

緒言

環境に適応することは、生物が生命活動を行う上で非常に重要なことである。生物は環境に適応するための様々な生体システムを持っている。これらの生体システムは遺伝情報として DNA に保存されている。この遺伝情報に刻まれた生体システムの内、ほとんどの生物が持つものの一つとして、概日リズムと呼ばれる約 24 時間を 1 周期とするリズム変動がある。概日リズムは生物の体内にある時計（体内時計）によって刻まれる内因性リズムで、睡眠や体温などのさまざまな生理現象で観察することができる。生物は、外界の明暗周期とほぼ一致している概日リズムによって生理現象を支配し、活動を外界の明暗周期に同調させることによって、より効率良く、円滑に生命活動を営むことができる。

哺乳類においては、体内時計は脳の視床下部領域にある視交差上核 (suprachiasmatic nucleus: SCN) と呼ばれる左右一対の神経核であることが知られている (Ralph et al., 1990; Shibata and Moore, 1988; Stephan and Zucker, 1972)。1994 年、概日リズムの形成に関連している遺伝子 Clock がマウスで発見された (Vitaterna et al., 1994)。哺乳類において体内時計遺伝子が発見されたのはこれが初めてであった。以降、BMAL1 や既にショウジョウバエにおいて見つかった Period (Per), Timeless (Tim), cryptochrome (Cry) のホモログなどの体内時計遺伝子が次々とクローニングされ、現在に至っている (Gekakis et al., 1998; Jin et al., 1999; Miyamoto and Sancar, 1998; Sun et al., 1997)。これらの哺乳類における体内時計遺伝子がどのように機能することで概日リズムを形成しているかは、いまだ断定されてはいないが、現在考えられている概日リズム形成モデルとしては以下のようなものがある。

BMAL1 と CLOCK の蛋白質の二量体が核内に移行し、Per や Cry といった遺伝子の上流にある E box に作用して転写を促進させる。転写され作られた PER や CRY の蛋白質は核内に移行し、BMAL1/CLOCK 蛋白質の二量体による Per や Cry といった遺伝子の転写を抑制するネガティブフィードバックループを形成する。このネガティブフィードバックループにより PER や CRY の蛋白質の発現に概日リズムが形成されるというものである (Kume et al., 1999) (図 1)。このように分子レベルで形成された概日リズムが、どのように SCN の細胞レベルにおける概日リズムを発現させるかは不明である。

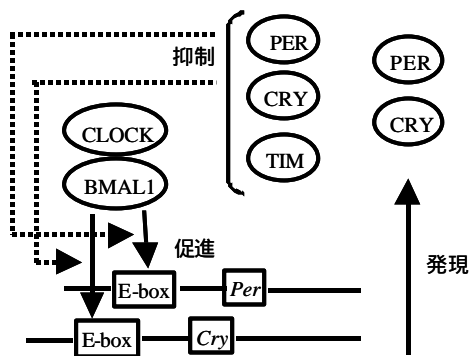


図1 体内時計遺伝子のネガティブフィードバックループモデル
 CLOCK, BMAL1蛋白質の二量体による、Per,Cry mRNA発現の転写促進を、PER, CRY, TIMLESS (TIM)蛋白質が抑制することで、PER, CRY の発現に概日リズムが形成されるというのが現在提唱されている仮説である。

さて、SCN ではこのように一定の周期の概日リズムを形成しているが、外界の明暗周期は常に一定ではない。地球上のほとんどの地域では季節によって昼の長さが変化する。生物はこの現象に対しても適応をはたしている。SCN は概日リズムを形成するだけでなく、外界の明暗周期に概日リズムを同調させる機構も備えている。中でも重要なのは光による概日リズムの位相変化(光同調)である。目から入った外界の光は網膜によって受容され、網膜から SCN へ投射しているグルタミン酸神経の経路、網膜視床下部路 (retinohypothalamic tract: RHT) を介して SCN へと伝えられ、概日リズムの位相を変化させる。光同調においては、光を当てた時の体内時計の時刻によって位相の変化量や、位相が前進するか後退するかなどが変わることが知られている。体内時計の時刻は外界で我々が日常用いている時計の刻む時刻とは異なっており、動物が夜だと感じている時間帯を主観的夜とし、昼だと感じている時間帯を主観的昼として定め、外界の時刻と区別するためにサーカディアンタイム (circadian time: CT) と呼ぶ。この体内時計の時刻である CT は、夜行性動物の場合、活動期の始まりである主観的夜の始まりを CT12 と定める。一方、外界の明暗周期に従った時刻はツァイトゲバータイム (zeitgeber time: ZT) と呼び、明期の始まりを ZT0 と定める。体内時計の時刻と光同調の関係は、夜行性動物を例にとると、活動期である主観的暗期の始め辺りに光を当てることで位相は後退し、主観的暗期の終わり辺りに光を当てることで位相は前進する。しかし、主観的明期では光を当てても位相は変化しない。これらの光による概日リズムの同調においてもリズム発振と同様に遺伝子レベルでの研究が進められている。光による行動の位相変化の起きる時刻に光を照射することによって、SCN における mPer1, mPer2 mRNA の発現量が一過性に増加したという報告や(Shigeyoshi et al., 1997; Takumi et al., 1998; Zylka et al., 1998)、光照射による概日リズムの位相後退を mPer1 のアンチセンスオリゴヌクレオチド投与によって阻害したという報告(Akiyama et al., 1999)がなされて

いる。このことから、光による概日リズムの位相変化には SCN における mPer1 の一過性の発現が重要であると考えられている。

そこで第 1 章では、mPer1 のプロモーター領域を持つルシフェラーゼの遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウス (Yamaguchi et al., 2000) を用いて、in vitro で長期にわたるリアルタイムでの観測が可能な実験系を確立し、NMDA を投与した際の生物発光のリズムの変化を観察することで、概日リズムの位相変化における mPer1 遺伝子の発現の詳細を検討した (図 2)。

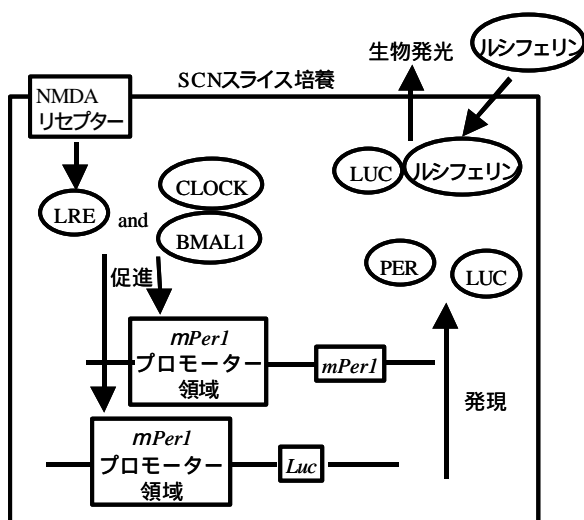


図2 mPer1-luc トランスジェニックマウスの SCN スライス培養を用いた in vitro での実験系

mPer1 遺伝子のプロモーター領域を上流につないだルシフェラーゼ (Luc) 遺伝子は mPer1 遺伝子と同様の発現パターンを示す。LUC 蛋白質はルシフェリンと反応して発光する。NMDA の投与により CREB や Fos などの光同調の際に反応する分子 (light responsive element: LRE) が mPer1 及び Luc 遺伝子の発現を促進する。その発現の詳細を生物発光を指標として観察した。

ところで、概日リズムにも他の生理現象と同様に、ある時期から老化による障害が現れる。老化によるリズム障害については、行動レベルから細胞レベルまでの研究はなされてきたが、体内時計遺伝子の発現レベルで調べた研究はいまだなされていない。そこで第 2 章では老齢動物を用い、老化によるリズム障害は体内時計の発振機構の障害で起きているのではないかとこの仮説のもと、各体内時計遺伝子の発現に対する老化の影響を検討した (図 3)。

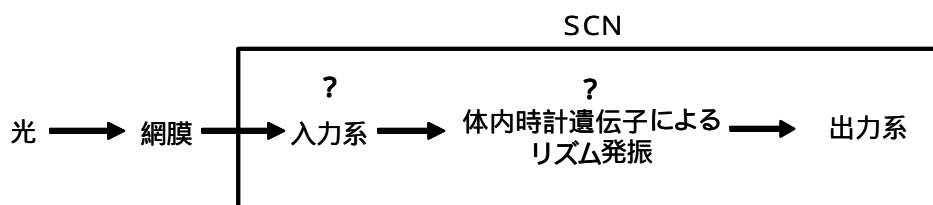


図3 老化による概日リズム障害に対する仮説

? は今回の研究の仮説において、体内時計遺伝子の発現に影響があると考えられる部位。行動レベルでみられる老化による概日リズム障害は、体内時計遺伝子によるリズムの発振における障害であるという仮説が考えられる。

第一章 SCN 培養系を用いた NMDA 投与による位相変化における mPer1 遺伝子の転写活性の変化

序論

光は体内時計が外界の明暗周期に同調するための代表的な同調因子である。光は網膜からグルタミン酸神経を介して SCN へとそのシグナルを伝達し、体内時計の位相を時刻依存的に変化させる (Moore, 1991)。この体内時計の光同調においても遺伝子レベルでの研究がなされている。SCN における mPer1 mRNA は時刻依存性に光による急性発現を示し (Shigeyoshi et al., 1997)、mPer1 と mPer2 のアンチセンスオリゴヌクレオチドの脳室内投与は、光による体内時計の位相変化を抑制する (Akiyama et al., 1999; Wakamatsu et al., 2001)。これらの報告から、mPer1 と mPer2 の体内時計における光同調への関与が示されている。

マウスとハムスターの行動レベルでの実験において、この体内時計の光同調という現象は 2 時間以内に完了しているという報告がある (Best et al., 1999)。しかし、この報告は遺伝子レベルで評価されていない。そこで、mPer1 のプロモーター領域を持つルシフェラーゼの遺伝子を組み込んだ mPer1-luc トランスジェニックマウス (Yamaguchi et al., 2000) を用いて、SCN のスライス培養を作成し、mPer1 の転写活性のリアルタイムで長期にわたる計測を行い、体内時計が位相変化する時の mPer1 遺伝子転写活性の変動を詳細に調べた。

方法

実験動物

実験には mPer1-luc トランスジェニックマウス (Yamaguchi et al., 2000) の新生仔 (4-7 日齢) を用いた。動物は全て恒温恒湿 (23±0.2 °C、55%)、明期 12 時間暗期 12 時間の明暗周期下で飼育し、餌と水は自由に摂取させた。

実験手順

ZT4-6 の間に脳のサンプリングを行い、スライスを作成した（実験手法：スライス培養を参照）。最低 1 週間の培養後、ルシフェリンとルシフェラーゼの反応による生物発光の計測を開始し（実験手法：生物発光の計測を参照）、薬物投与実験を行った（実験手法：薬物投与を参照）。

実験手法

スライス培養

エーテルで麻酔後、動物の脳を素早く取り出した。SCN を含む厚さ 400 μm の前額断切片をチョッパーで作成し、顕微鏡下で SCN 以外の部分をナイフで注意深く取り除いた。作成した SCN の組織片（約 0.7mm \times 0.7mm）はメンブレンフィルター（Millicell-CM, Millipore, Bedford, Massachusetts, USA）の上に置き、培養液に浸して 35 $^{\circ}\text{C}$ で培養した。

生物発光の計測

培養した SCN を培養液 1ml の入った 35mm ディッシュに移して密閉した。計測中の培養液はルシフェリン 1mM を含んだものを使用し、温度は 36 $^{\circ}\text{C}$ に維持した。培養した SCN からの生物発光は 2 次元フォトン計測カメラ（Imaging Photon Detector IPD418, Photek, East Sussex, United kingdom）で計測した。計測したデータは 20 分ごとにコンピューターへ記録した。

薬物投与

培養した SCN を、各薬物（NMDA 30 μM 、NMDA 30 μM と D-APV 25 μM ）を溶かした血清を含まない無血清培養液に移し、36 $^{\circ}\text{C}$ で 30 分インキュベートした。その後、薬物を含まない無血清培養液に 10 分間 \times 3 回移して薬物を洗い、計測で使用していた元の培養液に戻して再び計測を開始した。

蛋白質合成阻害の実験では、サイクロヘキサミドを 10 $\mu\text{g/ml}$ になるように、計測に使用している培養液に加えた。

試薬

培養液：50% minimum essential medium、25% Hank ' s balanced salt solution、25% ウマ血清、36mM グルコース、ペニシリン・ストレプトマイシン

無血清培養液：50% minimum essential medium、50% Hank ' s balanced salt solution、36mM グルコース、ペニシリン・ストレプトマイシン

統計処理

二群間の比較は Student ' s t-test を用いて検討した。

結果

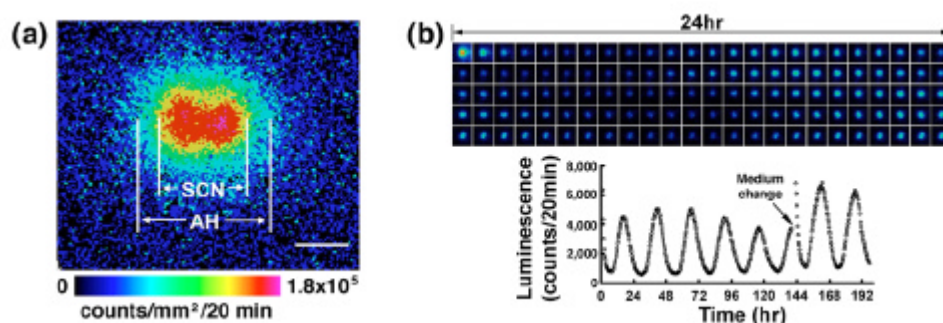


図1 *mPer1-luc*トランスジェニックマウスのSCN培養における生物発光の持続的計測。

(a) SCN培養の生物発光の高倍率画像。SCNの周りを薄く前視床下部域 (anterior hypothalamic area:AH) が囲んでいる。スケールバー = 500 μ m。

(b) SCN培養の生物発光の概日リズム。上段は20分間の生物発光を総和した画像。記録した5日間分の画像を2枚おきに並べた (60分ごとの画像)。下段のグラフは20分間での計測された発光の強さの合計を一つの点として示した。矢印は培養液の交換を示している。

今回の実験系は、SCN 以外の部分からの発光が SCN からの発光よりも弱いため、SCN における *mPer1* 遺伝子の転写活性を評価するのに適しているといえる (図 1 a)。培養した SCN からの発光は強い概日性の振動を示し (最高値/最低値 = 6.39 ± 0.35 、平均値 \pm 標準誤差 ; $n=26$; 図 1 b)、その振幅は *in vivo* での *mPer1* mRNA の振幅に匹敵するものだった (Shigeyoshi et al., 1997)。発光の振幅は数周期で徐々に弱まったが、培養液を変えることで、最初のレベルに回復した (図 1 b)。培養液を変えない場合、少なくとも 4 周期は生物発光のピークの間隔に顕著な変動は見られなかった。ピークの間隔の平均値を調べると、実験した SCN の培養の 95% が 25.05 ± 0.61 時間以内に収まった ($n=20$)。

レポーター遺伝子が遺伝子発現の変化に素早く反応するにはその半減期が短い必要がある (Wood, 1995)。そこで、今回の実験系におけるルシフェラーゼ蛋白質の半減期を調べるため、培養液にサイクロヘキサマイド (10 $\mu\text{g/ml}$) を加え、蛋白質の合成を阻害した。その結果、発光の半減期は 1.4 時間だった。

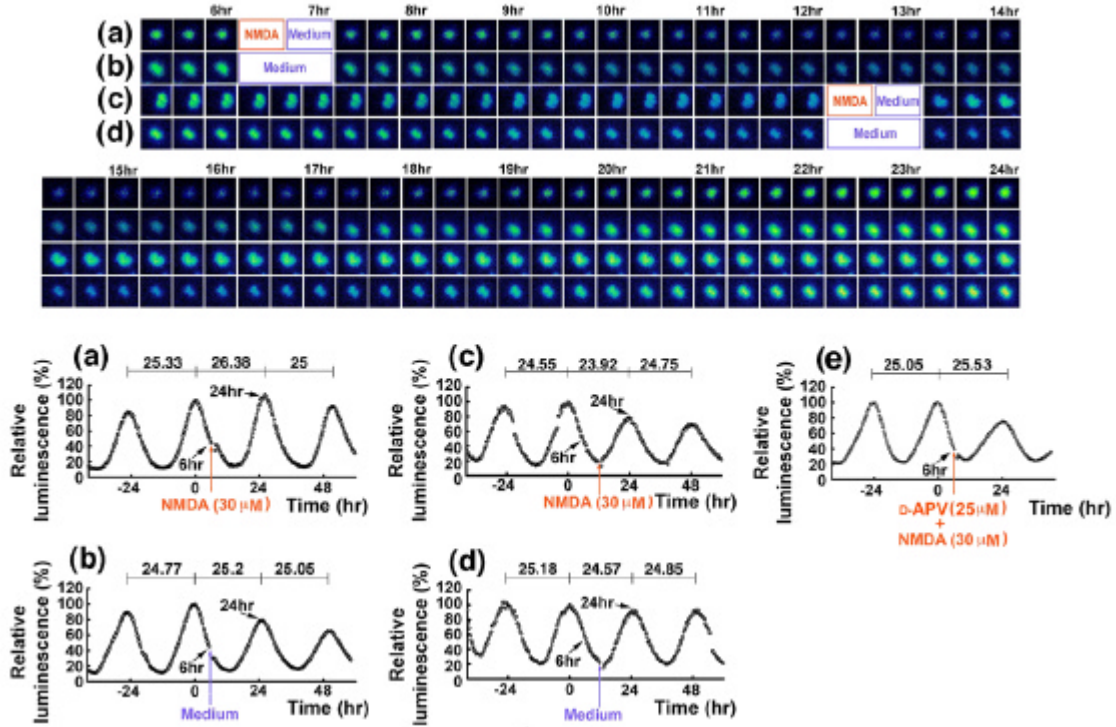


図2 NMDA投与による発光リズムの位相変化。

代表例の画像 (上段) とそれに対応したグラフ (下段)。グラフは20分間での計測された発光の強さの合計を一つの点とし、薬物投与前のピーク値 (Time 0) を100%として示した。ピークからピークまでの時間はグラフの上に示した。

(a) ピークから6時間後にNMDAを投与することで位相は後退した。

(c) ピークの12時間後にNMDAを投与すること位相は前進した。

NMDAの入っていない薬物投与前培養液をピークから6時間後 (b) 及び12時間後 (d) に投与しても位相に変化はなかった。

(e) NMDAとD-APVの同時投与により、NMDAによる位相変化は阻害された。

光によって体内時計の位相が変化する時、その過程で mPer1 遺伝子の転写活性はどのような変化を示すのかを調べるため、in vitro での実験において光照射したのと同様の結果を示す薬物として知られる NMDA (Shibata et al., 1994) を、培養した SCN に投与した。NMDA の濃度は 5 μM と 10 μM では効果が弱く、60 μM では毒性が出たため 30 μM で 30 分間の投与を行った。培養した SCN からの発光が弱まっていく位相である、ピークから 6 時間後に NMDA を投与すると、次に現れる発光のピークは NMDA の入っていない無血清培養液で処置したコントロール群と比べて有意に遅れた (NMDA, -1.94 ± 0.18

時間, n=6; control, -0.23 ± 0.04 時間, n=3; マイナスの値は位相の後退を、プラスの値は位相の前進を表している。; $p < 0.01$, Student's t-test; 図 2 a, b)。培養した SCN からの発光が強まっていく位相である、ピークから 12 時間後に NMDA を投与すると、位相は前進した (NMDA, 0.86 ± 0.10 時間, n=3; control, -0.32 ± 0.09 時間, n=3; $p < 0.05$, Student's t-test; 図 2 c, d)。これらの反応が NMDA による特異的なものであることを確かめるため、NMDA 受容体の拮抗薬である D-2-amino-5-phosphonovalerate (D-APV) $25 \mu\text{M}$ を NMDA $30 \mu\text{M}$ と同時に投与したところ、NMDA による位相の変化を完全に阻害した (図 2e)。

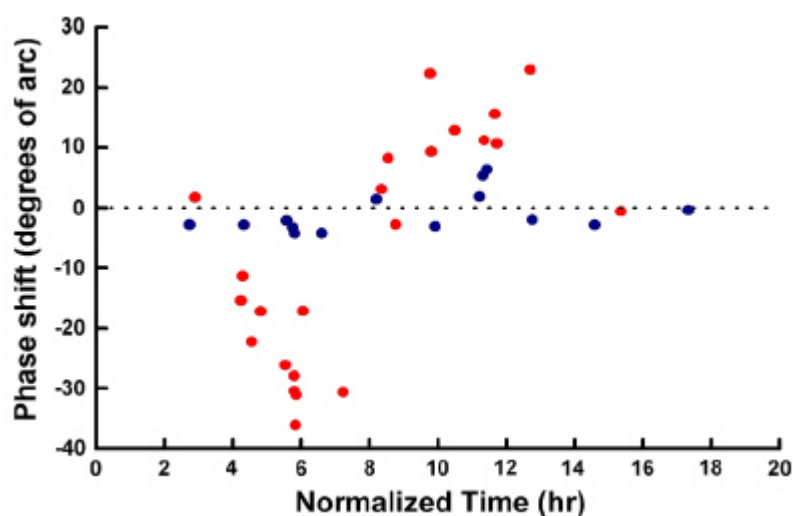


図3 NMDA投与によるSCN培養の生物発光リズムの位相反応。
 コントロール群 (青い点) とNMDA投与群 (赤い点) の位相反応。X軸はその SCN 培養のフリーラン周期で補正した時間 (1時間 = フリーラン周期 / 24時間) を用いて、ピークからの時間を示した。Y軸はdegrees of arcで示した (degrees of arc = フリーラン周期 / 360°) (Schwartz et al., 1990; Pittendrigh, 1993)。

図 3 は様々な時刻に NMDA を投与した時の位相変化をまとめたものである。データは生物発光のピークから次のピークまでの時間より計算したフリーラン周期で補正を行い、薬物を投与した時刻は circadian hour (Chr) で、位相の変化量は degrees of arc で示した (Pittendrigh, 1993; Schwartz and Zimmerman, 1990) (図 3 レジエント参照)。NMDA の投与による位相変化の変化量や、位相が前進するか後退するかは、SCN 培養の概日リズムの位相に依存していた。SCN の培養の生物発光が示すピークから 4.2-7.2Chr 後の間に NMDA を投与すると、SCN 培養の位相は後退し、9.8-12.7Chr の間に投与すると位相は前進した。

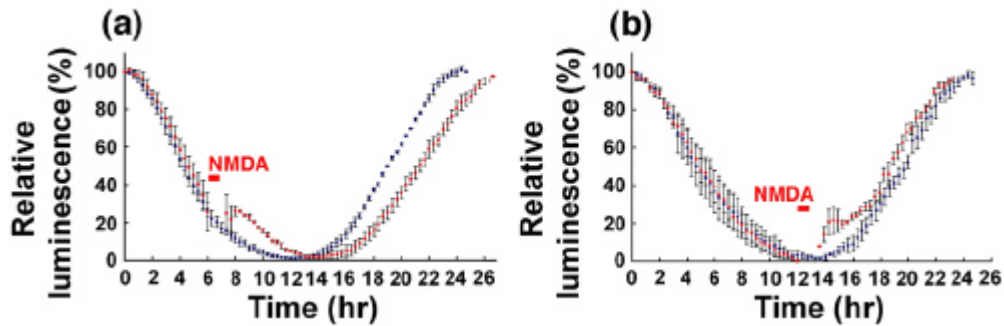


図4 NMDA投与によるSCN培養の生物発光リズムの位相変化の過程。

ピークからピークまでを一周期とした時の、NMDAを投与する前の一周期 (青い四角)とNMDAを投与した一周期 (赤い四角)の波形。それぞれの周期において、一番低い谷の値を0%とし、発光が弱まっていく一周期の前半部分の位相では発光が弱まる前のピークの値を100%として補正し、発光が強まっていく一周期の後半部分の位相では発光がピークに達した時の値を100%として補正した。値は平均 ± 標準誤差 (n=3)で示した。

(a)ピークから6時間後にNMDAを投与することで位相が後退した。

(b)ピークから12時間後にNMDAを投与することで位相が前進した。

SCN 培養における概日リズムが位相変化する時、mPer1 遺伝子の転写活性がどのように変化するかをより詳細に検討するため、NMDA を投与して位相変化がおきている周期の生物発光と、その前の周期の通常状態での生物発光の波形を比較した (図 4)。ピークから 6 時間後に NMDA を投与した時、生物発光の波形は NMDA 投与後 2 時間以内に、2-3 時間遅く現れた (図 4a)。同様の急速な波形の変化は図 3 で示した位相が後退する時間帯 (ピークから 4.2-7.2Chr 後) で観察され、いずれもその移動は 2 時間以内に完了していた (データ未発表)。ピークから 12 時間後に NMDA を投与した時、生物発光の波形は NMDA 投与後 2-3 時間以内に、約 1 時間早く現れた (図 4b)。同様の位相変化は図 3 で示した位相が前進する時間帯 (ピークから 9.8-12.7Chr 後) で観察された (データ未発表)。

考察

今回の実験系では安定した強い振動を持つ SCN の培養からの発光リズムを、4 日ごとに培養液の交換をする事で 2 ヶ月以上の長期間に渡って観測する事が可能となった。また、リポータージーンとして使用したルシフェラーゼ蛋白質の半減期は 1.4 時間と短く、急速な遺伝子発現の変化を捉える事にも適している。そのため今回の実験系は mPer1 遺伝子の転写活性の変化を観察するのに非常に適していると思われる。

mPer1 のアンチセンスオリゴヌクレオチドを投与することで、行動リズムの光による位相変化が阻害されることから mPer1 は概日リズムの光同調機構に重要な役割を持っていると考えられている (Akiyama et al., 1999; Wakamatsu et al., 2001)。今回行った体内時計の位相が変化する時の、mPer1 遺伝子の転写活性を調べる実験において、ピークから 6 時間後の NMDA の投与による位相変化量は 1.94 ± 0.18 時間であったが、これは同じく位相後退を引き起こす時刻に光照射を行ったマウスで mPer1 mRNA 発現のピークが約 2 時間後退したという *in vivo* の実験報告と一致した (Shigeyoshi et al., 1997)。また、今回の実験から得られた NMDA による mPer1 遺伝子の転写活性の位相反応 (図 3) は光による *in vivo* での行動リズムの位相反応曲線と一致した (Schwartz and Zimmerman, 1990)。

概日リズムが位相変化する時、SCN 培養における mPer1 遺伝子の転写活性がどのように変化するかを検討した結果、位相の前進、後退の両方とも、位相変化は 2 - 3 時間以内に完了していた。この結果は mPer1 自身の転写活性のみならず、mPer1 のプロモーターの転写活性の変化も同様に急速に起こることを示している。

体内時計に支配を受けている、例えば行動リズムのような表現型として観察されるリズムはその同調に何日かを要するが、このような行動リズムとは違い、SCN などの中心となる体内時計自身は素早くその位相を変化させるという説が Pittendrigh によって提唱されており、哺乳類を含むすべての生物の体内時計にあてはまると考えられている (Pittendrigh, 1974; Pittendrigh, 1993)。今回の実験結果は、幾つかの体内時計遺伝子が形成している転写 - 翻訳後フィードバックループによる体内時計の振動のレベルで急速な同調が起こることを示唆しており、Pittendrigh の唱える説を裏付けている。

今回の *in vitro* でのリアルタイムな観測を可能にした実験系は、*in vivo* での実験系とともに、体内時計の発振機構における体内時計遺伝子の転写レベルでの研究に有効な手段となるだろう (Yamaguchi et al., 2001; Yamazaki et al., 2000)。

第二章 老齡ラットの視交差上核、室傍核、松果体における Per mRNA 発現の日内変動

序論

老化は様々な生理機能に見られる現象である。概日リズムも老化による機能の低下や障害が起こることが知られている。人では高齢者において、睡眠障害(Dement et al., 1985)、睡眠覚醒リズムの位相前進(Haimov and Lavie, 1997)、体温リズム(Richardson et al., 1982)、活動リズム(Renfrew et al., 1987)、血中コルチゾールリズム(van Coevorden et al., 1991)の振幅の低下などが報告されている。老齡動物を用いた実験においても同様の報告がある。マウスでは、老化による概日リズムの周期()の延長、活動持続時間の断片化、睡眠覚醒リズムの位相の後退、外界の明暗周期の変化に対する同調速度低下などが(Valentinuzzi et al., 1997)、ラットやハムスターにおいても、老化による の短縮(Pittendrigh and Daan, 1974; van Gool et al., 1987; Witting et al., 1994)、SCN 細胞の自律発火リズムの振幅低下(Satinoff et al., 1993; Watanabe et al., 1995)などが報告されている。これらの報告は個体レベルで見られる概日リズムの老化現象が、体内時計である SCN のリズム発振レベルでの減衰に起因する可能性を示唆している。

さて、老化によるリズム障害を調べた研究には前述したような報告があるが、体内時計遺伝子の発現を指標とした研究はいまだなされてはいない。老化による概日リズムの振幅の低下や、位相のずれなどが SCN の体内時計遺伝子レベルで起こっている可能性が、仮説として考えられる。そこで、老齡ラットの SCN における rPer1, rPer2, rCry1 mRNA の日内発現リズムを、in situ ハイブリダイゼーション (in situ hybridization: ISH) 法と reverse transcription-polymerase chain reaction 法 (RT-PCR 法) を用いて解析した。

また、概日リズムの出力の一つとして知られる松果体ホルモン、メラトニンの生合成 (Schmid, 1993)、分泌 (Pang et al., 1990) においても老化による低下が見られる。この松果体へ SCN からの情報を伝える経路に室傍核 (paraventricular nucleus: PVN) がある (Tecler-Mariam-Mesbah et al., 1999)。実際、PVN は SCN からバソプレッシン、グルタミン酸、GABA などの神経の入力を受けており、これらの神経伝達物質が PVN に概

日リズムの情報を伝えていると考えられている(Hermes et al., 1996; Kalsbeek et al., 2000; Kalsbeek et al., 1993)。そこで、PVN と松果体における rPer1 mRNA の日内発現リズムに対する老化の影響についても調べた。

mPer1の転写は光によって誘導され、その誘導には時刻依存性が見られる(Shigeyoshi et al., 1997)。また、光照射による mPer1 と mPer2 の発現をアンチセンスオリゴヌクレオチドによって抑えることで、光による体内時計の位相変化が抑制されることも知られている(Akiyama et al., 1999; Wakamatsu et al., 2001)。これらのことから mPer1 と mPer2 の増加は光による体内時計の位相変化に必要であると考えられている。この光による位相変化に関しても、明暗周期をシフトした時に再同調に要する期間が老齢のマウスとハムスターでは若齢群に比べて長くなるという報告がなされている(Valentinuzzi et al., 1997; Zee et al., 1992)。老化は SCN における CREB のリン酸化と同様に、Fos や c-fos mRNA の光による発現も減弱させる(Benloucif et al., 1997; Sutin et al., 1993)。これらの報告から、光照射後の rPer1, rPer2 mRNA の発現量も老化の影響を受ける可能性がある。そこで、SCN における rPer1, rPer2 mRNA の光照射による発現量の解析も行った。

方法

実験動物

ウィスターラットの雄(若齢群:2-3ヶ月齢、老齢群:24-26ヶ月齢、三菱ウェルファイドより提供)を用いた。動物は全て恒温恒湿(23±0.2℃、55%)、明期12時間暗期12時間の明暗周期下で飼育し、光の急性的な影響を除くため、恒暗条件下に移して2日目に実験を行った。実験は、恒暗条件下に移す前の明暗周期を基準に、明期の開始時刻を0時とする Zeitgeber time (ZT) に従って行った。なお、餌と水は自由に摂取させた。

実験手順

RT-PCR法による各脳部位の rPer1 mRNA の日内発現に対する解析

実験日の ZT4, 8, 12, 18, 22 に SCN、松果体をサンプリングし、RT-PCR法(実験手法:

RT-PCR 法を参照)で rPer1 mRNA 発現量を測定した。

各脳部位の rPer1, rPer2, rCry1 mRNA の日内発現の ISH 法による解析

実験日の ZT4, 8, 12, 16, 20, 24 に脳を灌流固定し、ISH 法(実験手法: in situ ハイブリダイゼーション法を参照)で SCN、PVN における rPer1 mRNA の発現量を測定した。SCN においては rPer2, rCry1 mRNA の発現量も測定した。

光照射による SCN における rPer1, rPer2 mRNA の発現量に対する解析

実験日の ZT13.5 から 30 分間、50lux の光を照射し、ZT15 に脳を灌流固定して ISH 法で SCN における rPer1, rPer2 mRNA の発現量を測定した。また対照群としては光照射をせず、ZT15 に脳を灌流固定したものを用意した。

実験手法

in situ ハイブリダイゼーション法

試薬はすべて、オートクレーブ滅菌(121℃、20分)したものを用いた。動物を深くエーテル麻酔し、氷冷した生理食塩水、4% paraformaldehyde (PFA) 溶液で順に灌流固定し、脳を摘出した。摘出した脳は 4% PFA 溶液中で一日静置(4℃)し、その後 20% sucrose 溶液(4℃)に移した。二日以上静置した後、SCN、PVN を含む連続前額断切片(厚さ 30 μm)をクリオスタット(HM505E: ドイツマイクローム社)によって作成した。その際脳切片は 1 枚ごとに 3 群に分け、それぞれ rPer1 用、rPer2 用、rCry1 用とし、2×SSC 溶液中で保存した(室温)。

脳切片はまず Protinase K 溶液で 10 分間処理し(37℃、振とう)、4% PFA を加えて Protinase K の活性を停止した(室温、振とう、5分)後、2×SSC で洗浄した(室温、10分、振とう)。次に酢酸溶液に脳切片を移してアセチル化を行い(室温、10分、振とう)。2×SSC 溶液で脳切片の洗浄(室温、5分、振とう)を二回行った。その後 [³³P]UTP を用いて作製した rPer1 (2 μg/μl)、rPer2 (2 μg/μl)、rCry1 (16 μg/μl) の各アンチセンス cRNA プローブを含むハイブリダイゼーション溶液中にて、脳切片をインキュベーション(13-15 時間、60℃、振とう)した。ハイブリダイゼーション後、脳切片を 2×SSC/50%Formamide 溶液に移して洗浄を 3 回行った(60℃、振とう、それぞれ 45分、15

分、15分)。洗浄後、RNase 溶液で処理(37℃、30分、振とう)し、2×SSC/50%Formamide 溶液にて2回洗浄した(60℃、15分、振とう)。さらに0.4×SSC 溶液で洗浄(60℃、30分、振とう)した後、50mM Tris-HCl に脳切片を移し、ゼラチンコートしたスライドガラスに貼り付け、30分以上風乾させ、ethanol(80、90、95、100%)で脱水した。脳切片は乾燥後、検量線用のスタンダード(Autoradiographic ¹⁴C-microscale 3strips 222Bq:アマシャム)とともに、X線フィルムカセット(ハイパーカセット 30×40cm:アマシャム)内に移し、X線フィルム(Bio Max MR 30×40cm:KODAK)に感光させた(4℃、4-6日間)。感光後、developer D-19(KODAK)、および fujifix(フジフィルム)を用いて現像した。

X線フィルム解析には micro computer imaging device (MCID) システム(カナダ イメージングリサーチ社)を使用した。SCN は5枚の脳切片を選び、その両側の平均値を個体の値とした。

RT-PCR 法

エーテルで麻酔後、心臓を強打して致死させ、脳をすばやく取り出し、氷冷した生理食塩水に浸した。SCN は厚さ0.5mmの前額断切片とし、ドライアイスで凍らせ、パンチアウトして2サンプルを一つのチューブにプールした。サンプルは TRIZOL solution (BRL, MD, USA) 内でホモジナイズした。TRIZOL solution の1/5量の chloroform を加えて 15000rpm (4℃) で20分遠心した後、上清を取った。得られた上清と同量の 2-propanol と、1μl の glycogen(AMBION)を加えて -80℃ で1時間静置した後、15000rpm (4℃) で20分遠心し、上清を取り除いた。沈殿物に 80% ethanol を加えて 15000rpm (4℃) で15分遠心し、上清を取り除いて沈殿物を室温で風乾させた。沈殿物を 10μl の DEPC-H₂O に溶かし、RNA の量を吸光度計で測定し、100ng/μl になるよう調整した。

One Step RT-PCR system (GIBCO, BRL) を用い、100ng の total RNA を rPer1、GAPDH のプライマーとともにチューブに入れ、増幅を開始した。RT-PCR の条件は、reverse transcription (50℃、30分) {denaturing (94℃、15秒) annealing (55℃、30秒) extension (72℃、60秒)} ×25 cycle で行った。得られた PCR 産物 (rPer1:240bp、GAPDH:436bp) は 3%アガロースゲルに泳動し、ethidium bromide で染色した。

DNA のバンドの解析には EDAS-120 システム(KODAK)を用いた。得られた値から GAPDH

との比を算出し、rPer1 の値とした。

試薬

in situ ハイブリダイゼーション法

アンチセンス cRNA プローブ : rPer1 (nucleotide positions:736-1717)、 rPer2 (730-1490)、 rCry1 (mCry1 の 1074-1768)

4%PFA : paraform aldehyde (4%)、 Na₂HPO₄ (80mM)、 NaH₂PO₄ (20mM)

20% sucrose : sucrose (20%)、 Na₂HPO₄ (80mM)、 NaH₂PO₄ (20mM)

2 × SSC : NaCl (0.3M)、 C₆H₅O₇Na₃2H₂O (30mM)

Protenase K 溶液 : Tris-HCl (10mM,pH=7.5)、 EDTA (10mM)、 Protenase K (1 μg/ml)

酢酸溶液 : NaCl (0.15M)、 Triethanolamine (0.1M)、 無水酢酸 (0.25%)

50 × Denhardt 溶液 : Ficoll (1%)、 PVP (1%)、 BSA (1%)

ハイブリダイゼーション溶液 : Formamide (60%)、 Tris-HCl (10mM,pH=7.4)、 tRNA (0.2mg/ml)、 50 × Denhardt 溶液(2%)、 Dextran Sulfate(10%)、 NaCl(0.6M)、 SDS(0.25%)、 EDTA (1mM)

RNase 溶液 : NaCl (0.5M)、 Tris (10mM)、 EDTA (1mM)、 RNase A (10 μg/ml)

2 × SSC/50%Formamide : Formamide (50%)、 NaCl (0.3M)、 C₆H₅O₇Na₃2H₂O (30mM)

0.4 × SSC : NaCl (60mM)、 C₆H₅O₇Na₃2H₂O (6mM)

RT-PCR 法

プライマー : rPer1 ; 5' -CAG CAA TGG CTC AAG TGG CAA T-3' and 5' -ACT GTT CAC TGC TGC AGC CAC-3'、 GAPDH ; 5' -GAC CTC AAC TAC ATG GTC TAC A-3' and 5' -TGG CCG TGA TGG CAT GGA CT-3'

統計処理

結果は平均値 ± 標準誤差で表した。二群間の比較は Student ' s t-test を用いて検討した。時系列における多群比較には一要因分散分析後、Dunnett ' s test を用いて検討した。

結果

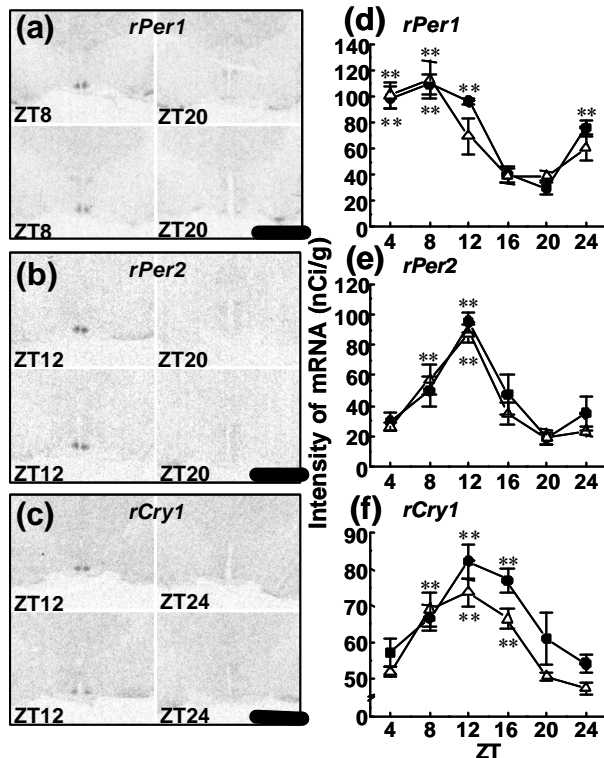


図1 SCNにおける*rPer1* (a,d),*rPer2* (b,e),*rCry1* (c,f)mRNA 発現に対する老化の影響のISH法による評価。

(a-c) 若齢群 (上段) と老齢群 (下段) のSCNを含んだ前額断切片のX線フィルム写真。*rPer1* (a), *rPer2* (b), *rCry1* (c) mRNA発現のシグナルが強い時刻と弱い時刻での代表例を示した。スケールバー = 2.5mm。
(d-f) 若齢群 (○) と老齢群 (●) のSCNにおける *rPer1* (d), *rPer2* (e), *rCry1* (f) mRNA発現の日内変動。値は平均 ± 標準誤差で示した (n=4)。**p<0.01 vs ZT20 (d,e) またはZT24 (f) (Dunnett's test)。

SCNにおける *rPer1*, *rPer2*, *rCry1* mRNA の発現量の変動を、一日6点でサンプリングを行い、ISH法によって調べた (図1)。

rPer1 mRNA の発現量は概日リズムを有する有意な変動を示し (若齢群: $F[5, 18]=28.9$, $p<0.01$, 老齢群: $F[5, 18]=9.4$, $p<0.01$, 一要因分散分析) 発現量のピークはZT8だった。

rPer2 mRNA の発現量も概日リズムを有する有意な変動を示し (若齢群: $F[5, 18]=9.0$, $p<0.01$, 老齢群: $F[5, 18]=18.1$, $p<0.01$, 一要因分散分析) 発現量のピークはZT12だった。

rCry1 mRNA の発現量も概日リズムを有する有意な変動を示し (若齢群: $F[5, 18]=6.5$, $p<0.01$, 老齢群: $F[5, 18]=15.1$, $p<0.01$, 一要因分散分析) 発現量のピークはZT12だった。

rPer1 ($F[1, 36]=0.96$, $p>0.05$, 二要因分散分析) と *rPer2* ($F[1, 36]=1.1$, $p>0.05$, 二要因分散分析) の mRNA 発現量において、若齢群と老齢群との間に差は見られなかった。*rCry1* の mRNA 発現量においては若齢群と老齢群との間に有意な差が見られ ($F[1, 36]=9.3$, $p<0.01$, 二要因分散分析) 老齢群においては振幅の低下が観察された (図1f)。しかし、各ZTにおける二群間の比較を Student's t-testで行ったところ、若齢群と老齢群との

間に有意な差は見られなかった。

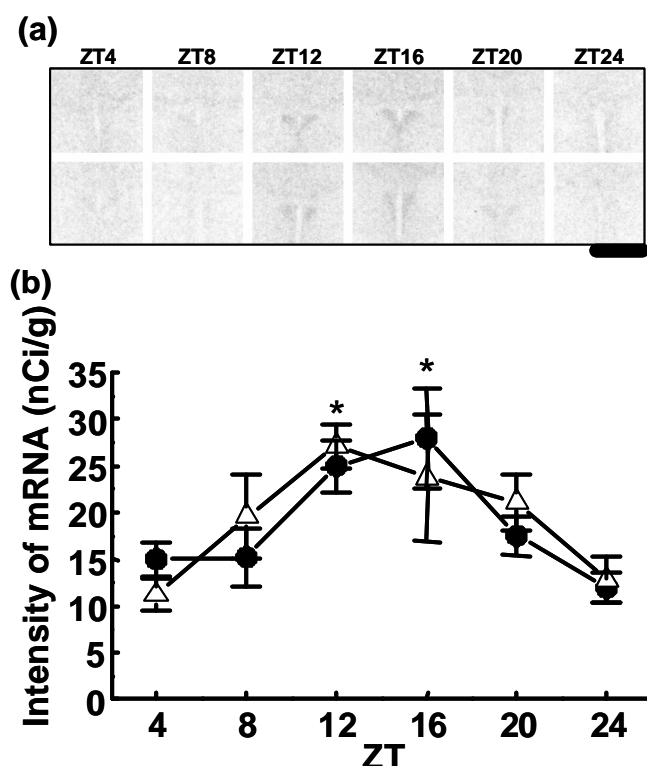


図2 PVNにおける*rPer1* mRNA発現に対する老化の影響のISH法による評価。

(a)若齢群(上段)と老齢群(下段)のPVNを含んだ前額断切片のX線フィルム写真。スケールバー=2.5mm。

(b)若齢群(△)と老齢群(●)のPVNにおける*rPer1* mRNA発現の日内変動。値は平均±標準誤差で示した(n=4)。* $p < 0.05$ vs ZT4 (Dunnett's test)。

次に、PVNにおける*rPer1*, *rPer2*, *rCry1* mRNAの発現量の変動を調べた(図2)。プローブの濃度はSCNにおけるmRNAの発現量に合わせているため、SCNよりもmRNAの発現量が低いPVNにおいては、*rPer2*, *rCry1* mRNAのハイブリダイゼーションシグナルは非常に弱く、定量には不十分なシグナルの強さだった。ちなみに、PVNにおける*rPer1* mRNAの発現量はSCNの約4分の1であった。

PVNにおける*rPer1* mRNAの発現量は概日リズムを有する有意な変動を示し(若齢群: $F[5, 18]=5.7$, $p < 0.01$, 老齢群: $F[5, 18]=2.4$, $p < 0.05$, 一要因分散分析) 発現量のピークはZT12もしくはZT16だった。若齢群と老齢群との間に差はなく、老化と時刻という要因の相互作用もなかった(二群間: $F[1, 36]=0.06$, $p > 0.05$, 老化×時刻: $F[5, 36]=0.56$, $p > 0.05$, 二要因分散分析)。

松果体における*rPer1* mRNAの発現量の変動は、一日5点でサンプリングを行い、RT-PCR法によって調べた(図3c,d)。松果体における*rPer1* mRNAの発現量は概日リズムを有する有意な変動を示し(若齢群: $F[4, 15]=5.3$, $p < 0.01$, 老齢群: $F[4, 15]=15.0$, $p < 0.01$, 一要因分散分析) 発現量のピークはZT18だった。この結果は今までの報告と一致した(Fukuhara

et al., 2000; Takekida et al., 2000)。若齢群と老齢群との間に差はなく、老化と時刻という要因の相互作用もなかった(二群間:F[1,28]=1.0, p>0.05, 老化×時刻:F[4,28]=0.4, p>0.05, 二要因分散分析)。

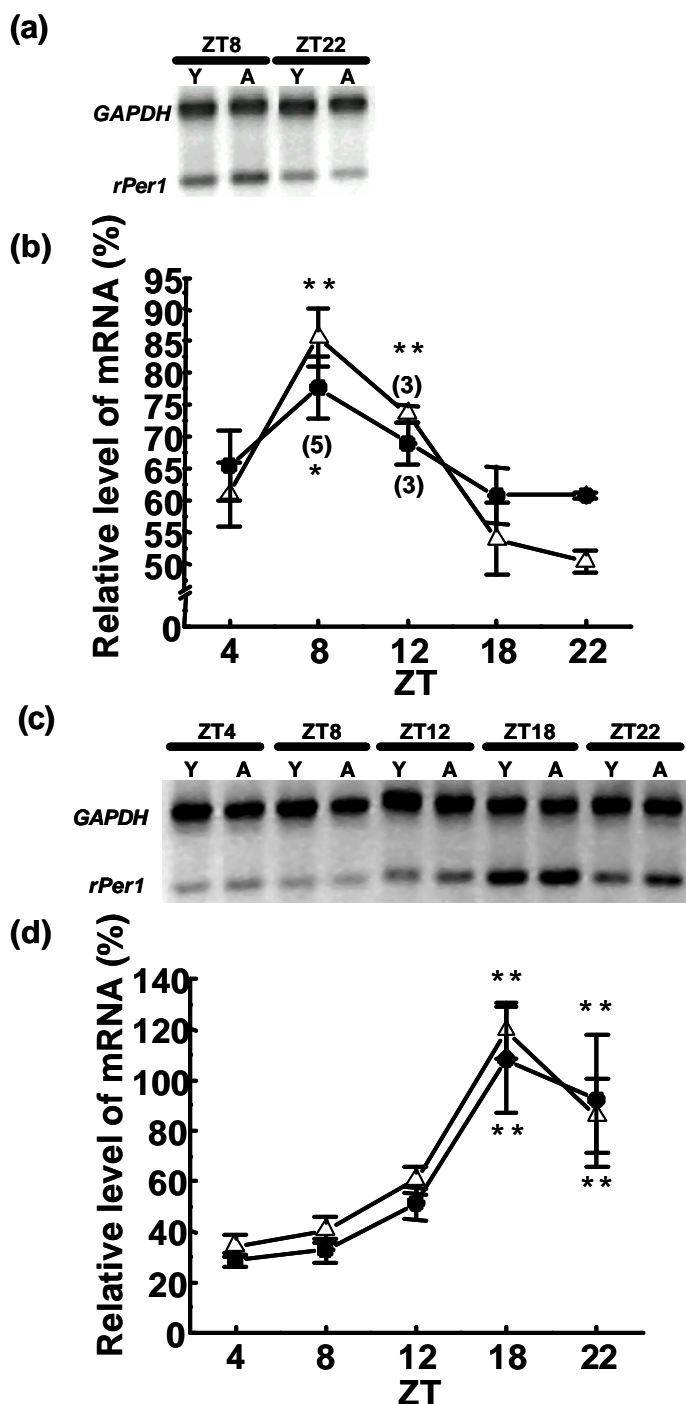


図3 SCN (a,b)と松果体 (c,d)における*rPer1* mRNA発現に対する老化の影響のRT-PCR法による評価。

(a)若齢群 (Y)と老齢群 (A)のSCNにおける*rPer1*, *GAPDH* mRNAの電気泳動写真。

(b)若齢群 ()と老齢群 ()のSCNにおける*rPer1* mRNA発現の日内変動。

(c)若齢群 (Y)と老齢群 (A)の松果体における*rPer1*, *GAPDH* mRNAの電気泳動写真。

(d)若齢群 ()と老齢群 ()のPVNにおける*rPer1* mRNA発現の日内変動。

rPer1 mRNAの値は *GAPDH* mRNAの値を元にした相対量で表し、平均±標準誤差で示した(個体数をカッコ内に示したものはn=4)。*p<0.05 **p<0.01 vs ZT22 (b)またはZT4 (d)(Dunnett's test)。

図 3a と 3b は SCN における *rPer1* mRNA の発現量の概日リズムを RT-PCR 法によって調べた結果である。ISH 法による結果と同様に、*rPer1* mRNA の発現量は概日リズムを有する有

意な変動を示し（若齢群：F[4,16]=2.9, p<0.05, 老齢群：F[4,15]=13.0, p<0.01, 一要因分散分析）発現量のピークはZT8 だった。また、若齢群と老齢群との間に差はなく、老化と時刻という要因の相互作用もなかった。

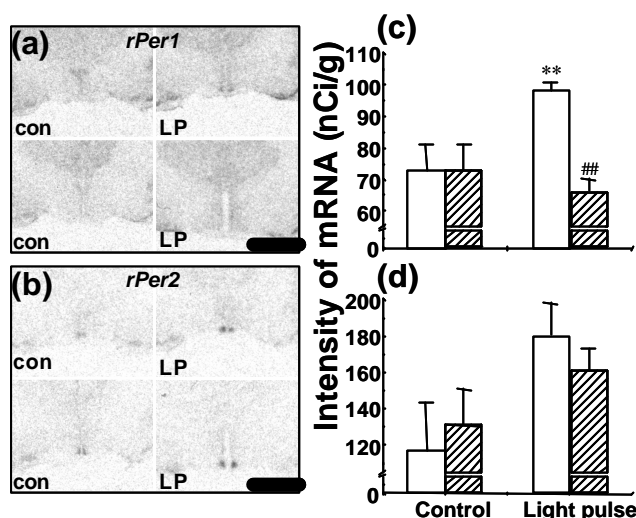


図4 SCNでの光による*rPer1* (a,c),*rPer2* (b,d)mRNA発現に対する老化の影響のISH法による評価。

(a,b)若齢群(上段)と老齢群(下段)のSCNを含んだ全額断切片のX線フィルム写真。コントロール群(con)と光照射群(LP)の代表例を示した。スケールバー=2.5mm。

(c,d)若齢群(白, n=8)と老齢群(斜線, n=5)のSCNでの光による*rPer1* (c),*rPer2* (d) mRNA発現。値は平均±標準誤差で示した。

**p<0.01 vs コントロール群、##p<0.01 vs若齢群 (Student's t-test)。

光同調における老化の影響を検討するため、光照射によるSCNの*rPer1*,*rPer2* mRNAの発現量を調べた(図4)。

若齢群における*rPer1* mRNAの発現量はZT13.5に光照射を行うことにより、光を照射しなかった対照群に比べ、34%の有意な増加を示した(p<0.01, Student's t-test)。老齢群では光を照射しなかった対照群に比べ、9%の減少が見られたが、有意な差ではなかった(図4a、c)。

同じ実験条件で、若齢群における*rPer2* mRNAの発現量はZT13.5に光照射を行うことにより、光を照射しなかった対照群に比べ、54%の増加を示したが有意な差ではなかった。老齢群では光を照射しなかった対照群に比べ、若齢群より少ない23%の増加が見られたが、有意な増加ではなかった。また、若齢群と老齢群との間に有意な差は見られなかった。

考察

今回の実験で、若齢ラットと老齢ラットのSCNにおける*rPer1*,*rPer2*,*rCry1* mRNAは類似

した日内発現パターンを示した。rPer1, rPer2 mRNA の SCN における日内発現パターンは Yanらの報告(1999)と一致している。しかし、老齢ラットの SCN の rCry1 mRNA は、日内リズムの振幅にわずかながら減少が見られた。マウスの SCN における時計機構は、CLOCK と BMAL1 の転写因子としての正の制御と、Per、Cry 遺伝子産物の転写抑制因子としての負のフィードバックが、体内時計遺伝子の転写のフィードバックループに関与していると考えられている(Dunlap, 1999; Kume et al., 1999)。今回の結果は、SCN の時計機構におけるフィードバックループの負の因子は老化によって乱されないことを示しており、このことから体内時計は老化した個体においても、まだ明瞭な安定したリズムを刻んでいる可能性を示唆している。この点において、今回の実験結果はこれまでの SCN における VIP の mRNA 発現リズムの減弱(Kawakami et al., 1997; Krajnak et al., 1998)、SCN の 2 DG の取り込みリズムの減弱(Wise et al., 1988)、そしてラットとハムスターの SCN 神経細胞の自律発火リズムの減弱(Satinoff et al., 1993; Watanabe et al., 1995)などの報告と一致しない。

マウスのアルギニンバソプレッシン(arginine vasopressin: AVP)遺伝子はそのプロモーター領域に CACGTG という E BOX の配列を持っており、PER がこの遺伝子の CLOCK:BMAL1 による転写を抑制したという報告がある(Jin et al., 1999)。この報告は SCN の体内時計に関わる転写機構が、体内時計に制御された出力リズムとしての AVP 遺伝子の発現を直接制御していることを示している。今回の実験結果で、老齢ラットの SCN においても rPer1, rPer2 mRNA の発現リズムは正常であることが観察された。この結果は体内時計の振動と体内時計遺伝子が少なくとも SCN の AVP 細胞では老化の影響を受けていないことを示している。

mCry1 ミュータントマウスや mCry2 ミュータントマウスでは mPer1、mPer2 mRNA の振動は明確なまま保たれている。これらのミュータントマウスでは、恒暗条件下に 1.5 から 2.5 日間置いた時に観察されるそれぞれのフリーラン周期と一致して、mPer1、mPer2 mRNA の発現のピークが mCry1 ミュータントマウスでは前進し、mCry2 ミュータントマウスでは後退していることが知られている(Okamura et al., 1999)。ラットでは老化に伴いフリーラン周期が短くなるという報告がある(Witting et al., 1994)。そのため今回の結果において、Per 遺伝子の発現のピークが老齢ラットで前進することが予想された。しかし、4 時間ごとのサンプリングによる ISH 法での定量という実験条件では、Per 遺伝子の発現のピークに老化による影響は見られなかった。また実験に使ったラットのフリーラン周期は調べていな

いので本研究からだけでは結論を出す事はできない。フリーラン周期を調べた後に SCN での Per 遺伝子の発現を調べれば、興味深いデータが得られた可能性がある。

松果体においても、体内時計遺伝子の転写が光情報や体内時計の支配下にある。ラットの松果体における Per1、Per2 mRNA(Fukuhara et al., 2000; Takekida et al., 2000)やマウスの松果体における PER1 蛋白質の発現(von Gall et al., 2001)などの夜間にピークを持った発現は、おそらくメラトニンの分泌のようなリズムを持った細胞の応答に関与していると考えられる。老化によりメラトニンの合成(Schmid, 1993)や、分泌(Pang et al., 1990)といった松果体の機能は低下するという報告がある。しかし興味深いことに、今回の実験では PVN と松果体における *rPer1* mRNA の発現に老化の影響は見られなかった。松果体の *rPer1* mRNA の発現が老化の影響を受けない理由については分からないが、この結果は松果体や PVN において *rPer1* mRNA の発現に関わる、SCN を起点とするリズムの出力が、老化が進んだ状況においても安定して維持されていることを示している。

mPer1、*mPer2* mRNA のアンチセンスオリゴヌクレオチドの投与により、光による概日リズムの位相変化が減弱するという報告(Wakamatsu et al., 2001)から、SCN における *mPer1* または *mPer2* 遺伝子の発現の増加は光による概日リズムの位相変化にとって重要な過程であることが知られている。また、ミュータントマウスを用いた実験では、*mPer1* 遺伝子と *mPer2* 遺伝子が明暗周期の位相をずらした際の概日リズムの位相変化に重要な役割をはたしていることが示された(Albrecht et al., 2001)。今回の実験では、ZT13.5 に光照射を行った結果、若齢群では SCN における *rPer1*, *rPer2* mRNA の急激な発現の増加が見られたが、老齢群においては見られなかった。これは老化によって Per 遺伝子の光による発現が障害されたことを示している。この結果は、SCN における光誘発性の *c-fos* mRNA 発現(Sutin et al., 1993)や Fos 蛋白質に対する免疫反応と CREB のリン酸化(Zhang et al., 1996)などが老化によって低下するという報告と一致する。この光に対する SCN の反応の老化による減弱においては、SCN の機能そのものの老化のほか、網膜の光受容体の数、または感受性の低下や、網膜から SCN への経路の障害などの可能性も考えられる。老齢ハムスターにおいて網膜を通した光の伝達が、若齢のそれに比べて 10-20%減少したという報告(Zhang et al., 1998)もあるように、網膜の衰退は SCN への光入力を弱めるので、光による Per の発現の減弱に対する原因となりうる。

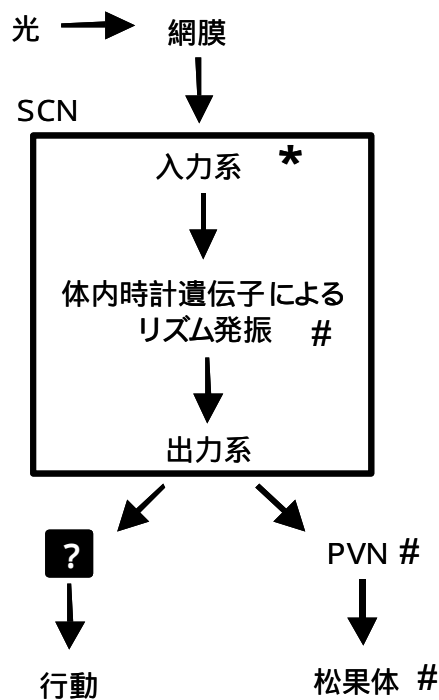


図5 体内時計遺伝子の発現を指標とした概日リズムに対する老化の影響

*は本研究において老化の影響があったもの。#は本研究において老化の影響が無かったもの。

行動レベルで見られる老化による概日リズム障害は、体内時計遺伝子によるリズムの発振における障害ではなく、出力系以降での障害が可能性として考えられた。

結論として、今回の結果ではラットの SCN における rPer1、rPer2 mRNA や、PVN、松果体における rPer1 mRNA の発現に老化の影響は見られなかった。このことから、行動レベルで見られる老化による概日リズム障害は、体内時計の体内時計遺伝子によるフィードバックループにおける障害ではなく、より下流での時計に制御された遺伝子の発現などの障害が可能性として考えられた。また、SCN における光による Per 遺伝子の発現の低下は、老齢動物に見られる行動レベルでの光による概日リズムの位相変化の低下の原因である可能性が示された（図5）。

総括

概日リズムの研究分野において、体内時計遺伝子の発見を発端に遺伝子レベルでの研究が急速になされるようになった。それ以前より、個体レベルの行動リズムなどの表現形として表れるリズムの研究や、SCN という神経核に焦点をあてた細胞レベルでの研究、概日リズムに関与すると思われる分子に注目した分子レベルでの研究などが行われてきたが、体内時計遺伝子という新たなパーツを得て、概日リズムのおおもととなる体内時計の発振機構というより核心に近い研究が可能となった。当然のことながら、これらの個体から遺伝子までの各レベルで起こる現象は、概日リズムという一つの生体システムの中に内包されるものであり、すべてが因果関係を持ってリンクしているはずである。この遺伝子発現から最終的な表現形である個体レベルでの生理現象の発現にいたるまでの機構を解明する事は非常に困難であると同時に、非常に重要かつ有意義なことである。家族性睡眠相前進症候群の患者に体内時計遺伝子 Per2 の変異が見られたという報告がある(Toh et al., 2001)。この報告は近年の概日リズムの研究分野における急速な遺伝子レベルの研究成果の恩恵を受けたものであり、個体レベルでの現象を遺伝子レベルで説明したという点で、概日リズムの研究がその困難な目標に一步近づいたと言っていいだろう。

このような概日リズムの研究分野における流れの中で、現在報告されている様々なレベルでの現象と体内時計遺伝子の関わりを研究することは、概日リズムの研究を発展させるために有用な蓄積となる。今回、第一章では体内時計の光同調における急速な位相変化が、遺伝子発現のレベルですでに起こっていることを見出した。また第二章では老化によるリズム障害と体内時計遺伝子の関わりに焦点をあて、SCN の時計機構におけるフィードバックループの負の因子は老化によって乱されないことを示し、老化による概日リズムの振幅の減弱などは、体内時計遺伝子によるフィードバックループにおける障害ではなく、より下流での時計に制御された遺伝子の発現などの障害が関与している可能性を見出した。さらに老化による光同調の低下に関しては、遺伝子発現の低下が原因である可能性を見出した。

老化によるリズム障害は、高齢者の生活様式と社会の生活様式との間にずれを生じさせ、高齢者の生活の質を悪化させることにつながり、高齢化の進んだ現代社会において問題となっている。今回の研究成果は老化によるリズム障害の原因究明や治療法の開発に寄与すると考える。

参考文献

Akiyama, M., Kouzu, Y., Takahashi, S., Wakamatsu, H., Moriya, T., Maetani, M., Watanabe, S., Tei, H., Sakaki, Y., and Shibata, S. (1999). Inhibition of light- or glutamate-induced mPer1 expression represses the phase shifts into the mouse circadian locomotor and suprachiasmatic firing rhythms. *J Neurosci* *19*, 1115-1121.

Albrecht, U., Zheng, B., Larkin, D., Sun, Z. S., and Lee, C. C. (2001). mPer1 and mPer2 are essential for normal resetting of the circadian clock. *J Biol Rhythms* *16*, 100-104.

Benloucif, S., Masana, M. I., and Dubocovich, M. L. (1997). Light-induced phase shifts of circadian activity rhythms and immediate early gene expression in the suprachiasmatic nucleus are attenuated in old C3H/HeN mice. *Brain Res* *747*, 34-42.

Best, J. D., Maywood, E. S., Smith, K. L., and Hastings, M. H. (1999). Rapid resetting of the mammalian circadian clock. *J Neurosci* *19*, 828-835.

Dement, W. C., Richardson, G., Prinz, P., Carskadon, M., Kripke, D., and Czeisler, C. (1985). Changes of sleep and wakefulness with age. In *The Biology with Aging*, C. E. Finch, and E. L. Schneider, eds. (New York, Van Nostrand Reinhold), pp. 692-717.

Dunlap, J. C. (1999). Molecular bases for circadian clocks. *Cell* *96*, 271-290.

Fukuhara, C., Dirden, J. C., and Tosini, G. (2000). Circadian expression of period 1, period 2, and arylalkylamine N-acetyltransferase mRNA in the rat pineal gland under different light conditions. *Neurosci Lett* *286*, 167-170.

Gekakis, N., Staknis, D., Nguyen, H. B., Davis, F. C., Wilsbacher, L. D., King, D. P., Takahashi, J. S., and Weitz, C. J. (1998). Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism [see comments]. *Science* *280*, 1564-1569.

Haimov, I., and Lavie, P. (1997). Circadian characteristics of sleep propensity function in healthy elderly: a comparison with young adults. *Sleep* *20*, 294-300.

Hermes, M. L., Coderre, E. M., Buijs, R. M., and Renaud, L. P. (1996). GABA and glutamate mediate rapid neurotransmission from suprachiasmatic nucleus to hypothalamic paraventricular nucleus in rat. *J Physiol* *496 (Pt 3)*, 749-757.

Jin, X., Shearman, L. P., Weaver, D. R., Zylka, M. J., de Vries, G. J., and Reppert, S. M. (1999). A molecular mechanism regulating rhythmic output from the suprachiasmatic circadian clock. *Cell* 96, 57-68.

Kalsbeek, A., Garidou, M. L., Palm, I. F., Van Der Vliet, J., Simonneaux, V., Pevet, P., and Buijs, R. M. (2000). Melatonin sees the light: blocking GABA-ergic transmission in the paraventricular nucleus induces daytime secretion of melatonin. *Eur J Neurosci* 12, 3146-3154.

Kalsbeek, A., Teclemariam-Mesbah, R., and Pevet, P. (1993). Efferent projections of the suprachiasmatic nucleus in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *J Comp Neurol* 332, 293-314.

Kume, K., Zylka, M. J., Sriram, S., Shearman, L. P., Weaver, D. R., Jin, X., Maywood, E. S., Hastings, M. H., and Reppert, S. M. (1999). mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell* 98, 193-205.

Miyamoto, Y., and Sancar, A. (1998). Vitamin B2-based blue-light photoreceptors in the retinohypothalamic tract as the photoactive pigments for setting the circadian clock in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 6097-6102.

Moore, R. Y. (1991). The suprachiasmatic nucleus and the circadian timing system. In *Suprachiasmatic nucleus: The Mind's Clock*, D. C. Klein, R. Y. Moore, and S. M. Reppert, eds. (New York, Oxford Univ. Press), pp. 13-15.

Okamura, H., Miyake, S., Sumi, Y., Yamaguchi, S., Yasui, A., Muijtjens, M., Hoeijmakers, J. H., and van der Horst, G. T. (1999). Photic induction of mPer1 and mPer2 in cry-deficient mice lacking a biological clock [see comments]. *Science* 286, 2531-2534.

Pang, S. F., Tsang, C. W., Hong, G. X., Yip, P. C., Tang, P. L., and Brown, G. M. (1990). Fluctuation of blood melatonin concentrations with age: result of changes in pineal melatonin secretion, body growth, and aging. *J Pineal Res* 8, 179-192.

Pittendrigh, C. S. (1974). Circadian oscillations in cells and the circadian organization of multicellular systems. In *The Neurosciences. Third Study Program*, F. O. Schmitt, and F. G.

Worden, eds. (Cambridge, The MIT Press), pp. 437-458.

Pittendrigh, C. S. (1993). Temporal organization: reflections of a Darwinian clock-watcher. *Annu Rev Physiol* 55, 16-54.

Pittendrigh, C. S., and Daan, S. (1974). Circadian oscillations in rodents: a systematic increase of their frequency with age. *Science* 186, 548-550.

Ralph, M. R., Foster, R. G., Davis, F. C., and Menaker, M. (1990). Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science* 247, 975-978.

Renfrew, J. W., Pettigrew, K. D., and Rapoport, S. I. (1987). Motor activity and sleep duration as a function of age in healthy men. *Physiol Behav* 41, 627-634.

Richardson, G. S., Carskadon, M. A., Orav, E. J., and Dement, W. C. (1982). Circadian variation of sleep tendency in elderly and young adult subjects. *Sleep* 5, S82-94.

Satinoff, E., Li, H., Tchong, T. K., Liu, C., McArthur, A. J., Medanic, M., and Gillette, M. U. (1993). Do the suprachiasmatic nuclei oscillate in old rats as they do in young ones? *Am J Physiol* 265, R1216-1222.

Schmid, H. A. (1993). Decreased melatonin biosynthesis, calcium flux, pineal gland calcification and aging: a hypothetical framework. *Gerontology* 39, 189-199.

Schwartz, W. J., and Zimmerman, P. (1990). Circadian timekeeping in BALB/c and C57BL/6 inbred mouse strains. *J Neurosci* 10, 3685-3694.

Shibata, S., and Moore, R. Y. (1988). Electrical and metabolic activity of suprachiasmatic nucleus neurons in hamster hypothalamic slices. *Brain Res* 438, 374-378.

Shibata, S., Watanabe, A., Hamada, T., Ono, M., and Watanabe, S. (1994). N-methyl-D-aspartate induces phase shifts in circadian rhythm of neuronal activity of rat SCN in vitro. *Am J Physiol* 267, R360-364.

Shigeyoshi, Y., Taguchi, K., Yamamoto, S., Takekida, S., Yan, L., Tei, H., Moriya, T., Shibata, S., Loros, J. J., Dunlap, J. C., and Okamura, H. (1997). Light-induced resetting of a

mammalian circadian clock is associated with rapid induction of the mPer1 transcript. *Cell* **91**, 1043-1053.

Stephan, F. K., and Zucker, I. (1972). Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**, 1583-1586.

Sun, Z. S., Albrecht, U., Zhuchenko, O., Bailey, J., Eichele, G., and Lee, C. C. (1997). RIGUI, a putative mammalian ortholog of the *Drosophila* period gene. *Cell* **90**, 1003-1011.

Sutin, E. L., Dement, W. C., Heller, H. C., and Kilduff, T. S. (1993). Light-induced gene expression in the suprachiasmatic nucleus of young and aging rats. *Neurobiol Aging* **14**, 441-446.

Takekida, S., Yan, L., Maywood, E. S., Hastings, M. H., and Okamura, H. (2000). Differential adrenergic regulation of the circadian expression of the clock genes *Period1* and *Period2* in the rat pineal gland. *Eur J Neurosci* **12**, 4557-4561.

Takumi, T., Taguchi, K., Miyake, S., Sakakida, Y., Takashima, N., Matsubara, C., Maebayashi, Y., Okumura, K., Takekida, S., Yamamoto, S., *et al.* (1998). A light-independent oscillatory gene mPer3 in mouse SCN and OVLN. *Embo J* **17**, 4753-4759.

Teclemariam-Mesbah, R., Ter Horst, G. J., Postema, F., Wortel, J., and Buijs, R. M. (1999). Anatomical demonstration of the suprachiasmatic nucleus-pineal pathway. *J Comp Neurol* **406**, 171-182.

Toh, K. L., Jones, C. R., He, Y., Eide, E. J., Hinz, W. A., Virshup, D. M., Ptacek, L. J., and Fu, Y. H. (2001). An hPer2 phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phase syndrome. *Science* **291**, 1040-1043.

Valentinuzzi, V. S., Scarbrough, K., Takahashi, J. S., and Turek, F. W. (1997). Effects of aging on the circadian rhythm of wheel-running activity in C57BL/6 mice. *Am J Physiol* **273**, R1957-1964.

van Coevorden, A., Mockel, J., Laurent, E., Kerkhofs, M., L'Hermite-Baleriaux, M., Decoster, C., Neve, P., and Van Cauter, E. (1991). Neuroendocrine rhythms and sleep in aging men.

Am J Physiol 260, E651-661.

van Gool, W. A., Witting, W., and Mirmiran, M. (1987). Age-related changes in circadian sleep-wakefulness rhythms in male rats isolated from time cues. *Brain Res* 413, 384-387.

Vitaterna, M. H., King, D. P., Chang, A. M., Kornhauser, J. M., Lowrey, P. L., McDonald, J. D., Dove, W. F., Pinto, L. H., Turek, F. W., and Takahashi, J. S. (1994). Mutagenesis and mapping of a mouse gene, *Clock*, essential for circadian behavior. *Science* 264, 719-725.

von Gall, C., Schneider-Huther, I., Pfeffer, M., Dehghani, F., Korf, H. W., and Stehle, J. H. (2001). *Clock* gene protein mPER1 is rhythmically synthesized and under cAMP control in the mouse pineal organ. *J Neuroendocrinol* 13, 313-316.

Wakamatsu, H., Takahashi, S., Moriya, T., Inouye, S. T., Okamura, H., Akiyama, M., and Shibata, S. (2001). Additive effect of *mPer1* and *mPer2* antisense oligonucleotides on light-induced phase shift. *Neuroreport* 12, 127-131.

Watanabe, A., Shibata, S., and Watanabe, S. (1995). Circadian rhythm of spontaneous neuronal activity in the suprachiasmatic nucleus of old hamster in vitro. *Brain Res* 695, 237-239.

Witting, W., Mirmiran, M., Bos, N. P., and Swaab, D. F. (1994). The effect of old age on the free-running period of circadian rhythms in rat. *Chronobiol Int* 11, 103-112.

Wood, K. V. (1995). Marker proteins for gene expression. *Curr Opin Biotechnol* 6, 50-58.

Yamaguchi, S., Kobayashi, M., Mitsui, S., Ishida, Y., van der Horst, G. T., Suzuki, M., Shibata, S., and Okamura, H. (2001). View of a mouse clock gene ticking. *Nature* 409, 684.

Yamaguchi, S., Mitsui, S., Miyake, S., Yan, L., Onishi, H., Yagita, K., Suzuki, M., Shibata, S., Kobayashi, M., and Okamura, H. (2000). The 5' upstream region of *mPer1* gene contains two promoters and is responsible for circadian oscillation. *Curr Biol* 10, 873-876.

Yamazaki, S., Numano, R., Abe, M., Hida, A., Takahashi, R., Ueda, M., Block, G. D., Sakaki, Y., Menaker, M., and Tei, H. (2000). Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science* 288, 682-685.

Zee, P. C., Rosenberg, R. S., and Turek, F. W. (1992). Effects of aging on entrainment and rate of resynchronization of circadian locomotor activity. *Am J Physiol* 263, R1099-1103.

Zhang, Y., Brainard, G. C., Zee, P. C., Pinto, L. H., Takahashi, J. S., and Turek, F. W. (1998). Effects of aging on lens transmittance and retinal input to the suprachiasmatic nucleus in golden hamsters. *Neurosci Lett* 258, 167-170.

Zhang, Y., Kornhauser, J. M., Zee, P. C., Mayo, K. E., Takahashi, J. S., and Turek, F. W. (1996). Effects of aging on light-induced phase-shifting of circadian behavioral rhythms, fos expression and CREB phosphorylation in the hamster suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience* 70, 951-961.

Zylka, M. J., Shearman, L. P., Weaver, D. R., and Reppert, S. M. (1998). Three period homologs in mammals: differential light responses in the suprachiasmatic circadian clock and oscillating transcripts outside of brain. *Neuron* 20, 1103-1110.

謝辞

本稿を終えるにあたり、始終暖かい御指導、御鞭撻を賜りました早稲田大学人間科学部神経薬理学教室 柴田重信教授に甚大なる謝意を表します。また、共同研究の機会を与えてくださり、様々な支援を賜った神戸大学大学院医学系研究科脳科学講座 岡村均教授に厚く感謝いたします。さらに、貴重な助言とトランスジェニックマウスを提供していただいた神戸大学大学院医学系研究科脳科学講座 山口瞬助教授に厚く御礼申し上げます。本研究で使用した老齢ラットを御提供戴き、多くの御協力を賜りました三菱ウェルファーマ株式会社の森哲子氏をはじめとする社員の方々に厚く御礼申し上げます。さらに、本研究の遂行にあたり、多大なる御協力と有益なる助言を賜りました長崎大学医学部 守屋孝洋助手ならびに早稲田大学人間科学部 秋山正志博士に心より感謝いたします。最後に、多くの助力を賜りました早稲田大学人間科学部神経薬理学教室の諸氏に深く感謝いたします。