

脳高次機能が日周リズムをもつ分子メカニズムの解明

東京大学大学院 理学系研究科 生物化学専攻
清水 貴美子

1. 背景

地球上に生息する生物は、地球の自転によって生まれる光周期の環境の中で、それぞれの生存に適した形の生活体系を作り上げてきた。地球上のほぼすべての生物が約一日周期で時を刻む体内時計をもつことは、生物の進化の歴史の中で地球環境に適応するために獲得した産物であろう。視交叉上核 (SCN, Suprachiasmatic Nucleus) で生み出される体内時計の位相は、光などの外部環境に同調してちょうど一日周期のリズムを刻み、時刻情報を他の脳領域や末梢組織に伝える。SCN からの指令を受けた脳内の各領域や末梢組織は、それぞれの領域の役割に応じた位相でリズムを刻む。記憶・学習の効率が一日の中で変化したり、一日のなかで気分の波を感じる事があるが、これらの現象も SCN からのシグナルによる現象である可能性が高い。環境のリズムが脳機能に重要である事を示す身近な例として、シフトワークやジェットラグにより気分障害が引き起こされること¹、季節性の鬱病に光治療が効果的であること²などが報告されている。また、時計分子の変異マウスや SCN 破壊マウスでは躁状態と極めて似た表現型を示すことを考えると^{3,4} 時計システムは単に脳高次機能にリズムを与えるだけでなく、脳高次機能を支える極めて重要な歯車の一部を担っており、この重要な歯車が壊れる事で脳高次機能の破綻が生じると考えることができる。鬱病などの感情障害はしばしば生体リズムの異常を伴い、逆にリズム障害の患者では鬱病などの発症頻度が高い。これらの事実は、時計と脳高次機能との繋がりの深さを映し出しているのかもしれない。しかしながら現在、一日周期のリズム性がどのように記憶や情動に影響を与えるのか、その分子基盤は謎に包まれている。記憶に関与する海馬では、ERK や CREB などの活性が長期記憶形成時に変化し、また情動をコントロールする扁桃体においては、ERK、CREB や GSK3- β 、 β -catenin が関わる経路が情動の制御に関与している。興味深いことに、これら分子の活性は SCN において日内変動している。このことから、海馬時計システムや扁桃体時計システムにおいても、ERK や CREB、GSK3- β や β -catenin の活性が日内変動して記憶や情動を調節している可能性が考えられる。本研究計画では、情動に日周変動がある事を明示し、その変動を作り出す分子メカニズムを明らかにする。情動制御機構が概日時計機構の制御下にある事とその分子メカニズムを示す事により、脳高次機能が日周リズムをもつ意味に迫る。

2. 方法

<情動の日周変動> 一日の中の情動の変化を検出するための光条件として、外部の光環境に同調した明暗条件下と、内在性リズムを検出するための一定光条件の両条件をもちいた。一定光条件の行動測定で用いる光は、マウスの視覚が機能しさらに時計機能には影響を与えないと考えられる光強度 4 Lx に設定した。行動測定の24 時間以上前からマウスを 4 Lx で飼育し、同条件で行動実験を行うシステムを作成した。情動を検出する行動測定法として、不安様行動を検出するための Elevated plus maze, Open field activity, 鬱様行動を検出するための Tail suspension test, Forced swim test を行った。

<日周変動の分子メカニズム> 情動に関与する脳部位として、扁桃体を始め、海馬、前頭前野皮質、大脳基底部等があげられる。その中でも扁桃体はすべての感覚情報の入力があり、経験と情動が統合される場所であることから、特に扁桃体に注目する。さらに扁桃体のなかでもいくつかの神経核に分けられその機能も異なることから、情動変化に重要である BLA (Baso-Lateral Nucleus) および情動のアウトプットに重要である CeA (Central Nucleus) を別々に単離し、GSK3- β 活性の概日変動の検討をおこなった。さらに、情動変化に伴う GSK3- β 活性の変化を時刻ごとに検討するため、拘束ストレスをかけた後の GSK3- β の活性変化を検出した。

3. 結果

<情動の日周変動> 明暗条件下と一定光条件下との両条件で情動を表す行動テストを行ったところ、すべての行動測定において概日変動が見られた。また、明暗条件と一定光との間ではほぼ同様の情動変動が見られた。したがって、情動は内在性の時計によってコントロールされ日周変動をしていると考えられる。しかしながら、各行動測定結果を個々に解析すると、不安を表すと考えられる行動同士でピークの時刻がずれる等、不安や鬱の変動の位相を特定する事はできなかった。Elevated plus maze では明期および主観的明期（一定光）の前半に open arm に進入する回数が多く、Open field test では、暗期および主観的暗期（一定光）の前半にfieldの中央にいる時間が長い。Elevated plus maze の open arm の滞在時間や Open field test の中央にいる時間は、警戒心や不安が低下し好奇心が上回っている事を示していると解釈できるが、これら2つの行動測定において変動の位相は一致しない。また、Tail suspension test では、暗期および主観的暗期の前半に無動時間が長く、鬱の指標となる別の行動測定であるForced swim test では、明期および主観的明期に無動時間が長い。何れのテストも無動時間の長さは鬱傾向の強さと相関すると考えられているが、2つの行動測定において変動の位相は一致しなかった。

<日周変動の分子メカニズム> 情動調節の中枢である扁桃体において、情動の概日変動の分子メカニズムを探るために、情動調節に関わる分子 GSK3- β の活性が扁桃体の BLA および CeA でどのように変動しているのかを検討した。BLA では GSK3- β のリン酸化が主観的暗期の前半にピークをもつ概日変動を、CeA では主観的明期の前半にピークをもつ概日変動をしめした。これまでの先行知見から時計蛋白質 Per2 が BLA と CeA においてお互いに異なる位相で日周変動する事がしめされている⁵。BLA と CeA で GSK3- β の日周変動の位相が異なるという結果は、Per2 蛋白質の位相が BLA と CeA で逆になるという結果と矛盾していない。また、拘束ストレスによる GSK3- β のリン酸化の変化は BLA ではどの時刻においても亢進し、CeA ではどの時刻にも減少した。ただし、ストレスによるGSK3- β のリン酸化の変化量は、時刻により変動していなかった。

4. 考察

本実験において、情動を表す行動に概日変動がある事を確認した。しかし、情動を表すとされる行動実験の中でも実験手法によって位相が異なり、不安や鬱の変動の位相は決定できていない。実験手法により位相が異なる理由には2つの可能性が考えられる。一つめは、鬱や不安の指標とされる行動実験系のなかでも、実験種の特性により異なる情動成分が表出する可能性である。さらに異なる実験手法を組み合わせる事で、特定の情動とその変動の特性を示す事が可能であると考えられる。また、もう一つの可能性として、外界の環境によるリセットが入らない条件下ではマウス個体それぞれの時計がずれている可能性が考えられ、時計位相のずれが行動テストの結果に反映されていると考えることができる。各個体の概日リズムを検出しながら行動実験を行う等、実験系の改良を行うことで、鬱や不安のピーク時間を正確に示す予定である。今後は、時計遺伝子の扁桃体特異的ノックダウンマウスを作成して情動の変動を観察することにより、扁桃体時計と情動変動との繋がりを明らかにすること、さらに、扁桃体における GSK3- β のノックダウンや過剰発現により情動調節システムと時計システムの間をつなぐ分子メカニズムの解明に向けて研究を進める。

5. 参考文献

1. Shift work and health. Scott, A. J., Prim. Care 27, 1057 (2000)
2. Seasonal affective disorder. A description of the syndrome and preliminary findings with light therapy. Rosenthal NE *et al.* Arch Gen Psychiatry. 41, 72 (1984)
3. Effect of lesioning the suprachiasmatic nuclei on behavioral despair in rats. Tetaroglu *et al.* Brain Res.1001, 118 (2004)
4. Mania-like behavior induced by disruption of CLOCK. Roybal *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A. 104, 6406 (2007)
5. The central and basolateral nuclei of the amygdala exhibit opposite diurnal rhythms of expression of the clock protein Period2. Lamont E.W., Proc Natl Acad Sci U S A. 102, 4180 (2005)