

時差をつかさどる視交叉上核のバソプレッシン神経回路

山口 賀章, 岡村 均

1. はじめに

コルチゾールや成長ホルモンの分泌あるいは体温や血圧の変動など、多くの生理現象が約 24 時間周期のリズム性を示すことはよく知られている。また、喘息発作は夜間から早朝に頻発するなど種々の病態にもリズムがあるが、喘息治療に用いるテオフィリン徐放剤は就寝前に服用するとこの高リスク時間に薬物濃度が上昇するように工夫されている。このような我々の体が示す概日リズム (circadian rhythm) は、中枢時計である視床下部の視交叉上核 (suprachiasmatic nucleus: SCN) が自律的に駆動するものであり、地球の自転に基づく環境の明暗リズムによって従属的に形成されるものではない。SCN はマスタークロックと称されるだけあって、恒常暗条件下でも神経活動は周期的なリズムを刻し、SCN 単独の切片培養条件下であっても数か月間にわたって安定した概日リズムを刻み続けることができる。しかしながら、そのリズム頑強性を担う分子神経機構はほとんど不明であった。本稿では、概日時計システムの概略と去年我々が報告した時差消失マウスを用いた研究成果を中心に、SCN の神経結合とそのリズム機能について紹介したい。

2. 視交叉上核と細胞時計

1) 視交叉上核の形態学的特徴

体内時計システムは、時計遺伝子のリズムミクな発現振動が生物個体の生理現象や行動レベルにまで反映するきわめてユニークな系である。野生型マウスは、明期 12 時間暗期 12 時間の 24 時間リズムの飼育環境化では、24 時間リズムの行動リズムを示すが、常時消灯したような明暗の

京都大学大学院薬学研究科医薬創成情報科学専攻システムバイオロジー分野 (〒606-8501 京都府京都市左京区吉田下阿達町 46-29)

Vasopressin-mediated neuronal circuit in the suprachiasmatic nucleus and jet lag

Yoshiaki Yamaguchi and Hitoshi Okamura (Department of Systems Biology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, 46-29 Yoshida-Shimoadachi-cho, Sakyo-ku, Kyoto, Kyoto 606-8501, Japan)

時間手がかりのない条件下であっても、約 23.7 時間周期の安定した行動リズムを示す。すなわち、生体は約 24 時間のリズムを自律的に発振できることと、その自身の体内時計を環境の 24 時間リズムに同調させていることがわかる。この体内時計機能の中核は SCN である。SCN を破壊すると、さまざまな生理現象の概日リズムが消失するが、破壊後に別個体から取り出した SCN を移植すると、移植した SCN がもともと持つリズム周期に応じて移植された個体のリズムが回復する¹⁾。したがって、SCN 自体にリズムを発振する機能が存在し、全身の細胞のリズムを統括・制御しているものと考えられる。SCN は形態学的に、網膜の神経節細胞が直接入力する腹外側部と、直接入力しない背内側部の二つに分けられる。腹外側部の神経細胞は vasoactive intestinal peptide (VIP)、背内側部の神経細胞は arginine vasopressin (AVP) とそれぞれ特異的なペプチドを発現しており、それぞれ細胞マーカーとして利用されている。また、背内側部の神経細胞は VIP と AVP それぞれの受容体を両者とも発現しており、図 1B で示したような SCN 内外の神経回路が主要なものとして想定されている。

2) 細胞時計の分子ネットワーク

概日リズム発振の基盤である細胞時計は、時計遺伝子の転写・翻訳を介したネガティブフィードバック機構によって成り立っている²⁾。図 1C の中央の「コアループ」がこの機構の中核であるが、以下この機構を *Per* 遺伝子を中心に説明する。転写活性化因子である CLOCK と BMAL1 のヘテロ二量体は、*Per* 遺伝子のプロモーター上の E-box 配列に結合し、*Per* の転写を活性化する。翻訳された PER タンパク質が細胞質に蓄積してくると核内へ移行し、転写抑制因子の CRY と結合して、CLOCK と BMAL1 の転写活性を抑制する。その結果、*Per* の転写量が低下し PER タンパク質が減少する。すると再び CLOCK と BMAL1 による *Per* の転写が活性化する。このようにしてこの細胞時計のコアループは 1 回転する。このループは、また別の転写制御を介した複数のサブループによって多重の制御を受けることで、安定したリズムミクな振動を示す。では、このコアループの振動周期はどのようにして 24 時間で 1 回転するように調節されているのだろうか？ その鍵は PER や CRY タンパク質の寿命にあるとされる。翻訳され

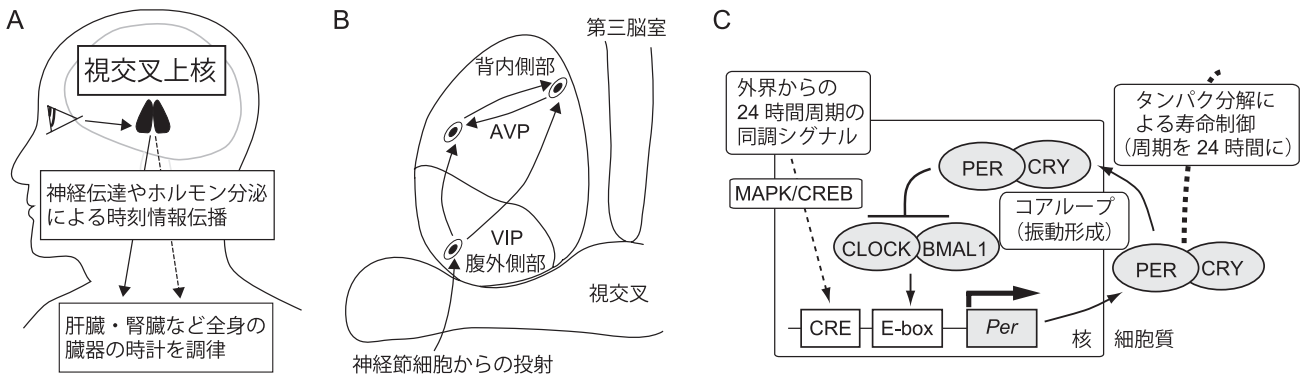


図1 体内時計システムの概略

(A) マスタークロック視交叉上核は全身の細胞時計を調律する。(B) 視交叉上核の形態学的特徴。(C) 細胞時計の分子ネットワーク。

たPERやCRYは、細胞質にてリン酸化やユビキチン-プロテアソーム系による分解の制御を受けており、自身の安定性(半減期)が厳密にコントロールされることで、コアループの周期は24時間に設定されている。

概日リズムというだけあって体内時計の周期は正確に24時間ではないため、地球の自転に基づく24時間の周期に体内時計の周期を同調させる必要がある。この同調因子の中で最も強力なものは光である。哺乳類の場合は、視覚情報を担う網膜の神経節細胞とは別の集団の神経節細胞であるメラノプシン含有細胞が、光を直接受容してその情報を直接SCNに伝達している³⁾。この経路を介した光シグナルは、MAPK(mitogen-activated protein kinase)やCREB(CRE-binding protein)経路を活性化し、*Per1*プロモーターのCRE配列(cAMP responsive element)を介して*Per1*の転写を誘導し、コアループの振動位相をリセットすると考えられている。

この時計遺伝子の転写制御機構は、SCNの神経細胞のみならず全身のほとんどの細胞にもみられる普遍的な分子機構である。したがって、SCN以外の脳部位や末梢臓器における個々の細胞時計も、自律的な概日振動能はあると考えられている。しかし、臓器や組織を単離し培養条件下で経時的にリズムを測定すると、集団としてもリズムな振動はすぐに消失してしまう。これは、個々の細胞は概日振動しているが、それぞれの振動位相が少しずつズレてしまい、その結果全体として観察するとリズム性が消失したように見えるためとされている⁴⁾。よって、臓器としての有効なリズム発振のためにはSCNから発せられた時刻情報をもとにして末梢の個々の細胞がそれぞれのリズム位相を同期させることが必要と考えられている⁵⁾。

3. 時差を制御する視交叉上核のバソプレッシン神経回路

1) 時差消失V1aV1bDKOマウスの開発

欧米へと海外渡航をすると、不眠や胃腸障害など、いわゆる時差ぼけに悩まされる。これは、ジェット機旅行により環境の明暗リズムは瞬時に位相が変動するが、自身の体内時計は直ちに渡航先の現地時間にリセットされないため、外界時計と体内時計の時刻位相が乖離してしまうからである。意外なことに、なぜ時差が生じるかは実のところほとんど解明されていなかった。そこで我々はマスタークロックのSCNにその鍵があると考え、SCNに特異的に発現する遺伝子のリズム異常検索であるSCN Gene-Project⁶⁾に、時差実験を加味した行動スクリーニングを行った。具体的には、*in situ*ハイブリダイゼーションや免疫組織化学によりSCNでリズムに発現している遺伝子を同定し、それらそれぞれの遺伝子改変マウスを作製して時差環境下における行動リズムを測定した。このスクリーニングの結果、AVPの受容体であるV1aとV1bが時差を担う分子の候補としてあがってきた。先述のとおり、AVPはSCNの主要なペプチドであり、AVPを発現する神経細胞群はV1a/V1b受容体を介してAVP発現細胞間でSCN内の局所神経ネットワークを形成することがわかっていた。しかしながら、このAVP局所神経回路の概日生理機能はなごらく不明であった。そこで我々は、V1aとV1b受容体とともに欠損したダブルノックアウトマウス(V1aV1bDKOマウス)を作製し、マウスを飼育する明暗環境を8時間早めるという、日本からアメリカ西部への移動を模倣した時差実験を行った。野生型マウスでは、時差の後で新しい明暗環境に再同調するのに10日程度を要したが、V1aV1bDKOマウスでは瞬時に再同調した(図2A)。また、明暗環境を8時間後退させるという、日本からヨーロッパへの移動を

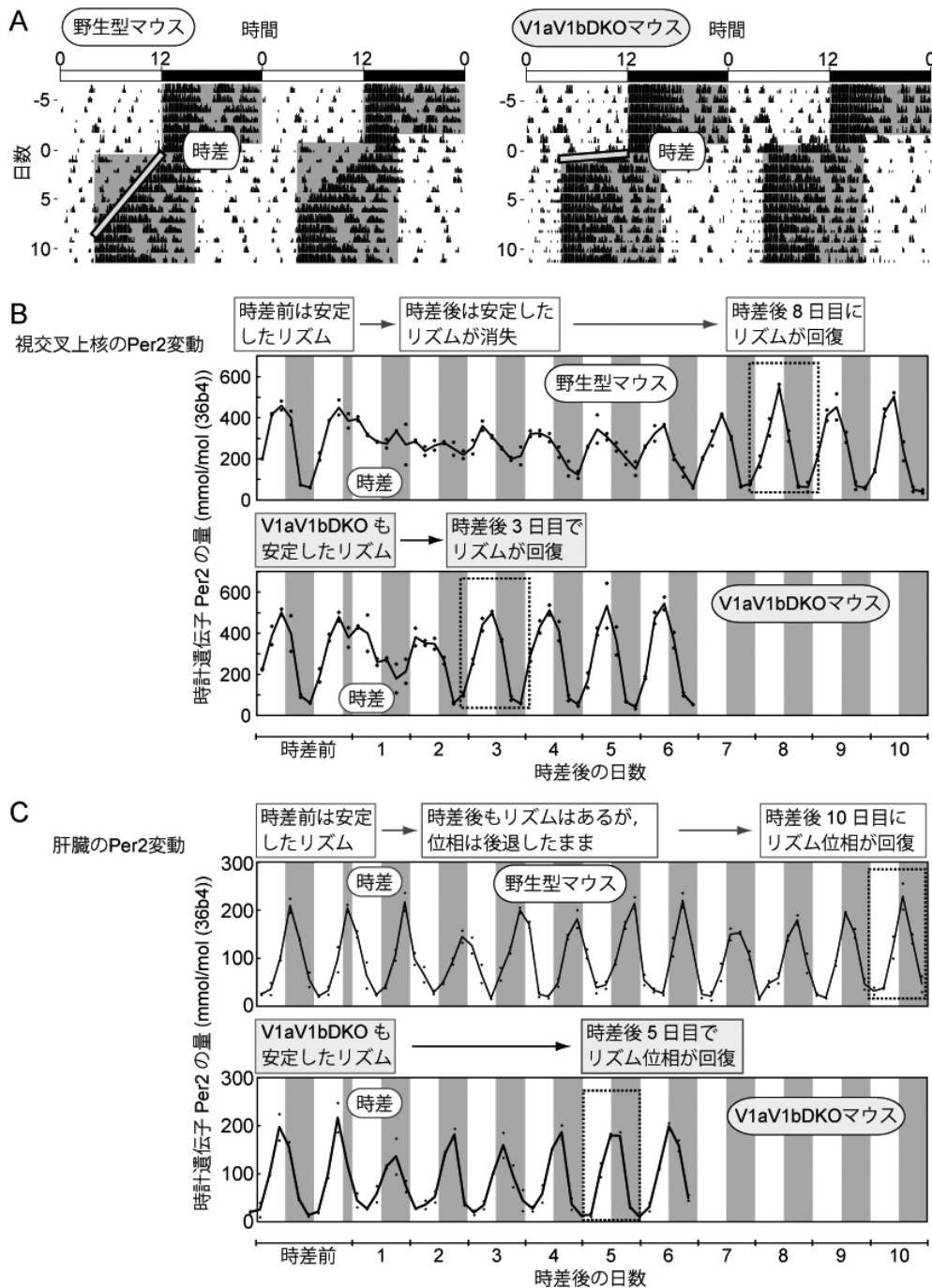


図2 V1aV1bDKOマウスは時差に瞬時に再同調する
(A) 時差環境下における代表的な行動リズム. (B) 時差環境下の視交叉上核における *Per2* の発現リズム. (C) 時差環境下の肝臓における *Per2* の発現リズム.

模倣した時差環境下でも、野生型マウスと比べてV1aV1bDKOマウスはすばやく再同調した⁷⁾. とはいえ、このような時差環境下におけるすばやい再同調は、時計遺伝子を欠損するなどして正常なリズム機能を失ったマウスでも観察されることが知られていた. そこで我々は、V1aV1bDKOマウスにおいて慣例的な時計機能を検討した

ところ、恒暗条件下での概日行動リズムは安定しており、その周期長は野生型マウスと同じく23.7時間であった. また、時計遺伝子の発現変動における振幅やピーク位相および光パルス刺激に対する *Per1* の誘導量とその領域はすべて正常であった. すなわち、V1aV1bDKOマウスは通常のみ暗飼育環境下では概日時計システムや光に対する反応

性は一見正常なマウスであるが、唯一時差環境下におかれたときのみすばやく再同調するという、きわめてユニークな特徴を持ったマウスであることがわかった。

2) 時差環境下における時計遺伝子の発現変動

それでは時差環境下では V1aV1bDKO マウスに一体何が起こっているのでしょうか？ そこで、我々は時差前後の SCN における時計遺伝子の発現変動を、時差前は 1 日半、時差後は野生型マウスでは 10 日間、V1aV1bDKO マウスでは 6 日間にわたって、4 時間ごとに SCN をサンプリングしリアルタイム PCR 法により定量的に時計遺伝子の発現量を測定した。野生型マウスの SCN において、コアループを形成する代表的な時計遺伝子である *Per2* は時差を起こす前には明瞭な日周リズムを示していたが、時差を起こした直後にはそのリズム性が消失した。きわめて安定したリズム性が SCN の最大の特徴であるため、このリズム消失は予想外の驚きであった。以後リズム性は日々少しずつ回復し、時差後 8 日目には時差前と同様の明瞭な日周リズムが観察された。一方で V1aV1bDKO マウスの SCN においては、*Per2* のリズムは時差を起こしてから時差後 3 日目で非常に早く時差前と同様の明瞭な日周リズムを示した (図 2B)。また、ほかの時計遺伝子である *Per1*、*Bmal1* および *Dbp* においても同様の結果が得られた⁷⁾。

続いて、末梢臓器の代表として肝臓の時計遺伝子の時差環境下における変動を同様にリアルタイム PCR 法により測定した。野生型マウスと V1aV1bDKO マウスの両方において、肝臓でも SCN と同様に、*Per2* は時差前に明瞭な日周リズムを示した。しかし、時差後のリズム性は野生型マウスと V1aV1bDKO マウスでは大きく異なった。すなわち、野生型マウスでは、*Per2* 発現リズムの振幅は SCN の場合とは異なり時差直後も保たれていたが、その位相は大きく後退しており、再同調には 10 日を要した。これに対し、V1aV1bDKO マウスでは時差後の位相回復は急速で、5 日目で野生型マウスよりもずっと早く再同調した (図 2C)⁷⁾。同様の結果は、腎臓の時計遺伝子変動においても観察された⁷⁾。

また、体温は代表的な概日リズムを示す生理現象である。時差環境下における体温の日周リズムを継時的に測定したところ、野生型マウスでは約 10 日後に再同調したのに対し、V1aV1bDKO マウスでは約 5 日後に再同調した⁷⁾。

以上の結果を総合すると、時差環境下における V1aV1bDKO マウスの行動、時計遺伝子そして体温のリズムは、野生型マウスのものよりもすばやく再同調することがわかった。さらに、野生型マウスと V1aV1bDKO マウスのどちらでも、まず SCN の時計が再同調し、その 1~2 日後に末梢や体温のリズムが回復することがわかった。このことから、時差後の再同調のスピードには SCN が最重

要であると示唆される。解剖学的には、哺乳類では網膜が明暗情報を独占して受容するので、時差によって前進した明暗サイクルはまず網膜で感知され、その情報は網膜視床下部路によって直接 SCN の腹外側部に入力される。この明暗シグナルを受けた SCN 腹外側部の神経細胞では、*Per* の転写誘導を介して分子時計のコアループの位相変動が起こり、他部位の SCN 神経細胞とはリズム位相がズレるため、時差後一定期間は SCN 全体としてのリズム振幅の減弱が起こるのであろう。上述のとおり、時差直後に SCN からの時刻シグナルの発振が減弱していても末梢臓器の時計にはリズム振動の変動がみられなかったことから、末梢臓器の時計のリズム形成には SCN のシグナルは直接関与していないと示唆される。時差後、日時の経過につれ SCN における時計遺伝子の発現リズムの振幅は徐々に回復することから、SCN より発せられる時間情報もそれに応じて次第に回復するのであろう。確かに、SCN のリズム振幅の回復とともに、末梢臓器振動のリズム位相も徐々に再同調していく。したがって、SCN リズムの回復が遅い野生型マウスでは末梢時計の回復も遅くなるが、SCN リズムの回復が早い V1aV1bDKO マウスでは末梢臓器の回復も早くなると考えられる。両マウスとも SCN の回復より 1~2 日遅れて肝臓や腎臓の末梢時計が再同調する。SCN の時間アウトプットである自律神経活動や副腎皮質ホルモン (グルココルチコイド) のリズムを時差前後で測定すれば、SCN から末梢への時差再同調の分子メカニズムを解明できるであろう。

3) V1aV1bDKO マウスは、なぜ時差に瞬時に再同調できるのか？

この問いにアプローチするために、我々は時差に最も早く再同調する SCN にある V1a/V1b 受容体を介した AVP 神経細胞間の局所神経回路に着目した。*Per1-luc* (ルシフェラーゼ) レポーターマウスの SCN 切片培養を用いて数百個に及ぶ SCN 神経細胞の個々のリズムをリアルタイム計測したところ⁸⁾、この AVP 神経結合が正常であると SCN は外界からのリズム攪乱因子の存在下であっても各 SCN 神経細胞がオリジナルのリズム位相を維持できた⁷⁾。一方で、V1a/V1b 受容体を欠損し AVP 神経結合が機能しない V1aV1bDKO マウスの SCN では、各神経細胞の秩序だったリズム位相パターンは、リズム攪乱因子の存在下では維持されなかった⁷⁾。

以上の結果から、我々は下記のモデルを想定している。野生型マウスでは時差により外界の明暗リズムが急激に変化した場合、光入力細胞である腹外側部の VIP 細胞のリズム位相はすぐに新明暗リズムに再同調できる。続いて、この VIP 細胞が (おそらく VIP とその受容体である VPAC2 を介して) AVP 細胞のリズム位相を変動させようとする

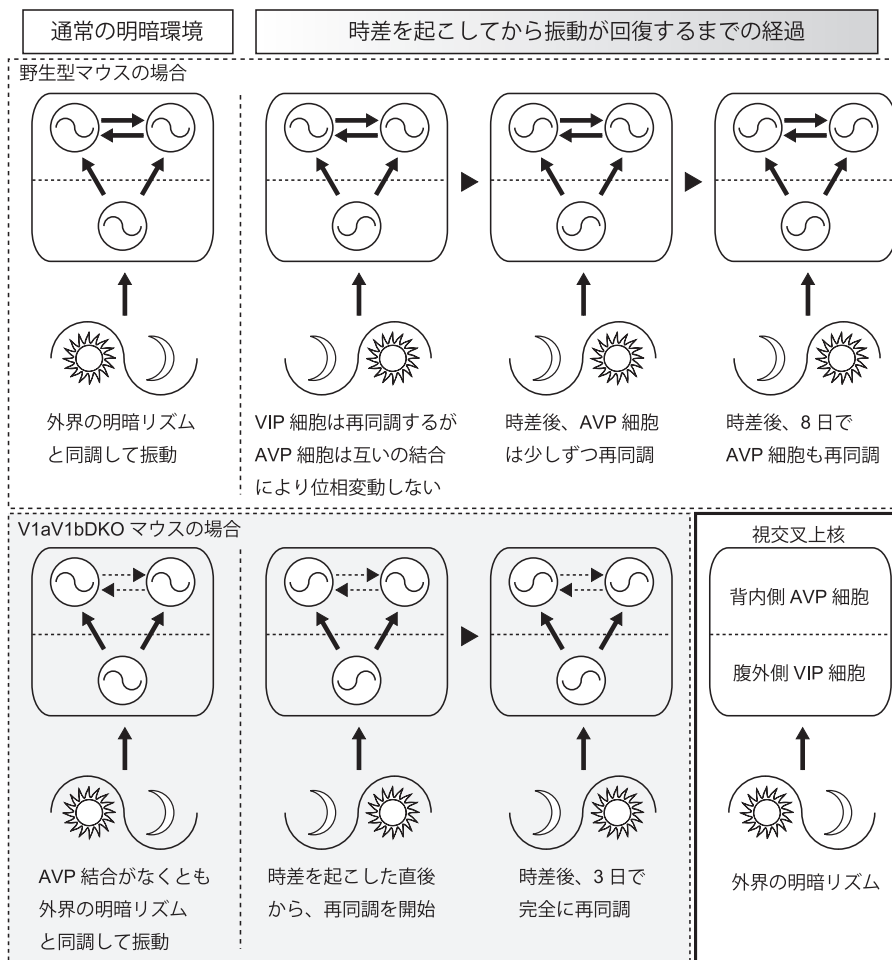


図3 時差環境下における視交叉上核振動の堅牢性を担う AVP 神経結合の模式図

が、AVP 細胞間には強固な神経結合が存在するため容易には位相を変動できず、AVP 細胞が再同調するのに多くの日数が必要となる。一方で V1aV1bDKO マウスの場合では、時差による明暗リズムの変動により位相変動した VIP 細胞が続いて AVP 細胞のリズム位相を変動しようとする際に、AVP 細胞は元の位相を維持する神経結合が脆弱であるため、AVP 細胞のリズム位相も瞬時に再同調するのであろう (図3)。我々は、このような VIP 細胞と AVP 細胞を想定した SCN の数理モデルを作成し、実際の実験データを再現することに成功した⁷⁾。

4. おわりに

地球上の生命体は何億年もかけて自律的に安定振動する約 24 時間の体内時計システムを確立した。特にげっ歯類のような夜行性の初期哺乳類にとって、正確に時を刻む時計は活動時期である夜間を知るのに重要であったのだろう。夜は基本的には暗いものである。しかし、満月や山火事あるいは雷鳴などによって薄明るくなることもある。こ

の不意の明るさを夜が明けて朝になったと誤認してしまったとしたら、本当に朝が来たときに「夜になった」と巣穴から出てきて捕食されてしまうことだろう。つまり、環境の明暗リズムの変化に左右されてすぐに狂ってしまうような脆弱な体内時計ではなく、捕食者が活動する時刻を正確に予測できる時計システムが生存に必須だったのであろう。しかしながら、ジェット機旅行が実用化された現代ではその堅牢性がかえって仇となり、海外旅行中に体内時計は容易に現地時間には再同調できず時差の原因になっているのはパラドックスである。

また、社会的な問題としては、グローバル経済のもとで 24 時間体制の工場や物流・輸送サービスを担うシフトワーカーがあげられる。2007 年度の厚生労働省の調査によると、日本の 27% もの労働者が交替制勤務や深夜業務に従事している。彼らは慢性化した時差勤務により高血圧やメタボリック症候群、がんといった生活習慣病のリスクが問題視されている⁹⁾。これは、通常時の明暗環境とはかけ離れた就業時間で生活せざるをえないため、シフトワーカーの体内時計リズムが破綻したためと類推されている

ものの、予防あるいは治療する方策は皆無である。我々は V1aV1bDKO マウスが時差に瞬時に再同調するという結果から、V1a と V1b 受容体の拮抗薬を野生型マウスの SCN に持続的に直接投与すると、濃度依存的に時差を軽減できることを示した⁷⁾。この結果は、海外旅行に伴う時差症候群だけでなく、睡眠障害や生活習慣病といったシフトワーカーの陥りやすい病気の予防や治療に対する薬剤の開発につながるものと期待している。覚醒・活動・睡眠という生活リズムは、社会生活や個人の健康の基盤である。引き続き、詳細な時差の分子神経メカニズムをシステムレベルで解明し、より時差軽減効果のある化合物を開発したい。

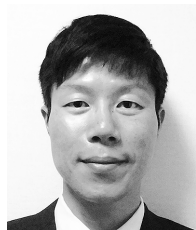
- 1) Ralph, M.R., Foster, R.G., Davis, F.C., & Menaker, M. (1990) *Science*, 247, 975-978.
- 2) Reppert, S.M. & Weaver, D.R. (2001) *Annu. Rev. Physiol.*,

63, 647-676.

- 3) Hattar, S., Liao, H.W., Takao, M., Berson, D.M., & Yau, K. W. (2002) *Science*, 295, 1065-1070.
- 4) Nagoshi, E., Saini, C., Bauer, C., Laroche, T., Naef, F., & Schibler, U. (2004) *Cell*, 119, 693-705.
- 5) Ishida, A., Mutoh, T., Ueyama, T., Bando, H., Masubuchi, S., Nakahara, D., Tsujimoto, G., & Okamura, H. (2005) *Cell Metab.*, 2, 297-307.
- 6) Okamura, H. (2007) *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 72, 551-556.
- 7) Yamaguchi, Y., Suzuki, T., Mizoro, Y., Kori, H., Okada, K., Chen, Y., Fustin, J.M., Yamazaki, F., Mizuguchi, N., Zhang, J., Dong, X., Tsujimoto, G., Okuno, Y., Doi, M., & Okamura, H. (2013) *Science*, 342, 85-90.
- 8) Yamaguchi, S., Isejima, H., Matsuo, T., Okura, R., Yagita, K., Kobayashi, M., & Okamura, H. (2003) *Science*, 302, 1408-1412.
- 9) Pan, A., Schernhammer, E.S., Sun, Q., & Hu, F.B. (2011) *PLoS Med.*, 8, e1001141.

著者寸描

●山口賀章 (やまぐち よしあき)



京都大学大学院薬学研究科助教。博士（生命科学）。

■略歴 1975年大阪府に生る。99年京都大学薬学部薬学科卒業。2004年同大大学院生命科学研究科博士後期課程修了。同年米国ソーク研究所博士研究員（日本学術振興会海外特別研究員）。2007年より現職。

■研究テーマと抱負 時差消失マウスを用いた体内時計の頑強性・恒常性の分子神経メカニズムの解明とその破綻による病態に興味を持って研究しています。

■ウェブサイト <http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/system-biology/>

■趣味 俳句。