

哺乳類体内時計の脳内制御機構に関する研究

I 試験研究の全体計画

1. 研究の趣旨

生体時計はほとんどの生命体に備わった基本的機構にもかかわらず、その解明が著しく遅れており、現代の生命科学に残された数少ないフロンティアの一つである。最近の本邦における時計機構の分子遺伝学・分子生物学のパイオニアの開発は、従来からの豊富なリズム生理の研究成果と人材とを結びつけることにより、本領域は格段の発展が期待できる状況となってきた。本研究は、以下の項目に代表される時間生物学の先導的意義を持つ課題を遂行する事により、他の研究領域に大きな波及効果をもたらすとともに、社会的諸課題の解決に貢献する事を目的とする。

1) 生体リズムの発振メカニズムの解明

サーカディアン振動は一種の永久運動であり、生命の大いなる不思議の一つである。この振動は振り子の役割をする時計振動遺伝子が振動遺伝子自身を産生する過程を抑制する抑制因子として働くネガティブ・フィードバック機構が基本である。このフィードバック機構は物理学でいうリミットサイクルを形成するが、その構成因子である転写促進因子、転写抑制因子、抑制遅延因子を明らかにする。

2) フォトンイメージングによる単一細胞レベルでのリズムモニター系の開発

遺伝子組換えの技術によって、遺伝子発現を生きのまま観察する事が可能になりつつある。しかし、現在の技術では比較的大きな組織からしか生体リズムの遺伝子発現は検出できない。しかし最近、細胞一個一個が生体時計の最小単位となって働く事を示唆するデータが散見されるようになった。従って、今回、超高感度のフォトンイメージング検出装置を開発し、遺伝子発現をリアルタイムで細胞レベルで経時的に測定する。このシステム開発は、生体リズムの研究に画期的なだけでなく、各種遺伝子の細胞内での発現を生きのまま見られるシステムとして、生命科学全般にわたる広い応用が考えられる。

3) 時間軸での遺伝子マッピングによる時計シグナル伝達機構の解析

体内時計の情報は24時間という長周期で、しかもきわめて正確で、時計遺伝子の振動情報を伝える新しい細胞伝達系が関与している事が考えられる。今回、微量組織で、数千個の遺伝子発現解析が可能な遺伝子アッセイ法を確立し、時計により制御される全遺伝子の時間階層性を明らかにする。

4) 時計発振の環境周期への同調機構および時計情報の出

力機構に関する研究

体内時計の重要な性質に、環境周期との同調の機構がある。今回、環境周期への光同調、細胞時計相互のリズム同期、時計情報の出力機構を、分子レベルで解明する。

5) 哺乳類における全身の時計の時刻の測定と人工生物時計（バイオクロック）の開発

哺乳類においては、時計の最高位中枢である視交叉上核から発振された時間情報は、他の脳部位にある時計に伝わり、さらに末梢臓器の時計を調律する。遺伝子発現の検索により、全身各組織の時刻を知り、哺乳類階層の時計機構が実際の様に働いているのかを探る。また、通常はリズムのない細胞に、時計遺伝子発振機構を導入する事により、数々の周期を持つ人工的な生物時計を作成する。これにより、将来のヒトにおける臨床応用を見据えた、基礎データ作りをする。

2. 研究内容及び目標

1. 時計遺伝子の発現制御に関する研究

サーカディアン振動は遺伝子レベルで発振される永久運動である。この地球の生命体に特異的な、長周期のしかも極めて正確な振動はリミットサイクルを形成し、振り子の役割をする時計振動遺伝子が振動遺伝子自身を産生する過程を抑制する抑制因子として働くネガティブ・フィードバック機構によって成り立っている。この哺乳類におけるフィードバック機構の分子機構を明らかにする。

(1) 時計遺伝子の転写制御に関する研究（神戸大学医学部）

振動を司る時計遺伝子の制御部位は、プロモーターにある。この部位にある振動の発生・増幅など、他の遺伝子にはない構造を明らかにする。具体的には、

① 哺乳類時計遺伝子 mPer 遺伝子群の転写制御に関する研究

② リズム発振の新規ポジティブフィードバックシステムに関する研究

③ 哺乳類時計遺伝子導入トランスジェニックショウジョウバエを用いた複数の振動体遺伝子の形成するリミットサイクル間の同期に関する研究

④ mPer プロモーターに微弱発光レポーター遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウス・細胞系によるリズムアッセイ系を確立する研究

⑤ 時計遺伝子ノックアウト細胞を用いた時計発振機構の解析

⑥ リズム同調には、環境因子が働く時間と働かない時間がある。これを「ゲーティング」と言うが、これを転写レ

ベルで説明する。

(2) 時間軸での遺伝子マッピングによる時計シグナル伝達機構の解析 (大阪大学細胞工学センター)

mPER が時計の針の役割をしているなら、その情報はどのように伝達されているのであろうか? そのため、我々は、mPer 遺伝子を強制発現させた後、急速に誘導される遺伝子をスクリーニングし、その発現遺伝子を検索する。そのため、微量組織で数千個の遺伝子発現解析が可能な、微量サンプル利用大規模遺伝子解析システムを確立し、リズム研究に応用する。具体的には、

- ① リズムセンター視交叉上核での時間変動遺伝子のスクリーニング
 - ② テトラサイクリン投与で発現する時計遺伝子 (Tet-on-mPer トランスジェニック) 細胞系を用いた時計シグナル伝達遺伝子の細胞系でのスクリーニング
 - ③ Tet-on-mPer トランスジェニックマウス系を用いた視交叉上核内での時計シグナル伝達遺伝子のスクリーニング
- ### (3) 時計遺伝子の核移行と時計フィードバックループに関する研究 (神戸大学医学部)

時計遺伝子が振動するには、抑制遅延機構が存在する必要がある。事実、ショウジョウバエでは、核移行、リン酸化による PER 蛋白修飾が抑制遅延機構に関与していると言われている。最近我々は、哺乳類の核移行がショウジョウバエと異なるファクターによって決定されることを細胞系を用いて示した。今回、視交叉上核での蛋白の核移行期の決定と、細胞系を用いてさらに詳細な核移行メカニズムを決定する。

- ① 哺乳類における時計遺伝子の核内移行に関する研究
 - ② 時計遺伝子のリン酸化の研究
- ### (4) 時計遺伝子間の分子結合に関する研究 (矢内原研究所)

時計遺伝子の機能発現には時計遺伝子産物間の結合が重要である。今回、これら時計蛋白の機能ドメインに対するモノクローナルおよびポリクローナル中和抗体を作成し、機能を検討する。

(5) 時計遺伝子のトランスジェニックマウス・ノックアウトマウスの行動解析に関する研究 (山口大学理学部)

時計遺伝子トランスジェニックマウス・ノックアウトマウスの作成と行動解析を行う。mPer 遺伝子群が時計発振細胞で過剰に発現すると時が動くと考えられるが、この事を行動レベルで検証する。

(6) 高感度フォトンクス・デヴァイスを利用した細胞レベルでのリズムモニター系の開発に関する研究: フォトンイメージングによる単一細胞でのリズムモニター (神戸大学医学部)

プロモーター・luciferase 時間遺伝子発現を単細胞レベルで経時的にとらえ、薬物の作用などをリアルタイムで見ることができる系を開発。また、空間分解能で優れた ICCD カメラと顕微鏡像を併用する事により、細胞質-核レベル

での移動を検出する装置を開発する。光情報受容から時計遺伝子に至るまでの時計シグナル解析の武器となる。

2. 時計発振の環境周期への同調機構に関する研究

(1) 光情報受容から時計遺伝子に至る経路に関する研究 (早稲田大学人間科学部)

体内時計の重要な性質に、環境周期との同調の機構がある。言うまでもなく、環境周期の中で最も重要なものは明暗周期であるが、ヒトでは非光同調因子 (食餌・睡眠など) も重要であるとされる。今回、これらの同調因子の情報が、いかにして時計遺伝子の発振に結びつくかを検索する。

- ① 視交叉上核における光情報伝達から時計遺伝子発現に至る細胞内情報伝達系路に関する研究
- ② 細胞内シグナルによる時計遺伝子のリン酸化に関する研究
- ③ 従属的振動発振細胞におけるリズム発振調節機構の研究

(2) 新規光情報伝達因子に関する研究 (東北大学加齢医学研究所)

ショウジョウバエ、マウスのミュータント解析から、リズムをリセットするのに opsin 類は主要なものではないことが明らかである。最近、植物、ショウジョウバエでは、blue light (430nm) を受容して電子供与体として働く光回復酵素 photolyase の一種である Cry がリズムに関与することが昨年明らかになった。哺乳類では Cry は 2 種類知られており、Cry1 と Cry2 のダブルノックアウトマウスでリズムが全くなくなることは、Cry1, Cry2 がリズムの本体にシグナルを送っていることを示唆する。

- ① Cry1, Cry2 の時計遺伝子フィードバックループへの情報伝達の解析と結合蛋白の同定
- ② Cry ノックアウト細胞によるリズム変動の解析

3. 時計出力機構の研究

(1) 視交叉上核細胞内での時計出力機構に関する研究 (早稲田大学人間科学部)

視交叉上核のスライス、初代培養系、膜電位測定、イメージング解析、リズム行動解析などを駆使し、Per 遺伝子が視交叉上核の細胞のリズム発振、視交叉上核全体としての発振、末梢の時計の発振にどの様に働くのかを明らかにする。また、昼行性動物と夜行性動物の出力情報の差異を説明しうる機構を解明する。

- ① 時計遺伝子から情報が膜電位として伝達される仕組みの解明
 - ② 視交叉上核から他の脳部位までの出力伝達機構の解明
- ### (2) 生体内埋込みマイクロダイアリスプローブによる生体での時計出力機構に関する研究 (浜松医科大学医学部)

松果体は鳥類では時計機構が存在しているが、哺乳類ではその機構を失って、完全に視交叉上核の活動の支配下にある。しかし松果体メラトニンは視交叉上核に働き、その活動を修飾することが判明している。従って、松果体は、

末梢から中枢へのフィードバック機構に位置する器官として注目される。今回、生体におけるリズム出力マーカーとしてメラトニンを利用し解析する。そのためには、現在まで開発されなかった、長期松果体埋込みプローブを開発し、その変動を記載する。松果体における時計遺伝子のノルアドレナリン入力による発現制御も行う。

(3) 網膜培養系の時計機構に関する研究（聖マリアンナ医科大学医学部・飯郷雅之）

現在まで、網膜は、視交叉上核以外では唯一の、生体時計がある事が知られている組織である。網膜ではメラトニン産生が局所の時計とカップルして産生が調整されており、長時間の培養系でのメラトニンのリズム的な放出が確認されている。この系の他の例を見ない特徴は、光の入力から出力に至るまで全てこの培養系だけで解析可能だからである。光の波長解析、網膜内ドーパミンとメラトニンの発現変動は時計の発振機構、同調機構の解明に深い意味を持つ。

4. 生体時間とバイオクロック（人工生物時計）に関する研究（神戸大学医学部）

哺乳類においては、時計の最高位中枢である視交叉上核から発振された時間情報は、他の脳部位にある時計に伝わり、さらに末梢臓器の時計を調律する。遺伝子発現の検索により全身各組織の時刻を知り、哺乳類階層の時計機構が実際どの様に働いているのかを探る。

また、上記のリズム発振。リズム同調、リズム出力機構がわかった上で、通常はリズムのない細胞に、時計遺伝子発振機構を導入することによって人工的な生物時計を作製する。これにより、数々の周期を持つ時計を作製し、将来の時間薬理学的な治療や診療に役立つ細胞工学的な基礎を作る。

① 時計遺伝子プロモーター・生理活性物質融合遺伝子を用いた周期的生理活性物質（インシュリンなど）産生パーマネントセルラインの開発

② いろいろな周期のバイオクロックの作成

3. 年次計画

本プロジェクトでは、全く新しい情報発振系により発振され、伝達される体内時計の分子機構を解明し、従来解析が困難であった生命現象の時間軸に沿った研究分野を切り開く事を目的とする。

まず、生体リズムは時計遺伝子の発現によって引き起こされる現象であるが、この哺乳類における振動発振機構を平成11年度から13年度にかけての第一期で、分子レベルで解明する。これには、独特の転写機序、時計フィードバックシステムを分子生物学的に解明し、微量組織で数千もの遺伝子発現を検索できる新しい遺伝子マッピング法を利用した時計遺伝子によって制御される遺伝子を全てリストアップする。これら分子生物学的検索には、超高感度フォトン検出装置によるリズムモニターシステムを考案し、細胞一個レベルで時計言い電子の動態がリアルタイムで追える系を開発する。同時に、時計遺伝子のトランスジェニックマウス・ノックアウトマウスを作製し、遺伝子から行動レベルまで外挿した仕事をする。

第一期では、発振機構の解明が非常に競合の激しい分野なので、大部分の研究費を発振機構の解明に費やし、時計遺伝子によって制御される遺伝子を全てリストアップする。また、リズムの同調・出力の分子機構にも目配せしながら、研究を進める。リズム研究は優れて生理的な仕事なので、常にリズム現象をモニターできるアッセイ系の開発が大前提として求められ、この優れたシステムの開発こそが、次世代のリズム研究のヘゲモニーを握る肝要な点である。従って、生体内メラトニン分泌の長期測定系、光入力から出力までモニターできる網膜培養系もこの時期にたちあげ、第二期（平成14年・平成15年）に備える。

第二期では、上記の研究の集大成を計りながら、第一期のリズム発振・同調・出力の分子機序解明の成果を、バイオクロック（人工生物時計）の研究につき込み、将来の医学的応用の基礎データを蓄積する。

研究項目	11年度	12年度	13年度	14年度	15年度
1. 時計遺伝子の発現制御に関する研究					
(1) 哺乳類時計遺伝子の転写制御に関する研究	mPer 遺伝子群の転写制御				
	リズムのポジティブフィードバック系				
	トランスジェニックハエでの同期		ゲーティングの分子機構		
	極微弱発光リズム計測によるトランスジェニックマウス				
	時計遺伝子ノックアウト細胞				
(2) 時間軸での遺伝子マッピングによる時計シグナル伝達機構の解析	視交叉上核変動遺伝子のスクリーニング				
	時計シグナル伝達遺伝子スクリーニング				
	視交叉上核内時間伝達遺伝子				
(3) 時計遺伝子の核移行と時計フィードバックループに関する研究	時計遺伝子の核内移行				
	時計遺伝子のリン酸化				
(4) 時計遺伝子間の分子結合に関する研究	時計遺伝子間の分子結合				
(5) 時計遺伝子のノックアウトマウス・トランスジェニックマウスの行動解析に関する研究	ノックアウトマウス・トランスジェニックマウスの行動解析				
(6) 高感度フォトンクス・デバイスを利用した細胞レベルでのリズムモニター系の開発に関する研究	フォトンモニター検出装置の開発				
	極微弱発光細胞内リズム計測システムの開発				
2. 時計発振の環境周期への同調機構に関する研究					
(1) 光情報受容から時計遺伝子に至る経路に関する研究	時計細胞内情報伝達経路				
	細胞内シグナルとリン酸化				
	従属的振動発振細胞				
(2) 新規光情報伝達因子に関する研究	Cry 蛋白質の時計遺伝子フィードバックループへの情報伝達の解析				
3. 時計出力機構の研究					
(1) 視交叉上核細胞内での時計出力機構に関する研究	視交叉上核細胞内での時計出力機構に関する研究				
(2) 生体内埋込みマイクロダイアリスプロブによる生体での計出力機構に関する研究	マイクロダイアリスプロブによる松果体メラトニンのリズム				
(3) 網膜培養系の時計機構に関する研究	網膜培養系の時計機構				
4. 生体時間とバイオクロック（人工生物時計）に関する研究					
	パーマメントセルラインの開発				
	バイオクロックの作成				
所要経費（合計）	174百万円	174百万円			

4. 平成12年度における実施内容と達成目標

1. 時計遺伝子の発現制御に関する研究

(1) 時計遺伝子の転写制御に関する研究

① 哺乳類時計遺伝子の転写制御に関する研究

哺乳類の時計振動遺伝子 *mPer1* の遺伝子上流域の遺伝子解析をさらに進め、この遺伝子の発振制御コードを解明し、新規発振機構を提案する。

② リズム発振の新規ポジティブフィードバックシステムに関する研究

時計遺伝子発振はネガティブフィードバックが基本であることは言うまでもないが、強力な安定した発振するためには、ポジティブフィードバックシステムの解明が必須である。昨年度同定したポジティブ因子 *DBP* の作用機構をさらに究明する。

③ 哺乳類時計遺伝子導入トランスジェニックショウジョウバエを用いた複数の振動体遺伝子の形成するリミットサイクル間の同期に関する研究

振動体と目される *mPer1*, *mPer2*, *mPer3* 遺伝子は同一細胞に発現するが、その意義は不明である。*Per* 欠失変位ショウジョウバエへ哺乳類 *mPer* 遺伝子群を導入したトランスジェニックフライを昨年に続きさらに作製し、リズム周期の同期の機序を検索する。

④ *mPer* プロモーターに微弱発光レポーター遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウス・細胞系による超微弱発光リズムアッセイ系を確立する研究

想定される既知の転写制御因子（転写促進因子または抑制因子）が実際に働くかを、*per* プロモーター部にレポーター遺伝子（ルシフェラーゼ）を組み込んだトランスジェニックマウスを作成し、24時間のルシフェラーゼ活性リズムを新たに開発するフォトンモニターシステムにて計測する。このマウスから取った線維芽細胞の培養系、視交叉上核の培養系を昨年に引き続き作製し、24時間リズムを測定し、リズムアッセイ系を構築する。

⑤ 時計遺伝子ノックアウト細胞を用いた時計発振機構の解析

無時間セルラインである *Cry* 遺伝子ノックアウトセルラインを樹立し、時計遺伝子産物（時計蛋白）の動態を解析する。

(2) 時間軸での遺伝子マッピングによる時計シグナル伝達機構の解析

① リズムセンター視交叉上核での時間変動遺伝子のスクリーニング

昨年に引き続き、微量組織で数千個の遺伝子発現解析が可能な *cDNA-AFLP* 法を、リズムセンターである視交叉上核に適用する。これにより、時計により制御される全遺伝子をスクリーニングする。さらに、脳との比較のため、末梢組織の代表として肝臓の時間特異的発現遺伝子のスクリーニングも行う。

(3) 時計遺伝子の核移行と時計フィードバックループに関する研究

① 哺乳類における時計遺伝子の核内移行に関する研究

視交叉上核と *COS7*, *NIH3T3* 等のセルラインを用いて、標識された哺乳類の時計蛋白がどのようにして核内に至るかを、昨年に続き検索する。

② 時計遺伝子のリン酸化の研究

ショウジョウバエでは時計遺伝子 *per* のリン酸化が核移行、抑制過程、分解に関与し、時計の位相決定にきわめて重要とされる。哺乳類 *mPER1*, *mPER2*, *mPER3* のリン酸化を司る *kinase* を二次元電気泳動で検索し同定する。またリン酸化酵素の阻害剤などを用いて、薬理的にも検索する。

(4) 時計遺伝子間の分子結合に関する研究

① 時計遺伝子間の分子結合に関する研究

核移行・転写抑制・分解過程には、現在まで数個知られている時計遺伝子産物間の結合が重要である。昨年に続き、これら時計蛋白の機能ドメインに対するモノクローナルおよびポリクローナル中和抗体を作成し、蛋白間結合がどのようにして時計フィードバックループに関与するかを検索する。今年度は特に、時計発振の中心的な分子である *mPer1* の全蛋白およびペプチド抗体を作成する。

(5) 時計遺伝子のノックアウトマウス・トランスジェニックマウスに関する研究

① *mPer1*, *mPer2*, *mPer3*, *mTim* ノックアウトマウスの作成と行動解析

mPer1, *mPer2*, *mPer3*, *mTim* が時計発振細胞に過剰・不足になると時が動くと考えられるが、この事を行動レベルで検証する。このため、今年度は、様々なプロモーターに *mPer* を導入したマウスを作製する。

(6) 高感度フォトニクス・デバイスを利用した細胞レベルでのリズムモニター系の開発に関する研究：フォトンイメージングによる単一細胞でのリズムモニター

昨年度、時間遺伝子発現を単細胞レベルで経時的にとらえ、薬物の作用などをリアルタイムで見ることができ「極微弱発光2次元時空間特性計測システムによるフォトンモニター検出装置」と、微細形態が観察可能な「極微弱発光細胞内リズム計測システム」を開発した。今回この成果を、生きた動物に適応するシステムを開発し、行動における遺伝子発現をリアルタイムで検出する。

① 脳内遺伝子発現リアルタイム解析システムの開発

リアルタイムで自由に動きまわる動物の遺伝子発現を、光シグナルで置き換え、そのシグナルを、動物に埋め込んだ光ファイバーで微小半導体素子まで伝え、その情報を赤外線に変換して、ディテクターに伝える「脳内遺伝子発現リアルタイム解析システム」を開発する。

② 生体超高感度光子検出装置システムの開発

動物を丸ごと飼育し、体から発する遺伝子発現を光に変換

しカウントできる生体超高感度光子検出装置システムを開発する。この遺伝子発現をリアルタイムで見るシステムは、現在どの分野にもない。我々がしている時計遺伝子は、生理的状态で発現レベルがダイナミックに調整されているきわめて希な系である。この性質を利用して、「遺伝子から脳機能まで」に対応できる、画期的なシステムの視索を試みる。

2. 時計発振の環境周期への同調機構に関する研究

(1) 光情報受容から時計遺伝子に至る経路に関する研究

体内時計の重要な性質に、環境周期との同調の機構がある。言うまでもなく、環境周期の中で最も重要なものは明暗周期であるが、ヒトでは非光同調因子（食餌・睡眠など）も重要であるとされる。昨年に引き続き今年も、これらの同調因子の情報が、いかにして時計遺伝子の発振に結びつくかを検索する。

① 視交叉上核における光情報伝達から時計遺伝子発現に至る細胞内情報伝達系路に関する研究

視交叉上核における、光情報伝達（グルタミン酸刺激）から時計遺伝子発現に至る細胞内情報伝達系路を、PKA, PKB, MAP, CaMK kinase 等によるリン酸化・脱リン酸化に注目して検索する。

② 細胞内シグナルによるリン酸化に関する研究

同調に伴う細胞内シグナルは、数々の時計遺伝子を含む蛋白質をリン酸化させる。これを、昨年に続き小脳培養系で検索する。また、視交叉上核培養系でも行う。

③ 従属的振動発振細胞におけるリズム発振調節機構の研究

生体内のほとんどの細胞には時計発振機構が備わっており、生体は視交叉上核を頂点とした階層的な時計発振機構を形成する事が明らかである。それら従属的な振動細胞は、自身ではリズム発振能を持たないが、上位からあるシグナルが来れば発振を始めると考えられる。今回、規則的食事性リズム発振モデル、メトアンフェタミンリズム発振モデルを用いて、視交叉上核非依存性発振現象を解析する。

(2) 新規光情報伝達因子に関する研究

ショウジョウバエ、マウスのミュータント解析から、リズムをリセットするのに opsin 類は主要なものではないことが明らかである。最近、植物、ショウジョウバエでは、blue light (430nm) を受容して電子供与体として働く光回復酵素 photolyase の一種である Cry がリズムに関与することが明らかになった。

① 新規光情報伝達因子の時計遺伝子フィードバックループへの情報伝達の解析

Cry1 と Cry2 のダブルノックアウトマウスでリズムが全くなくなることは、Cry1, Cry2 がリズムの本体にシグナルを送っていることを示唆する。昨年、Cry が時計遺伝子

Per の発現をネガティブにコントロールしていることを明らかにした。今回、さらに Cry1, Cry2 が関与する分子メカニズムを明らかにする。また、ノックアウト細胞の解析も行う。

② 新規光情報伝達因子結合タンパク質の同定

Cry は新規光情報伝達因子だと考えられるが、その情報伝達系路は不明である。昨年に続き、two hybrid 法や、免疫沈降法等を用いて、既知時計遺伝子や新規 Cry 結合蛋白を同定する。

3. 時計出力機構の研究

(1) 視交叉上核細胞内での時計出力機構に関する研究

① 時計遺伝子から情報が膜電位として伝達される仕組みの解明

視交叉上核のスライス、初代培養系、膜電位測定、イメージング解析、リズム行動解析などを駆使し、Per 遺伝子が視交叉上核の細胞のリズム発振にどの様に働くのかを薬理的・生化学的に明らかにする。

② 視交叉上核から他の脳部位までの出力伝達機構の解明

昨年に続き、小脳を例に取り、小脳までの出力情報伝達がどのような液性・神経性因子によりおこなわれるかを、生体内のみならず培養系をも用いて検討する。また、昼行性動物と夜行性動物の出力情報の差異を説明する機構を解明する。

(2) 生体内埋込みマイクロダイアリスプローブによる生体での時計出力機構に関する研究

① 生体内埋込みマイクロダイアリスプローブによる生体での時計出力機構に関する研究

松果体は鳥類では時計機構が存在しているが、哺乳類ではその機構を失って、完全に視交叉上核の活動の支配下にある。しかし松果体メラトニンは視交叉上核に働き、その活動を修飾することが判明している。従って、松果体は、末梢から中枢へのフィードバック機構に位置する器官として注目される。昨年までで、1カ月もの長期にわたり連続的に髄液を採取し、メラトニン値を測定できる系を作製した。今年も長期松果体埋込みプローブをさらに改良し、メラトニンのみならず神経伝達物質の変動も測定できる系を開発する。この系を利用して、体内時間の脱同調機構が想定される、メトアンフェタミン投与、制限給餌動物のリズムの神経機構を解析する。

(3) 網膜培養系の時計機構に関する研究

① 網膜培養系でのリズムミュータント・時計遺伝子ノックアウトマウスの連続的メラトニン測定

現在まで、網膜は、視交叉上核以外では唯一の、生体時計がある事が知られている組織である。光の入力から出力に至るまでこの系でそろっている、網膜組織を用いて、メラトニンと局所の時計のカップリング機構を検索する。

II 平成12年度における実施体制

研究項目	担当機関	研究担当者
1. 時計遺伝子の発現制御に関する研究		
(1) 哺乳類時計遺伝子の転写制御に関する研究	神戸大学医学部	山口 瞬
(2) 時間軸での遺伝子マッピングによる時計シグナル伝達機構の解析	大阪大学細胞工学センター	大久保 公策
(3) 時計遺伝子の核移行と時計フィードバックループに関する研究	神戸大学医学部	山口 瞬
(4) 時計遺伝子間の分子結合に関する研究	㈱矢内原研究所	矢内原 昇
(5) 時計遺伝子のノックアウトマウス・トランスジェニックマウスに関する研究	山口大学理学部	井上 慎一
(6) 高感度フォトニクス・デバイスを利用した細胞レベルでのリズムモニター系の開発に関する研究	神戸大学医学部	山口 瞬
2. 時計発振の環境周期への同調機構に関する研究		
(1) 光情報受容から時計遺伝子に至る経路に関する研究	早稲田大学理工学部	柴田 重信
(2) 新規光情報伝達因子に関する研究	東北大学加齢医学研究所	安井 明
3. 時計出力機構の研究		
(1) 視交叉上核細胞内での出力機構に関する研究	早稲田大学理工学部	柴田 重信
(2) 生体内埋込みマイクロダイアリシスプローブによる生体での時計出力機構に関する研究	浜松医科大学医学部	中原 大一郎
(3) 網膜培養系の時計機構に関する研究	聖マリアンナ医科大学	飯郷 雅之
4. 生体時間とバイオクロック（人工生物時計）に関する研究	神戸大学医学部	山口 瞬
5. 研究管理	神戸大学医学部	岡村 均

III リエゾン会議

委員	所 属
○岡村 均	神戸大学 医学部解剖学第二講座教授
飯郷 雅之	聖マリアンナ医科大学 解剖学教室助手
井上 慎一	山口大学 理学部自然情報科学科教授
大久保 公策	大阪大学 細胞工学センター助教授
小林 正樹	山形県テクノポリス財団 主任研究員
柴田 重信	早稲田大学 人間科学部薬理学教室教授
中原 大一郎	浜松医科大学 医学部心理学教室教授
安井 明	東北大学 加齢医学研究所遺伝子機能部門教授
矢内原 昇	㈱矢内原研究所 所長
山口 瞬	神戸大学 医学部解剖学第二講座助手

(注：○は研究管理統括者)