

学位論文題名

Clock genes outside the suprachiasmatic nucleus involved  
in manifestation of locomotor activity rhythm in rats

(ラット行動リズムの発現に関与する視交叉上核外時計関連遺伝子)

学位論文内容の要旨

【背景・目的】視交叉上核 (SCN) は哺乳類に於いて明暗サイクルに同調する概日リズムを駆動している。一方、ラットに Methamphetamine (MAP) を飲水中に混ぜて慢性投与すると、行動リズムが明暗サイクルから脱同調し、24 時間より長い周期でフリーランする現象が知られているが、この MAP によって発現する行動リズムは SCN に依存しない。このことから、SCN 以外にも概日リズムを駆動する振動体の存在が示唆されていた。

近年、*Per1*, *Per2*, *BMAL1*, *Clock* などの時計関連遺伝子が同定された。現在、これら時計関連遺伝子とそれらの遺伝子産物からなる遺伝子転写のネガティブフィードバックループによって生物時計は駆動されていると考えられている。これらの時計関連遺伝子は SCN だけではなく、SCN 外の脳内部位及び末梢臓器においても周期的に発現している。その生理的意義は不明であるが、株化細胞である Rat-1 fibroblast や H35 hepatoma cell を高濃度血清で処理すると時計関連遺伝子 (*Per1*, *Per2*) の発現に少なくとも 2~3 サイクル続く概日リズムが生じることが知られており、SCN 外の細胞においても自律的なサーカディアン振動が生じる可能性が示されている。そこで MAP 投与で発現する SCN 非依存性行動リズムが、MAP の作用部位であるドーパミン神経の投射部位において、時計関連遺伝子の概日振動が誘導された結果生じた可能性を検討する目的で以下の実験を行った。

【方法】実験動物には、Wistar 系雌ラット (2~3 ヶ月齢、MAP 投与群 n=49、対照群 n=58) を用いた。6 時から 18 時までが明期の 24 時間明暗サイクルで飼育した動物を個別ケージに移し、Animex III (島津製作所) で自発行動リズムを持続的に測定した。行動リズムの解析は Chronobiology Kit (Stanford Software Systems) で行った。測定開始約 1 週間後に MAP (塩酸メタンフェタミン、大日本製薬) を飲水中に 0.01% の濃度で溶解し持続的投与を開始した。MAP 投与後、通常暗期にある行動リズムの活動期が明暗サイクルから脱同調し、フリーランし

た後完全に明期に移動したところで、4時間おきに1日6点で断頭サンプリング（脳、松果体、血漿）を行った。その際、活動期の開始が午前4時前後になるように断頭日を定めた。対照群にも同様のスケジュールで断頭サンプリングを行った。松果体及び血漿中に含まれるメラトニン量をラジオイムノアッセイにて測定した。また脳内の時計関連遺伝子 mRNA 量を *in situ* hybridization にて測定し、Microcomputer Imaging Device (MCID)を用いて定量解析した。

【結果】SCN の *Per1* 発現リズム、松果体及び血漿中のメラトニンリズムは、行動リズムが明暗サイクルから脱同調しフリーランしているにもかかわらず、明暗サイクルに同調していた。これらのリズムは位相、振幅、振動レベルに於いて対照群と差は認められなかった。一方、線条体、側頭葉では *Per1*, *Per2*, *BMAL1* の発現リズムは明暗サイクル、SCN の *Per1* 発現リズム、メラトニンリズムから脱同調したが、行動リズムとは一定の位相関係を維持していた。側坐核、cingulate cortex においては、MAP 投与後も時計関連遺伝子の発現リズムに大きな変化はみられなかった。

【考察】MAP 慢性投与で行動リズムが明暗サイクルから脱同調したとき、SCN *Per1* 発現リズム、血漿中及び松果体メラトニンリズムが明暗サイクルに同調していたことより、行動リズムと視交叉上核リズムの間で内的脱同調が生じたと考えられる。行動発現と関連がある線条体、側頭葉の *Per1*, *Per2*, *BMAL1* 発現リズムも SCN 及びメラトニンリズムから脱同調し、行動リズムと一定の位相関係を保っていたことから、これらの脳部位が MAP によって発現する行動リズムの駆動に関与している可能性がある。

ヒトでは時間隔離環境下や非24時間睡眠覚醒症候群において行動リズムとメラトニンリズムの乖離が知られており、これによりヒト体内時計は2振動体からなると考えられている。今回、MAP 慢性投与ラットで行動リズムとメラトニンリズム及び視交叉上核の *Per1* 発現リズムに内的脱同調を認め、実験動物で初めて生物時計の2振動体仮説を支持する結果を得た。また、視交叉上核以外の振動体局在として線条体を示唆した。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 福 島 菊 郎  
副 査 教 授 本 間 研 一  
副 査 教 授 渡 辺 雅 彦

## 学 位 論 文 題 名

### Clock genes outside the suprachiasmatic nucleus involved in manifestation of locomotor activity rhythm in rats

(ラット行動リズムの発現に關与する視交叉上核外時計關連遺伝子)

覚醒剤である Methamphetamine(MAP)慢性投与ラットにおいては、その行動リズムが 24 時間周期の明暗サイクルから脱同調することが知られている。この動物の行動リズムを周期解析すると約 30 時間の長い周期成分だけでなく MAP を投与していないラットでみられる約 24 時間の周期成分が検出されるため、MAP 慢性投与ラットには生物時計の中核として確立されている視交叉上核 (SCN) と、SCN 以外の概日振動機構が存在する事が想定されていた。

本研究は MAP 慢性投与ラットにおけるリズム形成の脳内機構を知るために、行動リズムが明暗サイクルから脱同調した時点で、生物時計の出力系としてのメラトニンリズムおよび SCN 内外の時計關連遺伝子 *Per1*, *Per2*, *BMAL1*, *Clock* の発現リズムを検討した。

実験動物には、Wistar系雌ラットを用いた。明暗サイクルで飼育した動物を個別ケージに移し、Animex IIIで自発行動リズムを持続的に測定した。行動リズムの解析は Chronobiology Kitで行った。測定開始約1週間後にMAPを飲水中に0.01%の濃度で溶解し持続的投与を開始した。MAP投与後、通常暗期にある行動リズムの活動期が明暗サイクルから脱同調したところで、4時間おきに1日6点で断頭サンプリングを行った。松果体及び血漿中に含まれるメラトニン量をラジオイムノアッセイにて測定した。また脳内の時計關連遺伝子mRNA量を *in situ* hybridizationにて測定し、Microcomputer Imaging Device (MCID)を用いて定量解析した。

メラトニンリズム及び SCN の *Per1* および *Per2* 発現リズムは、行動リズムが明暗サイクルから脱同調しているにもかかわらず、明暗サイクルに同調していた。一方、線条体、頭頂葉では *Per1*, *Per2*, *BMAL1* の発現リズムは明暗サイクル、SCN リズム、メラトニンリズムから脱同調したが、行動リズムとは一定の位相關係を維持していた。側坐核、帯状回皮質においては、MAP 投与後も時計關連遺伝子の発現リズムに大きな変化はみられなかった。

これらの結果から、行動リズムと SCN リズムの間で内的脱同調が生じたこと、全ての生体リズム機能が SCN から脱同調したのではなく SCN は松果体のリズムを行動リ

リズムの脱同調後も支配していること、線条体、頭頂葉が MAP によって発現する行動リズムに関与している可能性があることが示された。

公開発表では、副査の渡邊教授からこのリズムを神経化学的に考えた場合その中枢となる部位、作用メカニズム、関与する神経伝達物質について、また、運動に関与する小脳との関連について質問があった。次いで副査の本間教授から MAP を投与した動物は分裂病のモデルとして知られているが精神病では内的脱同調が起こりやすいのか、またヒトにおいて覚醒度と内的脱同調の関連について知られていることはあるかとの質問があった。また主査の福島教授より遺伝子発現と行動リズムとの因果関係について質問があった。これらの質問に対して、申請者は自身のこれまでの研究成績や文献的考察をもとにおおむね妥当な回答をなし得た。

審査員一同は、本論文が哺乳類の生物時計が階層的に支配されていることを時計関連遺伝子の発現リズムから示した点、また、MAP 慢性投与ラットがヒトの概日システムのモデル動物であることを示し今後睡眠覚醒リズム障害の原因を探る上での有力な疾患モデルとして期待される点で、本論文を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。