

哺乳類体内時計の階層構造 ：クロノアーキテクチャー

山崎 晋

バージニア大学生物学部NSF時間生物学センター

哺乳類の体内時計は、主振動体 (master clock) と従属振動体群 (slave oscillators) から構成される階層構造をなすというモデルは古くから提唱されていたが、これまで末梢組織からリズムを正確に測定する方法がなかったため、そのモデルは推定にすぎなかった。しかし、最近の時計遺伝子のクローニングの成果により、末梢組織に減衰振動体が存在することが確認され、主振動体との相互関係やその階層構造が明らかにされつつある。哺乳類の体内時計の構造を解析する研究は、時差ぼけやシフトワークにおける肉体的不快感 (malaise) を理解するうえで、きわめて有益であるばかりでなく、これまで経験的に行われていた時間治療 (chronotherapy) に有用な情報をもたらすことが期待できる。

1. SCNの時計

哺乳類では視交叉上核 (SCN) に、活動リズムを駆動する時計が存在することが、これまで数多くの研究によって示されてきた^{16, 21, 15)}。SCNを破壊すると活動、体温、血中ホルモンなど観察されるほとんどのサーカディアンリズムが消失する^{16, 25, 31, 32, 38)}。一方、SCN破壊によってリズムの消失した動物に、他個体のSCNを移植すると活動リズムが再現する^{18, 34)}。このとき、SCN破壊した野生型のハムスターに、活動リズムの周期が短い (約20時間) タウミュータントハムスターのSCNを移植すると (SCN破壊前の野生型の周期は約24時間)、20時間の活動リズムが現れる²⁹⁾。SCN移植によって再現するサーカディアンリズムは活動リズムのみで、松果体メラトニン、血中コルチゾール、コルチコステロンなどのホルモンリズムは再現しない²⁹⁾。また、再現した

活動リズムは明暗条件に同調しない²⁹⁾。

ラットやハムスターの脳に慢性電極を埋め込み、無麻酔無拘束の動物から電気活動を記録する方法がある。この方法で記録したSCNの電気活動は、昼間に高く夜間に低いリズムを示す^{13, 14, 48)}。SCN以外の脳部位でもサーカディアンリズムがみとめられ、それは夜行性の行動リズムと一致して、夜間に高く昼間に低い^{13, 14, 48)}。ラットのSCNを外科的に周りの組織から隔離するとSCNの電気活動リズムは継続するが、SCNの外側のリズムは消失する¹³⁾。また、同様の方法でSCNを外科的に隔離すると、活動リズムが消失することが報告されている¹⁹⁾。これら一連のin vivoにおける実験は、SCNにサーカディアンペースメーカーが存在し、それが他の脳部位でみられるリズムをドライブしていることを示している。

一方、ハムスターでは、SCNを周りの

組織から隔離しても動物の活動リズムは消失しないという報告がある⁸⁾。また、SCNを破壊した動物に、低分子量の物質しか通さないカプセルに閉じ込めたSCNを移植するとリズムが再現するということが示され、SCNの出力はホルモン様物質であることが指摘されている³⁷⁾。これらの結果は先に述べたラットの結果と相反するように思われる。ハムスターの活動リズムはSCN以外の脳部位の電気活動リズムを必要としないのだろうか、それとも本来神経性とホルモン性の両方の出力があって、ホルモン出力のみでの活動リズムをある程度駆動できるのだろうか。今後、物質の同定を含む、詳細な研究が望まれる。

SCNが*in vitro*でもサーカディアンリズムを刻むという研究は数多くのグループによってさまざまな方法により確認されているが、誌面の関係上、詳細は、総説を参考していただきたい^{48, 50)}。SCNが*in vitro*で自律振動するということが、SCN破壊により観察されるほとんどのサーカディアンリズムが消失し、SCN移植によって活動リズムが再現するということからSCNが主振動体であると考えられている。

2. SCN以外の時計

先にSCN破壊によりほとんどの観察されるサーカディアンリズムが消失すると述べたが、これまでにいくつかのSCN非依存性リズムの存在が確認されている。ラット網膜のディスクシェーディング、マウス角膜上皮細胞の有糸分裂リズムは、SCNを破壊した動物でも持続する^{42, 35)}。これらは、哺乳類の眼球内に時計が存在することを示唆しており、ラットの光感

受性を行動学的に測定して得られるリズムがSCN破壊後も持続することと一致する⁴³⁾。その後、網膜に振動体が存在することが、培養網膜から放出されるメラトニンのリズムの測定によって直接示された⁴⁴⁾。また最近、培養したレンズにおいてもNAT活性のリズムが継続することが報告されている⁴⁵⁾。

1964年に、培養したハムスター副腎からコルチコステロンの放出のサーカディアンリズムが観察されたという報告があり^{2, 3)}、それは1974年に他のグループによって追試されている³⁶⁾。また肝臓では、酸素消費量、タンパク合成、核の大きさの変化のリズムが*in vitro*でも継続することが報告されている^{10, 17, 31)}。これらの1960、70年代に報告された研究は、SCNが主振動体であるという一連の研究体系に埋もれて、これまでほとんど注目されることがなかったため、一般にあまり知られていない。最近では、培養したラット睪腺から統計的に優位なインスリンの放出リズムが報告されている²⁷⁾。

一方、SCN非依存性リズムとして、周期的制限給餌によるリズムとメトアンフェタミン投与によるリズムは詳細にわたり研究されており、一般に幅広く受け入れられている¹¹⁾。ラットを自由給餌から昼間4時間のみ餌にアクセスできる制限給餌に切り替えると、夜間の活動リズムに加え、餌を得られる時間の数時間前から盛んになる予知活動が見られるようになる。予知行動は、SCNを破壊しても観察できるが、制限給餌から自由給餌に戻ると、すぐに消失する。ところが、1-2週間後に動物を絶食させると、餌にアクセスできないにもかかわらず、餌を予知していた同じ時間に予知行動が現れる。この時間記憶は50日以上持続したという報

告もある²⁰⁾。この現象は、SCN破壊動物(恒明条件)でも見られることから、SCN以外にある振動体(food-entrainable oscillator: FEO)が存在することが推定された。実際にFEOがどこに存在するかを確かめるために、数多くの破壊実験がなされたが、確固たる存在場所は見つからず、それゆえ、複数の神経核のネットワークがFEOとして働いている可能性が提案されている²⁰⁾。ラットにメトアンフェタミンを投与すると24時間の明暗周期に同調した成分に加え、24時間よりも長い周期のリズムが現れる。そのリズムの特徴はFEOと似ているといわれているが、FEOと同じ振動体なのか、それともFEOと強く結合している別の振動体が存在するのか未だ不明のままである¹¹⁾。

3. 主振動体と従属振動体

それぞれの生体機能には1日のリズムがあり、それが明暗周期に対して一定の位相関係を保っている。1978年にHalbergのグループはマウスの様々な生体機能のピークが一日のどの時間帯にあるのかを詳細に調べ、“位相地図”を作成した¹⁰⁾。各々の生体機能のピークが一日の異なる時間にあること、明暗周期をシフトした時にそれぞれの生体機能が定常な位相に落ち着くまでの速度がことなることから、Moore-Edeらは、哺乳類の体内時計の構造として、主振動体と複数の従属振動体からなる階層構造を提案している²¹⁾。

最近になって、相次ぐ哺乳類時計遺伝子のクローニングにより、末梢に時計がある可能性に注目が集まった。順遺伝学的方法によってクローニングされたClockやショウジョウバエの時計遺伝子

のホモログとしてクローニングされたPer遺伝子群など哺乳類の時計遺伝子はSCN以外にも中枢、末梢組織の様々な場所で発現していたのである^{15, 18, 11)}。時を同じくして、ショウジョウバエのper遺伝子は、遊離培養した様々な組織でリズムを示すことが発表された²²⁾。さらに培養したラット繊維芽細胞からPer遺伝子のリズムが観察され¹¹⁾、培養したゼブラフィッシュの末梢組織においてもショウジョウバエ同様に、時計の存在がみとめられたことなどから¹¹⁾、哺乳類でも末梢組織に時計が存在する可能性が高まった。

4. 末梢組織に減衰振動子の発見

著者らのグループは、Per1プロモータにリポーター遺伝子ルシフェリンをつけたコンストラクトを導入したトランスジェニックラットを作成し、Per1転写リズムを発光によってモニターすることに成功した²³⁾。予想通り、培養したSCNからは主観的昼にピークがあるほぼ24時間周期のリズムが1ヶ月以上にわたり観察され、SCNが自律振動体であることを確認した(図1、2)。培養した筋肉、肺、肝臓などの末梢組織からも、主観的夜にピークがあるリズムが観察されたが、それらのリズムは、1週間以内に減衰した(図3)。振動の止まった組織でも刺激をすると、再び振動が開始することから、減衰は、培養条件の不適當さによるものではないと考えられる。我々は哺乳類のサーカディアンシステムを、自律振動体SCNが末梢に存在する減衰振動体群をドライブしている階層構造であると考え、それを確かめるために、明暗条件をシフトした結果生ずる各々の振動体の位相の

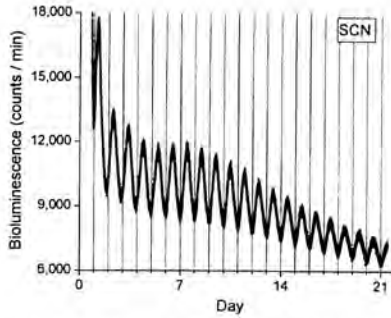


図1.トランスジェニックラットSCNの発光リズム

Per1-lucトランスジェニックラットのSCNを培養膜上で、ルシフェリンを含む培養液で培養し、培養直後（Day 0）から発光リズムを光電子倍增管により連続測定した。

SCNから得られる約24時間のサーカディアンリズムは、培地交換なしでも3週間以上継続した。（山崎未発表データ）

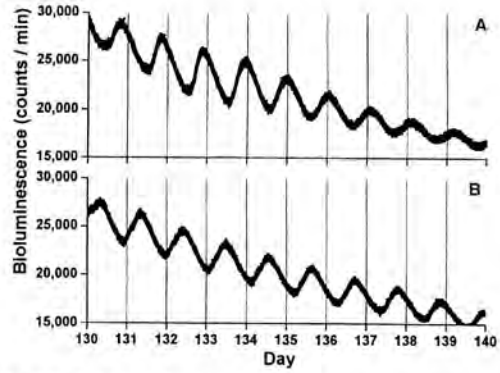


図2.長期培養SCNから得られた発光リズム

Per1-lucトランスジェニックラットのSCNをCO2インキュベーターで培養し（1週間に一度の培地交換）、122日後からルシフェリンを含む培養液で発光のリズムを記録した。同じ条件で用意した4つのカルチャーを同様に扱ったが、測定開始時にみられた位相はそれぞれ異なっていた（2例をそれぞれAとBに示してある）。この事は、SCNは培養中（発光を測定していない間も）それぞれわずかに異なる周期でリズムを刻み続けていたことと、1週間に一度の培地交換はリズムをリセットしなかったことを強く示唆しており、長期培養中に振動がとまっていて、培地交換時から振動が再び開始したのではないものと考えられる。（山崎未発表データ）

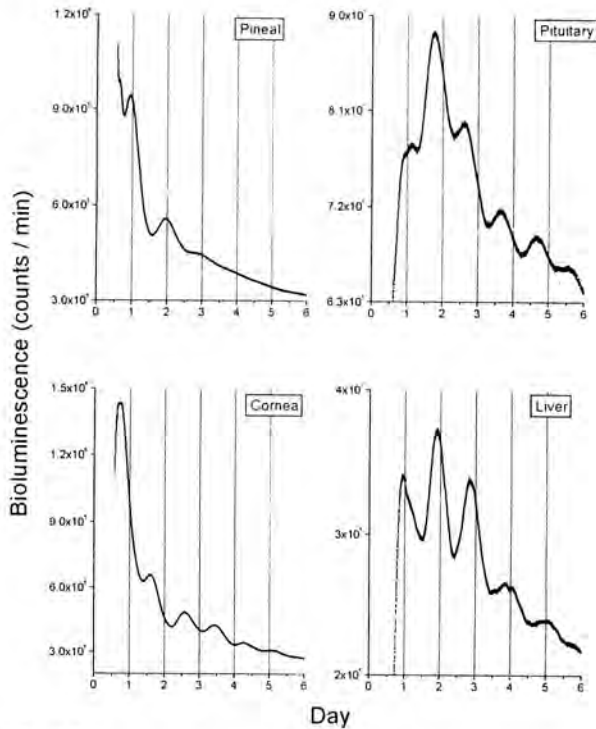


図3.末梢組織のサーカディアンリズム

Per1-lucトランスジェニックラット（3ヶ月齢）から取り出した、松果体、下垂体、角膜、肝臓の小片を、ルシフェリンを含む培養液中で培養し、発光のリズムを測定した。培養観察される最初のピークの位相、周期は組織によって異なる。また観察したすべての末梢組織から得られるリズムは2日から10日間で減衰した。（山崎未発表データ）

動きを観察した。明暗条件の6時間および9時間のシフトに対し、SCNは前進後退とも即座に新しい明暗周期に再同調したが、末梢時計は再同調に時間がかかった。たとえば筋肉は光条件を6時間前進させた翌日では一時的に無周期となり、6日後には位相前進を完了する。それに対し、位相後退では、翌日にはすでに、ほぼ半分の3時間の位相後退が観察される。同様に肺でも再同調に必要な日数は、後退よりも前進が長かった。一方、肝臓では位相前進が後退よりも早く完了することがわかった。これら組織により位相変化の速度が異なることは、SCNからの同調シグナルが1つではないことを想像させる。光条件をシフトさせると、末梢時計が新しい条件に再同調するには時間がかかり、組織によっては一時的に無周期となる。このSCN時計と末梢時計間の一時的な位相の乱れが時差ぼけやシフトワークの肉体的不快感を生じさせているものと考えられる。

5. 同調シグナル

SCN (自律振動体) が末梢に存在する減衰振動体を振動し続けるようにドライブしているというモデルを直接証明するには、SCNを破壊した動物で末梢の時計がどうなるかを調べる必要があるが、残念ながら信頼しうるデータは未だ発表されていない。最近、体内時計の階層構造を考えるうえで重要な結果が3つのグループからそれぞれ異なる方法で示された^{7, 8, 30)}。昼間のみの制限給餌により、ラットやマウスの肝臓のリズムの位相が夜から、昼にシフトしたのである。それとは対照的に、SCNの位相は光サイクルに同調しており、制限給餌の影響をうけな

かった。これらの結果は、肝臓のリズムは自由給餌ではSCNを介して明暗条件に同調しているが、昼間の制限給餌下では、SCNの支配から外れ、餌の時間(昼)に同調しうることを示している。それでは、どの生体信号が肝臓のリズムの位相をセットしているのでしょうか? Schiblerのグループはデキサメタゾンが培養繊維芽細胞のリズムの位相を変位させることと、デキサメタゾンをマウスに投与すると肝臓、腎臓、心臓のリズムの位相が変化することから、グルココルチコイドが同調シグナルであることを提案している⁵⁾。しかし、後に同じグループが肝臓特異的にグルココルチコイド受容体を欠如させたマウスでも野生型同様に制限給餌により肝臓のリズムの位相変化が生じたことを報告している⁷⁾。我々のグループもコルチコステロンを投与しても肝臓や肺のリズムが位相変化しないことを観察しているので³⁰⁾、副腎からのホルモンが関与する可能性は低いと思われる。SCNから末梢組織への神経連絡も確認されているが³⁰⁾、迷走神経を切断しても制限給餌により予知活動やコルチコステロンの上昇が観察されることから^{6, 30)} 神経出力の関与は少ないと考えられる。

ごく最近McKnightのグループがClock:BMAL1やNPAS2:BMAL1ヘテロダイマーのDNA結合活性がNAD補助因子のレドックス状態によって異なることを発表し、摂食による細胞内のレドックス変化が末梢の時計を同調させている可能性があることを提案している³¹⁾。

6. おわりに

SCNから末梢時計への同調シグナルは、実際には複雑で、複数のシグナルが

補償しあうように働いているため、その一つだけを取り去っても正常に機能するのかもしれない。あるいは、複数のシグナルが合わさって初めて機能するのでそのうちの一つだけを投与しても位相変化が観察されないのかもしれない。SCNが活動リズムや摂食行動のリズムを支配していることから、究極には、SCNから肺や肝臓への同調シグナルは存在しなくても、SCNは活動リズムを通して肺のリズムを、摂食行動を通して肝臓のリズムを同調することができる。すなわち、SCNは摂食のタイミングを支配するだけで、実際には、食べた餌が（たとえば血糖値を上昇させることによって）肝臓の時計をリセットし、またSCNは活動リズムを支配するだけで、肺は運動量（酸素消費）により位相をリセットされる可能性も考えられる。そうなると、主振動体—末梢時計からなるフィードバックループは生体にとどまらず、生体の外に出ていることになる。

いずれにせよ、主振動体から末梢時計への同調シグナルをみつける意義はきわめて大きいとおもわれる。たとえば、癌の時間治療で、正常細胞と癌細胞の時計の位相をコントロールし、正常細胞に毒性のないかつ癌細胞に効果がある時間に薬を投与することも可能である。また、より身近なことでは、時差ぼけや夜勤時に多くの人が体験する食欲不振に対応するために消化器系の位相をあわせることが可能になるかもしれない。

参考文献

- 1) Abe M, Itoh MT, Miyata M, Shimizu K, Sumi Y: *Exp Eye Res.* 70: 805-808 (2000)
- 2) Andrews RV: *Gegenbaurs Morphol Jahrb.* 117: 89-98 (1971)
- 3) Andrews RV, Folk JE: *Comp Biochem Physiol.* 11: 393-409 (1964)
- 4) Balsalobre A, Damiola F, Schibler U: *Cell.* 93: 929-937 (1998)
- 5) Balsalobre A, Brown SA, Marcacci L, Tronche F, Kellendonk C, Reichardt HM, Schutz G, Schibler U: *Science* 289:2344-2347 (2000)
- 6) Comperatore CA, Stephan FK: *Physiol Behav.* 47: 671-678 (1990)
- 7) Damiola F, Le Minh N, Preitner N, Kornmann B, Fleury-Olela F, Schibler U: *Genes Dev.* 14: 2950-2961 (2000)
- 8) Hakim H, DeBernardo AP, Silver R: *J Biol Rhythms.* 6: 97-114 (1991)
- 9) Hara R, Wan K, Wakamatsu H, Aida R, Moriya T, Akiyama M, Shibata S: *Genes Cells.* 6: 269-278 (2001)
- 10) Hardeland R: *Int J Biochem.* 4: 581-595 (1973)
- 11) 本間研一、本間さと、広重力: 生体リズムの研究, pp310, 北海道大学図書刊行会 (1989)
- 12) Honma S, Honma K, Hiroshige T: *Am J Physiol.* 246: R949-R954 (1984)
- 13) Inouye S-IT, Kawamura H: *Proc Natl Acad Sci USA.* 76: 5962-5966 (1979)
- 14) Inouye S-IT, Kawamura H: *J Comp Physiol [A].* 146: 153-160 (1982)
- 15) King DP, Zhao Y, Sangoram AM, Wilsbacher LD, Tanaka M, Antoch MP, Steeves TD, Vitaterna MH, Kornhauser JM, Lowrey PL, Turek FW, Takahashi JS: *Cell.* 89: 641-653 (1997)

- 16) Klein DC, Moore RY, Reppert SM: Suprachiasmatic nucleus: the mind's clock. New York: Oxford UP (1991)
- 17) Langner R, Rensing L: *Z Naturforsch.* 27: 1117-1118 (1972)
- 18) Lehman MN, Silver R, Gladstone WR, Kahn RM, Gibson M, Bittman EL: *J Neurosci* 7: 1626-1638 (1987)
- 19) Lowrey PL, Takahashi JS: *Annu Rev Genet.* 34: 533-562 (2000)
- 20) Matsumoto SI, Basil J, Jetton AE, Lehman MN, Bittman EL: *J Biol Rhythms.* 11: 145-162 (1996)
- 21) Meijer JH, Rietveld WJ: *Physiol Rev.* 69: 671-707 (1989)
- 22) Meyer-Bernstein EL, Jetton AE, Matsumoto SI, Markuns JF, Lehman MN, Bittman EL: *Endocrinology.* 140: 207-218 (1999)
- 23) Mistlberger RE: *Neurosci Biobehav Rev.* 18: 171-195 (1994)
- 24) Moore-Ede MC, Sulzman FM, Fuller CA: *The clock that time us.* Massachusetts: Harvard UP (1982)
- 25) Moore RY, Eichler VB: *Brain Res.* 42: 201-206 (1972)
- 26) Moreira AC, Kreiger DT: *Physiol Behav.* 28: 787-790 (1982)
- 27) Peschke E, Peschke D: *Diabetologia.* 41: 1085-1092 (1998)
- 28) Plautz JD, Kaneko M, Hall JC, Kay SA: *Science* 278: 1632-1635 (1997)
- 29) Ralph MR, Foster RG, Davis FC, Menaker M: *Science.* 247: 975-978 (1990)
- 30) Refinetti, R, Kaufman, CM, Menaker M: *J Comp Physiol [A].* 175: 223-232 (1994)
- 31) Rensing L, Goedeke K, Wassmann G, Broich G: *J Interdiscipl Cycle Res* 5: 267-276 (1974)
- 32) Rusak B, Zucker I: *Physiol Rev.* 59: 449-526 (1979)
- 33) Rutter J, Reick M, Wu LC, McKnight SL: *Science.* 293: 510-514 (2001)
- 34) Sawaki Y, Nihonmatsu I, Kawamura H: *Neurosci Res* 1: 67-72 (1984)
- 35) Scheving LE, Tsai TH, Powell EW, Pasley JN, Halberg F, Dunn J: *Anat Rec.* 205: 239-249 (1983)
- 36) Shiotsuka R, Jovonovich J, Jovonovich JA: *Chronobiological Aspects of Endocrinology.* Stuttgart: Schattauer-Verlag. pp255-267 (1974)
- 37) Silver R, LeSauter J, Tresco PA, Lehman MN: *Nature.* 382: 810-813 (1996)
- 38) Stephan FK, Zucker I: *Proc Natl Acad Sci USA.* 69: 1583-1586 (1972)
- 39) Stokkan KA, Yamazaki S, Tei H, Sakaki Y, Menaker M: *Science.* 291: 490-493 (2001)
- 40) Szabo I, Kovats TG, Halberg F: *Chronobiologia* 5: 137-143 (1978)
- 41) Tei H, Okamura H, Shigeyoshi Y, Fukuhara C, Ozawa R, Hirose M, Sakaki Y: *Nature* 389: 512-516 (1997)
- 42) Terman JS, Reme CE, Terman M: *Brain Res.* 605: 256-264 (1993)
- 43) Terman M, Terman J: *Ann N Y Acad Sci.* 453: 147-161 (1985)
- 44) Tosini G, Menaker M: *Science.* 272: 419-421 (1996)
- 45) Turek FW: *Annu Rev Physiol.* 47: 49-64 (1985)
- 46) Ueyama T, Krout KE, Van Nguyen X, Karpitskiy V, Kollert A, Mettenleiter TC, Loewy AD: *Nat Neurosci.* 2: 1051-1053 (1999)
- 47) Whitmore D, Foulkes NS, Sassone-Corsi P: *Nature.* 404: 87-91 (2000)
- 48) Yamazaki S, Kerbeshian MC, Hocker CG,

- Block GD, Menaker M: J Neurosci. 18: 10709-10723 (1998)
- 49) 山崎 晋：医学のあゆみ. 190: 285-286 (1999)
- 50) 山崎 晋：CLINICAL NEUROSCIENCE. 18: 1143-1146 (2000)
- 51) Yamazaki S, Numano R, Abe M, Hida A, Takahashi R, Ueda M, Block GD, Sakaki Y, Menaker M, Tei H: Science. 288: 682-685 (2000)