

**【課程外】**

博士（人間科学）学位論文

**ハムスター体内時計の光同調機構および非光同調機構の  
分子メカニズムとそれらの相互作用に関する研究**

**Molecular mechanism of photic and non-photic entrainment in  
hamster biological clock, and interaction between photic and  
non-photic entrainment**

**2005 年 7 月**

早稲田大学大学院 人間科学研究科

**横 田 伸 一**

**Yokota, Shin-ichi**

## 目次

緒言	1-3
第1章 光同調入力機構におけるカルモジュリン・カイネースの役割の解明	4-7
第1節 実験方法	7-16
第2節 実験成績	17-22
第3節 考察	23-27
第2章 非光同調機構における GABA 神経系の役割の解明	28-30
第1節 実験方法	30-33
第2節 実験成績	33-37
第3節 考察	38-40
第3章 光同調および非光同調機構の相互作用の分子メカニズムの解明	41
第1節 実験方法	41
第2節 実験成績	42-43
第3節 考察	44-45
総括	46-47
参考文献	48-55
謝辞	56

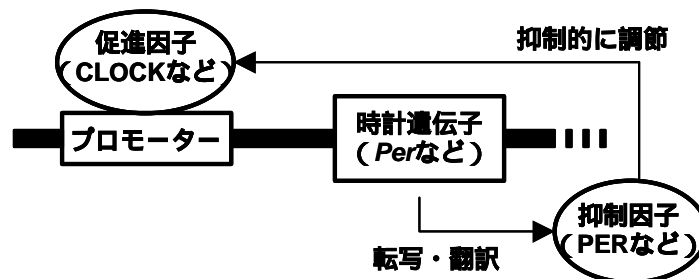
## 緒言

自然界には昼夜、潮汐、月周、季節など様々な周期性の変化が存在している。ヒトを含めた多くの生物は、これらの変化を予知しこれらの変化に適応して生活を営むために必要不可欠なものとして、体内に時計を持ったのではないかと考えられる。体内時計と外界の時刻とを照らし合わせ、あるときは体内時計の発振を優先し、あるときは外界の時刻に時計を同調させる。それによって通常は自らの恒常性を維持しつつも、必要なときには外界の環境変化にすばやく適応することが可能になる。

サーカディアンリズム（サーカ；約、ディアン；1日）とは、その名が示すとおり約 24 時間周期のリズムのことである。地球上の多くの地域において、昼夜の反転による 24 時間周期の明暗リズムが最も身近でかつ重大な影響を及ぼすリズム変動であるため、多くの生物にとって最も基本的なリズムとなっている。例えば我々ヒトの体内時計が示す周期変化には、月経周期のように約 1 ヶ月単位の変動もあるが、睡眠・覚醒リズム、体温や血圧、ホルモン分泌のような約 24 時間単位の変動はよりいっそう身近でかつ顕著にみられる生理現象である。またタバコの花芽形成、モンシロチョウの羽化、ハムスターの冬眠など、様々な生物が光周性（1日のうちの明るい時間の長さに対する生理的応答）を示すことが知られているが、サーカディアンリズムは日長を測る上でも極めて重要な役割を果たしていると考えられている（Burrning, 1969; Goldman, 1999; McWatters et al., 2000; Ruby et al., 2004; Spieth et al., 2004）。

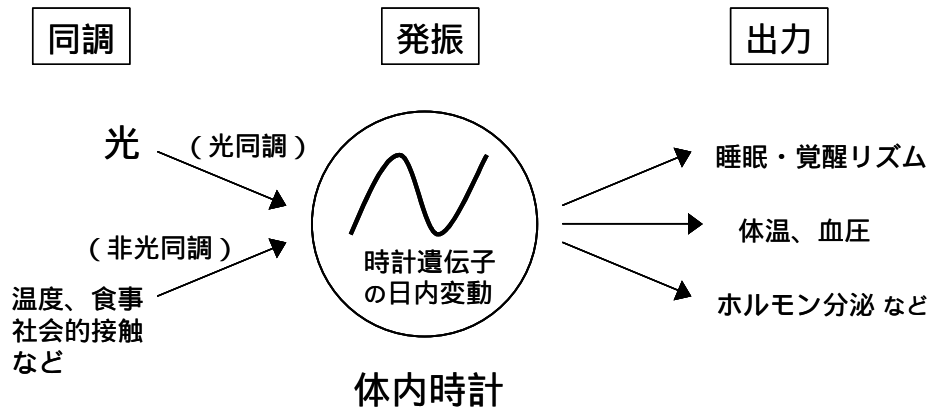
哺乳類動物の体内時計は視床下部の視交差上核（suprachiasmatic nucleus: SCN）にあることが知られている（Hirota et al., 2004, review）。SCN は約 24 時間周期の変動を繰り返す自律性振動体であり、あらゆる生体リズムの発振源となっている。体内時計を有する生物は外界から時刻情報が得られない条件下、例えば恒常暗条件下に隔離された場合、自らの体内時計の発振周期に従って主観的に昼（明期）と夜（暗期）を判断しつつも、およそ 24 時間に近い固有のサイクルで活動を継続することが知られている（これをフリーランリズムという）。現在、哺乳類動物においては、この個体固有の発振周期は一連の時計遺伝子群、なかでも *Period* 遺伝子（*Per1*, *Per2* および *Per3*）とその転写・翻訳産物である PER タンパク質により形成される負

のフィードバックループが中心となり、安定したサーカディアンリズムの発振を可能にしていることが想定されている (Dunlap, 1999; Hastings et al., 2004; Hirota et al., 2004; 図 A)。



図A. *Per*を中心に据えた負のフィードバックループ(模式図): 時計遺伝子*Per*の転写を促進する時計遺伝子(CLOCKなど)に対して、自らの転写・翻訳産物であるPERタンパク質が抑制的に働きかけることで負のフィードバックループが形成される。

体内時計の機構は同調、発振、出力の3つの要素から成り立つと考えられている(図B)その中心には約24時間周期で動く発振源があり、この時計の発振を受けて睡眠覚醒リズム、体温や血圧、ホルモン分泌といったさまざまな生理リズムが出力される。一方で、同調機構は体内時計の発振周期を外界の環境変化に適応させるための機構である。例えばヒトのサーカディアンリズムは24.5時間と24時間よりも長いことが知られているが、ヒトがもし外界の時刻情報を全く得られない状況下に隔離されると、体内時計は次第に約24.5時間のサーカディアンリズムで発振、出力を行いやがてフリーランリズムを示すようになる。すなわち、起床時刻や就寝時刻が一日あたり約0.5時間ずつ翌日へとずれこんでいき、外界の昼夜変動との乖離が生じていくのである。ところが日常生活においては、光、温度、音、さらには食事や社会的な接触など多くの要因(これを同調因子という)によって、絶えず時計の発振周期が外界の24時間に同調するため、周囲の環境に応じたリズムで行動できているのである。このことは、正常な同調機構の維持が健康な生活には欠かせないものであり、同調機構の異常によって様々な疾病に繋がる可能性があることを示している。

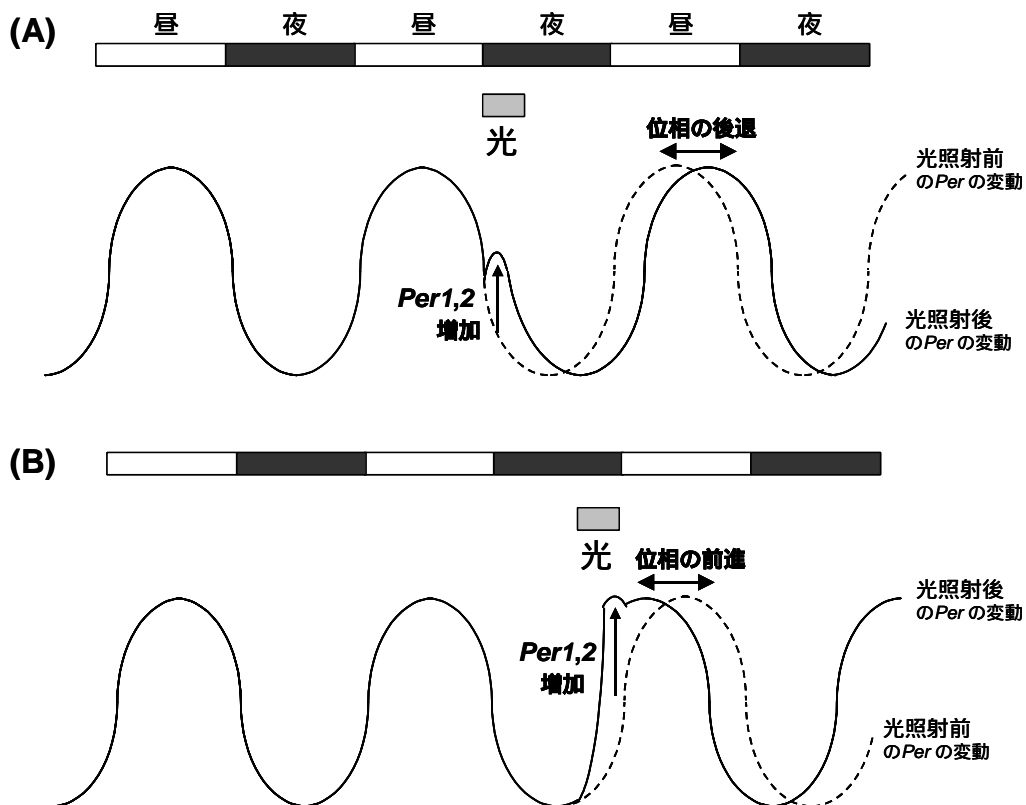


**図B. 体内時計の主要機構 (模式図):**体内時計の主要機構は同調、発振、出力の3つである。中心には約24時間周期での時計遺伝子の自律性変動(発振)があり、その発振を受けて様々な生理リズムが出力される。一方、外界からの様々な時刻情報に対して、体内時計の発振周期を変化させる機構が存在する(同調)。同調は、外界の環境変化に自らを適応させるために必須の機構であると考えられる。

体内時計の光同調は臨床治療にも応用されている。例えば、睡眠相後退症候群や季節性感情障害の患者に対して高照度の光照射を行うことで症状の軽減をはかる治療法がある。実際うつ病は発症の周期性、症状の日内変動、早朝覚醒を特徴とする睡眠障害など多様なリズム障害の関与が指摘されている。近年ではこれらの疾患の症状として現れたリズム障害、すなわち体内時計の発振や同調機構の異常を改善することが、疾病自体の治療となる可能性が示唆されてきている。このように体内時計の同調機構を解明することは、生物が保存してきた根源的な生理機構を解明する上での重要な示唆を与えてくれるだけでなく、創薬など臨床治療への応用やQOLの向上に役立つ知見を与えてくれるものと考えられる。私はこのような視点に立ち、哺乳類動物である齧歯類のハムスターを用いて、体内時計の同調機構における分子メカニズムの解明を目指して以下の研究を遂行した。

## 第1章 光同調入力機構におけるカルモジュリン・カイネースの役割の解明

体内時計は安定したサーカディアンリズムを発振する一方で、外界からの時刻情報の入力に対してすばやくそれに同調する。体内時計を同調させ得る因子(同調因子)には様々なものが知られているがそのなかで光が最も強力であると考えられており、光による時計の同調を光同調と呼んでいる(Viswanathan et al., 1994; Ebling, 1996; Meyer et al., 1998; Mintz et al., 1999; Yokota et al., 2000; Hirota et al., 2004)。暗期の光照射によってSCN内において時計遺伝子 *Per1* および *Per2* が一過的に上昇することで、時計の発振周期の位相がずれることが行動リズム上の位相変化に繋がっていることが知られている(Hastings et al., 2004; Hirota et al., 2004; 図C)。



図C. 光照射による体内時計の位相後退(A)および位相前進(B)の模式図:暗期(夜)の前半もしくは後半に光照射を行うと、SCN内において*Per1*および*Per2*の発現量が一過的に増加し、その結果それ以降の*Per*の変動周期の位相が後退(A)もしくは前進(B)する。

網膜から SCN へは網膜視床下部路 (Retinohypothalamic Tract, RHT) と呼ばれるモノシナプス神経投射がある。この神経繊維はその多くがグルタミン酸を含んでおり、SCN にはグルタミン酸をリガンドとする NMDA 受容体が多数発現していることから、網膜から SCN への光シグナル伝達には RHT 終末からのグルタミン酸遊離が SCN の NMDA 受容体を活性化させることで引き起こされると考えられている (Cui et al., 1996; Ebling, 1996; Ding et al., 1994, 1997)。NMDA 受容体はイオンチャネル連結型受容体ファミリーに属し、その活性化により細胞内へ  $Ca^{2+}$  を取込むことが知られている。そして SCN 内での細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の上昇が第一段階となって CREB (cAMP response element binding protein) のリン酸化が引き起こされ、最終的に時計遺伝子の *Per1* および *Per2* が一過的に発現増強されることによって体内時計の同調が完了する (Sassone-Corsi et al., 1988; Nakajima et al., 1993; Amato et al., 1996; Ding et al., 1994, 1997; Hirota et al., 2004)。しかしながら  $Ca^{2+}$  流入から CREB のリン酸化までの間をつないでいるセカンド・メッセンジャー系については未だ不明な点が多い。

カルシウムカルモジュリン依存性タンパク質リン酸化酵素 II ( $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II; CaMKII) は、多彩な生理機能制御への関与が指摘されている多機能性タンパク質リン酸化酵素である。ほとんど全ての組織で存在が確認されているが、特に脳に多く分布しており、海馬における神経可塑性発現など、さまざまな高次脳機能においても中核的な役割を果たすと考えられている (Fukunaga et al., 1988; Hallbeck et al., 1996; Lisman et al., 1997; Glazewski et al., 2000; Takao et al., 2005)。NMDA 受容体の開口などにより細胞内  $Ca^{2+}$  濃度が一過的に上昇するとカルモジュリン (Calmodulin; CaM) が一分子あたり 4 つの  $Ca^{2+}$  を結合させて活性化状態に至る。この活性化 CaM が CaMKII に結合すると CaMKII のリン酸化部位 (286 / 287 番トレオニン) が露出し、自らその部位をリン酸化することで (これを自己リン酸化という) 顕著な活性を有するようになり、同時に CaM に非依存的な活性化状態を保つことが可能になる。CaMKII は基質特異性が広く、CREB のリン酸化能があることが知られており、また SCN にも多く存在することから光シグナルの入力経路においてセカンドメッセンジャーとして機能していることが考えられている (Sheng et al., 1991; Golombek et al., 1994, 1995;

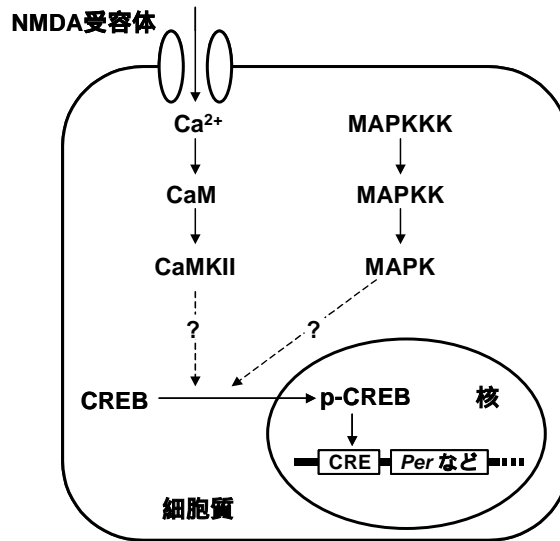
Hallbeck et al., 1996; Fukushima et al., 1997; Schurov et al., 1999 ; Fukunaga et al., 2002 )。すなわち、 $\text{Ca}^{2+}$ 流入 カルモジュリン活性化 CaM キナーゼ II のリン酸化 CREB のリン酸化 時計遺伝子の発現、という経路が考えられるのである。さらに最近 ,CaMKII が *mPer1* のプロモータ領域に働いてその発現を促進することが報告された ( Nomura et al., 2003 )。

分裂促進因子活性化タンパク質リン酸化酵素 ( Mitogen-activated protein kinase; MAPK ) は、細胞増殖、形態変化、アポトーシスなど、さまざまなシグナル伝達系で重要な役割を果たすと考えられているセリン/トレオニンキナーゼである。その活性化には三段階のキナーゼによる連鎖的な反応、すなわち MAPKKK MAPKK MAPK というカスケード(これを MAP キナーゼカスケードという)で活性化されることが知られており、細胞外からのシグナルを早急に核まで伝達すると考えられている。近年、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の上昇により MAPK 系が活性化されることや MAPK に CREB のリン酸化能があることなどが明らかになってきており、体内時計の光同調入力機構においても MAPK 系の関与が示唆されてきている( Xing et al., 1996; Impey et al., 1998; Obrietan et al., 1998, 1999; Sanada et al., 2000; Pizzio et al., 2003; Cheng et al., 2004 )。SCN 内の MAPK が主観的暗期のグルタミン酸負荷によって発現すること ( Obrietan et al., 1998, 1999 ) NIH-3T3 細胞での TPA 負荷による *Per1* および *Per2* の発現が MAPK 阻害薬の U0126 で阻害されること ( Akashi et al., 2000 ) などが報告されている。

体内時計の光同調入力の際には SCN 内で  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の一過的な上昇がみられるが、この  $\text{Ca}^{2+}$ シグナルに続いてカルモジュリン系が主に働くのか、あるいは MAPK 系が主に働くのか、あるいはそれ以外の系が働くのかは未だ明らかにされていない。そこで本研究においては、この点を明らかにするのを目的として、CaMKII および MAPK 阻害薬を用いた行動薬理学的実験、

CaMKII の自己リン酸化部位を特異的に認識する抗体と MAPK のリン酸化部位を特異的に認識する抗体を用いた免疫化学的実験、 *in situ* hybridization 法により時計遺伝子 *period* の mRNA の発現量を定量する分子生物学的実験を行った ( 図 D )。





図D. SCNの光同調入力機構において主要と思われる2つのシグナル伝達系：体内時計の光シグナルの入力系としては主にカルモジュリン系およびMAPK系の2つのシグナル伝達系が想定されているが、未だ不明な点も多い。今回の実験の目的はこれらのシグナル伝達系が本当に光同調入力機構において必要なのか否かを検討することである。

## 第1節 実験方法

### 実験1：輪回し行動リズムの測定によるCaMKIIおよびMAPK阻害薬の効果

体内時計の同調が起こるときには行動リズムの位相変化が引き起こされる。この行動上に現れた変化は、光シグナルという入力によって時計遺伝子群の振動に一度ズレが生じた後、再び安定した発振周期によって出力された最終的な同調現象の表現であると捉えることができる。そこで実験1では、実験動物に光照射を与えることで起こる行動リズムの位相変化をCaMKIIのリン酸化阻害薬であるKN-93とMAPK阻害薬のPD98059及びU0126の前投与がそれぞれ阻害し得るか否かを調べる行動薬理学的実験を行った。

#### 1-1 実験動物および飼育方法

実験には3-7週齢の雄性シリアンハムスターを用いた。動物は恒温恒湿(23±2℃, 55%)条件下で12時間12時間明暗サイクル(明期：8:30-20:30, 照度100 lux)の動物飼育舎で飼育し、餌と水は自由に摂取させた。

## 1-2 行動量測定装置および測定方法

直径 15 cm の回転車を取り付けた透明なプラスチック製の輪回し行動量測定用ケージ (35 × 20 × 20 cm) を外界から光が入らないようなキャビネット内 (恒常暗) に設置した。実験の 2 週間以上前にハムスターを輪回し行動量測定用ケージ内に移し、餌と水を随時与えながら単独隔離飼育を行った。回転車に取り付けたマイクロスイッチを回転車が 1 回転するごとに 1 カウントされるように設置し、6 分間あたりのカウント数をコンピュータにより 24 時間連続で記録した。記録されたカウント数は 0 : 00 から翌日の 24 : 00 までの計 48 時間を横軸にとり、縦軸を日数としたアクトグラム上に表した。アクトグラム上では輪を回した日時に縦線が刻まれるため、活動量が多いときには縦線の密度が濃くなり、少ないときには縦軸の密度が粗くなる。これをもとにして各動物の活動開始時刻や位相変化の大きさを求めた。

## 1-3 カニューレの固定手術

薬物の側脳室内投与のため、動物の頭蓋骨にカニューレを埋め込む手術を行った。動物にネンプタール (75mg/kg) を腹腔内投与して麻酔し、脳定位固定装置に固定した。頭部を剃毛後、カミソリで頭部を正中線に沿って切り頭蓋骨を露出させ、カニューレ (長さ 8.0 mm, 外径 0.7 mm) を右側脳室 (bregma の前方に 0.5 mm, 正中線の右方に 1.8 mm, 頭蓋骨表面から深さ 3.8 mm) に挿入した。さらにアンカービスを 2 本植え込み、カニューレと一緒に歯科用セメントで固定した。動物は止血後にホームケージに戻し、以後 1 週間以上の回復期間を経てから実験に使用した。

## 1-4 使用した薬物とその投与方法

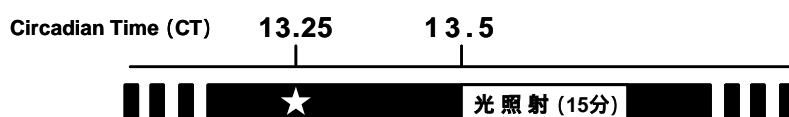
KN-93、KN-92、PD98059 は Research Biochemical 社から、U0126 は Promega 社からそれぞれ購入した。薬物は全て DMSO に溶解しておき、使用直前にそれぞれの薬物の使用濃度が 10% の DMSO に溶解されている状態になるようにイオン交換水で希釈して用いた。

薬物の脳室内投与は、光照射の 15 分前から開始した。薄明赤色光の下で動物をエーテル麻酔下に拘束し、動物の頭蓋骨に固定してあるガイドカニューレに、薬液注入用カニューレを挿入させて投与した。薬液注入用カニューレにはポリエチレンチューブが連結しており、もう片

端には 10  $\mu$ l 用ハミルトンシリンジが装着してある。このハミルトンシリンジをインフュージョンポンプに固定しておき、1 分間毎に 1.25  $\mu$ l の定速で薬液を注入した。

### 1-5 実験スケジュール

カニューレ固定手術後、アクトグラム上で少なくとも 2 週間以上安定したフリーランリズムを示した動物に対して実験を行った。まずアクトグラム上で実験前日までの約 10 日間の行動開始時刻に接線を引き、実験当日の各個体の活動開始時刻（これを CT12 とする）を求め、その CT12 を基準にして CT13.5 に当たる時刻を推定した。CT13.5 の 20 分ほど前になったら薄明赤色光の下に動物を出してエーテル麻酔下で拘束し、15 分前にあたる CT13.25 から各阻害薬（KN-93 と KN-92 は 0.3 mM で 5.0  $\mu$ l、PD98059 と U0126 は 1.0 mM で 5.0  $\mu$ l）の脳室内投与を行った（図 E）。CT13.5 にあたる時刻から 5 lux もしくは 300 lux の照度で動物に光照射を開始し、15 分間照射した後、直ちに恒暗ロッカー内に戻して 10 - 14 日間飼育した。



図E. 実験スケジュール:各薬物の脳室内投与は光照射開始の15分前 (CT13.5; 星印)に行い、CT13.5あたる時刻から15分間の光照射 (5lux もしくは300lux)を行った。

### 1-6 輪回し行動リズムの位相変化の評価法

輪回し行動リズムの位相変化の大きさは、アクトグラム上における各動物の活動開始時刻に接線を引き求めた。薬物投与および光照射を行った日を境にして、その前後 10 日間の各動物の活動開始時刻に任意に接線を引き、アクトグラム上の実験当日におけるそれら 2 本の接線の距離を測って時間に換算した。なお接線を引く作業は実験内容を知らせていない第三者によって行われた。

## 1-7 統計学的処理

実験結果の値は全て平均値 ± 標準誤差として表した。必要に応じて ANOVA を行い、Dunnett's test , Turkey's test および Student's t-test により差の検定を行った。なお ,  $p < 0.05$  のときに有意な差があったとした。

## 実験 2 : 免疫染色法による CaMKII および MAPK のリン酸化レベルの定量

実験 1 の結果から、光によって引き起こされる行動リズムの位相変化に対して MAPK 阻害薬は効果を示さず、CaMKII のリン酸化阻害薬は抑制効果を示すことが明らかとなった。このことから光同調が完了までのどこかで、CaMKII の活性化を伴ったカルモジュリン系の関与の可能性が示唆されたが、しかしながら CaMKII 自体は SCN にあることが確認されているものの、光刺激によって自己リン酸化が惹起されるか否かについては確認されていない。また脳室内投与された各阻害薬が、実際に SCN 内で薬効を示しているのかについても不明な点が残っている。そこで実験 2 では、CaMKII の自己リン酸化部位を特異的に認識する抗体と MAPK のリン酸化部位を特異的に認識する抗体を用いた免疫化学的実験を行った。

### 2-1 免疫組織化学的手法による定量

#### 2-1-1 実験動物および飼育方法

実験には 3-5 週齢の雄性シリアンハムスターを用いた。飼育方法は 1-1 と同様にした。

#### 2-1-2 使用した薬物とその投与方法

薬物の入手および調製方法は 1-4 と同様にした。また実験 1 と同様に、薬物投与は光照射開始 (CT13.5) の 15 分前 (CT13.25) から行ったが、実験 2 では慢性投与ではないためカニューレ固定手術を行わずに以下の方法にて脳室内投与を行った。光照射の 20 分ほど前になったら薄明赤色光の下で動物をエーテル麻酔下で拘束し、カミソリで頭部を正中線に沿って切って頭蓋骨を露出させたら、すばやく薬物注入用の注射針を右側脳室 ( bregma の後方に約 0.5 mm, 正中線の右方に約 1.8 mm ) に挿入し、薬液を約 1-2 分かけてゆっくり注入した。薬物注入用の注射針 ( 27G ) はその針の先端から 6.0 mm のところで 60-70° 曲げたものである。この注射針をポリエチレンチューブの片端に連結固定しておき、もう片端に 10  $\mu$ l 用八ミルトンシリン

ジを装着して 5 $\mu$ l の薬液を手作業で注入した。

### 2-1-3 使用した試薬とその調製方法

PBS ( phosphate buffer saline ): イオン交換水 1000 ml にリン酸水素二ナトリウム 1.4 g、塩化ナトリウム 9 g を溶解して pH7.4 に調製。

PLP ( periodate lysine paraformaldehyde ) 溶液 : PBS 1000 ml にパラホルムアルデヒド 40 g を溶解し、使用直前に過ヨウ素酸ナトリウム 2.14 g、リシン塩酸塩 13.7 g を加えて溶解。

20%および30%シヨ糖液:PBS 1000 ml にそれぞれ200 gもしくは300 gのスクロースを溶解。

DAB ( 3,3'-diamino benzidine tetrahydrochloride ) 溶液 : イオン交換水 100 ml に Trizma Hydrochloride 1.57 g と NaCl 0.9 g を溶解させて pH7.4 に調製し DAB を約 50 mg 加えて攪拌した後、ろ過して調製。

### 2-1-4 使用した抗体とその調製方法

一次抗体には熊本大学医学部の福永教授から戴いた抗 CaMKII 抗体および抗 p-CaMKII 抗体と New England Biolabs 社から購入した抗 phospho-p44/42 MAPK 抗体を使用した。二次抗体には Vectastain 社から購入したビオチン標識抗ウサギ IgG 抗体を使用した。実際に使用する際には抗 CaMKII 抗体は 1000 倍、抗 p-CaMKII 抗体は 2000 倍、抗 phospho-p44/42 MAPK 抗体は 250 倍、二次抗体は 200 倍になるように、1%のウサギ血清と 0.3%の Triton X-100 を含む PBS 液 ( PBSGT ) で希釈した。

### 2-1-5 脳の還流固定および脳切片の作成方法

薄明赤色光の下で動物を深くエーテル麻酔し、開胸して左心室から大動脈弓起始部までカテーターを通して、すばやく 4℃ に冷却した生理食塩水 25 ml で還流した後、続けて 4℃ に冷却した PLP 溶液 50 ml で脳を還流固定した。還流後、脳を丁寧に摘出して PLP 溶液に一晩浸して完全に固定し、さらに 20%シヨ糖液、30%シヨ糖液に各一晩ずつ浸した。その後、脳はマイクロトーム ( 大和光機工業株 ) で吻側から尾側に向かって厚さ 40  $\mu$ m の連続切片にし、PBS に一晩以上浸した後、2-1-6 に記述した免疫染色法を用いた。

### 2-1-6 免疫染色法

2-1-4 に記述したように調製した各一次抗体溶液(抗 CaMKII 抗体、抗 p-CaMKII 抗体もしくは抗 p-MAPK 抗体)に脳切片を浸して一晩以上 4℃ で反応させた。翌日、PBS で数回脳切片を洗浄した後、今度は二次抗体溶液に脳切片を浸して室温で 2 時間以上反応させ、その後また脳切片を PBS で数回洗浄した。続いて avidin と biotin 化した西洋わさび過酸化酵素(avidin-biotin complex; Vector Lab 社)を 100 倍になるように希釈した PBSGT に脳切片を移し、室温で 2 時間以上反応させた。脳切片を PBS で洗浄した後、DAB 溶液に 5 分間浸し、30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を 100 ml あたり 10 μl 加えて発色させ、約 10 分後に PBS に移して反応を停止した。脳切片はゼラチンをコーティングしたスライドガラスに貼り付け、オスミウム酸で発色強化した後、アルコールとキシレンで脱水し、カナダバルサムとカバーガラスで封入した。

### 2-1-7 定量方法

スライドガラスを光学顕微鏡で覗いて、SCN 内に発現している免疫陽性細胞数が多い方から 2 枚の脳切片を選んだ。その 2 枚の脳切片について、両側の SCN の免疫陽性細胞数を数えて平均値を計算し、その個体の測定値(免疫陽性細胞数)とした。なお p-MAPK 陽性細胞の発現量については細胞数を数えることが困難であったため、SCN 内に認められた陽性細胞像の濃淡を NIH Image program (written by Wayne Rasband at the U.S. National Institute of Health) を用いて定量し、光照射も薬物投与も行わなかった群の平均値を 100 としたときの相対値としてグラフ化および統計処理を行った。

### 2-1-8 統計学的処理

1-7 と同様にした。

## 2-2 western blot 法による定量

### 2-2-1 実験動物および飼育方法

2-1-1 と同様にした。

### 2-2-2 使用した試薬とその調製方法

TBST(Tris Buffer Saline with Tween): イオン交換水 1000 ml に Tris 1.21 g、NaCl 5.84 g、Tween

1.0 ml を溶解して pH7.4 に調製。

泳動バッファー：イオン交換水 1000 ml に Tris 3.03 g、グリシン 14.4 g、SDS 1.0 g を加えて溶解。

転写バッファー：泳動バッファーの組成に 20%のメタノールが含まれるように作成した溶液に、使用直前に 10%SDS を 2 ml 加えて調製。

10%TCA 溶液：イオン交換水 1000 ml にトリクロロ酢酸 100 g を溶解して調製。

### 2-2-3 使用した抗体とその調製方法

一次抗体には熊本大学医学部の福永教授から戴いた抗 CaMKII 抗体および抗 p-CaMKII 抗体を使用した。二次抗体には Amersham 社から購入した西洋わさび過酸化酵素 (HRP) 標識抗ウサギ IgG 抗体を使用した。実際に使用する際には、一次抗体の抗 CaMKII 抗体と抗 p-CaMKII 抗体は 1000 倍になるように 5 %の牛血清アルブミンを含む TBST で希釈し、二次抗体の抗ウサギ IgG 抗体は 20000 倍になるように 5 %のスキムミルクを含む TBST で希釈して使用した。

### 2-2-4 SCN 内の蛋白質サンプルの採取と調製方法

薄明赤色光の下で動物を深くエーテル麻酔し、開胸して左心室から大動脈弓起始部までカテーテルを通して、すばやく 4 °C に冷却した生理食塩水 25 ml で還流した後すばやく脳を摘出して、粉末状に砕いたドライアイスで脳を即急に冷凍した。凍結した脳は 10%TCA 溶液に移し、一晩以上浸して固定した。その後、脳はマイクロトームで吻側から尾側に向かって厚さ 300  $\mu$ m の連続切片にし、SCN を含む脳切片を各個体あたり 2-3 枚ずつ選んだ。SCN は実体顕微鏡下で内径 0.6 mm のカニューレによってパンチアウトし、実験群ごとに 2 匹分の SCN サンプルを 200  $\mu$ l の 10%TCA 溶液を入れた 1 本のアシストチューブに採集して超音波破碎した。遠心後、10%TCA 溶液をイオン交換水と入れ換えて TCA を除去した後、再び遠心して 50 mM MOPS バッファー 50  $\mu$ l に入れ替え、完全に超音波破碎を行った。そこへ 3 x SDS バッファーを加え、5 分間煮沸した。

### 2-2-5 蛋白質の膜への転写と免疫染色による可視化

CaMKII の分子量は約 50kDa であることが報告されているので、セミドライ方式の電気泳動装置 (Mini-PROTEAN<sup>®</sup> II Cell, BIO-RAD) で 7.5%ポリアクリルアミドゲルを用いてサンプルの蛋白質を電気泳動した。アクリルアミドゲルは約 60 分間放置してしっかりと重合させ、各サンプルを蛋白定量によって 10  $\mu$ g 分の蛋白質が流れるようにアプライした。50 mA で約 45 分間泳動した後、転写バッファーで 15 分間ゲルを洗浄し、転写装置 (TRANS-BLOT<sup>®</sup> SD, BIO-RAD) を用いて蛋白質を PVDF (polyvinylidene-difluoride) 膜に転写 (15V で 30 分間) した。転写終了後、TBST で膜を 30 分間洗浄し、5%MILK を含む TBST に移して一晩 4°C でブロッキングした。翌日、膜を TBST で洗浄し、一次抗体 (CaMKII もしくは p-CaMKII の抗体) を 2-2-3 の要領で調製して一晩 4°C で抗体反応させた。さらに翌日、膜を TBST で洗浄した後、今度は二次抗体 (抗ウサギ IgG 抗体) と室温で 2 時間、抗体反応させた。再び膜を TBST で洗浄した後、発色用のキット (ECL Plus, Amersham 社) を用いて発色させ、画像解析装置 (GS-250 Molecular Imager, BIO-RAD) によって発光量の強さを定量した。

### 2-2-6 定量方法

画像解析装置により各バンドの濃さと面積から相対的なタンパク質量を定量した。

### 実験 3: SCN での時計遺伝子 (*Per1-3*) 発現に対する CaMKII および MAPK 阻害薬の効果

実験 2 の結果から、SCN 内の CaMKII が光刺激によって一過的に自己リン酸化されることが明らかとなった。また実験 1 と実験 2 の結果から、CaMKII の自己リン酸化を阻害すると光刺激による行動リズムの位相変化を阻害することができるが、MAPK のリン酸化を阻害しても位相変化は阻害できないことが明らかとなった。このため光同調入力機構については CaMKII およびカルモジュリン系の活性化が重要な役割を果たしている可能性がよりいっそう示唆された。SCN 内での CaMKII の自己リン酸化反応は光照射の 5-15 分後には既にほぼ最大値に達するという経時的变化を示したが、これは光照射の 15-30 分後にほぼ最大値に達すると報告されている CREB のリン酸化よりもやや早く、整合性もあると考えられる。しかしながら光刺激による CaMKII の自己リン酸化反応が実際に *Per1*、*Per2* の一過的な発現量の増加に



関与しているか否かは定かではなく、また行動リズムの位相変化に影響を与えなかった MAPK 阻害薬も *Per1* および *Per2* の発現上昇には何らかの作用を及ぼしている可能性が考えられる。そこで実験 3 では、動物への光刺激による *Per1* および *Per2* の一過的な発現上昇に対して CaMKII リン酸化阻害薬および MAPK 阻害薬が効果を示すか否かを調べる目的で、*in situ* hybridization 法による SCN 内の *Per1* および *Per2* の定量を行った。

### 3-1 実験動物および飼育方法

2-1-1 と同様にした。

### 3-2 使用した薬物とその投与方法

2-1-2 と同様にした。

### 3-3 使用した試薬とその調製方法

4%PFA 溶液 : MilliQ 水 (滅菌済み) 1000 ml にパラホルムアルデヒド 40 g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  11.5 g、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  2.24 g を加えて溶解。

2 x SSC : NaCl 17.53 g、クエン酸三ナトリウム ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 8.82 g を MilliQ 水 (滅菌済み) 1000 ml に溶解し、pH7.0 に調製。

ハイブリダイゼーションバッファー : ホルムアミド 27 ml、1M Tris-HCl (pH7.4) 450  $\mu\text{l}$ 、tRNA (25 mg/ml) 360  $\mu\text{l}$ 、50 x Denhardt 900  $\mu\text{l}$ 、Dextran Sulfate 4.5 g、5M NaCl 5.4 ml、10% SDS 1.125 ml、0.5M EDTA 80  $\mu\text{l}$ 、MilliQ 水 (滅菌済み) 9.675 ml を加えて全て溶解して調製。

### 3-4 使用した cRNA プロープについて

本実験では *Per1* は *mPer1* の 726-1367、*Per2* は *mPer2* の 822-1601、*Per3* は *mPer3* の 1956-2754 の領域の塩基配列に相当する cRNA プロープを使用直前に合成した。なおプロープは  $^{33}\text{P}$  標識したものを使用した。

### 3-5 脳の遷流固定および脳切片の作成方法

2-1-5 とほぼ同様にしたので、変更した点のみを以下に記す。すなわち *in situ* hybridization 法に用いた脳切片は全て、30% ショ糖液には浸さない状態で、クリオスタット (マイクローム社) によって作製された厚さ 30  $\mu\text{m}$  連続切片であることが 2-1-5 とは異なる。

### 3-6 *in situ* hybridization 法

3-5 の要領で採集した脳切片をまず 37 °C で 10 分間振とうさせながらプロテインエース K 処理を行い、4%PFA を加えて 5 分間振とうして反応を停止させた後、2 x SSC に移して室温で 10 分間洗浄した。続いて脳切片を室温で 10 分間振とうさせながらアセチル化し、2 x SSC に移して室温で 10 分間洗浄を 2 回繰り返した。その後、脳切片は 3-4 の要領で調製したプローブ入りのハイブリダイゼーションバッファーに浸し、一晩 60 °C で振とうした。翌日、2 x SSC/50%ホルムアミド溶液に切片を移し、60 °C で 30 分間の洗浄を 2 回繰り返してから、37 °C で 30 分間の RNase 処理を行い、再び 2 x SSC/50%ホルムアミド溶液により 60 °C で 15 分間の洗浄を 2 回行った。さらに 0.4 x SSC により 60 °C で 30 分間の洗浄を行った後、ゼラチンで表面をコーティングしたスライドガラスに脳切片を貼り付けて乾燥させ、80、90、95、100%のエタノールに漬けて脱水した。これらのスライドガラスと <sup>14</sup>C マイクロスケールを貼り付けたスライドガラスを遮蔽用カセット（ハイパーカセット、アマシャム社）に並べて固定し、暗室内で X 線フィルム（Bio MAX MR, KODAK 社）を被せて蓋を閉じて 4 °C で 4 日間感光させた。X 線フィルムの現像した後は 3-7 に記述した要領で定量・解析した。

### 3-7 定量方法

定量は MCID システムによって行った。まず <sup>14</sup>C マイクロスケールの感光度により放射線量（nCi/g）の検量線を作成し、その検量線を基準にして各脳切片の SCN 内からの放射線量を数値化した。なお放射線量の数値化の際には、その切片のバックグラウンドの値として脳梁の数値を別にとっておき、SCN の数値から脳梁の数値を引いた値を各 SCN の生データとした。生データは左右の SCN で平均値をとってその平均値を計算してその脳切片の定量値とし、各個体ごとに定量値の大きい方から 4 枚を選んでそれらの平均値を測定値（mRNA の発現量（nCi/g））とした。

## 第2節 実験成績

### 実験1：輪回し行動リズムの測定による CaMKII および MAPK 阻害薬の効果

CT13.5 でのハムスターへの光照射は低照度 (5 lux) でも高照度 (300 lux) でも輪回し行動リズムの位相後退を引き起こした (図 1A-a, -d)。位相後退の大きさは低照度では、 $-0.81 \pm 0.10$  時間、高照度では  $-1.65 \pm 0.23$  時間であった (図 1B)。しかしながらこの光照射による位相後退は、15 分前の CaMKII 阻害薬 (KN-93) の脳室内投与により有意に抑制された (図 1A-b, -e)。すなわち、低照度では約 50% ( $-0.38 \pm 0.18$  時間) まで、高照度では約 60% ( $-0.97 \pm 0.21$  時間) まで位相後退が抑制された。また KN-93 の不活性型アナログである KN-92 および MAPK 阻害薬の PD98059、U0126 は光照射による位相後退に全く影響を与えなかった (図 1A-c, -f, -g, -h)。

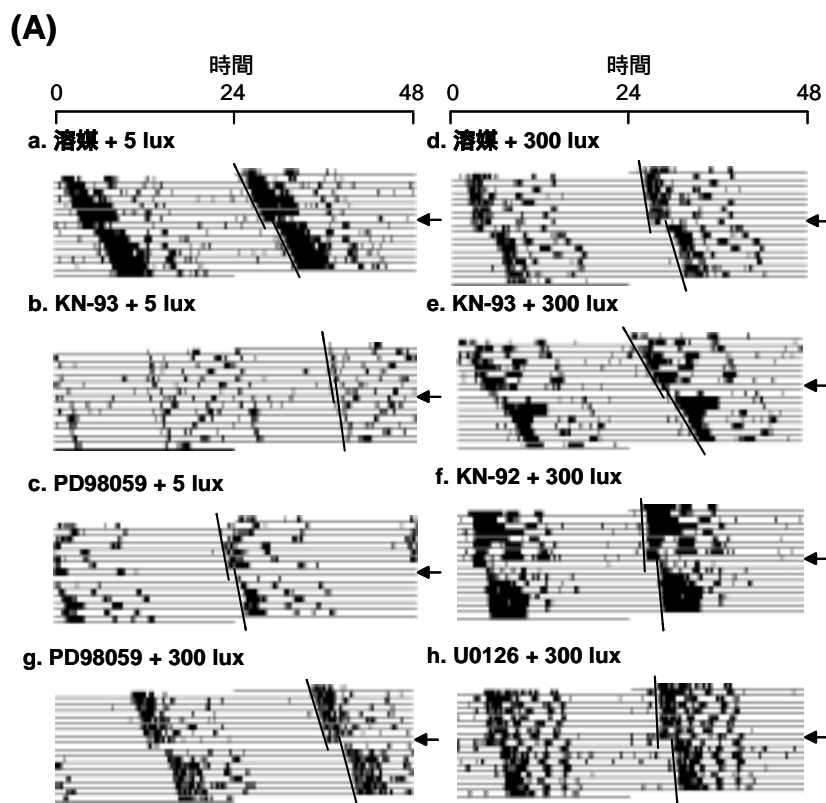


図1. (A) ハムスターの輪回し行動リズムの位相後退反応に対するCaMKIIおよびMAPK阻害薬の効果(代表例):実験当日(矢印で示してある)、主観的暗期の前半(CT13.5)にあたる時刻に光照射(5lux もしくは300lux)、光照射の15分前から各薬物の脳室内投与を行った。

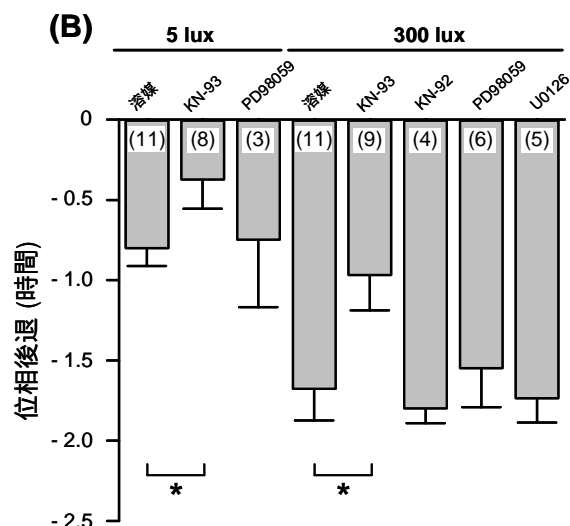


図1. (B) ハムスターの輪回し行動リズムの位相後退反応に対するCaMKIIおよびMAPK阻害薬の効果(まとめ):CT13.5の光照射により惹起された行動リズムの位相後退反応をCaMKII阻害薬のKN-93は有意に抑制したが、KN-93の不活性型アナログであるKN-92やMAPK阻害薬のPD98059およびU0126は全く効果を示さなかった。なお、括弧内の数字は各実験群の例数を示している。\*:  $p < 0.05$  (Dunnett's test)

## 実験2: 免疫染色法によるCaMKIIおよびMAPKのリン酸化レベルの定量

図2A, Bは抗CaMKIIおよび抗p-CaMKII抗体を用いて免疫染色を行った脳切片の光学顕微鏡像の代表例である。光照射を行わなかったときと比較してCT13.5から15分間の光照射を行った場合には、SCN内のとくに腹外側領域において顕著に多くのp-CaMKII免疫陽性細胞が発現していることが確認された(図2-B)。しかしながらCaMKIIに免疫陽性な細胞については、光照射を与えた場合も与えなかった場合も同様の染色像を示しており、確認される細胞数にも差はみられなかった(図2-A)。図2Cのグラフは、光照射にともなうp-CaMKII免疫陽性細胞数の経時的変化を示している。光照射を行わなかった場合( $38.3 \pm 3.2$  cells/SCN)と比較すると、p-CaMKIIに免疫陽性な細胞の数は光照射5分後、15分後には既にそれぞれ $68.4 \pm 8.4$  cells/SCN、 $71.4 \pm 10.5$  cells/SCNと有意な増加を示していた。そしてこの増加は、光照射(300luxで15分間)終了の15分後(CT14にあたる)には $76.5 \pm 9.2$  cells/SCNにまで達したが、75分後(CT15にあたる)には $39.0 \pm 2.3$  cells/SCNまで減少し、光照射を行わなかったときとほぼ同様の数に戻っていた。

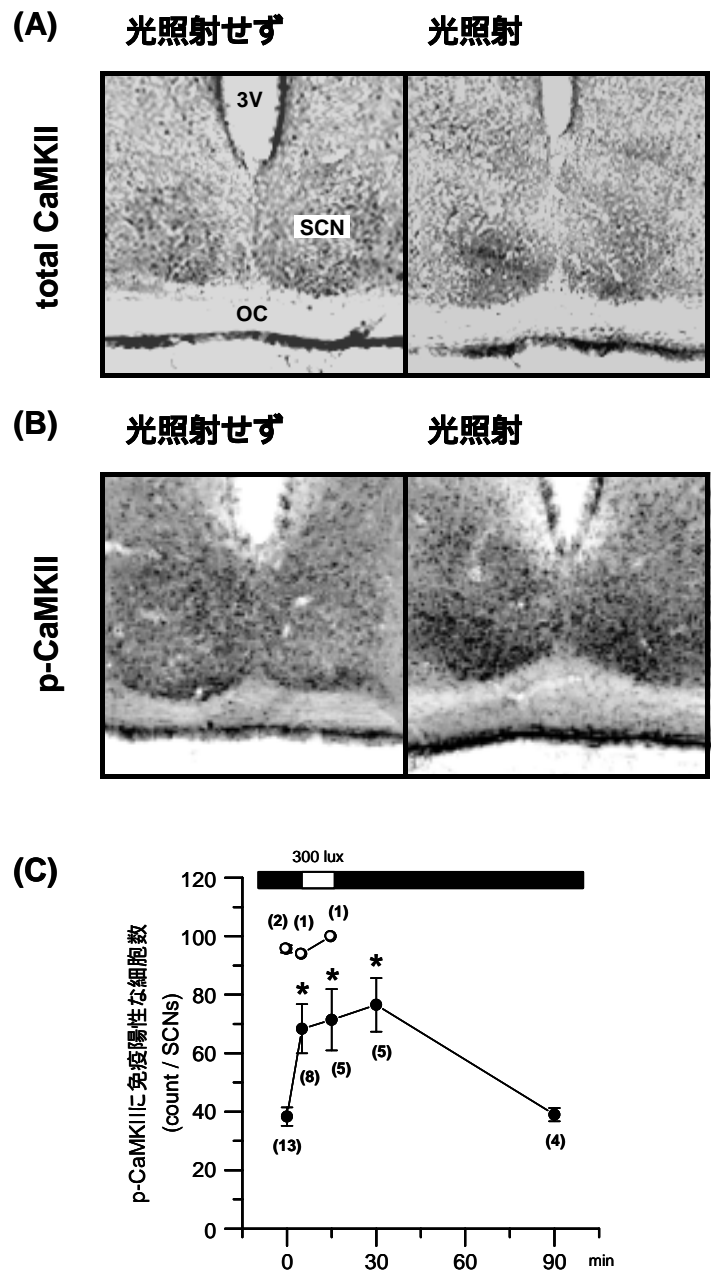


図2. CT13.5に光照射を行ったときのSCN内でのtotal CaMKII (A)およびp-CaMKII(B)の発現(代表例):CT13.5にあたる時刻にハムスターへ300luxで15分間の光照射を行い、その15分後に脳を還流固定して免疫組織化学を行った。黒い点として観察できるのがCaMKII(total CaMKII)および自己リン酸化されたCaMKII(p-CaMKII)に対する抗体に免疫陽性な細胞の像である。なお、(C)には光照射後のCaMKIIの自己リン酸化反応の経時的变化を示している。3V:第三脳室、OC:視交叉、SCN:視交叉上核。○: total CaMKII ●: p-CaMKII \* :  $p < 0.05$  (Dunnett's test)

図 3A, B にはそれぞれ抗 CaMKII および抗 p-CaMKII 抗体に対して免疫陽性なバンドが示してある。その分子量から上にみられるバンドが  $\beta$  サブタイプ (60 kD)、下にみられるバンドが  $\alpha$  サブタイプ (50 kD) であると推測される。光照射を与えなかった群のバンド (左のレーン) と比較して、光照射を与えた群のバンド (中央のレーン) は、 $\beta$  どちらのサブタイプも濃くなっており、CT13.5 の光照射 (300lux で 15 分間) によって SCN 内の CaMKII が急速に自己リン酸化されることが示唆された。しかしながら光照射の 15 分前に KN-93 を脳室内投与することにより、 $\beta$  どちらのサブタイプのバンド (右のレーン) も薄くなっており、SCN 内の CaMKII の自己リン酸化が強く抑制されることが示唆された。

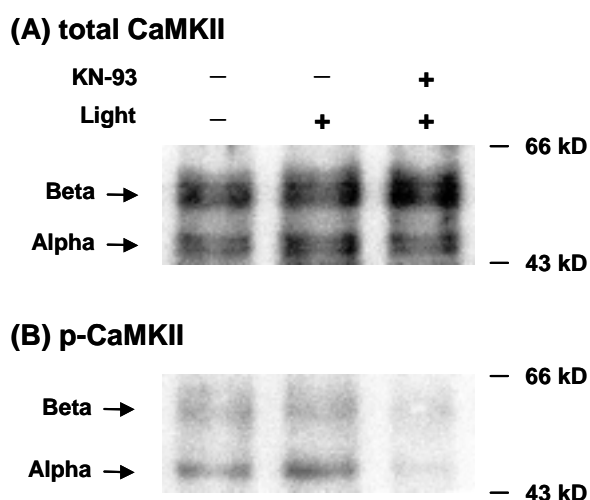


図3. CT13.5の光照射によるSCN内でのtotal CaMKII (A)およびp-CaMKII(B)の発現に対するCaMKII阻害薬(KN-93)の効果(western blot 法による定量):CT13.5 にあたる時刻に光照射(300luxで15分間)、光照射の15分前からKN-93の脳室内投与を行なった。60kD付近にみられるバンドがCaMKIIの  $\beta$  サブタイプ、50kD付近にみられるバンドが  $\alpha$  サブタイプと推測される。

図 4A は抗 p-MAPK 抗体を用いて免疫染色を行った脳切片の光学顕微鏡像の代表例である。また図 4B はその光学顕微鏡像の定量後の結果をまとめたものである。光照射を行わなかったとき (この値を 100 とする) と比較して CT13.5 から 15 分間の光照射を行った場合 ( $240.87 \pm 8.19$ ) には、図 2 で示した p-CaMKII のときと同様、SCN 内のとくに腹外側領域において顕著に多くの p-MAPK 免疫陽性細胞が発現していることが確認された。しかしながら光照射の 15

分前に MAPK 阻害薬の PD98059 を脳室内投与した場合、光照射による p-MAPK 免疫陽性細胞数の増加が有意に抑制された ( $151.27 \pm 6.70$ )。

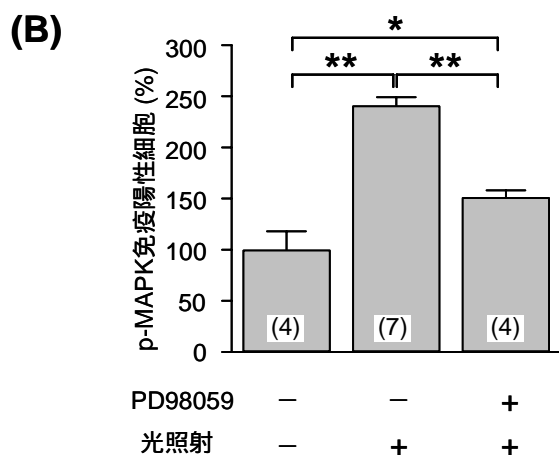
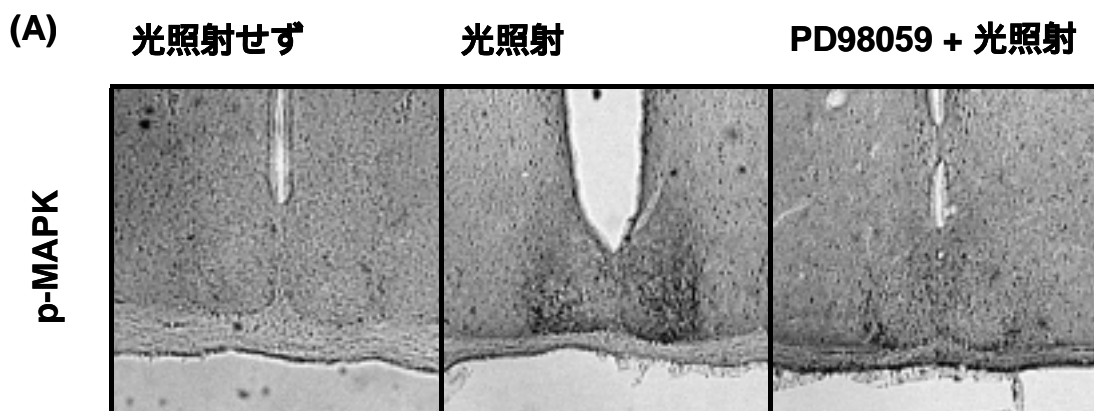


図4. CT13.5の光照射によるSCN内での p-MAPKの発現に対するMAPK阻害薬 (PD98059)の効果: (A) CT13.5にあたる時刻に光照射 (300luxで15分間)、光照射の15分前からKN-93の脳室内投与を行い、その15分後(CT14)に脳を還流固定して免疫組織化学を行った。黒い点として観察できるのがリン酸化されたMAPK (p-MAPK) に対する抗体に免疫陽性な細胞の像である。(B)には各実験群ごとのMAPKのリン酸化レベルを、光照射を行なわなかった群を100として示してある。なお、括弧内の数字は各実験群の例数を示している。

\* :  $p < 0.05$ , \*\* :  $p < 0.01$  (Dunnett's test)

### 実験 3 : SCN での時計遺伝子 (*Per1-3*) 発現に対する CaMKII および MAPK 阻害薬の効果

CT13.5 でのハムスターへの光照射 (300lux で 15 分間) は、その 90 分後 (これは CT15 にあたる) における SCN 内での *Per1* および *Per2* の一過的な発現増強を惹き起こした (図 5A, B, D)。しかしながらこの光照射による *Per1*、*Per2* の発現増加は、光照射 15 分前の KN-93 の脳室内投与により有意に抑制された。KN-92 および MAPK 阻害薬の PD98059、U0126 は光照射による *Per1*、*Per2* の発現増加に対して全く影響を与えなかった。一方、*Per3* の発現量は光照射および薬物投与のいずれによっても影響されず、どの群においてもほぼ同様であった (図 5C, D)。

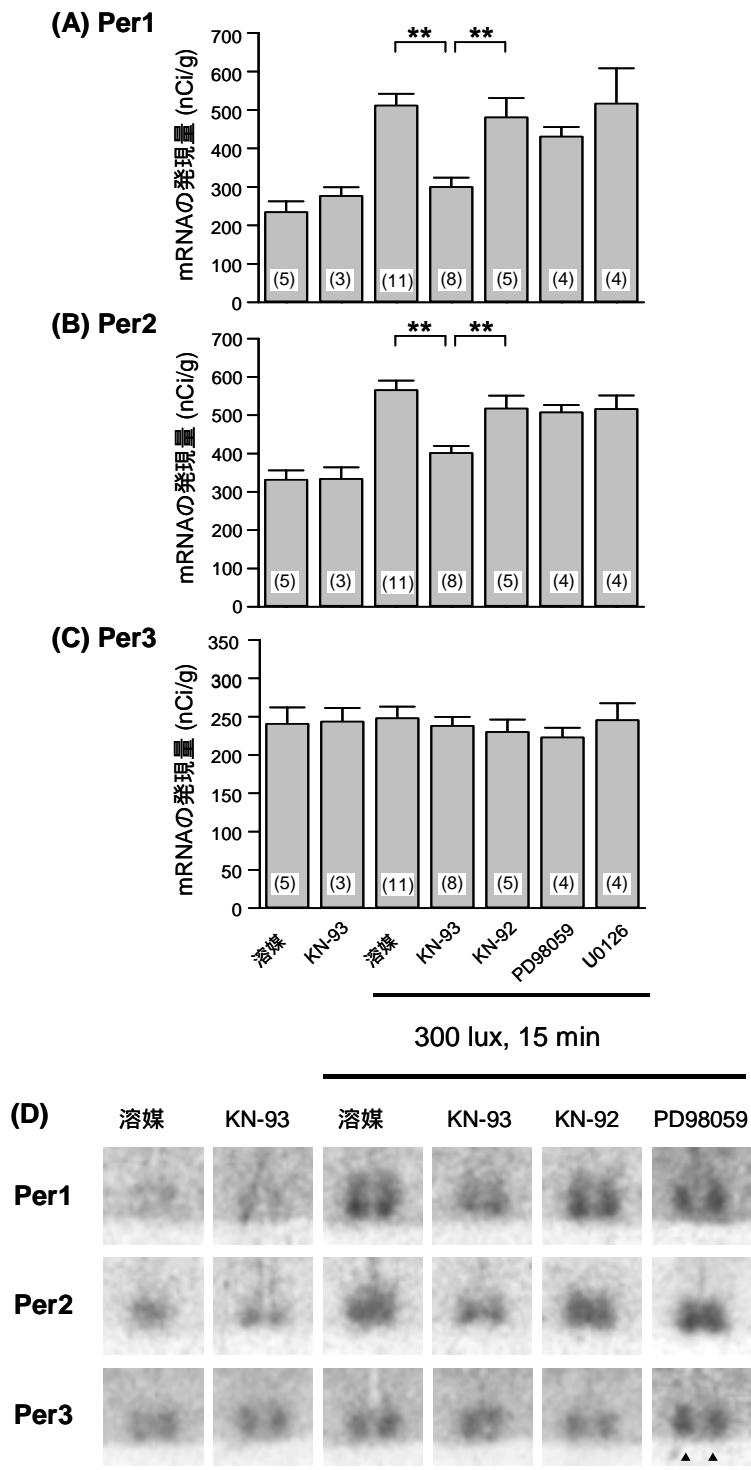


図5. 光照射により一過的に発現増強されたSCN内の*Period* mRNAに対するCaMKIIおよびMAPK阻害薬の効果: (A)には*Per1*、(B)には*Per2*、(C)には*Per3*の定量結果を示しており、(D)には実際に定量したX線フィルムの像の代表例を示してある。光照射によるSCN内の*Per1*および*Per2*の発現増強をCaMKII阻害薬のKN-93は有意に抑制したが、KN-93の不活性型アナログであるKN-92やMAPK阻害薬のPD98059およびU0126は全く効果を示さなかった。なお、(A)(B)(C)の括弧内の数字は各実験群の例数を示し、(D)の矢頭はSCNを、横棒は0.5mmを示している。 \*\* :  $p < 0.01$  (Dunnett's test)



### 第3節 考察

実験1の行動薬理学的実験において、ハムスターへの光照射刺激(CT13.5)による輪回し行動リズムの位相後退反応が、光照射前に脳室内投与したCaMKII阻害薬のKN-93によって有意に抑制された。またこの光照射により惹起される行動リズムの位相後退反応に対して、KN-93の非活性型アナログであるKN-92と、MAPK阻害薬のPD98059およびU0126は全く効果を示さなかった。これらのことは体内時計の光同調機構においてCaMKIIの活性化が何らかの役割を担っていることを示しており、一方のMAPKの活性化は、光同調機構においてはそれほど重大な役割を担っていないことが示唆される。以前にGolombekら(1994, 1995)は、CaMKII阻害薬のKN62(2.77 nmol)の脳室内投与が、光刺激によるハムスターの輪回し行動リズムの位相変化とSCN内のCREBのリン酸化をともに抑制することを報告しており、CaMKIIの活性化を介したCREBのリン酸化によって体内時計の光同調が起こっている可能性を考察している。またFukushimaら(1997)は、KN-62やカルモジュリン阻害薬のカルミダゾリウムおよびトリフルオパラジンが、光照射によるSCN内でのc-Fos発現やグルタミン酸負荷によるSCN神経活動リズムを抑制することを報告している。今回の実験結果はこれらの報告を支持するものであり、CaMKIIの活性化が体内時計の光同調入力機構において重要な役割を果たしている可能性を強く示唆するものである。

CaMKIIがSCNに豊富に存在することは既に報告されているが(Hallbeck, 1996)実際にSCNへの光シグナル入力があったときに活性化されるか否かは不明であった。実験2で免疫組織化学的手法を用いたことで、動物への光照射の直後にSCN内でCaMKIIが自己リン酸化されていることが明らかになり、またこの自己リン酸化反応が、網膜からのRHT神経終末が豊富に存在するSCNの腹外側領域で特に顕著に確認されることも明らかになった。本稿には記載しなかったが、予備実験では光照射(300 luxで15分間)の30分前にカルモジュリン阻害薬のカルミダゾリウムを腹腔内投与するとSCN内のCaMKIIの自己リン酸化が用量依存的に阻害されることを確認している。腹腔内投与であるため脳内で直接的に薬効が現れたか否かについては不明であるが、カルミダゾリウムの腹腔内投与がハムスターの輪回し行動リズムの位相後

退の大きさを用量依存的に抑制するという未発表データ( Fukushima 修士論文 )もあり、CaMKII の自己リン酸化反応の抑制がカルモジュリンの阻害に起因する可能性は高いと考えられる。光シグナルの入力の際に SCN 内で一過的に上昇した  $Ca^{2+}$  濃度によってまずカルモジュリンが活性化され、そのカルモジュリンによって CaMKII が活性化されるという細胞内シグナル伝達系の存在が想定できるといえる。

実験 2 においては western blot 法を用いることで SCN 内の CaMKII および自己リン酸化された CaMKII をより定量的に検討することを試みた。CT13.5 の光照射は、免疫組織化学の結果と同様に、ハムスターの SCN 内で CaMKII の急速な自己リン酸化を惹起することが確認され、また光照射前の KN-93 の脳室内投与が光によって引き起こされる CaMKII の自己リン酸化を強力に抑制することが明らかとなった。このことから、本実験で用いた KN-93 の投与量 ( 1.5nmol ) および投与方法で SCN 内の CaMKII の自己リン酸化抑制が十分に可能であることが確認され、輪回し行動リズムの位相後退反応( 実験 1 )や SCN 内の *Per1*、*Per2* の発現量( 実験 3 )に対する KN-93 の抑制効果も、おそらくは同様に SCN 内において CaMKII の自己リン酸化を抑制したための効果であることが推定された。

実験 3 では、光照射の前に KN-93 を脳室内投与することで、光によって誘導される SCN 内の *Per1* および *Per2* の一過的な発現増加が抑制されることが明らかとなった。そしてこの光照射による *Per1*、*Per2* の発現上昇に対して、KN-92、PD98059 および U0126 はいずれも全く効果を示さないことが明らかとなった。これらの結果から *Per1*、*Per2* の一過的な発現増加においても CaMKII の自己リン酸化に伴うカルモジュリン系の活性化が必要であることが推定される。ところで実験 1 と実験 3 の結果を比較すると、光によって引き起こされる SCN 内の *Per1*、*Per2* の発現上昇にも、輪回し行動リズムの位相後退反応にも CaMKII 阻害薬の KN-93 のみが薬効を示し、MAPK 阻害薬は薬効を示さない点で共通している。光による *Per1*、*Per2* の発現増加と行動リズムの位相後退が双方伴って起こることから、これまで考えられていたように光同調時の行動リズム上の変化が、SCN 内の *Per1*、*Per2* の一過的な発現増強の結果として引き起こされている可能性も強く示唆された。

第一章における実験全体を通して、光同調時に引き起こされる行動リズムの位相変化と SCN 内の *Per1*、*Per2* の発現増加を KN-93 はいずれも有意に抑制したが、しかしながらいずれの場合もその抑制効果は 50% 前後であった。先述したとおり Golombek ら (1994, 1995) は、本実験とほとんど同じスケジュールで CaMKII 阻害薬の KN62 の脳室内投与の光同調に対する効果を報告しているが、そこで彼らは光による行動リズムの位相変化に対する KN62 の抑制効果は、2.77 から 27.7nmol の間では全く差はみられないため、2.77nmol で十分に閾値に達しており、最大で 40-50% まで抑制することを示している。本実験で用いた KN-93 は一般的に KN-62 よりも選択性が高く、CaMKII のリン酸化に対する抑制効果も強いと考えられているが、実際に今回の実験において KN-93 が示した抑制効果はいずれも 50% 程度であった。このことから CaMKII のリン酸化を阻害することによって得られる光同調入力系の抑制効果はほぼ半分であって、残り半分は他の何らかのシグナル伝達系によって担われている可能性が示唆される。

MAPK 阻害薬は光による SCN 内の MAPK のリン酸化を有意に阻害したにも関わらず、*Per1* および *Per2* の発現増強にも輪回し行動リズムの位相後退にも効果を示さなかった。しかしながら本稿の実験 2 において、SCN への光刺激入力により SCN 内で MAPK が活性化されることは以前からの報告 (Obrietan et al., 1998) どおりに確認できている。これらのことから MAPK の活性化は光同調の主要経路ではない可能性が考えられるが、光刺激の入りに伴う何らかの生理応答には関与している可能性が否定できず、さらなる研究が必要と思われる。また MAPK には本研究でも検討した古典的 MAPK と呼ばれる ERK1/2 以外に、SAPK、JNK、p38、ERK5 がある。本稿には記載しなかったが、予備実験として p38 の阻害薬である SB203580 (Research Biochemical 社) とその不活性型アナログの SB202474 を実験 1 と全く同様の条件で脳室内投与したときには、光照射刺激 (5lux で 15 分間) による輪回し行動リズムの位相後退の大きさを抑制しなかった。p38 は紫外線や熱刺激などのストレス、IL1 などサイトカイン刺激によって活性化されることで知られる MAPK ファミリーのひとつであるが、アフリカツメガエルの網膜細胞培養を用いた実験系において光同調への関与が示唆されるなど、近年では体内時計の同調機構への関与が推測されている (Kawasaki et al., 1997; Hasegawa et al., 1999)。著者の行った

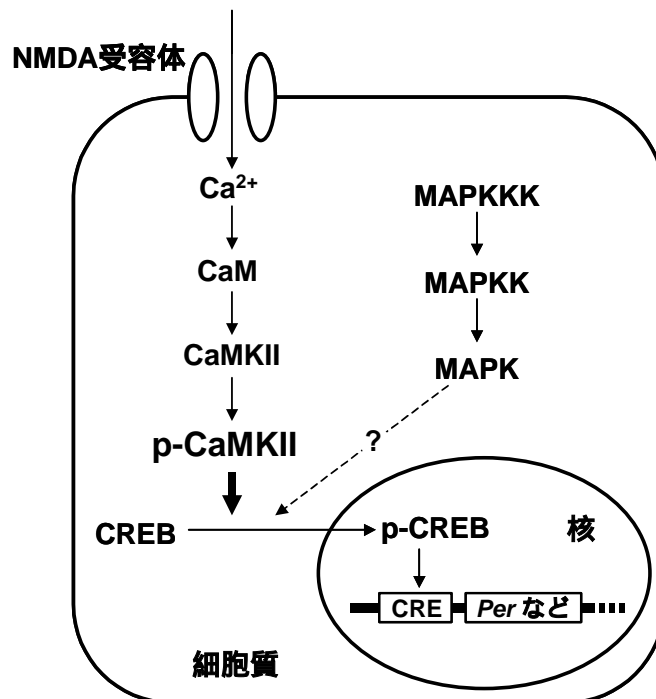
予備実験の結果のみから p38 の光同調機構への関与を否定することは不可能であるし、また SAPK や JNK の関与については検討していないが、本稿に記載したとおり ERK1/2 の阻害薬 2 種がいずれも効果を示さなかったこととあわせて考えると MAPK 系の光時計機構への直接的な関与の度合いは小さいことが推定される。

今回の実験に用いた KN-93 は CaMKII に選択性が高いものの若干ではあるが CaMKIV の阻害効果もあること、また高濃度になると電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル (voltage-dependent calcium channel; VDCC) の不活性化を引き起こすことが知られている。すなわち光同調入力機構に対する KN-93 の阻害効果が、CaMKII よりむしろ CaMKIV に作用したことによって引き起こされている可能性があるし、また VDCC の不活性化を誘起させたことによる細胞内への  $\text{Ca}^{2+}$  流入の妨害が原因である可能性も否定できない。カルミダゾリウムを用いた予備実験の結果や Fukushima ら (1997) の報告から、カルモジュリンの阻害が光同調入力系を阻害することが示されているため、CaMKII か CaMKIV かまたはそれ以外の CaM 依存性リン酸化酵素かは定かではないものの、カルモジュリン系自体が光同調入力機構において重要な役割を果たしている可能性は高いと考えられる。CaMKIV は CaMKII 同様にカルモジュリンによって活性化され、CREB のリン酸化能も有するキナーゼであり、SCN にも存在することが確認されている。また光同調機構に対して抑制的に働くと考えられているメラトニンによって CaMKIV のリン酸化反応が抑制されるという報告 (Fukunaga et al., 2002) もあり、CaMKIV が SCN 内での光同調入力系へ関与している可能性が示されている (Kasahara et al., 1999)。

今回の実験では時計遺伝子 *Per* の発現量を *in situ* hybridization 法によって定量し、光シグナルの影響と各薬物の効果を検討したが、体内時計の約 24 時間周期の駆動にはその翻訳産物である PER タンパク質による抑制的な制御も不可欠と考えられている。PER の N 末端側に 6 ケ所、C 末端側に 1 箇所、CaMKII によってリン酸化され得る部位が存在することから PER が CaMKII の標的分子である可能性も高い。すなわち、CaMKII の光同調入力機構における役割が CREB よりむしろ PER への直接的な働きかけである可能性も考えられる。しかし今回の実験からは SCN 内の PER がどのような影響を受けているかは全く不明であり、今後は PER

タンパク質に対する抗体を用いるなどして、より詳細に検討する必要があると考えられる。

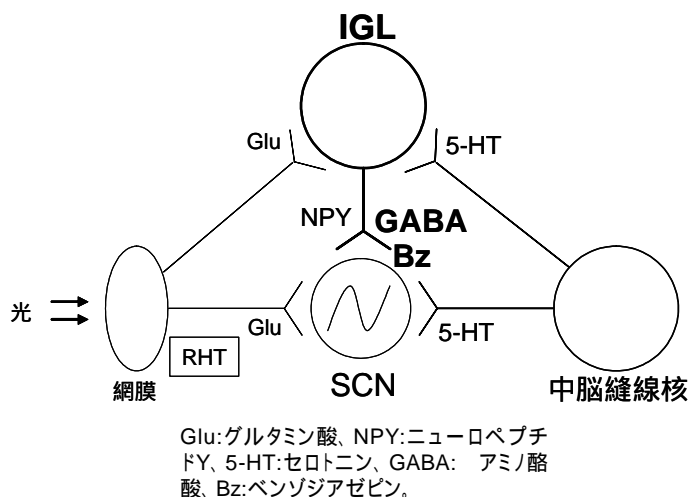
本研究の遂行によって 光照射により惹起される輪回し行動リズムの位相後退反応が CaMKII 阻害薬の KN-93 によって抑制されること、 光照射により SCN 内で一過的な CaMKII の自己リン酸化が引き起こされること、 光刺激による一過的な SCN 内での *Per1* および *Per2* の発現増加が CaMKII 阻害の KN-93 により抑制されることが明らかとなり、げっ歯類体内時計の光同調入力機構において CaMKII が重要な役割を果たしていることが示唆されたが、その関与の詳細な機構については明らかにならなかった。また一方で MAPK 系の関与も完全には否定できず、むしろカルモジュリン系以外にも何らかの他のシグナル伝達系が関与している可能性が推定されることから、この点に関して今後の更なる研究が必要と考えられた。



図F. SCNの光同調入力機構における細胞内シグナル伝達概念図: 今回の実験結果から、体内時計の光同調入力機構においてはMAPK系よりもCaMKIIの自己リン酸化をともなうカルモジュリン系の方が重要であることが示唆された。

## 第2章 非光同調機構における GABA 神経系の役割の解明

恒常明条件下で活動リズムがフリーランしている状態において、光刺激を一時遮断(暗パルスという)すると体内時計の位相が前進することが知られている(Ellis et al. 1982; Rosenwasser et al., 2001, 2002; Mendoza et al., 2004)。この場合、位相変化の時刻依存性は光同調と 180 度位相が異なり、主観的暗期に施行するとほとんど位相は変化しないが、主観的明期に施行すると顕著な位相前進が観察される。このことは光同調系とは異なる体内時計の同調機構が存在することを意味しており、これを非光同調と呼んでいる。制限給餌や強制運動、さらには種々の薬物などによっても暗パルスに類似した位相変化を誘発できることが知られている(Turek et al., 1987; Jilge., 1992; Viswanathan et al., 1994; Redlin et al., 1997; Meyer et al., 1998; Mintz et al., 1999; Davidson et al., 2005)。ところで、SCN は網膜からのグルタミン酸神経投射(RHT)以外に、中脳縫線核からも豊富なセロトニン神経の投射を受けていることが知られている(Morin., 1999)。セロトニン 1B 受容体のアゴニストが光刺激による Fos タンパク質の発現と位相変化をともに抑制することが報告されており(Pickard et al., 1996, 1997) また様々なセロトニン 1A および 7 受容体のアゴニストによって非光同調が惹起されることが種々の実験によって確かめられている(Moriya et al., 1998; Antle et al., 2003; Horikawa et al., 2004)。セロトニン神経系が体内時計の非光同調において重要な役割を果たし、さらには光同調を修飾している可能性が示唆されている。



**図G. SCNに投射する主要な神経経路:** 光同調のための主要な神経経路として網膜からSCNに直接投射するRHTが知られている。一方の非光同調については、中脳縫線核からの5-HT神経の入力が重要であることが推測されている。IGLは網膜からのグルタミン酸神経投射と中脳縫線核からの5-HT神経投射の双方から入力があり、光同調および非光同調のいずれについてもその関与が指摘されている。IGLからSCNに対してはNPYおよびGABAの神経投射があり、SCNの興奮状態に対して抑制的に作用することが推測されている。また、Bz受容体はGABA受容体に存在し、GABAの抑制的な作用を増強していることが考えられている。

SCN はまた外側膝状体 (IGL) からのニューロペプチド Y 神経および GABA 神経の投射を受けていることが知られている (Takatsuji et al., 1989; Michels et al., 1990; Morin et al., 2001)。主観的明期におけるニューロペプチド Y の添加は、SCN 切片の神経発火リズムを位相前進させ、光同調を抑制することが報告されている (Biello et al., 1994, 1995)。一方、GABA<sub>A</sub> 受容体刺激薬であるムシモールを SCN 内に直接投与したり、SCN スライスに添加したとき、行動リズムおよび神経活動リズムはいずれも非光同調型の位相変化を引き起こすことが報告されている (Smith et al., 1989; Tominaga et al., 1994; Novak et al., 2004)。さらに、GABA<sub>B</sub> 受容体刺激薬のバクロフェンについても光同調を抑制することが報告されている (Novak et al., 2004)。非光同調においては、SCN へのニューロペプチド Y および GABA の入力も重要な役割を果たしている可能性が考えられる。

ベンゾジアゼピン系薬物であるトリアゾラムは、主観的明期に投与すると体内時計の位相を前進させることから、非光同調刺激薬と考えられている (Turek et al., 1987; Hastings et al., 1998; Yokota et al., 2005)。ベンゾジアゼピン化合物は GABA<sub>A</sub> 受容体にあるベンゾジアゼピン受容体に結合することによって GABA 受容体のクロライドチャンネルを開き易くし、GABA の効果を増強する作用を有していると考えられている (Strecker et al., 1999)。IGL を破壊すると体内時計の光同調はそれほど影響を受けないが、トリアゾラムによる非光同調については明らかに阻害されることが報告されている (Pickard., 1989)。このような観点から、ベンゾジアゼピンによる非光同調においては、IGL から SCN へ投射している抑制性神経投射が重要であり、その作用点のひとつとして SCN にある GABA 受容体が考えられる。一方で、トリアゾラムによる位相前進はセロトニン神経の破壊によって抑制されることも報告されており、トリアゾラムの非光同調にはセロトニン神経系の関与も必要であることが推測されている (Meyer-Bernstein et al., 1998)。このように、ベンゾジアゼピンによる体内時計の同調機構のメカニズムについては、その作用点が絞りきれないことから未だ不明な点が多い。

近年、強制運動による位相前進時に SCN 内での *Per1* および *Per2* の発現量が抑制されることが報告された (Maywood et al., 1999)。また、セロトニン 1A および 7 受容体作動薬の 8-OH

DPAT を主観的明期に投与し行動リズムの位相前進が起こるときにも、SCN 内で *Per1* および *Per2* の発現量が一過的に減少することも明らかとなった ( Maywood et al., 1999; Horikawa et al., 2000 )。すなわち非光同調時には、SCN 内の時計遺伝子 *Per1* および *Per2* の発現量が抑制されることによって体内時計の規則的な日内変動が影響を受け、それによって最終的な表現型である行動リズムの位相変化が起きているという仮説が示されるようになった。そこで、このような仮説がベンゾジアゼピン系薬物のプロチゾラムにおいても当てはまるか否かについて検討するにあわせて、輪回し行動リズムの位相変化と SCN 内での時計遺伝子発現量という 2 つの指標で、作用点の異なる 8-OH DPAT とプロチゾラムとを比較検討した。なお、以上の検討を行うことにより、体内時計の非光同調機構における GABA 神経系の関与の可能性について明らかにすると同時に、臨床で短時間型睡眠導入薬として汎用されているプロチゾラムが体内時計に対してどのような影響を与えるかについても有意義な情報が得られるものと考えて本研究を遂行した。

## 第 1 節 実験方法

### 実験 4 : 輪回し行動リズムに対するプロチゾラムの効果

トリアゾラムやプロチゾラム ( BRZ ) といった短時間型睡眠導入薬は、体内時計を前進させる必要がある場所での睡眠時刻に服用することで、時差ぼけ軽減に役立つことが知られている。一方、動物を用いた基礎実験においては、主観的明期におけるトリアゾラムの投与が行動リズムの前進を惹起することは多数報告されているが ( Turek et al., 1987; Hastings et al., 1998; Yokota et al., 2005 )、トリアゾラムと同じベンゾジアゼピン系薬物である BRZ については報告が存在しない。そこで実験 4 では、現在の臨床現場においてより一般的に使用されている BRZ を用いた行動薬理学的実験を行い、体内時計に対する BRZ の基本的な効果を検討した。



#### 4-1 実験動物および飼育方法

実験には 3-7 週齢の雄性シリアンハムスターを用いた。飼育方法は 1-1 と同様にした。

#### 4-2 行動量測定装置および測定方法

1-2 と同様にした。

#### 4-3 使用した薬物とその投与方法

ベーリンガーインゲルハイム社から提供された BRZ( レンドルミン )を DMSO により 0.5、1.0、5.0 および 10.0 mg/ml になるように溶解して使用した。投与容量は 1 ml/kg、投与経路は腹腔内投与とした。

#### 4-4 実験スケジュール

恒常暗条件下において、アクトグラム上で少なくとも 2 週間以上安定したフリーランリズムを示した動物に対して実験を行った。1-5 と同様の手法によって実験当日の各個体の活動開始時刻 (CT12) を求め、その CT12 を基準にして CT0、CT3、CT6、CT9、CT12、CT15、CT18 および CT21 に当たる薬物の投与時刻をそれぞれ推定した。各個体ごとに定めた投与時刻において、薄明赤色光の下で投与を行い、直ちに恒暗ロッカー内に戻して 10 - 14 日間安置した。

#### 4-5 輪回し行動リズムの位相変化の評価法

1-6 と同様の手法で行った。すなわち、薬物投与日を境にしてその前後 10 日間の各動物の活動開始時刻に任意に接線を引き、アクトグラム上の実験当日におけるそれら 2 本の接線の距離を測って時間に換算した。接線を引く作業は実験内容を知らせていない第三者が行った。

#### 4-6 統計学的処理

1-7 と同様にした。

### 実験 5 : SCN での時計遺伝子 ( *Per1-3* ) 発現に対する BRZ の効果

実験 4 の結果から、主観的明期 (CT6 および CT9) に BRZ を投与した場合においてのみ行動リズムの位相前進が引き起こされることが明らかとなった。ところで、非光同調因子のひとつである 8-OH-DPAT (セロトニン 1A/7 作動薬) を主観的明期に投与すると、BRZ と同様に行動リズムの前進が引き起こされると同時に SCN 内における時計遺伝子 *Per1* および *Per2* の

mRNA 発現量が減少することが報告されている (Maywood et al., 1999; Horikawa et al., 2000)。そこで、8-OH-DPAT と同様に BRZ の投与によっても時計遺伝子の減少が観察されるか否かを調べる目的で、*in situ* hybridization 法を用いて SCN 内の時計遺伝子の定量を行った。

#### 5-1 実験動物および飼育方法

4-1 と同様にした。

#### 5-2 使用した薬物とその投与方法

4-3 と同様にした。ただし、実験 4 の結果に基づき、BRZ の投与用量は 5 mg/kg とした。

#### 5-3 *in situ* hybridization 法

*in situ* hybridization 法による SCN 内時計遺伝子の定量は 3-6 および 3-7 と同様の手順で行った。また、使用した試薬については 3-3、cRNA プローブについては 3-4、脳サンプルの固定および切片作成法については 3-5 にそれぞれ従った。

#### 5-4 統計学的処理

1-7 と同様にした。

### 実験 6：輪回し行動リズムおよび SCN での *Per1* 発現に対する BRZ および 8-OH DPAT の同時投与の効果

実験 4 および実験 5 の結果から、ベンゾジアゼピンの BRZ を主観的明期に投与すると動物の行動リズムの位相が前進し、それと同時に SCN 内で *Per1* および *Per2* の mRNA の発現減少が起きることが観察された。ところで本実験で使用しているベンゾジアゼピン系薬物以外にもセロトニン作動薬の投与が行動リズムや SCN の神経発火リズムに対してほぼ同様な作用を有することが知られているが、これらの薬物がどのような薬理作用に基づいてこれらの効果を示したのかは不明である。そこでこの点を明らかにする目的でセロトニン 1A/7 受容体の作動薬である 8-OH DPAT を用い、BRZ と 8-OH DPAT の同時投与がどのような効果を示すかを検討した。

## 6-1 実験動物および飼育方法

4-1 と同様にした。

## 6-2 使用した薬物とその投与方法

BRZ の調製は 5-2 と同様にした。(±)8-OH DPAT は RBI 社から購入し、生理食塩水に 0.5 ~ 10.0 mg/ml になるように溶解して調製した。いずれの薬物も、動物の体重 1 kg 当たり 1ml の容量で腹腔内投与した。

## 6-3 *in situ* hybridization 法

5-3 の要領で *in situ* hybridization 法による時計遺伝子の定量を行った。ただし、本実験では時計遺伝子 *Per1* の cRNA プローブ(3-4 に記載)のみ使用し、SCN 内の *Per1* のみを定量した。

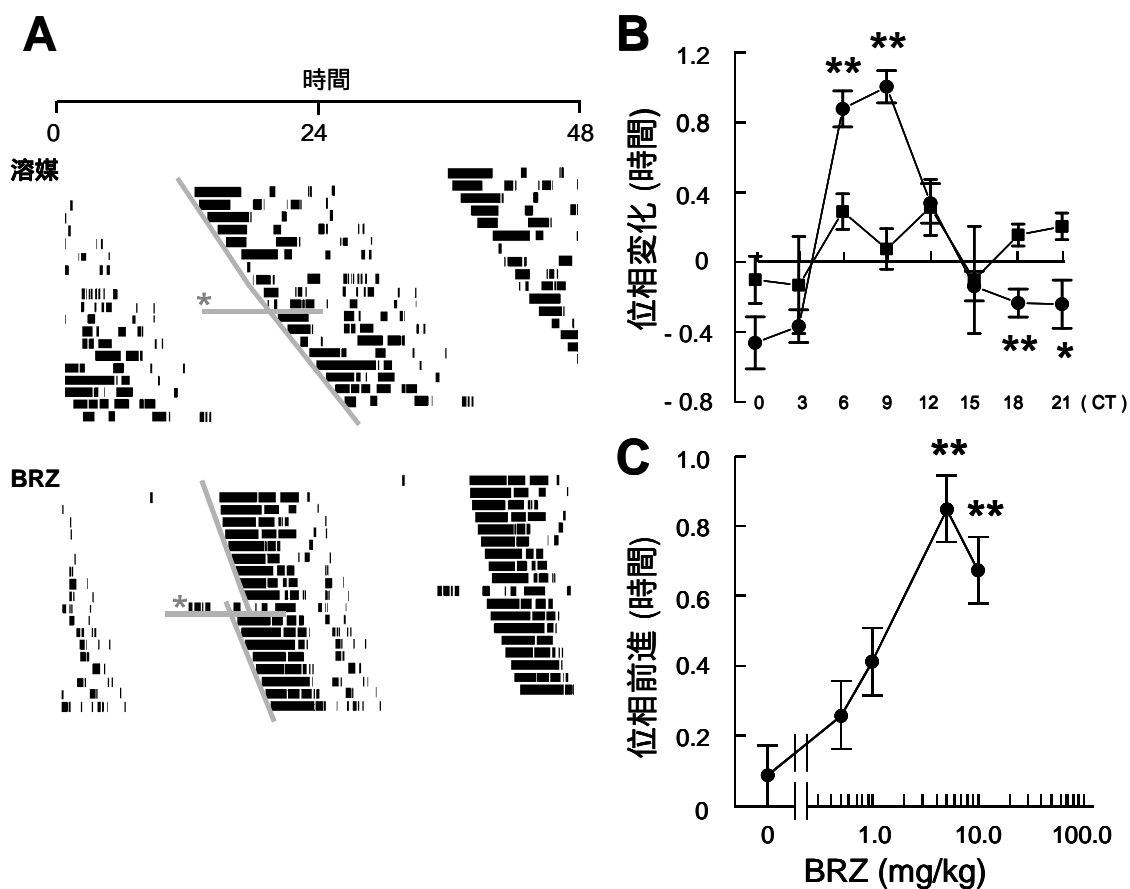
## 6-4 統計学的処理

1-7 と同様にした。

## 第 2 節 実験成績

### 実験 4 : 輪回し行動リズムに対するプロチゾラムの効果

まず CT0、CT3、CT6、CT9、CT12、CT15、CT18 および CT21 の 8 つの時間帯に BRZ を投与した際の基本的な効果を検討した。主観的明期にあたる CT6 および CT9 の時間に BRZ (5 mg/kg) を投与すると輪回し行動リズムの位相前進が引き起こされた(図 6-A, B)。位相前進の大きさは、CT6 では  $0.85 \pm 0.10$  時間、CT9 では  $0.93 \pm 0.10$  時間であった(図 6-B)。また、主観的暗期の終わりにあたる CT18 および CT21 に BRZ を投与すると輪回し行動リズムの位相後退が僅かながら引き起こされ、その位相後退の大きさは CT18 で  $-0.22 \pm 0.08$  時間、CT21 で  $-0.23 \pm 0.13$  時間であった(図 6-B)。一方で CT0、CT3、CT12、CT15 に BRZ を投与した場合には、行動リズムの位相変化は起こらなかった。有意な行動リズムの位相変化が観察された CT6 において、BRZ の用量依存性について調べてみると 5mg/kg 以上の用量で有意な差が検出された(図 6C)。



**図6.** ハムスターの輪回し行動リズムに対するBRZの効果:CT0、CT3、CT6、CT9、CT12、CT15、CT18およびCT21にあたる時刻にBRZ(5 mg/kg, i.p.)を腹腔内投与した際の位相変化を調べた。CT6およびCT9のBRZ投与は位相前進、CT18およびCT21のBRZ投与は位相後退をそれぞれ惹起した(B)。なお、明らかな位相前進作用が観察されたCT6においてBRZもしくは溶媒を投与した際の代表的なアクトグラムをAに示した。また、CT6におけるBRZの用量依存性についても検討した(C)。

\* :  $p < 0.05$ , \*\* :  $p < 0.01$  (Student's t-test or Dunnett's test)

### 実験 5 : SCN での時計遺伝子 (Per1-3) 発現に対する BRZ の効果

まず、SCN 内において時計遺伝子 (Per1-3) が規則正しい日内変動をしていることを確認した。図 7 には in situ hybridization 法による SCN での Per1、Per2 および Per3 の日内変動の定量結果を示しているが、すでに報告されているとおり Per1、Per2 および Per3 はいずれも明期 (CT0~CT12) に高く、暗期 (CT12~CT24) に低いという日内変動を示した。全く同様の手法により、SCN での Per1~Per3 の発現に対する BRZ の効果を検討してみたところ、輪回し行動リズムの位相前進を引き起こした CT6 での BRZ の投与のみが Per1 および Per2 の発現量を

有意に低下させることが明らかとなった(図8)。CT1 および CT20 での BRZ 投与は *Per1*、*Per2* いずれに対しても全く影響を与えず、また *Per3* については、どの時間帯に BRZ を投与しても変化を示さなかった。

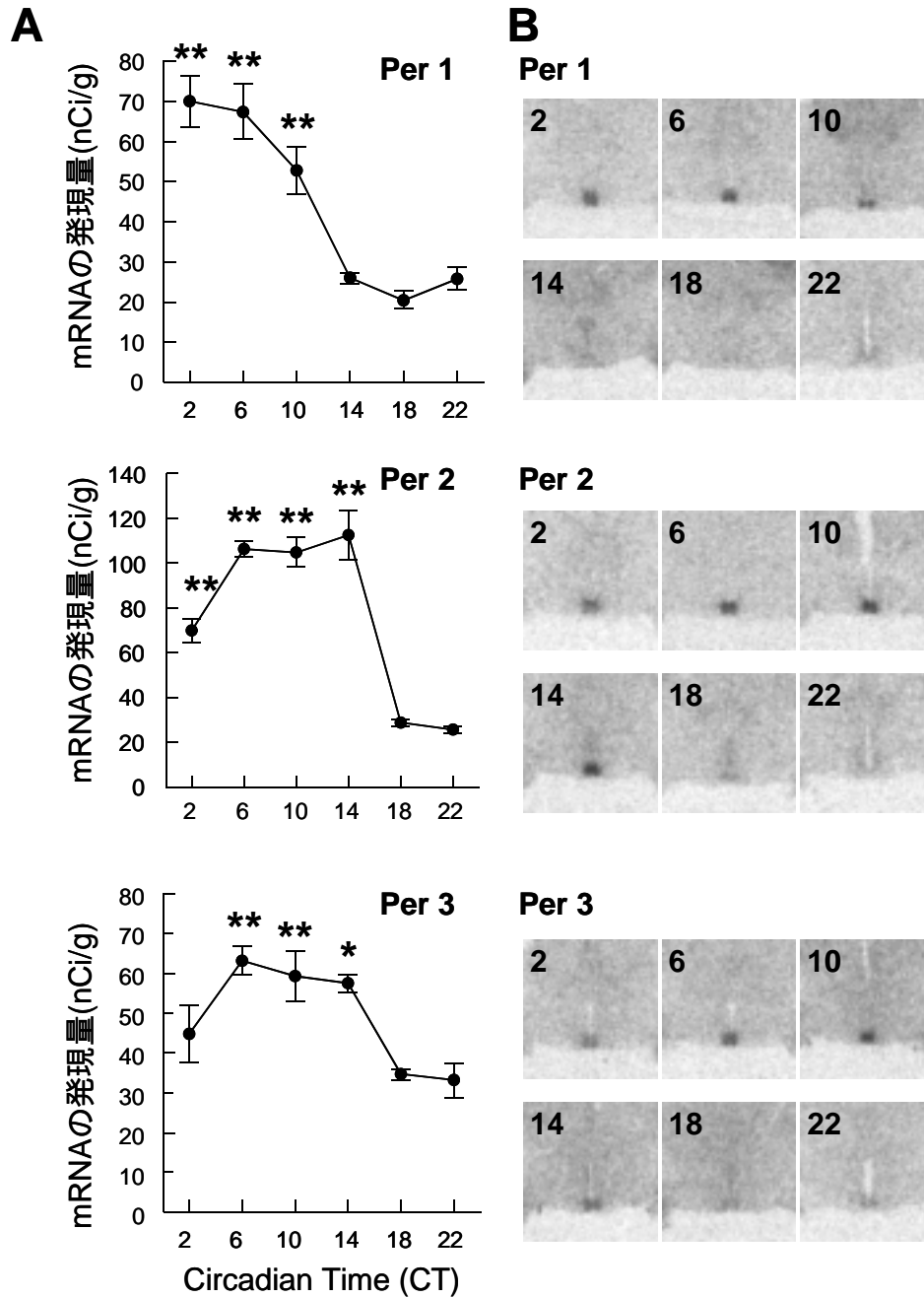


図7. SCN内での*Period* mRNAの日内変動の確認:CT2、CT6、CT10、CT14、CT18およびCT22にあたる時刻におけるSCN内での*Per1*、*Per2*および*Per3*の定量結果をAに示した。また、Bには実際に定量したX線フィルムの像の代表例を示した。  
\* :  $p < 0.05$ , \*\* :  $p < 0.01$  (Dunnett's test)

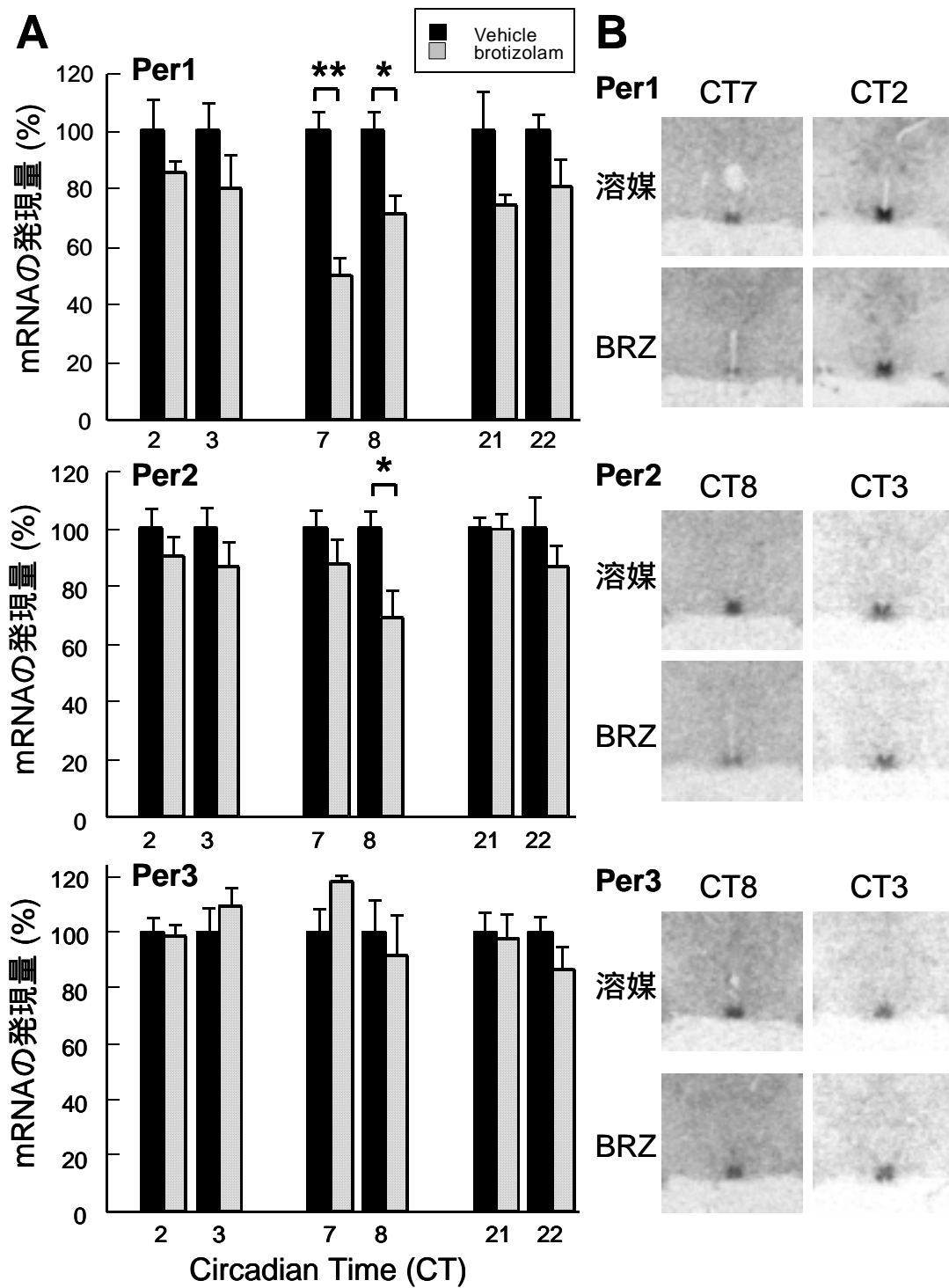
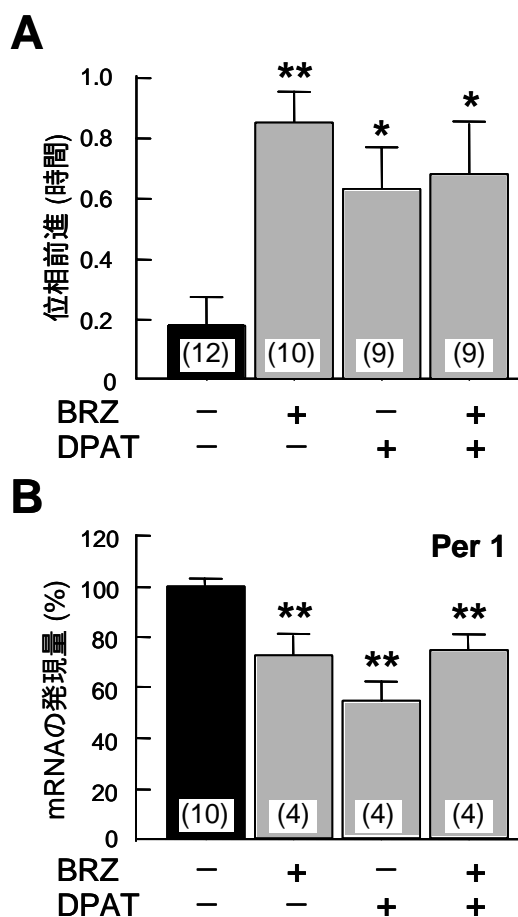


図8. CT1, CT6およびCT20でのBRZ投与によるSCN内の*Period* mRNAの発現量に対する効果:CT1, CT6およびCT20においてBRZを投与し、その1時間後および2時間後にあたる各CTにおけるSCN内での*Per1*, *Per2*および*Per3*の発現量をAに示した。また、Bに実際に定量したX線フィルム像の代表例を示した。CT6にBRZを投与した1時間後および2時間後において、SCN内の*Per1*および*Per2*の発現量が低下した。

\* :  $p < 0.05$ , \*\* :  $p < 0.01$  (Student's *t*-test)

**実験 6 : 輪回し行動リズムおよび SCN での *Per1* 発現に対する BRZ および 8-OH DPAT の同時投与の効果**

CT6 における BRZ および 8-OH DPAT の投与は、いずれも輪回しリズムの位相前進を引き起こした (図 9A)。位相前進の大きさはいずれの薬物でも同程度であり、BRZ では  $0.85 \pm 0.10$  時間、8-OH DPAT では  $0.63 \pm 0.13$  時間であった (図 9A)。また両薬物の単独投与は、いずれも SCN 内における *Per1* の発現量を有意に抑制した (図 9B)。一方で、CT6 において BRZ および 8-OH DPAT を同時投与しても、両薬物の単独投与による効果と同程度の位相前進作用および *Per1* 発現抑制作用を示すのみであり、相加的な効果は認められなかった。



**図9. 輪回し行動リズムおよびSCN内での*Per1* mRNAに対するBRZおよび8-OH DPATの同時投与の効果:**CT6においてBRZ(5 mg/kg)および8-OH DPAT(5 mg/kg)の単独投与もしくは両薬物の同時投与を行った際の輪回し行動リズムの位相変化をAに示した。また薬物投与の2時間後(CT8)におけるSCN内での*Per1*の発現量をBに示した。なお、括弧内の数字は各実験群の例数を示している。

\* :  $p < 0.05$ , \*\* :  $p < 0.01$  (Dunnett's test)

### 第3節 考察

実験5において、主観的明期のCT6に投与したBRZはSCN内で*Per1*および*Per2*の発現量を有意に低下させ、CT20の投与ではわずかに低下させ、CT1の投与では全く影響しなかった。この結果は、実験4で検討したハムスターの行動リズム上におけるBRZの位相変化にも対応していた。すなわち、CT6のBRZ投与は大きな位相前進を引き起こし、またCT20の投与は小さな位相後退を引き起こし、さらにCT1の投与では全く位相変化を引き起こさなかった。以上のことから、非光同調因子として用いたベンゾジアゼピン系薬物のプロチゾラムによって行動上に現れる変化は、SCN内における*Per1*および*Per2*の発現減少と同じタイミングで起こっていることが明らかとなった。ところで、強制運動やセロトニン1A/7受容体アゴニストの8-OH DPATといった非光同調刺激が与えられた際にも、SCNにおいて*Per1*および*Per2*が一過的に減少することが文献報告されている(Maywood et al., 1999; Horikawa et al., 2000)。このように、どのような非光同調刺激が入力したとしても、体内時計の位相が前進する際にはSCNにおいて*Per1*および*Per2*の発現量が一過的に低下するという事実は、SCNにおける時計遺伝子の規則正しい発振が体内時計の根源であり、行動リズムのような最終的な表現形にもそれが反映されるという仮説を支持するものと考えられる。

BRZがSCNのGABA<sub>A</sub>受容体に直接作用したのか、あるいは中脳縫線核など他の脳部位に作用して二次的にSCNの*Per1*や*Per2*の発現を低下させたのかは不明である。BRZなどのベンゾジアゼピン系薬物が非光同調を起こすとき、まずその作用点としてGABA受容体が考えられる。しかしながら、体内時計の同調機構に関与するといわれている主要な神経核、すなわちSCN、IGLおよび中脳縫線核はいずれもGABAを含んでいることが知られており、そのいずれもターゲットとなり得る。Michelsらは、ベンゾジアゼピン系薬物のジアゼパムおよびフルニトラゼパムとGABA<sub>A</sub>受容体との複合体濃度をSCN、IGLおよび中脳縫線核で比較したところ、その濃度はIGLで非常に低く、SCNおよび中脳縫線核で高濃度であったことから、SCNもしくは中脳縫線核にあるGABA<sub>A</sub>受容体がベンゾジアゼピンの作用点であると考察している(Michels et al., 1990)。今回の試験においては、BRZ投与の1時間後には既にSCN内の*Per1*

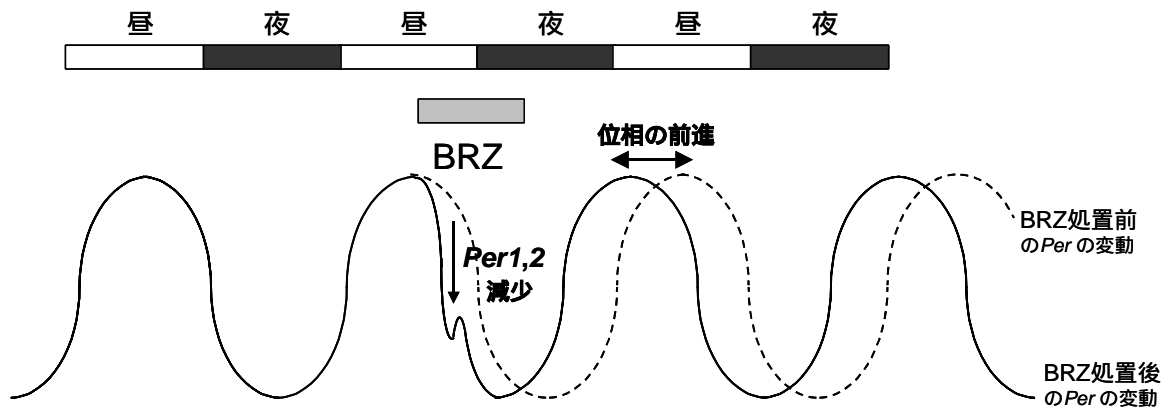


発現量が約半分のレベルまで減少していた。この速やかな *Per1* の発現低下から考えると、少なくとも SCN にある GABA<sub>A</sub> 受容体は作用点となっている可能性が高いことが推測されたが、一方で中脳縫線核に対する作用も考慮する必要が考えられた。

ベンゾジアゼピンによる非光同調とセロトニン 1A/7 受容体作動薬である 8-OH DPAT による非光同調とではそのメカニズムが異なっていることが以前から指摘されている (Schuhler et al., 1999)。例えば、主観的明期に投与したベンゾジアゼピンのトリアゾラムによる行動リズムの位相前進は、IGL の電気破壊によっても 5,7-DHT による 5HT 神経枯渇によっても明らかに阻害されるが、一方で 8-OH DPAT による位相前進は IGL 破壊では阻害されるが、5HT 神経枯渇では阻害されないという (Schuhler et al., 1999)。すなわち、SCN の 5-HT 受容体に直接作用して時計を同調させる 8-OH DPAT に対して、トリアゾラムなどベンゾジアゼピンによる非光同調には中脳縫線核を中心とする 5-HT システムに対する何らかの作用が必要である可能性が考えられる。実験 6 においては、この作用点の異なる 8-OH DPAT および BRZ の 2 剤を用いて、その単独投与および同時投与による行動リズムおよび SCN 内の *Per1* 発現量に対する効果について検討した。その結果、これらの 2 薬物の単独投与と併用投与においては、いずれについても同程度の位相前進と SCN 内の *Per1* 発現量の低下を引き起こした。このことから、BRZ と 8-OH DPAT が有する位相前進作用や時計遺伝子の発現低下は、共通した細胞内情報伝達機構を介していることが考えられた。

BRZ は不眠症の治療に広く使用されている薬物である。今回の結果から、BRZ やトリアゾラムなどベンゾジアゼピン系薬物は、不眠症治療に有用であるのみならず、体内時計の位相前進を期待できる薬物であることが示唆された。したがって、位相前進を強いる時差間の移動時に出現する不眠症に対して BRZ を使用することは、不眠症軽減、時差ぼけ軽減ならびに位相前進促進作用のいずれも期待できる。このことを図 H で模式的に説明する。昼から夕方さらに夜半にかけて BRZ を服用すると *Per1* や *Per2* の一過性の低下が起こり、次の周期の位相が前進する。つまり、*Per1* および *Per2* の発現が減少する時間帯に薬物を投与し、この発現をより早く低下させると、次の発現が早く起こることになる。すなわち、例えば位相の前進を強い

るような移動にともなう時差ぼけや睡眠相位相後退症などにおいて、夕方から夜の前半にBRZを服用することで位相を前にずらすといった治療が考えられる。



**図H. BRZによる体内時計の位相前進作用(模式図):** 今回の検討により、明期(昼)でのBRZの投与は、SCNにおける*Per1*および*Per2*の発現量を減少させることが明らかとなった。すなわち、*Per*が減少していく時間帯でのBRZの投与によって*Per*の減少がより一層早められ、結果としてそれ以降の*Per*の変動周期の位相が前進する可能性が考えられた。

### 第3章 光同調および非光同調機構の相互作用の分子メカニズムの解明

SCN スライスの発火リズムやハムスターの輪回し行動リズムなど多数の研究結果から、光同調と非光同調は互いに抑制的に作用し合うことが推定されている (Ralph et al., 1986, 1989; Joy et al., 1992; Biello et al., 1994, 1995; Penev et al., 1997; Novak et al., 2004)。一方で、本研究においても、第一章では光同調時に SCN 内の時計遺伝子 *Per1* および *Per2* が一過的に上昇することが示され、また第二章では非光同調時に SCN 内の *Per1* および *Per2* の発現減少が認められることが明らかとなった。すなわち、光同調と非光同調とでは SCN 内での *Per1* および *Per2* の発現量変化が正反対になることが明らかとなったが、これらの遺伝子発現量の逆変動により、これまで報告されてきた光同調および非光同調機構の相互作用を説明できる可能性が考えられる。そこで第三章においては、輪回し行動リズムの位相変化と SCN での時計遺伝子の発現量変化という2つの指標から光同調と非光同調との相互作用を検討する実験を行った。

#### 第1節 実験方法

##### 実験7：輪回し行動リズムにおける光照射およびBRZの相互作用

光照射によって引き起こされる行動リズム上の位相変化を、強制運動やいくつかの非光同調刺激薬の前投与が抑制することはこれまでに報告されている (Ralph et al., 1986, 1989; Joy et al., 1992; Penev et al., 1997; Novak et al., 2004)。実験7においては、これまで報告のないBRZの投与によっても光同調が抑制されるか否かについて行動薬理学的実験により検討を行った。

##### 実験8：SCNでの時計遺伝子 (*Per1-3*) 発現に対する光照射およびBRZの相互作用

実験7の結果から、非光同調刺激を惹起させ得る用量のBRZ (5 mg/kg, i.p.) の前投与は、主観的暗期前半 (CT13.5) の光照射で惹起される行動リズムの位相後退に対しては影響を与えないが、主観的暗期の後半 (CT20) における光照射によって引き起こされる位相前進に対しては抑制作用を示すことが明らかとなった。そこで実験8では、光照射に対してBRZが抑制効果を示した時間 (CT20) において、in situ hybridization法を用いてSCN内における時計遺伝子の定量を試みた。

## 第2節 実験成績

### 実験7：輪回し行動リズムにおける光照射およびBRZの相互作用

主観的暗期の前半にあたるCT13.5および後半にあたるCT20の時間においてハムスターに光照射のみを与えた場合、CT13.5では $-0.86 \pm 0.09$ 時間の位相後退、CT20では $2.56 \pm 0.25$ 時間の位相前進がそれぞれ観察された(図10B)。光照射の30分前にBRZ(5 mg/kg)を腹腔内投与することにより、CT20での光照射により惹起される行動リズムの位相前進がほぼ半分の大ききまで抑制された(図10A, B)。一方、CT13.5での光照射により引き起こされる輪回し行動リズムの位相後退に対しては、BRZは全く効果を示さなかった(図10B)。

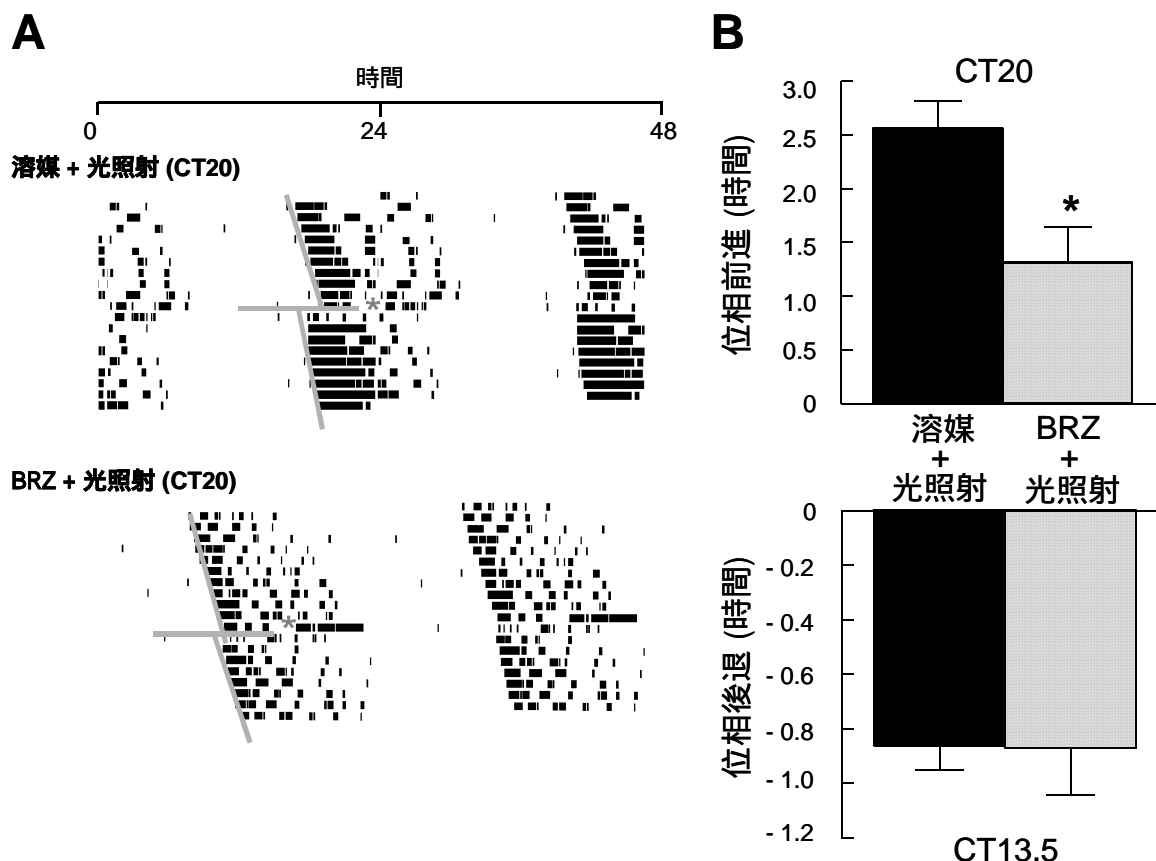


図10. ハムスターの輪回し行動リズムにおける光照射およびBRZの相互作用:主観的暗期の前半にあたるCT13.5および後半にあたるCT20において光照射を行い、その30分前にBRZ(5 mg/kg)もしくはその溶媒を腹腔内投与した(B)。CT20の光照射の30分前にBRZを投与することにより、光による輪回し行動リズムの位相前進が抑制された(アクトグラム代表例をAに示した)。 \* :  $p < 0.05$  (Student's *t*-test)

### 実験 8 : SCN での時計遺伝子 (*Per1-3*) 発現に対する光照射および BRZ の相互作用

CT20 の光照射により、SCN 内における *Per1* および *Per2* の発現量が上昇した(図 11A, B)。この光照射により惹起された *Per1* および *Per2* の発現量増加を BRZ の前投与は、有意に抑制した(図 11A, B)。しかしながら光照射をせずに BRZ のみを投与した場合には、第二章の実験 5 (図 8) の結果と同様、全く効果を示さなかった。また、*Per3* に関しては光照射も BRZ 投与もその発現量に対して全く影響を与えなかった(図 11A, B)。

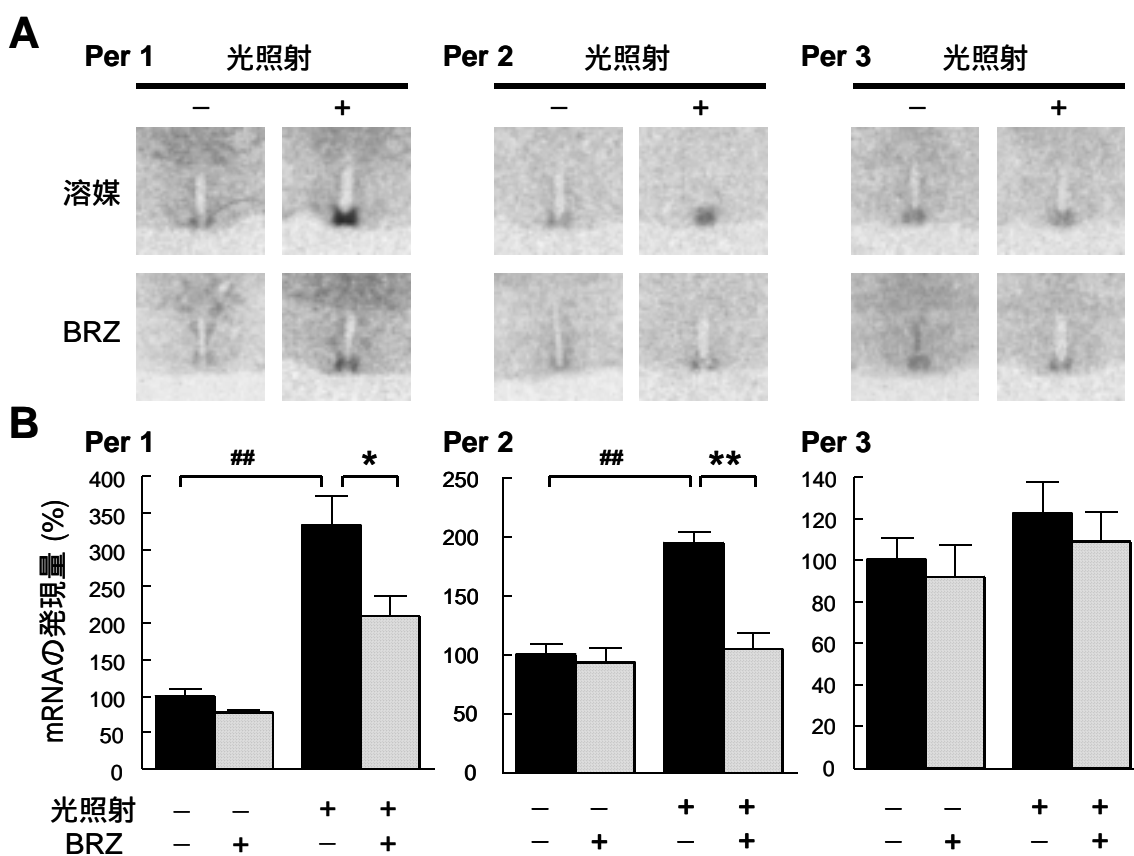


図11. SCN内での*Period* mRNAに対する光照射およびBRZの作用: CT19.5にBRZ(5 mg/kg, i.p.)を投与し、CT20に光照射(5 lux, 15分)を行った後、90分後(CT21.5)の時点で動物を屠殺しSCN内における*Period* mRNAを定量した(A)。なお、Bには実際に定量したX線フィルムの像の代表例を示した。

\* :  $p < 0.05$ , \*\* :  $p < 0.01$  (Tukey's test) ## :  $p < 0.01$  (Tukey's test)

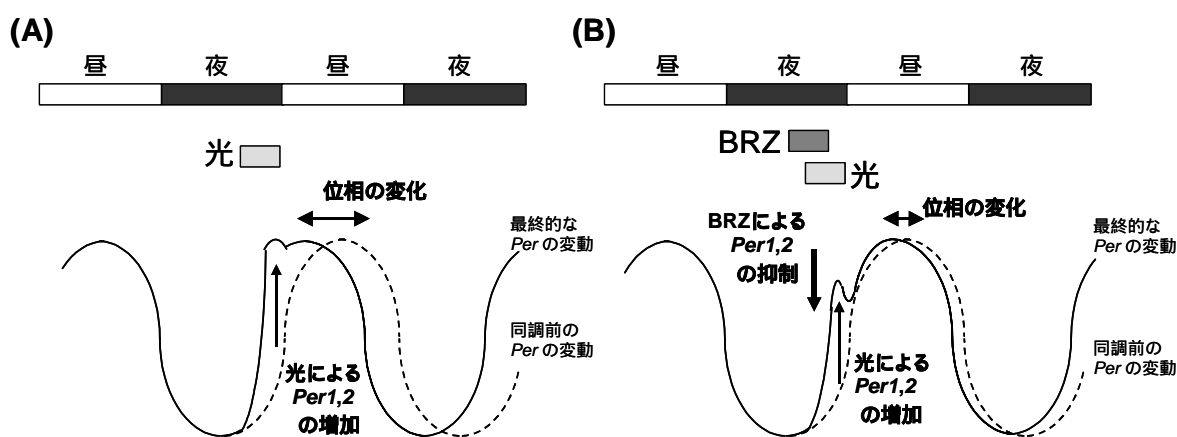
### 第3節 考察

主観的暗期の後半 (CT20) の光刺激によって引き起こされる輪回し行動リズムの位相前進および SCN 内での *Per1* および *Per2* の発現上昇に対して、BRZ の前投与はいずれも抑制効果を示した (図 I)。このことは、光同調時に認められる *Per1* および *Per2* の発現量増加と非光同調時に観察される *Per1* および *Per2* の発現量低下が SCN 内で互いに打ち消されることで最終的なリズム発振が行われることを示していると考えられる。すなわち換言すれば、光同調と非光同調の相互作用が時計遺伝子 *Period* の発現量の変化で説明し得る可能性が示唆された。最近、GABA と同様に非光同調因子と考えられているニューロペプチド Y を明期に投与すると SCN における *Per1* および *Per2* の発現が低下し、それと同時に行動リズムの位相が前進するが、これらの現象がニューロペプチド Y 投与後の光照射によって回復することが報告された (Maywood et al., 2002)。この文献報告や本研究結果は、光同調および非光同調に関わらず、SCN 内における *Per1* および *Per2* が時計の同調機構において重要な分子ターゲットとなり得ることを示唆していると考えられる。一方で、主観的明期における新規輪回し運動 (覚醒レベル上昇) はハムスターの活動リズムの位相を前進させるが、光照射の前にこの新規輪回し運動による非光同調刺激を与えると行動リズムの位相前進は拮抗されるが、SCN 内における *Per1* の発現誘導は阻害されなかったとの報告もある (Edelstein et al., 2003)。本試験結果と上記の 2 報とでは施行した非光同調刺激が異なっているため、それぞれが異なる作用メカニズムを有していることが考えられる。この作用点の違いがそれぞれの試験結果の違いに影響しているものと考えられる。

本試験において、BRZ の主観的暗期の前半 (CT13.5) における投与は、その後の光照射により引き起こされる行動リズムの位相後退に対して全く効果を示さなかった。BRZ と同じベンゾジアゼピンのジアゼパムの投与では、主観的明期の光照射による行動リズムの位相後退および位相前進をいずれについても阻害することが報告されている (Ralph et al., 1986)。しかしながら、光同調を阻害するのに必要とするジアゼパムの投与量は、位相前進の場合と位相後退の場合では異なっており、位相後退を阻害するためにより多くの投与量が必要となることも報

告されている。相対的に GABA 神経系の活性が暗期の前半で高く、後半で低いことがいわれており、その結果として GABA<sub>A</sub> 受容体に対するジアゼパムの作用は暗期の後半で得られ易い可能性が考えられるという (Ralph et al., 1986, 1989)。本試験において、BRZ が主観的暗期の後半においては光同調を抑制しなかった原因は不明であるが、ひとつには体内時計の主要機構における GABA 神経系の相対的な活性が異なり、GABA<sub>A</sub> 受容体に対する BRZ の作用力価が時刻依存的に異なった可能性が考えられる。

主観的暗期の後半、すなわち明け方近くの時間に BRZ を投与することにより、光による位相前進や *Per1* および *Per2* の発現増大が抑制されることが明らかとなった。緒言でも述べたように、我々ヒトの体内時計は 24 時間よりやや長いいため、通常は早朝の光暴露で体内時計を 30 分ほど前進させて、外界の 24 時間周期に合わせているわけであるが、BRZ の服用があまりに遅く、朝の光で体内時計を同調させる時にもこの薬物が体内に十分量存在すると、そのリセットが悪くなる可能性が示唆された。BRZ の血漿濃度半減期は約 7 時間であり、しばしば持ち越し効果が発生することも知られている。朝の光を浴びたときの健全な体内時計のリセットを阻害しないためにも早めの時間帯に服用することが、BRZ をはじめとするベンゾジアゼピン系薬剤のリスク・ベネフィットを最大限に生かすことに繋がると考えられた。



**図I. BRZによる光同調の抑制効果(模式図):** 光照射によって発現上昇した*Per1*および*Per2*に対してBRZの前投与が抑制的に作用し、光による体内時計の位相変化を減弱させた(B)。なお、Aには光照射のみを行った場合の体内時計の同調の仕組みを模式的に示した。

## 総括

最近では、ヒトにおいて時計遺伝子とリズム障害との関連性に関する研究報告も数多くなされるようになってきた。例えば、*Per2* が睡眠相前進症候群や季節性感情障害などの疾患と関係している可能性が報告され、また *Per3* のリピート配列の長さがヒトにおける朝型-夜型の嗜好性に関与していることも報告された( Toh et al., 2001; Archer et al., 2003; Pereira et al., 2005; Xu et al., 2005 )。これらの報告は、ヒトの体内時計についても時計遺伝子 *Period* がその駆動に中心的な役割を果たしており、疾患の治療等におけるターゲットになり得ること、さらには個人的な嗜好や感情などといった複雑な高次脳機能においても重要な役割を果たしている可能性を示唆するものと考えられる。

一方で基礎実験においても、時計遺伝子 *Period* と同様に体内時計の発振中枢に必要不可欠であることが考えられている時計遺伝子 *Clock* の変異マウスが摂餌量をコントロールできずに肥満などの代謝異常を示すことがごく最近報告された( Turek et al., 2005 )。体内時計の異常は生体の正常な機能の維持に重大な影響を与えることが考えられるが、近年問題になっている代謝性疾患などいわゆる慢性病の病因の究明や治療法の開発を目指す上でも体内時計の同調や発振のメカニズム解明が有益な情報をもたらす可能性が考えられる。本研究においては、ハムスターを用いて SCN 内に発現する時計遺伝子 *Period* と輪回し行動リズムの位相という2つの指標を体内時計の機能の表現形とみなして、体内時計の同調機構の解明を目指した。またその結果として、光同調の入力機構においては CaMKII のリン酸化が重要であること、GABA 神経系が非光同調において重要な役割を果たしていること、非光同調時に *Per1* および *Per2* の発現減少が観察されること、さらに光同調と非光同調の相互作用が時計遺伝子 *Period* の発現量の相殺によって起こっている可能性が明らかとなった。今回の研究で得られた知見の全てがヒトにも共通する現象とはなり得ないだろうが、少なくともその一部はヒトにも応用可能な知識となり、疾病の治療などにも繋がっていくことが考えられる。

先進国においては、交代制(シフト)勤務の従事者が全労働人口の 30% 近くに達するという。また交通機関の発達に伴い、海外出張や海外旅行などで時差の大きな地域への移動を日常



的に行う人も急速に増加した。こうした人々が、睡眠障害に起因する心身の不調を訴えることがしばしばあり、これらの症例に対して、高照度光照射やメラトニンの内服といった治療が一定の効果を示すことが知られている。本研究においては、現在も臨床において頻繁に用いられている睡眠導入剤である BRZ が体内時計の同調を刺激することが明らかとなり、高照度療法やメラトニンに加えて、BRZ の内服がリズム異常の治療に使用できる可能性が考えられた。

本研究の遂行によって得られた新たな知見が、未知なる脳高次機能の解明の一助となり、疾患の治療や生活の質の改善に繋がることを確信する。

## 参考文献

- Amato SF, Nakajima K, Hirano T, Chiles TC (1996) Transcriptional regulation of the junB promoter in mature B lymphocytes. Activation through a cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-like binding site. *J Immunol.* 157, 146-155.
- Akashi M, Nishida E (2000) Involvement of MAP kinase cascade in resetting of the mammalian circadian clock. *Genes Dev.* 14, 645-649.
- Antle MC, Ogilvie MD, Pickard GE, Mistlberger RE. (2003) Response of the mouse circadian system to serotonin 1A/2/7 agonists in vivo: surprisingly little. *J Biol Rhythms.* 18, 145-158.
- Archer SN, Robilliard DL, Skene DJ, Smits M, Williams A, Arendt J, von Schantz M. (2003) A length polymorphism in the circadian clock gene Per3 is linked to delayed sleep phase syndrome and extreme diurnal preference. *Sleep.* 26, 413-415.
- Biello SM, Janik D, Mrosovsky N. (1994) Neuropeptide Y and behaviorally induced phase shifts. *Neuroscience.* 62, 273-279.
- Biello SM, Mrosovsky N. (1995) Blocking the phase-shifting effect of neuropeptide Y with light. *Proc Biol Sci.* 259, 179-187.
- Cheng HY, Obrietan K, Cain SW, Lee BY, Agostino PV, Joza NA, Harrington ME, Ralph MR, Penninger JM. (2004) Dexas1 potentiates photic and suppresses nonphotic responses of the circadian clock. *Neuron.* 43, 715-728.
- Cui LN & Dyball (1996) Synaptic input from the retina to the suprachiasmatic nucleus changes with the light-dark cycle in the Syrian hamster. *J Physiol (Lond).* 497, 483-493.
- Davidson AJ, Tataroglu O, Menaker M. (2005) Circadian Effects of Timed Meals (and Other Rewards). *Methods Enzymol.* 393, 509-523.
- Ding JM, Chen D, Weber ET, Faiman LE, Rea MA, Gillette MU. (1994) Resetting the biological clock: mediation of nocturnal circadian shifts by glutamate and NO. *Science.* 266, 1713-1717.

- Ding JM, Faiman LE, Hurst WJ, Kuriashkina LR, Gillette MU. (1997) Resetting the biological clock: mediation of nocturnal CREB phosphorylation via light, glutamate, and nitric oxide. *J Neurosci.* 17, 667-675.
- Dunlap JC (1999) Molecular bases for circadian clocks. *Cell.* 96, 271-290.
- Ebling FJ (1996) The role of glutamate in the photic regulation of the suprachiasmatic nucleus. *Prog Neurobiol.* 50, 109-132.
- Edelstein K, de la Iglesia HO, Schwartz WJ, Mrosovsky N. (2003) Behavioral arousal blocks light-induced phase advances in locomotor rhythmicity but not light-induced Per1 and Fos expression in the hamster suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience.* 118, 253-261.
- Ellis GB, McKlveen RE, Turek FW. (1982) Dark pulses affect the circadian rhythm of activity in hamsters kept in constant light. *Am J Physiol.* 242, R44-50.
- Fukunaga K, Goto S, Miyamoto E (1988) Immunohistochemical localization of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II in rat brain and various tissues. *J Neurochem.* 51, 1070-1078.
- Fukunaga K, Horikawa K, Shibata S, Takeuchi Y, Miyamoto E. (2002) Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II-dependent long-term potentiation in the rat suprachiasmatic nucleus and its inhibition by melatonin. *J Neurosci Res.* 70, 799-807.
- Fukushima T, Shimazoe T, Shibata S, Watanabe A, Ono M, Hamada T, Watanabe S (1997) The involvement of calmodulin and Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II in the circadian rhythms controlled by the suprachiasmatic nucleus. *Neurosci Lett.* 227, 45-48.
- Golombek DA & Ralph MR (1994) KN-62, an inhibitor of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin kinase II, attenuates circadian responses to light. *Neuroreport.* 5, 1638-1640.
- Golombek DA & Ralph MR (1995) Circadian responses to light: the calmodulin connection. *Neurosci Lett.* 192, 101-104.

- Glazewski S, Giese KP, Silva A, Fox K (2000) The role of alpha-CaMKII autophosphorylation in neocortical experience-dependent plasticity. *Nat Neurosci.* 3, 911-918.
- Hallbeck M, Blomqvist A, Hermanson O (1996) Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase II immunoreactivity in the rat hypothalamus. *Neuroreport.* 7, 1957-1960.
- Hasegawa M, Hatter S, Eskin A, Cahill GM (1999) An inhibitor of p38 MAP kinase resets the circadian oscillator in cultured Xenopus retinal photoreceptors. *International Congress on Chronobiology.* 70, 71.
- Hastings MH, Duffield GE, Smith EJ, Maywood ES, Ebling FJ. (1998) Entrainment of the circadian system of mammals by nonphotic cues. *Chronobiol Int.* 15, 425-445.
- Hastings MH, Herzog ED. (2004) Clock genes, oscillators, and cellular networks in the suprachiasmatic nuclei. *J Biol Rhythms.* 19, 400-413.
- Hirota T, Fukada Y. (2004) Resetting mechanism of central and peripheral circadian clocks in mammals. *Zoolog Sci.* 21, 359-368.
- Horikawa K, Yokota S, Fuji K, Akiyama M, Moriya T, Okamura H, Shibata S (2000) Non-photic entrainment by 5-HT<sub>1A/7</sub> receptor agonists accompanied by Reduced Per1 and Per2 expression. *J Neurosci.* 20, 5867-5873.
- Horikawa K, Shibata S. (2004) Phase-resetting response to (+)8-OH-DPAT, a serotonin 1A/7 receptor agonist, in the mouse in vivo. *Neurosci Lett.* 368, 130-134.
- Impey S, Obrietan K, Wong ST, Poser S, Yano S, Wayman G, Deloulme JC, Chan G, Storm DR (1998) Cross talk between ERK and PKA is required for Ca<sup>2+</sup> stimulation of CREB-dependent transcription and ERK nuclear translocation. *Neuron.* 21, 869-883.
- Jilge B. (1992) Restricted feeding: a nonphotic zeitgeber in the rabbit. *Physiol Behav.* 51, 157-166.
- Joy JE, Turek FW. (1992) Combined effects on the circadian clock of agents with different phase response curves: phase-shifting effects of triazolam and light. *J Biol Rhythms.* 7, 51-63.

- Kasahara J, Fukunaga K, Miyamoto E (1999) Differential effects of a calcineurin inhibitor on glutamate-induced phosphorylation of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinases in cultured rat hippocampal neurons. *J Biol Chem.* 274, 9061-9067.
- Kawasaki H, Morooka T, Shimohama S, Kimura J, Hirano T, Gotoh Y, Nishida E (1997) Activation and involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in glutamate-induced apoptosis in rat cerebellar granule cells. *J Biol Chem.* 272, 18518-18521.
- Lisman J, Malenka RC, Nicoll RA, Malinow R (1997) Learning mechanisms: the case for CaM-KII. *Science.* 276, 2001-2002.
- Maywood ES, Mrosovsky N, Field MD, Hastings MH. (1999) Rapid down-regulation of mammalian period genes during behavioral resetting of the circadian clock. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96, 15211-15216.
- Maywood ES, Okamura H, Hastings MH. (2002) Opposing actions of neuropeptide Y and light on the expression of circadian clock genes in the mouse suprachiasmatic nuclei. *Eur J Neurosci.* 15, 216-220.
- Mendoza JY, Dardente H, Escobar C, Pevet P, Challet E. (2004) Dark pulse resetting of the suprachiasmatic clock in Syrian hamsters: behavioral phase-shifts and clock gene expression. *Neuroscience.* 127, 529-537.
- Meyer-Bernstein EL, Morin LP. (1998) Destruction of serotonergic neurons in the median raphe nucleus blocks circadian rhythm phase shifts to triazolam but not to novel wheel access. *J Biol Rhythms.* 13:494-505.
- Meyer JL, Hall AC, Harrington ME (1998) Histamine phase shifts the hamster circadian pacemaker via an NMDA dependent mechanism. *J Biol Rhythms.* 13, 288-295.
- Michels KM, Morin LP, Moore RY. (1990) GABAA/benzodiazepine receptor localization in the circadian timing system. *Brain Res.* 531, 16-24.

- Mintz EM, Marvel CL, Gillespie CF, Price KM, Albers HE (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.
- Morin LP. (1999) Serotonin and the regulation of mammalian circadian rhythmicity. *Ann Med.* 31:12-33.
- Morin LP, Blanchard JH. (2001) Neuromodulator content of hamster intergeniculate leaflet neurons and their projection to the suprachiasmatic nucleus or visual midbrain. *J Comp Neurol.* 437, 79-90.
- Moriya T, Yoshinobu Y, Ikeda M, Yokota S, Akiyama M, Shibata S. (1998) Potentiating action of MKC-242, a selective 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist, on the photic entrainment of the circadian activity rhythm in hamsters. *Br J Pharmacol.* 125, 1281-1287.
- Nakajima K, Kusafuka T, Takeda T, Fujitani Y, Nakae K, Hirano T (1993) Identification of a novel interleukin-6 response element containing an Ets-binding site and a CRE-like site in the junB promoter. *Mol Cell Biol.* 13, 3027-3041.
- Nomura K, Takeuchi Y, Yamaguchi S, Okamura H, Fukunaga K. (2003) Involvement of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in the induction of mPer1. *J Neurosci Res.* 72, 384-392.
- Novak CM, Ehlen JC, Huhman KL, Albers HE. (2004) GABA(B) receptor activation in the suprachiasmatic nucleus of diurnal and nocturnal rodents. *Brain Res Bull.* 63, 531-535.
- Novak CM, Albers HE. (2004) Circadian phase alteration by GABA and light differs in diurnal and nocturnal rodents during the day. *Behav Neurosci.* 118, 498-504.
- Obrietan K, Impey S, Smith D, Athos J, Storm DR (1999) Circadian regulation of cAMP response element-mediated gene expression in the suprachiasmatic nuclei. *J Biol Chem.* 274, 17748-17756.
- Obrietan K, Impey S, Storm DR (1998) Light and circadian rhythmicity regulate MAP kinase activation in the suprachiasmatic nuclei. *Nat Neurosci.* 1, 693-700.
- Penev PD, Zee PC, Turek FW. (1997) Serotonin in the spotlight. *Nature.* 385, 123.

- Pereira DS, Tufik S, Louzada FM, Benedito-Silva AA, Lopez AR, Lemos NA, Korczak AL, D'Ameida V, Pedrazzoli M. (2005) Association of the length polymorphism in the human Per3 gene with the delayed sleep-phase syndrome: does latitude have an influence upon it? *Sleep*. 28, 29-32.
- Pickard GE. (1989) Entrainment of the circadian rhythm of wheel-running activity is phase shifted by ablation of the intergeniculate leaflet. *Brain Res*. 494, 151-154.
- Pickard GE, Rea MA. (1997) TFMPP, a 5HT1B receptor agonist, inhibits light-induced phase shifts of the circadian activity rhythm and c-Fos expression in the mouse suprachiasmatic nucleus. *Neurosci Lett*. 231, 95-98.
- Pickard GE, Weber ET, Scott PA, Riberdy AF, Rea MA. (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, 8208-8020.
- Pizzio GA, Hainich EC, Ferreyra GA, Coso OA, Golombek DA (2003) Circadian and photic regulation of ERK, JNK and p38 in the hamster SCN. *Neuroreport*. 14, 1417-1419.
- Ralph MR, Menaker M. (1986) Effects of diazepam on circadian phase advances and delays. *Brain Res*. 372, 405-408.
- Ralph MR, Menaker M. (1989) GABA regulation of circadian responses to light. I. Involvement of GABAA-benzodiazepine and GABAB receptors. *J Neurosci*. 9, 2858-2865.
- Redlin U, Mrosovsky N. (1997) Exercise and human circadian rhythms: what we know and what we need to know. *Chronobiol Int*. 14, 221-229.
- Rosenwasser AM, Dwyer SM. (2001) Circadian phase shifting: Relationships between photic and nonphotic phase-response curves. *Physiol Behav*. 73, 175-183.
- Rosenwasser AM, Dwyer SM. (2002) Phase shifting the hamster circadian clock by 15-minute dark pulses. *J Biol Rhythms*. 17, 238-47.
- Sanada K, Hayashi Y, Harada Y, Okano T, Fukada Y (2000) Role of circadian activation of mitogen-activated protein kinase in chick pineal clock oscillation. *J Neurosci*. 20, 986-991.

- Sassone-Corsi P, Visvader J, Ferland L, Mellon PL, Verm IM (1988) Induction of proto-oncogene fos transcription through the adenylate cyclase pathway: characterization of a cAMP-responsive element. *Genes Dev.* 2, 1529-1538.
- Schuhler S, Pitrosky B, Saboureau M, Lakhdar-Ghazal N, Pevet P. (1999) Role of the thalamic intergeniculate leaflet and its 5-HT afferences in the chronobiological properties of 8-OH-DPAT and triazolam in syrian hamster. *Brain Res.* 849, 16-24.
- Schurov IL, McNulty S, Best JD, Sloper PJ, Hastings MH. (1999) Glutamatergic induction of CREB phosphorylation and Fos expression in primary cultures of the suprachiasmatic hypothalamus in vitro is mediated by co-ordinate activity of NMDA and non-NMDA receptors. *J Neuroendocrinol.* 11, 43-51.
- Sheng M, Thompson MA, Greenberg ME (1991) CREB: a Ca(2+)-regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin-dependent kinases. *Science.* 252, 1427-1430.
- Smith RD, Inouye S, Turek FW. (1989) Central administration of muscimol phase-shifts the mammalian circadian clock. *J Comp Physiol [A].* 164, 805-814.
- Strecker GJ, Park WK, Dudek FE. (1999) Zinc and flunitrazepam modulation of GABA-mediated currents in rat suprachiasmatic neurons. *J Neurophysiol.* 81, 184-191.
- Takao K, Okamoto K, Nakagawa T, Neve RL, Nagai T, Miyawaki A, Hashikawa T, Kobayashi S, Hayashi Y. (2005) Visualization of synaptic Ca<sup>2+</sup> /calmodulin-dependent protein kinase II activity in living neurons. *J Neurosci.* 25, 3107-3112.
- Takatsuji K, Tohyama M. (1989) Geniculo-geniculate projection of enkephalin and neuropeptide Y containing neurons in the intergeniculate leaflet of the thalamus in the rat. *J Chem Neuroanat.* 2, 19-27.
- Toh KL, Jones CR, He Y, Eide EJ, Hinz WA, Virshup DM, Ptacek LJ, Fu YH. (2001) An hPer2 phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phase syndrome. *Science.* 291, 1040-1043.



- Tominaga K, Shibata S, Hamada T, Watanabe S. (1994) GABAA receptor agonist muscimol can reset the phase of neural activity rhythm in the rat suprachiasmatic nucleus in vitro. *Neurosci Lett.* 166, 81-84.
- Turek FW, Joshu C, Kohsaka A, Lin E, Ivanova G, McDearmon E, Laposky A, Losee-Olson S, Easton A, Jensen DR, Eckel RH, Takahashi JS, Bass J. (2005) Obesity and Metabolic Syndrome in Circadian Clock Mutant Mice. *Science.* 308. 1043-1045.
- Turek FW, Losee-Olson S. (1987) Entrainment of the circadian activity rhythm to the light-dark cycle can be altered by a short-acting benzodiazepine, triazolam. *J Biol Rhythms.* 2, 249-260.
- Turek FW, Losee-Olson SH. (1987) Dose response curve for the phase-shifting effect of triazolam on the mammalian circadian clock. *Life Sci.* 40, 1033-1008.
- Viswanathan N, Weaver DR, Reppert SM, Davis FC (1994) Entrainment of the fetal hamster circadian pacemaker by prenatal injections of the dopamine agonist SKF 38393. *J Neurosci.* 14, 5393-5398.
- Xing J, Ginty DD, Greenberg ME (1996) Coupling of the RAS-MAPK pathway to gene activation by RSK2, a growth factor-regulated CREB kinase. *Science.* 16, 273, 959-963.
- Xu Y, Padiath QS, Shapiro RE, Jones CR, Wu SC, Saigoh N, Saigoh K, Ptacek LJ, Fu YH. (2005) Functional consequences of a CK1delta mutation causing familial advanced sleep phase syndrome. *Nature.* 434, 640-644.
- Yokota Si, Horikawa K, Akiyama M, Moriya T, Ebihara S, Komuro G, Ohta T, Shibata S. (2000) Inhibitory action of brotizolam on circadian and light-induced Per1 and Per2 expression in the hamster suprachiasmatic nucleus. *Br J Pharmacol.* 131, 1739-1747.
- Yokota Si, Moriya T, Shibata S. (2005) Inhibitory Action of 5-HT1A Agonist MKC-242 on Triazolam-induced Phase Advances in Hamster Circadian Activity Rhythms. *J Pharmacol.Sci.* 98, 103-106.

## 謝辞

本稿を終えるにあたり終始暖かい御指導と御鞭撻を賜りました柴田重信教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究を遂行するにあたり実験の現場で最も全般的な御指導を戴いた長崎大学医学部の守屋孝洋助手に厚く感謝致します。最後に、本研究の博士学位申請に際し快く主査を引き受けて下さいました山内兄人教授に心から御礼を申し上げます。