

「生物時計と老化」を開催するに当たって

三 井 洋 司

工業技術院、生命工学工業技術研究所

Ageing and Biological Clock

Youji MITSUI

(National Institute of Bioscience and Human Technology)

「老化研究は、生体リズムの計時機構あるいは生物時計の研究と近縁であり、その成果を活用し合うではないか」という提案を、シンポジウムの形で実現してみたのが今回の世話人としての私の趣旨である。

老化が時系列の生物現象であることは充分理解されており、今まで経時的な機能変化を記述した研究が大部分をしめる。ところが、時を計る機構とのからみで老化を研究した論文は極めて少ない。年輪を重ねる大木のように歴年齢を直接生体に記すことのない動物は、自らその時を刻み寿命を知る機構は何だろうか。ここに物理的な暦時間と異なる内因性の生物時計の重要性を知るのである。しかし、現状では老化が砂時計のタイプと目覚まし時計のタイプのどちらで支配されているかさえ充分なdata提示や討論がなされていない。

自然環境にみる1日周期の明暗リズムとは独立に生体内に自律的な概日リズムの機構が進化してきたとの確証はこの方面に大きなインパクトを与える。

一方で、光信号が、そのリズムを同調させる因子として働くことも認識されている。この光信号リズムを受け取る主要器官は、生物種によって異なる。

本シンポジウムでは先ず比較生物学的な視点から生体リズムの現象とその本体について概観を得た後、アカパンカビ、昆虫、鳥類等での光受容システムと概日リズム発生の関連を詳しく知る。又、生体内の自律的なリズム発生の例として、心筋細胞の拍動とその制御因子を学ぶ一方、哺乳類の概日ペースメーカーとして重視されている視交叉上核について、その組織細胞レベル、及び遺伝子レベルのリズムに注目する。そしてこの視交叉上核リズムの加齢変化に関する最新研究を学ぶ。

最後に総合討論では、人間の場合に、生物時計と老化に特殊性があることを把握しつつ、老化研究に生物時計研究がどのように貢献できそうかも討論してみたい。

生物リズムの比較生物学

大石 正

(研究協力者：益田敦子、成瀬真弓、藤沢裕美、大谷真澄、佐々木基子、
気賀沢恭子、原田由美子)

(奈良女子大学理学部生物教室)

Comparative biology of biological rhythms

Tadashi OISHI

(Atsuko MASUDA, Mayumi NARUSE, Hiromi FUJISAWA, Masumi OTANI,
Motoko SASAKI, Kyoko KEGASAWA, Yumiko HARADA)

(Department of Biology, Nara Women's University, Nara 630)

(1) 生物リズムと時間

生物リズムとして知られている周期的現象には、主なものとして、(1) 約24時間の周期をもつ概日リズム (Circadian rhythm)、(2) 約1年の周期をもつ概年リズム (Circannual rhythm)、(3) 約2週間のリズムをもつ概潮汐リズム (Circatidal rhythm) などがある。これらのリズムは地球誕生以来数十億年の間地球上において続いてきた正確な周期性を生物が体内に取り込んだものと考えられる。すなわち概日リズムは地球の自転による1日24時間の昼夜のサイクルを、概年リズムは公転によって生ずる1年間の日長の変化のサイクルを、そして概潮汐リズムは月の公転によって生ずる潮の干満のサイクルを取り込んだものと考えられる。体内に作り上げられた時計機構は自律的に時間を測定するのみでなく、外界の周期に常に同調させるためのリセット機構 (entrainment) も発達させた。これらのリズムのうち最もよく研究されているのが概日リズムであるが、その話に入る前に、生物と時間の関係についてもうすこし一般的に考えてみる必要がある。生命現象というものの本質が変化であり、変化の同義語が時間とするならば、生命現象と環境が切り離しえないように生命現象と時間は切り離しえないものである。発生、老化、進化といった現象は生物リズムと同じく時間と密接に結びついた現象であるが、ここで、時間の二つの側面との関連を考えてみる必要がある。二つの側面とは、(1) 時刻 (位相、タイミング) と (2) 時間 (長さ) である。そして、これらの時間の二つの側面を示す時計機構はやはり二つある。すなわち、(1) の時刻を計る時計は振動体型時計であり、(2) の時間を計るのは砂時計型時計である。概日リズムはこの (1) の振動体による時計機構により駆動されており、老化を含めて他の多くの生命現象は (2) の砂時計

型の時計機構により駆動されているようである。

(2) 脊椎動物を中心とした生物リズムの比較生物学

バクテリアなどの原核生物においては概日リズムは存在しないと言われていたが、最近ラン藻 (cyanobacteria) の細胞分裂、光合成などに概日リズムがあることが報告されている。従って、現在では原核生物を含めた単細胞生物からヒトにいたるまで生物時計を有していると考えられている。

脊椎動物においては、哺乳類、鳥類において非常に多くの研究がなされているが、下等脊椎動物における研究は比較的少ない。我々の研究室で今まで行われてきた魚類、両生類、爬虫類、鳥類そして哺乳類での結果を紹介しながらそれぞれの違いについて検討したい。特に、時計機構の同調系および表現リズムと時計とのカップリング (連結) の問題を中心として検討する。

(3) 時計の局在部の比較生物学

- (i) すべての生物において光受容部と概日時計の局在部とは密接な関係にあると考えられる。
- (ii) 光受容部と時計が同一細胞に存在するユニット型と別の細胞に分離しているセパレート型がある。単細胞生物においては、光受容部と時計機構は同一細胞内にある。すなわちユニット型である。多細胞生物においては、ユニット型とセパレート型の両方が見られる。
- (iii) 我々の研究室で得られたウズラの眼内時計機構に関する結果について述べる。

(4) 生物リズムと老化 — 比較生物学の立場から

最初に述べたように概日時計と老化時計はその機構が異なっているようである。しかしながら、両者の関係についていくつかの報告がなされているのでそれらの検討を行いたい。ショウジョウバエにおいて、恒明条件下あるいは24時間とは異なる明暗周期下で飼育した場合寿命が短くなるという報告がある。また、哺乳類において、一般に老化とともに体温、呼吸量、ホルモンレベル、活動などのリズムの振幅の減少が起こるとされている。ハムスターでは、加齢によりリズムの自由継続周期 (τ) が短くなると報告されている。ヒトにおいては生後2週間ほどは睡眠覚醒に周期性はないが徐々に昼行性リズムが顕著になり、老化とともに昼の居眠り、朝早い目覚めなど活動の振幅の減少や位相の変化が起こるとされている。特に内的脱同調 (internal de-synchronization) と呼ばれる異なるリズム間での脱同調が起こりやすくなることが知られている。しかしながら、これらが老化の原因なのか結果なのかはよく分かっていない。

参考文献

1. 千葉喜彦・高橋清久 (編) (1991) 時間生物学ハンドブック 朝倉書店
2. Aschoff, J. (ed.) (1981) Handbook of Behavioral Neurobiology. Vol. 4, Biological Rhythms. Plenum Press, New York and London

光信号伝達の分子機構とリズム

蓮沼 仰嗣

(研究協力者: 小田 和司、浜田 徹、伊藤 喜誠、西川 和子)
(横浜市立大学・木原生物学研究所)

Molecular mechanism of light signal perception with a special aspect on circadian rhythm.

Kohji HASUNUMA

(Kazushi ODA, Tohru HAMADA, Kisei ITO & Kazuko NISHIKAWA)
(Yokohama City University, Kihara Institute for Biological Research, 2-120-3 Nakamura-cho, Minami-ku, Yokohama, 232 Japan)

<はじめに>

アカバンカビのバンド(bd)株は寒天培地上で菌糸からの無性胞子形成の概日性(およそ1日の)リズムを示す。また暗発芽アラスカエンドウはクロロフィルa/b結合蛋白質の遺伝子、Cab-1の発現が概日性リズムを示す。菌類および植物はこのようにリズムを示して成長し、加齢してゆくと考えられる。植物の場合さらに1日の日長に対応して(光周性)花芽を付け、花を咲かせ、実をつけて枯死する。このように成長および加齢は菌類、植物において生体リズム(概日性リズム)と密接な関連を持つと考えられる。

この概日性リズムの分子機構を解明することは成長過程におけるリズムと加齢を分子レベルで理解するうえで重要な意味を持つと考えられる。概日性リズムは光により変動する。アカバンカビでは青色光照射により分生子リズムが変動し、それは位相応答と呼ばれる。アラスカエンドウではCab-1遺伝子の発現は光受容体であるフィトクロムを經由した赤色光により誘導され、近赤外光により、光可逆的にその発現が抑制される。この光信号受容の分子機構はフィトクロムの存在が予測された1953年以来実に40年間解かれざる問題として残されてきた。本研究ではアカバンカビ及びアラスカエンドウでの光信号受容の初期過程が分子レベルで解明されつつあり、概日性リズムとの関連において論議しよう。

1. アカバンカビのNTP結合蛋白質と光信号受容

アカバンカビのバンド株と野生株の菌糸よりミクロソーム分画を調製した。[α - 32 P]ATP, [α - 32 P]GTPを含む反応液にミクロソーム分画を入れ、1秒UV-A(355 nm)照射後、25℃60分保温した。膜に存在するNTP結合蛋白質に結合した[α - 32 P]ATP, [α - 32 P]GTPをUV照射でクロスリンクさせた後に、SDS電気泳動を行った。さらに蛋白質をニトロセルロース膜にエレクトロブロットし、オートラジオグラフィを行った。UV-A光1秒照射は58 kDa, 77 kDa, 83 kDa, 129 kDa蛋白質の[α - 32 P]ATP, [α - 32 P]GTPの結合を著しく増加させた。この反応は25℃では2分で光反応が検知された。

2. 膜結合性蛋白質のリン酸化の光による誘導

[γ - 32 P]ATPを含む反応液にミクロソーム分画を入れ、青色光(465 nm)照射し、0℃5秒の後、反応をSDSサンプルバッファーで停止した。SDS電気泳動後、上記同様にオートラジオグラフィをとった。15 kDa蛋白質のリン酸化が青色光で促進された。光に非感受性の変異株であるwc-1, wc-2のミクロソーム分画を用いた場合は青色光による15 kDa蛋白質のリン酸化は見られなかった。青色光による15 kDa蛋白質のリン酸化の促進は F_0F_1 -ATPaseの阻害剤であるDCCD, DES, オリゴマイシンにより阻害された。アカバンカビではオリゴマイシン耐性の変異株oli^rが存在し、oli^rではその分生子形成リズムが野生株の21.6時間から19時間に短縮される。oli^rは少なくともミトコンドリア F_0F_1 -ATPaseのサブユニット9で15 kDaであり、ATPase活性が低下している。またoli^rはfrqという分生子形成リズムを変調させる遺伝子とごく近くに存在し、frqはATPaseの活性に関与する可能性がある。

3. アラスカエンドウの光信号受容

暗発芽アラスカエンドウの第3節間は屈光性、また光によるCab-1遺伝子の発現を含む緑化に対して大変感受性の高い場所である。第3節間に赤色光、また赤色光と近赤外光を連続照射した。その直後、第3節間を磨砕し、原形質膜を精製した。赤色光照射により原形質膜上の92 kDa蛋白質が0℃5分の保温で[α - 32 P]ATPを結合したが、赤色光-近赤外光の連続照射ではATP結合能を消失した。これは92 kDa蛋白質が赤色光及び近赤外光で光可逆性を示すフィトクロムより、光信号を受容したと考えられる。

さらに同じ原形質膜を用いて、0℃5秒で[γ - 32 P]ATPよりのリン酸化を見た。15 kDaおよび70 kDa蛋白質のリン酸化は赤色光により上昇したが、赤色光-近赤外光の連続照射により15 kDa蛋白質のリン酸化は低下した。しかし、70 kDa蛋白質のリン酸化は上昇した。少なくとも15 kDa蛋白質のリン酸化はフィトクロムからの光信号を受容したと考えられる。

アラスカエンドウの第3節間原形質膜を用いてヴェシクルを作製すると、本来の外側が外になったヴェシクルは赤色光によりATP存在下に Ca^{2+} を外に排出する。本来の内側が外になったヴェシクルは赤色光により Ca^{2+} をヴェシクルの内に入れ

ることが知られている。近赤外光はこの逆に作用する。このことよりフィトクロムは原形質膜上のCa²⁺-ATPaseを制御していると考えられる。15 kDaおよび92 kDa蛋白質はこのCa²⁺-ATPaseに信号を送る可能性が考えられる。

<おわりに>

アカバンカビのミクロソーム分画を用いたUV-A、青色光の光信号受容、またアラスカエンドウの原形質膜を用いた光信号受容の分子機構はともにイオン輸送性ATPaseにその信号が送られている。アカバンカビの場合、58 kDa, 77 kDa, 83 kDa蛋白質はF₀F₁-ATPaseのサブユニットであることも考えられる。ミトコンドリアF₀F₁-ATPaseはその活性が低下するとATP生成能が低下し、エネルギーチャージが低下すると考えられる。アカバンカビではエネルギーチャージは概日性リズムの重要な構成要素と考えられている。oli⁺-frg遺伝子がごく近接して存在することも考えあわせ、概日性リズムの中枢部に光信号が入る可能性が示唆された。

一方、アラスカエンドウの原形質膜上のCa²⁺-ATPaseは細胞内遊離カルシウム濃度、[Ca²⁺]_iの制御に重要な役割を担っていると考えられる。概日性リズムの分子機構において[Ca²⁺]_iの変動が中心的役割を課していると考えられることから興味深い。DCCDはわずかに15 kDa蛋白質の光によるリン酸化促進を阻害した。[Ca²⁺]_iに重要な影響力を持つ原形質膜Ca²⁺-ATPaseに光信号が入ることが示唆された。

イオン輸送に関与するATPaseに光信号が入ることは、概日性リズムの主要な部分にイオン輸送が関与していることを示している。このことはリズムの時間はイオン輸送という砂時計で測定されていることを示唆しているものかも知れない。H₂Oの代わりにD₂Oを用いるとリズムが遅延する現象も、このイオン輸送性ATPaseが関与している可能性が考えられる。"D₂Oは長寿の水"はいささか推論のゆきすぎを感じる。

文南大

- (1) Hasunuma, K., Shinohara, Y., Funadera, K. and Furukawa, K.: *Adv. Chronobiology. Part A*, pp. 123-130. ed. by J. E. Pauly and L. E. Scheving. Alan R. Liss, Inc., New York. (1987)
- (2) Hasunuma, K. and Funadera, K.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 143; 908-912. (1987)
- (3) Hasunuma, K., Funadera, K., Shinohara, Y., Furukawa, K. and Watanabe, M.: *Curr. Genet.* 12; 127-133. (1987)
- (4) Hasunuma, K. and Shinohara, Y.: *Fungal Genet. Newsl.* 34; 33-35. (1987)
- (5) Hasunuma, K., Furukawa, K., Funadera, K., Kubota, M. and Watanabe, M.: *Photochem. Photobiol.* 46; 531-536. (1987)
- (6) Furukawa, K., Hasunuma, K. and Shinohara, Y.: *J. Bacteriol.* 169; 4790-4795. (1987)
- (7) Hasunuma, K., Miyamoto-Shinohara, Y. and Furukawa, K.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 146; 1178-1183. (1987)
- (8) Hasunuma, K., Furukawa, K., Tomita, K., Mukai, C. and Nakamura, T.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 148; 133-139. (1987)
- (9) Hasunuma, K.: *Symposium on Radioisotope and Radiation Technique in Agriculture*, Cheju Applied Radioisotope Research Institute., Cheju, Korea. pp. 25-61. (1987)
- (10) Sugai, M., Yamada, K., Manabe, K. and Hasunuma, K.: *XIV Intern. Bot. Congr. Abstr.* 137. (1987)
- (11) Hasunuma, K., Shinohara, Y., Funadera, K. and Furukawa, K.: *XIV Intern. Bot. Congr. Abstr.* 142. (1987)
- (12) Ohmori, M., Ohmori, K. and Hasunuma, K.: *Arch. Microbiol.* 150; 203-204. (1988)
- (13) Hasunuma, K., Funadera, K., Furukawa, K. and Miyamoto-Shinohara, Y.: *Photochem. Photobiol.* 48; 89-92. (1988)
- (14) Ohmori, M., Hasunuma, K. and Furukawa, K.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 151; 215-221. (1988)
- (15) Ohmori, M., Ohmori, K. and Hasunuma, K.: *VI Symposium on Phototrophic Prokaryotes. Abstr.* 2. (1988)
- (16) Hasunuma, K.: *3rd Sapporo Symposium on Biological Rhythm. Abstr.* 28. (1988)
- (17) Hasunuma, K.: *10th International Congress on Photobiology. Abstr.* 7. (1988)
- (18) Hasunuma, K. and Takimoto, A.: *Photochem. Photobiol.* 50; 799-808. (1989)
- (19) Hasunuma, K.: *Biology of Cellular Transducing Signals '89 IX International Washington Spring Symposium. Abstr.* 9. (1989)
- (20) Hasunuma, K.: *Trends in Photochem. Photobiol.* 1; 311-319. (1991)
- (21) Hasunuma, K.: *Plant Cell Physiol.* 32; 653-664. (1991)
- (22) Hasunuma, K.: *IIIrd Japan-China Joint Seminar on Biophysics. Xi-an, Abstr.* 143. (1991)
- (23) Hasunuma, K.: *Sixteenth Fungal Genet. Conf. Pacific Grove, Abstr.* 31. (1991)
- (24) Yoshida, S., Kanauchi, A., Murayama, T. and Hasunuma, K.: *Sixteenth Fungal Genet. Conf. Pacific Grove, Abstr.* 50. (1991)
- (25) Hasunuma, K.: *2nd Japan-USSR Coop. Symp. Receptors; Structure and Function. Abstr.* 9. (1991)
- (26) Hasunuma, K., Nishikawa, K. and Ohsaki, Y.: *Fourth Sapporo Symp. Biol. Rhythm, Abstr.* 34. (1991)
- (27) Hasunuma, K., Oda, K., Nishikawa, K. and Hamada, T.: *The 8th Yokohama Forum for the 21st Century Intern. Symp. ; Molecular Structure and Function.* 101. (1991)
- (28) Hasunuma, K., Oda, K., Nishikawa, K. and Hamada, T.: *Yokohama Medical Bulletin. in press.* (1992)
- (29) Hasunuma, K. and Nishikawa, K.: *Plant Cell Physiol.* 33; 889-896. (1992)
- (30) Hasunuma, K., Oda, K. and Nishikawa, K.: *Seiken Ziho.* 37; 1-6. (1992)
- (31) Hasunuma, K.: *Seiken Ziho.* 37; 7-18. (1992)
- (32) Hasunuma, K., Ootaki, T. and Suzuki, T.: *Seiken Ziho.* 37; 19-30. (1992)
- (33) Hasunuma, K., Furukawa, K. and Kajiura, H.: *Seiken Ziho.* 37; 31-36. (1992)
- (34) Ito, K. and Hasunuma, K.: *Seiken Ziho.* 37; 37-45. (1992)
- (35) Hasunuma, K.: *Seiken Ziho.* 37; 46-54. (1992)
- (36) Hasunuma, K. and Oda, K.: *11th Intern. Congr. Photobiol. Abstr.* 343. (1992)
- (37) Hasunuma, K., Hamada, T. and Itoh, K.: *11th Intern. Congr. Photobiol. Abstr.* 345. (1992)
- (38) Oda, K. and Hasunuma, K.: *11th Intern. Congr. Photobiol. Abstr.* 227. (1992)
- (39) Hasegawa, K., Shinozawa, T., Hashimoto, H., Hasunuma, K., Shimamoto, M. and Tsukahara, Y.: *11th Intern. Congr. Photobiol. Abstr.* 353. (1992)
- (40) Oda, K. and Hasunuma, K.: *Symp. "Molecular mechanism of the photo-reception and transduction in the bio-information systems" Tokyo. Abstr.* 9. (1992)
- (41) Hasunuma, K., Oda, K. and Hamada, T.: *Cytologia. in press.* (1993)
- (42) Hasunuma, K. and Oda, K.: *Cytologia. in press.* (1993)
- (43) Hasunuma, K. and Hamada, T.: *Cytologia. in press.* (1993)
- (44) Hasunuma, K., Ito, K. and Oda, K.: *Cytologia. in press.* (1993)
- (45) Yoshida, S., Kanauchi, A., Hasunuma, K. and Murayama, T.: *J. Tech. Res.* 37-1; in press. (1993)

心筋細胞の拍動リズムとその制御

鈴木 崇彦^{1) 3)}、各務 博^{2) 3)}、三井 洋司³⁾

1) 東京大学医学部放射線研究施設、2) 新潟大学医学部第二内科

3) 工業技術院生命工学工業技術研究所

Beating rhythm and its regulation in cardiac myocytes.

Takahiko SUZUKI¹⁾³⁾, Hiroshi KAGAMU²⁾³⁾ and Youji MITSUI³⁾

1)Radioisotope Research Institute, The Faculty of Medicine, The University of Tokyo, 2)Department of Medicine II, School of Medicine, Niigata University and 3)National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology.

はじめに

心臓は、我々動物があるリズムをもって生きていることを最も確実に認識させてくれる臓器であろう。心臓に自動能があることは古代から知られており、生体から切り離されても拍動を続ける心臓は「生きている」ことの象徴として扱われてきた。1912年、酵素処理によって分離された個々の心筋細胞が自動的に拍動する能力を有していることが報告され、心臓の自動能の本体が心筋細胞自らに備わっていることが明らかになった。心筋細胞の拍動は細胞内外の各種のイオン (K^+ , Na^+ , Ca^{2+} 等) バランスとそれぞれのチャンネルの状態によって制御されており、従ってこれらに影響を与える因子は拍動リズムに影響を与えうる。今回は、1個の心筋細胞における自動収縮の機序を簡単に説明し、我々の行なっている細胞生物学的立場からの拍動制御の研究を紹介すると共に、老化という観点から見た心筋細胞の生物学について言及する。

1. 心筋細胞の自発拍動

興奮性の細胞が自動的に、周期的に脱分極を繰り返すためには静止電位の上昇が必要であるとされている。実際、心筋細胞の中でも、自発能を示す細胞は、その静止電位が自発能を示さない細胞よりも高い。また、自発能を示さない心筋細胞でも、電気的に静止電位を上昇させることによって自発運動を引き起こすことができる。このことから、静止膜電位が脱分極側にシフトしていることが自発的に拍動をするためには重要であると考えられている。心筋細胞が骨格筋細胞と異なる点に、心筋細胞は一回の脱分極-再分極時間が長いことがあげられるが、このことは強縮をおこさずにある周期をもって拍動を繰り返すためには非常に重要なことである。心筋細胞の収縮は最終的には筋小胞体から放出されるCaイオンによって引き起こされるが、心筋は筋小胞体によるCaイオンの再吸収によって弛緩する。この細胞質Caイオンの再吸収過程は収縮よりもより多くのエネルギーを必要としており、また、心筋細胞の弛緩速度は再吸収速度に依存する。

2. ラット新生仔心筋細胞の無血清培養と拍動

ラットの新生仔の心臓から分離した心室筋細胞は血清添加培地中では盛んな自発拍動を示す。しかし、適切な無血清培養を行なうと細胞は静止した状態を維持することができる。この無血清培養された心筋細胞は、交感神経ホルモンの刺激に対して速やかに反応する。我々はこのような心筋細胞の無血清培養系を確立し、利用することによって心筋細胞の拍動誘導に関して興味ある結果を得ている。無血清培養された心筋細胞はノルエピネフリン(NE)やエンドセリン(ET)に対して非常に良く反応し、拍動が促進される。ETの拍動促進作用については現在も検討の途中であるが、最近ETが心筋細胞のカリウムチャンネルの開口確率を低下させるという報告がなされていることから、このことが細胞の静止膜電位の上昇を促し、ひきつづくナトリウムチャンネルの開口による脱分極、カルシウムイオンの細胞内流入といった一連のカスケードの引き金になっていると考えられる。このことは逆に、無血清培養されている心筋細胞では静止膜電位が血清培養の時よりも過分極側にシフトしていることを示唆している。また、心筋細胞に備わった自動能が維持されるためには細胞に対し持続的に静止膜電位を上昇させておくようななんらかの活性化因子が必要とされるらしい。さらに、ある種の刺激によって拍動している細胞に、単独では細胞の拍動を促進する方向に働く物質を与えると拍動が停止するという現象も観察しており、これらの解析は心筋細胞内での情報伝達のクロストークを理解する意味で興味深い。また、最近我々は無血清培養に何も添加することなく、培養環境のみに、ある変化を加えることによって心筋細胞に拍動を誘発できることを見出した。現在その詳細について検討中であり、それらの結果についても紹介する予定である。

3. 老化との関連から見た心筋細胞

老化に伴って心臓の拍動数が徐々に減少してくることが知られている。細胞レベルから見た場合、細胞膜の静止電位が老齢時に過分極側に移行することが報告されており、これが加齢による徐脈と関係するのではないかと考えられている。加齢と共に心筋細胞の環境も変わってくることは容易に考えられることであるが、心筋細胞自身にも加齢と共にイオンチャンネルの質的、量的変化が起こっていることも予想される。心筋細胞が自発的に拍動を開始するためには細胞の静止膜電位レベルが重要であることはすでに述べたが、静止膜電位はイオンチャンネルの質、量に依存すると考えられ、従って、心筋細胞の拍動リズムはチャンネルの遺伝子発現という点から考えれば、大きな意味では遺伝子によって制御されていると言える。近年、培養された正常二倍体細胞には分裂寿命というものが存在するという研究から、細胞自身の分裂回数の増加に伴う細胞内の変化と個体における同種の細胞における変化についての比較研究がなされつつある。しかし、分裂しない細胞、特に神経細胞や心筋細胞などの細胞老化はどのように捉えたら良いのであろうか。心筋細胞は特に休み無く拍動を続け、生後間も無くからは細胞分裂による世代交代をすることは無いと考えられており、細胞の老化を考える意味においては非常に興味深い問題である。

器官としての心臓を考えると、心臓の作り出す血液の脈流リズムは非常に重要な意味を持っていることが明らかになりつつある。それは、人工心臓を考えたときに、人為的に脈流リズムを作らないと末梢での血流が非常に悪化することに代表される。生体における器官はある種の緊張や刺激にさらされていないとその機能が低下してしまうことは周知のことであるが、脳からの電気的な刺激を除けば、血液を介する心臓拍動による脈流リズムは生体の発生、分化さらには老化との関係において重要な意味を持っている可能性がある。

昆虫の概日時計システム

富岡憲治

(山口大学理学部 生物学教室)

Circadian clock system in insects

Kenji Tomioka

(Biological Institute, Faculty of Science, Yamaguchi University,
Yamaguchi 753)

はじめに

単細胞生物から脊椎動物に至るまでほとんどの真核生物はその生命活動に約24時間の周期性(概日リズム)を示す。多細胞生物の場合、概日リズムを駆動する振動系は複数の細胞から成るいわゆる概日系を形作っている。概日系は24時間で振動する概日時計を核として、光サイクルへの同調のための光受容器、および時計からの出力を受けて活動や生理活性などのリズムを現す被駆動系から成る。概日リズムの神経機構を明かにするためには時計や光受容器などの諸要素の所在を明かにし、さらにそれらの相互作用を明かにする必要がある。昆虫の中樞神経系は梯子状で分散型であり、それを構成する神経細胞の数も脊椎動物と比較すれば桁違いに少ない。このことは昆虫が、概日システム要素の同定や要素間の相互作用の研究に極めて好都合な材料であることを意味している。ここでは、われわれがフタホシコオロギ (*Gryllus bimaculatus*) を用いて明かにすることができたことを中心に、昆虫の概日リズムの神経機構について紹介する。

1) 概日時計の所在

破壊実験や移植実験などの結果に基づいて、昆虫ではこれまでに大きく分けて2つの時計部位が同定されている。いずれも脳の一部であるが、一つはコオロギ¹⁰⁾やゴキブリ^{11,12)}の研究により明かにされた視葉であり、いま一つはショウジョウバエ¹³⁾やガ¹⁴⁾の前大脳である。後者についてはいくつか仕事があるが、いまだに明確な時計部位は不明のままである。しかし、前者については、われわれとPageによって、視葉の移植により時計機能が移植されること¹⁵⁾、体外培養条件下に置かれた視葉でも

電気活動に概日リズムを示すこと^{18,13,17}から、概日時計を含むことが実証された。現在、視葉時計系では入力系、出力系の研究が進みつつある。

2) 光受容器

通常、概日時計は環境サイクルに同調して正確な24時間の周期を刻んでいる¹⁶。時計が同調するための最も強い告時因子は光サイクルであり、昆虫は同調のための光受容器をもつ。視葉に時計をもつものでは、この光受容器は複眼であることが知られている。このことは視神経の切断により、明暗サイクルの下でもあたたかも恒暗下のようにリズムが自由継続することから明らかになった^{16,12}。網膜電図を指標にした研究から、複眼の感度が概日リズムを持つことも示されている¹⁷。このことは、概日時計が光受容器からの情報を介して自己の振動を入力するという一種のフィードバック系をなすと捉えることができる¹²⁰。この系は恒常条件下でも機能することから、自己安定的な機能を担うと考えられよう。

3) 概日時計間の相互作用

視葉は左右に一对存在する、したがって、視葉時計を持つ昆虫は2つの時計を持つことになるが、左右の時計が互いに同位相同一周期で動く機構を持つことによって、システムとしては単峰性の安定なリズムを示している。コオロギを用いた研究ではこの機構は位相変位系と活動の抑制系からなる^{14,18}。概日時計は反対側の概日時計に対して、主観的昼の後半で位相前進を、主観的夜の前半で位相後退を引き起こす出力を送っている。この系によって、2つの時計は互いの位相を引き寄せ合い、安定な同調系を作り上げているらしい。また、時計は主観的昼の位相で、反対側の時計が駆動する活動を強く抑制し、単峰性の夜行性リズムを維持している。

4) 概日時計システムの個体発生

視葉時計は卵の中で動きはじめることが明らかになっている¹⁵が、この時計の性質は安定なものではなく、個体発生の過程でさらされる光サイクルに応じて変化する。例えば、時計の周期や主観的昼夜の長さは、幼虫期に与えられる光サイクルの周期や明暗比に依存して変化する^{10,11}。このことは、時計が、その本質的な部分はショウジョウバエやアカパンカビなどで明かにされているように遺伝子によって形成されるとしても、なお環境サイクルに順応する可塑性を有することを物語っている。成長に伴いリズムが変化することが知られている昆虫もある。フタホシコオロギは幼虫期は昼行性であるが、成虫になって数日経つと夜行性に逆転する⁹。この逆転にともない時計の周期も若干変化する。しかし、電気活動を指標にして調べてみると視葉時計自身の位相は全く変化しない¹⁷。この変化は、発生に伴う時計と活動駆動中枢との結合の変化に起因すると考えられる¹⁹。

おわりに

昆虫の概日時計システムは光受容器をも含めて、複数の振動体を擁するいわゆる複数振動体系をなす。これらの振動体間の相互作用により概日時計システムは系全体としての安定性を保つ“自己安定系”であるといえる。ところが一方で、このシステムはそれが曝されている環境サイクルに順応する柔軟性をも合わせ持っている。われわれが無視しがちである環境サイクルが体内時計に重要な影響を持つことを強調したい。

文 献

1. Page, T.L. : *J. Comp. Physiol.*, 124, 225-236 (1978)
2. Handler, A.M. and Konopka, R.J.: *Nature*, 279, 236-238 (1979)
3. Tomioka, K. and Chiba, Y.: *J. Comp. Physiol.* 147, 299-304 (1982)
4. Tomioka, K. and Chiba, Y.: *Naturwissenschaften*, 69, 395-396 (1982)
5. Page, T.L.: *Science*, 216, 73-75 (1982)
6. Tomioka, K. and Chiba, Y.: *Zool. Sci.*, 1, 385-394 (1984)
7. Tomioka, K. and Chiba, Y.: *J. Interdiscipl. Cycle Res.*, 16, 73-76 (1985)
8. Tomioka, K. and Chiba, Y.: *J. Insect Physiol.*, 32, 747-755 (1986)
9. Tomioka, K. and Bollenbacher, W.E.: *J. Insect Physiol.*, 35, 1023-1030 (1989)
10. Tomioka, K. and Chiba, Y.: *J. Insect Physiol.*, 35, 273-276 (1989)
11. Tomioka, K. and Chiba, Y.: *Zool. Sci.*, 6, 565-571 (1989)
12. Tomioka, K., Okada, Y. and Chiba, Y.: *J. Biol. Rhythms*, 5, 303-313 (1990)
13. Colwell, C.S. and Page, T.L.: *J. Comp. Physiol. A*, 166, 643-649 (1990)
14. Tomioka, K., Yamada, K., Yokoyama, S. and Chiba, Y.: *J. Comp. Physiol. A*, 169, 291-298 (1991)
15. Tomioka, K., Wakatsuki, T., Shimono, K. and Chiba, Y.: *J. Insect Physiol.*, 37, 365-371 (1991)
16. Okada, Y., Tomioka, K. and Chiba, Y.: *J. Insect Physiol.*, 37, 585-590 (1991)
17. Tomioka, K. and Chiba, Y.: *J. Comp. Physiol. A*, 171, 1-7 (1992)
18. Tomioka, K.: *J. Comp. Physiol. A*, (in press)
19. Tomioka, K., Seto, N., Okada, S., Terada, T. and Chiba, Y.: *Comp. Biochem. Physiol.*, (in press)
20. Tomioka, K., Ikeda, M., Nagao, T. and Tamotsu, S.: *Naturwissenschaften*, (in press)

鳥類における生物時計の仕組み

海老原史樹文

(名古屋大学 農学部 資源生物環境学科 動物機能制御学)

Mechanisms of avian biological clock.

Shizufumi Ebihara

(Dep. Animal Physiology, School of Agriculture, Nagoya University,
Nagoya 464-01)

生物は1日の環境条件の時間的変化に適応するために、内因性の計時機構を備えている。この機構に基づいて発現するリズムは、光や温度変化などの外部条件が一定の下でも周期が約1日を示す固有のリズムを持続することから概日リズムと呼ばれている。概日リズムは人間はもとより、下等な動植物にまで広く認められ、そのリズムの発振源としての生物時計がそれぞれの生物に存在している。ここでは、鳥類、特にハトにおける生物時計の仕組みについて、我々の研究を中心に述べる。

(1) 松果体及び網膜の役割 (Ebihara et al., 1984 ; Ebihara et al., 1987)

松果体の、概日リズム制御に果たす役割は、鳥の種によって異なっている。すなわち、スズメや文鳥では松果体除去によって恒常条件下で行動リズムが消失するが、ハトやムクドリなどではリズムが乱れるものの消失することはない。また、ウズラやニワトリでは松果体を除去してもリズムに何の変化も生じない。松果体除去によって生じるこのような種差は、網膜の役割を考慮することによって説明することができる。例えば、ハトでは松果体や網膜の単独除去では、恒常条件下の行動リズムは消失しないが、両方を除去することによって、リズムを消失させることができる。また、ウズラでは、網膜除去によってリズムが消失する。このことは、鳥の種によって概日リズム制御における松果体と網膜の重要性が異なっていることを示している。

(2) メラトニンの役割 (Oshima et al., 1987 ; Yamada et al., 1988 ; Oshima et al., 1989)

鳥類の松果体や網膜ではメラトニンが合成されており、その合成には概日リズムが認められている。そこで、血漿メラトニンリズムと行動リズムとの関係について次のような実験条件を設けて検討した。【a. 松果体除去 b. 網膜除去 c. 松果体及び網膜除去 d. 恒常明条件 e. 高照度恒常明条件】 その結果、行動リズムが消失する場合は常にメラトニンリズムが消失し、また、行動リズムが継続する場合にはメラトニンリズムも継続していることが明らかとなった。

そこで、次に、メラトニンを投与した時に行動リズムがどのように変化するかについて検討した。その結果、メラトニンの投与によって行動リズムが消失したハトにリズムを回復させることができた。

以上のことから、ハトの概日リズムの制御には、松果体や網膜で合成されるメラトニンが重要であることが明らかになった。

(3) 視床下部オシレーターの役割 (Ebihara & Kawamura, 1981 ; Ebihara et al., 1987)

松果体と網膜の両方を除去したハトは、恒常条件下ではリズムを消失するが明暗サイクルに対しては、同調することができる。このことは、松果体や網膜以外にも光に対して反応する別のオシレーターが存在することを示している。鳥類にも哺乳類の生物時計である視交叉上核に相当する神経核が視床下部に存在することが知られている。そこで、ハトや文鳥を用いてその神経核を破壊した時に生じる行動リズムへの影響について検討した。その結果、視床下部破壊によって行動リズムが消失することがわかった。

(4) 松果体、網膜及び視床下部オシレーターの相互作用 (Hasegawa & Ebihara, 1992)

以上の結果から、ハトの概日リズムは複数のオシレーターによって制御されており、それぞれのオシレーターが互いに相互作用し合い、安定したリズムを発現しているものと考えられた。そこで、これらのオシレーターがどのような相互作用をもってリズムを制御しているかを検討するためにマイクロダイアリス法を用いて、松果体からメラトニンリズムを測定する方法を確立した。この方法を用いた実験について、特に、網膜と松果体との関係を調べたところ、網膜から入力した光情報は松果体メラトニン合成の光による制御に重要ではなく、網膜外光受容器からの光入力によってその合成が制御されていることがわかった。

文 献

1. Ebihara, S. and Kawamura, H. : *J. Comp. Physiol.*, 141, 207-214 (1981)
2. Ebihara, S., Uchiyama, K. and Oshima, I. : *J. Comp. Physiol.*, 154, 59-69 (1984)
3. Oshima, I., Yamada, H., Sato, K. and Ebihara, S. : *Gen. Comp. Endocrinol.*, 67, 409-414 (1987)
4. Ebihara, S., Oshima, I., Yamada, H., Goto, M. and Sato, K. : *In: Comp. Aspects Circadian Clocks (Hiroshige, T. and Honma, K. eds.)*, 84-94, Hokkaido University Press, Sapporo (1987)
5. Yamada, H., Oshima, I., Sato, K. and Ebihara, S. : *J. Comp. Physiol.*, 163, 459-463 (1988)
6. Oshima, I., Yamada, H., Goto, M., Sato, K. and Ebihara, S. : *J. Comp. Physiol.*, 166, 217-226 (1989)
7. Hasegawa, M. and Ebihara, S. : *Neurosci. Lett.*, 148, 89-92 (1992)

視交叉上核にある生物時計

井上慎一

(研究協力者：竹内潤一、篠原一之、雷永恵子、福原千秋)

(三菱化成生命科学研究所)

A biological clock localized in the suprachiasmatic nucleus in mammals

Shin-ichi T. Inouye

(Junichi Takeuchi, Kazuyuki Shinohara, Keiko Tominaga & Chiaki Fukuhara)

(Mitsubishi Kasei Institute of Life Sciences, 11, Minamiooya, Machida-shi, Tokyo 194)

<はじめに>

人間を含めた哺乳動物の生物時計は脳の視床下部視交叉上核にある。この第三脳室の両側にある小さな神経核で約一日周期のリズムが作られ、外界の光を受けて、その位相が調節されている。

サーカディアンリズムの衰退も実は老化に伴って起こる行動上の著しい変化の1つである。年を経るに従って、目ざめが早くなる現象は中年以上の人ならば誰も気のつくことであるし、夜の睡眠の質が低下し、昼の覚醒の程度も次第に悪くなる。もっと老化が進むと夜間徘徊といった症状があらわれる。運動や記憶といった機能の他にサーカディアンリズムも明らかに老化する。

さて、哺乳動物のサーカディアンリズムはどんな機構に基づいて作られ制御されているのだろうか。我々は実験動物であるラットを使ってこのメカニズムを研究してきた。

1. 行動のリズム

ラットは夜行性の動物であるから、夜間に活動、摂食し昼間は大部分眠って過している。ところがこの日内変化は実験室の中で暗黒条件で飼っておいたラットでも観察される。ただしその位相は次第に少しずつずれていく。これはラットの生体内に外界の環境には必ずしも依存しない一日周期の振動体があってそれが行動のリズムを駆動していることとこの振動体の周期は24時間とは30分程度違っていることを示している。このラットを明暗環境下に移すとリズムは正確に24時間になる。これは光の正確な周期性にこの生体内の振動体が合わせられることを示している。

2. 視交叉上核の振動体

ラットの行動に見られるリズムを駆動している振動体は視床下部視交叉上核にある。この事実は生体内の様々な器官を破壊して行動リズムを観察した実験から明らかされてきた。リズムは麻酔しても電気ショックを加えても、肝臓、副腎、腎臓などの臓器を摘出して、あまり大きな影響を受けなかったが、脳の視床下部基底部分を破壊したときにはリズムが消失してしまった。この

核を破壊された動物は睡眠-覚醒リズムをはじめあらゆるサーカディアンリズムが消失する。松果体のメラトニン活性のリズムも消失するので松果体のリズムもまた視交叉上核の支配下にある。

視交叉上核の振動体はこの核を構成する神経細胞の電気活動に著しい昼夜変動をもたらしている。ラットは夜行性でありながら視交叉上核の電気活動は昼間の方が夜間より10倍も高い。その他の代謝活動にも生理活性物質の量にも大きな日周変動があることが知られている。しかも視交叉上核の活動の振動は脳の中においたまま入出力連絡を断ったアイランドの中でも、生体外に取出した培養した組織でも維持された。更には一旦視交叉上核を破壊してリズムを失ったラットに生まれたばかりの別のラットの視交叉上核組織を移植するとそのリズムが移されてラットの行動にサーカディアンリズムが戻ってくる。これは視交叉上核が特殊に分化したサーカディアンリズム生成機構をこの核内に持っていることを証明している。

3. 視交叉上核のリズム生成機構

なぜ、どのような仕組みで視交叉上核が一日周期で振動しているのか、これはとても興味深い問題だがまだ解明されていない。視交叉上核にはペプチドを大量に合成している神経細胞が密集している。我々はこれを手掛りにしてリズム生成機構を探ろうとしている。ペプチドの分布から見ると視交叉上核には2つの内部構造がある。1つは背内側部でここにはバソプレシン(AVP)とノマトスタチン(SS)産生細胞が存在し、外部からの入力線維は投射していない。もう1つは腹外側部でここには血管収縮性小腸ペプチド(VIP)やガストリン放出ペプチド(GRP)の産生細胞が存在する。腹外側部には脳の他の場所からいくつかの神経線維が投射している。そのため神経終末にはセロトニン、NPYなどが多く見られる。視交叉上核の組織を脳の断片からパンチする方法で集めこの中に含まれるペプチドの量を酵素抗体法で定量すると二つの内部構造のどちらかに存在するかによってペプチドの日周変動のパターンが違っていることがわかった。AVPとSSは外界の明暗条件には関係なく昼間一回高まりそれ以外の時間は低値に滞まっている内因性のサーカディアンリズムを示したが、一方腹外側部のVIPとGRPは光に、曝されたときだけ減少、あるいは増加する。したがって恒暗条件ではほとんど何も変化しなかった。このような部分構造による違いは細胞の電気あるいは代謝活動がどこでも一様に昼間高まっていることと対照をなしている。

4. mRNA のリズム

この結果からリズム生成機構は少なくとも直接的には背内側部のペプチドを制御していることが考えられるのでそのペプチドのリズムの由来を考えるために、次にmRNAの量をノーザン解析した。その結果SS mRNA量も恒暗条件下で変動していることが明らかにされた。その位相はSSペプチドより2、3時間前進していた。

5. 光に対する同調機構

視交叉上核に何らかの情報を伝えるため外から運ばれてくるセロトニンとNPYはまた別の特徴を持っていた。これらは明暗にも反応するし、恒暗条件でもしっかりしたサーカディアンリズムを示していた。この結果はセロトニン線維の細胞体がある縫線核もNPYの細胞体がある外側膝状体も視交叉上核からの影響を受けてリズムを示すと同時に光の直接の影響もうけていると解釈することができる。

<おわりに>

リズムが視交叉上核に由来していることは確立したように見えるが、その中でのリズム生成機構は未だ研究の途中である。老化の進行がもしリズムの衰退を伴っているのであれば、逆にリズムを強化することで老化の進行をくい止めることができるだろうか。若いラットの視交叉上核を移植された為ハムスターがよりはっきりしたリズムを示すようになるという報告もある。

文献

1. 井上慎一、篠原一之、富永恵子、福原千秋、徳増亜古
生体の科学、42、589-595。(1991)

哺乳類における *per repeat* 遺伝子のリズム

石田 直理雄

通商産業省工業技術院 生命工学工業技術研究所

Rhythmic expression of *per repeat* sequence in mammals.

Norio Ishida

(National Institute of Bioscience and Human-Technology, AIST, MITI,
1-1-3 Higashi, Tsukuba Science City. Ibaraki.)

<はじめに>

ショウジョウバエの生物時計遺伝子 *period* の中には, Gly-Thrからなる繰り返し配列が存在する. この繰り返し配列 (*per repeat* 配列) と相同性を有する14種のDNA配列を齧歯類からクローン化した事を既に報告してきた¹⁾²⁾. これら *per repeat* 配列が, 哺乳類においても生物時計機能に関わる分子であるかどうかを知るために, ラット脳内における *per repeat* 配列の時間的・空間的発現パターンを検討した.

<方法>

ノーザンブロット法; Light : Dark = 12 時間 : 12 時間で14日間飼育慣らしたラットを継時的に開頭し, 全脳を摘出した. この脳組織をGTC法を用い crude RNAを得, さらにこの全画分をオリゴd(t)セルロースカラムにより精製し, poly(A)⁺RNAとした. poly(A)⁺RNAをThomasらの方法によりグリオキサール処理して, 電気泳動を行い, pp2.5遺伝子(10種の *per repeat* 配列の内最長の2.3kbのオープン・リーディング・フレームを持つもの)をプローブとしてハイブリダイズした³⁾⁴⁾.

In situ ハイブリダイゼーション法; ラットをエーテル麻酔し, 4%パラホルムアルデヒドで灌流固定を行い, 脳組織を取り出し, パラフィンに包埋した. 5 μ m厚の組織切片を作製し, ポリリジン処理スライドガラス上に貼付した. センスとアンチセンスのリボプローブをBlue scriptベクターから³²S-UTPラベルで調整し, ハイブリダイゼーションを行った.

<結果>

ノーザン・ブロット法により, *per repeat* 配列がラットとマウスの脳内で 5.0kb と

6. 3kbの転写産物として発現している事が明かとなった。

次に *per repeat* 配列のラット脳内における発現部位を特定する目的で *in situ* ハイブリダイゼーション法を行った。この結果、*per repeat*配列は、松果体、線状体、プローカ対角対、海馬、視交叉上核で発現していた。しかしながら、日内変動は、哺乳類生物時計の中核と考えられている視交叉上核においてのみ、昼間に高く夜間に低い発現が認められた¹¹⁾。さらにポジティブシグナルは、グリア細胞ではなく神経細胞に特定される事も明かとなった。

これらの結果にもとずいて、サブトラクション法によりラット脳から単離した新しい *per repeat* cDNA RB15、マウス脾臓から単離したcDNA sp41についても哺乳類生物時計機構との関連について考察する。

文 献

1. Ishida, N., Nishimatsu, S., Saida, K. and Mitsui, Y. : *Nucleic Acids Res.*, 16(1988) 3581.
2. Nishimatsu, S., Murakami, K., Mitsui, Y. and Ishida, N. : *Nucleic Acids Res.*, 16(1988)11831-11832.
3. Shin, H. S., Bargiello, T. A., Clark, B. T., Jackson, F. R. and Young, M. W. : *Nature*, 317(1985)445-448.
4. Ishida, N., Noji, S., Ono, K., Koyama, E., Nohno, T., Taniguchi, S., Tokunaga, A., Fujii, T. and Mitsui, Y. : *Neuroscience letters*, 122(1991)113-116.
5. Hall, J. : *Current Biology*, 1(1991)89-90.

ラット概日リズムの加齢による変化と視交叉上核の役割

山岡 貞夫

(研究協力者： 渡辺和人， 鯉淵典之， 酒井美加子)

(獨協医科大学第一生理学教室)

The ageing effect of the circadian rhythm in the rat and the role of suprachiasmatic nucleus

Sadao YAMAOKA

(Kazuto WATANABE, Noriyuki KOIBUCHI, Mikako SAKAI)

(Department of Physiology, Dokkyo University, School of Medicine)

<はじめに>

加齢によって概日リズムの周期の短縮が起こったり、体温と睡眠のリズムの位相が解離して内的脱同調が起こり易くなったり、種々の概日リズムの振幅が減少したりすることが人で観察されている。種々の実験動物についても概日リズムが加齢によって変動することの多くの報告がある。しかし、その多くが現象を示しているに過ぎず、変動の機序について論及した報告は少ない。今回は睡眠・覚醒のリズムや行動のリズムをパラメータとして雌動物と雄動物の加齢による変化を比較しながら、その機構について言及する。

方法

動物は Sprague Dawley 系雌雄ラットを使用した。対照には3~5ヵ月齢、加齢群は雌の場合加齢による性周期変化より連続発情、偽妊娠、連続非発情に、雄は12~18ヵ月齢と24ヵ月齢以上とに分けた。飼育環境は室温 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度45~55%、14時間明、10時間暗の照明(明：5:00~19:00)とした。脳波記録には頭骨にビス電極、頸部に筋電図電極をネンブタール麻酔下に予め挿入し、2週間以上経過後実験に供した。前頭皮質・辺縁皮質・頸部筋電図より睡眠段階を徐波睡眠(SWS)と逆説睡眠(PS)に分類した。行動記録は飲水行動または Area Sensor によって行った。記録期間中に4~7日間の恒暗状態とし、明暗環境との比較を行った。夫々の時系列データは パワースペクトラム、最小二乗スペクトラム法により分析した。なお、雌については睡眠・覚醒リズムが加齢動物と同じ様な変動を示

すモデル動物の作製を試みた。更に、視交叉上核の c-fos 発現は明暗による差があるだけでなく、眼球摘出ラットでも概日性変化が見られ c-fos の概日リズムへの関与を報告しているので明暗による Fos 発現の変動に対する加齢の影響も検討した。

結果

- 1). 3~5ヵ月齢ラット：雌雄とも SWS, PS 共明暗環境下では明時に高く暗時に低い日内変動を示し、行動量は逆の変動を示した。恒暗下では SWS はリズムの振幅は減少したが、周期には明暗下と有意な差は認められなかったが、PS と行動量のリズムは振幅が有意に増加した。雌ラットでは性周期性変動が見られ発情前期夜間の PS 発現量が減少した。
- 2). 12~18ヵ月齢雄ラット：明暗環境下では3~5ヵ月齢と有意な差は全く見られなかったが、恒暗環境下では SWS リズムの振幅と周期の減少が認められたが PS と行動量のリズムは振幅の増大の見られる個体と有意差のない個体と観察された。
- 3). 加齢連続発情雌ラット：明暗下の SWSのリズムは 1)の場合と差は認められなかったが、PS のリズムは概日リズムを示す個体と超日リズムを示す個体とが観察された。恒暗下ではSWS リズムの有意な振幅の減少を認めたが、PS リズムは超日リズムを示した個体も概日性を示し振幅も有意に増大した。
- 4). 加齢偽妊娠雌ラット：明暗環境下の SWS リズムは概日性を示す個体と周期の短縮した個体が見られ PS リズムは多くが1 2時間に近い周期を示した。恒暗環境下ではこの傾向が一層強くなったが振幅の有意な差は認められなかった。
- 5). 24ヵ月齢以上：雌ラットは連続非発情を示す個体が現れるようになる。SWS PS 行動いずれのリズムも明暗環境下でも日内変動が不明となり超日性リズムを示す個体が雌では多く観察されるが、雄では大半は依然として明瞭な日内変動を示す。しかし恒暗環境下では SWS PS 行動量すべてのリズム振幅の減少が認められ、超日性リズムを示す個体も多く観察されるようになった。
- 6). 雌ラットの加齢による睡眠リズムの変動は性周期性変動と連動して変化することより、脳の局所破壊や線維連絡切断或は薬理的処置により同様の性周期性変動を示すモデル動物を作製し比較した。その結果、視索前野破壊による偽妊娠ラットは加齢偽妊娠ラットの睡眠リズムとよく一致し、視交叉上核内へのPCPA(parachlorophenylalanine)投与による一過性の連続発情ラットは超日性 PS リズムを示した。6-OHDA 投与ラットおよび後方より視床下部への入力切断は性周期は変化しなかったが、睡眠リズムは連続発情ラットと極めてよく似た睡眠リズムを示した。視交叉上核を含む視床下部広範囲の破壊による連続非発情ラットは加齢非発情ラットの睡眠リズムとよく一致した。
- 7). 加齢により連続非発情となり、睡眠リズムが超日性となった雌ラットの第3脳室に新生仔ラットの視交叉上核を移植すると、性周期は戻らなかったが移植後2週後より睡眠リズムは概日性を示すようになり。恒暗暴露によるリズム変動も 1).と全く差は認められなかった。

- 8). 視交叉上核の c-fos の発現は 14 カ月齢の雄ラットでも若年ラットと有意な差は認められなかった。

考察

以上より、雌ラットは性周期変動と連動して睡眠リズムにも変化が現れ、その変化は脳内のアミン量の変動と関係があることが推察された。雌に比して雄では加齢の影響を受け難く24ヵ月以上にならないと明暗環境下で超日性を示すことはまず認められない。しかし恒暗環境下で観察すると徐々に概日性が失われ超日性となる。また SWS PS 行動量のリズムの間に加齢による変動に差が認められことや新生仔視交叉上核の第3脳室への移植が失われた概日リズムを完全に回復させることより、加齢は視交叉上核内の複数のリズムオシレータ間の脱同調を起こすのではないかと推測する。更に次第に明暗環境下でも概日性が失われる様になることは、外界からの同調機転にも障害が起こるのであろう。現在明暗同調機構の視交叉上核における機序を探るため視交叉上核における c-fos 発現の加齢による変動を検討中であるが14カ月齢迄には有意な変化は現れていない。

文献

1. Bowersox,S.S., Baker,T.I. and Dement,W.C. *Electroenceph. clin. Neurophysiol.* 58:240-252 (1984)
2. Ingram,D.K., London,E.D. and Reynolds,M.A. *Neurobiol. Aging* 3:37-42 (1982)
3. Koibuchi,N., Sakai,M., Watanabe,K. and Yamaoka,S. *NeuroReport* 3:501-504 (1992)
4. Monk,T.H. *Clin. Geriatr. Med.* 5:331-346 (1989)
5. Rosenberg,R.S., Zepeline,H. and Rechtschaffen,A. *J.Gerontol.* 34:525-532 (1979)
6. Wever R.A. *"The Circadian System of Man."* Springer-Verlag, New York (1979)
7. Yamaoka,S. and Yoshida,N. *J. Interdiscipl. Cycle Res.* 19:241-256 (1988)
8. Yamaoka,S. In *"Experimental and Clinical Interventions in Aging"* edited by R.F. Waker and R.L. Cooper, Marcel Dekker, New York 369-395 (1983)