = 8$; vehicle、 -7.4 ± 1.6 min、 $n = 3$; 正と負の値は、それぞれ位相の前進と後退を表す) (図3A, B)。このAMPAによる位相の後退は、AMPA受容体のアンタゴニストである、3-dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahydrobenzo[f]quinoxaline-7-sulfonamide (NBQX) を同時に投与することで完全に抑制された (AMPA+NBQX、 -6.6 ± 3.8 min、 $n = 3$) (図3C)。NBQXの単独投与では、位相の変動は生じなかった (NBQX、 -1.4 ± 1.4 min、 $n = 3$) (図3D)。

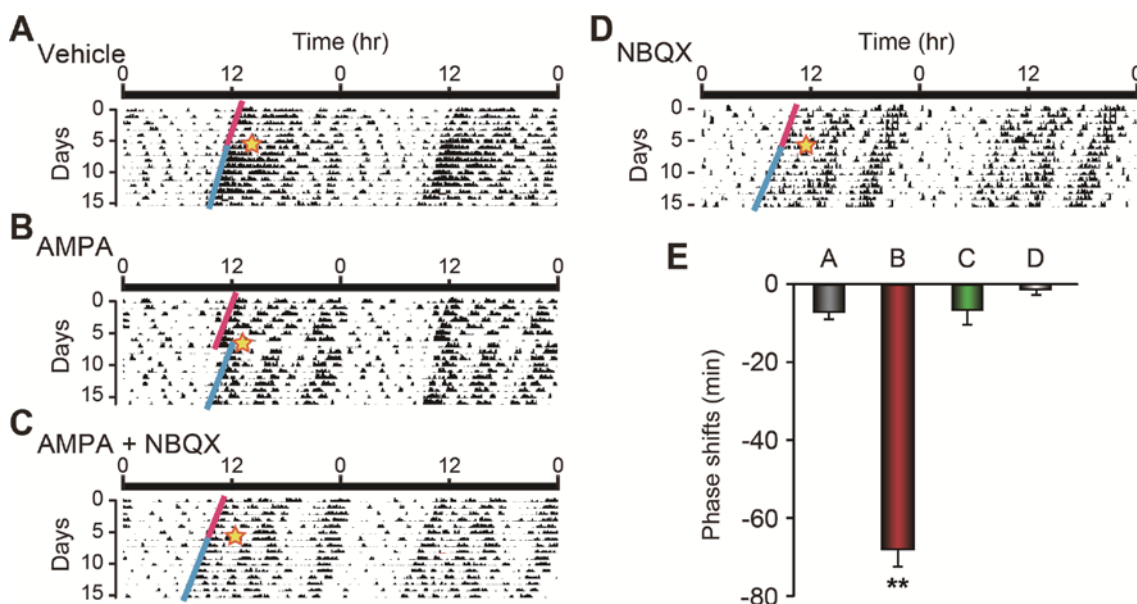


図3 (A)~(D) は (A) vehicle、(B) AMPA、(C) AMPA + NBQX、(D) NBQX を投与したマウスの代表的な概日行動リズムのダブルプロットアクトグラムを示す。AMPA は CT14 (図中の星印) に、恒暗条件下で行動するマウスの SCN に直接投与した。位相変動の大きさは、投与前1週間と投与後1週間から2週間の行動の開始点をもとに引いた2本の線の差を計測した。(E) CT14でのAMPA局所投与による位相変動量を示す。データは各刺激条件での位相変動の平均値±標準誤差で示す。P値はOne-way ANOVAの後、Scheffe法により求めた (** : $P < 0.01$)。

位相変動の方向や大きさは、光刺激を与える時刻に依存する (Schwartz and Zimmerman, 1990)。そこで、光刺激による概日行動リズムの位相変動と同様に AMPA 投与による位相変動にも位相依存性があるかを検討したところ、主観的昼である CT6 および主観的夜の後期である CT22 に AMPA を投与しても、概日行動リズムの位相は変動しなかった (CT6 ; AMPA, -1.5 ± 0.5 min, $n = 4$; vehicle $+1.4 \pm 4.1$ min, $n = 3$) (CT22 ; AMPA, $+5.0 \pm 2.9$ min, $n = 3$; vehicle -2.4 ± 1.4 min, $n = 3$) (図 4)。これらの結果から、SCN の AMPA 受容体の活性化は、主観的夜の初期において光刺激と同様に、マウスの概日行動リズムの位相を変動させることがわかった。

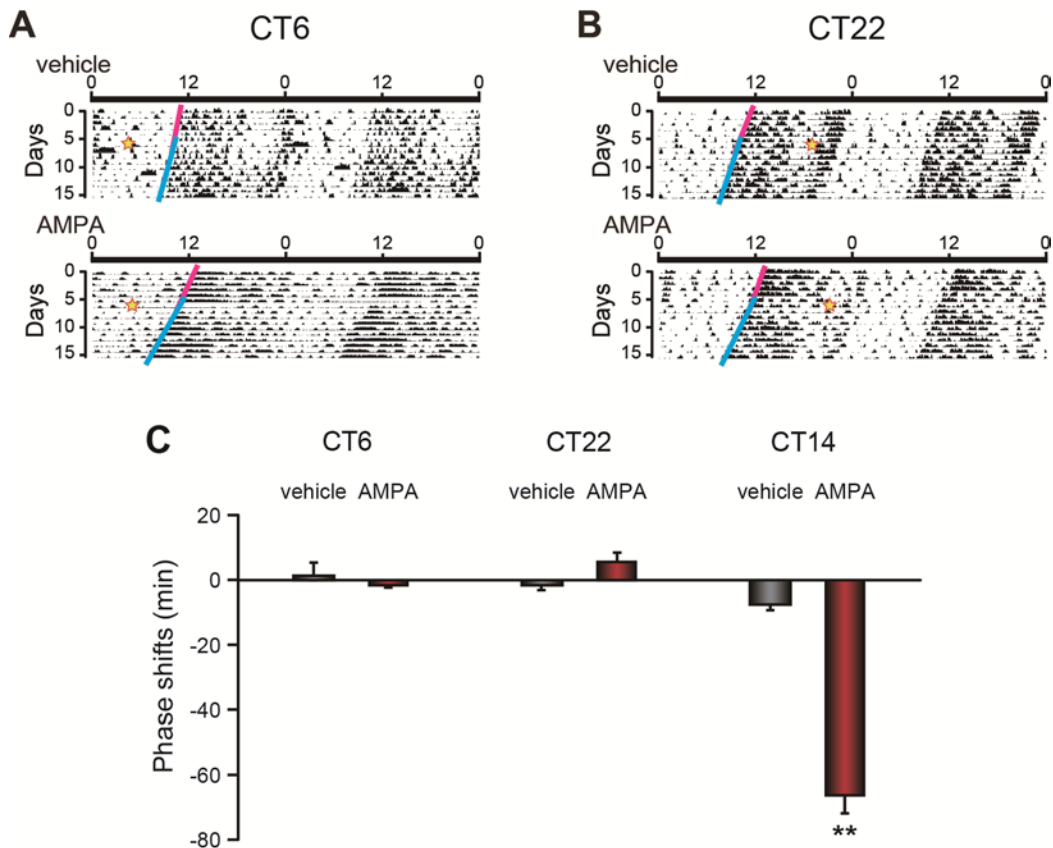


図 4 (A) および (B) は、vehicle または AMPA を投与したマウスの代表的な概日行動リズムのダブルプロットアクトグラムを示す。恒暗条件下で行動するマウスに対して、(A) CT6 または (B) CT22 (図中の星印) に AMPA を投与した。位相変動の大きさは、投与前 1 週間と投与後 1 週間から 2 週間の行動の開始点をもとに引いた 2 本の線の差を計測した。(C) CT6、CT22 および CT14 での AMPA の SCN 局所投与による位相変動量を示す (CT14 のデータは図 3 のものを再掲した)。データは各刺激条件での位相変動の平均値 ± 標準誤差で示す。P 値は One-way ANOVA の後、Scheffe 法により求めた (** : $P < 0.01$)。

次に私は、AMPA 受容体シグナルによる位相変動に、NMDA 受容体が関与するのかを調べた。AMPA 投与によって概日行動リズム位相の後退が確認できた CT14 において、NMDA 受容体のアンタゴニストである (2R)-amino-5-phosphono-pentanoic acid (AP5) を AMPA と同時投与したところ、AMPA による概日行動リズムの位相変動は完全に抑制された (AMPA + AP5, -6.3 ± 5.2 min, $n = 4$) (図 5C)。AP5 の単独投与では、概日行動リズム位相の変動は生じなかった (AP5, -5.0 ± 2.4 min, $n = 3$) (図 5D)。これらの結果は、AMPA による概日行動リズムの位相変動には、AMPA 受容体の活性化のみでなく、NMDA 受容体の活性化も必要であることを示唆している。

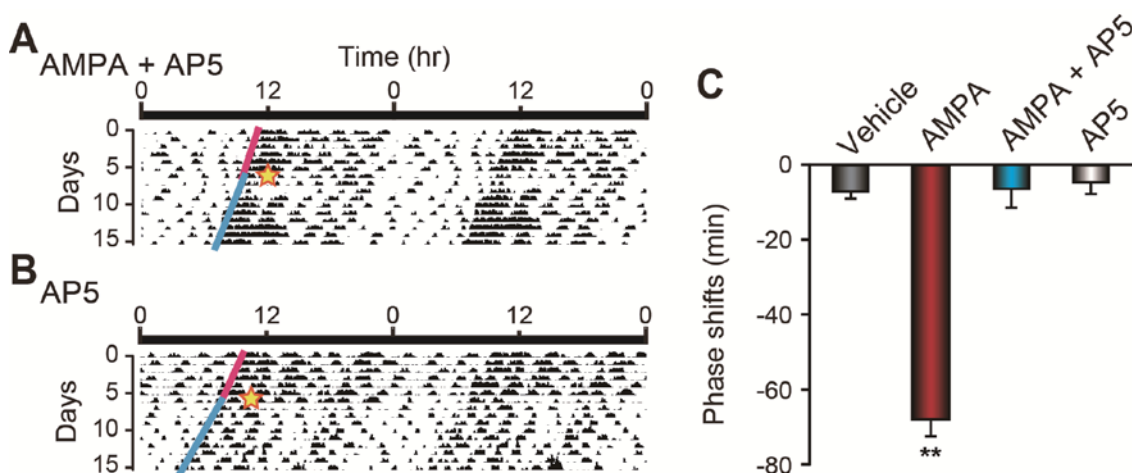


図 5 (A) および (B) は、AMPA と AP5 (A) あるいは AP5 のみ (B) を SCN に局所投与したマウスの代表的な概日行動リズムのダブルプロットアクトグラムを示す。恒暗条件下で行動するマウスに対して、CT14 (図中の星印) に恒暗条件下で行動するマウスの SCN に直接投与した。位相変動の大きさは、投与前 1 週間と投与後 1 週間から 2 週間の行動の開始点をもとに引いた 2 本の線の差を計測した。(C) CT14 での AMPA 局所投与による位相変動量を示す。データは各刺激条件での位相変動の平均値±標準誤差で示す。P 値は One-way ANOVA の後、Scheffe 法により求めた (** : $P < 0.01$)。

1_3 : SCN への AMPA 局所投与は SCN において *Per1* の発現を誘導する

主観的夜における光照射により、マウスの概日行動リズムの位相が変動することは先に述べた通りであるが、この際には、SCN において時計遺伝子 *Per1* が急激に発現誘導される (Shigeyoshi *et al.*, 1997)。また、*Per1* のアンチセンスオリゴヌクレオチドを事前投与しておくこと、光照射による概日行動リズムの位相変動が阻害される (Akiyama *et al.*, 1999 ; Wakamatsu *et al.*, 2001)。これらの事実から、*Per1* の急性誘導が、概日リズムの同調において重要な役割を果たすことが推察される。そこで、CT14 に SCN へ AMPA を局所投与した際の *Per1* mRNA の発現量を RI 標識プローブを用いた *in situ* hybridization 法によって測定したところ、*Per1* が AMPA 刺激後に SCN において急激に発現した (vehicle、 1.00 ± 0.14 、 $n = 3$; AMPA、 1.78 ± 0.14 、 $n = 3$) (図 6)。以上の結果は、AMPA 受容体が、光照射による概日行動リズムの位相変動に深く関与することを示唆するものである。

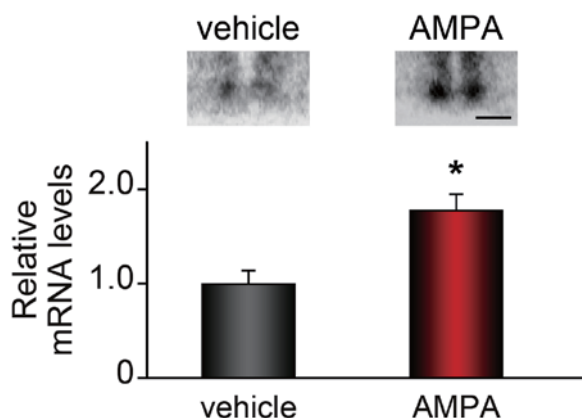


図 6 SCN への AMPA 局所投与による、*Per1* mRNA の急性発現誘導。vehicle 投与群の平均値を 1 とした。P 値は Student の *t* 検定により求めた (*: $P < 0.05$)。グラフ上のパネルは、vehicle 投与群 (左) と AMPA 投与群 (右) の代表的なオートラジオグラフィの画像である。スケールバーは 500 μm 。

1_4 : AMPA は SCN スライス培養における時計遺伝子の発現リズムを位相依存的に変動させる

Per1-luc レポーターマウスから取り出した SCN のスライス培養の発光量を測定することで、時計遺伝子 *Per1* の発現リズムをリアルタイムでモニタリングすることができる。この *in vitro* の系を用いて、AMPA 受容体の活性化が *Per1* 発現の概日リズムの位相を変動させるのかを検討した。主観的夜の初期に相当する *Per1* 発現リズムのピークから 6 時間後に AMPA を投与したところ、その後の *Per1* リズムの位相はコントロール群に比べて有意に後退した (AMPA、 -3.18 ± 0.45 hr、 $n = 7$; control、 -0.68 ± 0.26 hr、 $n = 3$) (図 7A, B)。一方で、主観的夜の後期に相当する *Per1* 発現リズムのピークから 14 時間後に AMPA を投与したところ、その後の *Per1* リズムの位相はコントロール群に比べて有意に前進した (AMPA、 $+1.92 \pm 0.24$ hr、 $n = 3$; control、 $+0.31 \pm 0.14$ hr、 $n = 3$) (図 7C, D)。

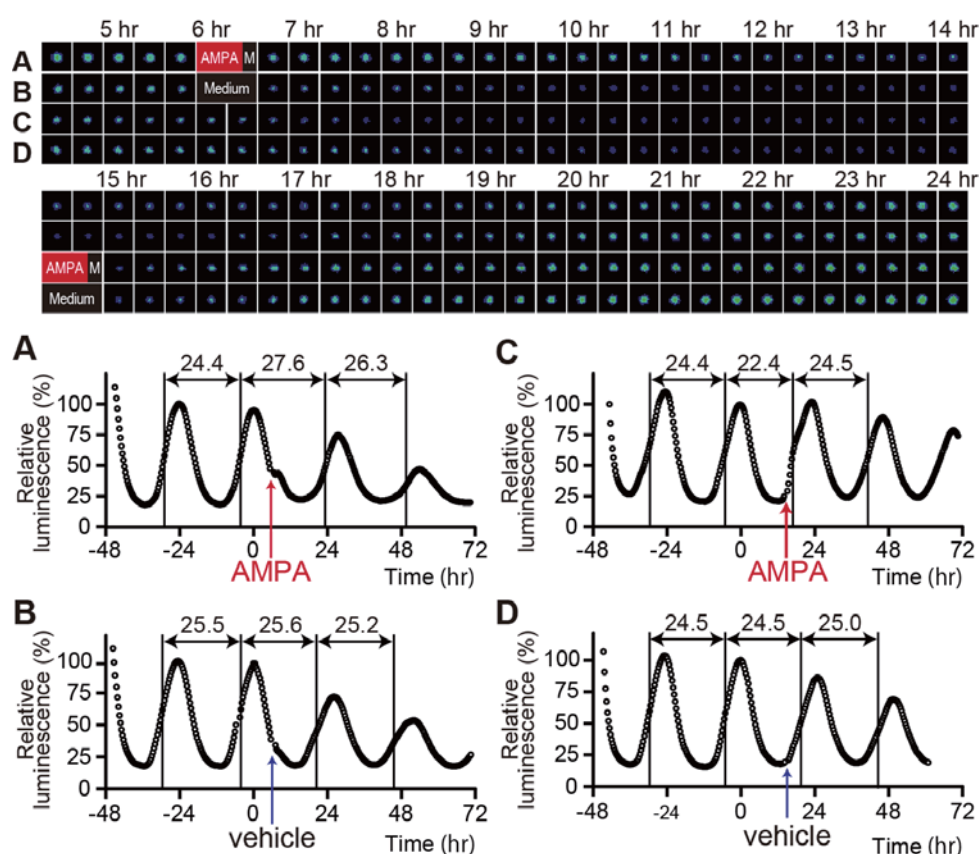


図 7 代表的な SCN スライスの 20 分毎の画像データ (上) と、各々から測定した発光量のグラフ (下) を示す。グラフは、2 回目の発光ピークを 100%とした。周期の測定は、発光のトラフとその次のピークとの中間値の時刻を求め、その 1 つ前の振動の中間点の時刻との差として求めた。

次に、位相依存性をより詳細に検討するために、2時間毎に AMPA 受容体を刺激して位相変動を測定したところ、*Per1* 発現リズムのピークから 2-6 時間後の AMPA 刺激は *Per1* リズムの位相を後退させ、14-16 時間後の AMPA 刺激は *Per1* リズムの位相を前進させた (図 8)。この AMPA 投与による位相反応曲線の形は、光刺激 (Schwartz and Zimmerman, 1990) や NMDA 投与 (Asai *et al.*, 2001) による位相反応曲線の形と一致した。これらの結果から、AMPA 受容体の活性化は、SCN における時計遺伝子の概日リズムの位相を位相依存的に変動させることがわかった。

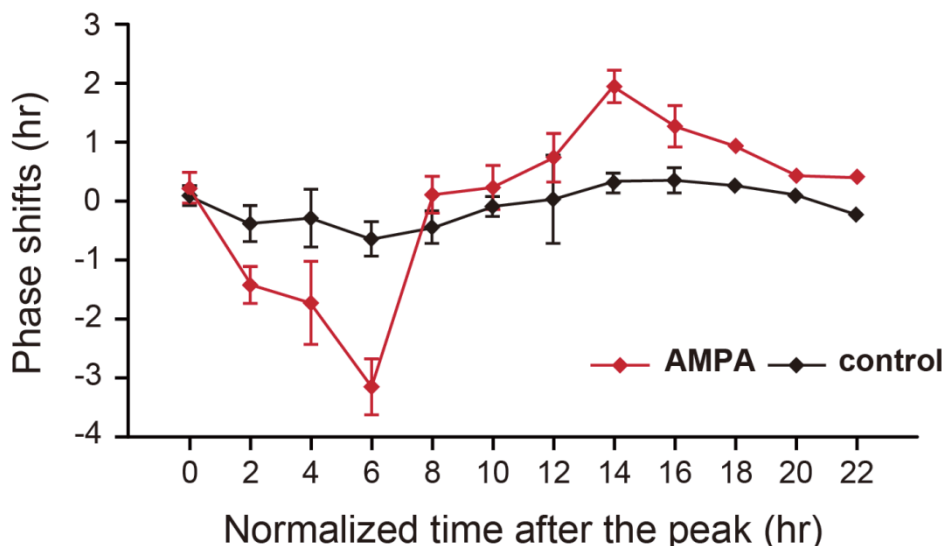


図 8 AMPA 投与による発光リズムの位相変動の位相反応曲線を示す。x 軸は発光ピークの時間を 0 として、ピークからの経過時間を Normalized time (1 時間は発光リズムの周期を 24 等分したもの) で示す。y 軸は発光リズムの位相変動の大きさを示しており、正符号および負符号は、それぞれ位相前進と位相後退を表す。各データは平均値±標準誤差で示す。AMPA 投与群の位相反応曲線は One-way ANOVA で有意差が出たのに対して、vehicle 投与群では有意差が見られなかった。Scheffe 法による多重比較検定を行ったところ、ピークから 6 時間後の AMPA 投与は、ピークから 2 時間後、および 4 時間後を除く全ての時点に対して有意差があった ($P < 0.01$)。

考察

海馬の神経細胞を用いたこれまでの研究から、神経の発火は NMDA 受容体の活性化に依存しており、AMPA 受容体はあくまで NMDA 受容体が活性化するための前提条件と考えられてきた (Cooke and Bliss, 2006)。しかし本研究において、AMPA を SCN に局所投与するだけで概日行動リズムや時計遺伝子発現リズムの位相を変動できることを示した。しかしながら、NMDA 受容体のアンタゴニストの同時投与により、AMPA 投与による位相変動が抑制されたことから、AMPA 受容体の活性化による位相変動に NMDA 受容体が関与していると考えられる。一方でこれまでの研究により、NMDA 投与による位相変動が AMPA 受容体のアンタゴニストの投与によって減弱することが示されていた (Mintz *et al.*, 1999 ; Paul *et al.*, 2003)。従って、SCN のグルタミン酸シグナルによる概日リズムの位相変動の制御においては、AMPA 受容体と NMDA 受容体が相互に機能し、位相変動の向きや大きさを決定していると考えられる。

本研究において、*in vivo* と *in vitro* の双方で、主観的夜の初期における AMPA 投与で概日リズム位相が後退し、主観的昼における AMPA 投与では概日リズム位相は変動しないことが明らかになった。一方で、主観的夜の後期での AMPA 投与は、*in vitro* の SCN スライス実験では位相が前進したが、*in vivo* のマウス行動リズムでは位相は変動しなかった。この結果の矛盾が生じた原因として、主観的夜の後期のマウス SCN に対して抑制性のシグナルが豊富に入力しており、AMPA 受容体刺激による位相前進作用を打ち消している可能性が考えられる。実際に、Mintz らによる NMDA 投与実験においても、主観的夜の初期の NMDA 投与が光照射と同程度に概日リズム位相を後退させることが示されたが、主観的夜の後期の NMDA 投与は光照射ほど位相を前進させなかった (Mintz *et al.*, 1999)。また、Moriya らは、主観的夜の初期における Aniracetam (AMPA 受容体の増強剤) 投与は概日行動リズムの位相を後退させるが、主観的夜の後期に投与しても位相は変動しないことを報告した (Moriya *et al.*, 2003)。これらの結果から、動物個体のレベルにおいては、主観的夜の後期における概日リズムの位相前進にはグルタミン酸シグナルだけでなく、他のシグナル因子が関与していると考えられる。

この点において、中脳の抑制性セロトニンシグナルが SCN の網膜視床下部路終末部に投射することは、極めて重要な知見である (Pickard *et al.*, 1996)。セロトニンシグナルは概日リズムを示すが、SCN では主観的夜の後期に最も強くなる (Cagampang and Inouye, 1994)。この抑制シグナルのために、AMPA 受容体の活性化のみでは主観的夜の後期において、*in vivo* のマウス個体の概日行動リズムの位相は前進しないと考えられる。その一方で、*in vitro* の SCN スライス培養

系では、中脳など SCN 外からのシグナル入力が物理的に切断されているため、AMPA 受容体の活性化のみでも位相を前進させることができると考えられる。また、SCN に多く存在するアストロサイトの作用が、*in vivo* と *in vitro* の差の原因かもしれない。アストロサイトはグルタミン酸の取込みや放出を介してシナプス間のグルタミン酸シグナルを制御するが (Anderson and Swanson, 2000)、*in vivo* と *in vitro* の条件下では、アストロサイトの機能に違いがあるために、本研究で見られた *in vivo* と *in vitro* の差が生じている可能性が考えられる。

本研究は、AMPA受容体の活性化が、概日行動リズムや時計遺伝子発現リズムの明暗周期への同調において重要な役割を担うことを示した。今後は、このAMPA受容体を標的とする新しい機序の睡眠導入剤や概日リズム障害の治療薬の開発が期待される。

第二章

SCN の AVP-V1aV1b 局所神経回路の概日時計における機能

序論

先述の通り、SCNのみならず全身の細胞も機能的な分子時計を有しており、概日リズムを示す。しかしながら、SCNや末梢臓器のリズムを個々の培養系を用いて測定すると、SCNは何か月にも渡って安定した概日リズムを示すのに対し、末梢臓器では数サイクルのうちにリズムが減衰する。このSCNに特異なリズム頑強性の基盤は、SCN内の神経細胞間連絡にあるとされているが、その実態はあまりよくわかっていない。

私達も、SCNによって駆動され、日々、安定振動する体内時計を有しているわけであるが、普段は外界の明暗周期と体内時計の位相は完全に同調しているため、私達は自身の時計の存在を自覚することはない。しかし、欧米へのジェット機旅行等により短時間に複数の時間帯をまたいで東西方向に移動した場合、外界の明暗周期の位相が急激に変化する一方で、体内時計のリズム位相はその驚異的な安定性のため、新明暗周期に対してすぐには同調できず、外界の明暗周期と体内時計の位相が乖離し、睡眠障害や内臓機能失調といった時差症候群を発症する。また、慢性的に時差環境下におかれる国際線のキャビンアテンダントや昼夜交代制勤務者などでは、心血管障害や代謝異常といった生活習慣病やがんの罹患率が增大することが知られている (Scheer *et al.*, 2009 ; Pan *et al.*, 2011 ; Kojo *et al.*, 2005)。このように、時差障害は非常に深刻な社会問題であるにもかかわらず、時差の分子・細胞メカニズムはあまりよくわかっていない。

当研究室では長年にわたり、SCN特異的に発現する遺伝子の網羅的解析によって概日時計機能異常マウスを探索するプロジェクト (SCN Gene Project) (Okamura, 2007) を進めているが、さらに明暗周期の位相を8時間前進または後退させる時差実験を加えてスクリーニングを行ったところ、arginine vasopressin (AVP) の受容体であるV1aとV1bをダブルノックアウトしたマウス ($V1a^{-/-}V1b^{-/-}$) が、時差環境下においても、行動や時計遺伝子、体温のリズムが瞬時に新明暗環境に再同調することが明らかになった (図9) (Yamaguchi *et al.*, 2013)。AVP作動性ニューロンはSCN細胞の半数近くを占める巨大なニューロン系であるが、同時に自身の受容体であるV1aとV1b も発現しており、SCN内で主要な局所神経回路を形成している。また、野生型マウスのSCNにV1aとV1bのアンタゴニストを局所投与したところ、濃度依存的に時差を軽減した。そこで、私はSCNのV1aとV1bが時差に深く関与しているものと考え、*Per1-luc* レポーターマウスのSCNス

ライス培養系を用いてシングルセルレベルでの解析を行い、SCN内のAVP-V1aV1b局所神経細胞間結合の細胞概日振動における役割について検討した。

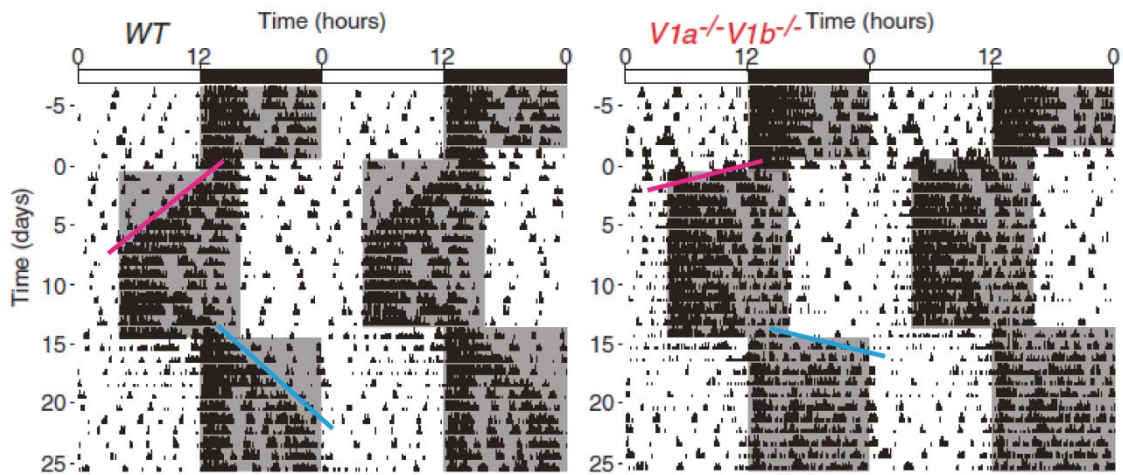


図9 明暗周期を8時間前進あるいは後退させた時のWT (左) と $V1a^{-/-}V1b^{-/-}$ (右) の行動リズムの代表的なダブルプロットアクトグラム。WT に比べて、 $V1a^{-/-}V1b^{-/-}$ は、明暗周期の前進 (赤線) および後退 (青線) のどちらの場合でも、新規明暗環境に速く同調する。

結果

2_1 : SCN スライス培養系を用いた AVP-V1aV1b 局所神経回路の機能の解析

Per1-luc レポーターマウスから作製した SCN スライスの生物発光をリアルタイムでモニタリングすることにより、SCN に存在する何百という神経細胞の概日リズムを同時に測定することができる (Yamaguchi *et al.*, 2003)。この系を利用して、AVP-V1aV1b 局所神経回路が SCN 神経細胞の概日リズムにどのように影響を及ぼすのかを検討した。SCN の各細胞は安定した概日振動を示すが、全ての細胞が同時にリズムのピークを迎えるというわけではなく、振動のパターン

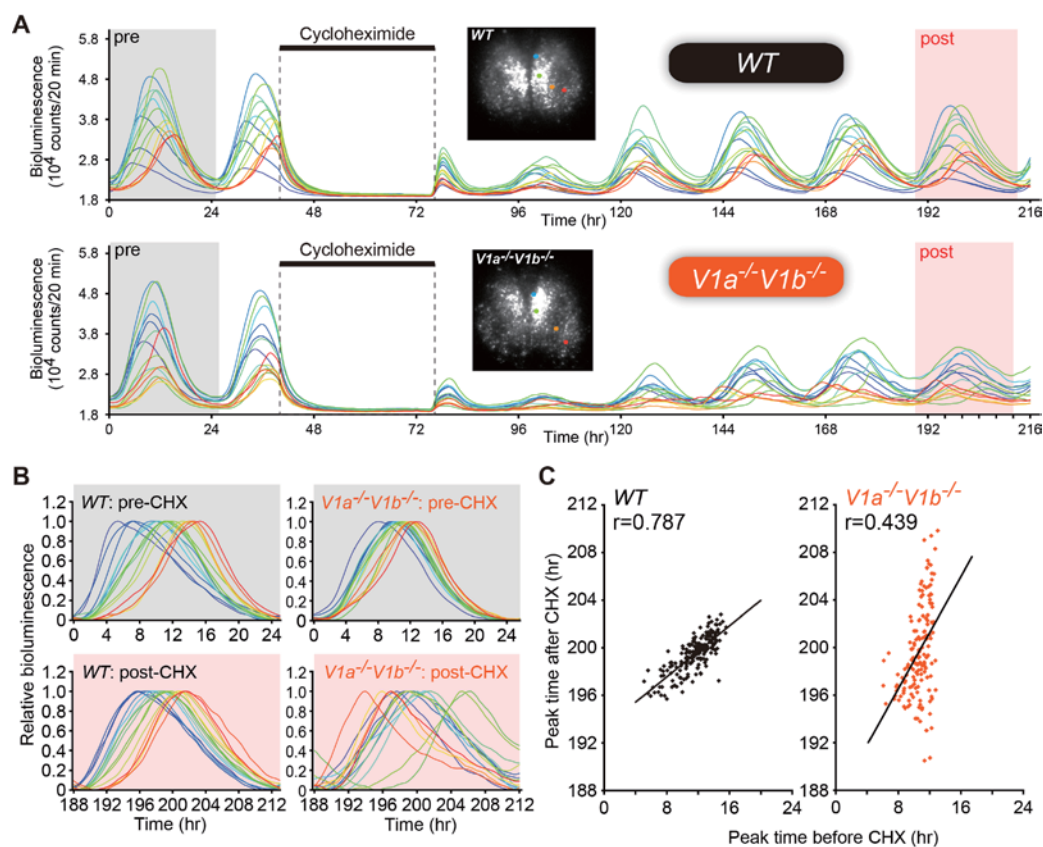


図 10 (A) WT(上) および $V1a^{-/-}V1b^{-/-}$ (下) の SCN スライスからランダムに選択した個々の細胞 (各 15 細胞) の発光量を示す。SCN の画像にあるカラーの丸印で示した細胞は、グラフの同色で示された波形の通りにリズム的に振動する。CHX 投与前は、WT と $V1a^{-/-}V1b^{-/-}$ ともに、背側から腹側へ向かう、青→緑→黄色→赤の順序で各細胞は振動する。WT の SCN では、CHX 処理後もこの順序の通りに各細胞の振動は回復したが、 $V1a^{-/-}V1b^{-/-}$ の SCN では元の順序の通りには回復しなかった。(B) WT と $V1a^{-/-}V1b^{-/-}$ の SCN における CHX 投与前および投与後 (それぞれ図 10A 中の灰色部分と赤色部分) の細胞リズムの順序を示す (各 15 細胞)。各細胞の発光量のピークを 1、トラフを 0 とした。(C) CHX 投与前 (0~24 時間) と CHX 投与後 (188~212 時間) の WT と $V1a^{-/-}V1b^{-/-}$ の各 SCN 細胞における発光リズムピーク時間の相関図 (WT : $n = 180$ 、 $V1a^{-/-}V1b^{-/-}$: $n = 155$)。CHX 投与前後で発光リズムがピークを迎える細胞の順序の相関は、WT の場合よりも、 $V1a^{-/-}V1b^{-/-}$ の SCN スライスで弱い。グラフ中の直線は各相関図の近似直線であり、 r は相関係数を示す。

には秩序だった順序が存在した。すなわち、まず SCN の背側の細胞が概日リズムのピークを迎え、その後波が伝播していくように、腹側に向かって次々と細胞がピークを迎えていった (図 10)。ここで、SCN スライスにタンパク質合成阻害剤である cycloheximide (CHX) を投与すると、細胞発光の概日リズムは完全に消失した。続いて、CHX を除去すると、その 3 時間後に全ての SCN 細胞が同時に発光リズムのピークを迎えた (Yamaguchi *et al.*, 2003)。その後、WT の SCN スライスの場合、CHX 投与前に観察された背側から腹側の順序の通りに各細胞の概日リズムは回復した。これに対して、*V1a^{-/-}V1b^{-/-}* の SCN スライスは CHX 投与前は各細胞が WT と同様の背側から腹側の順序で概日リズムを示したが、CHX 投与後はその順序の通りには回復を示さなかった (図 10)。また、WT の SCN スライスの場合でも、CHX 投与後に V1a と V1b の各アンタゴニストを投与しておくと、各細胞の概日リズムは、CHX 投与前に観察されていた背側から腹側の順序の通りには回復しなかった (図 11)。

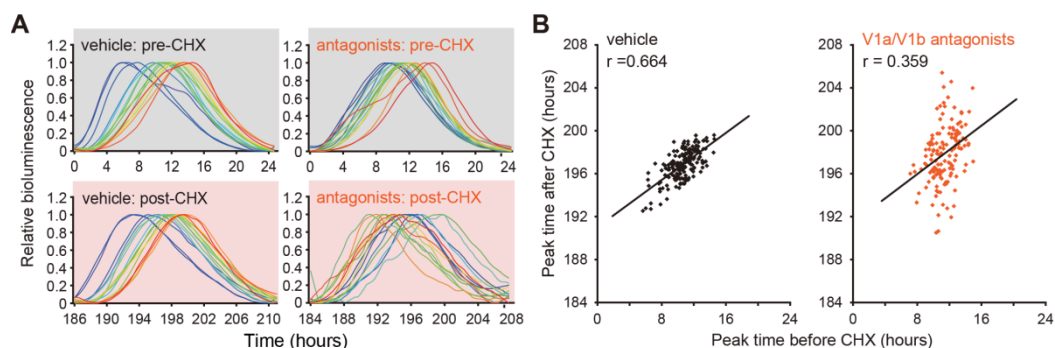


図 11 (A) vehicle 投与群と V1a と V1b のそれぞれのアンタゴニスト投与群の SCN における CHX 投与前および投与後の細胞リズムの順序を示す (各 15 細胞)。各細胞の発光量のピークを 1、トラフを 0 とした。(B) CHX 投与前 (0~24 時間) と CHX 投与後 (184~208 時間) の vehicle 投与群とアンタゴニスト投与群の各 SCN 細胞における発光リズムピーク時間の相関図 (vehicle 投与群 : n = 180、アンタゴニスト投与群 : n = 139)。CHX 投与前後で発光リズムがピークを迎える細胞の順序の相関は、vehicle 投与群の場合よりも、アンタゴニスト投与群の SCN スライスで弱い。グラフ中の直線は各相関図の近似直線であり、r は相関係数を示す。

2_2 : 数理モデルを用いた解析

以上の結果から、SCN 内の AVP-V1aV1b 局所神経回路が概日リズム機能をもつことがわかった。そこで、この神経細胞間結合を元にして、SCN 内外の細胞リズムの振動カップリングを検証する数理モデルを構築した。この数理モデルは、SCN 内の 3 つの振動子、および末梢組織として 1 つの振動子から成る (図 12A)。振動子 0 は光応答細胞 (例 : vasoactive intestinal peptide (VIP) 発現細胞) (Moore and Lenn, 1972 ; Ibata *et al.*, 1989) であり、明暗周期の位相変動の影響を直接受ける。その結合定数を K_a とする。振動子 1 および振動子 2 は AVP 発現細胞であり (Yan and Okamura, 2002)、これらの細胞は AVP シグナル (結合定数を K_{AVP} とする) とそれ以外のシグナル (例 : γ -amino butyric acid (GABA) (Okamura *et al.*, 1989 ; Moore and Speh, 1993)、結合定数を K_c とする) により、相互に細胞間で結合している。また、振動子 1 および振動子 2 は、先述した振動子 0 から VIP シグナルの入力を受けており (Ibata *et al.*, 1993)、この結合定数を K_b とした。振動子 3 は末梢臓器の振動子を示しており、SCN の出力細胞とされる AVP 発現細胞 (振動子 1 および振動子 2) からの入力を受ける (結合定数を K_d とした) (Schwartz and Reppert, 1985 ; Jin *et al.*, 1999)。

それぞれの振動子は、位相振動子モデルに基づく。このモデルは、カップリングした複数の振動子のダイナミクスを理解するのに有用なものとして知られる (Winfree, 1967 ; Kuramoto, 2003)。このモデルにおいて、各振動子は内在する時刻を示す位相のみを変数としている。各振動子の動的方程式は以下の通りである。

$$\begin{aligned}\frac{d\varphi_0}{dt} &= \omega_0 + K_a Z_a(\varphi_0) L(t), \\ \frac{d\varphi_1}{dt} &= \omega_1 + K_b Z_b(\varphi_1) g_0(\varphi_0) + (K_{AVP} + K_c) Z_1(\varphi_1) g_2(\varphi_2), \\ \frac{d\varphi_2}{dt} &= \omega_2 + K_b Z_b(\varphi_2) g_0(\varphi_0) + (K_{AVP} + K_c) Z_2(\varphi_2) g_1(\varphi_1), \\ \frac{d\varphi_3}{dt} &= \omega_3 + K_d Z_d(\varphi_3) G(\varphi_1, \varphi_2),\end{aligned}$$

ここで、 $\varphi_i(t)$ ($0 \leq \varphi < 1$) は振動子 i の位相を示す変数 t [日] の方程式であり、 ω_i は固有振動数である。 $L(t)$ は光の強度を示す関数であり、明暗サイクルは、 $L(t) = 1$ ($0 \leq t < 0.5$) および $L(t) = 0$ ($0.5 \leq t < 1$) として表現した。関数 Z_i は、それぞれ光入力 ($i = a$)、VIP シグナル ($i = b$)、AVP および非 AVP シグナル ($i = 1, 2$)、SCN からの出力 ($i = d$) に対する位相応答関数である。関数 g_i は、振動子 i からのカップリング因子の放出を示しており、関数 $G(\varphi_1, \varphi_2)$ は SCN 全体からの出力 (例えば Dbp のような SCN における時計遺伝子の発現) を示す。

また、位相応答関数は、 $Z_a(\varphi) = -\sin(2\pi(\varphi + 0.10))$ 、 $Z_b(\varphi) = -\sin(2\pi(\varphi + 0.40))$ 、 $Z_d(\varphi) = -\sin(2\pi(\varphi - 0.80))$ 、 $Z_1(\varphi) = -\sin(2\pi\varphi)$ 、 $Z_a(\varphi) = -\sin(2\pi(\varphi + \alpha))$ とし、出力関数 $g(\varphi)$ は、関数 $h(\varphi)$ ($0 \leq \varphi \leq \theta$ の場合は $h(\varphi) = \sin(\pi\varphi/\theta)$ でその他の場合は $h(\varphi) = 0$ 、 θ は出力シグナル放出の持続時間)を用いて $g_0(\varphi) = h(\varphi + 0.05)$ 、 $g_1(\varphi) = h(\varphi)$ 、 $g_2(\varphi) = h(\varphi + \alpha)$ とし、SCN 全体のアウトプットは、 $G(\varphi_1, \varphi_2) = (2 + \sin(2\pi\varphi_1) + \sin(2\pi\varphi_2))/4$ と設定した。

パラメーター α は、振動子1と振動子2の位相差を制御する。 $K_b = 0$ の時に観察されたSCN細胞の位相波形に基づいて、 $\varphi_1 - \varphi_2 = \alpha$ とした。各パラメーターの値は、全ての i について $\omega_i = 1$ 、 $K_a = 8.0$ 、 $K_b = 2.7$ 、 $K_{AVP} = 0.7$ 、 $K_c = 0.6$ 、 $K_d = 0.5$ 、 $\theta = 0.1$ 、 $\alpha = 0.35$ と設定した。また、 $V1a^{-/-}V1b^{-/-}$ の場合は、 $K_{AVP} = 0$ としたが、その他のパラメーターはWTの値と同じである。

WTマウスのSCNにおける時計遺伝子の発現リズムは、時差直後は一旦リズムが消失し、時差後8-9日目になってようやく回復するが、 $V1a^{-/-}V1b^{-/-}$ マウスのSCNの場合は、時差後3日目とずっとはやくに回復する (Yamaguchi *et al.*, 2013)。そこで、この数理モデルを用いて、明暗周期の位相を前進させた際の振動子の挙動をシミュレーションしたところ、時差環境下のマウス個体を用いて測定したSCN時計遺伝子の発現変動と同様に、WTのSCNからの出力は数日間にわたりリズム性が消失し、回復には8日程度を要したが、 $V1a^{-/-}V1b^{-/-}$ のSCNからの出力は迅速にリズムを回復した (図 12B)。また、末梢臓器の振動も、時差環境下のマウス個体を用いて測定した変動と同様に (Yamaguchi *et al.*, 2013)、 $V1a^{-/-}V1b^{-/-}$ の場合では迅速にリズムが回復した (図 12C)。従って、本数理モデルは、SCNのみならず末梢臓器を含めた各振動子の時差環境下における挙動を、忠実に再現するものであると考えられる。

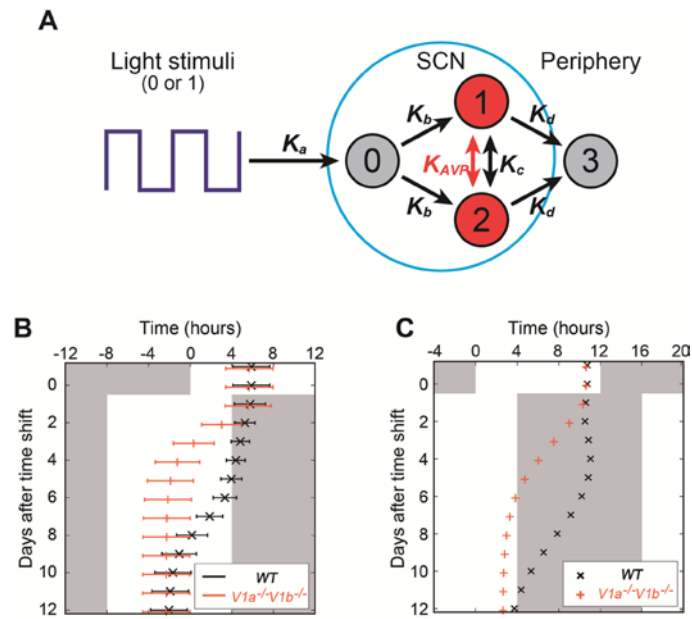


図 12 SCN の AVP-V1aV1b 局所神経細胞間結合に基づいた数理モデルの構築と時差環境下における位相変動のシミュレーション。(A) 3 つの SCN 振動子と 1 つの末梢振動子からなる本数理モデルの各振動子間の結合を示す (B) SCN からの出力を示す $G(\varphi_1, \varphi_2)$ の値をプロットしたもの。中点は振動のピーク時間を示し、バーの長さは振動の振幅の大きさを示す。(C) 末梢臓器の振動を示す $g_3(\varphi_3)$ のピーク時間をプロットしたもの。末梢臓器の振動の振幅は時差の前後を問わず一定である。各グラフの黒色と赤色は、それぞれ WT と $V1a^{-/-}V1b^{-/-}$ の値を示す。

2_3 : SCN の AVP 神経細胞間の結合は、細胞振動間に位相差を与える

本数理モデルにより振動子 1 と振動子 2 の個々の位相変動を算出すると、時差を起こす前の通常の明暗条件下で、振動子 1 と振動子 2 の間のリズム位相差が WT の場合に比べて $V1a^{-/-}V1b^{-/-}$ では小さくなっており、この位相差が $V1a^{-/-}V1b^{-/-}$ では時差に素早く再同調できる原因であることが示唆された (図 13)。そこで、SCN スライス培養を用いてシングルセルレベルの発光リズムを観察することで、生体内で本当に AVP 細胞間の位相差が、WT の SCN に比べて $V1a^{-/-}V1b^{-/-}$ の SCN で小さいかどうかを検討した。SCN スライスの各細胞が発光リズムのピークを迎える時間の分散値を解析したところ、 $V1a^{-/-}V1b^{-/-}$ の SCN スライスでは WT のものに比べて有意に分散値が小さかった (図 14A, B)。また、WT の SCN スライスに V1a と V1b のそれぞれのアンタゴニストを投与すると、コントロール投与群と比較して、各細胞振動のリズム位相差が有意に小さくなった (図 14C, D)。以上の結果から、SCN 内の AVP-V1aV1b 局所神経回路は、SCN 細胞間の概日リズムの位相差を生み出すと考えられる。

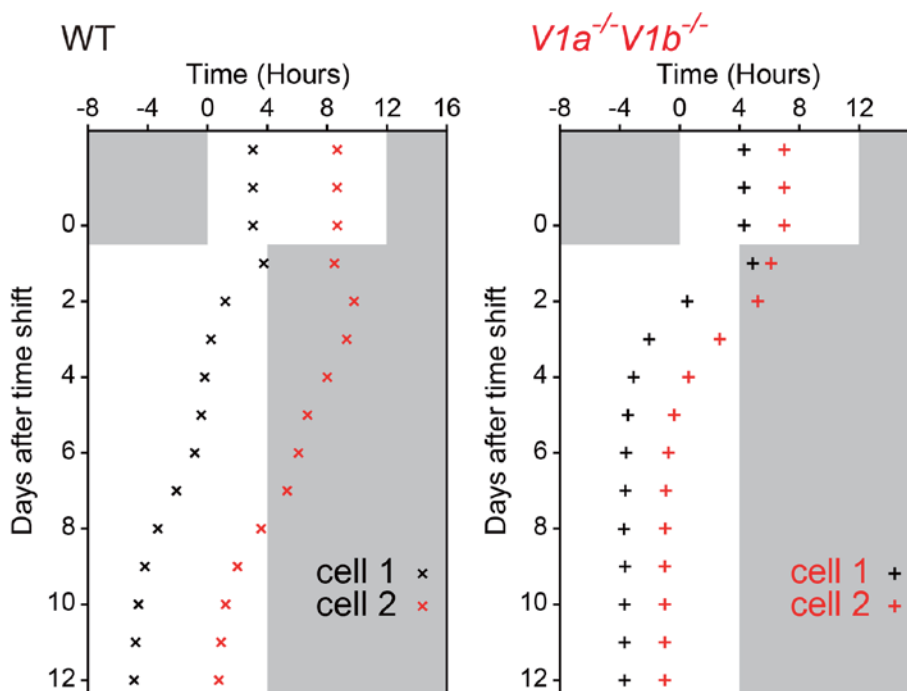


図 13 各点は、振動子 1 ($g_1(\varphi_1)$) (黒点) と振動子 2 ($g_2(\varphi_2)$) (赤点) のリズムがピークを迎える時間を示す。時差前の明暗条件下では、WT の場合に比べて $V1a^{-/-}V1b^{-/-}$ で振動子 1 と振動子 2 の位相差が大きい。

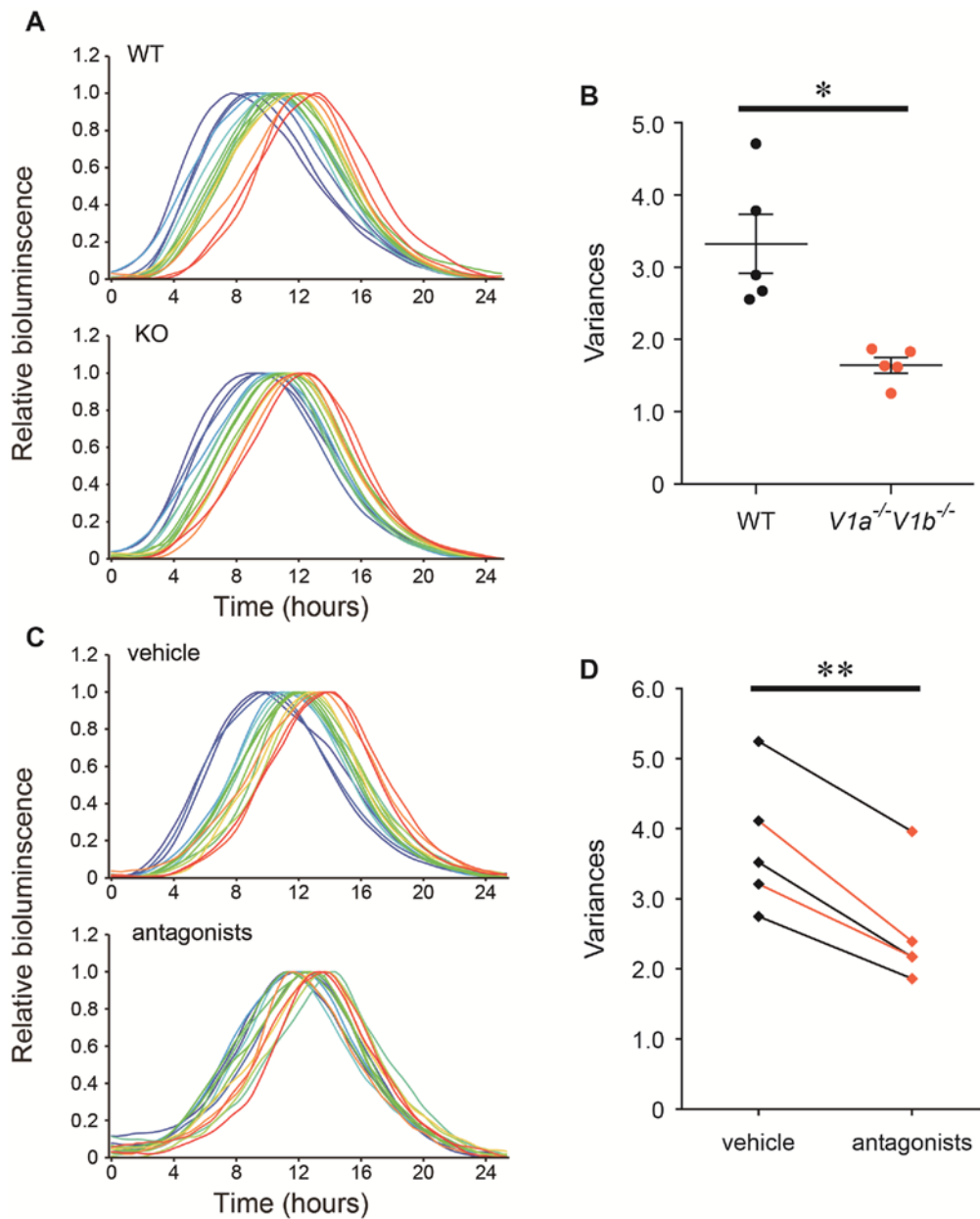


図 14 (A) WT あるいは $V1a^{-/-}V1b^{-/-}$ のマウスから作製した SCN スライスにおける各細胞の振動の順序を示す (各 15 細胞)。各細胞の発光量のピークを 1、トラフを 0 とした。(B) 各 SCN 細胞の発光リズムにおけるピーク時間の分散値を示す。各点はそれぞれの SCN スライス毎の分散値を示す (WT : $n=5$, $V1a^{-/-}V1b^{-/-}$: $n=5$)。横線とエラーバーは、それぞれ分散の平均値と標準誤差を示す。P 値は Student の t 検定を用いて求めた (* : $P < 0.05$)。 (C) WT マウスから作製した SCN スライスに、vehicle (1% DMSO) あるいは $V1a$ と $V1b$ のアンタゴニストを投与した各 SCN 細胞の振動の順序を示す (各 15 細胞)。各細胞の発光量のピークを 1、トラフを 0 とした。(D) 各 SCN 細胞の発光リズムにおけるピーク時間の分散値を示す。各点はそれぞれの SCN スライス毎の分散値を示す。直線で繋がれた 2 つのデータは、同じ SCN スライスから得た値である ($n=5$)。黒線と赤線はそれぞれ、先に vehicle を投与した後にアンタゴニストを投与した SCN スライス ($n=3$)、先にアンタゴニストを投与した後に vehicle を投与した SCN スライス ($n=2$) を示す。P 値は Student の t 検定を用いて求めた (** : $P < 0.01$)。

考察

リズムセンターである SCN の時計があまりに頑強であるため、かえってこの特徴が仇となり、時差環境下ではすぐに新明暗環境に再同調できず、時差症候群を発症するとされている。しかしながら、これまでの時差の分子・細胞メカニズムは不明であった。当研究室では、SCN を対象とした時間生物学研究を通して、 $V1a^{-/-}V1b^{-/-}$ マウスの行動や時計遺伝子発現のリズムが明暗周期の位相変動に対して瞬時に再同調ことを報告した (Yamaguchi *et al.*, 2013)。では、なぜ $V1a^{-/-}V1b^{-/-}$ マウスは時差に速く再同調するのだろうか？私は、SCN スライス培養を用いて細胞リズムをリアルタイムで解析することにより、SCN 内の AVP-V1aV1b 局所神経回路が正常に機能していると、各 SCN 細胞のリズムは、たとえリズム攪乱因子の存在下であっても、もともとのリズム位相を維持できることを見出した。従って、WT マウスでは、SCN 内に正常な AVP-V1aV1b 神経結合が存在するため、時差という体内リズムを大いに乱す環境下であっても時差前のリズムを保持し、時差後も急には体内時計のリズム位相を変動できないために、新明暗環境に再同調するのに多くの日数を要するものと考えられる。体内時計システムは、生物が何億年もかけて確立した機能であるが、特に中世代を生き延びた夜行性の哺乳類にとっては、捕食者が活動しない夜間を正確に知ることが生存競争に必須だったと考えられる。すなわち、夜間でも満月や山火事あるいは雷鳴などにより不意に明るくなることもあるが、それで夜が明けて昼になったと誤認してすぐ体内時計の位相が変動してしまうような脆弱な体内時計では生存に不適だったのであろう。

時計遺伝子を欠損したマウスや、AVP と同じく SCN 内で神経回路を形成する VIP の受容体である VPAC2 を欠損したマウスでも、新規明暗環境に速く再同調することが知られている (van der Horst *et al.*, 1999; Harmar *et al.*, 2002)。しかし、これらの遺伝子改変マウスは、時計遺伝子の発現リズムが障害され、機能的な体内時計システムを持たないリズム異常のマウスであり、時差環境下でのこれらのマウスの行動は、マスクングと呼ばれ単に暗くなったから行動し、明るくなったので行動しない、という表現型の結果である。その一方で、 $V1a^{-/-}V1b^{-/-}$ マウスの行動リズムや時計遺伝子の発現リズムあるいは光刺激に対する応答性は全て正常であり、 $V1a^{-/-}V1b^{-/-}$ マウスは機能的な体内時計を保持しているが、時差環境下においてのみ WT と異なり瞬時に再同調するという全く新しい特徴を持ったマウスである。

本研究において構築した数理モデルを利用することで、SCN の AVP 神経細胞間の結合が、それぞれの細胞間に位相差を形成することが予測された。そこで、SCN スライスを用いて解析したところ、SCN 細胞間の発光リズムの分散値は、

$V1a^{-/-}V1b^{-/-}$ では WT のものに比べて有意に小さかった。この位相差の縮小が $V1a^{-/-}V1b^{-/-}$ が時差に素早く再同調できる原因であることが示唆される (図 13)。興味深いことに、アンタゴニスト投与の場合でも、 $V1a^{-/-}V1b^{-/-}$ マウスと同様に各細胞振動のリズム位相差が有意に小さくなった。このことは、遺伝学的に両受容体をノックアウトするまでもなく、V1a および V1b 受容体をアンタゴニストにより薬理的に阻害しても時差の軽減効果がある事実を補強する (Yamaguchi *et al.*, 2013)。すなわち、アンタゴニストは細胞間の位相較差の制御という全く新しい機構で、時差による体内時計の位相変位を制御している可能性がある。

今回の検索の結果、V1a および V1b のシグナルを標的とすれば、本質的な体内時計機能を乱すことなく時差にのみ瞬時に適応できる創薬が期待できる。この新薬は、昼夜交代制勤務者や国際線のキャビンアテンダントで懸念される生活習慣病リスクの軽減が期待できることから、非常に意義深い。

材料と方法

動物と行動解析

$V1a^{-/-}$ マウス (Koshimizu *et al.*, 2006) と $V1b^{-/-}$ マウス (Tanoue *et al.*, 2004) は戻し交配により遺伝的背景を C57BL/6 近交系マウスに揃えた。 $V1a^{-/-}V1b^{-/-}$ マウスは、 $V1a^{-/-}$ マウスと $V1b^{-/-}$ マウスを掛け合わせて作製した。C57BL/6 近交系マウスは、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、実験に供した。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 (Stanford 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。本研究における動物実験はすべて、京都大学実験動物委員会の承認を得たものであり、動物実験取り扱い指針に従って行った。

AMPA の SCN 局所投与

ケタミン・キシラジン投与により麻酔処置を施したマウスの頭部を定位装置 (ナリシゲ) にて固定し、ブレグマから 0.4 mm 尾側に 5.0 mm 長のガイドカニューレをその先端が SCN の直上に到達するようにして留置した。

ガイドカニューレを留置されたマウスは、恒暗環境下で安定した自由行動リズムが見られるまで飼育した。安定した行動リズムが確認できてから 10 日後、エーテルを用いて麻酔をかけ、10 mL ハミルトンシリンジとポリエチレンチューブを接続した 5.5 mm 長のインジェクションカニューレを用いて、暗赤色光下で試薬の投与を行った。0.25 mM AMPA (Tocris)、0.5 mM NBQX (Tocris)、0.5 mM AP5 (Tocris)、0.25 mM AMPA と 0.5 mM NBQX、0.25 mM AMPA と 0.5 mM AP5、人工脳脊髄液 (147 mM NaCl、4 mM KCl、1.2 mM CaCl₂、pH 7.0) を、0.2 mL/min の流速で 5 分かけて投与した後、インジェクションカニューレを挿入したまま 2 分間静置した。人工脳脊髄液を用いて AMPA とアンタゴニストを溶解した。AMPA と AP5、AMPA と NBQX は、混合液として同時に投与した。

脳切片の作製

恒暗条件下のマウスの SCN に 0.25 mM の AMPA または人工脳脊髄液のみを CT14 に局所投与した後、マウスを再び恒暗条件下に戻した。CT15 に、マウスを暗赤色光下でエーテルにより麻酔処置を施した後、10 mL の氷冷生理食塩水により脱血し、20 mL の固定液 (4% Paraformaldehyde、0.1 M リン酸 buffer、pH 7.4) にて灌流固定した。脳を摘出し、4°C で 24 時間、固定液を用いて後固定した。その後、20% sucrose、0.1 M リン酸 buffer を用いて、4°C で 24 時間置換した。脳の冠状切片は、Cryostat (Leica) により、30 μ m (AMPA 受容体の発現局在の解

析) または 40 μm (*Per1* の発現誘導の解析) の厚さで作製した。

***in situ* hybridization**

SCN における AMPA 受容体の各サブユニットの発現局在、SCN への AMPA 投与による *Per1* の発現誘導を検討するために、下記の mRNA 配列により特異的なアンチセンスプローブを作製した。

GluR1 : 434–1090 bp (NM_001113325.1)

GluR2 : 631–1394 bp (NM_001039195.1)

GluR3 : 766–1524 bp (NM_016886.3)

GluR4 : 295–884 bp (NM_019691.4)

Per1 : 844–1626 bp (NM_011065)

クローニングした cDNA 断片は、塩基配列を確認した後、アンチセンス cRNA プローブ合成の鋳型として用いた。標識 cRNA プローブは、標準的な cRNA 合成のプロトコルに従って、digoxigenin 標識 UTP (Roche) または ^{33}P 標識 UTP (PerkinElmer) を用いて作製した。

in situ hybridization は浮遊法を用いて行った (Shigeyoshi *et al.*, 1997)。2x SSC 溶液にて洗浄した脳切片は、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ proteinase K 溶液 (0.1 M Tris buffer、50 mM EDTA、pH 8.0) で 37°C で 10 分間処理した後、室温で 10 分間のアセチル化処理を行った (0.25% acetic anhydride、0.1 M triethanolamine)。2x SSC 溶液にて 10 分間洗浄した後、標識した各 cRNA アンチセンスプローブ 7.2 μL を含む 1.8 mL hybridization buffer (55% formamide、10% dextran sulfate、10 mM Tris HCl、1 mM EDTA、0.6 M NaCl、0.2% N-laurylsarcosine、500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ tRNA、1x Denhardt's、0.25% SDS、10 mM dithiothreitol、pH 8.0) 中に切片を移し、60°C で 16 時間反応させた。反応後、脳切片を 2x SSC/50% formamide を用いて、60°C で 45 分間を 1 回と 15 分間を 2 回で洗浄した。その後、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RNase 溶液 (10 mM Tris-HCl、1 mM EDTA、0.5 M NaCl、pH 8.0) にて 37°C で 30 分間処理した。さらに、2x SSC/50% formamide を用いて 60°C で 15 分間 2 回洗浄し、0.4x SSC 溶液を用いて 60°C で 30 分間洗浄した。

digoxigenin 標識 *in situ* hybridization は、0.4x SSC 溶液洗浄の後に Alkaline Phosphatase 標識抗 digoxigenin 抗体の Fab 断片 (Roche Diagnostics) で抗体反応を行った。洗浄後、nitroblue tetrazolium salt (0.34 mg/ml, Roche Diagnostics) と 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate toluidinium salt (0.18 mg/ml, Roche Diagnostics) を含む反応液で、室温にて発色させ、ゼラチンコートされたスライドガラスに貼り付け、Entellan (Merk Chemicals) を用いて封入した。

RI 標識 *in situ* hybridization は、0.4x SSC 溶液洗浄の後に、ゼラチンコートされたスライドガラスに貼り付け、 ^{14}C -acrylic Standard (Amersham) とともに 5 日間、

BioMax film (Kodak) に感光させた。SCN における遺伝子の転写量の定量的解析は、BioMax film の SCN におけるシグナル強度を、 $[^{14}\text{C}]$ -acrylic Standard を標準として、MCID image analyzing system (Imaging Research Inc.) を用いて定量した。

SCN スライス培養

Per1-luc-V1a^{-/-}V1b^{-/-} マウスは、*Per1-luc* マウスと *V1a^{-/-}V1b^{-/-}* マウスを交配させて作製した。生後 4-6 日齢の新生児マウスを断頭により安楽死させ、ティッシュチョッパーを用いて SCN を含む 400 μm 厚の冠状面の脳切片を作製し、実体顕微鏡下で SCN のみをトリミングした。SCN スライスは、メンブレン上に移し、SCN 培養液 (50% minimum essential medium、25% Hank's balanced salt solution、25% horse serum、36 mM glucose、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ penicillin、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin) にて 35°C で培養した。作製してから 1 週間以上培養した後、発光量の経時的測定を行った。SCN 全体の発光量を解析するために、SCN スライスを 1 mM Luciferin 含有 SCN 培養液 200 μL の入った 24 well plate に移し、35°C で培養した。SCN スライスからの発光は two-dimensional photon-counting camera (Imaging Photon Detector IPD 418, Photek) にて 20 分毎の発光量を連続撮影した (Asai *et al.*, 2001)。単細胞レベルの発光量を解析するために、SCN スライスを 1 mM Luciferin 含有 SCN 培養液 750 μL の入った 35 mm Petri dish に移し、35°C で培養した。SCN スライスからの発光は高感度 CCD カメラ (Spectra Video SV16K/CT, Pixel Vision) にて 20 分毎の発光量を連続撮影した (Yamaguchi *et al.*, 2003)。得られた画像データから、MetaMorph (Molecular Devices) を用いて各 SCN 細胞の周期や位相を解析した。

SCN スライスへの試薬投与

AMPA : SCN スライス全体の発光リズムのピークから所定の時間後に、5 mM AMPA を含む培養液 (50% minimum essential medium、50% Hank's balanced salt solution、36 mM glucose、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ penicillin、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin) に移し、30 分間 35°C で培養した。その後、新しい培養液にて 10 分間 3 回の洗浄を行い、SCN スライスを元の培養液に戻した。ピークからの各時点の対照群および AMPA 投与群のサンプル数は、ピークから 0 時間 (対照群 : n = 3、AMPA 投与群 : n = 4) ; 2 時間 (3, 3) ; 4 時間 (5, 5) ; 6 時間 (3, 7) ; 8 時間 (7, 6) ; 10 時間 (5, 5) ; 12 時間 (3, 5) ; 14 時間 (3, 3) ; 16 時間 (5, 5) ; 18 時間 (2, 2) ; 20 時間 (2, 1) ; 22 時間 (1, 2) である。

CHX : SCN スライス全体の発光リズムの 2 度目のピークから 3 時間後に 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CHX を含む培養液に移し、36 時間培養した。その後、新しい培養液で 2 回洗浄し、さらに 7 日間培養し、各 SCN 細胞の発光リズムを測定した。

V1aV1b antagonists : CHX 投与実験では、CHX 除去後、10 nM V1a antagonist (OPC-21268) と 10 nM V1b antagonist (SSR 149415) を含む培養液に SCN スライス移し、7 日間培養し、各 SCN 細胞の発光リズムを測定した。位相差測定実験では、10 nM V1a antagonist (OPC-21268) と 10 nM V1b antagonist (SSR 149415) を含む培養液で、60 時間にわたって各 SCN 細胞の発光リズムを測定した。両アンタゴニストは DMSO に溶かした。vehicle には、1% DMSO を含む培養液を用いた。

引用文献

- Abrahamson, E.E., and Moore, R.Y. (2001). Suprachiasmatic nucleus in the mouse: retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections. *Brain Res.* 916, 172–191.
- Akiyama, M., Kouzu, Y., Takahashi, S., Wakamatsu, H., Moriya, T., Maetani, M., Watanabe, S., Tei, H., Sakaki, Y., and Shibata, S. (1999). Inhibition of light- or glutamate-induced mPer1 expression represses the phase shifts into the mouse circadian locomotor and suprachiasmatic firing rhythms. *J. Neurosci.* 19, 1115–1121.
- Anderson, C.M., and Swanson, R.A. (2000). Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia* 32, 1–14.
- Asai, M., Yamaguchi, S., Isejima, H., Jonouchi, M., Moriya, T., Shibata, S., Kobayashi, M., and Okamura, H. (2001). Visualization of mPer1 transcription in vitro: NMDA induces a rapid phase shift of mPer1 gene in cultured SCN. *Curr. Biol.* 11, 1524–1527.
- Cagampang, F.R., and Inouye, S.T. (1994). Diurnal and circadian changes of serotonin in the suprachiasmatic nuclei: regulation by light and an endogenous pacemaker. *Brain Res.* 639, 175–179.
- Colwell, C.S., and Menaker, M. (1992). NMDA as well as non-NMDA receptor antagonists can prevent the phase-shifting effects of light on the circadian system of the golden hamster. *J. Biol. Rhythms* 7, 125–136.
- Colwell, C.S., Foster, R.G., and Menaker, M. (1991). NMDA receptor antagonists block the effects of light on circadian behavior in the mouse. *Brain Res.* 554, 105–110.
- Cooke, S.F., and Bliss, T.V.P. (2006). Plasticity in the human central nervous system. *Brain J. Neurol.* 129, 1659–1673.
- Ding, J.M., Chen, D., Weber, E.T., Faiman, L.E., Rea, M.A., and Gillette, M.U. (1994). Resetting the biological clock: mediation of nocturnal circadian shifts by glutamate and NO. *Science* 266, 1713–1717.
- Dunlap, J.C. (1999). Molecular bases for circadian clocks. *Cell* 96, 271–290.
- Gannon, R.L., and Rea, M.A. (1994). In situ hybridization of antisense mRNA oligonucleotides for AMPA, NMDA and metabotropic glutamate receptor subtypes in the rat suprachiasmatic nucleus at different phases of the circadian cycle. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 23, 338–344.
- Güler, A.D., Ecker, J.L., Lall, G.S., Haq, S., Altimus, C.M., Liao, H.W., Barnard, A.R., Cahill, H., Badea, T.C., Zhao, H., *et al.* (2008). Melanopsin cells are the principal conduits for rod-cone input to non-image-forming vision. *Nature* 453, 102–105.
- Harmar, A.J., Marston, H.M., Shen, S., Spratt, C., West, K.M., Sheward, W.J., Morrison, C.F., Dorin, J.R., Piggins, H.D., Reubi, J.C., *et al.* (2002). The VPAC₂ receptor is essential for circadian function in the mouse suprachiasmatic nuclei. *Cell* 109, 497–508.

- van der Horst, G.T., Muijtjens, M., Kobayashi, K., Takano, R., Kanno, S., Takao, M., de Wit, J., Verkerk, A., Eker, A.P., van Leenen, D., *et al.* (1999). Mammalian Cry1 and Cry2 are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature* 398, 627–630.
- Ibata, Y., Takahashi, Y., Okamura, H., Kawakami, F., Terubayashi, H., Kubo, T., and Yanaihara, N. (1989). Vasoactive intestinal peptide (VIP)-like immunoreactive neurons located in the rat suprachiasmatic nucleus receive a direct retinal projection. *Neurosci. Lett.* 97, 1–5.
- Ibata, Y., Tanaka, M., Ichitani, Y., Takahashi, Y., and Okamura, H. (1993). Neuronal interaction between VIP and vasopressin neurones in the rat suprachiasmatic nucleus. *Neuroreport* 4, 128–130.
- Jin, X., Shearman, L.P., Weaver, D.R., Zylka, M.J., de Vries, G.J., and Reppert, S.M. (1999). A molecular mechanism regulating rhythmic output from the suprachiasmatic circadian clock. *Cell* 96, 57–68.
- Ko, C.H., and Takahashi, J.S. (2006). Molecular components of the mammalian circadian clock. *Hum. Mol. Genet.* 15 *Spec No 2*, R271–277.
- Kojo, K., Pukkala, E., and Auvinen, A. (2005). Breast cancer risk among Finnish cabin attendants: a nested case-control study. *Occup. Environ. Med.* 62, 488–493.
- Koshimizu, T., Nasa, Y., Tanoue, A., Oikawa, R., Kawahara, Y., Kiyono, Y., Adachi, T., Tanaka, T., Kuwaki, T., Mori, T., *et al.* (2006). V1a vasopressin receptors maintain normal blood pressure by regulating circulating blood volume and baroreflex sensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 7807–7812.
- Kuramoto, Y. (2003). *Chemical oscillations, waves, and turbulence* (Mineola, N.Y.: Dover Publications).
- Lee, H.S., Billings, H.J., and Lehman, M.N. (2003). The suprachiasmatic nucleus: a clock of multiple components. *J. Biol. Rhythms* 18, 435–449.
- Liou, S.Y., Shibata, S., Iwasaki, K., and Ueki, S. (1986). Optic nerve stimulation-induced increase of release of ³H-glutamate and ³H-aspartate but not ³H-GABA from the suprachiasmatic nucleus in slices of rat hypothalamus. *Brain Res. Bull.* 16, 527–531.
- Mintz, E.M., Marvel, C.L., Gillespie, C.F., Price, K.M., and Albers, H.E. (1999). Activation of NMDA receptors in the suprachiasmatic nucleus produces light-like phase shifts of the circadian clock in vivo. *J. Neurosci.* 19, 5124–5130.
- Moore, R.Y., and Lenn, N.J. (1972). A retinohypothalamic projection in the rat. *J. Comp. Neurol.* 146, 1–14.
- Moore, R.Y., and Speh, J.C. (1993). GABA is the principal neurotransmitter of the circadian system. *Neurosci. Lett.* 150, 112–116.
- Moriya, T., Ikeda, M., Teshima, K., Hara, R., Kuriyama, K., Yoshioka, T., Allen, C.N., and Shibata, S. (2003). Facilitation of α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate receptor

- transmission in the suprachiasmatic nucleus by aniracetam enhances photic responses of the biological clock in rodents. *J. Neurochem.* *85*, 978–987.
- Nowak, L., Bregestovski, P., Ascher, P., Herbet, A., and Prochiantz, A. (1984). Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* *307*, 462–465.
- Okamura, H. (2007). Suprachiasmatic nucleus clock time in the mammalian circadian system. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* *72*, 551–556.
- Okamura, H., Bérød, A., Julien, J.F., Geffard, M., Kitahama, K., Mallet, J., and Bobillier, P. (1989). Demonstration of GABAergic cell bodies in the suprachiasmatic nucleus: in situ hybridization of glutamic acid decarboxylase (GAD) mRNA and immunocytochemistry of GAD and GABA. *Neurosci. Lett.* *102*, 131–136.
- Pan, A., Schernhammer, E.S., Sun, Q., and Hu, F.B. (2011). Rotating night shift work and risk of type 2 diabetes: two prospective cohort studies in women. *PLoS Med.* *8*, e1001141.
- Panda, S., Antoch, M.P., Miller, B.H., Su, A.I., Schook, A.B., Straume, M., Schultz, P.G., Kay, S.A., Takahashi, J.S., and Hogenesch, J.B. (2002). Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. *Cell* *109*, 307–320.
- Paul, K.N., Fukuhara, C., Tosini, G., and Albers, H.E. (2003). Transduction of light in the suprachiasmatic nucleus: evidence for two different neurochemical cascades regulating the levels of *Per1* mRNA and pineal melatonin. *Neuroscience* *119*, 137–144.
- Pickard, G.E., Weber, E.T., Scott, P.A., Riberdy, A.F., and Rea, M.A. (1996). 5HT1B receptor agonists inhibit light-induced phase shifts of behavioral circadian rhythms and expression of the immediate-early gene *c-fos* in the suprachiasmatic nucleus. *J. Neurosci.* *16*, 8208–8220.
- van den Pol, A.N. (1991). Glutamate and aspartate immunoreactivity in hypothalamic presynaptic axons. *J. Neurosci.* *11*, 2087–2101.
- Reppert, S.M., and Weaver, D.R. (2001). Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Annu. Rev. Physiol.* *63*, 647–676.
- Reppert, S.M., and Weaver, D.R. (2002). Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* *418*, 935–941.
- Scheer, F.A.J.L., Hilton, M.F., Mantzoros, C.S., and Shea, S.A. (2009). Adverse metabolic and cardiovascular consequences of circadian misalignment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 4453–4458.
- Schwartz, W.J., and Reppert, S.M. (1985). Neural regulation of the circadian vasopressin rhythm in cerebrospinal fluid: a pre-eminent role for the suprachiasmatic nuclei. *J. Neurosci.* *5*, 2771–2778.
- Schwartz, W.J., and Zimmerman, P. (1990). Circadian timekeeping in BALB/c and C57BL/6 inbred mouse strains. *J. Neurosci.* *10*, 3685–3694.
- Shibata, S., Watanabe, A., Hamada, T., Ono, M., and Watanabe, S. (1994). N-methyl-D-aspartate induces phase shifts in circadian rhythm of neuronal activity of rat SCN in vitro. *Am. J. Physiol.*

267, R360–364.

- Shigeyoshi, Y., Taguchi, K., Yamamoto, S., Takekida, S., Yan, L., Tei, H., Moriya, T., Shibata, S., Loros, J.J., Dunlap, J.C., *et al.* (1997). Light-induced resetting of a mammalian circadian clock is associated with rapid induction of the mPer1 transcript. *Cell* *91*, 1043–1053.
- Storch, K.F., Paz, C., Signorovitch, J., Raviola, E., Pawlyk, B., Li, T., and Weitz, C.J. (2007). Intrinsic circadian clock of the mammalian retina: importance for retinal processing of visual information. *Cell* *130*, 730–741.
- Tanoue, A., Ito, S., Honda, K., Oshikawa, S., Kitagawa, Y., Koshimizu, T.A., Mori, T., and Tsujimoto, G. (2004). The vasopressin V1b receptor critically regulates hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity under both stress and resting conditions. *J. Clin. Invest.* *113*, 302–309.
- De Vries, M.J., Nunes Cardozo, B., van der Want, J., de Wolf, A., and Meijer, J.H. (1993). Glutamate immunoreactivity in terminals of the retinohypothalamic tract of the brown Norwegian rat. *Brain Res.* *612*, 231–237.
- Wakamatsu, H., Takahashi, S., Moriya, T., Inouye, S.T., Okamura, H., Akiyama, M., and Shibata, S. (2001). Additive effect of mPer1 and mPer2 antisense oligonucleotides on light-induced phase shift. *Neuroreport* *12*, 127–131.
- Winfrey, A.T. (1967). Biological rhythms and the behavior of populations of coupled oscillators. *J. Theor. Biol.* *16*, 15–42.
- Yamaguchi, S., Isejima, H., Matsuo, T., Okura, R., Yagita, K., Kobayashi, M., and Okamura, H. (2003). Synchronization of cellular clocks in the suprachiasmatic nucleus. *Science* *302*, 1408–1412.
- Yamaguchi, Y., Suzuki, T., Mizoro, Y., Kori, H., Okada, K., Chen, Y., Fustin, J.M., Yamazaki, F., Mizuguchi, N., Zhang, J., *et al.* (2013). Mice genetically deficient in vasopressin V1a and V1b receptors are resistant to jet lag. *Science* *342*, 85–90.
- Yan, L., and Okamura, H. (2002). Gradients in the circadian expression of Per1 and Per2 genes in the rat suprachiasmatic nucleus. *Eur. J. Neurosci.* *15*, 1153–1162.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、常に熱心なご助言・ご指導を賜り、また素晴らしい研究環境を提供して下さった本学薬学研究科の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、論文作成等で、細部に渡り様々な形でご助言・ご指導くださった山口賀章助教に、深く感謝申し上げます。

お茶の水女子大学の郡宏准教授には、数理モデルの作製とその解析で、非常にお世話になりました。

そして、日常の会話やセミナー等を通じての激励やご助言等を賜りました土居雅夫准教授をはじめ、システムバイオロジー分野の皆様に、深くお礼申し上げます。

最後になりましたが、これからもシステムバイオロジー分野がますます躍進されることを祈念しております。

2014年3月
溝曾路 祥孝