

A study on light responsiveness in the suprachiasmatic
nucleus under jet lag condition

(時差環境下における視交叉上核の光応答性に関する研究)

2015

陳 宇林

目次

要旨	2
序論	4
実験材料と方法	8
結果	11
第 1 章 時差環境下の視交叉上核細胞における時計遺伝子の発現解析.....	11
1.1 サンプリングスケジュール	11
1.2 時差環境下の野生型視交叉上核における <i>Per1</i> の発現	11
1.3 時差環境下の <i>V1a^{-/-}V1b^{-/-}</i> 視交叉上核における <i>Per1</i> の発現	13
1.4 時差環境下の野生型視交叉上核における <i>Dbp</i> の発現	13
1.5 時差環境下の <i>V1a^{-/-}V1b^{-/-}</i> 視交叉上核における <i>Dbp</i> の発現	15
第 2 章 時差環境下の視交叉上核における c-Fos の発現解析.....	16
2.1 時差開始日の視交叉上核における c-Fos の発現.....	16
2.2 時差環境下の視交叉上核における c-Fos の発現.....	18
2.3 Two-way ANOVA による統計解析	21
考察	22
引用文献.....	27
謝辞	34

要旨

地球上の多くの生物は体内に約 24 時間を刻む時計、概日時計を持っており、血圧変動、ホルモン分泌、体温、睡眠周期など様々な生理現象に 24 時間周期のリズムを与えている。この概日時計を制御する中枢は、脳の視床下部にある小さな神経核、視交叉上核 (SCN) である。概日リズムを形成する分子メカニズムは *Per1* をはじめとする一群の時計遺伝子による転写翻訳を介したネガティブフィードバックループである。このような概日振動の分子機構は全身の細胞にも存在するが、SCN はホルモン分泌や神経伝達により全身の末梢時計を調律し、個体としての概日リズムを統括している。

通常、私たちの体内時計のリズムは外界の明暗リズムに同調しているため、その存在を実感することはない。ところが、ジェット機により海外渡航をすると、外界の明暗リズムは急激に変動するのに対して、私たちの体内時計の位相はほとんど変動しないので、体内時計と環境の明暗リズムが乖離して、不眠や食欲不振といった時差症状に陥る。また近年、慢性的な時差環境下での生活を強いられるシフトワーカーでは、心血管障害や肥満、糖尿病などの生活習慣病や癌などの発症リスクが増加することも社会問題となっている。しかしながら、時差の分子神経メカニズムについては、これまでほとんどわかっていなかった。

近年私たちは、SCN を対象に時差の分子スクリーニングを行い、アルギニンバソプレッシン (AVP) の受容体である *V1a* と *V1b* のダブルノックアウトマウス (*V1a^{-/-}V1b^{-/-}* マウス) が、時差環境下において新しい明暗環境に対して極めて迅速に再同調し、全く時差症状を示さないことを見いだした。そこで私は、時差環境下の *V1a^{-/-}V1b^{-/-}* マウスと野生型 (WT) マウスの SCN における時計遺伝子の発現変動を、*digoxigenin* を用いた *in situ* ハイブリダイゼーションによって、SCN の細胞レベルで解析した。WT の SCN では、時差後 1 日目に光情報が入力する SCN の腹外側部 (VL 領域) で *Per1* が転写誘導され、時差後 2 日目より概日リズムの位相が再同調を開始し、時差後 9 日目に時差前と同様の概日振動が回復した。一方、*V1a^{-/-}V1b^{-/-}* の SCN における時計遺伝子の変動は、時差直後では WT の SCN のものとほとんど同様であったが、再同調の完了は時差後 3 日目と極めて迅速であった。また私は、神経活動マーカーである *c-Fos* 発現の免疫組織化学的解析によって、時差環境下における光刺激が、SCN の細胞に対して日々どのように作用するのかについて検討した。その結果、新明暗環境の光は、WT の SCN を少なくとも時差後 3 日目までは活性化するのに対して、*V1a^{-/-}V1b^{-/-}* の SCN の活性化は時差後 1 日目のみであることがわかった。以上

の結果は、時差環境下においては、朝に光を浴びることが時計遺伝子の誘導や SCN 細胞の活性化を引き起こし、新明暗環境のリズムへの再同調を促進していることを示唆するものである。また、SCN における AVP の神経回路は、光刺激が直接入力しない背内側部 (DM 領域) にあるが、 $V1a^{-/-}V1b^{-/-}$ の SCN では VL 領域の再同調も迅速であることから、DM 領域から VL 領域への新規の制御機構が存在すると考えられる。

序論

地球上のほぼすべての生物は、自身の体内に約 24 時間周期を刻む時計、概日時計を持つ (Dunlap, 1999; Johnson *et al.*, 2011; Rey *et al.*, 2013; Romanowski *et al.*, 2015)。この概日時計により、ホルモン分泌や血圧変動など様々な生理現象は 24 時間リズムを示す (Reppert *et al.*, 2002; Hastings, *et al.*, 2003; Ko *et al.*, 2006)。例えば、副腎皮質ホルモンであるコルチゾールの血中濃度は、起床前から上昇して起床時にピークを迎え、その後低下するという日周リズムを示す (Weitzman *et al.*, 1971)。哺乳類では、この概日リズムを統括する中枢は、脳の視床下部にある小さな神経核である視交叉上核 (suprachiasmatic nucleus, SCN) である。このことは、SCN の破壊実験や移植実験により解明された。すなわち、SCN を破壊すると行動やホルモン分泌などの概日リズムが完全に消失し (Stephan *et al.*, 1972; Moore *et al.*, 1972)、SCN を破壊された個体に別の個体から採取した SCN を移植すると、ホスト個体の概日リズムが回復するだけでなく、その周期長はドナーの SCN のものと等しくなる (Ralph *et al.*, 1990)。また、時計遺伝子を欠損し、概日リズムを示さないマウスに対して、野生型 (WT) マウスの SCN を移植しただけで概日行動リズムは回復する (Sujino *et al.*, 2003; McDearmon *et al.*, 2006)。

このように、概日リズムを形成する解剖学的、生理学的知見は早くから集積していたが、そのリズム発振の分子メカニズムについては長らく不明であった。ところが、1997 年の時計遺伝子 *Per1* のクローニングを皮切りにして世界中で研究が進み、概日リズムは 10 個程度の時計遺伝子による転写と翻訳を介するネガティブフィードバックループによるものであることがわずか数年で判明した。中心的な役割を担う *Per* に着目してこの機構について説明すると、まずコアループの転写活性化因子である CLOCK と BMAL1 がヘテロ二量体を形成し、*Per* と *Cry* のプロモーター上の E-box に結合して *Per* と *Cry* の転写を活性化する。続いて、翻訳された PER と CRY は二量体を形成し、CLOCK/BMAL1 による E-box を介する転写活性を抑制する。その結果、PER と CRY の発現量が減少し、続いて CLOCK/BMAL1 への抑制が解除されることによって再び *Per* と *Cry* の転写が活性化される (図 1)。このようにして、*Per* の転写サイクルが 1 回転する。また、このコアループは、複数のサブループによる多重の連結制御を受けることで、安定した 24 時間周期のリズムを形成している (Okamura, 2004; Dunlap, 1999; Reppert *et al.*, 2001; Reppert *et al.*, 2002; Hastings, 1997; Moore, 1997)。さらに、プロモーター上に時計遺伝子が作用する配列を持ち、それによってリズム

ックに概日発現する遺伝子（時計被制御遺伝子と総称される）も多数同定されている。このような概日振動を生み出す分子機構は、SCN の細胞だけでなく、全身のほぼ全て細胞にも存在している。発現振動する時計被制御遺伝子は、組織ごとに独自性があり、組織固有の生理機能に深く関与していることがわかってきた（Storch *et al.*, 2002; Ueda *et al.*, 2002; Panda *et al.*, 2002; Delaunay *et al.*, 2002; Lowrey *et al.*, 2004）。SCN は、ホルモン分泌や神経伝達を介して、このように全身に存在する末梢時計を調律することによって、個体としての概日リズムを制御している（Inouye *et al.*, 1979; Klein *et al.*, 1991; Buijs *et al.*, 2001; Terazono *et al.*, 2003; Silver *et al.*, 1996）。

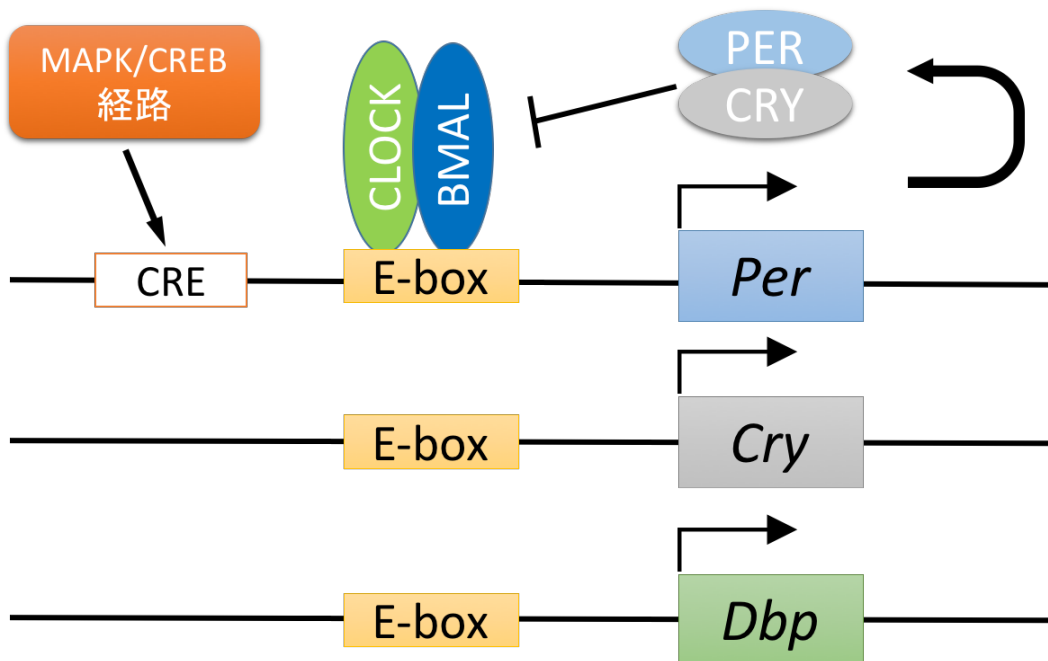


図 1 概日リズムを生み出す時計遺伝子の分子機構

SCN は、形態学的に背内側部 (dorsomedial, DM) 領域と腹外側部 (ventrolateral, VL) 領域の細胞群によって構成される。また、DM 領域と VL 領域の神経細胞は、アルギニンバソプレッシン (arginine vasopressin, AVP) と血管作動性腸管ペプチド (vasoactive intestinal peptide, VIP) をそれぞれ特異的に発現している (Ibata *et al.*, 1997; Moore *et al.*, 2002)。さらに、DM 領域には、AVP の受容体である V1a と VIP の受容体である VPAC2 がそれぞれ発現している (Yamaguchi *et al.*, 2013; An *et al.*, 2012)。また、AVP の受容体である V1b も SCN に発現していることから (Vaccari *et al.*, 1998)、図 2 に示すように、AVP と VIP を介する SCN 内局所神経回路が存在している。この SCN 細胞間の密接な神経回路によって、SCN は末梢組織とは異なり、生体から切り離れた切片培養系であって

も何ヶ月間にもわたって安定した概日リズムを生み出すことができると考えられている (Nagoshi *et al.*, 2004; Yamaguchi *et al.*, 2003; Yamaguchi *et al.*, 2013)。

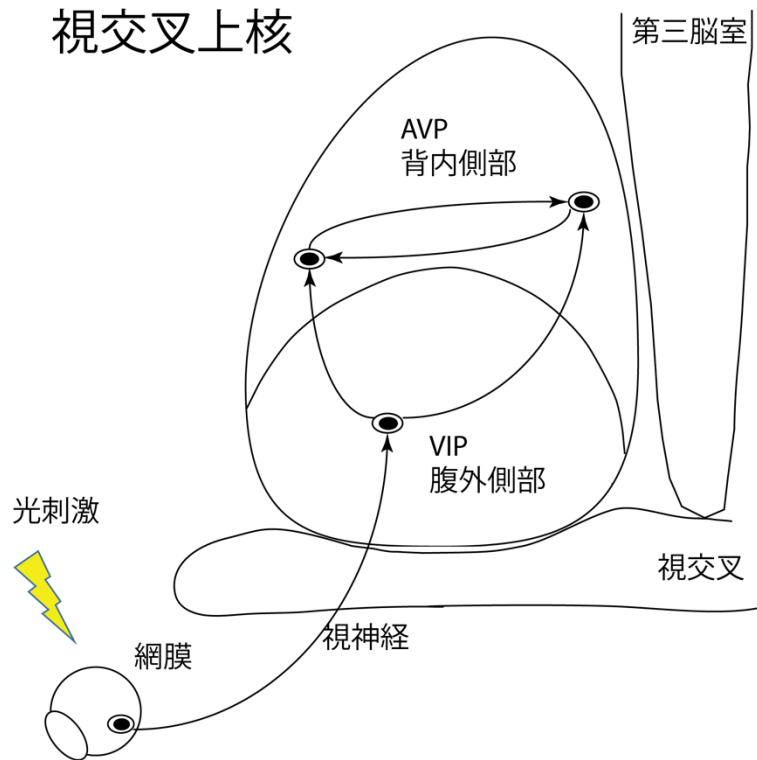


図 2 視交叉上核の形態学的特徴

ところで、概日リズムの周期長は正確には 24 時間ではないため、日々自身の概日リズムの位相を調節し、地球の自転に基づく 24 時間の明暗周期に同調させる必要がある。哺乳類の概日リズムの最も強力な同調因子は光である。網膜の細胞から SCN の VL 領域の VIP 細胞に投射する網膜視床下部路があり (Moore *et al.*, 1972; Ibata *et al.*, 1989)、外界の光刺激はこの神経終末からのグルタミン酸放出へと変換される。続いて、このグルタミン酸は、SCN 細胞のグルタミン酸受容体に対して作用し、mitogen-activated protein kinase (MAPK) や CRE-binding protein (CREB) 経路を活性化し、*Per1* プロモーターの cAMP responsive element (CRE 配列) を介して *Per1* の転写を誘導することで、コアループの振動位相をリセットするとされている。

このように生体に内在する概日時計であるが、私たちがその存在を実感するのは、海外に行って時差ボケになった時ではなかろうか。通常は、私たちの体内時計のリズムは外界の明暗リズムに完全に同調しているが、海外渡航の際には、明暗リズムの位相は瞬時に変動するが、体内時計はその安定性ゆえに外界の新しい明暗環境に対して直ちには再同調できない。そのため、両者のリズム

位相は乖離してしまい、私たちは不眠や食欲不振といった時差症状を呈する (Comperatore *et al.*, 1990; Sack, 2009)。また、社会的には、慢性的な時差環境下での生活を強いられるシフトワーカーで、心血管障害や肥満、糖尿病など生活習慣病や癌などの発症リスクが増加することが問題となっている (Scheer *et al.*, 2009; Buxton *et al.*, 2012; Thaiss *et al.*, 2014; Pan *et al.*, 2011; Kojo *et al.*, 2005)。しかしながら、時差の分子神経メカニズムについては、これまでほとんどわかっていなかった (Waterhouse, 1999; Yamazaki *et al.*, 2000; Reddy *et al.*, 2002; Kiessling *et al.*, 2010)。

近年私たちは、AVP の受容体である V1a と V1b のダブルノックアウトマウス ($V1a^{-/-}V1b^{-/-}$ マウス) が、時差環境下において、行動や時計遺伝子の発現リズムを新たな明暗環境に素早く再同調させ、時差症状を全く示さないことを見いだした (Yamaguchi *et al.*, 2013)。一方、WT マウスでは、時差環境下における概日行動のリズム位相は日々少しずつ変化し、およそ 10 日後に新明暗環境のリズムに再同調した。また、リアルタイム PCR により WT の SCN における時計遺伝子の発現を定量したところ、時差を起こした直後に一旦そのリズム性が消失し、その後日をおって概日振動の振幅が少しずつ大きくなり、時差後 8 日目程度で時差前の概日振動のように回復した (Yamaguchi *et al.*, 2013)。前述のように、SCN においては、時計遺伝子の大きく安定した日周リズムに基づく頑強な概日リズムが最も大きな特徴であることから、この時差直後の振動停止現象は非常に興味深い。そこで私は、第一章で、時差環境下の SCN における時計遺伝子の発現変動を digoxigenin による *in situ* ハイブリダイゼーションによって SCN の細胞レベルで検討した。また、時差環境下においては、それまで暗期であった時間帯に毎日光があたることになるが、その光が SCN にどのように作用するかは不明である。そこで私は、第二章で、時差環境下における SCN の光応答性を、c-Fos をマーカーとして用いて神経活動を測定することによって検討した。

実験材料と方法

実験動物と時差実験

C57BL/6 マウス（日本動物）あるいは $V1a^{-/-}V1b^{-/-}$ マウス（Yamaguchi *et al.*, 2013）の飼育は、明期 12 時間・暗期 12 時間の明暗サイクルの下（蛍光灯、200 ルクス）、自由飲水・自由給餌下で、光密閉性のある換気されたボックス内にて行った。2 週間以上同調させた後に、暗期開始後 4 時間目に点灯し、それより新たに明期 12 時間・暗期 12 時間の明暗サイクルの下で飼育することで、マウスを時差環境下においた。明暗環境下では、Zeitgeber time 0 (ZT0) を点灯時間、ZT12 を消灯時間とするが、時差環境下では、ZT16 で点灯することで、8 時間明暗環境を前進させていることになる。本研究で行った全ての動物実験は、京都大学動物実験委員会の承認を得て行ったものであり、京都大学における動物実験の実施に関する規定に則り行った。

Digoxigenin (DIG) 標識プローブを用いた *in situ* hybridization

10 mL の氷冷生理食塩水を灌流してマウスを脱血した後、20 mL の 4% パラホルムアルデヒド含有 0.1 M リン酸緩衝溶液 (4% PFA/0.1 M PB) を用いて灌流固定した。摘出した脳組織を 4% PFA/0.1 M PB に 24 時間浸漬固定し、凍結保護のために 20% スクロース含有 0.1 M PB に 48 時間浸漬した。脳をドライアイスで急速に凍結し、Leica CM3050 S (Leica) により SCN を含む 30 μ m 厚の冠状凍結切片を作製した。続いて、*in situ* hybridization を浮遊切片法により行った (Shigeyoshi *et al.*, 1997)。脳切片を 2 \times SSC で洗浄後、1 mg/ml proteinase K (0.1 M Tris buffer, pH8.0, 50 mM EDTA) において 37°C で 10 分振盪処理した後、4% PFA によって反応を停止させた。切片を 2 \times SSC にて室温で洗浄し、0.25% 無水酢酸含有 0.1 M トリエタノールアミン緩衝溶液にて、室温で 10 分間アセチル化を行った。切片を 2 \times SSC で洗浄した後、DIG 標識 cRNA プローブを含むハイブリダイゼーションバッファー (60% formamide, 10mM Tris-HCl, pH7.5, 0.2 mg/ml tRNA, 1x Denhardt's solution, 10% dextran sulfate, 0.6 M NaCl, 0.25% SDS, 1 mM EDTA) に移し、60°C で 16 時間ハイブリダイズさせた。続いて、2 \times SSC/50% formamide 溶液中にて 60°C で洗浄し、10 μ g/mL RNaseA (0.5 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH8.0, 1 mM EDTA) において 37°C で 30 分間 RNaseA 処理を行った。さらに、切片を 2 \times SSC/50% formamide および 0.4 \times SSC/50% formamide にて 60°C で洗浄し、Buffer1 (100 mM Tris-HCl, pH7.5, 0.15 M NaCl) に溶解した 10 mg/mL Block Reagent (Roche) 溶液に移し、室温で 1 時間ブロッキング処理を行った。続いて、アルカリフォスファターゼ標識抗 DIG 抗体 (1:500, Roche)

を含む Buffer1 に切片を移し、4°Cで 72 時間振盪した。その後、Buffer 1 で切片を洗浄し、Buffer 3 (100 mM Tris-HCl (pH 9.5)、0.3% NaCl) で 1 時間振盪した後、5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate と nitro-blue tetrazolium chloride を Buffer 3 に溶かした反応液でおよそ 8 時間発色させた。続いて TE buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.5)、1 mM EDTA) により発色を停止させ、切片をゼラチンコートスライドガラスに貼り付け、風乾させた。エタノールによる脱水処理、キシレンによる透徹処理後に、エンテラン (Merck) を用いて封入した。顕微鏡撮影は Axioskop 2 plus (Zeiss) を用いて明視野で行った。cRNA プローブ (*Per1*, NM_011065: 812-1651; *Dbp*, NM_016974: 969-1475) は、DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7) (Roche) を用いて合成した。

免疫組織化学

マウスを赤色安全光のもとエーテルで麻酔し、氷冷の 4% PFA/0.1 M PB 固定液 25 ml で速やかに灌流固定した。脳を摘出し、4°Cで同じ固定液で 24 時間後固定した後、20%スクロース含有 0.1 M PB 置換液に入れ替え、48 時間のスクロース置換を行った。脳をドライアイスで凍らせた後、Leica CM3050 S (Leica) を使用して SCN を含む 30 μ m の冠状凍結切片を作製した。

免疫組織化学はポリクローナル抗 c-Fos 抗体 (Abcam, ab7963) を用いて、浮遊切片法で行った (Doi *et al.*, 2011)。4°Cで洗浄後 (0.1 M PB、10 分間、2 回; 3% Triton X-100 を含む 0.1 M PB (PBX)、10 分間、1 回)、1.5% H₂O₂ を含む 0.1 M PB で 20 分間処理した。さらに 4°Cで洗浄後、室温で 5% Horse serum を含む PBX で 1 時間インキュベートした。1 次抗体反応は 2% Horse serum を含む PBX で c-Fos 抗体を 10,000 倍希釈し、4°Cにおいて 72 時間反応させた。4°Cで洗浄後、2 次抗体としてビオチン化 anti-rabbit IgG (Vector Laboratories) を PBX で 1,000 倍希釈し、16 時間反応させた。4°Cで洗浄後、Vectorstain Elite ABC kit (Vector Laboratories) を用いて、標準プロトコールに従って発色させた。切片を 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) に移して、ゼラチンコートしたスライドガラスに貼り付けて風乾させた。エタノールによる脱水処理、キシレンによる透徹処理後に、エンテランで封入を行った。顕微鏡撮影は Axioskop 2 plus (Zeiss) を用いて明視野で行った。

c-Fos 陽性細胞の計数

c-Fos の染色像は核に局限されるので、c-Fos 陽性細胞数を測定することが可能である。本実験では、ImageJ ソフトウェア (NIH、<http://imagej.nih.gov/ij/>) を用いた。まず、染色画像を RGB 色から 8-bit グレイスケールに変換し、ImageJ の 'Triangle' を用いて、客観的に陽性シグナルの閾値を設定した。c-Fos 陽性と

された核の数を、‘Analyze Particles.’を利用して求めた (Vargis *et al.*, 2014; Pačesová *et al.*, 2015)。ImageJが選出したc-Fos陽性領域をオリジナルの染色画像に重ね合わせ、本当に一つの核であるかを目視で確認した。近接した複数個のc-Fos陽性核がImageJにより一つと算出されていた場合には、その分を補正して正しい細胞数を求めた。SCNの中央3枚の切片における全c-Fos陽性細胞数を、SCNあたりのc-Fos陽性細胞数とした。統計解析は、Two-way ANOVAを用いて行い、Post-hocテストはBonferroni法により行った。有意水準は、*** $p < 0.001$ 、** $p < 0.01$ 、および * $p < 0.05$ とした。

結果

第1章 時差環境下の視交叉上核細胞における時計遺伝子の発現解析

1.1 サンプルングスケジュール

私は、時差環境下の SCN における時計遺伝子の発現変動分布を、DIG *in situ* ハイブリダイゼーションによって、細胞レベルで調べた。サンプルングポイントは、WT マウスで時差前1日、時差後1日目、2日目、3日目および9日目を、 $V1a^{-/-}V1b^{-/-}$ マウスで時差前1日、時差後1日目、2日目および3日目に、1日4時間ごと6点にて行った（図3）。

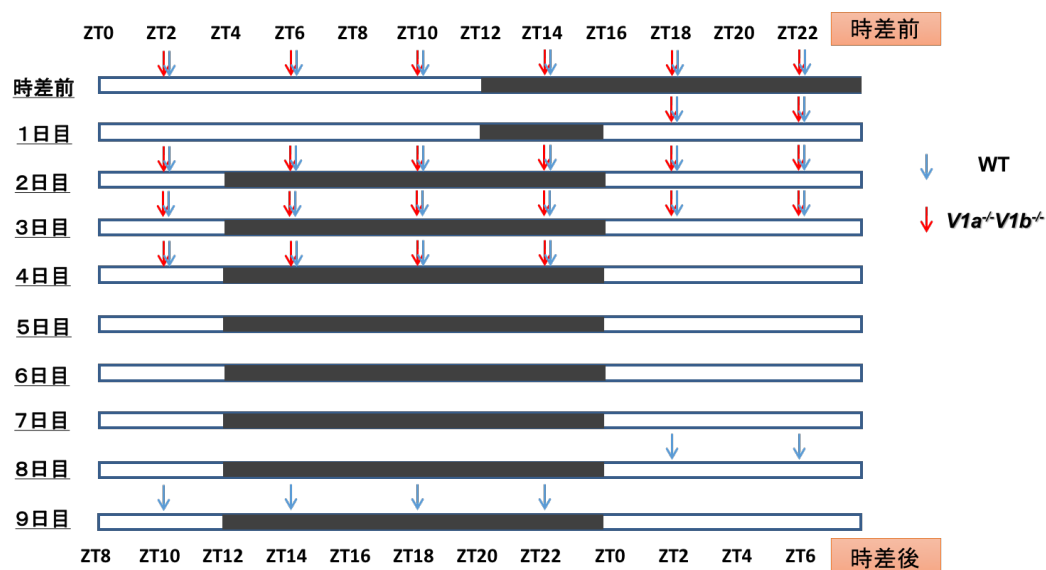


図3 DIG *in situ* ハイブリダイゼーションのサンプルングポイント

白いバーは明期、黒いバーは暗期を示す。青い矢印は WT マウス、赤い矢印は $V1a^{-/-}V1b^{-/-}$ マウスのサンプルングポイント（各日の ZT2、ZT6、ZT10、ZT14、ZT18 および ZT22）を示す。ZT16 において明暗周期を 8 時間前進させ、時差を起こした。上部は時差前、下部は時差後の時間を示す。

1.2 時差環境下の野生型視交叉上核における *Per1* の発現

まず、私は概日リズムの形成にとって重要な時計遺伝子である *Per1* の WT の SCN における発現を DIG *in situ* ハイブリダイゼーションにより検討した。時差を起こす前では、*Per1* は ZT2 で SCN の DM 領域の第三脳室近傍で発現し、

ZT6 では SCN 全体に広がった。その後、*Per1* 発現細胞は減り、暗期である ZT14 から ZT22 ではほとんど発現していなかった。このような *Per1* の発現振動は、時差の開始後から大きく乱れていた。時差後 1 日目の ZT2 は、時差前の ZT18 に相当する時間であるが、SCN の VL 領域で多くの細胞で *Per1* が発現していた。これは、時差前の ZT18 では *Per1* がほぼ発現していないこととは大きく異なる。また、時差後 1 日目の ZT10 から ZT18 において *Per1* が SCN 全体で発現していたが、この時間帯は時差前の ZT2 から ZT10 に相当するものであることから、時差前にあった *Per1* の概日振動がそのまま継続していると考えられる。時差後 2 日目でも、ZT2 において SCN の VL 領域で *Per1* の発現が確認された。また、ZT6 においては、SCN の DM 領域でも *Per1* が発現しており、DM 領域でも *Per1* の発現リズムの再同調が始まっていると考えられる。このことは、2 日目の ZT14、ZT18 における時差前のピークに相当するシグナルが、1 日目より減弱していることでも裏付けられる。続いて、時差後 3 日目では *Per1* の再同調が継続しており、時差後 9 日目に時差前と同等の概日リズムが回復した (図 4)。

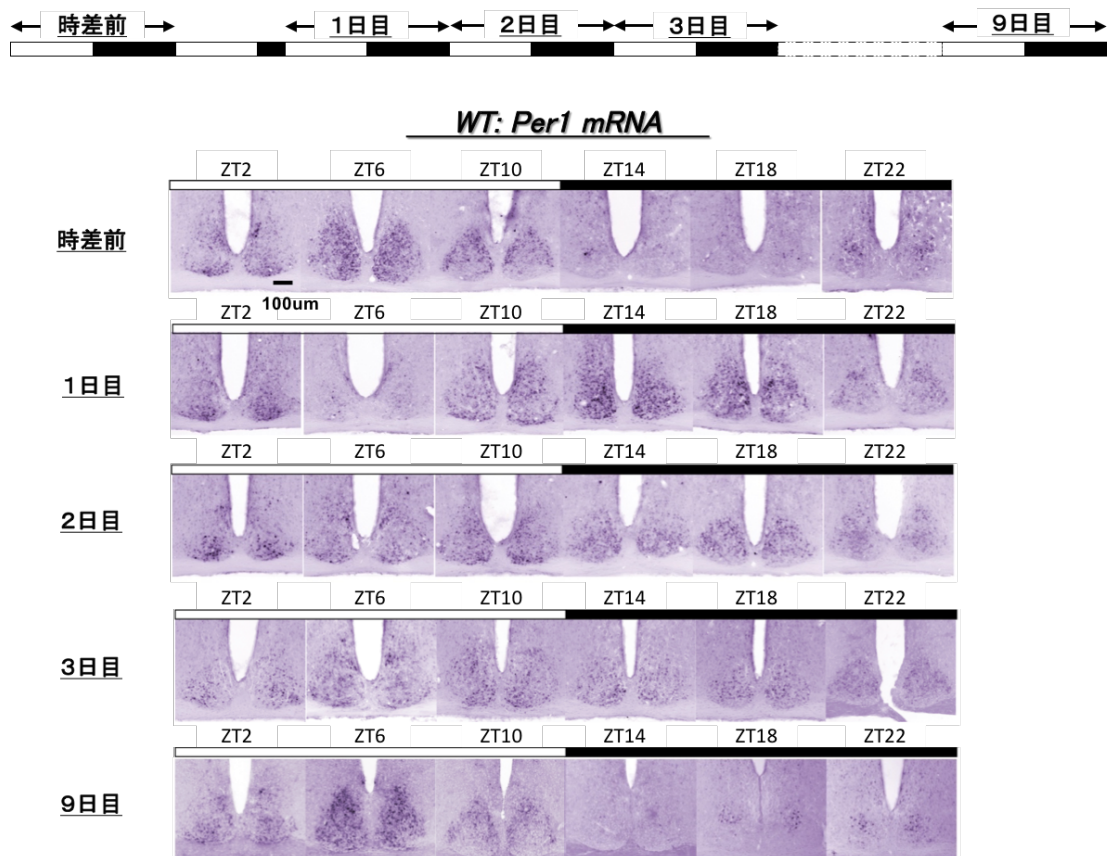


図 4 時差環境下の WT SCN における *Per1* の発現変動プロファイル
 上部の白いバーは明期、黒いバーは暗期を示す。時差後 9 日目までの *Per1* mRNA の発現を DIG *in situ* hybridization 法により解析した。スケールバーは 100 μ m を示す。

1.3 時差環境下の $V1a^{-/-}V1b^{-/-}$ 視交叉上核における $Per1$ の発現

時差前では、 $V1a^{-/-}V1b^{-/-}$ マウスの SCN における $Per1$ の発現は、WT マウスと同様に昼に高く、夜に低い明瞭なリズムを示した。また、時差後 1 日目の ZT2 において SCN の VL 領域で $Per1$ が発現することは WT と同様であるが、ZT10 から ZT22 の広い時間帯において SCN 全体で散在的に $Per1$ が発現することが異なっていた。時差後 2 日目にも、SCN の VL 領域に明瞭な $Per1$ シグナルが認められるが、ZT10-ZT22 のシグナルは時差前と同様に非常に低くなっているのが特徴である。

興味深いことに、 $V1a^{-/-}V1b^{-/-}$ マウスでは、時差後 3 日目には時差前の SCN 全体における $Per1$ の概日振動パターンが完全に回復していた。これは、WT の 9 日目よりも著しく早かった (図 5)。

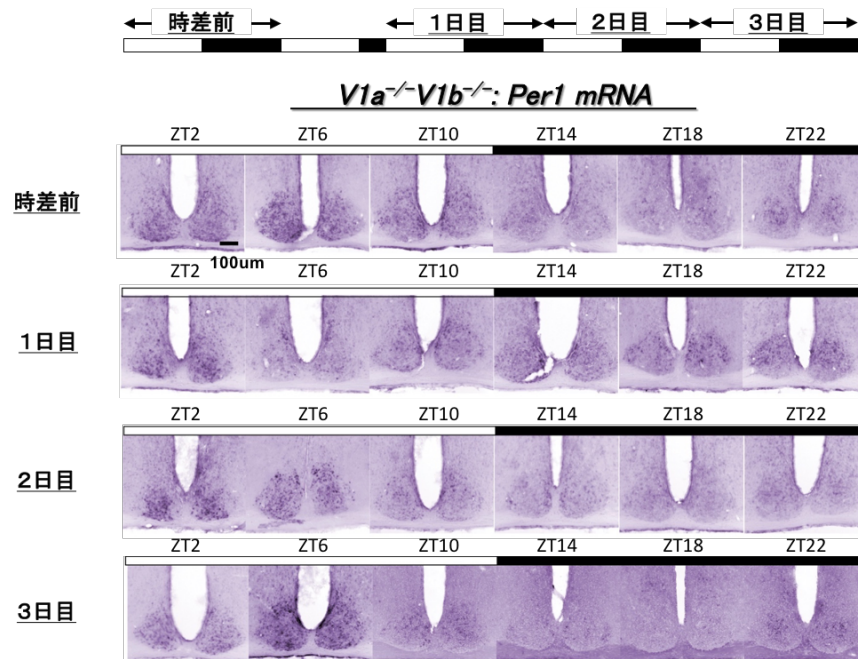


図 5 時差環境下の $V1a^{-/-}V1b^{-/-}$ SCN における $Per1$ の発現変動プロファイル
上部の白いバーは明期、黒いバーは暗期を示す。時差後 3 日目までの $Per1$ mRNA の発現を DIG *in situ* hybridization 法により解析した。スケールバーは 100 µm を示す。

1.4 時差環境下の野生型視交叉上核における Dbp の発現

$Per1$ は、概日時計のコアグループによる概日発現だけでなく、暗期の光パルスによっても急激に発現誘導される (Shigeyoshi *et al.*, 1997)。時差後 1 日目の ZT2 は、暗期に 2 時間の光パルスを受けた状況なので、この VL における $Per1$ の発現は概日リズムによる発現なのか、それとも時差の光環境の変化による発現誘導なのかは区別できない。そこで私は、概日時計のコアグループによって発

現が制御され、光パルスによっては誘導されない *Dbp* (Yan *et al.*, 2000) の時差環境下における発現変動を、DIG *in situ* ハイブリダイゼーションにより検討した。

WT マウスの SCN では、時差を起こす前では *Dbp* は ZT6 をピークとする明瞭な 24 時間リズムを示した。時差後 1 日目の ZT2 において、*Dbp* は *Per1* とは異なり検出されなかった。この *Dbp* 発現の結果は、*Per1* の時差直後の VL 領域での発現は概日振動ではなく、光刺激による誘導であることを示唆する。また、時差後 1 日目の ZT10 から ZT18 において、*Dbp* は *Per1* と同様に SCN 全体で発現していた。この時間帯は時差前の ZT2 から ZT10 に相当するので、時差前にあった *Dbp* の概日振動がそのまま継続していると考えられる。時差後 2 日目では、ZT2 で SCN の VL 領域で *Dbp* の発現が確認された。また、ZT6-ZT10 において、SCN の DM 領域で *Dbp* が発現しており、ZT14-18 のシグナルは減弱傾向にあった。このことは、VL 領域と DM 領域を含む SCN 全体の再同調が進行している結果と考えられる。時差後 3 日目では、*Dbp* の ZT6 のシグナルの増強、ZT10-18 の減弱傾向は続くが、時差前と同様の概日振動パターンが回復するには 9 日を要した (図 6)。

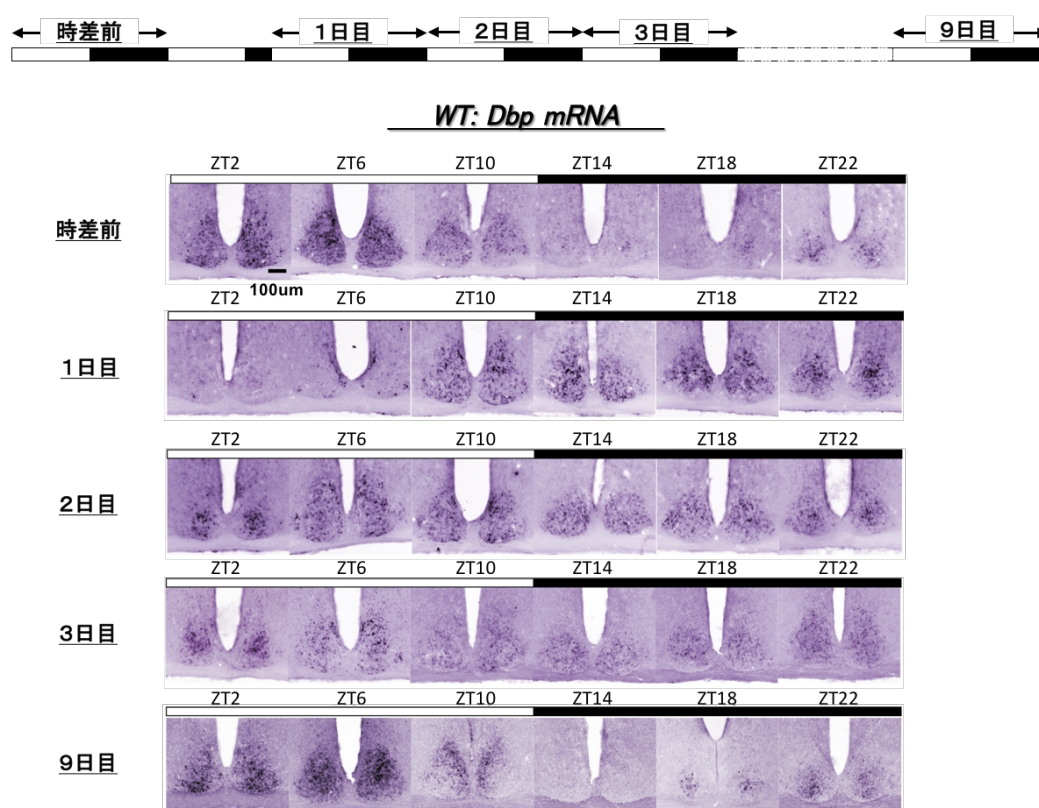


図 6 時差環境下の WT SCN における *Dbp* の発現変動プロファイル
 上部の白いバーは明期、黒いバーは暗期を示す。時差後 9 日目までの *Dbp* mRNA の発現を DIG *in situ* hybridization 法により解析した。スケールバーは 100 μ m を示す。

1.5 時差環境下の $V1a^{-/-}V1b^{-/-}$ 視交叉上核における Dbp の発現

$V1a^{-/-}V1b^{-/-}$ マウスの SCN でも、 Dbp の発現は時差前では WT マウスのものと同様に昼に高く、夜に低い明瞭なリズムを示した。また、WT の SCN と同様に、 $V1a^{-/-}V1b^{-/-}$ の SCN でも、時差後 2 日目の ZT2 の VL 領域で Dbp の発現が確認され、ZT6 では SCN の DM 領域でも Dbp が発現しており、DM 領域でも再同調が始まっていると考えられる。VL 領域も DM 領域も含む SCN 全体での Dbp の発現リズムは、時差後 3 日目に完全に回復した (図 7)。

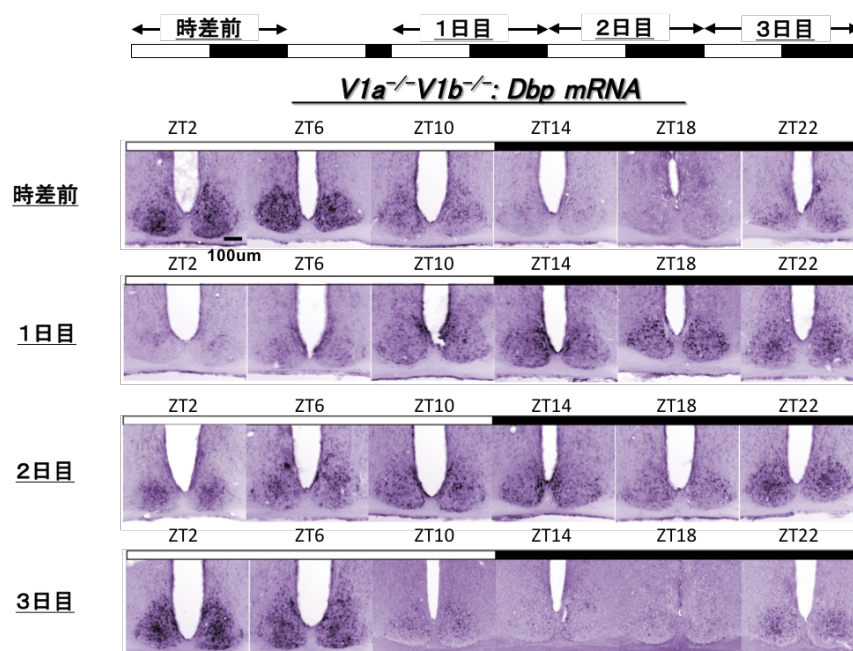


図 7 時差環境下の $V1a^{-/-}V1b^{-/-}$ SCN における Dbp の発現変動プロファイル
上部の白いバーは明期、黒いバーは暗期を示す。時差後 3 日目まで Dbp mRNA の発現を DIG *in situ* hybridization 法により解析した。スケールバーは 100 μ m を示す。

第2章 時差環境下の視交叉上核における c-Fos の発現解析

第1章の結果から、時差環境下において、SCNでの時計遺伝子の発現リズムは、日々、少しずつ新明暗環境に再同調していくことが分かった。したがって、時差後の新たな明暗環境が、SCNに対して日々作用していると考えられる。そこで私は、時差環境下における明暗環境の変化がSCN神経細胞に及ぼす作用について、神経活動のマーカであるc-Fosを用いて検討した。

2.1 時差開始日の視交叉上核における c-Fos の発現

c-Fosは、SCNにおいて30分間の光パルスによって強く誘導されるが(Rusak *et al.*, 1990)、このc-Fos誘導には時刻特異性があり、暗期の光パルスによって誘導されるが、明期の光パルスでは誘導されない(Kornhauser *et al.*, 1990)。さらに、暗期の光パルスは概日行動リズムの位相を変動させるが、その変動量とc-Fosの誘導量には相関があることも示されている(Kornhauser *et al.*, 1990)。そこで私は、時差環境下のWTマウスと*V1a^{-/-}V1b^{-/-}*マウスのSCNにおけるc-Fosの発現変動を免疫組織化学により解析した。

まず、時差後1日目のWTマウスのSCNにおいて、c-Fosがいつ誘導されるのかを調べた。時差前には、SCNのc-Fos陽性細胞はほとんど見られなかったが、時差開始後1時間目であるZT1において、c-FosはVL領域に極めて強く誘導された。その後、c-Fosの発現は徐々に減っていき、ZT10以降ではほとんど見られなくなった(図8A)。また、SCNにおける光応答性のマーカーとして利用されるMAPKのリン酸化も、同様にZT1でVL領域に強い反応が認められた(図8B)。したがって、時差後1時間目が最も顕著な変化を示すことが分かった。

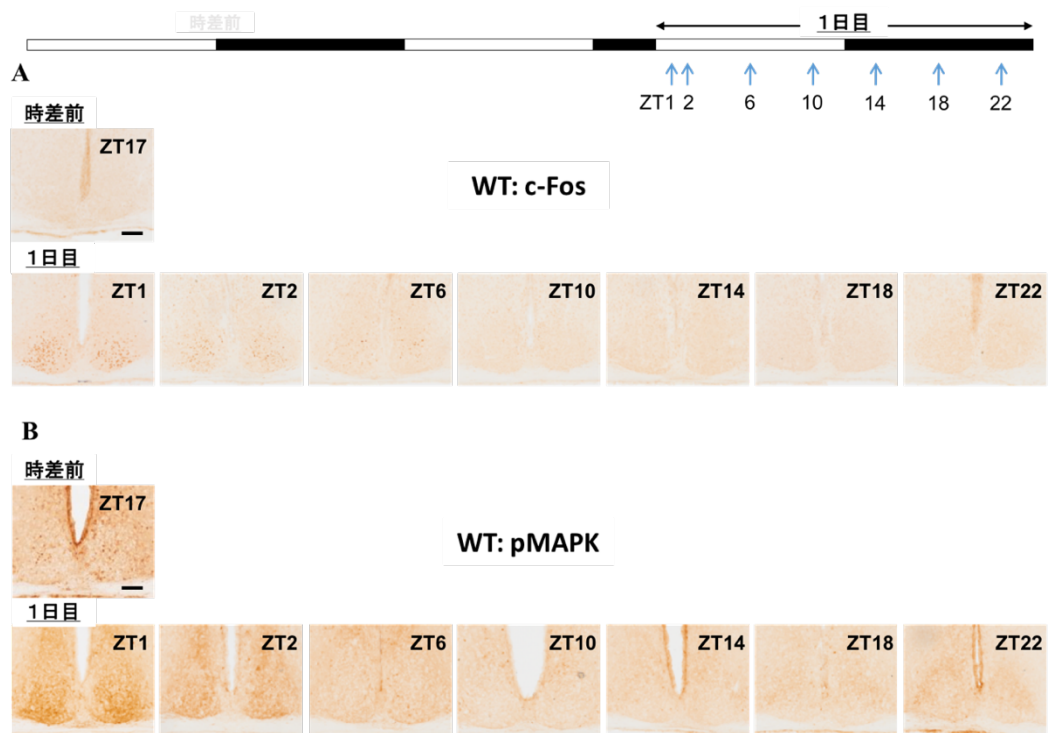


図 8 時差後 1 日目における c-Fos 発現及びリン酸化 MAPK の解析

上部の白いバーは明期、黒いバーは暗期を示す。青い矢印は WT マウスのサンプリングポイントを示す。ZT16 において明暗周期を 8 時間前進させ、時差を起こした。c-Fos (A) およびリン酸化 MAPK の発現 (B) を免疫組織化学により解析した。スケールバーは 100 μm を示す。

2.2 時差環境下の視交叉上核における c-Fos の発現

次に、時差環境下で明期開始後 1 時間目の SCN における c-Fos の発現を免疫組織化学により解析した。WT マウスについては時差後 8 日目まで、 $V1a^{-/-}V1b^{-/-}$ マウスについては時差後 5 日目までの SCN を調べた (図 9)。

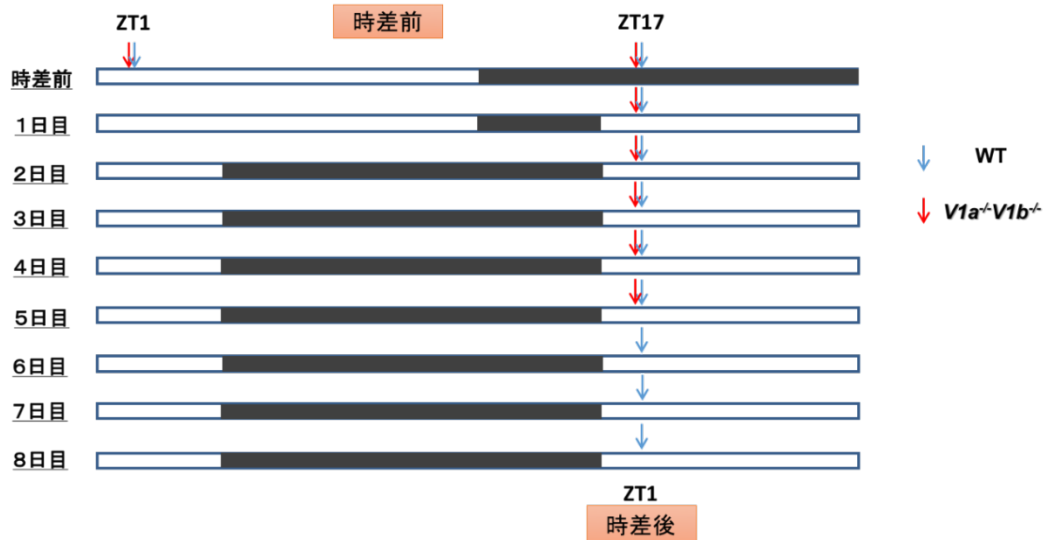


図 9 時差環境下の SCN における c-Fos 発現を検討するサンプリングスケジュール

白いバーは明期、黒いバーは暗期を示す。青い矢印は WT マウス、赤い矢印は $V1a^{-/-}V1b^{-/-}$ マウスのサンプリングポイントを示す。ZT16 において明暗周期を 8 時間前進させ、時差を起こした。上部は時差前、下部は時差後の時間を示す。サンプリングポイントは時差前では ZT1 と ZT17、時差後では ZT1 に行った。WT マウスについては時差後 8 日目まで、 $V1a^{-/-}V1b^{-/-}$ マウスについては時差後 5 日目までを調べた。

WT の SCN において、時差前では明期の ZT1 でも暗期の ZT17 でも、c-Fos 発現細胞はほとんど見られなかった。ところが、時差後 1 日目の明期開始 1 時間後では、SCN の VL 領域の全域に多数の c-Fos 陽性細胞が確認された。時差後 2 日目では、1 日目と比べると細胞数は減少したが、VL 領域のうち視交叉直上の腹側底部に多くの c-Fos 陽性細胞が確認された。その後、c-Fos 陽性細胞は時差後 3 日目から 4 日目にかけて次第に減っていき、時差後 5 日目以降ではほとんど見られなくなった (図 10)。

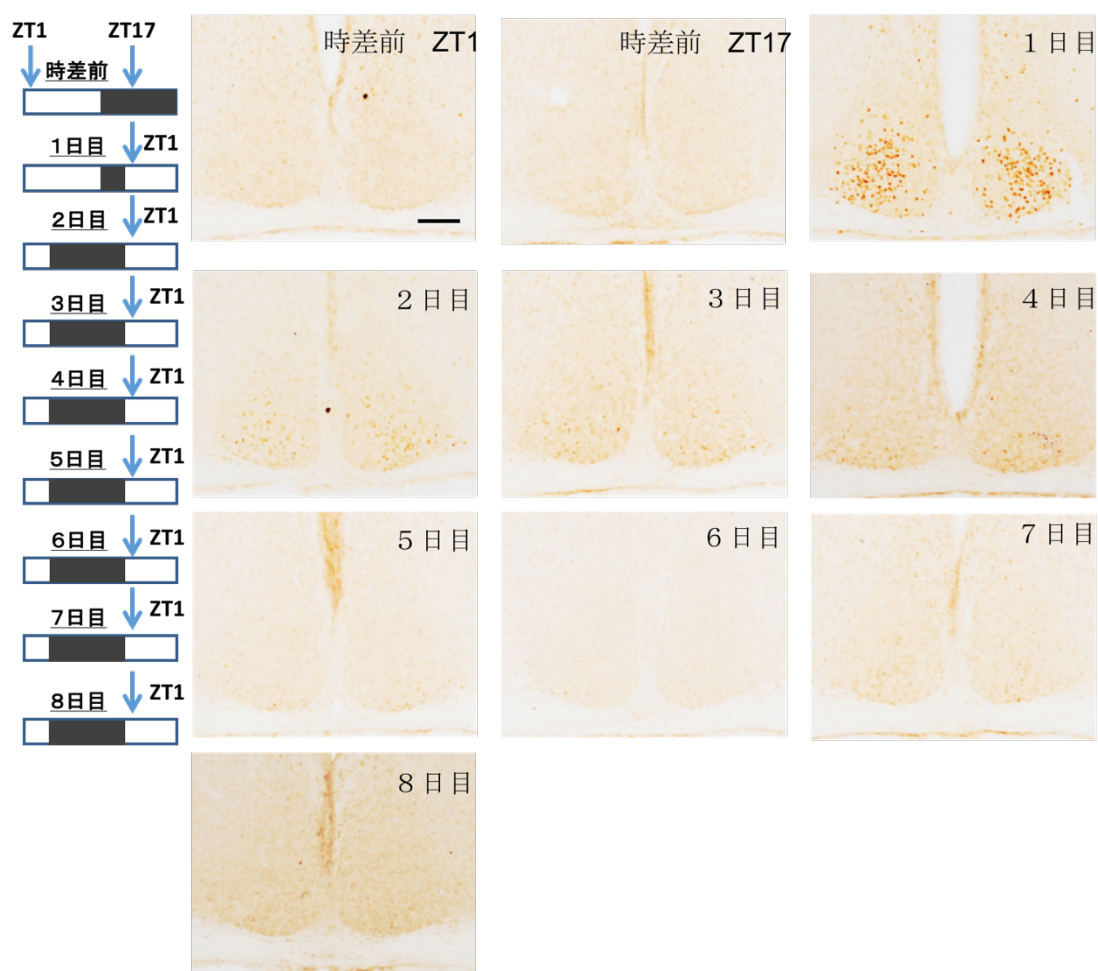


図 10 時差環境下の WT SCN における c-Fos 発現

左図において白いバーは明期、黒いバーは暗期を示す。青い矢印は WT マウスのサンプリングポイントを示す。右に時差後 8 日目までの c-Fos の発現を示す。ZT16 において明暗周期を 8 時間前進させ、時差を起こした。スケールバーは 100 μm を示す。

また、 Vla^{-}/Vlb^{-} の SCN においても、WT マウスのものと同様に、c-Fos 発現細胞は時差前では明期の ZT1 でも暗期の ZT17 でも、ほとんど見られなかった。さらに、時差後 1 日目の ZT1 でも WT マウスと同様に、VL 領域の多く細胞で c-Fos が強く誘導されていた。しかし時差後 2 日目以降では、 Vla^{-}/Vlb^{-} の SCN では、c-Fos 発現細胞は WT マウスと異なりほとんど見られなくなった (図 11)。

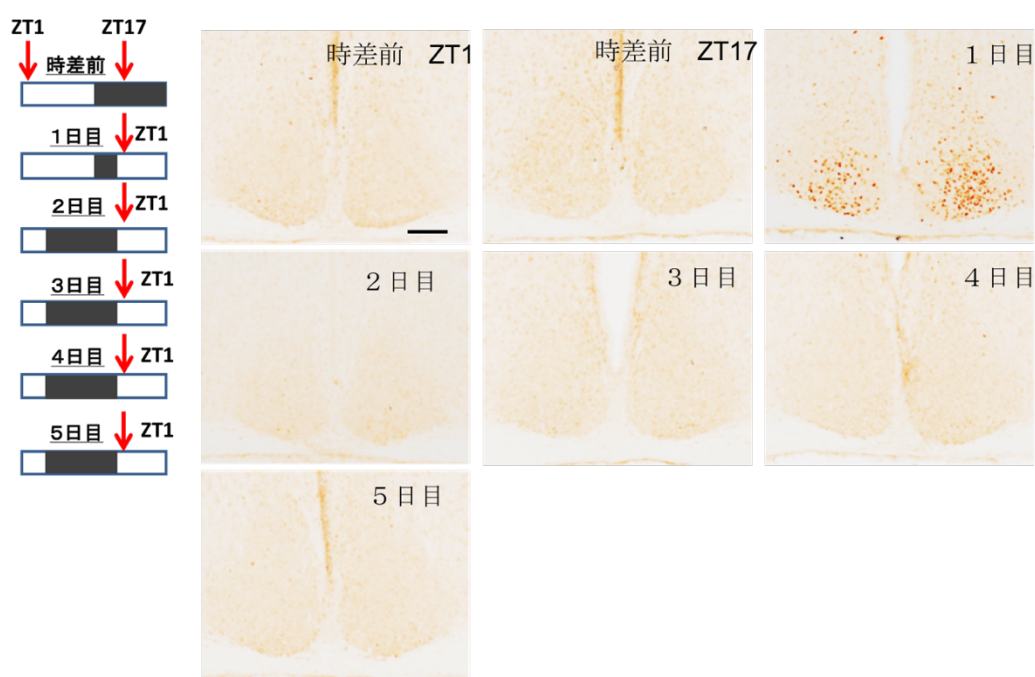


図 11 時差環境下の Vla^{-}/Vlb^{-} SCN における c-Fos 発現

左図において白いバーは明期、黒いバーは暗期を示す。赤い矢印は Vla^{-}/Vlb^{-} マウスのサンプリングポイントを示す。右に時差後 5 日目までの c-Fos の発現を示す。ZT16 において明暗周期を 8 時間前進させ、時差を起こした。スケールバーは 100 μm を示す。

2.3 Two-way ANOVA による統計解析

時差前の ZT1 と ZT17 における SCN あたりの c-Fos 陽性細胞数は、WT マウスと $V1a^{-/-}V1b^{-/-}$ マウスの SCN のどちらにおいても非常に少なく、遺伝子型あるいは時間による有意な差はなかった。しかし、時差後 1 日目では、WT マウスと $V1a^{-/-}V1b^{-/-}$ マウスの SCN のどちらにおいても、500-600 個程度と非常に多くの細胞において c-Fos の発現が確認された。その後、WT の SCN においては、時差後 2 日目では約 180 個、時差後 3 日目では約 130 個と次第に減ってはいたが、時差前と比べると、有意に多くの細胞で c-Fos の発現が確認された。しかし、 $V1a^{-/-}V1b^{-/-}$ の SCN の c-Fos 陽性細胞数は、時差後 2 日目以降から急激に低下した。また、Two-way ANOVA による統計解析を行ったところ、WT マウスの SCN の c-Fos 発現細胞数は、時差後 2 日目および 3 日目において、 $V1a^{-/-}V1b^{-/-}$ マウスの SCN よりも有意に多いことがわかった (図 13)。

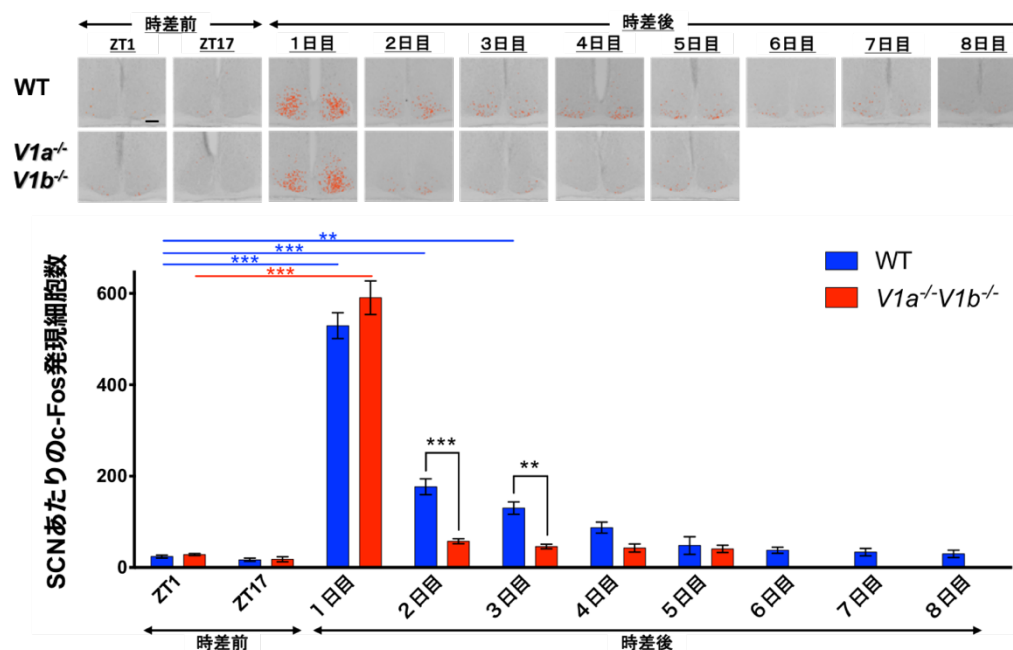


図 13 時差環境下における c-Fos 陽性細胞数の変動

上部の写真の赤い細胞は、時差環境下の各日における代表的な c-Fos 陽性細胞を示す。下部のグラフにおいて、青色は WT マウスの、赤色は $V1a^{-/-}V1b^{-/-}$ マウスの c-Fos 陽性細胞数を示す。データは平均±標準誤差で示す。統計解析は、Two-way ANOVA を用いて行い、post-hoc テストは Bonferroni 法により行った (**: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$)。スケールバーは 100 μm を示す。

考察

私たちはこれまでの研究で、時差環境下の SCN における時計遺伝子の発現変動をリアルタイム PCR により定量することによって、SCN の特徴である頑強なリズム性が時差直後に消失することを見出していた (Yamaguchi *et al.*, 2013)。そこで、私は第一章において、digoxigenin を用いた *in situ* ハイブリダイゼーションによって、時差環境下の SCN における時計遺伝子の発現変動を細胞レベルで検討した。時差後 1 日目では、明期開始 2 時間目の ZT2 において、SCN の VL 領域で *Per1* が発現していたが、*Per1* とは異なり光によって誘導されない *Dbp* (Yan *et al.*, 2000) は発現しなかった。したがって、時差後 1 日目の ZT2 における *Per1* の発現は、概日時計のコアループによる E-box を介する発現ではなく、CRE 配列を介する転写誘導であると考えられる。しかし、時差後 2 日目の ZT2 では、SCN の VL 領域で *Per1* だけでなく *Dbp* も発現していたことから、SCN の VL 領域の少なくとも一部の細胞では、時差後 2 日目から概日時計のコアループによる時計遺伝子の発現位相が、新明暗環境のリズムへと再同調を開始していると考えられる。また、SCN の DM 領域でも、時差後 2 日目の ZT6 では *Per1* と *Dbp* が発現しており、時計遺伝子の概日リズムが再同調を開始していると考えられる。このように、時差直後の SCN では、VL 領域でも DM 領域でも、全ての細胞が一斉に再同調するのではなく、各細胞が独自のスピードでゆっくりと再同調していくために、SCN 全体としては明確な概日リズムが消失したように見えると考えられる。その後、*Per1* と *Dbp* の発現リズムは *Vla^{-/-}Vlb^{-/-}* の SCN では時差後 3 日目で回復したのに対して、WT の SCN では時差後 3 日目では依然として乱れており、時差後 9 日目になって回復した。このことは、リアルタイム PCR を用いて得られた以前の結果と一致している。

第一章の結果から、時差環境下の WT の SCN では、時計遺伝子の発現リズムが日々少しずつ再同調していくと考えられる。時差環境下では時差前では暗期であった時間帯が明期に急変するが、哺乳類では光刺激が最も強力な同調因子であるので、この光刺激が日々 SCN に作用しているのかもしれない。そこで私は第二章において、神経活動マーカーである c-Fos の免疫組織化学染色を行うことによって、時差環境下での SCN 細胞の光応答性について検討した。SCN の c-Fos 陽性細胞数を計測したところ、WT および *Vla^{-/-}Vlb^{-/-}* 両方の SCN において、時差後 1 日目には、時差前と比較して極めて多くの c-Fos 陽性細胞が確認された。その後、WT の SCN の c-Fos 陽性細胞数は、時差後 2 日目、3 日目と次第に減少するが、c-Fos は時差前より有意に多くの細胞で誘導されていた。

一方、*Vla^{-/-}Vlb^{-/-}*の SCN の c-Fos 陽性細胞数は時差後 2 日目、3 日目にかけて急激に減少し、WT の SCN と比較して有意に少なくなった。c-Fos の誘導量と概日行動リズムの位相変動量には相関があるので (Kornhauser *et al.*, 1990)、WT マウスでは時差後少なくとも 3 日目までの間に新明暗環境での光を浴びることが、概日行動リズムの再同調に日々寄与していると考えられる。したがって、私たちも海外渡航の際には、現地で毎日早朝の光を浴びると時差症状を早期に解消できるのかもしれない。また、c-Fos の誘導は主観的暗期にのみ起こるが、特にそれは網膜から神経投射が直接入力する SCN の VL 領域に限局される (Rusak *et al.*, 1990; Kornhauser *et al.*, 1990)。したがって、WT の SCN の VL 領域は、時差後 3 日目ではまだ新明暗周期に再同調しておらず、時差後 4 日目以降に再同調すると考えられる。一方、*Vla^{-/-}Vlb^{-/-}*の SCN の VL 領域は、時差後 2 日目には再同調していると考えられる。

光情報は網膜で神経活動に変換される。概日リズムの同調に最も関係するのは、オプシンのうち青色に感受域のあるメラノプシンを含有する内因性光感受性網膜神経節細胞 (intrinsically photosensitive retinal ganglion cells: ipGRC) と言われる特殊な神経節細胞である (Provencio *et al.*, 2000; Berson *et al.*, 2002)。このメラノプシン発現神経節細胞は、SCN に投射しており (Hattar *et al.*, 2002)、グルタミン酸作動性と考えられている。すなわち、この神経終末より放出されるグルタミン酸が SCN の VL 細胞に発現するグルタミン酸受容体に作用するとされている。光刺激を受けると、SCN の VL 領域に存在する時計細胞では、NMDA 型グルタミン酸受容体および AMPA 型グルタミン酸受容体を介して Ca イオンなどのカチオンが細胞内に流入し、さまざまな細胞内シグナル伝達系が活性化され、神経細胞は脱分極し神経活動は亢進する。細胞内 Ca イオン濃度上昇はカルシウムカルモジュリン依存性タンパク質キナーゼの活性化や CREB のリン酸化を起し、これが時計遺伝子の転写翻訳のフィードバックループに作用し、リズム位相が変位すると考えられている。

時計遺伝子 *Per1* に関しては、光照射による転写誘導現象が知られている (Shigeyoshi *et al.*, 1997)、これはプロモーターの CRE 配列を介すると言われている (Travnickova-Bendova *et al.*, 2002)。本時差実験において、時差 1 日目では明期開始直後に *Per1* の誘導が認められたが、これは、短時間の光照射による *Per1* 転写誘導現象と同じと考えられる。ただ、*Per1* の誘導だけで無く、時計遺伝子のコアループの概日振動の位相も同時に変動しはじめる。

第一章と第二章の結果から、時差環境下において SCN が如何に光に応答して再同調するのかに関して、私は以下のモデルを想定している (図 14)。時差後 1 日目においては、時差前にもともと暗期であった時間帯に時差による光刺激が VL 領域に入力する。第 1 日目は、光照射に時計遺伝子が誘導され、時計遺

伝子コアループの発振が一時停止する。その再開は、時差後 2 日目より、コアループの転写活性化因子である CLOCK と BMAL1 による E-box を介する *Per1* や *Dbp* の概日発現が徐々に開始されると考えられる。

しかし、時差後 3 日目までに多くの細胞で *c-Fos* が誘導されたことから、VL 領域の細胞は時差後 3 日目では完全に再同調しておらず、時差後 4-5 日目程度で再同調すると考えられる。また、網膜から光刺激が直接入力しない DM 領域では、VL 領域の細胞からの神経入力によって新明暗周期の位相が伝達されると考えられるが、第一章の結果から、時計遺伝子は DM 領域でも時差後 2 日目から新明暗周期へと徐々に再同調していき、時差後 8-9 日目で再同調が完了すると考えられる (図 14A)。また、*Vla^{-/-}Vlb^{-/-}* の SCN でも時差後 1 日目に VL 領域で *Per1* の転写が誘導されて時計遺伝子の概日発現が再同調を開始するが、時差後 2 日目で *c-Fos* の誘導はすでに見られなかった。このことは、時差後 2 日目で VL 領域の細胞の位相変動はすでに完了しており、新明暗環境のリズムに再同調していると考えられる。また、DM 領域でも、*Per1* や *Dbp* の発現から見ると、時差後 1 日目から再同調が始まっており、2 日目には同等すすんでおり、時差後 3 日目で完了するものと考えられる (図 14B)。

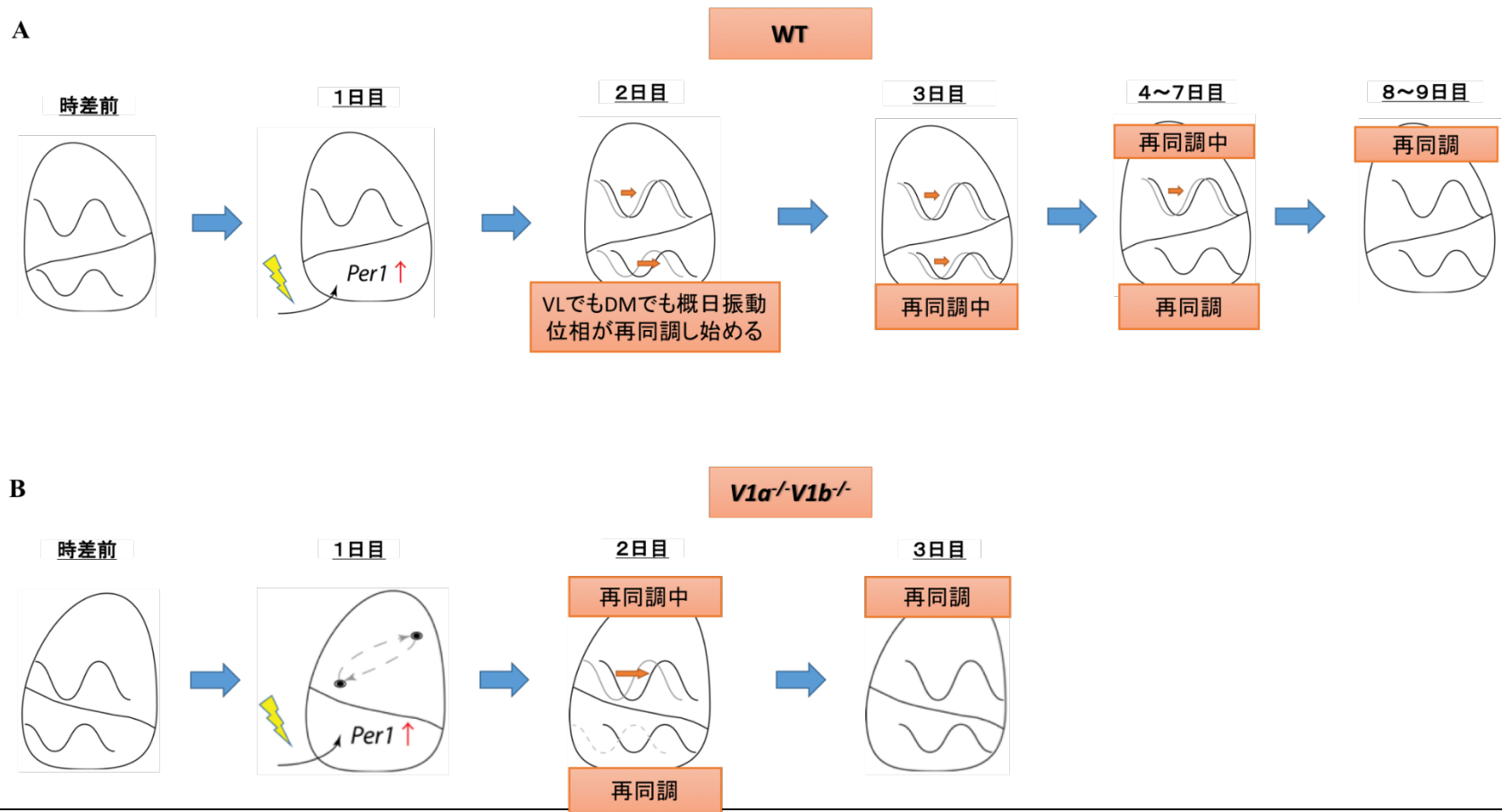


図 14 時差環境下における SCN の DM 領域と VL 領域の再同調モデル
 上部は WT (A)、下部は $V1\alpha^{-/-}V1b^{-/-}$ (B) の SCN におけるモデル

ところで、SCNにおいて、AVPおよびV1a受容体はDM領域で発現している。したがって、 $V1a^{-/-}V1b^{-/-}$ マウスのSCNではDM領域の細胞間の神経結合が減弱しており、外乱に対する抵抗性が弱まることによって時差環境下における再同調が早まると考えられる (Yamaguchi *et al.*, 2013)。ところが、興味深いことに、c-Fosの反応から判断すると、 $V1a^{-/-}V1b^{-/-}$ マウスのSCNのVL領域での応答は正常と考えられるが、WTのVL領域は時差後4~5日程度で新明暗環境に再同調するのに対して、 $V1a^{-/-}V1b^{-/-}$ マウスのVL領域は時差後2日目と早くから再同調した。このことは、SCNにおいてAVP神経ネットワークが形成するDM領域からVL領域への制御機構が存在することを強く示唆する。しかし、DM領域のAVPニューロンは、VL領域には投射していない。したがって、神経投射としては、SCNのDM領域に存在するソマトスタチン細胞を介してVL領域の細胞に作用する可能性がある (Van den Pol *et al.*, 1985; Card *et al.*, 1988; Maegawa *et al.*, 1987)。また、DM領域の細胞からVL領域の細胞への液性分子によるパラクライン制御機構が存在する可能性も十分に考えられる (Maywood *et al.*, 2011)。これまでに、DM領域からVL領域への制御機構による生理機能に関しては、私の知る限り何も報告されておらず、今後の研究によるシグナル解明が待たれる。

現代は24時間社会と言われているが、これはシフトワーカーがあつてこそ成立している。しかし、シフトワークが癌や生活習慣病のリスクファクターであることが疫学研究によって報告されているが、有効な手立ては確立されていない。本研究で得た知見が、時差の分子神経メカニズムの解明のみならず、シフトワーカーの病態に対する創薬にも貢献できればと期待している。

引用文献

- An, S., Tsai, C., Ronecker, J., Bayly, A., & Herzog, E. D. (2012). Spatiotemporal distribution of vasoactive intestinal polypeptide receptor 2 in mouse suprachiasmatic nucleus. *The Journal of Comparative Neurology*, 520(12), 2730–41.
- Berson, D. M., Dunn, F. A., & Takao, M. (2002). Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science (New York, N.Y.)*, 295(5557), 1070–3.
- Buijs, R. M., & Kalsbeek, A. (2001). Hypothalamic integration of central and peripheral clocks. *Nature Reviews. Neuroscience*, 2(7), 521–6.
- Buxton, O. M., Cain, S. W., O'Connor, S. P., Porter, J. H., Duffy, J. F., Wang, W., ... Shea, S. A. (2012). Adverse Metabolic Consequences in Humans of Prolonged Sleep Restriction Combined with Circadian Disruption. *Science Translational Medicine*, 4(129), 129ra43–129ra43.
- Card, J. P., Fitzpatrick-McElligott, S., Gozes, I., & Baldino, F. (1988). Localization of vasopressin-, vasoactive intestinal polypeptide-, peptide histidine isoleucine- and somatostatin-mRNA in rat suprachiasmatic nucleus. *Cell and Tissue Research*, 252(2), 307–15.
- Comperatore, C. A., & Krueger, G. P. (1990). Circadian rhythm desynchronization, jet lag, shift lag, and coping strategies. *Occupational Medicine (Philadelphia, Pa.)*, 5(2), 323–41.
- Delaunay, F., & Laudet, V. (2002). Circadian clock and microarrays: Mammalian genome gets rhythm. *Trends in Genetics*, 18(12), 595–597.
- Doi, M., Ishida, A., Miyake, A., Sato, M., Komatsu, R., Yamazaki, F., ... Okamura, H. (2011). Circadian regulation of intracellular G-protein signalling mediates intercellular synchrony and rhythmicity in the suprachiasmatic nucleus. *Nature Communications*, 2(May), 327.

- Dunlap, J. C. (1999). Molecular bases for circadian clocks. *Cell*, 96(2), 271–290.
- Hastings, M. H. (1997). Circadian clocks. *Current Biology : CB*, 7(11), R670–R672.
- Hastings, M. H., Reddy, A. B., & Maywood, E. S. (2003). A clockwork web: circadian timing in brain and periphery, in health and disease. *Nature Reviews. Neuroscience*, 4(8), 649–661.
- Hattar, S., Liao, H. W., Takao, M., Berson, D. M., & Yau, K. W. (2002). Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science (New York, N.Y.)*, 295(5557), 1065–70.
- Ibata, Y., Takahashi, Y., Okamura, H., Kawakami, F., Terubayashi, H., Kubo, T., & Yanaihara, N. (1989). Vasoactive intestinal peptide (VIP)-like immunoreactive neurons located in the rat suprachiasmatic nucleus receive a direct retinal projection. *Neuroscience Letters*, 97(1-2), 1–5.
- Ibata, Y., Tanaka, M., Tamada, Y., Hayashi, S., Kawakami, F., Takamatsu, T., ... Okamura, H. (1997). REVIEW: The Suprachiasmatic Nucleus: A Circadian Oscillator. *The Neuroscientist*, 3(4), 215–225.
- Inouye, S. T., & Kawamura, H. (1979). Persistence of circadian rhythmicity in a mammalian hypothalamic “island” containing the suprachiasmatic nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(11), 5962–6.
- Johnson, C. H., Stewart, P. L., & Egli, M. (2011). The cyanobacterial circadian system: from biophysics to bioevolution. *Annual Review of Biophysics*, 40(1), 143–167.
- Kiessling, S., Eichele, G., & Oster, H. (2010). Adrenal glucocorticoids have a key role in circadian resynchronization in a mouse model of jet lag. *Journal of Clinical Investigation*, 120(7), 2600–2609.
- Klein, D. C., Moore, R. Y., & Reppert, S. M. (1991). *Suprachiasmatic Nucleus: The Mind's Clock*. (D. C. Klein, R. Y. Moore, & S. M. Reppert, Eds.). New York: Oxford University Press.

- Ko, C. H., & Takahashi, J. S. (2006). Molecular components of the mammalian circadian clock. *Human Molecular Genetics*, 15(SUPPL. 2), 271–277.
- Kojo, K., Pukkala, E., & Auvinen, A. (2005). Breast cancer risk among Finnish cabin attendants: a nested case-control study. *Occupational and Environmental Medicine*, 62(7), 488–93.
- Kornhauser, J. M., Nelson, D. E., Mayo, K. E., & Takahashi, J. S. (1990). Photic and circadian regulation of c-fos gene expression in the hamster suprachiasmatic nucleus. *Neuron*, 5(2), 127–134.
- Lowrey, P. L., & Takahashi, J. S. (2004). Mammalian circadian biology: elucidating genome-wide levels of temporal organization. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 5(47), 407–441.
- Maegawa, M., Hisano, S., Tsuruo, Y., Katoh, S., Nakanishi, J., Chikamori-Aoyama, M., & Daikoku, S. (1987). Differential immunolabeling for electron microscopy of diverse peptidergic neurons. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 35(2), 251–255.
- Maywood, E. S., Chesham, J. E., O'Brien, J. a., & Hastings, M. H. (2011). A diversity of paracrine signals sustains molecular circadian cycling in suprachiasmatic nucleus circuits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(34), 14306–14311.
- McDearmon, E. L., Patel, K. N., Ko, C. H., Walisser, J. a, Schook, A. C., Chong, J. L., ... Takahashi, J. S. (2006). Dissecting the functions of the mammalian clock protein BMAL1 by tissue-specific rescue in mice. *Science (New York, N.Y.)*, 314(5803), 1304–8.
- Moore, R. Y. (1997). Circadian rhythms: basic neurobiology and clinical applications. *Annual Review of Medicine*, 48, 253–266.
- Moore, R. Y., & Eichler, V. B. (1972). Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Research*, 42(1), 201–206.

- Moore, R. Y., & Lenn, N. J. (1972). A retinohypothalamic projection in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, *146*(1), 1–14.
- Moore, R. Y., Speh, J. C., & Leak, R. K. (2002). Suprachiasmatic nucleus organization. *Cell and Tissue Research*, *309*(1), 89–98.
- Nagoshi, E., Saini, C., Bauer, C., Laroche, T., Naef, F., & Schibler, U. (2004). Circadian gene expression in individual fibroblasts: cell-autonomous and self-sustained oscillators pass time to daughter cells. *Cell*, *119*(5), 693–705.
- Okamura, H. (2004). Clock genes in cell clocks: roles, actions, and mysteries. *Journal of Biological Rhythms*, *19*(5), 388–399.
- Pačesová, D., Volfová, B., Červená, K., Hejnová, L., Novotný, J., & Bendová, Z. (2015). Acute morphine affects the rat circadian clock via rhythms of phosphorylated ERK1/2 and GSK3 β kinases and Per1 expression in the rat suprachiasmatic nucleus. *British Journal of Pharmacology*, *172*(14), 3638–3649.
- Pan, A., Schernhammer, E. S., Sun, Q., & Hu, F. B. (2011). Rotating night shift work and risk of type 2 diabetes: two prospective cohort studies in women. *PLoS Med*, *8*(12), e1001141.
- Panda, S., Antoch, M. P., Miller, B. H., Su, A. I., Schook, A. B., Straume, M., ... Hogenesch, J. B. (2002). Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. *Cell*, *109*(3), 307–320.
- Provencio, I., Rodriguez, I. R., Jiang, G., Hayes, W. P., Moreira, E. F., & Rollag, M. D. (2000). A novel human opsin in the inner retina. *The Journal of Neuroscience*, *20*(2), 600–5.
- Ralph, M. R., Foster, R. G., Davis, F. C., & Menaker, M. (1990). Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science (New York, N.Y.)*, *247*(4945), 975–978.
- Reddy, A. B., Field, M. D., Maywood, E. S., & Hastings, M. H. (2002). Differential resynchronisation of circadian clock gene expression within the suprachiasmatic nuclei of mice subjected to experimental jet lag. *The Journal of Neuroscience*, *22*(17), 7326–7330.

- Reppert, S. M., & Weaver, D. R. (2001). Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Annual Review of Physiology*, 63(1), 647–76.
- Reppert, S. M., & Weaver, D. R. (2002). Coordination of circadian timing in mammals. *Nature*, 418(6901), 935–41.
- Rey, G., & Reddy, A. B. (2013). Connecting cellular metabolism to circadian clocks. *Trends in Cell Biology*, 23(5), 234–241.
- Romanowski, A., & Yanovsky, M. J. (2015). Circadian rhythms and post-transcriptional regulation in higher plants. *Frontiers in Plant Science*, 6(June), 437.
- Rusak, B., Robertson, H. A., Wisden, W., & Hunt, S. P. (1990). Light pulses that shift rhythms induce gene expression in the suprachiasmatic nucleus. *Science (New York, N.Y.)*, 248(4960), 1237–1240.
- Sack, R. L. (2009). The pathophysiology of jet lag. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 7, 102–110.
- Scheer, F. A. J. L., Hilton, M. F., Mantzoros, C. S., & Shea, S. A. (2009). Adverse metabolic and cardiovascular consequences of circadian misalignment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(11), 4453–4458.
- Shigeyoshi, Y., Taguchi, K., Yamamoto, S., Takekida, S., Yan, L., Tei, H., ... Okamura, H. (1997). Light-Induced Resetting of a Mammalian Circadian Clock Is Associated with Rapid Induction of the mPer1 Transcript. *Cell*, 91(7), 1043–1053.
- Silver, R., LeSauter, J., Tresco, P., & Lehman, M. (1996). A diffusible coupling signal from the transplanted suprachiasmatic nucleus controlling circadian locomotor rhythms. *Nature*, 382(6594), 810–3.
- Stephan, F. K., & Zucker, I. (1972). Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 69(6), 1583–1586.

- Storch, K., Lipan, O., Leykin, I., Viswanathan, N., Davis, F. C., Wong, W. H., & Weitz, C. J. (2002). Extensive and divergent circadian gene expression in liver and heart. *Nature*, *417*(6884), 78–83.
- Sujino, M., Masumoto, K., Yamaguchi, S., van der Horst, G. T. J., Okamura, H., & Inouye, S.-I. T. (2003). Suprachiasmatic nucleus grafts restore circadian behavioral rhythms of genetically arrhythmic mice. *Curr Biol*, *13*(8), 664–668.
- Terazono, H., Mutoh, T., Yamaguchi, S., Kobayashi, M., Akiyama, M., Udo, R., ... Shibata, S. (2003). Adrenergic regulation of clock gene expression in mouse liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(11), 6795–6800.
- Thaiss, C. A., Zeevi, D., Levy, M., Zilberman-Schapira, G., Suez, J., Tengeler, A. C., ... Elinav, E. (2014). Transkingdom Control of Microbiota Diurnal Oscillations Promotes Metabolic Homeostasis. *Cell*, *159*(3), 514–529.
- Travnickova-Bendova, Z., Cermakian, N., Reppert, S. M., & Sassone-Corsi, P. (2002). Bimodal regulation of mPeriod promoters by CREB-dependent signaling and CLOCK/BMAL1 activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(11), 7728–33.
- Ueda, H. R., Chen, W., Adachi, A., Wakamatsu, H., Hayashi, S., Takasugi, T., ... Hashimoto, S. (2002). A transcription factor response element for gene expression during circadian night. *Nature*, *418*(6897), 534–9.
- Vaccari, C., Lolait, S. J., & Ostrowski, N. L. (1998). Comparative distribution of vasopressin V1b and oxytocin receptor messenger ribonucleic acids in brain. *Endocrinology*, *139*(12), 5015–33.
- van den Pol, A. N., & Tsujimoto, K. L. (1985). Neurotransmitters of the hypothalamic suprachiasmatic nucleus: immunocytochemical analysis of 25 neuronal antigens. *Neuroscience*, *15*(4), 1049–86.
- Vargis, E., Peterson, C. B., Morrell-Falvey, J. L., Retterer, S. T., & Collier, C. P. (2014). The effect of retinal pigment epithelial cell patch size on growth factor expression. *Biomaterials*, *35*(13), 3999–4004.

- Waterhouse, J. (1999). Jet-lag and shift work: (1). Circadian rhythms. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 92(8), 398–401.
- Weitzman, E. D., Fukushima, D., Nogeire, C., Roffwarg, H., Gallagher, T. F., & Hellman, L. (1971). Twenty-four hour pattern of the episodic secretion of cortisol in normal subjects. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 33(1), 14–22.
- Yamaguchi, S., Isejima, H., Matsuo, T., Okura, R., Yagita, K., Kobayashi, M., & Okamura, H. (2003). Synchronization of cellular clocks in the suprachiasmatic nucleus. *Science (New York, N.Y.)*, 302(5649), 1408–12.
- Yamaguchi, Y., Suzuki, T., Mizoro, Y., Kori, H., Okada, K., Chen, Y., ... Okamura, H. (2013). Mice genetically deficient in vasopressin V1a and V1b receptors are resistant to jet lag. *Science (New York, N.Y.)*, 342(6154), 85–90.
- Yamazaki, S., Numano, R., Abe, M., Hida, A., Takahashi, R., Ueda, M., ... Tei, H. (2000). Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science (New York, N.Y.)*, 288(5466), 682–685.
- Yan, L., Miyake, S., & Okamura, H. (2000). Distribution and circadian expression of dbp in SCN and extra-SCN areas in the mouse brain. *J Neurosci Res*, 59(2), 291–295.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、長年に熱心なご指導を賜り、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教授の岡村均先生に心より感謝申し上げます。

論文全般に関して細部にわたり終始懇切丁寧なご指導を、ご助言を賜りました京都大学薬学研究科助教の山口賀章先生に心より感謝申し上げます。

京都大学大学院薬学研究科准教授の土居雅夫先生を始め、6年間在籍したシステムバイオロジー分野の皆様にご助言やご激励を賜り、心より御礼申し上げます。システムバイオロジー分野がこれからもますますのご発展、ご躍進されることを心よりお祈り申し上げます。

最後に、常に私を温かく見守り、今まで支え続けていただいた家族に深く感謝申し上げます。

2016年3月
陳 宇林