


視交叉上核外概日ペースメーカー

山崎 晋 

テキサス大学 サウスウエスタン医学センター 神経科学科

近代、哺乳類概日リズム研究では、ペースメーカーの場所が同定され、分子振動の基本メカニズムが解明された。さらに、末梢組織にも概日振動体が存在することが判明し、体内時計と環境サイクル間の脱同調（外的脱同調）に加え、中枢時計と末梢時計間の脱同調（内的脱同調）が生じることがわかってきた。そして、これら脱同調などのリズムの攪乱と疾病との関連が盛んに議論されるようになった。現在、哺乳類概日リズム研究体系は確立したとも思われるが、いまだ場所も同定されていない既知の概日分子振動メカニズム非依存の概日ペースメーカーも存在する。本稿では、それら未知のペースメーカー研究の歴史をカバーしつつ、その構造と機能を考えてみたい。

1. はじめに

内因性であり、環境因子に同調でき、周期は環境温度にほとんど影響を受けないという概日リズムの3つの特徴がパイオニアたちにより示された後、多細胞生物の概日リズム研究者たちは、同調に係る光受容体と時計の場所の同定に全力をそそいだ¹⁻³。時計組織の同定には、時計候補組織の破壊により行動・生理リズムが消失すること、そのリズムが消失した個体にほかの個体から採集した候補組織を移植するとリズムが回復すること、そして、候補組織は生体外に取り出してもリズムを刻むことのそれぞれを確認するアプローチがとられた。これらの条件を満たすということで同定された時計組織は、ゴキブリの視葉^{4,6}、スズメの松果体⁷⁻⁹、げっ歯類の視交叉上核（suprachiasmatic nucleus, SCN）¹⁰⁻¹⁹などがあげられる（スズメの松果体は小さく、培養下では測定可能なメラトニンが放出されないため、培養での初期の研究は主にニワトリの松果体が用いられた²⁰⁻²³、また鳥類では眼、視床下部、松果体に概日振動体が存在し、種により主要なペースメーカー組織が異なる^{24,25}）。1997年からの数年間は、時計分子研究黄金期で、多様な方法で時計遺伝子が必然的・偶然的に同定され、基本分子振動メカニズムが瞬間に解明された。この時計遺伝子の同定により、その挙動（振動）を細胞や組織から直接観察することが可能となり、末梢組織にも概日振動体があることが証明された^{26,27}。末梢時計の発見は、体内時計と環境周期間の脱同調と考えられていた時計障害が、中枢時計と末梢時計間でも起きう

ることを示し、実際、その中枢時計と末梢時計間のミスマッチメントがヒトの健康へ及ぼす（悪）影響が盛んに議論されるようになった。一方、哺乳類概日ペースメーカーであるSCN以外にも未知の概日ペースメーカーが存在する²⁸。これらペースメーカーの行動出力は特殊な条件でないと観察されないことから、研究は難しい。本稿では、これら未知の哺乳類概日ペースメーカーの研究の歴史を記載するとともに、これら振動体の構造と生理・行動的な機能について考えてみたい。

2. FEO

制限給餌下でみられる餌の予知行動とそれを司るペースメーカーの研究の歴史は古い。1922年にRichterはラットに正午に25分間のみ餌を与える制限給餌を続けると、その数時間前からラット行動量が上昇する現象を報告した²⁹。1979年にStephanは、この餌の予知行動（food anticipatory activity, FAA）は、SCNを破壊した動物でも観察されることから、SCN外に存在する振動体によって駆動されていると結論した^{30,31}。当初この振動体は、food (feeding)-entrainable pacemakerと論文で記載されたが、Stephanは後に、Jürgen AschoffにpacemakerはSCNのためにのみ使用するべきだと言われたため、food-entrainable oscillator (FEO)と呼ぶことにしたと述べている³²。しかし、最近の研究では、FEOはSCN同様、末梢の時計の位相を調和することがで

きること、生理・行動リズムを駆動することができる
ことが示され、*pacemaker* と呼ぶにふさわしいとおもわれるが、本稿では、歴史的に FEO と呼ばれてきたことに準じ FEO と呼ぶことにする。FAA は満腹・空腹により繰り返されるインターバルタイマー(砂時計)で駆動されていることでも説明できるが、FAA は概日振動体 (FEO) により駆動されていると考えなければ説明できない多くの特徴が観察されている。制限給餌により現れる FAA は、自由給餌に移した直後すぐに消失するが、その後絶食をすると以前現れていた時刻とほぼ同じ時刻に再出現する。SCN を破壊して恒暗条件下で飼育したラットでも FAA は観察され、自由給餌下で消失した FAA は、その後の絶食で、制限給餌下で観察された FAA の位相の延長上に現れる^{30,31}。SCN を破壊した動物でみられる FAA は、制限給餌の時間をシフトすると、移行期を経て新しい餌の時刻に再同調する³³。この移行期の存在は、概日振動体の特徴の1つである。制限給餌を異なる周期で行うと、24 時間に近い一定の範囲の周期で餌を与えたときのみ FAA が観察される^{34,35}。この同調範囲が存在することも概日振動体としての特徴である。これら間接的な証明に加え、1992 年に Stephan は FAA が特殊な条件下で、フリーランするという現象を観察した。SCN を破壊したラットを恒暗条件下で、同調範囲より短い、23 時間の周期で制限給餌を行うと、25 時間よりも長い周期の活動リズム (FAA) がフリーランした³³。この現象は、長い間追試されることはなかったが、近年高須らは、SCN を破壊した *Cry1* ノックアウトマウスで³⁶、我々のグループは、SCN や末梢組織の概日リズムが機能していない *Per1/2/3* トリプルノックアウトマウスで³⁷、同調範囲を超える周期で制限給餌をしたときに FAA がフリーランすることを観察している。これらの観察結果は、FEO は概日振動体であることと、特殊な条件下では、FEO に駆動されるフリーランする行動リズムを観察できることを示している。

FEO の場所の同定は、脳の部分破壊、内分泌組織の除去などにより試みられつづけたが、まだ候補の組織もわかっていない³⁸。dorsomedial hypothalamus は FEO の候補としてあげられたが、その後論文中的実験的、倫理的問題が指摘された³⁸⁻⁴⁵。その後の研究により、dorsomedial hypothalamus は FAA の現れ方には関係しているが、FEO の振動には必須ではない (FEO 本体ではない) というのが現在の共通した認識である^{46,47}。脳幹の *parabrachial nucleus* を破

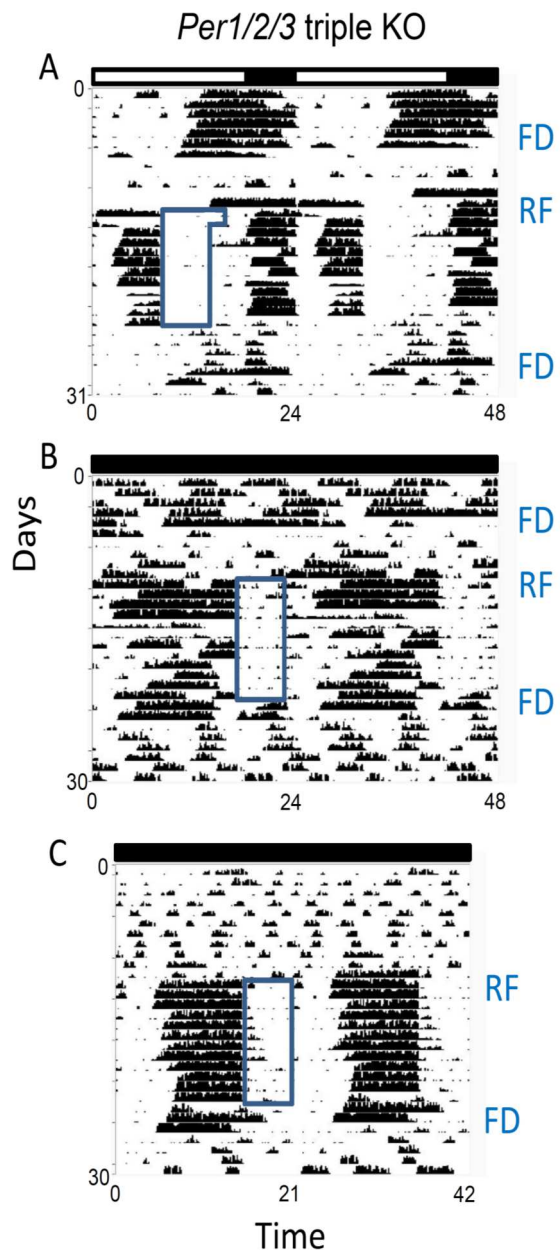


図 1 FEO

Per1/2/3 トリプルノックアウトマウスに明暗条件下 (A)、恒暗条件下 (B、C) で 6 時間の制限給餌を行った。*Per1/2/3* トリプルノックアウトマウスは、SCN や末梢組織の内因性振動機能は失われているが、明暗条件では明瞭な日周行動リズムを示す (A)。昼に制限給餌を行うと、夜間の行動に加え、昼間餌の時間の数時間前から餌を予知する行動 (FAA) が見られるようになる。恒暗条件では、トリプルノックアウトマウスは、内因性の概日行動リズムは観察されず、ウルトラディアンリズムを示す (B)。この動物に 6 時間の制限給餌を 24 時間周期で行うと、ウルトラディアンリズムは消失し、活動リズムが出現する。しかし、このリズムは、餌の時間に同調することはなく、一部の個体では、21 時間周期でフリーランする現象が観察された。制限給餌を 21 時間周期で行うと、餌の時間の前に活動が集中する、餌を予知する (餌の時間に同調した) 概日行動リズムが観察された (C)。線で囲んだ部分は、制限給餌中に餌を食べられる時間を示している。行動図の右の文字は、FD は絶食、RF は制限給餌を示している。それ以外は、自由給餌である。活動図は、A、B は 1 日を 24 時間、C は 21 時間として、ダブルプロット法で表示している。明暗条件は、活動図の上に、明期を白で、暗期を黒で示してある。これらは、Pendegast et al³⁷ に発表した行動データをオリジナルとはすこし異なるパラメータで再表示した。

壊すと FAA が消失するという報告があるが、この論文の著者らは、parabrachial nucleus は FEO ではなく、その入力か出力であると結論している⁴⁸。

興味深いことに時計遺伝子の欠如や変異は、FEO にほとんど影響を与えない^{45,49}。行動リズムが消失した概日リズム変異体マウスでも、制限給餌により予知行動が正常に出現する。*Bmal1* ノックアウトや、*Per2^{Brdm1}* 変異体マウスでは FAA がみられないことが報告されたが、のちにこれらの結果は他の研究者により否定されている⁴⁹。我々は、SCN や末梢組織で概日リズムが検出されない *Per1/2/3* トリプルノックアウトマウスへ制限給餌を行った (図 1)³⁷。恒暗条件下では、このマウスは、3 時間から 6 時間周期のウルトラディアンリズムを示す。この動物に 24 時間周期で制限給餌を行うと、連続する活動リズムが現れたが、餌の時間に同調せず、一部の個体では約 21 時間周期でフリーランした (図 1 B)。我々はこの活動リズムは FEO により駆動されており、また 24 時間の制限給餌は同調範囲外であると仮定し、この周期に近い 21 時間の周期で制限給餌をおこなった。すると、マウスは、餌の数時間前に連続行動をする強い FAA を示した (図 1 C)。この FAA は自由給餌にした直後消失し、その後の絶食で、前の制限給餌で観察された延長上の位相で再出現した。このことは、*Per1, 2, 3* の 3 つの遺伝子は FEO の振動には必要ではないが、FEO の周期に影響をもたらしていることを示している。時計遺伝子以外に、空腹や満腹に関係するペプチド、神経伝達物質やその受容体など様々なノックアウト動物で予知行動が測定されたが、制限給餌で FAA が消失した確固たる例はいまだない^{45,49}。

3. MASCO/MAO

他の SCN 非依存の行動リズムとして、メタンフェタミンにより誘導される行動リズムが知られている。最初の現象は、アンフェタミン投与により観察された⁵⁰。1982 年に池田と千葉は明暗条件で飼育されたラットの飲み水を 0.01% のアンフェタミンを含む飲み水に差し替えた。こうして恒常的に低濃度のアンフェタミンを継続投与すると、SCN に支配されている光に同調する行動リズムに加え、それよりも長い周期で光に同調しない行動リズムが出現した。継続してアンフェタミンを投与するとこの新しく出現したリズムが徐々に強くなり、最終的には SCN に支配されるリズムは見られなくなりアンフェタミンにより誘導さ

れた周期の長いリズムのみとなった。この現象は、恒暗条件でも観察された。数年後、本間らは、メタンフェタミンでも同様の現象が観察されることを報告した⁵¹。さらに、重要なことに、本間らは、SCN を破壊して無周期となったラットでも、メタンフェタミンを与えると明瞭な行動リズムが出現することを観察した⁵²。このメタンフェタミンにより誘導されるリズムは、ラットの飲水行動 (砂時計) によって引き起こされている可能性もある。しかし、この可能性は、メタンフェタミンを腹腔常駐させた浸透圧ポンプにより恒常的に放出させる実験で否定された⁵²。また、メタンフェタミンにより誘導される行動リズムは、メタンフェタミンを含まない飲み水に切り替えた後も 2 週間継続することが観察されている⁵³。これらの実験結果は、メタンフェタミンで誘導される行動リズムは SCN 外概日ペースメーカーにより駆動されていることを示している。このメタンフェタミン誘導行動リズムは、本間らが中心となり、ラットで研究されてきたが、2006 年に Menaker のグループは、同様なリズムが SCN を破壊したマウスでも観察できることを報告した⁵³。Menaker らはこのペースメーカーを methamphetamine-sensitive circadian oscillator (MASCO) と名付け⁵³、本間グループは、このペースメーカーを methamphetamine-induced oscillator (MAO) と名付けた⁵⁴。MASCO はメタンフェタミン非存在下でも振動体としての特徴があること、MAO はメタンフェタミンを与えたときに振動が開始することをそれぞれ想像させ、これらの命名には、各ラボがどのようにこのペースメーカーの役割を考えているかがよく表現されている。FEO と同様に MASCO/MAO は SCN 外に存在するが、FEO と異なりフリーランを容易に観察できることから、MASCO/MAO の周期は容易に求めることができる (図 2、3)。C57BL/6J 系統のマウスは恒暗条件で約 23.6 時間の周期でフリーランする。メタンフェタミンを与えると周期が延長し、平均 24.2 時間となる (図 2 C、図 3)。しかし、SCN を破壊して無周期となった C57BL/6J マウスにメタンフェタミンを与えると SCN インタクトの動物よりもはるかに長い周期 (26-29 時間) の活動リズムが出現する (図 2 D、図 3)。このことは、メタンフェタミンを投与した SCN インタクトのマウスで見られる約 24.2 時間の行動リズムは、結合した SCN と MASCO/MAO によって駆動されていることを示している^{53,55}。一方、C3H 系統のマウスは、メタンフェタミンを与えても周期が変化しない。この結果は 3 つの可能性で説明できる。一

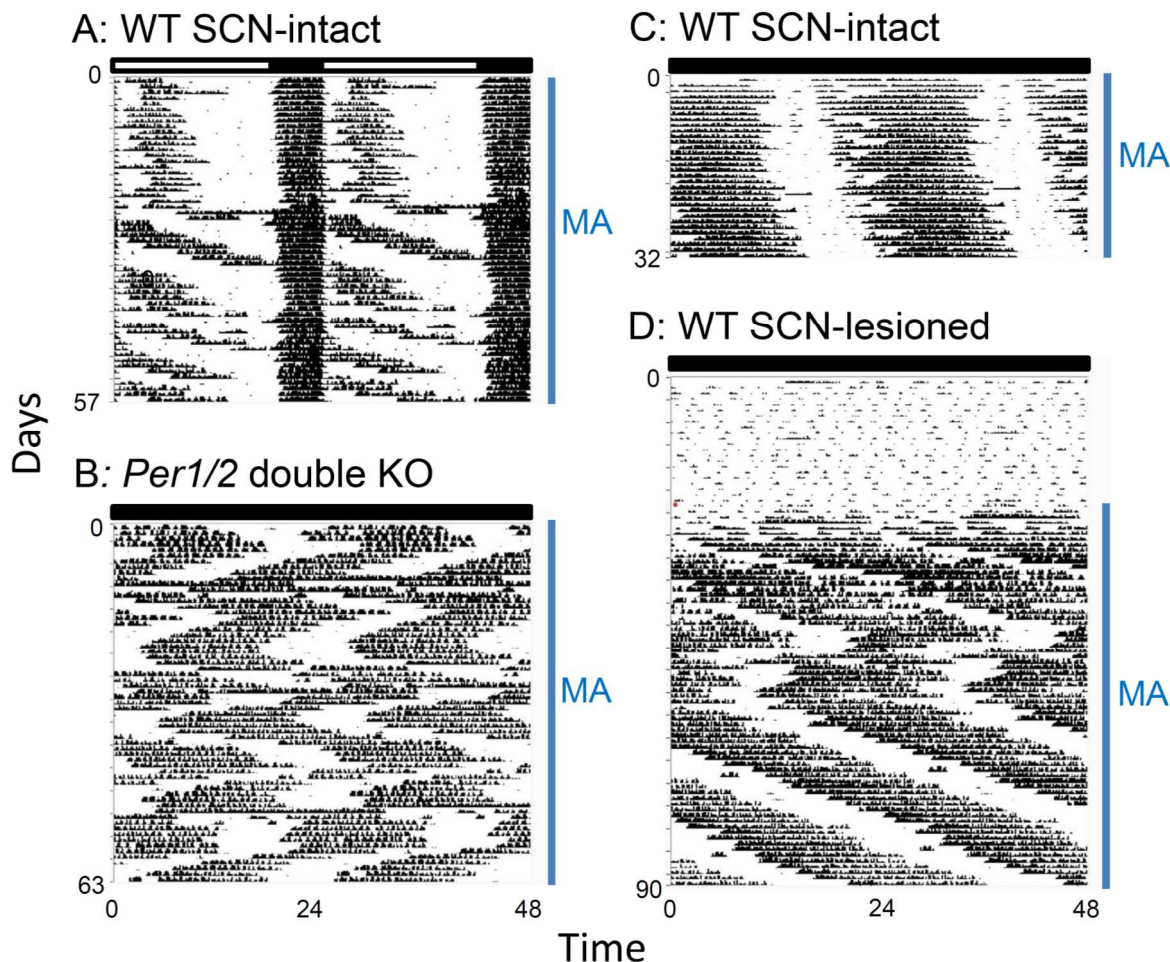


図2 MASCO (MAO)

明暗サイクル (18:6) に同調している C57BL/6 野生型マウスにメタンフェタミンを与えると、SCN により駆動される光に同調した活動リズムに加え、光に同調しない周期の長い MASCO/MAO に支配される行動リズムが出現する (A)。恒暗条件下では、メタンフェタミンを与えた直後、行動リズムの周期は有意に延長する (C)。SCN を破壊したマウスは、メタンフェタミンを与えた直後、28-30 時間の長い周期の活動リズムが出現することから (D)、SCN インタクトの動物でみられた、周期の延長した行動リズムは、カップリングした SCN と MASCO/MAO により駆動されているものと考えられる (図3)。遺伝的に、SCN や末梢組織の内因性概日振動が欠損した、*Per1/2*ダブルノックアウト (B) や、*Per1/2/3*トリプルノックアウト動物でも、メタンフェタミンを与えると、活動リズムが出現する。これらの動物での活動リズムは、主に 21-22 時間の周期であるが、約 22 時間と 27 時間の周期を交互に繰り返して現れる現象がみられることがある (B)。周期が比較できるように行動図の縦軸は同じ割合で表示してある。行動図の右側に縦のラインで表示している期間中メタンフェタミンを含む飲み水を与えている。これらは、Pendergast et al.^{37,55} に発表した行動データをオリジナルとはすこし異なるパラメータで再表示した。詳しい実験条件は、論文を参照されたい。

つは、C3H マウスは MASCO/MAO が機能していない。二つ目の可能性は、C3H マウスはメタンフェタミンにインセンシティブである。最後の可能性は、C3H マウスの MASCO/MAO の周期は、SCN の周期と同じであるために、SCN に駆動されるリズムと区別できない。これらの可能性を検討するために SCN の破壊実験がなされた。SCN を破壊して無周期となったマウスにメタンフェタミンを投与すると SCN を破壊した C57BL/6J マウスに見られるよりも短い約 24.5 時間周期の活動リズムが出現したのである。このことは、C3H 系統のマウスの MASCO/MAO の周期は、C57BL/6J 系統のマウスよりもはるかに短く、SCN の周期に近い場合、メタンフェタミンを与えて

も行動周期の延長が観察されないことを示している⁵³。*Per2^{dc}*ノックアウトマウスも C3H マウス同様メタンフェタミンを与えても周期が延長しない。しかし、それは、上にあげた 3 つの可能性以外に由来する。SCN を破壊した *Per2^{dc}*ノックアウトマウスは、SCN を破壊した WT (C57BL/6J) マウスと同様の長い約 28 時間の周期のリズムがメタンフェタミン投与により出現する。SCN インタクトの *Per2^{dc}*ノックアウトマウスを恒明条件で飼育し、メタンフェタミンを与えると、約 23 時間の周期と 30 時間の周期の 2 つの活動リズムが独自にフリーランすることが観察された。*Per2^{dc}*ノックアウトマウスは、WT マウスと異なり光による周期の延長がみられないので (フリーラン周期

DD

LL

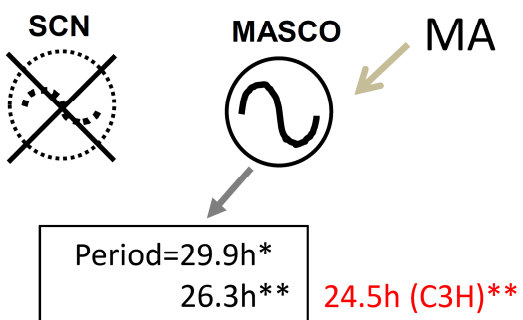
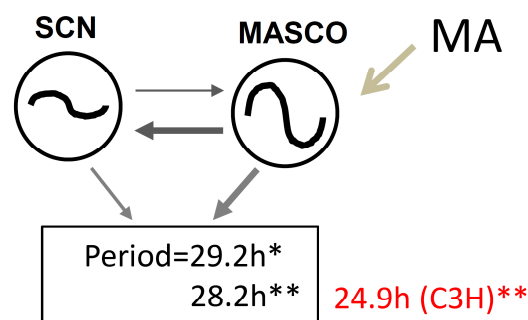
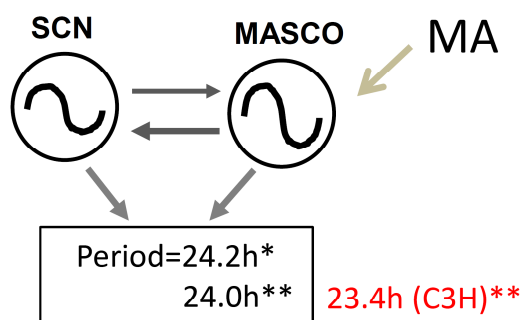
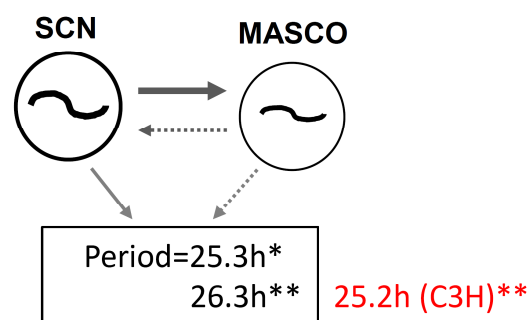
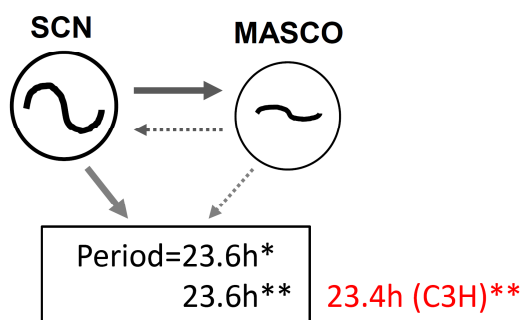


図3 光とメタンフェタミンがマウスの行動を司るペースメーカーへ及ぼす影響（予想図）

DD：恒暗条件、LL：恒明条件、MA：メタンフェタミン、SCN：視交叉上核、MASCO：メタンフェタミンによって誘導される概日ペースメーカー、*Pendergast et al⁵⁵、より C57BL/6J マウスから得られた行動周期を示してある、**Tataroglu et al⁵³、より、C57BL/6 マウスからの行動周期を四角内、C3H マウスからの行動周期を四角外に示してある。

は恒暗条件と恒明条件と同じ）、恒明条件でメタンフェタミンを与えたときに観察される 2 つの成分のうち、短い周期は SCN により、長い周期は MASCO/MAO により駆動されていることが示唆される。また、*Per2^{dc}* ノックアウトマウスでは、SCN と MASCO/MAO は少なくとも、恒明条件ではカップリングしていないと考えられる。恒暗条件でも同様に SCN と MASCO/MAO はカップリングしていないと仮定し、MASCO/MAO に駆動される行動が（おそらく SCN により）マスクされて観察されないと考えれば、*Per2^{dc}* ノックアウトマウスで、メタンフェタミンにより周期が延長しないという結果を説明できる⁵⁵。*Rev-erba* ノックアウトマウスと R6/2 ハンテントトランスジェニックマウスも、メタンフェタミンを投与しても周期が延長しない^{56,57}。しかし、これらの動物では、SCN 破壊の実験がなされていないためなぜ周期が延長しないのかはわかっていない。

興味深いことに、行動リズムが観察されない時計遺伝子変異体マウスでも、メタンフェタミンを与えると明瞭な活動リズムが出現することから、FEO 同様 MASCO/MAO も既知の概日リズム振動機構に非依存で振動していると考えられる^{37,58-60}。*Per1/2/3* トリプルノックアウト動物にメタンフェタミンを与えると、約 21 時間周期の活動リズムが出現する。*Per1/2/3* トリプルノックアウトは SCN の時計は機能していないため、出現したリズムは MASCO/MAO により駆動されている。これは、FEO 同様 MASCO/MAO の振動には 3 つの *Per* は必要ではないが、*Per* は周期決定にかかわっていることを示している³⁷。次に、3 つ *Per* のうちどれが MASCO/MAO の周期短縮に関係しているか確かめるため、我々は SCN を破壊した *Per* シングルノックアウト動物の MASCO/MAO の周期を測定した⁵⁵。SCN を破壊した *Per1, 2, 3* いずれのシングルノックアウトでも、SCN を破壊した WT と

同様の約 27-29 時間の周期のリズムを示したことから、特定の *Per* 遺伝子の欠損が MASCO/MAO の周期を短くしているわけではないことが分かった。*Per1/2* ダブルノックアウトは、*Per1/2/3* トリプルノックアウト同様に 21 時間の周期を示したが、一部のマウスは、22 時間と 27 時間を交互にジグザグに変化するパターンを示した (図 2 B)。これは、バイリズムシシティと呼ばれる現象^{61,62}なのかそれとも、MASCO/MAO は 22 時間と 27 時間の 2 つの振動体から成り立っているのか興味深い現象である。また以下に述べるが、ヒトの内的脱同調でみられる深部体温と乖離した睡眠リズムの周期が、34 時間か、18 時間であることと類似しているように思われる。結論として、MASCO/MAO の周期短縮には、*Per1* と *Per2* の 2 つの遺伝子を欠如させることが必要であることがわかった。

Storch らは、*Bmal1* ノックアウトマウスの行動にみられるウルトラディアンリズムは、メタンフェタミンの濃度依存的に周期が延長することや、ドーパミントランスポーターを発現する ventral tegmental area/ substantia nigra 領域の神経を化学遺伝学的に

刺激すると 24 時間に近い行動リズムが出現することから、MASCO/MAO は周期が延長したドーパミンウルトラディアン振動体であると考えた⁶³。半面、われわれは、*Per1/2/3* トリプルノックアウトマウスにメタンフェタミンを与えると、ウルトラディアンリズムの周期が徐々に延長することではなく、突如サーカディアンリズムが出現することを観察している⁶⁴。また Menaker グループは、マウスでは、MASCO の周期は、メタンフェタミンの濃度に依存しないことを報告している⁵³。MASCO/MAO は、どのような振動機構で、またメタンフェタミンがどうして MASCO/MAO に由来する行動を出現させるのか、MASCO/MAO はメタンフェタミンがない状態でも振動しているのかなど興味は尽きない。

4. PICO と WICO

ラットやマウスへ、チョコレートやピーナッツバターなどの好みの食物を毎日同じ時刻に与えるとそれを予知する行動がみられる。この好みの食物の予知行動は、餌の予知行動と異なり、好みの食物を与えるの

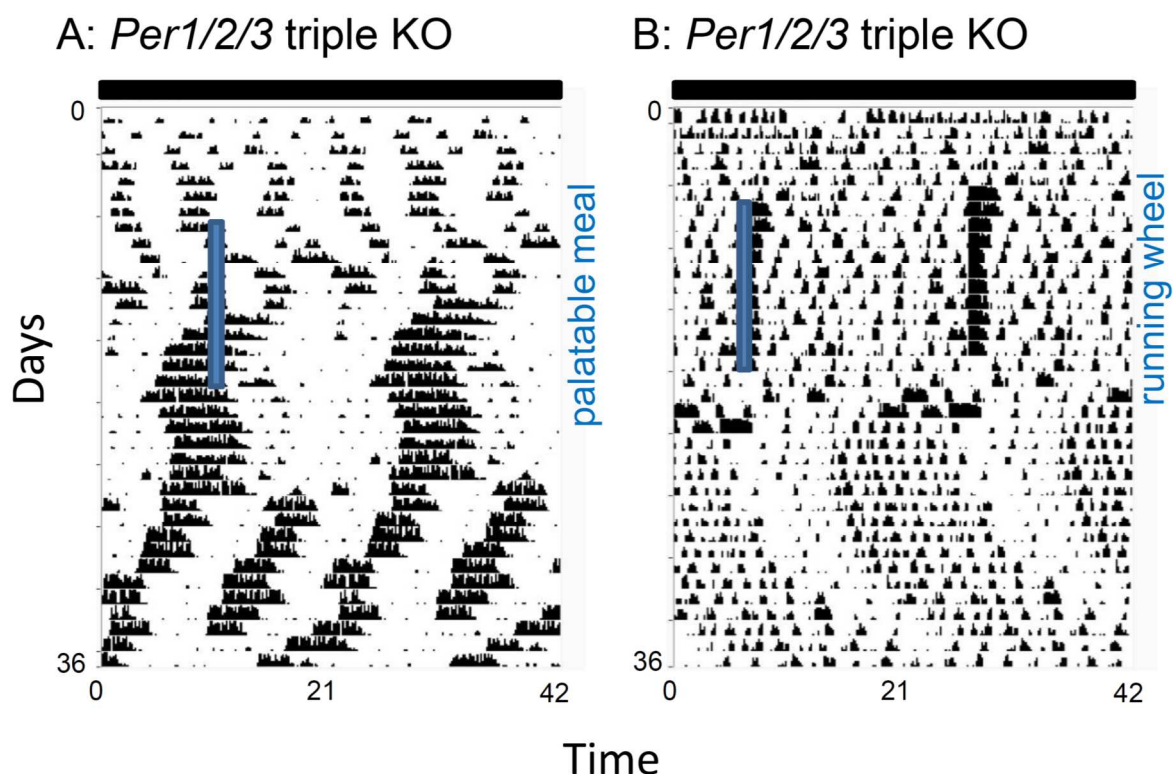


図4 PICO と WICO

恒常暗条件下では、*Per1/2/3* トリプルノックアウトマウスはウルトラディアンリズムを示す。ウルトラディアンリズムの周期は、回し車があると長く (A)、回し車をロックしてあると短い (B)。21 時間周期で、1 時間の間ピーナッツバターを与えたり (A)、ロックを解除し回転輪行動ができるようにすると (B)、活動リズムが出現し、それらの操作を終了した後も、何日にもわたりフリーランする様子が観察できる。行動動図中の縦のバーは、それぞれ、ピーナッツバターを食べられる時間、回し車のロックを解除した時間を示している。マウスの行動は、回転輪 (A)、IR センサー (B) でそれぞれ測定している。これらは、Flóres et al⁶⁴ に発表した行動データをオリジナルとはすこし異なるパラメータで再表示した。詳しい実験条件は、論文を参照されたい。

を中止しても数日間継続する⁶⁵。著者らのグループは *Per1/2/3* トリプルノックアウトマウスを恒暗・自由給餌条件下で飼育し、1時間だけピーナッツバターを与えた。これを21時間の周期で継続すると、ウルトラディアンリズムが消失し、活動リズムが現れた。この活動リズムは、ピーナッツバターを与えるのを終止した後、約21時間の周期で、数日間フリーランした(図4A)。著者らは、このピーナッツバターにより出現する活動リズムを駆動する振動体を *palatable meal-inducible circadian oscillator (PICO)* と名付けた⁶⁴。好みの食物は、脳のドーパミン報酬系を活性化することが知られているので、次に、我々は、ほかの報酬系を活性化することが知られている回転運動の影響を調べた。先行研究で山仲らは、マウスを毎日3時間回転運動のあるケージに移すと、回転運動を予知する行動がみられ、それは、操作を終了した後30日以上も続くことを報告している⁶⁶。これは、操作終了後も継続する好みの食物の予知行動と似ている。我々は、*Per1/2/3* トリプルノックアウトマウスを、恒暗・自由給餌条件下に置き、物理的にロックした回転運動があるケージで飼育し、行動をIRセンサーにより測定した。回転運動は、常時ロックされ回せないが、1時間だけロックが解除され、マウスは回転運動を行うことができる。これを21時間周期で続けると、ピーナッツバターと同様にリズムが出現した。このリズムは、回転運動のロックの解除を終止したのちも、数週間にわたり約21時間の周期で継続した(図4B)。我々は、この定期的な輪回しによって誘導される行動を司る振動体を *wheel-inducible circadian oscillator (WICO)* と呼ぶことにした⁶⁴。このPICOとWICOはFEOと同様に一定周期で繰り返される刺激により誘導されるが、FEOのように刺激を終止した直後に消失することはなく、数〜数十サイクルフリーランする。このフリーランを観察できるという点は、MASCO/MAOと似ている。FEO, MASCO/MAO, PICO, WICOは既知の転写翻訳のフィードバックによる概日分子振動機能が働かない *Per1/2/3* トリプルノックアウトマウスで振動していることと、周期が21時間であるという点で共通している。

5. SCNとSCN外概日ペースメーカー間の相互協調の関係

SCNとFEOとの間に相互協調の関係(カップリング)が存在していることは、明暗周期の位相を変化させた後のFAAの位相の変化を観察することで示された。

先行実験ではFAAが夜間のSCN支配の活動期にマスクされてしまい強い結論が導きだされなかったが^{67,68}、我々は、長日条件で実験を行うことでそれを回避した⁶⁹。マウスを長日明暗条件で飼育し、昼間に制限給餌を行いFAAを観察する。その後マウスは自由給餌におかれ、FAAが消失することを確認した後、光サイクルの位相を前進、もしくは、後退させた。SCNに支配される活動リズムが新しい光条件に再同調したとき、マウスを絶食させFAAの現れる位相を測定した。絶食により再現したFAAは、光条件のシフトに対応した位相上に現れた。この結果は、制限給餌により作られたSCNとFEOの位相関係は、自由給餌下でも継続すること、SCNの位相を変化させるとFAAの位相も平行に変化することを示唆している。

先に少し述べたように、SCNとMASCO/MAOもカップリングしている。メタンフェタミンを与えた直後に見られる行動リズムの周期の延長は、カップリングしているSCNとMASCO/MAOによって駆動されている。なぜなら、SCNを破壊した動物に、メタンフェタミンを投与すると、SCNがインタクトの動物よりもはるかに長い周期のMASCO/MAOに駆動される活動リズムが見られるからである。SCNがインタクトの動物に、メタンフェタミン投与を継続すると、SCNに支配される光に同調する活動リズムに加え、光に同調しない周期の長いMASCO/MAOに駆動されるリズムの両方が観察される(2つのリズムの間に相対的協調が観察されることが多い; 図2A)。さらにメタンフェタミン投与を続けると、SCNに駆動されるリズムは消失し、MASCO/MAOに駆動されるリズムのみしか見られなくなる。これらの現象は、環境の光因子のない恒暗条件でも観察できる。これらの結果は、SCNとMASCO/MAOは少なくともメタンフェタミンを投与した直後はカップリングしていて、メタンフェタミンの投与を継続するとカップリングが弱まり、2つのペースメーカーは独自の周期でそれぞれフリーランすることを示している。

6. SCN外概日ペースメーカーの行動・生理的機能(作業仮説)

上に述べたSCN外に存在する概日ペースメーカーは同じ振動体であろうか? FEO, MASCO/MAO, PICO, WICOに駆動される活動リズムを出現させる操作(制限給餌、メタンフェタミン、ピーナッツバター、回転運動)は、ドーパミン報酬系神経活動を活発化

させることが知られている。また、これら振動体の周期は、*Per1/2/3*トリプルノックアウトで21時間と短くなっていること、SCN破壊をしたラットのMASCO/MAOに駆動される活動リズムは光には同調できないが制限給餌には同調できること⁷⁰、制限給餌をすると、SCNとMASCO/MAO乖離が起きやすくなること⁶⁹などから我々は、これらSCN外概日ペースメーカーは同じ場所に存在する同一振動体ではないかと予想している。

それでは、SCN外概日振動体は、自由給餌やメタンフェタミンが存在しない通常の条件でも、振動しているのでしょうか？SCNを破壊した動物や、時計遺伝子が欠損しSCNの概日振動が機能していない動物からは、行動・生理の概日リズムを観察することができない。このことは、FEOやMASCO/MAOなどのSCN外概日振動体は通常条件ではSCNの代役を担うことはできないこと、SCNが存在しない時は、振動をしていないか、非常に弱い振動体（あるいは、ウルトラディアン振動体）であることを示唆している。ところが、これらの動物でも、制限給餌やメタンフェタミンを投与すると行動・生理のリズムが観察され、末梢時計の位相も統合される⁷¹⁻⁷³。このことは、制限給餌や低濃度のメタンフェタミン投与を受けた動物のSCN外概日ペースメーカーは、SCNがなくても、

強い自律振動をしており、SCNの機能を少なくとも部分的には代行できることを示している。それでは、自由給餌やメタンフェタミン投与をしていない通常状態では、SCN外概日ペースメーカーは、振動が停止しているのでしょうか、それとも、この弱い振動体はSCNに駆動されてSCNと同じ位相・周期で振動しているのでしょうか？また、SCNとSCN外ペースメーカーはそれぞれ異なる行動・生理のリズムを支配しているのでしょうか？SCN外ペースメーカーの場所はまだ同定されていないので、破壊実験ができない。そのため、これらの問いに答える実験結果はないが、ここで、我々の作業仮説を述べてみたい(図5)。SCN外概日ペースメーカーは、通常は弱い振動体でSCNに結合しSCNによって駆動されている(SCNとともに振動している)。また、SCNとは異なる行動・生理リズム(例えば採餌行動)を駆動している(通常SCNとSCN外概日ペースメーカーはカップリングしているのでそれらのアウトプットはSCNのアウトプットと区別ができない)。ところがドーパミン報酬系を活性化させるような刺激が入ると振動体としての特徴が強くなり(振幅が大きくなる)、それ自身でも生理・行動リズムを駆動でき、また、振幅が大きくなるがために、SCNへも影響を与えるようになる。自然界では、本来の活動時間帯ではない時間帯に捕食者に狙われるリスクを負ってでも採餌し

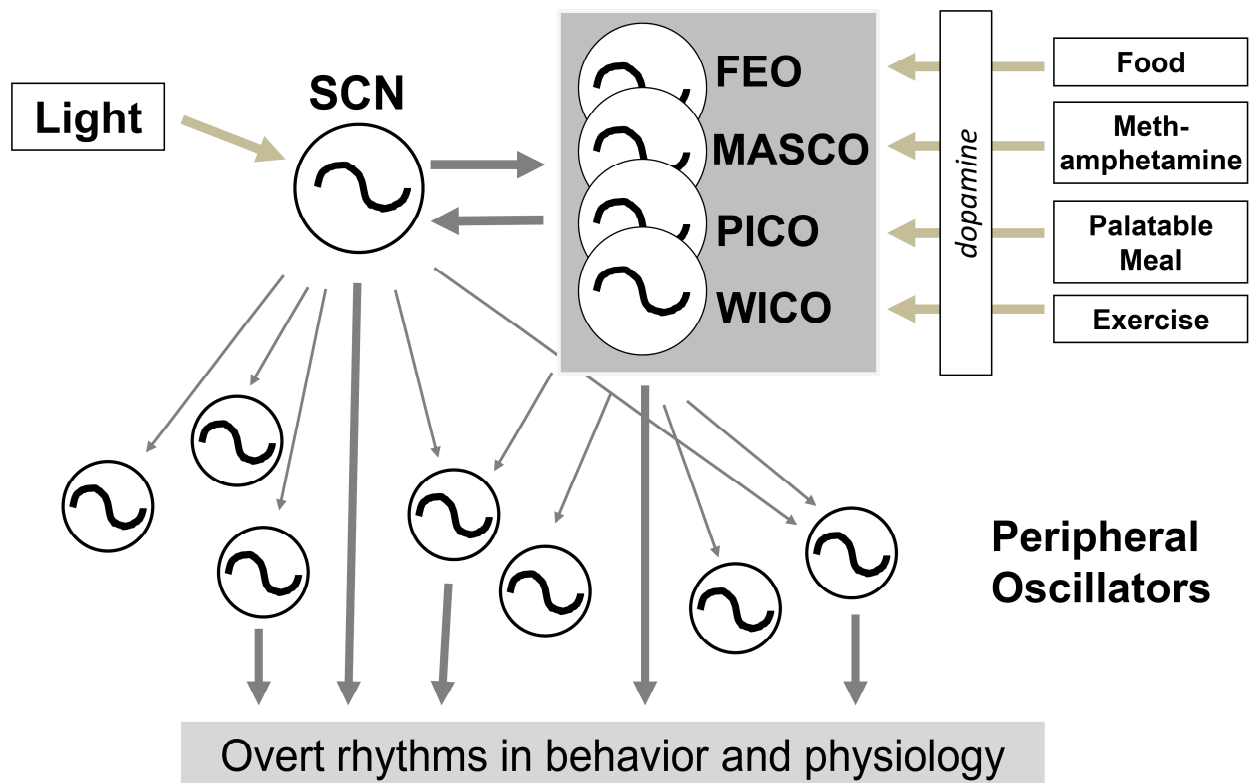


図5 マウスの概日振動系の模式図(作業仮説)

なければいけないような状況がある。このような特殊な環境条件下ではドーパミン報酬系が活発化し、SCN 外概日振動体の振幅が大きくなり、それに駆動される採餌行動などが引き起こされるのではないかと考えられる。そして、人工的なメタンフェタミンの慢性投与は、このドーパミン系の活性状態を模倣しているのではないかと我々は考えている。

7. ヒトの2振動体モデル

1970年代後半にドイツのアンデックスにあるマックスプランク研究所で、Aschoff と Wever はヒトを自然的小および社会的環境から隔離した実験室内で、深部体温と睡眠覚醒リズムが異なるフリーラン周期を示す自発的内的脱同調という興味深い現象を観察した⁷⁴。通常深部体温と睡眠覚醒のリズムは、約25時間の周期でフリーランするが、内的脱同調が始まると、その約25時間の深部体温のリズムの周期はわずかに短縮し、睡眠覚醒のリズムは、30時間を超える周期あるいは20時間より短い周期となり、それぞれ独自の周期でフリーランした。その後、本間らは、メラトニンと睡眠覚醒リズム間の内的脱同調を観察した⁷⁵。Wever や Kronauer らはこの内的脱同調は、ヒトの生物時計機構には、深部体温のリズムを制御する概日ペースメーカーと睡眠覚醒のリズムを制御する概日ペースメーカーの2つの振動体があることを示していると考えた^{74,76}。本間らは、さらにこれらのモデルを発展させ、SCN に存在する光に同調する概日ペースメーカーと、SCN 外に存在するノンフォティックシグナルに同調するペースメーカーから構成されるヒト概日系2ペースメーカーモデルを提唱している⁷⁷。近年、隔離実験でヒトの睡眠覚醒リズムのフリーラン周期を求めることは少なくなった。現在、主に使われている方法は、被験者を28時間の睡眠覚醒スケジュールで生活させる強制脱同調法である^{78,79}。その強制脱同調法では、コンスタントルーチン法を強制脱同調の前後に行い、メラトニンなどのリズム位相の変化からフリーラン周期を算出する。この方法だと、ヒトのフリーラン周期は、24時間に非常に近い値となる。この強制脱同調法は、睡眠覚醒のリズムを強制的に28時間に同調させるゆえ、睡眠覚醒を司る時計と体温・メラトニンなどの生理を司る時計を強制的に乖離させている。強制脱同調法により測定されるリズムの周期は、深部体温・メラトニンを司るペースメーカー（おそらくSCN）の周期なのであろうか？そして、古典的フリーラン法により測定される25時間のリズム

ムは、カップリングした2つのペースメーカーによって駆動されているのだろうか？さらには、ヒトの隔離実験で観察される内的脱同調は、メタンフェタミン慢性投与したげっ歯類でみられるSCNとMASCO/MAOの乖離と同じように、SCNとSCN外ペースメーカーの乖離によるものだろうか？もしそうならば、げっ歯類でも、SCNは深部体温・メラトニンのリズムを、SCN外ペースメーカーは睡眠覚醒のリズムをそれぞれ独自に駆動しているのだろうか？増淵らは、メタンフェタミンを投与し、MASCO/MAOに駆動される行動が現れたラットで、メラトニンのリズムは、SCNと同位相であることを観察している⁸⁰。Per1/2ダブルノックアウトでみられた22時間と27時間のリズムの繰り返しと、ヒトの内的脱同調でみられる睡眠の周期が18時間か34時間のどちらかなのは、ともに、リミットサイクル振動体のバイリズムシティと呼ばれる現象なのだろうか？覚せい剤・興奮薬物依存症などで、人工的にドーパミン報酬系が活発化されたとき、睡眠覚醒リズムはSCNと乖離して長い周期でフリーランするのであろうか？ヒトと夜行性げっ歯類の直接単純比較はできないが、共通する部分を考慮し、構造・機能を解明するなにかよいアプローチがみえてこないだろうか。

8. おわりに

SCN外概日ペースメーカーの研究の歴史は古いが、まだまだ解明されていない点が多岐にわたる概日リズム研究の（ラスト？）フロンティアである。特殊な条件でないと振動を観察できないこと、既知の時計遺伝子による転写翻訳フィードバックが振動に必須ではないことがアプローチを難しくしている。場所が同定されていないゆえ、トランスクリプトーム、プロテオーム、メタボロームなどで振動をしている分子を探することもできない。また、破壊実験により消失する生理機能を調べることもできない。場所は、ドーパミン報酬系かその下流に存在すると予想できるが、SCNのように単一神経核内に振動体が存在する可能性もあるが、複数神経核のネットワークによって振動体が構成されている可能性も十分考えられる。既知の時計遺伝子の一部、Rev-erbaやPer1, 2は、何らかの形で周期決定に関係しているが、振動には必須ではないことから、遺伝学、光学・化学遺伝学的に場所を探す方法も限られる。核のない赤血球で、peroxiredoxinの酸化還元状態にリズムがあることが報告されている⁸¹。この転写時計に非依存のレドックス/メタボリック概日

振動は、転写翻訳のフィードバックにより刻まれる振動よりも、原始的な振動体ではないかといわれているが⁸²、SCN 外概日ペースメーカーは、このメタボリック概日機能によって振動しているのであろうか？ 私は、SCN 外概日ペースメーカーの場所の特定、分子振動メカニズムの解明、行動生理学的役割が近い将来明らかになればと思いつつ、毎日ワクワクしながら研究をしている。また多くの人々がこの未知の概日ペースメーカーに興味を持ってくださり、研究に参加してくれることを願って本稿を終了したいとおもう。

謝辞

私はアメリカにきて 25 年以上になるが、日本語は私の母国語であるし、毎日日本語のメールを書いているので、日本語の文章は簡単に書けるだろうとたかをくくっていたが、いざ書き始めてみるとかなり難しいことに気づいた。恥ずかしながら、インターネットで単語の意味を確認しながらの作業となってしまった。初稿の内容をみてくださり、また日本語を添削していただいた、山仲勇二郎博士と、瓜生耕一郎博士に感謝の意を表したい。両博士からは、サイエンティフィックな多くの指摘を受けた。また匿名のレビュアーからも多くの有意義なサジェッションを受けた。最終原稿が読みやすくなったのはこのレビュアーの指摘によるものである。最後に原稿を依頼して下さり、また、リバイズに関して相談にのっていただいた編集委員の吉川朋子博士と沼野利佳博士に感謝したい。

参考文献

1. *Biological Clocks*. (The Biological Laboratory, Cold Spring Harbor, L.I., 1960).
2. 本間研一, 本間さと & 広重力. *生体リズムの研究*. (北海道大学図書刊行会, 1989).
3. 川村浩. *脳とリズム*. (朝倉書店, 1989).
4. Nishiitsutsuji-Uwo, J. & Pittendrigh, C.S. Central nervous control of circadian rhythmicity in the cockroach. III. The optic lobes, locus of the driving oscillation? *Zeit. Vel. Physiol.* **58**, 1-46 (1968).
5. Page, T.L. Transplantation of the cockroach circadian pacemaker. *Science* **216**, 73-75 (1982).
6. Page, T.L. in *Trends in Chronobiology* (eds Hekkens, W.J.M., Kerkhof, G.A., & Rietveld, W.J.) 67-79 (Pergamon Press, 1988).
7. Gaston, S. & Menaker, M. Pineal function: the biological clock in the sparrow? *Science* **160**, 1125-1127 (1968).
8. Zimmerman, N.H. & Menaker, M. Neural connections of sparrow pineal: role in circadian control of activity. *Science* **190**, 477-479 (1975).
9. Zimmerman, N.H. & Menaker, M. The pineal gland: a pacemaker within the circadian system of the house sparrow. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 999-1003 (1979).
10. Moore, R.Y. & Eichler, V.B. Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res.* **42**, 201-206 (1972).
11. Stephan, F.K. & Zucker, I. Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**, 1583-1586 (1972).
12. Inouye, S.T. & Kawamura, H. Persistence of circadian rhythmicity in a mammalian hypothalamic "island" containing the suprachiasmatic nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 5962-5966 (1979).
13. Sawaki, Y., Nihonmatsu, I. & Kawamura, H. Transplantation of the neonatal suprachiasmatic nuclei into rats with complete bilateral suprachiasmatic lesions. *Neurosci. Res.* **1**, 67-72 (1984).
14. Drucker-Colin, R., Aguilar-Roblero, R., Garcia-Hernandez, F., Fernandez-Cancino, F. & Bermudez Rattoni, F. Fetal suprachiasmatic nucleus transplants: diurnal rhythm recovery of lesioned rats. *Brain Res.* **311**, 353-357 (1984).
15. Lehman, M.N. *et al.* Circadian rhythmicity restored by neural transplant. Immunocytochemical characterization of the graft and its integration with the host brain. *J. Neurosci.* **7**, 1626-1638 (1987).
16. Ralph, M.R., Foster, R.G., Davis, F.C. & Menaker, M. Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science* **247**, 975-978 (1990).

17. Green, D. J. & Gillette, R. Circadian rhythm of firing rate recorded from single cells in the rat suprachiasmatic brain slice. *Brain Res.* **245**, 198-200 (1982).
18. Groos, G. & Hendriks, J. Circadian rhythms in electrical discharge of rat suprachiasmatic neurones recorded in vitro. *Neurosci. Lett.* **34**, 283-288 (1982).
19. Shibata, S., Oomura, Y., Kita, H. & Hattori, K. Circadian rhythmic changes of neuronal activity in the suprachiasmatic nucleus of the rat hypothalamic slice. *Brain Res.* **247**, 154-158 (1982).
20. Kasal, C.A., Menaker, M. & Perez-Polo, J.R. Circadian clock in culture: N-acetyltransferase activity of chick pineal glands oscillates in vitro. *Science* **203**, 656-658 (1979).
21. Takahashi, J.S., Hamm, H. & Menaker, M. Circadian rhythms of melatonin release from individual superfused chicken pineal glands in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* **77**, 2319-2322 (1980).
22. Deguchi, T. Circadian rhythm of serotonin N-acetyltransferase activity in organ culture of chicken pineal gland. *Science* **203**, 1245-1247 (1979).
23. Deguchi, T. A circadian oscillator in cultured cells of chicken pineal gland. *Nature* **282**, 94-96 (1979).
24. Underwood, H. The pineal and melatonin: regulators of circadian function in lower vertebrates. *Experientia* **46**, 120-128 (1990).
25. Menaker, M., Moreira, L.F. & Tosini, G. Evolution of circadian organization in vertebrates. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **30**, 305-313 (1997).
26. Yamazaki, S. *et al.* Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science* **288**, 682-685 (2000).
27. Brown, A.J., Pendergast, J.S. & Yamazaki, S. Peripheral Circadian Oscillators. *Yale J. Biol. Med.* **92**, 327-335 (2019).
28. Pendergast, J.S. & Yamazaki, S. in *Biological Clocks* (eds Honma, K. & Honma, S.) 141-152 (Hokkaido Univ. Press, 2017).
29. Richter, C.P. A behavioristic study of the activity of the rat. *Comp. Psychol. Monogr.* **1**, 1-54 (1922).
30. Stephan, F.K., Swann, J.M. & Sisk, C.L. Anticipation of 24-hr feeding schedules in rats with lesions of the suprachiasmatic nucleus. *Behav. Neural. Biol.* **25**, 346-363 (1979).
31. Stephan, F.K., Swann, J.M. & Sisk, C.L. Entrainment of circadian rhythms by feeding schedules in rats with suprachiasmatic lesions. *Behav. Neural. Biol.* **25**, 545-554 (1979).
32. Stephan, F.K. The "other" circadian system: food as a Zeitgeber. *J. Biol. Rhythms* **17**, 284-292 (2002).
33. Stephan, F.K. Resetting of a feeding-entrainable circadian clock in the rat. *Physiol. Behav.* **52**, 985-995 (1992).
34. Boulos, Z., Rosenwasser, A.M. & Terman, M. Feeding schedules and the circadian organization of behavior in the rat. *Behav. Brain Res.* **1**, 39-65 (1980).
35. Stephan, F.K. Limits of entrainment to periodic feeding in rats with suprachiasmatic lesions. *J. Comp. Physiol.* **143**, 401-410 (1981).
36. Takasu, N.N. *et al.* Circadian regulation of food-anticipatory activity in molecular clock-deficient mice. *PLoS One* **7**, e48892 (2012).
37. Pendergast, J.S., Oda, G.A., Niswender, K.D. & Yamazaki, S. Period determination in the food-entrainable and methamphetamine-sensitive circadian oscillator(s). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 14218-14223 (2012).
38. Davidson, A.J. Lesion studies targeting food-anticipatory activity. *Eur. J. Neurosci.* **30**, 1658-1664 (2009).
39. Fuller, P.M., Lu, J. & Saper, C.B. Differential rescue of light- and food-entrainable circadian rhythms. *Science* **320**, 1074-1077 (2008).
40. Mistlberger, R.E. *et al.* Comment on "Differential rescue of light- and food-entrainable circadian rhythms". *Science* **322**, 675 (2008).
41. Fuller, P.M., Lu, J. & Saper, C.B. Response to Comment on "Differential rescue of light- and food-entrainable circadian rhythms". *Science*

- 322, 675 (2008).
42. Mistlberger, R.E. *et al.* Standards of evidence in chronobiology: critical review of a report that restoration of *Bmal1* expression in the dorsomedial hypothalamus is sufficient to restore circadian food anticipatory rhythms in *Bmal1*^{-/-} mice. *J. Circadian Rhythms* **7**, 3 (2009).
 43. Fuller, P.M., Lu, J. & Saper, C.B. Standards of evidence in chronobiology: A response. *J. Circadian Rhythms* **7**, 9 (2009).
 44. Mistlberger, R.E. *et al.* Food anticipation in *Bmal1*^{-/-} and AAV-*Bmal1* rescued mice: a reply to Fuller *et al.* *J. Circadian Rhythms* **7**, 11 (2009).
 45. Challet, E., Mendoza, J., Dardente, H. & Pevet, P. Neurogenetics of food anticipation. *Eur. J. Neurosci.* **30**, 1676-1687 (2009).
 46. Landry, G.J. *et al.* Evidence for time-of-day dependent effect of neurotoxic dorsomedial hypothalamic lesions on food anticipatory circadian rhythms in rats. *PLoS One* **6**, e24187 (2011).
 47. Acosta-Galvan, G. *et al.* Interaction between hypothalamic dorsomedial nucleus and the suprachiasmatic nucleus determines intensity of food anticipatory behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, 5813-5818 (2011).
 48. Davidson, A.J., Cappendijk, S L. & Stephan, F. K. Feeding-entrained circadian rhythms are attenuated by lesions of the parabrachial region in rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **278**, R1296-1304 (2000).
 49. Pendergast, J.S. & Yamazaki, S. The mysterious food-entrainable oscillator: Insights from mutant and engineered mouse models. *J. Biol. Rhythms* **33**, 458-474 (2018).
 50. Ikeda, Y., Chiba, Y. Effects of psychotropics on circadian motor activity in rats. In: *Toward Chronopharmacology* (eds Takahashi, R., Halberg, F., & Walker, C.A.) Pergamon Press, New York, 3-10 (1982).
 51. Honma, K., Honma, S. & Hiroshige, T. Disorganization of the rat activity rhythm by chronic treatment with methamphetamine. *Physiol. Behav.* **38**, 687-695 (1986).
 52. Honma, K., Honma, S. & Hiroshige, T. Activity rhythms in the circadian domain appear in suprachiasmatic nuclei lesioned rats given methamphetamine. *Physiol. Behav.* **40**, 767-774 (1987).
 53. Tataroglu, O., Davidson, A.J., Benvenuto, L.J. & Menaker, M. The methamphetamine-sensitive circadian oscillator (MASCO) in mice. *J. Biol. Rhythms* **21**, 185-194 (2006).
 54. Natsubori, A., Honma, K. & Honma, S. Differential responses of circadian *Per2* rhythms in cultured slices of discrete brain areas from rats showing internal desynchronisation by methamphetamine. *Eur. J. Neurosci.* **38**, 2566-2571 (2013).
 55. Pendergast, J.S., Niswender, K.D. & Yamazaki, S. The complex relationship between the light-entrainable and methamphetamine-sensitive circadian oscillators: evidence from behavioral studies of *Period*-mutant mice. *Eur. J. Neurosci.* **38**, 3044-3053 (2013).
 56. Salaberry, N.L., Mateo, M. & Mendoza, J. The clock gene Rev-Erb α regulates methamphetamine actions on circadian timekeeping in the mouse brain. *Mol. Neurobiol.* **54**, 5327-5334 (2017).
 57. Cuesta, M., Aungier, J. & Morton, A.J. The methamphetamine-sensitive circadian oscillator is dysfunctional in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Neurobiol. Dis.* **45**, 145-155 (2012).
 58. Coward, D.J., Cain, S. W. & Ralph, M.R. A circadian rhythm in mice that is unaffected by the period mutation at clock. *Biol. Rhythm Res.* **32**, 233-242 (2001).
 59. Masubuchi, S., Honma, S., Abe, H., Nakamura, W. & Honma, K. Circadian activity rhythm in methamphetamine-treated *Clock* mutant mice. *Eur. J. Neurosci.* **14**, 1177-1180 (2001).
 60. Mohawk, J.A., Baer, M.L. & Menaker, M. The methamphetamine-sensitive circadian oscillator does not employ canonical clock genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 3519-3524 (2009).
 61. Decroly, O. & Goldbeter, A. Birhythmicity, chaos, and other patterns of temporal

- self-organization in a multiply regulated biochemical system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 6917-6921 (1982).
62. Leloup, J.C. & Goldbeter, A. Chaos and birhythmicity in a model for circadian oscillations of the PER and TIM proteins in drosophila. *J. Theor. Biol.* **198**, 445-459 (1999).
 63. Blum, I.D. *et al.* A highly tunable dopaminergic oscillator generates ultradian rhythms of behavioral arousal. *eLife* **3**, e05105 (2014).
 64. Flores, D.E., Bettilyon, C.N. & Yamazaki, S. Period-independent novel circadian oscillators revealed by timed exercise and palatable meals. *Sci. Rep.* **6**, 21945 (2016).
 65. Angeles-Castellanos, M., Salgado-Delgado, R., Rodriguez, K., Buijs, R.M. & Escobar, C. Expectancy for food or expectancy for chocolate reveals timing systems for metabolism and reward. *Neuroscience* **155**, 297-307 (2008).
 66. Yamanaka, Y., Honma, S. & Honma, K. Daily exposure to a running wheel entrains circadian rhythms in mice in parallel with development of an increase in spontaneous movement prior to running-wheel access. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **305**, R1367-1375 (2013).
 67. Rosenwasser, A.M., Pelchat, R.J. & Adler, N.T. Memory for feeding time: possible dependence on coupled circadian oscillators. *Physiol. Behav.* **32**, 25-30 (1984).
 68. Stephan, F.K. Coupling between feeding- and light-entrainable circadian pacemakers in the rat. *Physiol. Behav.* **38**, 537-544 (1986).
 69. Pendergast, J.S. & Yamazaki, S. Effects of light, food, and methamphetamine on the circadian activity rhythm in mice. *Physiol. Behav.* **128**, 92-98 (2014).
 70. Honma, S., Honma, K. & Hiroshige, T. Methamphetamine induced locomotor rhythm entrains to restricted daily feeding in SCN lesioned rats. *Physiol. Behav.* **45**, 1057-1065 (1989).
 71. Pezuk, P., Mohawk, J.A., Yoshikawa, T., Sellix, M.T. & Menaker, M. Circadian organization is governed by extra-SCN pacemakers. *J. Biol. Rhythms* **25**, 432-441 (2010).
 72. Natsubori, A., Honma, K. & Honma, S. Dual regulation of clock gene *Per2* expression in discrete brain areas by the circadian pacemaker and methamphetamine-induced oscillator in rats. *Eur. J. Neurosci.* **39**, 229-240 (2014).
 73. Izumo, M. *et al.* Differential effects of light and feeding on circadian organization of peripheral clocks in a forebrain *Bmal1* mutant. *eLife* **3**, e04617 (2014).
 74. Wever, R.A. The Circadian system of man; Results of experiments under temporal isolation. *Springer-Verlag*, pp276 (1979).
 75. Honma, K., Hashimoto, S., Endo, T. & Honma, S. Light and plasma melatonin rhythm in humans. *Biol. Signals* **6**, 307-312 (1997).
 76. Kronauer, R.E., Czeisler, C.A., Pilato, S.F., Moore-Ede, M.C. & Weitzman, E.D. Mathematical model of the human circadian system with two interacting oscillators. *Am. J. Physiol.* **242**, R3-17 (1982).
 77. Honma, K., Hashimoto, S., Natsubori, A., Masubuchi, S., & Honma, S. Sleep-wake cycles in humans. *Indian J. Medicine* **8**, 51-57 (2013).
 78. Czeisler, C.A. *et al.* Stability, precision, and near-24-hour period of the human circadian pacemaker. *Science* **284**, 2177-2181 (1999).
 79. Czeisler, C.A. *et al.* Is there an intrinsic period of the circadian clock? Response. *Science* **288**, 1174-1175 (2000).
 80. Masubuchi, S. *et al.* Clock genes outside the suprachiasmatic nucleus involved in manifestation of locomotor activity rhythm in rats. *Eur. J. Neurosci.* **12**, 4206-4214 (2000).
 81. O'Neill, J.S. & Reddy, A.B. Circadian clocks in human red blood cells. *Nature* **469**, 498-503 (2011).
 82. Milev, N. B., Rhee, S.G. & Reddy, A.B. Cellular Timekeeping: It's Redox o'Clock. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **10**, a027698 (2018).