

令和4年度 博士論文

摂食行動と行動リズムを支配する分子神経基盤の解析

Molecular neurobiological mechanisms regulating feeding behaviors and  
behavioral rhythms

生命融合科学教育部 生体情報システム科学専攻

32052101 小泉隼人

## 目次

目次	.....	1
第 1 章		
要旨	.....	2-3
序論	.....	4-5
方法	.....	6-11
結果	.....	12-15
考察	.....	16-18
第 2 章		
要旨	.....	19
序論	.....	20-22
方法	.....	23-26
結果	.....	27-29
考察	.....	30-33
謝辞	.....	34
参考文献	.....	35-45
図表	.....	46-94

## 第1章 「摂食制御におけるコレシストキニンとレプチンの細胞内相互作用の解析」

### 要旨

食物を十分量摂取すると、胃腸管の拡張やエネルギー充足に呼応して、コレシストキニン (CCK) やレプチンといったペプチドホルモンが分泌され、これらが中枢神経系や末梢神経系へ作用することで、満腹感が惹起されることが知られている。レプチン受容体はリン酸化酵素である JAK2 や PI3K などの活性化、および転写因子 STAT3 (signal transducer and activator of transcription-3) のリン酸化を介して転写調節を行う。一方、CCK 受容体は Gq タンパク質共役型受容体であり、細胞内 Ca<sup>2+</sup> 動員によりシグナルを伝達する。これら両ホルモンは共に摂食行動を抑制することが知られている。一方で、細胞内シグナルレベルでの相互関係に関しては不明な点が多い。そこで本研究では、*in vitro* および *in vivo* モデルを用いて、CCK とレプチンの相互作用を解析した。

まず、ラット C6 グリオーマ細胞を用いた Ca<sup>2+</sup> イメージング実験により、CCK とレプチンの作用を解析した。その結果、レプチンの前処理により CCK 受容体アゴニスト (CCK-8s) による Ca<sup>2+</sup> 動員が増強されることが示された。また、この増強作用は JAK2 あるいは PI3K のインヒビターにより阻害された。次に、免疫組織化学を用いてリン酸化 STAT3 (pSTAT3) の発現を解析した。その結果、レプチン受容体刺激により核内 pSTAT3 蓄積が誘発された一方で、CCK-8s の前処理は、レプチンによる核内 pSTAT3 蓄積を抑制した。

上記の細胞評価系での結果から、レプチンは CCK シグナルを活性化する一方で、CCK はレプチンシグナルを抑制する関係性が示唆された。そこで、次に摂食制御中枢として知られる視床下部腹内側核 (VMN) 脳スライス標本を用いて、その相互作用が実際に観察されるのかを解析した。その結果、レプチンと CCK-8s の共刺激により神経発火が相乗的に促進された。また、側脳室内へのレプチン投与は VMN 神経において核内 pSTAT3 蓄積を惹起したが、CCK-8s の共投与は、このレプチン投与による核内 pSTAT3 蓄積を抑制することが明らかとなった。

本研究では、最終的にこうしたレプチンと CCK の相互作用関係が、実際の摂食制御に関係するのについても解析を試みた。*in vivo* での CCK アゴニストやレプチンの投与は、動物の摂食量を抑制することから、内因性の CCK やレプチンシグナルの強度に影響を与える。よって、相互作用の単純比較は難しい。そこで、この実験では、1 時間の制限給餌に慣れさせたラットに対して、給餌時間の直後 (つまり内因性のレプチンや CCK が増加し満腹応答を引き起こした直後) に CCK-1 受容体アンタゴニスト (LGM) を腹腔内投与することで、その後の摂食行動量の変化を観察した。その結果、CCK-1 受容体アンタゴニスト投与群では、投与 3 時間後に再提示した餌に対する摂食行動が増加することが明らかとなった。さらに、投与 3 時間の時点での、VMN 神経を免疫組織化学により解析したところ、LGM 投与群では核内 pSTAT3 の増加と、c-Fos の減少が観察された。

これまでに、コレシストキニンとレプチンは共に満腹制御に関与するシグナルペプチドとして広く認められてきた。しかしながら、これらの受容体刺激が細胞内情報伝達のレベルでどのように関連するのかについては、よくわかっていなかった。本研究の結果から、レプチンは CCK シグナル ( $\text{Ca}^{2+}$  応答や神経興奮作用) を増強する一方で、CCK はレプチンシグナル (核内 pSTAT3 蓄積) を抑制する関係性が示された。さらに特定の実験条件では、核内 pSTAT3 レベルは満腹度と負の相関を示すことも明らかになった。長期の満腹応答においては、主にレプチンシグナルが関与することが知られており、核内 pSTAT3 レベルと満腹応答には正の相関がみられることが報告されている。よって、短期と長期の満腹制御では細胞内シグナリング機構が異なることが示唆された。

## 序論

食物摂取の制御は動物の生存に不可欠であり、摂取行動には複数のシグナル伝達機構が関与している<sup>1,2</sup>。コレシストキニン (CCK) は、食物摂取に反応して腸から分泌されるペプチドホルモンであり<sup>3,4,5</sup>、古典的な満腹感を制御する分子である<sup>6,7</sup>。CCK 受容体は CCK-1 および CCK-2 受容体が存在し、いずれも Gq タンパク質共役型受容体である<sup>8,9</sup>。CCK-1 受容体の活性化は満腹感を促進することで、摂食量を減少させ<sup>10,11</sup>、逆に CCK-1 受容体の不活性化は摂食量を増加させることが報告されている<sup>10,12,13,14,15,16,17,18,19</sup>。CCK-1 受容体は、満腹感の制御に関わる末梢および神経組織に発現しており、幽門、節状神経節、孤束核、視床下部満腹感制御中枢に高発現することが確認されている<sup>20</sup>。CCK は末梢投与でも中枢投与でも満腹感をもたらすが<sup>21,22</sup>、CCK の脳への透過性については未だ議論がある。視床下部神経には、高レベルの CCK ペプチドが発現し<sup>23,24</sup>、中枢神経における CCK の摂食抑制作用は、CCK-1 受容体を発現する神経回路に依存することが報告されている<sup>25,26,27,28,29</sup>。また、CCK-1 受容体ノックアウトマウスにおいて CCK-2 受容体による機能補償が生じることが知られている<sup>30</sup>。一方で、このような受容体間の補償関係が、他の受容体間でも存在するかに関しては明らかにされていない。本研究では、同じく摂食制御に関わるペプチドであるレプチンと CCK シグナルの細胞内相互作用について検討した。

レプチンは、白色脂肪細胞から分泌されるペプチドホルモンであり、満腹感を制御するホルモンとして知られている<sup>31,32,33</sup>。CCK とは異なり、レプチンは食事回数を変えずに摂食量を減らす作用があるため<sup>34,35</sup>、レプチンシグナルはより長期的な摂食制御に関わると考えられている。レプチン受容体にはスプライスバリエント (ObRa-ObRe) が存在し、完全長アイソフォームの ObRb のみが細胞内シグナルの開始に必要な細胞内モチーフを含んでいる<sup>36</sup>。ObRb は一回膜貫通型の受容体で、Janus kinase-2 (JAK2), signal transducer and activator of transcription-3 (STAT3), phosphoinositide-3 kinase (PI3K), mitogen-activated protein kinase (MAPK), 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) など多様なシグナル分子と相互作用することが知られている<sup>37,38,39,40</sup>。また、レプチンは細胞質 Ca<sup>2+</sup>シグナルを調節することが報告されているが、その作用は細胞種によって異なる。例えば、小脳顆粒細胞初代培養において、レプチンは MAPK 経路を介して、N-methyl-D-aspartate 誘発性の Ca<sup>2+</sup>流入を増強する作用を持つ<sup>41</sup>。レプチン受容体は、視床下部腹内側核 (VMN) に発現し、満腹感を制御している<sup>42</sup>。実際、視床下部腹内側野 (VMH; VMN と弧状核 (ARC) を含む) の初代培養において、レプチンは細胞種に依存して細胞内 Ca<sup>2+</sup>振動を増強あるいは抑制することが報告されている<sup>40</sup>。レプチンの抑制性作用は AMPK を介した K<sup>+</sup>チャネルの活性化によってもたらされるのに対し、レプチンの興奮性作用は未だ解明されていない<sup>40</sup>。また、単離 ARC 神経において、N 型 Ca<sup>2+</sup>チャネルに依存するグレリン誘発性の Ca<sup>2+</sup>上昇は、レプチンによって抑制された<sup>43</sup>。さらに、視床下部のアストロサイトでは、レプチン刺激により単相性の細胞質 Ca<sup>2+</sup>上昇が観察されたが<sup>44</sup>、そのメカニズムは明らかにされていない。アストロサイト特異的な

レプチン受容体のコンディショナルノックアウトにより、レプチンによる摂食抑制作用が減少することから、グリア細胞のレプチンシグナルも満腹感のコントロールに関与している可能性がある<sup>45</sup>。

興味深いことに、単独では摂食に影響を与えない閾値以下の CCK とレプチンを共投与すると、マウス<sup>46</sup>とラット<sup>47,48</sup> 両種において摂食量が劇的に減少することが報告されている。また、機能的なレプチン受容体を欠損した Zucker fa/fa ラットでは、CCK の満腹感制御効果が減弱していた<sup>49</sup>。加えて、レプチンを介した満腹感制御系が CCK 系と強く相互作用している可能性を示唆する報告がある<sup>18,50,51,52,53,54</sup>。例えば、視床下部室傍核のオキシトシン神経における c-Fos の発現はレプチン投与により上昇し、これらの神経は末梢の CCK シグナルを受け取る孤束核に軸索を伸ばしている<sup>52</sup>。また、レプチンの第四脳室投与は CCK による満腹感反応を増強したが、孤束核の c-Fos 発現の増加は観察されなかった<sup>18</sup>。このように、CCK とレプチンは大きな神経ネットワークを介して相乗的に満腹感を調節している可能性がある。さらに、節状神経節神経には ObRb と CCK-1 受容体が共発現しており、これらの神経において相乗的な神経興奮作用が確認された<sup>53,54</sup>。このことから、末梢の満腹感制御機構において、これらの受容体が直接相互作用していることが示唆される。一方で、中枢神経系において、これらの受容体が細胞内シグナルレベルでどのように相互作用しているかは不明である。以上の背景から、本研究では *in vitro* および *in vivo* モデルを用いて、レプチンと CCK の相互作用を解析した。

## 方法

### 実験動物

室温 (22±2°C) に維持した明期 12 時間、暗期 12 時間の明暗サイクル (明期：8:00～20:00) の条件下で飼育した生後 9 週から 11 週の成体オス Sprague Dawley ラット (体重 370-475 g) を実験に使用した。制限給餌実験以外は市販飼料 (ペレット：ラボ MR スタンダード) と水道水を常に自由に摂取できる状態とした。動物実験は、富山大学動物実験委員会により承認され、(承認番号：A2015SCI-3、A2018 SCI -2)、国立大学法人富山大学動物実験取扱規則に従って実施された。

### 細胞培養

C6 細胞 (ラット神経グリア細胞腫瘍由来細胞株) は、通常培地 (DMEM/F12 (Dalbecco's Modified Eagle Medium:Nutrient Mixture F-12, Invitrogen) 1 : 1 Mixture に 10%非動化牛胎児血清 (FBS)、1%ペニシリン-ストレプトマイシンを加えた培地) を用いて培養した。この培地を用いて、C6 細胞を 25 cm<sup>2</sup> フラスコ (Sigma-Aldrich) に播種し、37°C、5%CO<sub>2</sub> インキュベーター (Hera cell 150i, Thermo scientific) で培養した。2-3 日毎に継代を行った。

### 遺伝子導入 (リポフェクション)

培養細胞への遺伝子導入は Lipofectamine3000 (Invitrogen) を使用した。細胞は 35×10 mm セルカルチャーディッシュもしくはガラスベースディッシュで 60～70%コンフルエントになるまで培養した。50 µL/dish の無血清 DMEM (Sigma-Aldrich) を入れたエッペンチューブを 2 本用意し、1 本には DNA (ObRb プラスミド) 1 µg/dish と P3000 Reagent 2 µL/dish を加え、もう一方には Lipofectamine3000 Reagent 1.5 µL/dish を加えて 5 分間静置した。5 分後、両液を混合し 20 分静置した。その間に培養したディッシュ内の培養液をアスピレートし、無血清 DMEM で 3 回洗浄後、無血清 DMEM 700 µL を添加した。20 分後、混合液を 100 µL ずつ添加し 37°C、5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 4 時間インキュベートした。4 時間後、ディッシュ内の無血清 DMEM をアスピレートし、通常培地 DMEM/F12 で 3 回洗浄後、通常培地 1 mL を添加した。ObRb は 24 時間から 48 時間後には発現し、1-2 日後には実験に用いることができた。その後、細胞選択のために 500 µg/mL G418 disulfate salt (Sigma-Aldrich) を含む培地中で培養した。

### Real time RT-PCR

細胞は 35×10 mm セルカルチャーディッシュで 100%コンフルエントになるまで培養したのを使用した。培養液をアスピレートし、トリプシン溶液 (0.05% Trypsin (Invitrogen)、0.5 mM EGTA (Dojindo) in PBS(-)) を 1 mL 加え 2 分間静置した。ピペッティングにより細胞を剥離後、細胞懸濁液を 1.5 mL RNase フリーエッペンドルフチューブ (Eppendorf) に移

し、遠心機 (centrifuge 5417R, Eppendorf) を用いて遠心操作した (5 分間、5,000 rpm、20-24°C)。上清を完全に除去し、ペレット化した細胞をタッピングし、Buffer RLT (RNeasy mini kit に付属) を 350  $\mu$ L 添加し、ボルテックスで 1 分間混和させた後、マイクロピペットチップ (Nichiryo) を用いてよくピペッティングした。ホモジナイズされたライセートに 70% エタノールを 350  $\mu$ L 加えた。溶解されたサンプルは RNA 抽出に利用、あるいは -80 °C で保存した。Total RNA 抽出には RNeasy mini kit (QIAGEN) を使用し、付属のプロトコルに従い、RNA 抽出を行った。得られた RNA 抽出液は、RNA 濃度測定後、逆転写に利用、あるいは -30°C で保存した。逆転写は Quanti Tect Reverse Transcription Kit (QIAGEN) を用い、付属のプロトコルに沿って実施し、合成した cDNA は続くリアルタイム PCR のステップで利用、あるいは -30°C で保存した。

Rotor-Gene SYBR Green RT-PCR Kit (QIAGEN)、および以下に示した配列をもつ rat *ObRa*、rat *ObRb*、rat *CCK-1R*、rat *CCK-2R* (Invitrogen)、または *GAPDH* プライマーを利用し、QIAGEN のスタンダードプロトコルに従って PCR 反応液を調整した。PCR プライマーは先行研究<sup>55,71</sup> を参照し設計した。

	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
rat <i>ObRa</i>	TGAAGTATCTCATGACCACTACAGATGA	GTTTGCTTCCTTCCTTCAAAATGT
rat <i>ObRb</i>	GCATGCAGAATCAGTGATATTTGG	CAAGCTGTATCGACACTGATTTCTTC
rat <i>CCK-1R</i>	CAGCAGGCCGGTGATAAGA	GGTGGACATGAGAAGGTGT
rat <i>CCK-2R</i>	CGCCATATGCCGACCACTG	CCACACCCGGGATGAAGAAC
<i>GAPDH</i>	GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG	ATGGTGGTGAAGACGCCAGTA

調製した PCR 反応液は Rotor gene 3000A (CORBETT RESERCH) にセットし以下の条件で PCR 反応を行った。PCR 初期活性化の温度と時間はそれぞれ 95°C、5 分間に設定した。2 ステップサイクリングの変性の温度と時間をそれぞれ 95°C、5 秒間とし、アニーリング/エクステンションステップの温度と時間をそれぞれ 60°C、10 秒間に設定した。サイクリングの Rotor speed を Normal speed に設定し、サイクル数は 60 とした。これにより SYBR Green の蛍光強度による、cDNA 増幅曲線を得た。全てのサンプルに関して、*GAPDH* を内部標準として比較定量した。

### 電気生理学的解析

生後 12-16 日目のラットにペントバルビタール麻酔を行い、氷冷した High  $Mg^{2+}$  ACSF (artificial cerebrospinal fluid; High  $Mg^{2+}$  ACSF, 138.6 mM NaCl, 3.35 mM KCl, 21 mM  $NaHCO_3$ , 0.6 mM D-glucose, 0.5 mM  $CaCl_2$ , 4 mM  $MgCl_2$ ) 中でビブラトームスライサーを用いて VMH スライス (300  $\mu$ m 厚) を作製した。スライスを 95%  $O_2$ /5%  $CO_2$  をバブリングした Normal ACSF (124 mM NaCl, 3 mM KCl, 2.5 mM  $CaCl_2$ , 1 mM  $MgCl_2$ , 1.25 mM  $NaH_2PO_4$ , 26 mM  $NaHCO_3$ , 10 mM glucose) へ移し室温で 1 時間ポストインキュベートした。インキュベート後、正立型顕微鏡 (BX50WI; Olympus) のステージに移した。レコーディングチェンバーには、34°C に温

め酸素を含ませた Normal ACSF を 3 mL/min で灌流した。VMH 神経を赤外線 CCD カメラ (C2741-79; 浜松フォトニクス) で確認し、patch-clamp amplifier (Axopatch 200B; Axon Instruments) を用いて whole-cell current-clamp mode でレコーディングを行った。レコーディングは、KOH で pH7.3 に調整した電極内液 (135 mM potassium gluconate, 5 mM KCl, 10 mM HEPES, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.0 mM EGTA, 10 mM phosphocreatine, 2 mM Mg-ATP, 0.2 mM Na-GTP) で満たした 4-6MΩ の高抵抗をもつパッチピペットを用いて行った。増幅器の出力は、10 kHz のサンプリングレートを A/D converter board (Digidata 1200; Axon Instrument) を用いて出力し、data acquisition software (pCLAMP 8; Axon Instruments) でハードディスクに記録した。膜電位は 2 kHz のローパスフィルターで固定をした。-60 mV より低い静止膜電位は陽イオンを加えることで、約-60 mV に調整した。刺激には重力落下灌流システムを適用した。

#### レプチンおよび CCK の脳室内投与

ラットを脳定位固定台に固定し、ガイドカニューレ (切断長 5 mm, no. C315G; Plastics One Inc.) を右側脳室に埋め込んだ。座標はブレグマより 0.8 mm 後方、正中線より 1.4 mm 外側、頭蓋骨表面より 3.3 mm 腹側とした。カニューレは 2 本のステンレス製ねじと歯科用レジンで頭蓋骨表面に固定した。その後、ラットを 1 週間以上ケージで回復させた。レプチン (4 μg) および CCK (2 μg) を 4 μl の ACSF に溶解し、インターナルカニューレ (切断長 5.5 mm, no. C315I; Plastics One Inc.) を介して投与した。内因性シグナルの影響を最小限にするため、ラットは脳室内投与の前に 10 時間 (08:00-18:00) 餌を与えないようにした。薬物は電動シリンジポンプ (Carnegie Medicine model CMA/102) を用いて 1 μl/min の流速で 4 分間かけて投与し、薬物を拡散させるためにさらに 4 分間シリンジポンプを止めて留置した。脳室内投与から 1 時間後に脳を摘出し、免疫組織化学実験に使用した。

#### 免疫組織化学的解析

##### i) C6 細胞を用いた免疫組織化学

ObRb ベクターを導入し、ObRb を強制発現させた C6 細胞 (C6-ObRb) を使用した。細胞をガラスベースディッシュに撒き、60-70%コンフルエントになるまで通常培養した。試薬 (レプチンまたは CCK) 刺激は、実験 30 分前に培地に試薬を添加することで行った。インヒビターを使用した場合は実験 45 分前にインヒビターを添加し、その 15 分後にレプチンまたは CCK を添加した。刺激後、培養したディッシュ内の培地をアスピレートし、4%パラホルムアルデヒド (PFA、富士フィルム和光純薬) 溶液 (PBS(-)を用いて PFA を 4%になるように調整した溶液) に浸し、室温で 10 分間固定し、PBS(-)で室温、10 分間×3 回リンスした。続いて、ブロッキング液 (10% Donkey Serum (Jackson Immuno Research Laboratories)、0.1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) in PBS(-)) に浸して室温で 2 時間ブロッキングした。2 時間後、anti-rabbit phospho-STAT3 (pTyr<sup>705</sup>) (pSTAT3)抗体 (Sigma-Aldrich) を抗体希釈液 (5% Donkey Serum in PBS(-)) で 1:100 に希釈した 1 次抗体溶液に浸し、4°C で 24 時間振蕩した。

その後、PBS(-)で室温、20分×3回リンスした。続いて、Cy3-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG(H+L) (Jackson Immuno Research) を抗体希釈液で 1:400 に希釈した 2 次抗体溶液に浸して室温で 2 時間振蕩した。なお、この手順以降は遮光して行った。2 時間後、PBS(-) で室温、15 分×4 回リンスした。続いて、VECTA SHIELD mounting medium with DAPI (Vector Laboratories) を滴下し、カバーガラスをかけて封入した。

## ii) VMH 脳スライスを用いた免疫組織化学

制限給餌モデル 5 日目の試薬投与 3 時間後 (ZT16) のラットに対し、ペントバルビタール (50 mg/kg) を腹腔内投与した後、腹部を切開した。その後、PBS(-) (phosphate buffered saline; 1.37 M NaCl, 27 mM KCl, 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 18 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 約 200 ml を左心室から灌流し脱血を行った。脱血後、4 %PFA 溶液を約 200 ml 灌流し固定した。固定後、脳を摘出し、固定液を浸透しやすくするため、嗅球を切除した。脳を 4 °C で一晩、4 % PFA 溶液により浸漬固定を行った後、さらに 4 °C で一晩 30 %スクロース溶液により脱水した。その後、脳を OCT コンパウンド (サクラファインテックジャパン) で包埋し、クライオスタットで厚さ 30 μm の凍結連続脳切片を作成した。作成した切片は PBS(-)で満たされた 24 ウェルプレート中で保存した。

24 ウェルプレートに保存したサンプルのうち、ラット脳地図を参照し、視床下部腹内側核 (VMN) と視床下部弓状核 (ARC) が含まれる切片 (Bregma -2.56 ~ -3.30 mm) を使用した。1 次抗体として anti-rabbit phospho-STAT3 抗体を 1 : 200、anti-c-Fos (AB-5)Rabbit pAb 抗体(Calbiochem)を 1 : 5000、2 次抗体として Alexa 488 conjugated Affinipure Donkey Anti-Rabbit IgG(H+L)(Jackson Immuno Research Laboratories)を 1 : 200 の濃度で使用し、上記と同様の方法で染色した。最後に、1:400 に希釈した Monoclonal Anti-Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP)-Cy3 conjugate Purified Mouse Immunoglobulin (Sigma-Aldrich)を 4 °C で 1 晩反応させ、PBS(-)で十分にすすぎ、VECTA SHIELD mounting medium with DAPI を使用してマウントした。

観察および撮影には共焦点レーザー蛍光顕微鏡 (Olympus FV1000 または Nikon A1R MP plus) を使用した。ARC はアストロサイトに富むことから GFAP 染色により VMN と ARC を区別した。核内蛍光強度 (8-bit depth) は PhotoShop 6.0 ソフトウェア (Adobe Systems) で解析した。

## 制限給餌モデルの作成

制限給餌および腹腔内投与トレーニングは計 5 日間行った。制限給餌開始 1 日目の暗期開始である 20 時 (ZT12) にこれまでのペレット状のエサを取り除き、摂食量を正確に測るため、代わりにペースト状のエサ (市販飼料 : 水道水 = 2 : 3 の割合で混合したものを一晩浸けた後、練り合わせたもの) を給餌した。そして、給餌開始 1 時間後にエサを取り上げ、水のみを摂取できる状態とし、これを 5 日間行った。そして、腹腔内投与の順化として、給餌終了直後に生理食塩水 (大塚製薬) を体重 10 g あたり 0.01 ml 腹腔内投与し、こ

れを1日目から4日目まで行った。5日目に食餌摂取行動に対する CCK-1 受容体アンタゴニストである Lorglumide (LGM, LKT Laboratories Inc.) の影響を分析するために生理食塩水または LGM(2 mg/ml または 10 mg/ml 共に溶媒は生理食塩水)を体重 10 g あたり 0.01 ml 腹腔内投与した。腹腔内投与は赤色光下で行い、明期 12 時間、暗期 12 時間の LD サイクル (明期: 8:00~20:00) を保った。

### 摂食行動解析

制限給餌開始1日目の暗期開始時刻 (ZT12) に SD ラットをシールドルーム内の高さ 30 cm 直径 29 cm の円筒ケージに移した。そして、ケージの高さ 31cm の地点に H45×W80×D95 mm の金属製のエサ箱を吊るし、その中にペーストエサを入れ、エサ箱にタッチセンサー (PS-306, Elekit) を接続した。エサ箱の底はケージから 21.5 cm の位置にある。このシステムを使用して、一般的な運動活動ではなく、意図的な食べ物へのアクセス行動を記録した。センサーからの ON/OFF の信号はフォトカップラで絶縁されたデジタル I/O カード (PIO-16/16L, Contec Inc.) を通してパソコンに伝えられ、オリジナルのソフトウェアにより 3 分置きに自動でカウントされた。制限給餌 5 日目の試薬投与 3 時間後 (ZT16) にエサ箱にエサを入れ、自由摂食条件とし、試薬投与 (ZT13) から ZT23 までの摂食行動を記録した。

### Fura-2 Ca<sup>2+</sup>イメージング

#### i) C6 細胞を用いた Ca<sup>2+</sup>イメージング

35×10 mm セルカルチャーディッシュに通常培養した C6 細胞を蛍光 Ca<sup>2+</sup>指示薬である Fura-2 により染色した。染色液は、Fura-2 AM (Dojindo Laboratories) を 1 mM になるようにジメチルスルオキシド (DMSO, Wako) で調製したストック Fura-2 溶液を、培地 (DMEM/F12) を溶媒として、6 μM になるように調整し、15 分間ソニケートした。染色液は 1 ディッシュにつき 500 μL にした。染色液に浸して 37°C、5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 30 分間染色した。染色後、灌流用緩衝塩類溶液 (BSS; 135 mM NaCl (Wako)、5.4 mM KCl (Wako)、5.5 mM Glucose (Wako)、10 mM HEPES-NaOH (Dojindo)、2 mM CaCl<sub>2</sub> (Wako)、1 mM MgCl<sub>2</sub> (Wako)、pH7.4) で 3 回洗浄し、実験を行った。

インヒビターを使用した実験では、Fura-2 染色液の洗浄後に、ディッシュ内の BSS にインヒビター (AG490 (Calbiochem) もしくは LY294002 (Calbiochem)) を添加し、37°C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 30 分間インキュベートし前処理を行い、その後実験を行った。洗浄後、ディッシュを顕微鏡ステージにセットし、BSS あるいは薬液 (溶媒は normal BSS) を毎分 2.5 mL 灌流させ、薬液は灌流液を切り替えることにより投与した。細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度測定には、蛍光色素 Fura-2 における蛍光ピークの偏移を利用した。光源には、175 W キセノンランプを備えたランプハウス (LAMBDA LS, SUTTER INSTRUMENT CO.) を使用した。励起光としての 340 nm 波長光および 380 nm 波長光の制御には、フィルターチェンジ

ヤー (LAMBDA 10-2, SUTTER INSTRUMENT CO.) を用いた。紫外光源には、ダイクロイックミラー (FT 395 nm, Carl Zeiss) でフルスペクトル光から UV 光を反射させた。380 nm 波長光は 340 nm 波長光より変換が高いため、バランスフィルターをダイクロイックミラーの励起光フィルターに挿入した。2 対の蛍光画像は、バンドパスフィルター (BP480-515 nm, Carl Zeiss) を透過させ、20 倍水浸レンズ (ACHROPLAN 20×/0.50 w Ph2, Carl Zeiss) を備えた正立型蛍光顕微鏡 (Axioplan2, Carl Zeiss) および冷却 CCD カメラ (CoolSNAP-fx, Photometrics) を用いて取り込んだ。露光時間 600 ミリ秒、6 秒おきに蛍光画像を取得した。記録および解析には、MetaFluor Ver. 6.2 (Universal Imaging Co.) を用いた。

#### ii) 視床下部スライスを用いた $\text{Ca}^{2+}$ イメージング

10-12 日齢のマウスを、ペントバルビタールを腹腔内投与 (50 mg/kg) したうえで、脳を摘出し、混合ガス (95% $\text{CO}_2$ , 5% $\text{O}_2$ ) でバブリングした脳切片作成用人工脳脊髄 (High  $\text{Mg}^{2+}$  artificial cerebrospinal fluid; High  $\text{Mg}^{2+}$  ACSF, 138.6 mM NaCl, 3.35 mM KCl, 21 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 0.6 mM D-glucose, 0.5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 4 mM  $\text{MgCl}_2$ ) 中でビブラトームスライサーを用い、厚さ 300  $\mu\text{m}$  の脳スライスを作成した。0.40  $\mu\text{m}$  のフィルターカップ (Millicell-CM, Millipore) に乗せ、Normal ACSF を満たしたチェンバーに移し、バブリングしながら 1-4 時間室温に置いた (ポストインキュベーション)。その後、Normal ACSF を溶媒とし、10  $\mu\text{M}$  Fura-2AM, 0.01% Pluronic F-127 (Invitrogen) 溶液を調整し、10 分間ソニケートして染色に用いた。染色条件は、室温、遮光、バブリング下で 45~60 分行った。染色後、脳スライスを 30 分、灌流液 (Normal ACSF) で洗浄し実験に用いた。洗浄後、イメージング用チェンバーに脳スライスのみ移し、顕微鏡のステージにセットした。記録は上記の方法と同様に行った。画像取得中、レプチン (PeproTech)、CCK-4 (Peptide Institute, Inc)、CCK-8s (Sigma-Aldrich)、AG490 (Calbiochem)、LY294002 (Calbiochem)、LY225910 (R&D Systems)、LGM、および ATP (Sigma-Aldrich) を灌流液を切り替えることで投与した。 $\text{Ca}^{2+}$  反応の大きさは、Origin 5.0 ソフトウェア (OriginLab) を用いてピーク面積を算出することで測定した。

#### 統計解析

データは平均値と標準誤差で示した。2 群間の比較には Two-tailed Student's *t*-test を用いた。単要因の様々な平均における比較には One way analysis of variance (ANOVA) followed by Duncan's multiple range tests を用い、複数の用量依存曲線の比較には Two way ANOVA を用いた。用量依存曲線の推定には four-parameter Hill function を使用した。有意水準が 95 % 以上の場合に有意であるとみなした。

## 結果

### ラット C6 グリオーマ細胞におけるレプチン・CCK 受容体の発現

C6 細胞は視床下部アストロサイトと同様に ObRa (短鎖アイソフォーム) と ObRb (全長アイソフォーム) を発現し、ObRa の割合が高いことが報告されている<sup>44,55</sup>。C6 細胞はがん細胞株であるため、まず本研究で使用した C6 細胞の受容体発現を解析した。リアルタイム RT-PCR を用いて、ObRa と ObRb の発現を確認したところ、ObRb の発現レベルが 4 倍高く ( $p < 0.05$  by Student's *t*-test; Fig.1A)、保存サンプル間あるいは細胞継代回数で発現比率が異なる可能性が示唆された。

C6 細胞において CCK 受容体のリガンド結合が報告されているので<sup>56</sup>、本研究ではリアルタイム RT-PCR を用いて CCK-1 および CCK-2 受容体の遺伝子発現を解析した。その結果、両受容体遺伝子の発現が確認された (Fig.1B)。C6 細胞に発現する CCK 受容体の機能をさらに確認するために、Ca<sup>2+</sup>イメージング解析を行った。CCK-2 受容体アゴニストである CCK-4 (100 nM) で C6 細胞を刺激すると、約 20% の C6 細胞 ( $n = 35 / 3$  dishes) で Ca<sup>2+</sup>増加応答が誘発されたが、その大きさは細胞間で大きく異なっていた。同じ細胞をより特異性の低いアゴニストである CCK-8s (10 nM) で再刺激すると、32% の C6 細胞が Ca<sup>2+</sup>増加応答を示した ( $n = 103 / 5$  dishes)。CCK-1 受容体アンタゴニストの Lorglumide (LGM, 100 nM) で前処理すると、CCK-8s 誘発 Ca<sup>2+</sup>増加応答の大きさが著しく減少した (-44%,  $F_{2,24}, p < 0.05$  by one-way ANOVA; Fig.1C)。LGM と CCK-2 受容体アンタゴニストの LY225910 (100 nM) を共に前処理することにより、CCK-8 による Ca<sup>2+</sup>増加応答がほぼ完全に抑制された ( $F_{2,24}, p < 0.01$  by one-way ANOVA; Fig.1C)。これらの結果から、C6 細胞において CCK-1 および CCK-2 受容体が内在的に発現していると考えられる。

### C6 細胞における Ca<sup>2+</sup>動員に対するシグナル伝達の相互作用

次に、CCK-8s (10 nM) 誘発の Ca<sup>2+</sup>動員に対するレプチンの影響を解析した。その結果、レプチン前処理 (100 nM, 5 min) により、Ca<sup>2+</sup>動員の大きさが有意に (~5 倍) 増強された ( $n = 115 / 5$  dishes; Fig. 2A, D)。一方、野生型 C6 細胞 ( $n = 185 / 8$  dishes) およびマウス ObRb を強制発現させた C6 細胞 (C6-ObRb;  $n = 190 / 11$  dishes) において、レプチンの単独刺激 (100 nM, 5 min または 500 nM, 5 min) による Ca<sup>2+</sup>濃度変化は観察されなかった (Fig. 2B)。また、C6-ObRb ( $n = 84 / 4$  dishes) におけるレプチン (100 nM) と CCK-8s (10 nM) の共刺激による Ca<sup>2+</sup>応答の大きさは、野生型 C6 細胞におけるものと有意差はなかった (by Student's *t*-test n.s.)。野生型 C6 細胞において、JAK 阻害剤 AG490 の前処理 (1  $\mu$ M, 10 min) により、レプチンによる CCK-8s 誘発性 Ca<sup>2+</sup>動員の増強作用が阻害された ( $n = 48 / 3$  dishes; Fig. 2C, D)。また、同じように PI3K 阻害剤である LY294002 (50  $\mu$ M) で処理した場合においても同様の結果が得られた ( $n = 45 / 3$  dishes; Fig. 2C, D)。これらの結果から、レプチンは JAK や PI3K を介して CCK シグナルを増強する作用を持つことが示唆される。

### C6 細胞における STAT3 リン酸化に関連するシグナル伝達の相互作用

次に、免疫組織化学によりレプチン受容体刺激に対する STAT3 のリン酸化応答を解析した。本実験では、リン酸化 STAT3 (pSTAT3) 免疫反応 (immunoreactivity; ir) を最大化するために、C6-ObRb を使用した。無刺激の C6-ObRb 細胞において、低レベルの核内 pSTAT3-ir が検出された (Fig. 3A)。レプチン (100 nM) 刺激により、核内 pSTAT3-ir が増加した (30 images / 3 dishes,  $F_{5,174} = 119.4, p < 0.01$  by one-way ANOVA; Fig. 3A, B)。一方で、CCK-8s (50 nM) 刺激により細胞質での pSTAT3-ir が誘導された (Fig. 3A)。CCK-8s 処理群の核内 pSTAT3-ir 強度は、無刺激対照群よりも有意に小さく (30 images / 3 dishes,  $F_{5,174} = 119.4, p < 0.01$  by one-way ANOVA; Fig. 3A, B)、pSTAT3 の細胞質への固定化が示唆された。興味深いことに、レプチン (100 nM) と CCK-8s (50 nM) の共刺激により、核内 pSTAT3-ir が誘導されたものの、その強度はレプチン単独刺激と比べ有意に小さかった (30 images / 3 dishes,  $F_{5,174} = 119.4, p < 0.01$  by one-way ANOVA; Fig. 3A, B)。AG490 (1  $\mu$ M) または LY294002 (50  $\mu$ M) の作用を  $Ca^{2+}$  イメージング実験と同様に解析した結果、これらのキナーゼ阻害剤の処理により核内 pSTAT3-ir は無刺激対照群を下回った (30 images / 3 dishes,  $F_{5,174} = 119.4, p < 0.01$  by one-way ANOVA; Fig. 3B)。また、CCK-8s 刺激とは異なり、細胞質 pSTAT3-ir は、これらのキナーゼ阻害剤によって上昇しなかった。これらの結果から、CCK はレプチンシグナルに対して抑制的に作用することが示唆される。

### CCK とレプチン受容体の共刺激による VMN 神経の活性化

満腹感を制御する神経に対するレプチン受容体と CCK 受容体の相互作用をさらに解析するために、ラット VMH スライスを用いた  $Ca^{2+}$  イメージング実験を行った。C6 細胞の場合とは異なり、高濃度レプチン (500 nM) により、VMN ( $65.4 \pm 7.5\%$ , 11 slices; Fig. 4A) および ARC ( $25.9 \pm 4.5\%$ , 12 slices) の細胞において細胞内  $Ca^{2+}$  増加応答が観察された。VMN において、レプチン応答細胞の大部分は 10 nM CCK-8s にも応答し、細胞内  $Ca^{2+}$  濃度が上昇した ( $81.3 \pm 9.1\%$ , 11 slices)。一方で、レプチン ( $12.2 \pm 1.5\%$ , 11 slices) または CCK-8s ( $5.2 \pm 1.1\%$ , 11 slices; Fig. 4A) にのみ応答する細胞も存在した。次に、レプチン (1-1000 nM) と 1 nM CCK-8s の共刺激、または 1  $\mu$ M LGM で処理した後の VMN 細胞へのレプチン刺激に対する応答を解析した (Fig. 4B, C)。VMN 細胞 ( $n = 216$ , 18 slices) において 1 nM の CCK-8s により  $Ca^{2+}$  濃度変化は観察されなかった一方で、レプチンとの共刺激の場合、レプチン誘発  $Ca^{2+}$  応答が増強された ( $F_{2,16} = 7.09, p < 0.01$  by two-way ANOVA; Fig. 4C)。逆に、LGM 処理によりレプチン誘発  $Ca^{2+}$  応答は抑制された ( $F_{2,16} = 7.09, p < 0.01$  by two-way ANOVA; Fig. 4C)。

次に、VMN 神経の神経活動をモニターするために、ホールセルパッチクランプを行った。保持電位を -60 mV に設定した場合、平均発火頻度は  $1.45 \pm 0.07$  Hz であった ( $n = 9$ )。1 nM CCK-8s の添加による発火頻度の変化はほとんど観察されなかった ( $1.28 \pm 0.15$  Hz,  $n = 9, F_{3,32}$ )。

= 8.46, n.s. by one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test; Fig. 5A) 。また、30 nM レプチンの添加による発火頻度の変化も同様にほとんど観察されなかった ( $1.55 \pm 0.13$  Hz,  $n = 9$ ,  $F_{3, 32} = 8.46$ , n.s. by one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test; Fig. 5B) 。一方、1 nM CCK-8s と 30 nM レプチンを同時に添加した場合、発火頻度の有意な増加が観察された ( $3.49 \pm 0.68$  Hz,  $n = 9$ ,  $F_{3, 32} = 8.46$ ,  $p < 0.01$  by one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test; Fig. 5C)。9つの記録の内5つの神経において発火頻度の明らかな増加(2倍以上)を示し、最高発火頻度は 5.5Hz に達した (Fig. 5C)。

### 生体内におけるシグナル伝達の相互作用

生体内におけるシグナル伝達の相互作用を調べるために、以下の2つの実験を行った。まず、直接的な相互作用を観察するために、脳室内にレプチン (4  $\mu$ g) 単独投与またはレプチンと CCK-8s (2  $\mu$ g) の共投与を行い、ラット VMN における核内リン酸化 STAT3 (pSTAT3) を免疫組織化学により可視化した。内因性シグナルの影響を最小限にするため、すべてのラットは脳室内投与の10時間前から餌を与えないようにした。この条件下でレプチンを脳室内投与すると、核内 pSTAT3-ir が有意に増加した (溶媒対照群の3倍、 $F_{2, 33} = 36.03$ ,  $p < 0.01$  by one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test ; Fig. 6)。一方で、レプチンと CCK-8s を同時に投与した場合、VMN の核内 pSTAT3-ir は対照群と比べ有意な差は検出されなかった (n.s. by one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test; Fig. 6)。以上の結果は、レプチン投与により STAT3 のリン酸化が誘導され、CCK によりレプチンシグナリングが阻害されることを示しており、これは C6 細胞を用いた結果 (Fig. 3) と一致している。

次に、より生理的な条件下でのシグナル伝達の相互作用を明らかにするため、ラットの CCK-1 受容体の機能阻害による影響を検討した。しかし、CCK-1 受容体アンタゴニスト (LGM) の腹腔内投与は摂食量の増加を引き起こすことが知られている<sup>10,12,13,14,15,16,17,18,19</sup>。したがって、LGM の腹腔内投与は食事量やエネルギー摂取に伴う内因性 CCK およびレプチン放出に影響すると思われた。そこで、条件を安定させるために Fig.7A に示した1日1時間の制限給餌条件に5日間馴化させたラットを実験に使用した。5日間の制限給餌期間中、ラットの平均体重は減少したが ( $-8.1 \pm 0.9\%$ )、1日の摂餌量は4日目から安定した (Fig. 8)。またラットは制限給餌終了直後に生理食塩水を毎日注射することで腹腔内投与実験に順応させ、5日目に生理食塩水または LGM (2 mg/kg または 10 mg/kg) を腹腔内投与した。最終投与の3時間後、自由摂食に戻し、餌へのアクセス頻度を測定した。その結果、再給餌開始時の餌へのアクセス頻度は、10 mg/kg の LGM 投与によって有意に増加した (生理食塩水対照群の1.8倍、 $F_{2, 14} = 4.63$ ,  $p < 0.05$  by repeated one-way ANOVA ; Fig. 7B)。

上記の行動実験において、LGM 投与による摂食行動量の増加が観察されたタイミングにおけるシグナル伝達への影響を解析した。行動実験とは異なる群のラットを使用し、制限給餌5日目に LGM (10 mg/kg) または生理食塩水を投与し3時間後にラットを灌流固定した。その後、VMH において核内 pSTAT3 と c-Fos を標的とした免疫組織化学的解析を

行った。ARC はアストロサイトに富む腹側神経核であるため、アストロサイトマーカー (glial fibrillary acidic protein, GFAP) の多重免疫組織化学を行い、ARC と VMN を区別した (Fig. 9A)。制限給餌後の LGM 投与により、ARC では c-Fos-ir が変化しなかった一方、pSTAT3-ir は増加した (14 images in 4 rats,  $p < 0.01$  by Student's *t*-test; Fig. 9A, C)。VMN では、LGM 投与により c-Fos-ir は有意に減少し (18 images in 4 rats,  $p < 0.05$  by Student's *t*-test)、一方 pSTAT3-ir は有意に増加した ( $p < 0.05$  by Student's *t*-test, Fig. 9B, C)。この結果から、内因性の CCK シグナルの阻害により、レプチン受容体シグナリングが増強されたと考えられる。

## 考察

CCK とレプチンは共に満腹感を制御するペプチドであり、その相乗的な役割が報告されている<sup>46,47,48</sup>。レプチンと CCK シグナルの直接的な機能的相互作用は、ObRb と CCK-1 受容体を共発現し、満腹感を調節することが知られている末梢の節状神経節神経で報告されている<sup>53,54</sup>。しかし、中枢神経系の満腹感を制御する領域では、同様の直接的な相互作用は報告されていない。本研究では、VMH においてレプチンと CCK-8s の共刺激により、活動電位および細胞内  $Ca^{2+}$  濃度が相乗的に増強されることを明らかにした。さらに、*in vitro* および *in vivo* モデルを用いて、満腹感の制御に関連すると考えられる細胞内シグナルの相互作用を解析し、CCK シグナルはレプチン誘発性の核内 pSTAT3 蓄積を抑制する一方で、レプチンシグナルは CCK-8s 誘発性の  $Ca^{2+}$  動員を増強する関係性が示唆された。

まず、本研究では、ラット C6 グリオーマ細胞を用いて、CCK およびレプチンを介した細胞内シグナル伝達を解析した。C6 細胞は、ObRa と ObRb を発現していることが報告されている<sup>44,55</sup>。また、C6 細胞において CCK-2 受容体の発現が報告されている<sup>56</sup>。本研究ではリアルタイム RT-PCR と  $Ca^{2+}$  イメージングアッセイを用いて、C6 細胞における機能的な CCK-1 受容体の発現を確認した。CCK 受容体のサブタイプは細胞によって異なる可能性があるが、CCK-1 および CCK-2 受容体はともに Gq タンパク質共役型受容体であるため、C6 細胞をモデルとして、レプチンと CCK 受容体の相互作用を解析した。その結果、レプチン前処理により CCK 誘発性の細胞質  $Ca^{2+}$  動員が増強されることが示された。一方で、C6 細胞において、マウス ObRb を過剰発現させた場合においてもレプチン単独刺激による細胞質  $Ca^{2+}$  濃度変化は観察されなかった。レプチン刺激は、求心性迷走神経<sup>57</sup>、視床下部アストロサイト<sup>44</sup>、ブタ副腎髄質クロム親和性細胞<sup>58</sup> で細胞質  $Ca^{2+}$  を増加させることが報告されている。また、本研究では、ラット VMN 細胞において、レプチン刺激により細胞質  $Ca^{2+}$  上昇応答が見られた。C6 細胞での結果により、レプチンによる  $Ca^{2+}$  動員は、他の受容体シグナル分子や神経細胞で特異的に発現するイオンチャネルの活性化による間接的な反応であることが示唆される。

巨核芽球細胞において、Gq タンパク質共役型受容体である P2Y 受容体を介した ADP 誘発性の  $Ca^{2+}$  動員がレプチンとの共刺激により増強されることが既に報告されている<sup>59</sup>。この細胞において、レプチンは JAK2 を介して Gq $\alpha$  タンパク質に存在するチロシン残基のリン酸化を促進することから、C6 細胞においてもレプチンは同様の仕組みで CCK 受容体のシグナルを促進する可能性がある。さらに、本研究では PI3K 阻害剤である LY294002 が、レプチンによる CCK 誘発性  $Ca^{2+}$  動員の増強を阻害することも明らかにした。したがって、さらに下流のシグナルにはホスファチジルイノシトールシグナルの活性化も関与している可能性がある。

末梢性 CCK は脳への透過性が限られているため、消化管から分泌された CCK が中枢神経系に直接影響を及ぼすかどうかは議論の余地がある。また、CCK を介した満腹感の制御

は、主に求心性迷走神経を介することが示唆されている<sup>60,61</sup>。加えて、CCK は血液脳関門を越えて脳内に発現する CCK-1 受容体を介して満腹感を刺激するという報告もある<sup>15,62,63</sup>。実際、視床下部神経には CCK ペプチドが多く含まれており<sup>23,24</sup>、レプチン受容体の発現が知られている視床下部の満腹感制御中枢には、CCK-1 受容体が発現している<sup>20,64</sup>。したがって、視床下部の満腹中枢神経において、レプチンにより内在性の CCK シグナルが増強されたことは妥当だと考えられる。

VMN および ARC 神経の初代培養においてレプチンは細胞質  $Ca^{2+}$  振動を減少させることが示されているが<sup>40</sup>、本研究では VMN 細胞においてレプチン刺激後の細胞質  $Ca^{2+}$  レベルの明らかな減少は確認されなかった。本研究の  $Ca^{2+}$  イメージングアッセイでは、シナプス間伝達を防ぐために、すべての実験を  $0.5 \mu M$  テトロドトキシン存在下で行った。したがって、レプチンの抑制作用が観察されなかったのは、実験条件の違いに起因する可能性がある。一方で、本研究ではレプチン刺激後、大多数の VMN 細胞で  $Ca^{2+}$  上昇が観察された。VMN 領域では GFAP 陽性細胞がほとんど観察されなかったことから、これらの反応は主に神経細胞のものであると推測される。VMN における  $Ca^{2+}$  イメージングの結果、レプチンまたは CCK-8s にのみ反応する細胞が約 5-12% 存在することが示された。したがって、CCK シグナルカスケードとは独立した  $Ca^{2+}$  動員機構が存在する可能性がある。しかし、レプチンによる  $Ca^{2+}$  上昇を示す細胞の 80% 以上が CCK-8s にも反応しており、両者の強い関連性が示唆された。また、VMN 神経において、低濃度の CCK-8s とレプチン存在下で発火頻度の増加を示した。さらに、一般に神経興奮や  $Ca^{2+}$  上昇の下流である c-Fos 発現は、LGM 投与後の VMN で著しく減少していた。興味深いことに、VMH 欠損ラットはレプチンによる満腹感の促進作用が失われていることが報告されている<sup>65</sup>。レプチンの CCK 誘発性  $Ca^{2+}$  動員および VMN 神経の活動電位発火に対する正の作用は、視床下部の満腹感制御のためのシグナル伝達機構に関連している可能性がある。VMN 神経の発火はインスリンとグルコースにも感受性があることが知られているので<sup>66</sup>、VMN は多様な満腹感やエネルギー制御シグナルを統合できる可能性があると考えられる。

本研究により C6 細胞において、レプチンによる核内 pSTAT3 の蓄積が CCK-8s との共刺激により抑制されることが示された。ラット節状神経節神経の初代培養を用いた先行研究では CCK-8s とレプチンの共刺激により pSTAT3 レベルが増加することが報告されている<sup>53,54</sup>。これらの先行研究では、pSTAT3 の総量が定量されており、細胞内分布は考慮されていない。一方、本研究では CCK-8s 刺激により C6 細胞の細胞質での pSTAT3 の蓄積が促進され、レプチン刺激に伴う pSTAT3 の核内蓄積が抑制された。この結果は予想外であったため、本研究ではこのような負の制御がラット VMN で起こり得るかどうかを検討した。その結果、レプチンと CCK-8s を脳室内に同時投与すると、レプチン単独投与に比べ、ラット VMN 神経の核内 pSTAT3 レベルが減少することが明らかになった。したがって、モデル細胞株だけでなく、ラット視床下部神経においても、核内 pSTAT3 は CCK シグナルによって負の制御を受けていることが示唆された。

最後に、自由行動下の動物における CCK とレプチン受容体シグナルの相互作用を調べるために、LGM の全身投与を検討した。しかし、アゴニストあるいはアンタゴニスト投与による生体内でのこれらの受容体の薬理的な操作は、摂食行動に影響を与え、間接的にこれらの内在性シグナル伝達に影響を与える可能性がある。このような二次的作用を排除するために、本研究では 1 時間の制限給餌の後、内因性の CCK およびレプチンシグナルが定常レベルの状態に CCK-1 受容体を薬理的に遮断した。その結果、(1) LGM 投与により、投与後 3 時間経過したラットに再摂食させると摂食行動が増強された。また、(2) LGM 投与により VMN と ARC で核内 pSTAT3 レベルが増加することが明らかになった。このように、少なくともこの実験条件下では、内因性 CCK-1 受容体シグナルの遮断は VMH における核内 pSTAT3 の蓄積を促進する。この結果は、C6 細胞や脳室内投与実験で得られた CCK-8s により核内 pSTAT3 が減少する結果と一致するものであった。

CCK とレプチンは、一般に満腹感を制御するペプチドとして知られているが、その役割の違いも報告されている。CCK は食事回数を減らし、最終的には食事量に対する影響を相殺することが示されている<sup>67-69</sup>。一方で、レプチンは食事量が減少するが食事回数は変化しない<sup>34,35</sup>。これはレプチンシグナルを介した体重調節へのより長期的な影響を示唆している。ObRb に関連する様々な細胞内シグナル伝達経路のうち、どの経路がどのような満腹感の制御に関連しているかは未だ不明である。STAT3 のリン酸化は JAK/STAT 経路を反映することから、一般的に pSTAT3 は ObRb 活性化のマーカーとして使用されている<sup>36,70</sup>。また、STAT3 は転写因子であるため、遺伝子発現を介した長期的な生理的制御に関与すると思われる。本研究では、短期的な満腹感制御において、これまでに報告された一般的なレプチンシグナルとは異なり、核内 pSTAT3 レベルは満腹度と負の相関がみられた。よって、短期と長期の満腹制御では細胞内シグナリング機構が異なることが示唆された。

## 第2章 「昼行性ナイルグラスラットを用いた昼行性行動を制御する分子基盤の解明」

### 要旨

摂食のタイミングを含め、様々な行動の約1日のリズムを調節する体内時計は、視床下部視交叉上核 (SCN) に存在する中枢ペースメーカーにより支配されている。行動の昼・夜行性を問わず、時計中枢 SCN の神経活動は昼に高いことが知られているが、SCN ニューロンがどの脳神経回路を介して行動リズムを決定しているのかについては、まったく未解決の問題である。昼・夜行性決定機構の解明には昼行性動物と夜行性動物の比較研究が有用であるが、これまでのところ、昼行性齧歯類に関する知見は極めて少ない。そこで本研究では、昼行性齧歯類のナイルグラスラット (*Arvicanthis niloticus*) を用いて、以下の解析を行った。

まず、ナイルグラスラット時計遺伝子 (*Per1/2*、*Bmal1*、*Clock*、*Cry1/2*) の全長塩基配列を決定し、推定されるアミノ酸配列の種間比較を行った。その結果、ナイルグラスラットの時計遺伝子はヒト (一致率: 79.6~98.6%) よりもマウス (95.9~99.5%) やラット (95.2~99.5%) と高い相同性を示した。次に、ナイルグラスラットの SCN および、その一次投射先である PVN、二次投射先である海馬を解析対象として、時計遺伝子の発現リズムを解析した。その結果、ナイルグラスラットの SCN では、*Per1*、*Per2* の発現ピークが明期中頃となる概日リズムが見られた。なお、これらのリズムは夜行性のマウスと同位相であった。一方で、ナイルグラスラットの PVN や海馬の *Per1*、*Per2* 発現リズムは、SCN とほぼ同位相のリズムであり、マウスとは逆位相であった。よって、SCN の一次投射先で、すでに昼行性・夜行性の位相決定がなされていることが明らかとなった。

時計遺伝子はほぼ全身の細胞で発現しており、振動を薬理的に同期させることでモデル細胞 (セルライン) でも振動機構の解析を行うことが可能である。例えば、われわれは、ヒト網膜色素上皮細胞由来の細胞株 (がん化モデル細胞) を用いて、ヒスタミンに対する細胞レベルの振動応答を解析してきた (参考論文1)。そこで本研究では、昼行性ラットの細胞レベルでの研究を可能とするために、ナイルグラスラット線維芽細胞の培養を行った。また、時計遺伝子 (*Bmal1*) 発光レポーターを安定発現させた細胞株を樹立した。この細胞株を多チャンネル化学発光分析機により解析し、時計遺伝子発現リズムを調節することができる生理活性物質の探索をおこなった。その結果、ATP が *Bmal1* の発現量を増加させ、リズム位相をシフトさせる作用を持つことが明らかとなった。一方で、雷公藤として漢方薬で用いられる台湾クロヅル (根) に含まれる生理活性成分 (セラストロール) が、*Bmal1* の発現量を減少させ、リズムを減衰させることを明らかにした。セラストロールは、抗肥満・抗炎症作用が知られており、レプチン感受性を増強することが報告されている。よって、これらの結果から、満腹シグナルはフィードバックして時計遺伝子振動を制御し得ることが示唆される。われわれのグループは、ミトコンドリアを介した細胞内  $Ca^{2+}$  シグナルが概日ペースメーカーの振動形成に不可欠であることを報告してきた (参考論文2)。よって、代謝制御と体内時計は、行動の昼・夜行性を問わず、根源で深く連関しているのかもしれない。

## 序論

マウスやラットは、医学・薬学分野における実験用動物として広く利用されている。睡眠・覚醒サイクルをはじめとした体内時計研究においても、これら夜行性の齧歯類がモデルとして使われている。一方で、ヒトは昼行性であり、ヒトへの応用を目的とした研究に夜行性齧歯類のマウスやラットを使用することに関しては議論の余地がある。よって、昼行性齧歯類を用いた研究が求められるが、これまでに昼行性齧歯類を用いた研究は極めて限られている。また、根源的に問題として夜行性と昼行性を決定する神経機構は解明されていない。哺乳類の体内時計中枢は視床下部視交叉上核 (suprachiasmatic nucleus; SCN) であることは古くから知られている。例えば、SCN を損傷したラットでは恒常条件下において、概日リズムが失われることが確認されている<sup>74,75</sup>。SCN 神経では、夜間よりも昼間の方が高い神経活動リズムが報告されており、このリズムは生体外においても維持される<sup>76-78</sup>。SCN 神経の投射は視床下部室傍核(paraventricular nucleus; PVN)を含む近傍の脳領域に終始している。SCN から出力されたリズム情報はこれらの一次投射先を介して睡眠・覚醒中枢を含む様々な生理現象の支配領域へと伝達される。

また、概日時計の分子機構は主にマウスを用いた研究が進んでおり、主要時計遺伝子の *Bmal1*, *Clock*, *Period (Per)*, *Cryptochrome (Cry)* を中心とした転写翻訳フィードバックループ機構の存在が知られている。時計遺伝子産物 (時計タンパク質) である BMAL1 と CLOCK は転写因子として機能し、ヘテロダイマーを形成して *Per* と *Cry* 遺伝子上流に位置する E box エンハンサー領域に結合してその転写を活性化する<sup>79-83</sup>。PER と CRY はヘテロダイマーを形成し、核内に移行して CLOCK/BMAL1 による転写活性化を抑制する。以上のような概日時計の神経・分子機構は、霊長類を含む多種多様な哺乳類で高い共通性が示されている<sup>84-88</sup>。

このような概日時計の共通性が明らかにされている一方で、昼行性行動と夜行性行動を切り替えるメカニズムはほとんどわかっていない。この疑問を解決するために、アフリカ原産の 2 種のグラスラット、ナイルグラスラット (*Arvicanthis niloticus*) とスーダングラスラット (*Arvicanthis ansorgei*) が体内時計研究における昼行性齧歯類モデルとして使用されている。ナイルグラスラットは、1993 年にケニア南部で捕獲された個体をもとに、アメリカミシガン州立大学の Laura Smale 博士によって繁殖が開始された。また、1998 年にフランスのストラスブール大学の Paul Pevet 博士の研究室によって、マリ南部で捕獲された個体をもとに、スーダングラスラットの繁殖が開始された<sup>89</sup>。核型解析により、これらのグラスラットは別種であることが示されたが<sup>90</sup>、比較研究は限られている。

SCN 神経における活動電位発火頻度は、ナイルグラスラット・スーダングラスラット両種において解析されており、行動リズムと相関した単峰性または双峰性の神経活動リズムが報告されている<sup>91,149</sup>。これと一致して、神経細胞興奮の指標である c-Fos 発現は、ナイルグラスラットの SCN において夜間よりも昼間の方が高く、夜行性ラットと同様のリズムを

示した<sup>92,93</sup>。さらに、ナイルグラスラットはランニングホイールを提示すると、一部の個体は夜行性型の行動パターンに反転する特性を持ち、夜行性個体における SCN 内での c-Fos 発現は昼行性個体と同様に昼間に高まることが報告されている<sup>94</sup>。これらのことから、ナイルグラスラットとスーダングラスラットでは SCN 神経の神経活動性は昼間に活動的であることが示唆される。

David Weaver のグループにより、ナイルグラスラットの時計遺伝子 *Per1* と *Per2* の部分配列が決定されている<sup>95</sup>。また、*In situ* ハイブリダイゼーションによる *Per1, Per2* mRNA の発現リズム解析の結果、SCN における *Per1* の発現は明期開始 6 時間後（環境時刻；zeitgeber time [ZT]6）に、*Per2* は明期開始 10 時間後（ZT10）にピークがあり、夜行性のラットやマウスと類似していることが確認された<sup>95</sup>。また、Novak らは、マウス *Per1*、ハムスター *Per1*、マウス *Per2* の塩基配列を参照して設計したプローブを使用し、ナイルグラスラットの SCN において *in situ* ハイブリダイゼーション解析を行っている<sup>96</sup>。その結果、マウス *Per1* プローブとハムスター *Per1* プローブのピークは共に ZT4-8 に位置し、マウス *Per2* プローブを用いたピークは ZT8-12 に位置することが明らかとなった<sup>96</sup>。さらに、マウス PER1 および PER2 に対するポリクローナル抗体を用いた免疫組織化学的解析により、SCN における PER1 および PER2 のタンパク質発現の解析結果が報告されている<sup>97</sup>。その結果、PER1 と PER2 のタンパク質発現リズムは、暗期に入ってから 2 時間後の ZT14 で共にピークを示すことがわかった。これらの結果は、ナイルグラスラットの *Per* 遺伝子配列、PER タンパク質構造、および SCN における発現パターンは、他の実験用齧歯類と相同であることを示唆するものである。以上の先行研究により、ナイルグラスラットの時計遺伝子 *Per1, Per2* の部分配列は決定されているが、*Per1, Per2* の全長配列および他の時計遺伝子の塩基配列は未だ決定されていない。

また、時計遺伝子はほぼ全身の細胞で発現しており、振動を薬理的に同期させることでモデル細胞（セルライン）でも振動機構の解析を行うことが可能である。これまでに、夜行性マウスやラット由来のモデル細胞を用いて、体内時計の分子振動機構が研究されてきた。時計遺伝子のプロモーター配列と発光酵素（ルシフェラーゼ）を連結した遺伝子を細胞に導入することで、ルシフェラーゼが時計遺伝子と同期して発現する。この細胞を用いて、ルシフェリン-ルシフェラーゼ反応による発光を測定することで、時計遺伝子の発現変動をリアルタイムに測定することが出来る。このような時計遺伝子レポーターを発現するモデル細胞は、時計遺伝子振動機構や転写翻訳フィードバック機構さらには時計遺伝子に対する薬効評価など、広範な研究に利用可能である。これまでのナイルグラスラット研究は、行動解析や組織学的解析が主であり、本種由来のモデル細胞は確立されておらず、分子レベルの研究は行われていない。

以上の背景から、本研究では、ナイルグラスラットの時計遺伝子 (*Per1, Per2, Clock, Bmal1, Cry1, Cry2*) の全長配列を決定し、相同性の比較を行った。また、ナイルグラスラットの各時計遺伝子の塩基配列に基づいて設計した PCR 用プライマーを用いて時計遺伝子の転写リ

リズムをリアルタイム RT-PCR により解析した。さらに、ナイルグラスラット由来の細胞株を作成し、時計遺伝子発現リズムに対する生理活性物質の影響を解析した。

## 方法

### 実験動物

本研究で使用したナイルグラスラットは、Laura Smale 博士（ミシガン州立大学）の許可を得て、Chidambaram Ramanathan 博士（メンフィス大学）から提供され、当研究室において確立した系統を使用した。ナイルグラスラットは、一定の温度（22±1°C）で明暗サイクル（明期：08:00～20:00、照度：125 lux）下で飼育された。水、チモシー（パスチャーチモシー、ハイペット株式会社）、アルファルファ（パスチャーアルファルファ、ハイペット株式会社）は自由摂取とした。通常の栄養混合飼料（ペレット：ラボ MR スタンダード、日本農産株式会社）は過剰な摂食およびそれに伴う糖尿病の発症を防ぐため、一日一個体あたり 6g をランダムな時刻に与えた。動物実験は、富山大学動物実験委員会により承認され、（承認番号：A2015SCI-3、A2018 SCI-2）、国立大学法人富山大学動物実験取扱規則に従って実施された。

### クローニングとシークエンス

RNAiso Plus（タカラバイオ）を用いて凍結視床下部組織から Total RNA を抽出した。PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser（タカラバイオ）を用いて、Total RNA から相補的 DNA（cDNA）を逆転写した。哺乳類の *Bmal1*, *Clock*, *Per1*, *Per2*, *Cry1*, *Cry2*, *GAPDH* の配列に基づいて、各遺伝子の degenerate primer（Table 1）を設計した。PCR は High-fidelity DNA polymerase（KOD-FX, TOYOBO）を用いて、98°C 2 分間の後、98°C 10 秒間-58°C 30 秒間-68°C 1 分間を 35 サイクルの条件で行った。PCR 産物を電気泳動で分離し、予測されるサイズのバンドをゲルから精製し、pT7Blue T-Vector（Merck Millipore）にライゲーションした。ライゲーションしたプラスミドをコンピテントセル（XL1-Blue, Invitrogen）へ形質転換し、GenElute Plasmid Midiprep Kit（Sigma Aldrich）を用いてプラスミド DNA を単離した。配列決定は、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit（Thermo Fisher Scientific）を用いて行った。塩基配列は、ABI PRISM 3100 3100 Genetic Analyzer（Thermo Fisher Scientific）を用いて決定した。完全長 cDNA は、アダプターおよび遺伝子特異的プライマー（Table 1）を用いて、5'-または 3'- RACE（rapid amplification of the cDNA ends）により取得した。

### RNA 抽出

#### i) ナイルグラスラットの各脳領域からの RNA 抽出

脳摘出は明期開始時刻（Zeitgeber time; ZT0）から ZT20 まで 4 時間おきに各時刻 4-8 匹ずつ使用した。ナイルグラスラットにペントバルビタール（10 mg/kg）を腹腔内投与し、深麻酔下にて脳の摘出を行った。まず、断頭し、頭蓋骨を露出させた。頭蓋骨に切れ込みを入れ、脳へ極力触れないよう頭蓋骨を剥がした。脳底部を丁寧に頭蓋骨より切り離し、視神経を伸ばさないよう切断した。そして脳を摘出し、ドライアイス上に置いてあるスラ

イドグラスに視床下部を下にして脳を乗せ、速やかにディープフリーザーに入れ、深部まで凍結させるために 20 分放置した。摘出作業は酵素による RNA 分解を抑制するため、5 分以内に完了した。-15 °C に設定したクライオスタット (SAKURA) を用いて上記の手順で凍結したナイルグラスラット脳ブロックから、本種のブレインマップ (高橋 2020 年度修士論文<sup>150</sup>) を参考にして SCN、PVN、海馬を含む脳切片を厚さ 99  $\mu\text{m}$  で作成し、スライドグラス (スーパーフロスト, 松浪硝子工業) に貼り付けた。脳スライス作成後、RNA 分解を防ぐために、-80 °C ディープフリーザーで冷やしておいた金属のプレート上で脳領域を採取した。SCN はテルモ注射針 23 G の先を平に加工したパンチアウト専用ニードルを使用してパンチアウトした。PVN は SCN をパンチアウトした後、その直上をホルダーに挟んだ白金線を用いて長方形にカットした。海馬はパンチアウト用ニードルで縁どり、くりぬいた。パンチアウトには、テルモ注射針 23 G の先を平に加工したパンチアウト専用ニードルを使用して、ターゲットとした脳領域をくり抜いた。くり抜いた脳組織は、RNA 抽出のために 350  $\mu\text{L}$  の Buffer RLT (RNeasy Micro Kit に付属) の入った 1.5 mL チューブに入れ、ボルテックスを用いて約 30 秒間混濁した。組織の入ったチューブは RNA 抽出まで常時氷上で維持した。RNeasy micro kit を用いて、各脳領域から Total RNA を抽出し、バイオフォトメーター (D30, eppendorf) を用いて RNA 濃度を測定した後、逆転写に利用、もしくは -30 °C フリーザーにて凍結保存した。

#### ii) 培養細胞からの RNA 抽出

35 mm ディッシュに 70-80% コンフルエントになるまで培養した細胞を使用した。ディッシュ中のメディアを交換してから 24 時間経過後の細胞に対してセラストール 1  $\mu\text{M}$  を投与し、4 時間経過後に RNA 抽出を行った。RNAiso Plus を使用し、付属のプロトコルに従い Total RNA を抽出し、バイオフォトメーター (D30, eppendorf) を用いて RNA 濃度を測定した後、逆転写に利用、もしくは -30 °C フリーザーにて凍結保存した。

#### リアルタイム RT-PCR

逆転写には、QuantiTect Reverse Transcription Kit (QIAGEN) を用いて、付属プロトコルに沿って、ゲノム DNA 除去および逆転写を行った。PCR 用プライマーは、本研究で配列決定したナイルグラスラット各遺伝子の塩基配列を参照して設計した (Table 1)。リアルタイム RT-PCR は、Rotor-Gene SYBR Green RT-PCR Kit (QIAGEN) を用いて行った。スタンダードプロトコルに従って、鋳型 cDNA、2 $\times$  Rotor-Gene SYBR Green、フォワードおよびリバースプライマー (各 100  $\mu\text{M}$ )、RNase free water を混合し、Rotor Gene Q system (QIAGEN) にセットした。2 ステップサイクリングの変性の温度と時間を 95 °C、5 秒間とし、アニーリング/エクステンションステップの温度と時間を 60 °C、10 秒間とし、サイクル数は 60 に設定した。各サンプル中の遺伝子発現量は、comparative quantification method (Rotor Gene Q software, QIAGEN) により比較定量した。サンプル間の総 cDNA 量の差を補正するために、目的遺伝子の発現量を GAPDH 発現量との相対値で示した。

### 線維芽細胞の単離

先行研究<sup>98</sup>を参考にし、ナイルグラスラットの皮膚および肺から線維芽細胞を単離した。皮膚由来の線維芽細胞の単離には3週齢の雄個体を、肺由来の線維芽細胞の単離には4日齢の個体（雌雄不明）を使用した。ペントバルビタール(50 mg/kg)を腹腔内投与し、深麻酔下にて単離を行った。皮膚の摘出の際には、わきの下の毛をメスで剃り、70%エタノールで滅菌し、約1 cm<sup>2</sup>の皮膚断片を切り取った。肺の摘出の際には、まず、胸部を70%エタノールで滅菌し、ハサミでT字に切開した。皮膚を引き離して、筋肉を露出させ筋肉部分を70%エタノールで洗浄し乾燥させた。ピンセットとハサミを使用して胸郭を切断した後、ピンセットとハサミを使用して約1 cm<sup>2</sup>の肺の断片を摘出した。摘出した組織片は滅菌 PBS に入れ保管した。クリーンベンチ内で、組織片を100 mm ディッシュに移し、メスで組織片を1 mm 以下に刻んだ。これを30 mL フラスコに移し、酵素入りのメディウム (1.08% Liberase (Roshe) , 1% antibiotic/antimycotic in DMEM) を入れ、40°Cに加熱したスターラーで80 rpmの速さで30-40分間攪拌した。全量を50 mL 遠沈管に移し、血清入りメディウム (15%FBS、1% antibiotic/antimycotic in DMEM/F12) を入れ、Liberase を不活性化させた。534 g, 5 min, RT で遠心後、上清を取り除き、メディウムで2回リンスすることで Liberase を除去した。組織片をメディウム 10 mL で再懸濁し、100 mm ディッシュに移し 37°C, 5%CO<sub>2</sub> (条件1) または 37°C, 5%CO<sub>2</sub>, 3%O<sub>2</sub> (条件2) でインキュベートした。2日後以降に組織断片から這い出てきた線維芽細胞が観察された。6-7日後にコンフルエントに達したタイミングで継代を行い、EMEM 培地 (15%FBS, 1%PS in EMEM (富士フィルム和光純薬)) で培養した。

### 不死化線維芽細胞株の作成

齧歯類において、単離した線維芽細胞の初代培養は継代培養を繰り返すことにより、自発的な形質転換が起き、不死化することが知られている<sup>99,100</sup>。そこで、本研究において単離したナイルグラスラット由来の線維芽細胞を継代培養により不死化した。肺由来の線維芽細胞は大気中酸素濃度 (条件1) での継代培養により不死化に至ったが、皮膚由来の線維芽細胞は不死化に至らなかったため、酸素濃度を3% (条件2) に下げて培養することで酸化ストレスを軽減した。

### 時計遺伝子発光レポーターコンストラクトの作成

産業技術総合研究所の中島芳浩先生より提供して頂いた高輝度ルシフェラーゼ (Emerald Luc; Eluc) レポーターベクター (ELuc-PEST::pGL3 Basic pYM1796-1) にナイルグラスラット *Bmal1* プロモーターとネオマイシン耐性遺伝子を組み込んだ。まず、ナイルグラスラットの視床下部ブロックから DNA を抽出し、KOD-FX を用いて *Bmal1* のプロモーター領域 (3292 bp) を増幅した (プライマー: Nile *Bmal1* std SES\_2, Nile *Bmal1* std ANT, Table 1)。次に、これを鋳型として同様に *Bmal1* プロモーター領域の上流 967 bp (*AnBmal1* プロモータ

一)を増幅した(プライマー:Nile Bmal-pro IF-SES3, Nile Bmal-pro IF-ANT1, Table 1)。また、pcDNA3 (Invitrogen)を鋳型としてネオマイシン耐性遺伝子(NeoR)を増幅した(プライマー:pcDNA3\_NeoR\_IF SES, pcDNA3\_NeoR\_IF ANT)。ELucベクターのインバースPCRを行い、線状化した(プライマー:pGL3 IF-SES2, pGL3 IF-ANT2)。In-Fusion HD Cloning Kit (タカラバイオ)を用いて、作成したNeoR遺伝子(1668 bp)を線状化したELucベクターに組み込んだ(ELuc-PEST-NeoR)。さらに、ELuc-PEST-NeoRのインバースPCRを行い(プライマー:pGL3 IF-SES1, pGL3 IF-ANT1)、In-Fusion HD Cloning Kitを用いてこれに*AnBmal1*プロモーター(967 bp)を組み込んだ(*AnBmal1*-ELuc-PEST-NeoR)。

### 遺伝子導入

細胞を35 mm ディッシュで60~70%コンフルエントになるまで培養した。Lipofectamine3000 (Invitrogen)を使用し、付属のプロトコルに従いリポフェクションを行った。2日後に選択培地(G418 200-800  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in DMEM/F12, 15%FBS, 1%PS)に交換し16-20日間セクションを行った。セクション終了後は通常培地(DMEM/F12, 15%FBS, 1%PS)を用いて維持した。また、一部のセクション条件には細胞の生存性をあげるためにROCK (Rho-associated coiled-coil forming kinase) 阻害剤であるY-27632 (富士フィルム和光純薬)を5  $\mu\text{M}$  添加した。肺由来の不死化線維芽細胞のセクション条件は、(1) G418 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (8day) + G418 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (12day), (2) G418 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (8day) + G418 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (12day) (Y-27632 5  $\mu\text{M}$  を添加), (3) G418 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (16day), (4) G418 800  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (4day) + G418 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (12day)、皮膚由来の不死化線維芽細胞のセクション条件は、(1) G418 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (19day), (2) G418 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (26day), (3) G418 800  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (10day), (4) G418 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (27day)とした。

### 発光イメージング

細胞を35 mm ディッシュで90%コンフルエントになるまで培養した。ディッシュ内の個々の細胞の概日振動を同期させるため、1  $\mu\text{M}$  デキサメタゾン (Dexamethasone; DEX, Sigma Aldrich)を添加した通常培地(DEX含有培地)で、1時間インキュベートした。DEX処理後、100  $\mu\text{M}$  ルシフェリン (D-luciferin, Promega)を含む通常培地に置換し、Kronos Dio (ATTO)により発光測定を行った。測定中のディッシュに対して任意の時刻においてセラストール(東京化成工業)またはATP (Sigma)による試薬刺激を行った。

### 統計解析

2群間の比較にはTwo-tailed Student's *t*-test または Welch's *t*-test 多群間比較には一元配置分散分析(one-way ANOVA) およびDunnnett's test を用いた。有意水準が95%以上の場合に有意であるとみなした。

## 結果

### 時計遺伝子の塩基配列および推定アミノ酸配列の比較解析

ナイルグラスラットの時計遺伝子 (*Per1/2*、*Bmall*、*Clock*、*Cry1/2*) の全長塩基配列を決定した (Fig. 10-13, Table 2)。ここから推定されるナイルグラスラット時計タンパク質のアミノ酸配列をヒト、マウス、ラットの時計タンパク質のアミノ酸配列 (GenBank より取得; Table 2) と比較した。その結果、ヒトよりもマウスやラットと高い相同性を示した。ナイルグラスラットとラットまたはマウス間の時計タンパク質アミノ酸配列の相同性は、95.2~99.5%であった (Table 3, Fig. 10-13)。一方、ナイルグラスラット・ヒト間における時計タンパク質アミノ酸配列の相同性は比較的 low (79.6~98.6%)、特に PER2 の相同性は約 80% の一致率が示された (Table 3, Fig. 10-13)。次に、各時計タンパク質の機能ドメインについて比較した。その結果、BMAL1 と CLOCK に存在する機能ドメインである bHLH (basic helix-loop-helix)、および BMAL1、CLOCK、PER1、PER2 に存在する Per-Arnt-Sim (PAS) -A、PAS-B、PAC (PAS-associated C-terminal) 領域における相同性はそれ以外の領域 (C-terminal) と比較して高いことが示された (Table 4, Fig. 10-13)。

また、スーダングラスラットのゲノム配列 (ドラフトシーケンス) をフランス共和国ストラスブール大学 David Hicks 教授に提供して頂き、各時計遺伝子のタンパク質コード領域における塩基配列を比較した。その結果、BMAL1 と CLOCK の bHLH 領域のアミノ酸配列は、ナイルグラスラットとスーダングラスラットの間で 100% 一致していた。また、PER1、PER2、BMAL1、CLOCK の PAS-A ドメインのアミノ酸配列もナイルグラスラットとスーダングラスラットの間で同一であった。さらに、PER1 と CLOCK の PAS-B ドメインおよび PER2、BMAL1、CLOCK の PAC ドメインのアミノ酸配列についてもナイルグラスラットとスーダングラスラットの間で同一であった (Table 5)。また、時計遺伝子コード領域の塩基配列の比較の結果、ナイルグラスラットの時計遺伝子はマウス (94.5-96.6%)、ラット (93.3-96.1%)、ヒト (79.4-90.7%) と比べスーダングラスラット (98.0-99.6%) と相同性が高いことが示された (Table 3, 5)。これらの特徴から、ナイルグラスラットとスーダングラスラットは遺伝的に近縁であると考えられる。

### 時計遺伝子の mRNA 発現リズム解析

以上の解析において、時計遺伝子自体に昼・夜行性動物間で顕著な違いが見られなかったことから、次にナイルグラスラット時計遺伝子の発現解析を行った。SCN および、その一時投射先である PVN、二次投射先である海馬を解析対象として、時計遺伝子の転写リズムを解析した。SCN では、*Bmall*、*Per1*、*Per2*、*Cry1* の mRNA 発現量に有意な日内変動が観察された (*Bmall*:  $F_{5,33} = 3.80$ ,  $P < 0.01$ ; *Per1*:  $F_{5,32} = 5.54$ ,  $P < 0.01$ ; *Per2*:  $F_{5,32} = 3.92$ ,  $P < 0.01$ ; *Cry1*:  $F_{5,22} = 7.25$ ,  $P < 0.01$  by one way ANOVA; Fig. 14)。一方、*Clock* と *Cry2* では有意な変動は見られなかった (*Clock*:  $F_{5,31} = 1.47$  n.s.; *Cry2*:  $F_{5,22} = 1.20$  n.s. by one way ANOVA, Fig. 14)。*Per1* と *Per2*

の転写量は明期中頃 (ZT8) でピークに達する一方、*Bmall* の転写量には逆位相のリズムが見られた。PVN では、各時計遺伝子に有意な概日性変動はみられなかったものの、各時計遺伝子の転写リズムは SCN で見られたパターンとおよそ同位相となる傾向が見られた (Fig. 15)。海馬では、時計遺伝子の平均転写レベルは SCN より低く (55.2%,  $P < 0.01$  by Student's *t*-test)、*Bmall* と *Per2* だけが統計的に有意な転写リズムを示した (*Per2*:  $F_{5,25} = 3.12$ ,  $P < 0.05$ ; *Bmall*:  $F_{5,28} = 3.03$ ,  $P < 0.05$  by one way ANOVA; Fig. 16)。海馬における *Bmall* と *Per2* の発現パターンは、SCN で見られた発現パターン (Fig. 14) とおよそ同位相であった。

#### ナイルグラスラット由来不死化細胞株の作成と生理活性物質の作用解析

次に、ナイルグラスラット由来の不死化細胞株を作成した。まず、ナイルグラスラットの肺または皮膚組織から線維芽細胞を単離した。齧歯類の線維芽細胞は継代培養を繰り返すことで自発的に不死化することが知られている<sup>99,100</sup>。よって、これらの線維芽細胞を 37°C、5% CO<sub>2</sub> (条件 1) または 37°C、5% CO<sub>2</sub>、3% O<sub>2</sub> (条件 2) の条件に設定したインキュベーターで 3-4 日ごとに継代培養を行うことで、自発的な不死化を試みた。その結果、肺から単離した線維芽細胞は条件 1 で 21 回の継代により、皮膚から単離した線維芽細胞は条件 2 で 39 回の継代により、それぞれ不死化が確認された。次に、ナイルグラスラット *Bmall* (*AnBmall*) プロモーターにより駆動される発光レポーター (*AnBmall-ELuc*) コンストラクトを設計し、不死化した皮膚または肺由来の線維芽細胞に一過的に導入した。この細胞を dexamethasone (Dex) 1  $\mu$ M 1 時間の処理により、細胞間の時計振動を同調させ、発光強度変化を測定した。その結果、発光レポーターを一過的に発現する細胞では皮膚・肺由来ともに明瞭な発光リズムは観察できなかった (Fig. 17)。そこで、*AnBmall-ELuc* を導入した後、抗生物質の G418 を用いたセレクションを行った。その結果、各セレクション条件により不死化肺線維芽細胞に由来する 4 つの細胞集団、および不死化皮膚線維芽細胞に由来する 3 つの細胞集団を得ることが出来た。これらの細胞を用いた発光リズムを測定した結果、皮膚由来の細胞集団では明瞭な発光リズムが観察されなかったものの (Fig. 18)、肺由来のいくつかの細胞集団において約 24 時間周期を示す発光リズムが得られた (Fig. 19)。このうち、最も明瞭な発光リズムを示す細胞集団 (Fig. 19C, G) をナイルグラスラット由来の不死化細胞株として確立した (NLF-Luc 細胞)。

次に、確立した NLF-Luc 細胞を用いて時計遺伝子発現リズムに対する生理活性物質の作用を検討した。まず、ATP が *AnBmall-ELuc* 発光リズムに及ぼす影響を解析した。Dex 処理 36 時間後に ATP を投与した結果、発光量の一時的な増加が観察された (Fig. 20A, B)。さらに、漢方由来成分であるセラストロールの作用を解析した。セラストロールは漢方として使用されている台湾クロズル (*Tripterygium wilfordii*) から単離された物質で、抗炎症作用や抗肥満作用を持つことが知られており<sup>101,102</sup>、行動リズムに対して影響することも報告されている<sup>103,104</sup>。Dex 処理 24 時間後にセラストロールを投与した結果、発光量の低下が観察された (Fig. 20C)。5  $\mu$ M 以上の濃度では、発光量がバックグラウンドと同程度にま

で低下し細胞死が観察された。Dex 処理 36 時間後にセラストロールを投与した結果、同様に発光量の低下が観察された (Fig. 20D)。Dex 処理直後のタイミングでセラストロールを投与した場合、濃度に依存して一時的に発光量が増加したものの、48-72 時間以降は溶媒投与群と比べて発光量が低下した (n=3, Fig. 20E)。また、Dex 処理直後にセラストロールを投与した条件において、3 日経過時点での平均発光量を定量した結果、溶媒投与群と比べて 0.5  $\mu$ M 以上の濃度において、有意に発光量が低下したことが示された。 ( $p < 0.05, 0.01$  by Dunnett's test, Fig. 20F)。さらに、セラストロール投与による時計遺伝子の転写量変化を解析するために、メディウムチェンジから 24 時間後の NLF-Luc 細胞に対してセラストロール 1  $\mu$ M を 4 時間投与し、リアルタイム RT-PCR により *Bmal1* と *Per2* の転写量を解析した (Fig. 21)。その結果、*Bmal1* の転写量は変化しなかったものの (Fig. 21A)、*Per2* の転写量は有意に増加した。 ( $p < 0.05$  by Welch's *t*-test Fig. 21B)

## 考察

本研究により、ナイルグラスラットの時計遺伝子 (*Per1/2*、*Bmall*、*Clock*、*Cry1/2*) の全長塩基配列を初めて決定し、データベース上に登録した (Table 2)。アミノ酸配列の種間比較の結果、昼行性・夜行性に関わらず、齧歯類間において時計遺伝子の保存性が高いことが示された。今回解析した6遺伝子において、昼行性・夜行性間で顕著な違いは見られなかったことから、時計遺伝子の機能は昼・夜行性間で共通していると示唆される。また、ナイルグラスラットとスーダングラスラットの比較により、両種の時計遺伝子は塩基配列レベルで相同性が高く、遺伝的に近縁であることが示された。よって、別々の研究機関で研究されている2種のグラスラットは極めて近縁であり体内時計機構の高い共通性を持つことから、両種を用いた研究結果は相互に適応可能であると考えられる。

ナイルグラスラットの SCN における時計遺伝子の発現リズムは夜行性齧歯類の報告<sup>105-107</sup>とおよそ一致していた。上述した時計遺伝子の高い相同性と合わせて、時計遺伝子 (時計タンパク質) の転写翻訳フィードバック機構およびその機能は昼・夜行性間で共通であると考えられる。また、先行研究により報告された、ナイルグラスラットの SCN における時計遺伝子 (*Per1*, *Per2*) の転写リズム<sup>95,96</sup>と本研究結果を比較すると、*Per1* および *Per2* の発現パターンはおよそ一致しており、本研究結果は、これらの先行研究結果を裏付ける重要な知見である。一方で、ナイルグラスラットの SCN において *Cry1* 転写量は昼と夜にピークをもつ二峰性リズムを示した (Fig. 14)。夜行性齧歯類を用いた先行研究により *Cry1* 転写リズムは明期と暗期の間 (ZT12) 付近にピークを持つリズムが示されており<sup>108-110</sup>、本研究とは異なる。本研究において観察された *Cry1* の発現リズムが恒常暗条件などの異なる照明条件下で再現されるかなど、*Cry1* 発現リズムの再現性および生理的意義についてはさらなる検証が必要である。

先行研究により齧歯類以外にも、昼行性哺乳類の SCN における時計遺伝子発現リズムが報告されている。例えば、哺乳綱鯨偶蹄目に属するソアイヒツジ (*Ovis aries*) の *Per1/2*, *Bmall*, *Clock*, *Cry1/2*<sup>111</sup>、哺乳綱霊長目に属するオマキザル (*capuchin monkey*) の *Per2*, *Bmall*, *Clock*<sup>112</sup> やアヌビスヒヒ (*papio anubis*) の *Per1*, *Bmall*, *Cry1*, *Cry2*<sup>113</sup> についての報告がある。これらの報告で示された昼行性哺乳類の SCN における時計遺伝子の発現リズムは夜行性齧歯類とおよそ共通している。以上のことから、時計遺伝子の機能や転写翻訳フィードバック機構は昼行性・夜行性間で種を超えて保存されていること、また体内時計中枢である SCN 神経の内因的なリズム位相は昼・夜行性間で一致しているといった、昼・夜行性間の共通性が示唆される。よって、昼・夜行性行動パターンの選択には SCN 以外の脳領域が重要な役割を持つと考えられた。

そこで、次にナイルグラスラットの PVN (SCN の一次投射先) および海馬 (SCN の二次投射先) における時計遺伝子転写リズムを解析した。本種の SCN の結果と比較すると、PVN および海馬では、時計遺伝子転写リズムがおよそ同位相であることがわかった (Fig. 15-16)。一方で、夜

行性齧歯類を用いた研究では、PVN および海馬における時計遺伝子(*Per1/2, Bmal1*)転写リズムの位相は、SCN の位相と比べ、およそ逆位相であることが報告されている<sup>114,115</sup>。よって、ナイルグラスラットの PVN および海馬における時計遺伝子発現リズムは、夜行性齧歯類とはおよそ逆転した位相を持つことが示された。このような昼・夜行性間における差異は、同じく昼行性齧歯類であるデグー(*Octodon degus*)を用いた報告<sup>116,117</sup>において、本研究結果と同様の結果が得られている。すなわち、時計遺伝子 *Per2* の発現リズムがデグーの SCN と SCN 以外の領域(帯状皮質、頭頂皮質、線条体)間において同位相であり、夜行性ラットでは SCN 以外の領域で逆位相のリズムが示された。また、最初期遺伝子である c-Fos の発現リズムを、ナイルグラスラットと夜行性ラットで比較した報告<sup>118,119</sup>では、SCN の c-Fos 発現リズムは両種間で類似しているが、SCN の投射先領域(ventral sub-paraventricular zone; vSPZ)においてはリズムが大きく異なることが報告されている。

以上をまとめると、昼・夜行性間で、SCN においては類似した概日リズムを示す一方で、PVN や vSPZ など SCN 神経の直接的な投射先や、海馬などの間接的な投射先においては、概日リズムの位相が異なることが示唆された。これは SCN 以外の脳領域および末梢組織における体内時計振動(末梢時計振動)が動物の行動リズムと連動しているという考え<sup>120</sup>を支持している。

SCN からの概日リズム出力過程において、一次投射先である PVN のリズム位相が昼・夜行性間で既に逆転していることから、SCN 神経から一次投射先脳領域への出力シグナルが、昼・夜行性間で異なる指令として伝達される可能性が考えられる。SCN 神経の出力機構については、夜行性齧歯類を用いた研究により明らかになりつつある。例えば、SCN 神経細胞の約 8 割が  $\gamma$ -アミノ酪酸(GABA)作動性神経であり<sup>121</sup>、SCN 神経のリズム情報出力には GABA が大きな役割を果たすことが報告されている<sup>122-125</sup>。よって、SCN 神経から SCN の投射先に対する GABA 出力が昼・夜行性間で異なる可能性が考えられる。GABA は通常、抑制性の神経伝達物質として知られているが、一部の神経では興奮性の作用を示すことが知られている<sup>126,127</sup>。実際、夜行性齧歯類を用いた先行研究において、SCN 神経は GABA 受容体刺激に対して、興奮性/抑制性の両方の応答を示すことが報告されている<sup>129-131</sup>。また、PVN を構成する神経の内、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン(CRH)を発現する神経は GABA に対して抑制性の応答を示すことが報告されている<sup>123,132</sup>一方で、アルギニンバソプレシン(AVP)を発現する PVN 神経は GABA に対して興奮性応答を示すことが報告されている<sup>148</sup>。一方で、昼行性動物における PVN 神経の GABA 応答性はこれまでに報告がなかった。そこで昨年、当研究室の春日の修士論文研究において、 $Ca^{2+}$ イメージングを用いてナイルグラスラットの PVN 神経に対する GABA の作用が解析された<sup>133</sup>。その結果、ナイルグラスラットの PVN 神経において GABA 刺激による  $Ca^{2+}$ 応答が確認された細胞の内、ほとんどが興奮性応答を示した。しかしながら、同研究においてマウスの PVN 神経を用いた解析の結果、同様に GABA の興奮性応答が多く観察され、どちらの種においても PVN 神経の GABA に対する応答性は興奮性が主であることが示唆された。この実験では幼若個体を

用いており、幼若個体の皮質神経は GABA に対して興奮性応答を示すことが知られている<sup>127,134</sup> ことから、成体個体を用いた電気生理学的解析が求められる。

本研究では、ナイルグラスラットの遺伝子解析に加えて、本種由来の不死化細胞株を確立し、生理活性物質の作用を解析した。線維芽細胞は単離条件下において時計遺伝子の明瞭な発現リズムを示すことから、体内時計研究において古くから細胞モデルとして使用されてきた<sup>135,136</sup>。また、線維芽細胞は継代培養により自発的に不死化することが知られていることから<sup>99,100</sup>、ナイルグラスラット由来の線維芽細胞の単離および継代培養により不死化を行い、本種由来の細胞株を初めて確立した。本研究において確立した細胞株は、ナイルグラスラット研究において遺伝子ベクターの確認や生理活性物質の作用解析など広範な実験に有用であると考えられる。さらに、この細胞株に対して時計遺伝子発光レポーターを導入し、時計遺伝子発現リズムに対する生理活性物質の影響を解析した結果、ATP 刺激により発光強度の増加が観察された。ATP は、イオンチャネル型の P2X 受容体と G タンパク質共役型の P2Y 受容体に結合する。P2X 受容体は、細胞外 ATP により活性化される非選択性陽イオンチャネルであり、P2X1-P2X7 の 7 つのサブタイプが知られている。ミクログリア細胞を用いた先行研究では、高濃度 ATP (1 mM) 刺激により P2X7 受容体を介して時計遺伝子 *Per1*, *Per2* の転写量が増加することが報告されている<sup>137</sup>。本研究では *Bmal1-Luc* 発光強度が ATP 刺激により増加したが、ATP はルシフェリン-ルシフェラーゼ反応に直接的に関わることから、受容体非依存的に発光強度を増加させた可能性があるため、P2X または P2Y 受容体のアゴニスト・アンタゴニストを用いて ATP の時計遺伝子に対する作用機構の解明を進めていく予定である。

漢方由来成分であるセラストロールはナイルグラスラット由来線維芽細胞株の *Bmal1-Luc* 発光強度を投与タイミングに応じて変化させた。セラストロールは抗炎症、抗肥満作用を持つことで知られているが<sup>101,102</sup>、行動リズムや体内時計に作用することも報告されている<sup>103,104</sup>。また、最近になって時計遺伝子発現リズムに対する影響も報告された<sup>139</sup>。*Per2-Luc* を発現させたヒト U2OS 細胞およびマウス NIH3T3 細胞を用いた先行研究により、セラストロールは *Per2* 発現リズムの位相変位、発現量増加、周期短縮の作用を持つことが示された<sup>139</sup>。一方本研究では、同調処理 24 または 36 時間後のセラストロール投与により、*Bmal1-Luc* 発光強度の減少とリズムの減衰が見られた。また、同調処理直後のセラストロール投与により *Bmal1-Luc* 発光強度の一時的な増加が観察されたものの 48-72 時間経過すると発光強度は溶媒投与群に比べ低下していた。さらに、リアルタイム RT-PCR を用いた解析の結果、NFL-Luc 細胞においてもセラストロール投与により *Per2* 転写量が増加したことから、セラストロールは各時計遺伝子に対して異なる作用を示すことが示唆される。これまでに、セラストロールは多様なシグナル経路に作用することが報告されているものの<sup>101,102</sup>、時計遺伝子の発現調節に対する作用機序は明らかにされていない。関節リウマチ患者の滑膜線維芽細胞を用いた先行研究により、セラストロールは小胞体膜上の  $Ca^{2+}$ ポンプ(sarco/endoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase ; SERCA) に作用し、細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度を上昇させる作用を持つことが

示されている<sup>140,141</sup>。さらに、セラストロールは炎症シグナルパスウェイを介してレプチン感受性やミトコンドリア生合成を調節することが示されている<sup>101,102</sup>。これまでに我々のグループは、アセチルコリン受容体やヒスタミン受容体の活性化が細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ シグナルを介して時計遺伝子の発現リズムを調節することを報告した<sup>72,142</sup>。また、ミトコンドリアを介した細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ シグナルが概日ペースメーカーの振動形成に不可欠であることを報告してきた<sup>143</sup>。以上のことからセラストロールは細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ シグナルや代謝制御シグナルを介して時計遺伝子の発現調節さらには行動リズムへの影響を及ぼす可能性がある。代謝制御と体内時計がどのように関連し、個体の行動を制御しているのかについては不明な点が多く残されており、今後の研究が期待される。

セラストロールは抗肥満作用の他にも、インスリン抵抗性を改善する作用<sup>102</sup>や季節性感情障害 (Seasonal Affective Disorder: SAD) (冬季うつ病) モデル動物 (メダカ) のうつ様症状を緩和する作用が報告されており<sup>144</sup>、肥満やうつ病の治療薬として期待されている。ナイルグラスラットは通常の飼料を与えるだけで肥満や糖尿病を発症する特性を持ち、高脂肪食や遺伝子操作などを必要とする従来のマウスやラットを用いた肥満モデルと比べ、より自然な肥満・糖尿病モデルとして期待されている<sup>145,146</sup>。また、当研究室においてこれまでに、低照度 (10 lux) 環境において SAD 様症状 (行動量の低下およびシヨ糖選好性の低下) を示すことを確認している。よって、今後はセラストロールの抗肥満、抗糖尿病、抗うつ作用および行動リズムへの影響を個体レベルでも解析していく。近年、薬の作用が昼夜で変化することが認識されつつあり、薬の開発において夜行性のマウスやラットを用いることの問題点が提唱されている<sup>147</sup>。昼行性であるナイルグラスラットを用いて薬効を評価することでこのような問題を解消することが可能である。ナイルグラスラットを用いた研究により、昼行性・夜行性の決定機構の解明や薬の開発研究などの進展が期待される。

## 謝辞

本実験の遂行にあたり、多大なるご支援、ご協力頂きました本学理学部生物学科 今野紀文講師、本学和漢医薬学総合研究所 スレスアワレ准教授、産業技術総合研究所 中島芳浩先生、Strasbourg 大学 David Hicks 教授にこの場を借りて厚く御礼申し上げます。また、本研究の計画遂行にあたり、ご指導とご鞭撻を賜りました富山大学 池田真行先生、望月貴年先生、森岡絵里先生、吉川朋子先生および本研究において多くのご協力をしていただいた池田研究室の皆様に対し厚く御礼申し上げます。

## 参考文献

1. Dockray, G. J. Cholecystokinin and gut-brain signalling. *Regul. Pept.* 155, 6-10 (2009).
2. Begg, D. P. & Woods, S. C. The endocrinology of food intake. *Nat. Rev. Endocrinol.* 9, 584-597 (2013).
3. Ivy, A. C. & Oldberg, E. A hormone mechanism for gallbladder contraction and evacuation. *Am. J. Physiol.* 86, 599-613 (1928).
4. Mutt, V. & Jorpes, J. E. Structure of porcine cholecystokinin-pancreozymin. 1. Cleavage with thrombin and with trypsin. *Eur. J. Biochem.* 6, 156-162 (1968).
5. Crawley, J. N., Fiske, S. M., Durieux, C., Derrien, M. & Roques, B. P. Centrally administered cholecystokinin suppresses feeding through a peripheral-type receptor mechanism. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 257, 1076-1080 (1991).
6. Gibbs, J., Young, R. C. & Smith, G. P. Cholecystokinin elicits satiety in rats with open gastric fistulas. *Nature* 245, 323-325 (1973).
7. Konturek, P. C. & Konturek, S. J. The history of gastrointestinal hormones and the Polish contribution to elucidation of their biology and relation to nervous system. *J. Physiol. Pharmacol.* 54, 83-98 (2003).
8. Kopin, A. S. *et al.* Expression cloning and characterization of the canine parietal cell gastrin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 3605-3609 (1992).
9. Ulrich, C. D. *et al.* Molecular cloning and functional expression of the human gallbladder cholecystokinin A receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 193, 204-211 (1993).
10. Moran, T. H., Ameglio, P. J., Schwartz, G. J. & McHugh, P. R. Blockade of type A, not type B, CCK receptors attenuates satiety actions of exogenous and endogenous CCK. *Am. J. Physiol.* 262, R46-R50 (1992).
11. Simmons, R. D., Kaiser, F. C. & Hudzik, T. J. Behavioral effects of AR-R 15849, a highly selective CCK-A agonist. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 62, 549-557 (1999).
12. Moran, T. H., Ameglio, P. J., Peyton, H. J., Schwartz, G. J. & McHugh, P. R. Blockade of type A, but not type B, CCK receptors postpones satiety in rhesus monkeys. *Am. J. Physiol.* 265, R620-R624 (1993).
13. Reidelberger, R. D. & O'Rourke, M. F. Potent cholecystokinin antagonist L 364718 stimulates food intake in rats. *Am. J. Physiol.* 257, R1512-R1518 (1989).
14. Reidelberger, R. D., Varga, G. & Solomon, T. E. Effects of selective cholecystokinin antagonists L364,718 and L365,260 on food intake in rats. *Peptides* 12, 1215-1221 (1991).
15. Reidelberger, R. D. Abdominal vagal mediation of the satiety effects of exogenous and endogenous cholecystokinin in rats. *Am. J. Physiol.* 263, R1354-R1358 (1992).
16. Reidelberger, R. D. *et al.* Cholecystokinin suppresses food intake by a nonendocrine

- mechanism in rats. *Am. J. Physiol.* 267, R901-R908 (1994).
17. Reidelberger, R. D., Castellanos, D. A. & Hulse, M. Effects of peripheral CCK receptor blockade on food intake in rats. *Am. J. Physiol.* 285, R429-R437 (2003).
  18. Williams, D. L., Baskin, D. G. & Schwartz, M. W. Hindbrain leptin receptor stimulation enhances the anorexic response to cholecystokinin. *Am. J. Physiol.* 297, R1238-R1246 (2009).
  19. Blevins, J. E. *et al.* Alterations in activity and energy expenditure contribute to lean phenotype in Fischer 344 rats lacking the cholecystokinin-1 receptor gene. *Am. J. Physiol.* 303, R1231-R1240 (2012).
  20. Ozaki, T., Mohammad, S., Morioka, E., Takiguchi, S. & Ikeda, M. Infant satiety depends on transient expression of cholecystokinin-1 receptors on ependymal cells lining the third ventricle in mice. *J. Physiol.* 591, 1295-1312 (2013).
  21. Maddison, S. Intraperitoneal and intracranial cholecystokinin depress operant responding for food. *Physiol. Behav.* 19, 819-824 (1977).
  22. Griesbacher, T., Leighton, G. E., Hill, R. G. & Hughes, J. Reduction of food intake by central administration of cholecystokinin octapeptide in the rat is dependent upon inhibition of brain peptidases. *Br. J. Pharmacol.* 96, 236-242 (1989).
  23. van den Pol, A. N. & Tsujimoto, K. L. Neurotransmitters of the hypothalamic suprachiasmatic nucleus: immunocytochemical analysis of 25 neuronal antigens. *Neuroscience* 15, 1049-1086 (1985).
  24. Hinks, G. L., Poat, J. A. & Hughes, J. Changes in hypothalamic cholecystokininA and cholecystokininB receptor subtypes and associated neuropeptide expression in response to salt-stress in the rat and mouse. *Neuroscience* 68, 765-781 (1995).
  25. Hirose, Y. *et al.* Cholecystokinin octapeptide analogues suppress food intake via central CCK-A receptors in mice. *Am. J. Physiol.* 265, R481-R486 (1993).
  26. Schick, R. R., Harty, G. J., Yaksh, T. L. & Go, V. L. Sites in the brain at which cholecystokinin octapeptide (CCK-8) acts to suppress feeding in rats: a mapping study. *Neuropharmacology* 29, 109-118 (1990).
  27. Blevins, J. E., Stanley, B. G. & Reidelberger, R. D. Brain regions where cholecystokinin suppresses feeding in rats. *Brain Res.* 860, 1-10 (2000).
  28. Blevins, J. E., Hamel, F. G., Fairbairn, E., Stanley, B. G. & Reidelberger, R. D. Effects of paraventricular nucleus injection of CCK-8 on plasma CCK-8 levels in rats. *Brain Res.* 860, 11-20 (2000).
  29. Chen, J., Scott, K. A., Zhao, Z., Moran, T. H. & Bi, S. Characterization of the feeding inhibition and neural activation produced by dorsomedial hypothalamic cholecystokinin administration. *Neuroscience* 152, 178-188 (2008).

30. Mohammad, S. *et al.* Functional compensation between cholecystokinin-1 and -2 receptors in murine paraventricular nucleus neurons. *J. Biol. Chem.* 287, 39391-39401 (2012).
31. Zhang, Y. *et al.* Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372, 425-432 (1994).
32. Campfield, L. A., Smith, F. J., Guisez, Y., Devos, R. & Burn, P. Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science* 269, 546-549 (1995).
33. Pelleymounter, M. A. *et al.* Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science* 269, 540-543 (1995).
34. Eckel, L. A. *et al.* Chronic administration of OB protein decreases food intake by selectively reducing meal size in female rats. *Am. J. Physiol.* 275, R186-R193 (1998).
35. Kahler, A. *et al.* Chronic administration of OB protein decreases food intake by selectively reducing meal size in male rats. *Am. J. Physiol.* 275, R180-R185 (1998).
36. Miller, R. J. & Bell, G. I. JAK/STAT eats the fat. *Trends Neurosci.* 19, 159-161 (1996).
37. Baumann, H. *et al.* The full-length leptin receptor has signaling capabilities of interleukin 6-type cytokine receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 8374-8378 (1996).
38. Bjørbaek, C. *et al.* Divergent roles of SHP-2 in ERK activation by leptin receptors. *J. Biol. Chem.* 276, 4747-4755 (2001).
39. Shanley, L. J., O'Malley, D., Irving, A. J., Ashford, M. L. & Harvey, J. Leptin inhibits epileptiform-like activity in rat hippocampal neurones via PI 3-kinase-driven activation of BK channels. *J. Physiol.* 545, 933-944 (2002).
40. Irani, B. G., Le Foll, C., Dunn-Meynell, A. & Levin, B. E. Effects of leptin on rat ventromedial hypothalamic neurons. *Endocrinology* 149, 5146-5154 (2008).
41. Irving, A. J., Wallace, L., Durakoglugil, D. & Harvey, J. Leptin enhances NR2B-mediated N-methyl-D-aspartate responses via a mitogen-activated protein kinase-dependent process in cerebellar granule cells. *Neuroscience* 138, 1137-1148 (2006).
42. Bingham, N. C., Anderson, K. K., Reuter, A. L., Stallings, N. R. & Parker, K. L. Selective loss of leptin receptors in the ventromedial hypothalamic nucleus results in increased adiposity and a metabolic syndrome. *Endocrinology* 149, 2138-2148 (2008).
43. Kohno, D., Gao, H. Z., Muroya, S., Kikuyama, S. & Yada, T. Ghrelin directly interacts with neuropeptide-Y-containing neurons in the rat arcuate nucleus: Ca<sup>2+</sup> signaling via protein kinase A and N-type channel-dependent mechanisms and cross-talk with leptin and orexin. *Diabetes* 52, 948-956 (2003).
44. Hsueh, H. *et al.* Obesity induces functional astrocytic leptin receptors in hypothalamus. *Brain* 132, 889-902 (2009a).

45. Kim, J. G. *et al.* Leptin signaling in astrocytes regulates hypothalamic neuronal circuits and feeding. *Nat. Neurosci.* 17, 908-910 (2014).
46. Barrachina, M. D., Martínez, V., Wang, L., Wei, J. Y. & Taché, Y. Synergistic interaction between leptin and cholecystokinin to reduce short-term food intake in lean mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 10455-10460 (1997).
47. Akieda-Asai, S., Poleni, P. E. & Date, Y. Coinjection of CCK and leptin reduces food intake via increased CART/TRH and reduced AMPK phosphorylation in the hypothalamus. *Am. J. Physiol.* 306, E1284-E1291 (2014).
48. Emond, M., Schwartz, G. J., Ladenheim, E.E. & Moran, T. H. Central leptin modulates behavioral and neural responsivity to CCK. *Am. J. Physiol.* 276, R1545-R1549 (1999).
49. Merino, B., Cano, V., Guzmán, R., Somoza, B. & Ruiz-Gayo, M. Leptin-mediated hypothalamic pathway of cholecystokinin (CCK-8) to regulate body weight in free-feeding rats. *Endocrinology* 149, 1994-2000 (2008).
50. McMinn, J. E., Sindelar, D. K., Havel, P. J. & Schwartz, M. W. Leptin deficiency induced by fasting impairs the satiety response to cholecystokinin. *Endocrinology* 141, 4442-4448 (2000).
51. Morton, G. J. *et al.* Leptin action in the forebrain regulates the hindbrain response to satiety signals. *J. Clin. Invest.* 115, 703-710 (2005).
52. Blevins, J. E., Schwartz, M. W. & Baskin, D. G. Evidence that paraventricular nucleus oxytocin neurons link hypothalamic leptin action to caudal brain stem nuclei controlling meal size. *Am. J. Physiol.* 287, R87-R96 (2004).
53. Li, Y., Wu, X., Zhou, S. & Owyang, C. Low-affinity CCK-A receptors are coexpressed with leptin receptors in rat nodose ganglia: implications for leptin as a regulator of short-term satiety. *Am. J. Physiol.* 300, G217-G227 (2011).
54. Heldsinger, A., Grabauskas, G., Song, I. & Owyang, C. Synergistic interaction between leptin and cholecystokinin in the rat nodose ganglia is mediated by PI3K and STAT3 signaling pathways: Implications for leptin as a regulator of short term satiety. *J. Biol. Chem.* 286, 11707-11715 (2011).
55. Hsuchou, H., Pan, W., Barnes, M. J. & Kastin, A. J. Leptin receptor mRNA in rat brain astrocytes. *Peptides* 30, 2275-2280 (2009b).
56. Kaufmann, R. *et al.* Type B cholecystokinin receptors on rat glioma C6 cells. Binding studies and measurement of intracellular calcium mobilization. *Brain Res.* 639, 109-114 (1994).
57. Peters, J. H., Karpel, A. B., Ritter, R. C. & Simasko, S. M. Cooperative activation of cultured vagal afferent neurons by leptin and cholecystokinin. *Endocrinology* 145, 3652-3657 (2004).
58. Takekoshi, K. *et al.* Ca<sup>2+</sup> mobilization, tyrosine hydroxylase activity, and signaling mechanisms in cultured porcine adrenal medullary chromaffin cells: effects of leptin.

- Endocrinology* 142, 290-298 (2001).
59. Nakata, M., Maruyama, I. & Yada, T. Leptin potentiates ADP-induced  $[Ca^{2+}]_i$  increase via JAK2 and tyrosine kinases in a megakaryoblast cell line. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 70, 209-216 (2005).
  60. Smith, G. P., Jerome, C. & Norgren, R. Afferent axons in abdominal vagus mediate satiety effect of cholecystokinin in rats. *Am. J. Physiol.* 249, R638-R641 (1985).
  61. Joyner, K., Smith, G. & Gibbs, J. Abdominal vagotomy decreases the satiating potency of cck-8 in sham and real feeding. *Am. J. Physiol.* 264, R912-R916 (1993).
  62. Reidelberger, R. D., Hernandez, J., Fritsch, B. & Hulce, M. Abdominal vagal mediation of the satiety effects of CCK in rats. *Am. J. Physiol.* 286, R1005-R1012 (2004).
  63. Ripken, D. *et al.* Cholecystokinin regulates satiation independently of the abdominal vagal nerve in a pig model of total subdiaphragmatic vagotomy. *Physiol. Behav.* 139, 167-176 (2015).
  64. Patterson, C. M., Leshan, R. L., Jones, J. C. & Myers, M. G. Jr. Molecular mapping of mouse brain regions innervated by leptin receptor-expressing cells. *Brain Res.* 1378, 18-28 (2011).
  65. Satoh, N. *et al.* Pathophysiological significance of the obese gene product, leptin, in ventromedial hypothalamus (VMH)-lesioned rats: evidence for loss of its satiety effect in VMH-lesioned rats. *Endocrinology* 138, 947-954 (1997).
  66. Cotero, V. E., Zhang, B. B. & Routh, V. H. The response of glucose-excited neurones in the ventromedial hypothalamus to decreased glucose is enhanced in a murine model of type 2 diabetes mellitus. *J. Neuroendocrinol.* 22, 65-74 (2010).
  67. West, D. B., Fey, D. & Woods, S. C. Cholecystokinin persistently suppresses meal size but not food intake in free-feeding rats. *Am. J. Physiol.* 246 R776-R787 (1984).
  68. West, D. B. *et al.* Infusion of cholecystokinin between meals into free-feeding rats fails to prolong the intermeal interval. *Physiol. Behav.* 39 111-115 (1987).
  69. Mori, T., Nagai, K., Nakagawa, H. & Yanaihara, N. Intracranial infusion of CCK-8 derivatives suppresses food intake in rats. *Am. J. Physiol.* 251 R718-R723 (1986).
  70. Heshka, J. T. & Jones, P. J. A role for dietary fat in leptin receptor, OB-Rb, function. *Life Sci.* 69, 987-1003 (2001).
  71. Ko, E. S. *et al.* The difference in mRNA expressions of hypothalamic CCK and CCK-A and -B receptors between responder and non-responder rats to high frequency electroacupuncture analgesia. *Peptides* 27, 1841-1845 (2006).
  72. Morioka, E., Kanda, Y., Koizumi, H., Miyamoto, T. & Ikeda, M. Histamine regulates molecular clock oscillations in human retinal pigment epithelial cells via  $H_1$  receptors. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* 9, 108; 10.3389/fendo.2018.00108 (2018).
  73. Kim, J., Nakajima, K., Oomura, Y., Wayner, M. J. & Sasaki, K. Electrophysiological effects

- of ghrelin on pedunculopontine tegmental neurons in rats: An in vitro study. *Peptides* 30, 745-757 (2009).
74. Moore, R. Y., & Eichler, V. B. Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res.* 42, 201-6 (1972).
  75. 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).
  76. 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).
  77. Welsh, D. K., Logothetis, D. E., Meister, M., & Reppert, S.M. Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron* 14, 697-706 (1995).
  78. Ikeda, M., *et al.* Circadian dynamics of cytosolic and nuclear Ca<sup>2+</sup> in single suprachiasmatic nucleus neurons. *Neuron* 38, 253-263 (2003).
  79. Antoch, M. P., *et al.* Functional identification of the mouse circadian clock gene by transgenic BAC rescue. *Cell* 89, 655-667 (1997).
  80. King, D. P., *et al.* Positional cloning of the mouse circadian clock gene. *Cell* 89, 641-53 (1997).
  81. van der Horst, G. T., *et al.* Mammalian Cry1 and Cry2 are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature* 398, 627-630 (1999).
  82. Jin, X., *et al.* A molecular mechanism regulating rhythmic output from the suprachiasmatic circadian clock. *Cell* 96, 57-68 (1999).
  83. Kume, K., *et al.* mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell* 98, 193-205 (1999).
  84. Schwartz, W. J., Reppert, S. M., Egan, S. M., & Moore-Ede, M. C. In vivo metabolic activity of the suprachiasmatic nuclei: a comparative study. *Brain Res.* 274, 184-187 (1983).
  85. Edgar, D. M., Dement, W. C., & Fuller, C. A. Effect of SCN lesions on sleep in squirrel monkeys: evidence for opponent processes in sleep-wake regulation. *J. Neurosci.* 13, 1065-1079 (1993).
  86. Tei, H., *et al.* Circadian oscillation of a mammalian homologue of the *Drosophila* period gene. *Nature* 389, 512-516 (1997).
  87. Sangoram, A. M., *et al.* Mammalian circadian autoregulatory loop: a timeless ortholog and mPer1 interact and negatively regulate CLOCK-BMAL1-induced transcription. *Neuron* 21, 1101-1113 (1998).
  88. King, D. P., & Takahashi, J. S. Molecular genetics of circadian rhythms in mammals. *Annu. Rev. Neurosci.* 23, 713-742. (2000).
  89. Verra, D. M, Sajdak, B. S., Merriman, D. K., & Hicks D. Diurnal rodents as pertinent animal models of human retinal physiology and pathology. *Prog. Retin. Eye Res.* 74, 100776 (2020).
  90. Challet, E., Pitrosky, B., Sicard, B., Malan, A., & Pévet, P. Circadian organization in a diurnal

- rodent, *Arvicanthis ansorgei* Thomas 1910: chronotypes, responses to constant lighting conditions, and photoperiodic changes. *J. Biol. Rhythms* 17, 52-64 (2002).
91. Schoonderwoerd, R. A., Caputo, R., Ramkisoensing, A., Janse, J. A., van Diepen, H. C., Raison, S., ... & Meijer, J. (2022). Behavioral activity increases neuronal activity in the circadian clock of diurnal *Arvicanthis ansorgei*. *bioRxiv*.
  92. Katona, C. & Smale, L. Wheel-running rhythms in *Arvicanthis niloticus*. *Physiol. Behav.* 61, 365–372 (1997).
  93. Nunez, A. A., Bult, A., McElhinny, T. L., & Smale, L. Daily rhythms of Fos expression in hypothalamic targets of the suprachiasmatic nucleus in diurnal and nocturnal rodents. *J. Biol. Rhythms* 14, 300–306 (1999).
  94. Smale, L., Castleberry, C., & Nunez, A. A. Fos rhythms in the hypothalamus of *Rattus* and *Arvicanthis* that exhibit nocturnal and diurnal patterns of rhythmicity. *Brain Res.* 899, 101-105 (2001).
  95. Lambert, C. M., Machida K. K., Smale, L., Nunez, A. A., & Weaver, D. R. Analysis of the prokineticin 2 system in a diurnal rodent, the unstriped Nile grass rat (*Arvicanthis niloticus*). *J Biol Rhythms.* 20, 206-218 (2005).
  96. Novak, C. M., Ehlen, J. C., Paul, K. N., Fukuhara, C., & Albers, H. E. Light and GABAA receptor activation alter period mRNA levels in the SCN of diurnal Nile grass rats. *European Journal of Neuroscience*, 24(10), 2843-2852. (2006).
  97. Ramanathan, C., Nunez, A. A., Martinez, G. S., Schwartz, M. D., & Smale, L. Temporal and spatial distribution of immunoreactive PER1 and PER2 proteins in the suprachiasmatic nucleus and peri-suprachiasmatic region of the diurnal grass rat (*Arvicanthis niloticus*). *Brain Res.* 1073-1074, 348-358 (2006).
  98. Seluanov, A., Vaidya, A., & Gorbunova, V. Establishing primary adult fibroblast cultures from rodents. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (44), 2033. (2010).
  99. Amand, M., Hanover, J. A., & Shiloach, J. A comparison of strategies for immortalizing mouse embryonic fibroblasts. *Journal of biological methods*, 3(2), e41. (2016).
  100. Rangarajan, A., Hong, S. J., Gifford, A., & Weinberg, R. A. Species- and cell type-specific requirements for cellular transformation. *Cancer cell*, 6(2), 171–183. (2004).
  101. Ng, S. W., Chan, Y., Chellappan, D. K., Madheswaran, T., Zeeshan, F., Chan, Y. L., ... & Panneerselvam, J. Molecular modulators of celastrol as the keystones for its diverse pharmacological activities. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 109, 1785-1792. (2019).
  102. Xu, S., Feng, Y., He, W., Xu, W., Xu, W., Yang, H., & Li, X. Celastrol in metabolic diseases: progress and application prospects. *Pharmacological research*, 167, 105572. (2021).
  103. Liu, J., Lee, J., Hernandez, M. A. S., Mazitschek, R., & Ozcan, U. Treatment of obesity with celastrol. *Cell*, 161(5), 999-1011. (2015).

104. Chellappa, K., Perron, I. J., Naidoo, N., & Baur, J. A. The leptin sensitizer celestrol reduces age-associated obesity and modulates behavioral rhythms. *Aging cell*, 18(3), e12874. (2019).
105. Dunlap J. C. Molecular bases for circadian clocks. *Cell*, 96(2), 271–290. (1999).
106. King, D. P., & Takahashi, J. S. Molecular genetics of circadian rhythms in mammals. *Annual review of neuroscience*, 23, 713. (2000).
107. Takahashi J. S. Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock. *Nature reviews. Genetics*, 18(3), 164–179. (2017).
108. Miyamoto, Y., & Sancar, A. Vitamin B2-based blue-light photoreceptors in the retinohypothalamic tract as the photoactive pigments for setting the circadian clock in mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(11), 6097-6102. (1998).
109. Okamura, H., Miyake, S., Sumi, Y., Yamaguchi, S., Yasui, A., Muijtjens, M., ... & Van Der Horst, G. T. Photic induction of mPer1 and mPer2 in cry-deficient mice lacking a biological clock. *Science*, 286(5449), 2531-2534. (1999).
110. Park, K., & Kang, H. M. Cloning and circadian expression of rat Cry1. *Molecules & Cells (Springer Science & Business Media BV)*, 18(2). (2004).
111. Lincoln, G., Messenger, S., Andersson, H., & Hazlerigg, D. Temporal expression of seven clock genes in the suprachiasmatic nucleus and the pars tuberalis of the sheep: evidence for an internal coincidence timer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(21), 13890-13895. (2002).
112. Valenzuela, F. J., Torres-Farfan, C., Richter, H. G., Mendez, N., Campino, C., Torrealba, F., ... & Serón-Ferré, M. Clock gene expression in adult primate suprachiasmatic nuclei and adrenal: is the adrenal a peripheral clock responsive to melatonin?. *Endocrinology*, 149(4), 1454-1461. (2008).
113. Mure, L. S., Le, H. D., Benegiamo, G., Chang, M. W., Rios, L., Jillani, N., ... & Panda, S. Diurnal transcriptome atlas of a primate across major neural and peripheral tissues. *Science*, 359(6381), eaao0318. (2018).
114. Wang, L. M. *et al.* Expression of the circadian clock gene Period2 in the hippocampus: possible implications for synaptic plasticity and learned behaviour. *ASN Neuro*. 1, e00012 (2009).
115. Chun, L. E., Woodruff, E. R., Morton, S., Hinds, L. R., & Spencer, R. L. Variations in phase and amplitude of rhythmic clock gene expression across prefrontal cortex, hippocampus, amygdala, and hypothalamic paraventricular and suprachiasmatic nuclei of male and female rats. *Journal of biological rhythms*, 30(5), 417-436. (2015).
116. Vosko, A. M., Hagenauer, M. H., Hummer, D. L., & Lee, T. M. Period gene expression in the diurnal degu (*Octodon degus*) differs from the nocturnal laboratory rat (*Rattus norvegicus*). *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 296(2), R353-R361. (2009).

117. Otalora, B. B., Hagenauer, M. H., Rol, M. A., Madrid, J. A., & Lee, T. M. Period gene expression in the brain of a dual-phasing rodent, the Octodon degus. *Journal of Biological Rhythms*, 28(4), 249-261. (2013).
118. Schwartz, M. D., Nunez, A. A., & Smale, L. Differences in the suprachiasmatic nucleus and lower subparaventricular zone of diurnal and nocturnal rodents. *Neuroscience*, 127(1), 13-23. (2004).
119. Todd, W. D., Gall, A. J., Weiner, J. A., & Blumberg, M. S. Distinct retinohypothalamic innervation patterns predict the developmental emergence of species-typical circadian phase preference in nocturnal Norway rats and diurnal Nile grass rats. *Journal of Comparative Neurology*, 520(14), 3277-3292. (2012).
120. Dibner, C., Schibler, U., & Albrecht, U. The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks. *Annu. Rev. Physiol.* 72, 517-549 (2010).
121. Moore, R. Y., & Speh, J. C. GABA is the principal neurotransmitter of the circadian system. *Neuroscience letters*, 150(1), 112-116. (1993).
122. Ono, D., Honma, K. I., Yanagawa, Y., Yamanaka, A., & Honma, S. GABA in the suprachiasmatic nucleus refines circadian output rhythms in mice. *Communications biology*, 2(1), 1-12. (2019).
123. Ono, D., Mukai, Y., Hung, C. J., Chowdhury, S., Sugiyama, T., & Yamanaka, A. The mammalian circadian pacemaker regulates wakefulness via CRF neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Science advances*, 6(45), eabd0384. (2020).
124. Paul, S., Hanna, L., Harding, C., Hayter, E. A., Walmsley, L., Bechtold, D. A., & Brown, T. M. Output from VIP cells of the mammalian central clock regulates daily physiological rhythms. *Nature communications*, 11(1), 1-14. (2020).
125. Maejima, T., Tsuno, Y., Miyazaki, S., Tsuneoka, Y., Hasegawa, E., Islam, M. T., ... & Mieda, M. GABA from vasopressin neurons regulates the time at which suprachiasmatic nucleus molecular clocks enable circadian behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(6), e2010168118. (2021).
126. Watanabe, M., Fukuda, A., & Nabekura, J. The role of GABA in the regulation of GnRH neurons. *Frontiers in neuroscience*, 8, 387. (2014).
127. Watanabe, M. and Fukuda, A. Development and regulation of chloride homeostasis in the central nervous system. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9, 371. (2015).
128. Wagner, S., Castel, M., Gainer, H., & Yarom, Y. GABA in the mammalian suprachiasmatic nucleus and its role in diurnal rhythmicity. *Nature*, 387(6633), 598-603. (1997).
129. Wagner, S., Castel, M., Gainer, H., & Yarom, Y. GABA in the mammalian suprachiasmatic nucleus and its role in diurnal rhythmicity. *Nature*, 387(6633), 598-603. (1997).
130. Ikeda, M., Yoshioka, T., & Allen, C. N. Developmental and circadian changes in Ca<sup>2+</sup> mobilization mediated by GABA<sub>A</sub> and NMDA receptors in the suprachiasmatic nucleus. *European Journal of Neuroscience*, 17(1), 58-70. (2003).

131. Choi, H. J., Lee, C. J., Schroeder, A., Kim, Y. S., Jung, S. H., Kim, J. S., ... & Kim, Y. I. Excitatory actions of GABA in the suprachiasmatic nucleus. *Journal of Neuroscience*, 28(21), 5450-5459. (2008).
132. Kakizawa, K., Watanabe, M., Mutoh, H., Okawa, Y., Yamashita, M., Yanagawa, Y., ... & Fukuda, A.. A novel GABA-mediated corticotropin-releasing hormone secretory mechanism in the median eminence. *Science advances*, 2(8), e1501723. (2016)
133. 春日 2021 年度修士論文
134. Dzhala, V. I., Talos, D. M., Sdrulla, D. A., Brumback, A. C., Mathews, G. C., Benke, T. A., ... & Staley, K. J. NKCC1 transporter facilitates seizures in the developing brain. *Nature medicine*, 11(11), 1205-1213. (2005).
135. Balsalobre, A., Damiola, F., & Schibler, U. A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell*, 93(6), 929-937. (1998).
136. Nagoshi, E., Saini, C., Bauer, C., Laroche, T., Naef, F., & Schibler, U. Circadian gene expression in individual fibroblasts: cell-autonomous and self-sustained oscillators pass time to daughter cells. *Cell*, 119(5), 693-705. (2004).
137. Nakazato, R., Takarada, T., Yamamoto, T., Hotta, S., Hinoi, E., & Yoneda, Y. Selective upregulation of Per1 mRNA expression by ATP through activation of P2X7 purinergic receptors expressed in microglial cells. *Journal of pharmacological sciences*, 1107080583-1107080583. (2011).
138. Liu, J., Lee, J., Hernandez, M. A. S., Mazitschek, R., & Ozcan, U. Treatment of obesity with celastrol. *Cell*, 161(5), 999-1011. (2015).
139. Suzuki, C., Fukumitsu, S., & Oike, H. Modulation of cellular circadian clocks by triterpenoids. *Phytochemistry*, 181, 112539. (2021).
140. de Seabra Rodrigues Dias, I. R., Mok, S. W., Gordillo-Martínez, F., Khan, I., Hsiao, W. W., Law, B. Y., ... & Liu, L. The calcium-induced regulation in the molecular and transcriptional circuitry of human inflammatory response and autoimmunity. *Frontiers in pharmacology*, 962. (2018).
141. Wong, V. K. W., Qiu, C., Xu, S. W., Law, B. Y. K., Zeng, W., Wang, H., ... & Liu, L. Ca<sup>2+</sup> signalling plays a role in celastrol-mediated suppression of synovial fibroblasts of rheumatoid arthritis patients and experimental arthritis in rats. *British journal of pharmacology*, 176(16), 2922-2944. (2019).
142. Ikarashi, R., Akechi, H., Kanda, Y., Ahmad, A., Takeuchi, K., Morioka, E., ... & Ikeda, M. Regulation of molecular clock oscillations and phagocytic activity via muscarinic Ca<sup>2+</sup> signaling in human retinal pigment epithelial cells. *Scientific reports*, 7(1), 1-14. (2017).
143. Morioka, E., Kasuga, Y., Kanda, Y., Moritama, S., Koizumi, H., Yoshikawa, T., ... & Ikeda, M. Mitochondrial LETM1 drives ionic and molecular clock rhythms in circadian pacemaker neurons. *Cell Reports*, 39(6), 110787. (2022).

144. Nakayama, T., Okimura, K., Shen, J., Guh, Y. J., Tamai, T. K., Shimada, A., ... & Yoshimura, T. Seasonal changes in NRF2 antioxidant pathway regulates winter depression-like behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(17), 9594-9603. (2020).
145. Chaabo, F., Pronczuk, A., Maslova, E., & Hayes, K. C. Nutritional correlates and dynamics of diabetes in the Nile rat (*Arvicanthis niloticus*): a novel model for diet-induced type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Nutrition & metabolism*, 7(1), 1-21. (2010).
146. Singh, J., Yousuf, M. S., Jones, K. E., Shelemey, P. T., Joy, T., Macandili, H., ... & Webber, C. A. Characterization of the Nile Grass Rat as a unique model for type 2 diabetic polyneuropathy. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 77(6), 469-478. (2018).
147. Esposito, E., Li, W., T Mandeville, E., Park, J. H., Şencan, I., Guo, S., ... & Lo, E. H. Potential circadian effects on translational failure for neuroprotection. *Nature*, 582(7812), 395-398. (2020).
148. Haam, J., Popescu, I. R., Morton, L. A., Halmos, K. C., Teruyama, R., Ueta, Y., & Tasker, J. G. GABA is excitatory in adult vasopressinergic neuroendocrine cells. *Journal of Neuroscience*, 32(2), 572-582. (2012).
149. Morioka, E., Miyamoto, T., Tamogami, S., Koketsu, T., Kim, J., Yoshikawa, T., ... & Ikeda, M. Action potential firing rhythms in the suprachiasmatic nucleus of the diurnal grass rat, *Arvicanthis niloticus*. *Neuroscience Letters*, 792, 136954. (2023).
150. 高橋 2020 年度修士論文

## 图表

Table 1 シーケンスまたはリアルタイム RT-PCR で使用したプライマー配列

Gene	Application		Sequences (5'-3')	
<i>Bmal1</i>	PCR	Forward	ACCAGAGAATGGACATTTTCCTC	
		Reverse	TGGCAAGTCACTAAAGTCAACG	
	3' Race	Forward1	ACAGGATAAGAGGGTCGTCG	
		Forward2	CATTCCTTCCACTGGCCTAC	
		Forward3	GATATGATAGACAACGACCAAGG	
	5' Race	Reverse1	AAGATGCCAATTCGTCAATG	
		Reverse2	CCTCTCAGTGTCTTCATATGC	
		Reverse3	GGATAGAAATGTTGGCTTG TAG	
		Reverse4	GCTATAATTGAGGATCTTGAAG	
		Reverse5	TTCCTTAACTTTGGCAATATC	
	real time RT-PCR	Forward	AGAATATGCAGAACACCAAGG	
		Reverse	CCTCTCAGTGTCTTCATATGC	
<i>Clock</i>	PCR	Forward	ACCGTAAGCTGTAGTAAAATGAG	
		Reverse	GGAAAGTGCTCTGTTGTAGTG	
	3' Race	Forward1	GTGACCAAATTAGTGACTGCTC	
		Forward2	CCTATCCTACCTTTGCCACAC	
		Forward3	AGCAGCTTCCTTCAGTTCAAC	
	5' Race	Reverse1	TGCAGTGATCTCTTTATGTTTG	
		Reverse2	AGATCAGATGGTAAATGTTCAAG	
		Reverse3	ATCTTATAAACCTCTGAATGCTC	
		Reverse4	GTTGAAGTTGATACATTGTTTAAAG	
		Reverse5	AGCTACGAAACAACTCTATCTT	
	real time RT-PCR	Forward	CAAACATAAAGAGATCACTGCAC	
		Reverse	AGATCAGATGGTAAATGTTCAAG	
	<i>Per1</i>	PCR	Forward1	TCTGGCAATGGCAAGGACTC
			Forward2	CTCCAGTGACTTTCCAGCAG
			Reverse1	ATCTGCTGGAAAGTCACTGGAG
Reverse2			GCTGAAGCTACACTGACTGG	
Reverse3			GTCCTCTGAGAACCGTGGCTG	
3' Race		Forward1	CCAATCAGGACGCACTTTC	
		Forward2	CAGTCAGAGCAGCCATACAAG	
		Forward3	GTCATTAAGTACGTGCTCCAGG	
		Forward4	TTGATGTGATGGCTTGTGTG	

	real time RT-PCR	Forward	TTACCTGCAGAAGAAAATGGC
		Reverse	GTCGGTCCAGCTATGTCTTGAG
<i>Per2</i>	PCR	Forward	GCCTTTCGATTATTCTCCCATTG
		Reverse	AGGTTAAGCTGTAGGGGACTG
	3' Race	Forward1	CAGATACCCAGAACAGTGATGC
		Forward2	CACAAGTCACACCAGCAAATAC
		Forward3	ACCACAGACACGGAGGAAAG
		Forward4	TGATGACATACCAGCTGCC
	real time RT-PCR	Forward	CACAAGTCACACCAGCAAATAC
		Reverse	ATGATGTTGTCTGTGTGTTG
<i>Cry1</i>	PCR	Forward	TCGGTAGAGGAAGTCGGGG
		Reverse	TCCACCAACTTCAGCTGCG
	real time RT-PCR	Forward	CTCGGCTTTGATACAGATGG
		Reverse	CAACCAAAGCGGAGATAAAGG
<i>Cry2</i>	PCR	Forward	GACGATGGCGGCAGCTGCT
		Reverse	TGTGGCCGTGGCAGCTCAG
	real time RT-PCR	Forward	AGAGACCTCGGATGAATGCC
		Reverse	CCACAGGCGGTAGTAGAAGAGG
<i>GAPDH</i>	PCR	Forward	ATGGTCTACATGTTCCAGTATGAC
		Reverse	CATACTTGGCAGGTTTCTCC
	real time RT-PCR	Forward	CACTCAAGATCGTCAGCAATG
		Reverse	GTGATGGCATGGACTGTGG

Table 2 時計遺伝子の相同性解析に使用したマウス、ラット、ヒトの時計遺伝子とデータベース上に登録したナイルグラスラット時計遺伝子の GenBank Accession number

Gene	Species	Accession number (protein)	Accession number (mRNA)
Bmal1	<i>M. musculus</i>	NP_031515.1	NM_007489.4
	<i>R. norvegicus</i>	NP_077338.2	NM_024362.2
	<i>H. sapiens</i>	NP_001284648.1	NM_001297719.2
	<i>A. niloticus</i>		LC_589366
Clock	<i>M. musculus</i>	NP_031741.1	NM_007715.6
	<i>R. norvegicus</i>	NP_068628.1	NM_021856.2
	<i>H. sapiens</i>	NP_001254772.1	NM_001267843.1
	<i>A. niloticus</i>		LC_589367
Per1	<i>M. musculus</i>	NP_035195.2	NM_011065.5
	<i>R. norvegicus</i>	NP_001029297.1	NM_001034125.1
	<i>H. sapiens</i>	NP_002607.2	NM_002616.3
	<i>A. niloticus</i>		LC_589368
Per2	<i>M. musculus</i>	NP_035196.2	NM_011066.3
	<i>R. norvegicus</i>	NP_113866.1	NM_031678.1
	<i>H. sapiens</i>	NP_073728.1	NM_022817.3
	<i>A. niloticus</i>		LC589369
Cry1	<i>M. musculus</i>	NP_031797.1	NM_007771.3
	<i>R. norvegicus</i>	NP_942045.2	NM_198750.2
	<i>H. sapiens</i>	NP_004066.1	NM_004075.5
	<i>A. niloticus</i>		LC_589370
Cry2	<i>M. musculus</i>	NP_034093.1	NM_009963.4
	<i>R. norvegicus</i>	NP_596896.2	NM_133405.2
	<i>H. sapiens</i>	NP_066940.3	NM_021117.5
	<i>A. niloticus</i>		LC_589371

Table 3 ナイルグラスラットとマウス (*Mus musculus*)・ラット (*Rattus norvegicus*)・ヒト (*Homo sapiens*)間の時計タンパク質(遺伝子)の全長塩基配列または推定アミノ酸配列の一致率(%)

	Species	Bmal1	Clock	Per1	Per2	Cry1	Cry2
Protein	<i>M. musculus</i>	99.5	97.8	96.4	95.9	97.8	98.3
	<i>R. norvegicus</i>	99.4	96.6	96.3	95.2	98.1	98.3
	<i>H. sapiens</i>	98.6	96.1	91.0	79.6	95.6	94.6
cDNA	<i>M. musculus</i>	96.3	95.8	95.3	95.0	94.5	96.6
	<i>R. norvegicus</i>	96.1	94.1	95.0	93.8	93.3	96.1
	<i>H. sapiens</i>	90.7	90.5	87.0	79.4	89.1	90.0

Table 4 ナイルグラスラットとマウス (*Mus musculus*)・ラット (*Rattus norvegicus*)・ヒト (*Homo sapiens*)間の時計タンパク質機能ドメインにおけるアミノ酸配列一致率(%)

	Species	bHLH	PAS-A	PAS-B	PAC	C-terminal region
Bmal1	<i>M. musculus</i>	98.1	100.0	98.5	100.0	99.5
	<i>R. norvegicus</i>	98.1	100.0	100.0	100.0	99.5
	<i>H. sapiens</i>	98.1	100.0	100.0	100.0	98.4
Clock	<i>M. musculus</i>	98.0	97.0	100.0	100.0	97.3
	<i>R. norvegicus</i>	100.0	95.5	98.5	100.0	95.2
	<i>H. sapiens</i>	100.0	97.0	100.0	100.0	94.2
Per1	<i>M. musculus</i>	-	98.6	98.6	97.7	95.0
	<i>R. norvegicus</i>	-	98.6	98.5	97.7	94.3
	<i>H. sapiens</i>	-	94.0	98.5	97.7	87.3
Per2	<i>M. musculus</i>	-	97.1	97.4	100.0	95.3
	<i>R. norvegicus</i>	-	94.1	98.7	100.0	94.4
	<i>H. sapiens</i>	-	86.8	98.7	97.7	75.5

Table 5 ナイルグラスラット・スーダングラスラット間の時計遺伝子塩基配列または推定アミノ酸配列の一致率(%)

	bHLH	PAS-A	PAS-B	PAC	Entire	Coding region (cDNA)
Bmal1	100.0	100.0	98.5	100.0	99.9	99.6
Clock	100.0	100.0	100.0	100.0	99.0	98.5
Per1	-	100.0	100.0	97.7	99.0	99.0
Per2	-	100.0	98.7	100.0	98.9	99.0
Cry1	-	-	-	-	97.3	98.0
Cry2	-	-	-	-	98.8	98.9

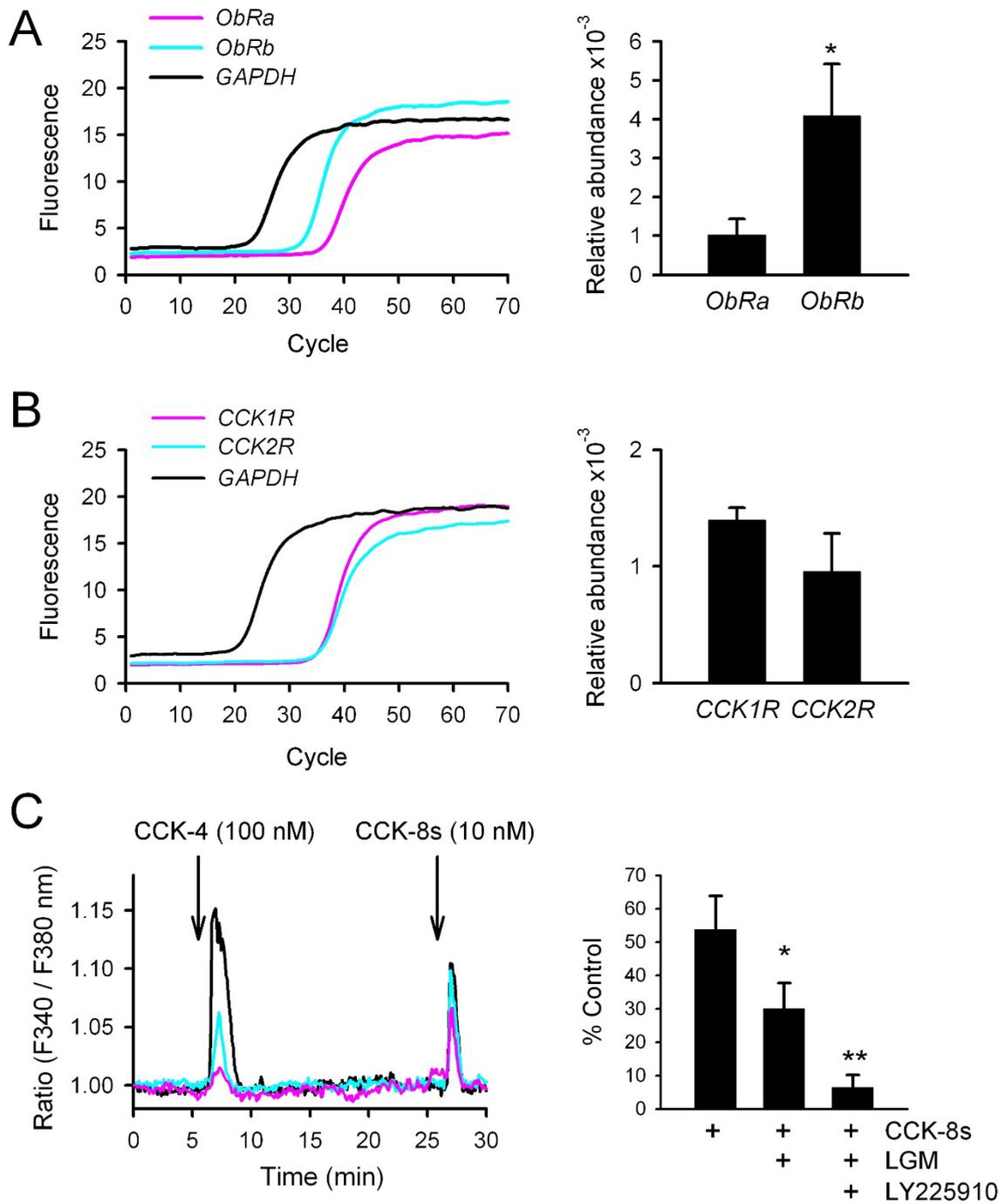


Figure 1

**Figure 1. ラット C6 グリオーマ細胞におけるレプチンおよび CCK 受容体の内在的な発現**

**(A)** リアルタイム RT-PCR を用いて *ObRa*、*ObRb*、およびハウスキーピング遺伝子 (glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase, *GAPDH*) の生データ (サイクル数に対する蛍光強度変化) および *GAPDH* に対する *ObRa*、*ObRb* 発現量解析の結果を示す。C6 細胞において *ObRb* の発現量が相対的に高いことが示された ( $*p < 0.05$  by Student's *t*-test.)。 **(B)** リアルタイム RT-PCR を用いた CCK-1 受容体 (*CCK1R*) および CCK-2 受容体 (*CCK2R*) mRNA の発現量解析の結果。 **(C)** 細胞質  $Ca^{2+}$  濃度変化を  $Ca^{2+}$  指示薬である Fura-2 により解析した。C6 細胞では、CCK-4 (100 nM) および CCK-8s (10 nM) により細胞質  $Ca^{2+}$  が上昇することが示された。矢印は、薬剤投与 45 秒間の開始を示す。代表的な 3 つの細胞応答を黒、ピンク、青のトレースで示した。CCK-1 受容体アンタゴニスト (LGM, 100 nM) または LGM+CCK-2 受容体アンタゴニスト (LY225910, 100 nM) の存在下で CCK-8s 誘発  $Ca^{2+}$  応答を解析した。アンタゴニスト無処理群と比較して、アンタゴニスト投与群では  $Ca^{2+}$  応答の大きさが有意に減少した ( $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$  by Duncan's multiple range test following one way ANOVA)。

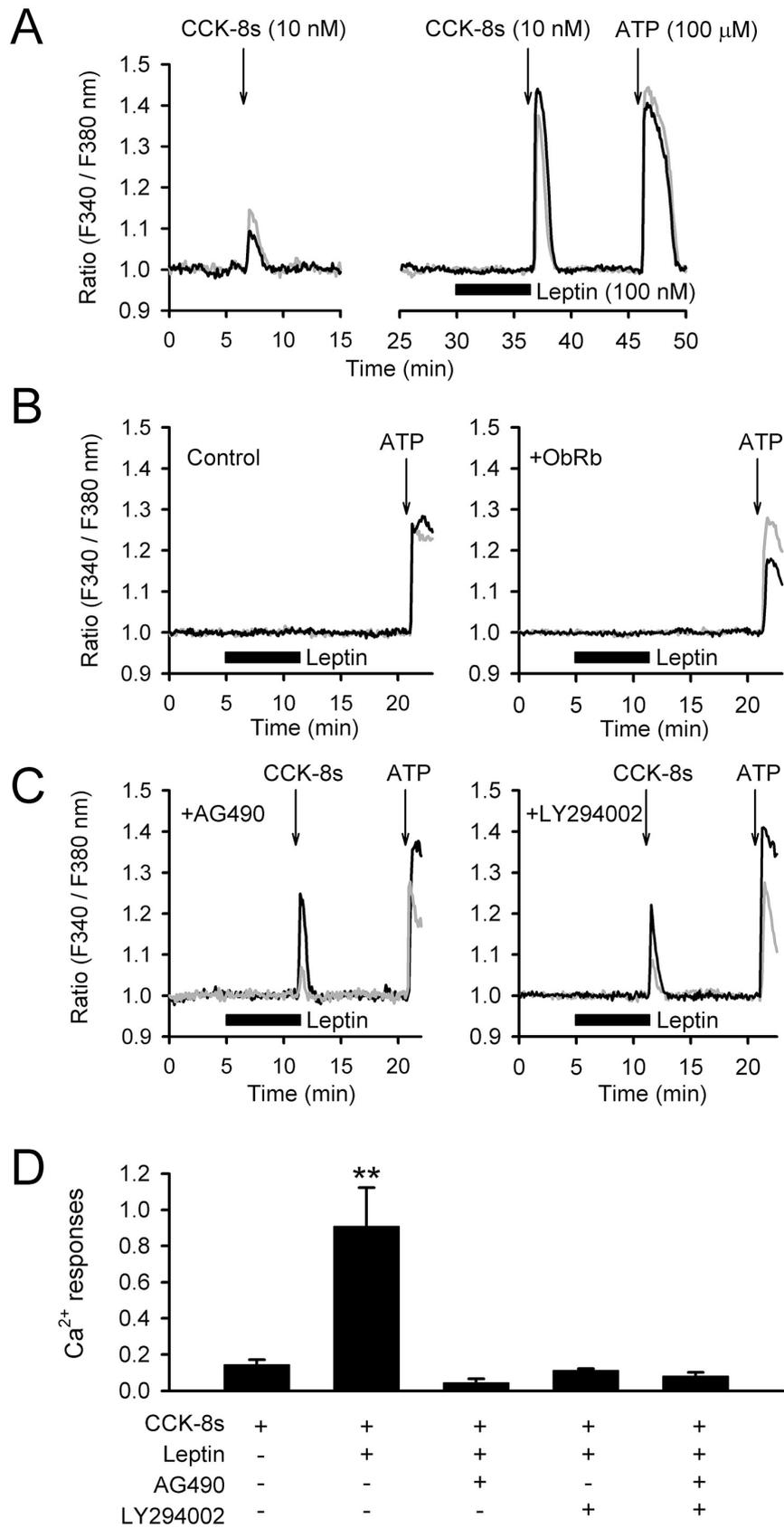


Figure 2

## Figure 2. C6 細胞における細胞質 $\text{Ca}^{2+}$ 動員

(A) C6 細胞における CCK-8s (10 nM) 誘発の  $\text{Ca}^{2+}$  応答は、レプチン (100 nM) で前処理することにより増強された。ポジティブコントロールとして、実験終了時に ATP (100  $\mu\text{M}$ ) を投与した。代表的な 2 つの細胞の反応を黒とグレーのトレースで示した。(B) 野生型 C6 細胞 (コントロール、左図) およびマウスレプチン受容体を過剰発現した C6 細胞 (+ObRb、右図) において、レプチン単独刺激では細胞質  $\text{Ca}^{2+}$  応答は見られなかった。(C)  $\text{Ca}^{2+}$  イメージング開始前に JAK 阻害剤 (1  $\mu\text{M}$  AG490、左図) または PI3K 阻害剤 (50  $\mu\text{M}$  LY294002、右図) で C6 細胞を 10 分間前処理した。これらのキナーゼ阻害剤は CCK-8s 誘発の  $\text{Ca}^{2+}$  動員に対するレプチン作用を有意に減少させた。(D)  $\text{Ca}^{2+}$  応答の大きさを定量し、比較した。\*\* $p < 0.01$  by one-way ANOVA

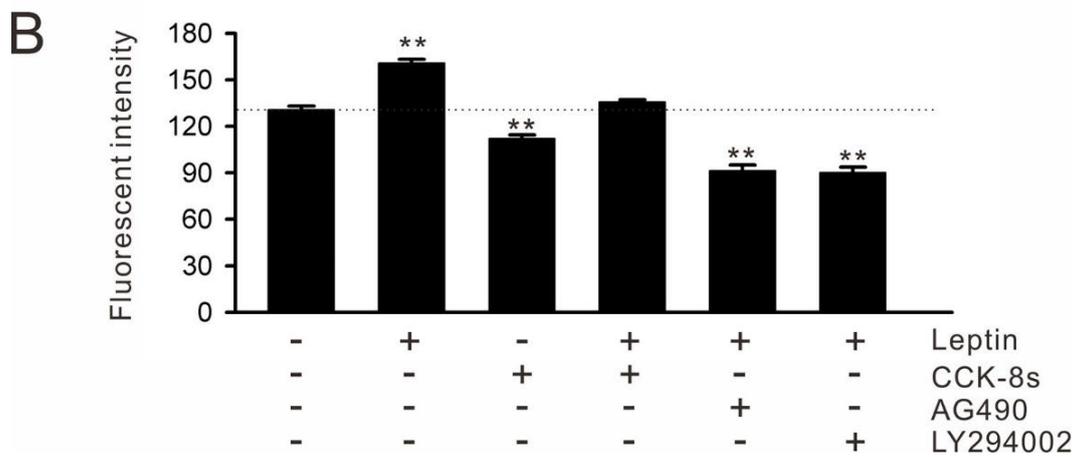
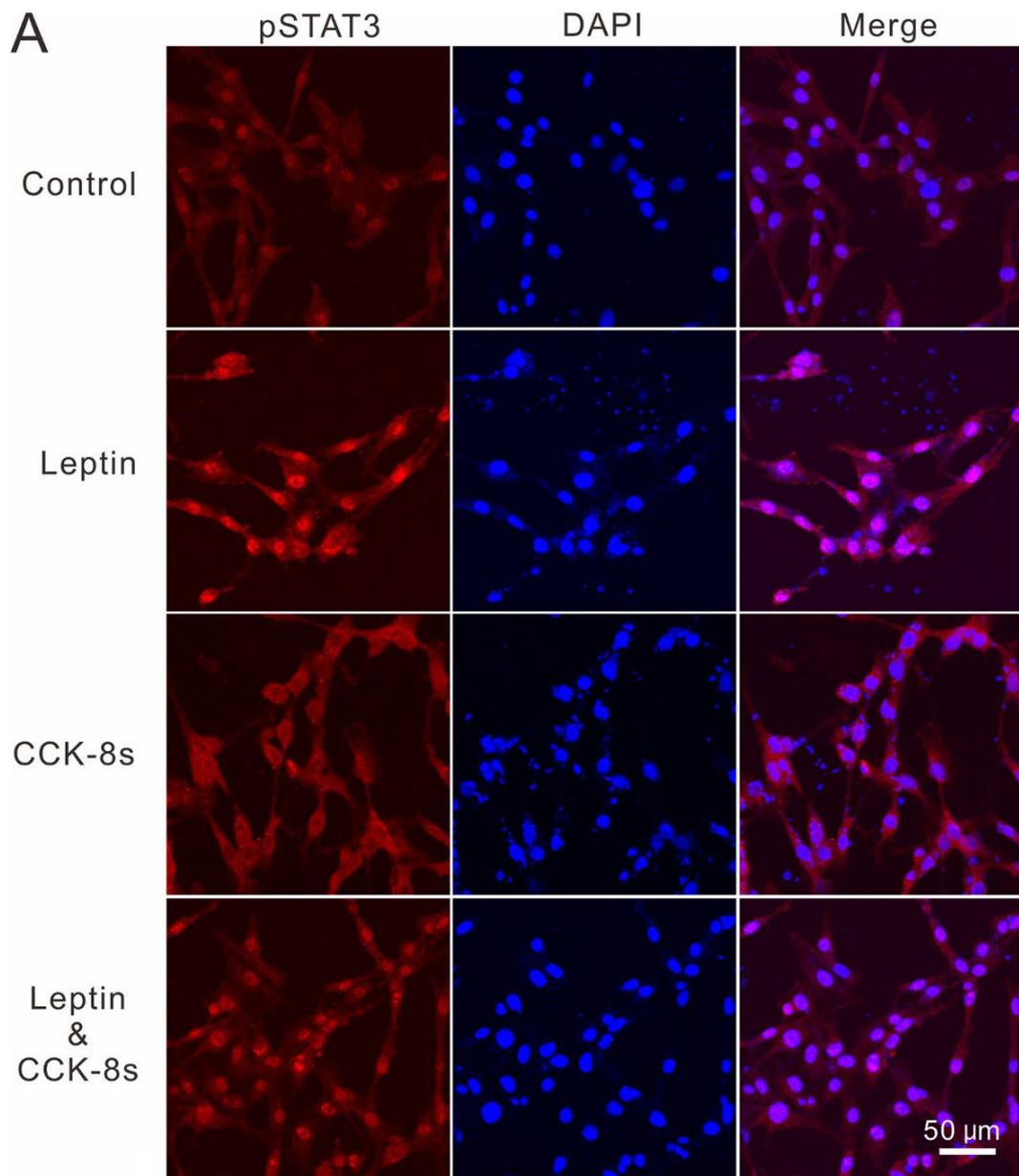


Figure 3

Figure 3. C6-ObRb 細胞における pSTAT3 の免疫組織化学的解析

(A) C6-ObRb 細胞を固定する 30 分前にレプチン (100 nM) または CCK-8s (10 nM) で 1-2 分間刺激し、pSTAT3 を免疫標識した。pSTAT3 (赤)、DAPI 核染色 (青)、マージの代表例をそれぞれ示す。レプチン刺激により核内 pSTAT3-ir が増加した一方で、CCK-8s 刺激により細胞質における pSTAT3-ir の増加が観察された。レプチンと CCK-8s の共刺激により核内 pSTAT3-ir はわずかに増加したものの、無刺激群と比較して有意差は検出されなかった。(B) pSTAT3-ir の核内蛍光強度を定量し比較した。AG490 (1  $\mu$ M) または LY294002 (50  $\mu$ M) は、レプチン誘導性の核内 pSTAT3 蓄積を阻害した。\*\* $p < 0.01$  by Duncan's multiple range test following one-way ANOVA.

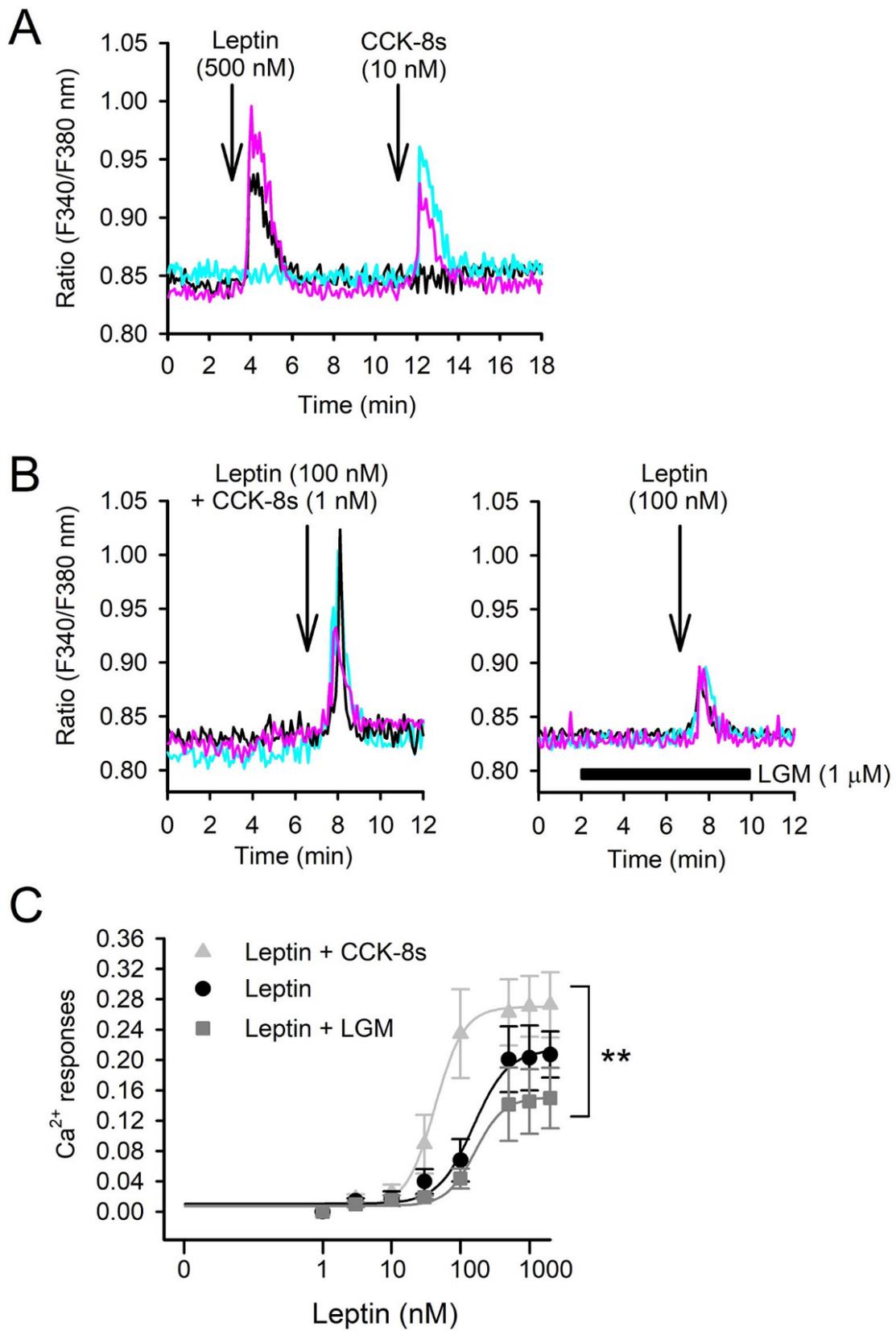


Figure 4

#### Figure 4. VMN における細胞質 $\text{Ca}^{2+}$ 動員

(A) VMN 細胞を 500 nM レプチンおよび 10 nM CCK-8s により刺激した時の 3 つの代表的な細胞応答を示す。レプチン (黒)、CCK-8s (青) のどちらかのみ、または両方 (ピンク) に対して  $\text{Ca}^{2+}$  増加応答を示す細胞が存在した。(B) 100 nM レプチンと 1 nM CCK-8s の共刺激に対する代表的な細胞反応 (左図) と 1  $\mu\text{M}$  LGM 存在下での 100 nM レプチンによる刺激に対する代表的な細胞応答 (右図) を示す。(C) 各濃度のレプチンに対する用量依存曲線 ( $R_{\max} = 0.2$ ,  $EC_{50} = 152.9 \text{ nM}$ ) を示す。1 nM CCK-8s の共刺激により  $\text{Ca}^{2+}$  応答は増強され ( $R_{\max} = 0.26$ ,  $EC_{50} = 42.8 \text{ nM}$ )、1  $\mu\text{M}$  LGM による CCK-1 受容体の阻害により抑制された ( $R_{\max} = 0.14$ ,  $EC_{50} = 162.7 \text{ nM}$ )。  $**p < 0.01$  by two-way ANOVA.

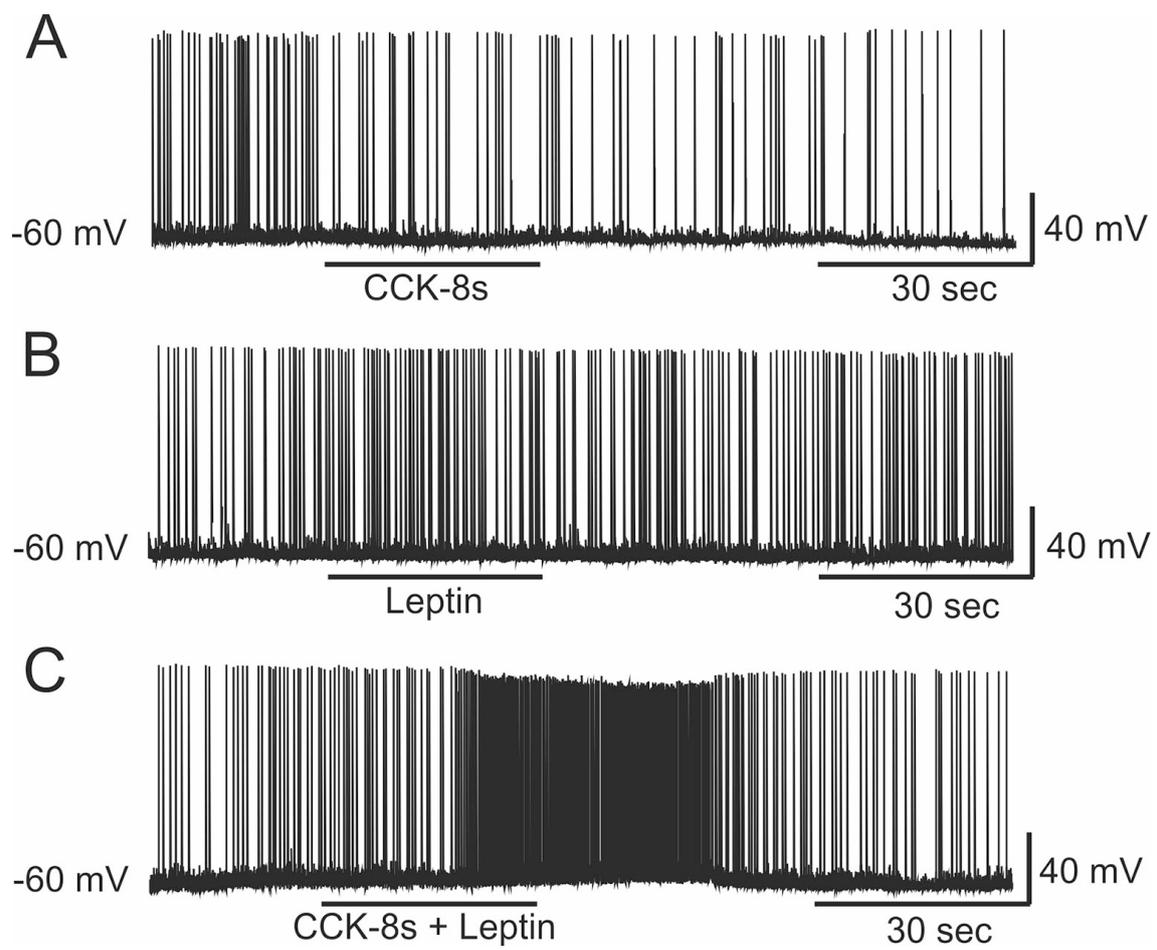


Figure 5

Figure 5. VMN 神経における神経発火頻度に対するレプチン・CCK の作用

(A)低濃度の CCK-8s (1 nM) 投与により、活動電位の自発的発火頻度は変化しなかった。(B) 同様に低濃度レプチン (30 nM) による影響はみられなかった。(C) CCK-8s (1 nM) とレプチン (30 nM) の共刺激は、発火頻度を有意に増加させた。(B, C)は ACSF 灌流下で 15 分間の間隔をおいて単一神経から記録された。

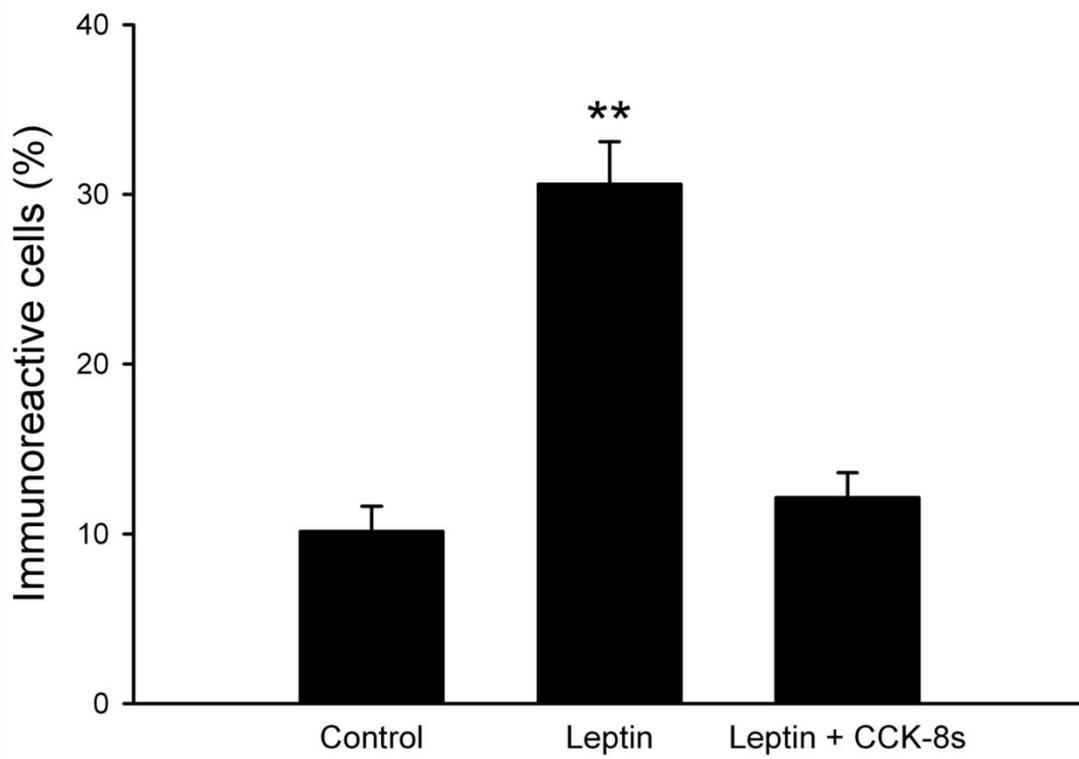
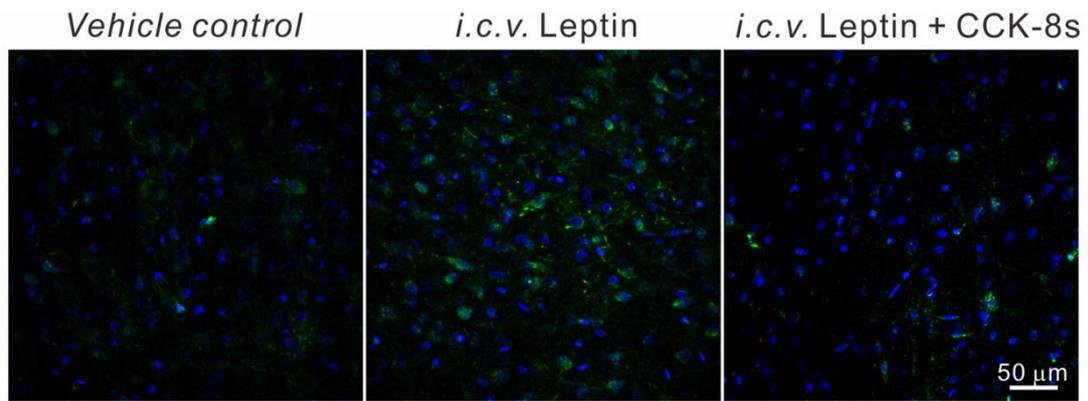


Figure 6

**Figure 6. ラット VMN の pSTAT3 に対するレプチンおよび CCK 脳室内投与の影響**

レプチン (4  $\mu\text{g}$ ) またはレプチン+CCK-8s (2  $\mu\text{g}$ ) を、脳摘出の 1 時間前にラット側脳室に投与した。各群での pSTAT3 (緑) と DAPI 核染色 (青) のマージ画像をそれぞれ示す。溶媒 (ACSF 4  $\mu\text{L}$ ) 投与対照群と比較して、VMN の核内 pSTAT3 免疫応答はレプチン投与により増強された。レプチンと CCK-8s の同時投与では、VMN の核内 pSTAT3 免疫応答は変化しなかった。各群それぞれ 12 枚の画像から核内 pSTAT3 陽性細胞数の平均値を算出した。

**\*\* $p < 0.01$  by Duncan's multiple range test following one-way ANOVA.**

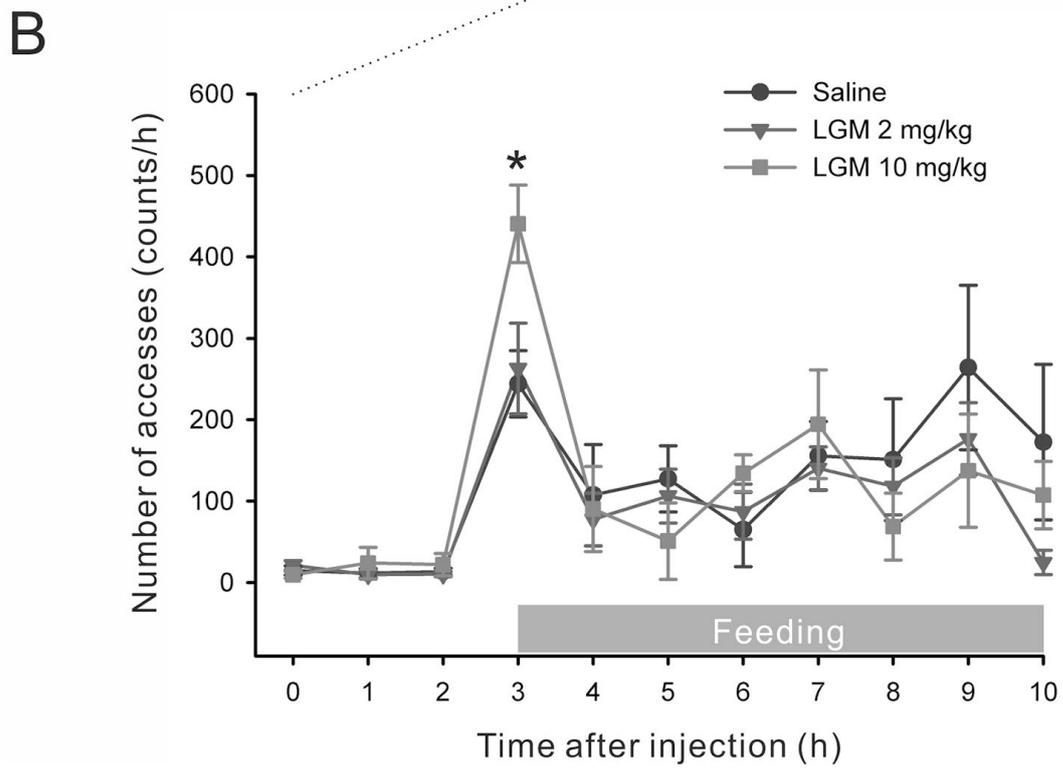
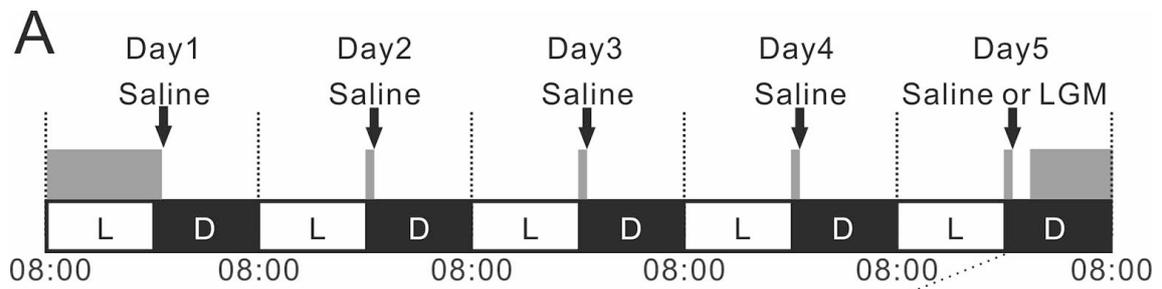


Figure 7

Figure 7. LGM 腹腔内投与後の摂食行動頻度の変化

(A) 制限給餌および腹腔内投与の実験スケジュール。ラットは毎日 1 時間の制限給餌と生理食塩水の腹腔内投与で馴化させた。灰色のバーは摂食のタイミングを示す。L：明期、D：暗期。(B) 5 日目に生理食塩水または LGM (2 または 10 mg/kg) を腹腔内投与し、その後 3 時間の間隔を空けて再摂食させた。再摂食後 7 時間の餌へのアクセス頻度の変化を示す。LGM 10 mg/kg 投与により、再摂食直後のアクセス頻度が上昇した。各群 n = 5-6, \* $p < 0.05$  by repeated one-way ANOVA

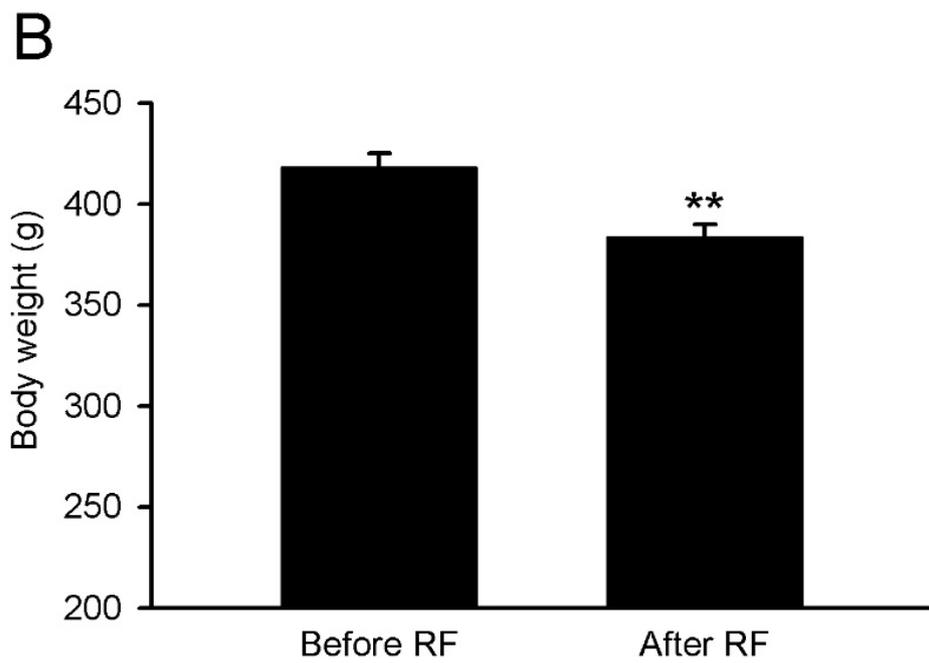
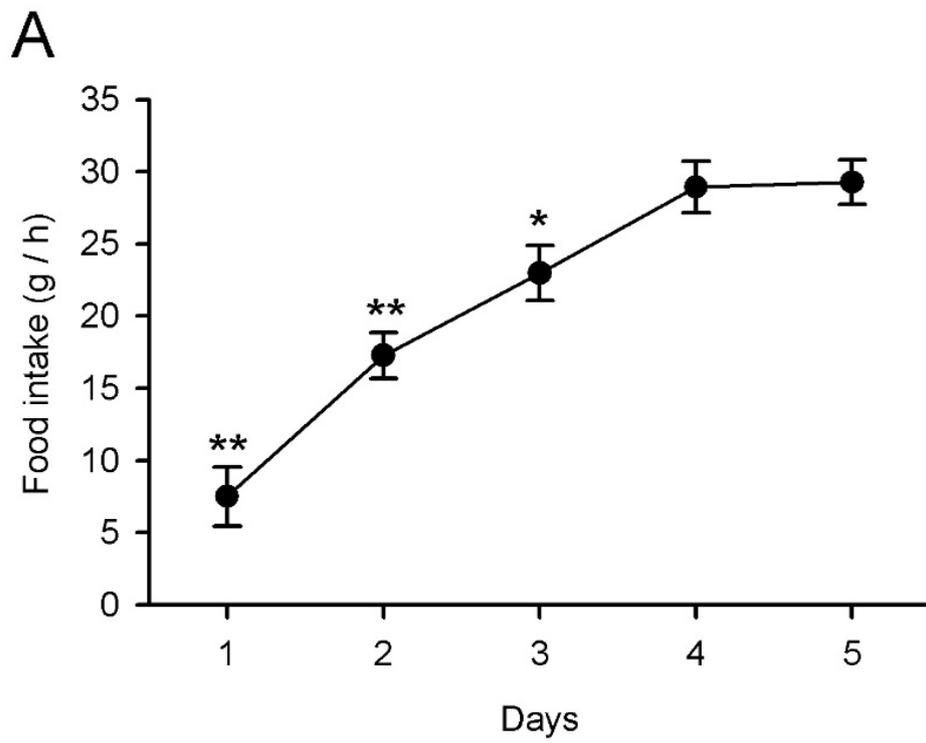


Figure 8

Figure 8. 制限給餌スケジュールによる摂食量と体重の変化

(A) 制限給餌 (RF) 期間中の 1 日の摂食量。Fig. 7 の 1 時間の RF 条件での摂取量を示している。ラットは RF に順応し、5 日間のために食事量が安定した。4 日目と 5 日目の摂取量に有意差はなかったが、最初の 3 日間の摂取量よりも多かった (\*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$  by Duncan's multiple range test following one-way ANOVA)。 (B) 5 日間の RF 期間前後のラットの体重。RF の後、体重は約 8% 減少した。 \*\* $P < 0.01$  by two-tailed paired  $t$ -test.

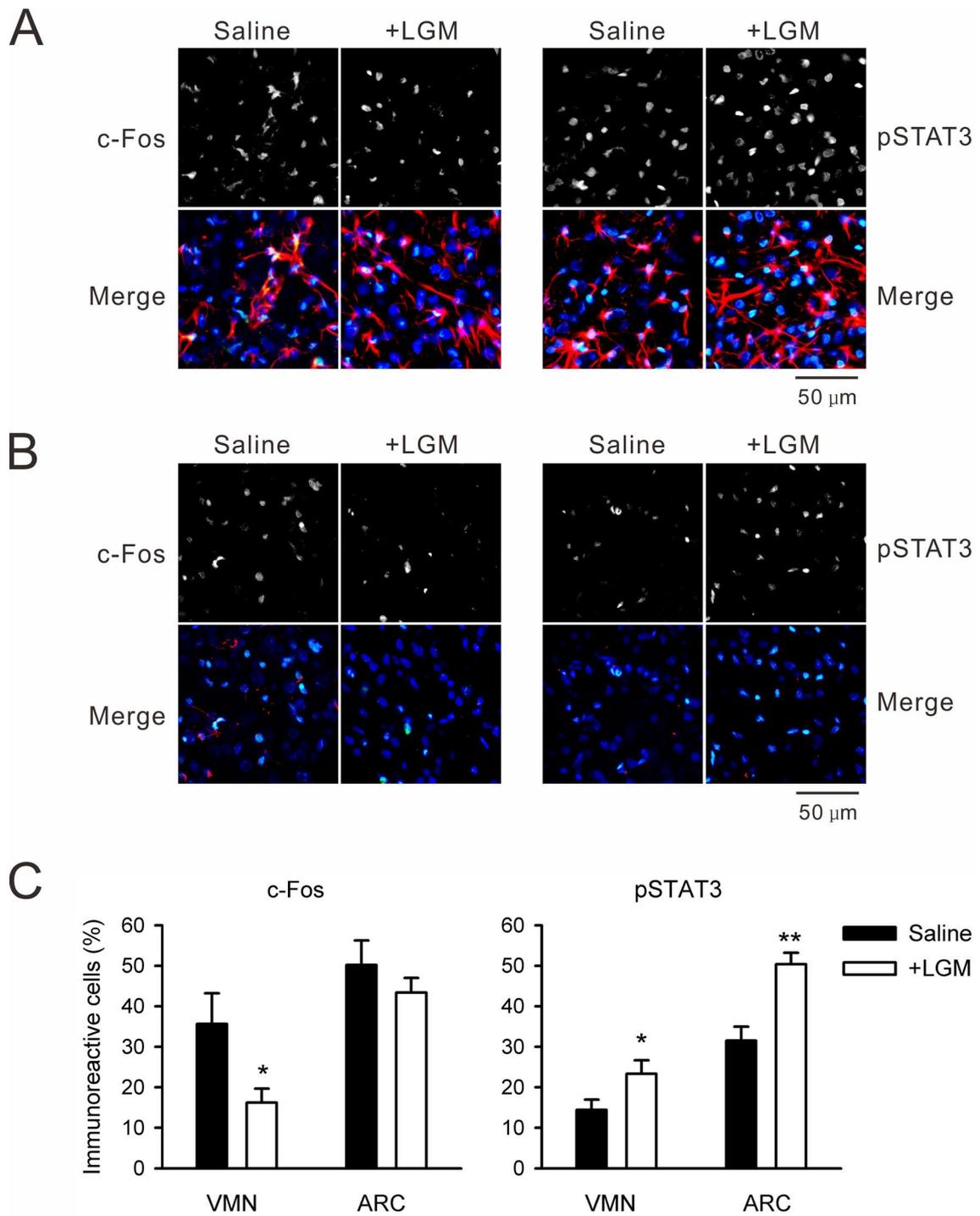


Figure 9

Figure 9. VMH における核内 c-Fos および pSTAT3

(A) Fig. 7 と同様に生理食塩水または LGM (10 mg/kg) を腹腔内投与して 3 時間後にラット脳を固定し、ARC 領域の脳切片を c-Fos 抗体 (左側) または pSTAT3 抗体 (右側) によって標識した。c-Fos または pSTAT3 染色 (緑)、GFAP 染色 (赤)、DAPI 核染色 (青) のマージ画像をそれぞれ示す。マージ画像内の水色は c-Fos または pSTAT3 免疫陽性の核を示す。

(B) VMN 領域における同様の解析結果。VMN は GFAP をほとんど含まないことから ARC と区別した。

(C) 免疫陽性細胞数の平均数を解析した。平均値の算出には各群 14-18 枚の画像を使用した。LGM 投与により、VMN において c-Fos 免疫陽性細胞が減少し、pSTAT3 免疫陽性細胞が増加したことが示された。\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  by Student's *t*-test

AnPER1	MSGPLEGADG	GGDPRPGEPF	CSGGVPSPGA	PQHRPCPGPS	LADDDANSN	GSSGNESNGH	ESRGASQRSS	HSSSSGNGKD	SALLETTESS
rPER1	MSGPLEGADG	GGDPRPGEPF	CPGGVPSPGA	PQHRPCPGPS	LADDDANSN	GSSGNESNGH	ESRGASQRSS	HSSSSGNGKD	SALLETTESS
hPER1	MSGPLEGADG	GGDPRPGEST	CPGGVPSPGP	PQHRPCPGPS	LADDDANSN	GSSGNESNGH	ESRGASQRSS	HSSSSGNGKD	SALLETTESS
AnPER1	KSTNSQSPSP	PSSSIAYSLI	SASSEQDNPS	TSGCSSEQSA	RARTQKELMT	ALRELKLRLP	PERRGKGRSG	TLATLQYALA	CVKQVQANQE
rPER1	KSTNSQSPSP	PSSSIAYSLI	SASSEQDNPS	TSGCSSEQSA	RARTQKELMT	ALRELKLRLP	PERRGKGRSG	TLATLQYALA	CVKQVQANQE
hPER1	KSTNSQSPSP	PSSSIAYSLI	SASSEQDNPS	TSGCSSEQSA	RARTQKELMT	ALRELKLRLP	PERRGKGRSG	TLATLQYALA	CVKQVQANQE
AnPER1	YYQQWSLEEG	EPCAMDMSYI	TLEELEHITS	EYTLRNQDTF	SVAVSFLTGR	IVYISEQAGV	LLRCKRDVFR	GARFSELLAP	QDVGVFYGST
rPER1	YYQQWSLEEG	EPCAMDMSYI	TLEELEHITS	EYTLRNQDTF	SVAVSFLTGR	IVYISEQAGV	LLRCKRDVFR	GARFSELLAP	QDVGVFYGST
hPER1	YYQQWSLEEG	EPCAMDMSYI	TLEELEHITS	EYTLRNQDTF	SVAVSFLTGR	IVYISEQAAV	LLRCKRDVFR	GTRFSELLAP	QDVGVFYGST
						PAS-A			
AnPER1	TPSRFLTWGA	GTSAGSGLKD	FTQEKSVFCR	IRGGPDRDPG	PWYQPFRLTP	YVTKIRVSDG	APAQPCCLLI	AERIHSGYEA	PRIPPKRIF
rPER1	TPSRFLTWGT	GTSAGSGLKD	FTQEKSVFCR	IRGGPDRDPG	PRYQPFRLTP	YVTKIRVSDG	APAQPCCLLI	AERIHSGYEA	PRIPPKRIF
hPER1	APSRFLTWTG	GASAGSGLRD	FTQEKSVFCR	IRGGPDRDPG	PRYQPFRLTP	YVTKIRVSDG	APAQPCCLLI	AERIHSGYEA	PRIPPKRIF
AnPER1	TRRHTPSCLF	QDVDERAAPL	LGYPQLDILG	APVLLFLHPE	DRPLMLAIHK	KILQLAGQPF	DHSPIRFCAE	NGEYVTMDTS	WSGFVHPWSR
rPER1	TRRHTPSCLF	QDVDERAAPL	LGYPQLDILG	APVLLFLHPE	DRPLMLAIHK	KILQLAGQPF	DHSPIRFCAE	NGEYVTMDTS	WAGFVHPWSR
hPER1	TRRHTPSCLF	QDVDERAAPL	LGYPQLDILG	APVLLFLHPE	DRPLMLAIHK	KILQLAGQPF	DHSPIRFCAE	NGEYVTMDTS	WAGFVHPWSR
			PAS-B					PAC	
AnPER1	KVAFVILGRHK	VRTAPLNEDV	FTPPAPSLAP	SLDSDIQELS	EQIHRLLLPQ	VHSSSPTGVC	GVGPLMSPGP	LHSPGSSSDS	NGDAEGGPP
rPER1	KVAFVILGRHK	VRTAPLNEDV	FTPPVPSAP	SLDSDIQELS	EQIHRLLLPQ	VHSSSTGLC	GVGPLMSPGP	LHSPGSSSDS	NGDAEGGPP
hPER1	KVAFVILGRHK	VRTAPLNEDV	FTPPAPSLAP	SLDSDIQELS	EQIHRLLLPQ	VHSPSTGLC	GVGAVTSPGP	LHSPGSSSDS	NGDAEGGPP
AnPER1	PAPVTFQQIC	EDVHLVKHQG	QQLFIESRAK	PPARPRLLAT	GTLKAKVLFPS	QSPSPELEVA	PAPDQASVAL	AHEEPERKEA	SSCSYQQINC
rPER1	PAPVTFQQIC	KDVHLVKHQG	QQLFIESRAK	PPRRPRLLAT	GTFKAKVLFPS	QSPNPELEVA	PAPDQASLAL	APEEPERKES	SSCSYQQINC
hPER1	PAPVTFQQIC	KDVHLVKHQG	QQLFIESRAR	PQSRPRLPAT	GTFKAKALFC	QSPDPELEAG	SAPVQAPLAL	VPEEAERKEA	SSCSYQQINC
AnPER1	LDSILRYLES	CNIPSTTKRK	CASSSSYTS	SASDDDKQRA	GPVPGGAKKD	PSSAVLSGEG	APPRKEPVVG	GTLSPALAN	KAESVASVTS
rPER1	LDSILRYLES	CNIPSTTKRK	CASSS-CTAS	SASDDDKQRA	GPVPGGAKKD	TSSAVLSGEG	ATPRKEPVVG	GTLSPALAN	KAESVSVTS
hPER1	LDSILRYLES	CNIPSTTKRK	CASSSSYTS	SASDDDRQRT	GPVSVGTKKD	PSSAALSSEG	ATPRKEPVVG	GTLSPALAN	KAESVSVTS
AnPER1	QCSFSSSTIVH	VGDKKPPESD	IIMMEDLPGL	APGPAPSPAP	SPTVAPDPAP	DAYRPVGLTK	AVLSLHTQKE	EQAFLSRFRD	LGRLRGLDTS
rPER1	QCSFSSSTIVH	VGDKKPPESD	IIMMEDLPGL	APGPAPSPAP	SPTVAPDPAP	DAYRPVGLTK	AVLSLHTQKE	EQAFLSRFRD	LGRLRGLDTS
hPER1	QCSFSSSTIVH	VGDKKPPESD	IIMMEDLPGL	APGPAPSPAP	SPTVAPDPAP	DAYRPVGLTK	AVLSLHTQKE	EQAFLSRFRD	LGRLRGLDSS
AnPER1	SVAPSA---P	GCHHGPIPPG	RRHHCERSKAK	RSRHHQTRPR	ETPCCASHPS	PVPSSAPWFP	PPATTHFPFAV	VQPYPLPVFS	PRGGPQPLPP
rPER1	SVAPSA---P	GCHHGPIPSG	RRHHCERSKAK	RSRHHQTRPR	ETPCYVSHPS	PVPSSGFWFP	PPATTPFPFAV	VQPYPLPVFS	PRGGPQPLPP
hPER1	STAPSAALGER	GCHHGPAFPP	RRHHCERSKAK	RSRHHQNPRA	EAPCYVSHPS	PVPSTFPWPT	PPATTPFPFAV	VQPYPLPVFS	PRGGPQPLPP
AnPER1	APTSVSPATF	PSPLVTFMVA	LVLPNYLFPT	PPSYFPGVSQ	APVEGPPTPA	SHSPSPSLFP	PPSPPHRPD	SPLFNSRCSS	PLQLNLLQLE
rPER1	APTSVSPATF	PSPLVTFMVA	LVLPNYLFPT	PPSYFPGVSQ	APVEGPPTPA	SHSPSPSLFP	PPSPPHRPD	SPLFNSRCSS	PLQLNLLQLE
hPER1	APTSVPPAAF	FAPLVTMVA	LVLPNYLFPT	PPSYFPGALQ	TPAEGPPTPA	SHSPSPSLPA	LPPSPPHRPD	SPLFNSRCSS	PLQLNLLQLE
AnPER1	ESSRTDGGAA	AGGPGSSAGP	LFPNDEESAE	PEARLVEVTE	SSNQDALSGS	SDLLELLLQE	DSRSGTGSAA	SGSLGSLGGS	GSGSGSHEGG
rPER1	ESPRTEGGAA	AGGPGSSAGP	LFPSE-EAE	PEPRLVEVTE	SSNQDALSGS	SDLLELLLQE	DSRSGTGSAA	SGSLGSLGGS	GSGSGSHEGG
hPER1	ELPRAEGAAV	AGGPGSSAGP	PPPSA-EAAE	PEARLAEVTE	SSNQDALSGS	SDLLELLLQE	DSRSGTGSAA	SGSLGSLGGS	GSGSGSHEGG
AnPER1	STSASITRSS	QSSHTSKYFG	SIDSSEAEAG	SAQARTEPGD	QVIKYVLQDP	IWLLMANADQ	HVMMTYQVPS	RDAASVLKQD	RERLRAMKQK
rPER1	STSASITRSS	QSSHTSKYFG	SIDSSEAEAG	AAQARTEPGD	QVIKYVLQDP	IWLLMANADQ	HVMMTYQVPS	RDAASVLKQD	RERLRAMKQK
hPER1	STSASITRSS	QSSHTSKYFG	SIDSSEAEAG	AARGGAEPGD	QVIKYVLQDP	IWLLMANADQ	RVMMTYQVPS	RDMTSVLKQD	RERLRAMKQK
AnPER1	QPRFSEDQRR	ELGAVHSWVR	KGQLPRALDV	MACVDCGSSI	QDPGHSDDPL	FSELDGLGLE	PMEEGGGEGG	GGGVG--EGG	GGGGGGGEEA
rPER1	QPRFSEDQRR	ELGAVHSWVR	KGQLPQALDV	TACVDCGSSV	QDPGHSDDPL	FSELDGLGLE	PMEEGGGEGG	GGVGGGGVGV	GGGGGGGEEA
hPER1	QPRFSEDQRR	ELGAVHSWVR	KGQLPRALDV	MACVDCGSSV	QDPGHPDDPL	FSELDGLGLE	PMEEGGGEGG	SSGGGSGEG-	-----EGCE
AnPER1	QTQTGAKGSS	SQDSAMEEEE	QGGGSSSPAL	PAEENGTS					
rPER1	QTQIGTKGSS	SQDSAMEEEE	QGGGSSSPAL	PAEENGTS					
hPER1	EAQGGAKASS	SQDLAMEEEE	EGRSSSPAL	PTAGNCTS					

Figure 10

**Figure 10. 時計タンパク質 PER1 アミノ酸配列の配列比較**

ナイルグラスラットの時計遺伝子 *Per1* の塩基配列から推定されるアミノ酸配列(AnPER1)をラット(rPER1)およびヒト(hPER1)と比較した。PER2 タンパク質内に存在する機能ドメインの PAS-A、PAS-B、PAC ドメインを示した。灰色の領域は比較した3種の間でアミノ酸が一致していることを示す。各機能ドメインにおいて高い保存性が示された。

AnPER2	MNGYVDFSPS	FTSPTKEFGE	PQPTQAVLQE	DVDMSSGSSG	---NENCSTG	RDSQGSDCDD	SGKELRMLVE	SSNIHPSFDD	AFRLMMTEAE
rPER2	MNGYVDFSPS	FTSPTKEFGE	PQPTQAVLQE	DVDMSSGSSG	---NENCSTG	RDSQGSDCDD	SGKELRMLVE	SSNIHPSFDD	TFRLMMTEAE
hPER2	MNGYAEFPSS	PSNPTKEFVE	PQPSQVPLQE	DVDMSSGSSG	HETNENCSTG	RDSQGSDCDD	SGKELGMLVE	FPDARQSE-D	TFSLMMAKSE
AnPER2	HNPSTSGCSS	EQSAKADAHK	ELIRTLRELK	VHLPADKKAK	GKASTLATLK	YALRSVKQVK	ANEYYQLLM	SSESQPCSM	VPSYTMQVVE
rPER2	HNPSTSGCSS	EQSAKADAHK	ELIRTLRELK	VHLPADKKAK	GKASTLATLK	YALRSVKQVK	ANEYYQLLM	SSESQPCSD	VPSYTMQVVE
hPER2	HNPSTSGCSS	DQSSKVDTHK	ELIKTLKELK	VHLPADKKAK	GKASTLATLK	YALRSVKQVK	ANEYYQLLM	SSEGHPCGAD	VPSYTVEME
AnPER2	GITSEYIVKN	ADMPALAVSL	VSGKILYISD	QVASIFHCKK	DAFSDAKFVE	FLAPHDVSVF	HSYTTPTYKLP	PWSVCSGLDS	FTQECMEEKS
rPER2	GITSEYIVKN	SDMPAVAVSL	VSGKILYISN	QVAPIFHCKK	DAFSDAKFVE	FLAPHDVSVF	HSYTTPTYKLP	PWSVSSGLDS	FTQECMEEKS
hPER2	SVTSEHIVKN	ADMPAVAVSL	VSGKILYISD	QVASIFHCKR	DAFSDAKFVE	FLAPHDVGVF	HSFTSPYKLP	LWSMCSGADS	FTQECMEEKS
<b>PAS-A</b>									
AnPER2	FFCRVSVGKH	HENEIRYQFF	RMTPLYLVKQ	EQQGAESQLC	CLLLAEVWHS	GYEAPRIPPE	KRIFTTTHTP	NCLFQDVDER	AVPLLGLYLPQ
rPER2	FFCRVSVGKH	HENEIRYQFF	RMTPLYLVKQ	EQKGAASQLC	CLLLAERVHS	GYEAPRIPPE	KRIFTTTHTP	NCLFQDVDER	AVPLLGLYLPQ
hPER2	FFCRVSVRKS	HENEIRYHPF	RMTPLYLVKR	DQQGAESQLC	CLLLAERVHS	GYEAPRIPPE	KRIFTTTHTP	NCLFQDVDER	AVPLLGLYLPQ
<b>PAS-B</b>									
AnPER2	DLIETPVLVQ	LHPSDRPLML	AIHKKILQAG	GQPPDYSPIR	FRTRNGEYIT	LDTSWSSFIN	PWSRKISPII	GRHKVRVGPL	NEDVFAASPC
rPER2	DLIETPVLVQ	LHPSDRPLML	AIHKKILQAS	GQPPDYSPIR	FRTRNGEYIT	LDTSWSSFIN	PWSRKISPII	GRHKVRVGPL	NEDVFAASPC
hPER2	DLIETPVLVQ	LHPSDRPLML	AIHKKILQSG	GQPPDYSPIR	FRARNGEYIT	LDTSWSSFIN	PWSRKISPII	GRHKVRVGPL	NEDVFAAHPC
<b>PAC</b>									
AnPER2	PEEKTPHPSV	QELTEQIHRL	LMQPVPHSGS	SGYGSLGNSG	SHEHLMSQTS	SSDSNGQEES	HRRSGIFKT	GGKIQTKSHF	SPESSGQKEA
rPER2	PEEKTPHPSV	QELTEQIHRL	LMQPVPHSGS	SGYGSLGNSG	SHEHLMSQTS	SSDSNGQEES	HRRSGIFKT	SGKSQSKSHF	SPESSGQKEA
hPER2	TEEKALHPSI	QELTEQIHRL	LLQPVPHSGS	SGYGSLGNSG	SHEHLMSQTS	SSDSNGHEDS	RRRRAEICKN	GNKTKNRSHY	SHESSGQKKK
AnPER2	PVAEMQSSFP	AQVKAVTTIE	RDSSGASLPK	ASFPPELTYK	NQPPCSYQQI	SCLDSVIRYL	ESCNEAATLK	RKCEFFANIP	S-----RKT
rPER2	PVAEMQSSFP	AQVRSVTTME	RDSSGASLPK	ASFPPELTYK	SQPPCSYQQI	SCLDSVIRYL	ESCNEAATLK	RKCEFFANIP	S-----RKA
hPER2	SVTEMQTNPF	AEKKAVPAME	KDSLGV---	-SFPEELACK	NQFTCSYQQI	SCLDSVIRYL	ESCNEAATLK	RKCEFFANVP	ALRSSDKRKA
AnPER2	TVSPGLHSGE	AARPSKVTS	TEVSAHLSSL	TLPGKAESV	SLTSQCSYSS	TIVHVGDKKP	QPELETVEDV	ASGPESLDGA	G-----GGFS
rPER2	TVSPGLHSGE	AARSSKVTS	TEVSAHLSSL	ALPGKAESV	SLTSQCSYSS	TIVHVGDKKP	QPELETVEDV	ASGPESQDDA	A-----GGLS
hPER2	TVSPGPHAGE	AEPFSRVNSR	TGVGTHLTSL	ALPGKAESVA	SLTSQCSYSS	TIVHVGDKKP	QPELEMVEDA	ASGPESLDCL	AGPALACGLS
AnPER2	QEKGPLQKLG	LTKEVLAHA	QREEQGFLLR	FREVSRLGAL	QAHCCNYLQE	RSRAQASD--	-RGLRNTSGV	ESSWKKTKGN	RKLKSKRVKT
rPER2	QEKGSLQKLG	LTKEVLAHA	QREEQGFLLR	FREVSRLGAL	QAHCCNYLQE	RSRAPASD--	-RGLRNASGI	ESSWKKTKGN	RKLKSKRVKT
hPER2	QEKEPFKKLG	LTKEVLAHA	QKEEQSFLQK	FKEIRKLSIF	QSHCHYYLQE	RSKQQPSERT	APGLRNTSGI	DSPWKKTKGN	RKLKSKRVKP
AnPER2	RDSESTGSG	GPVSHRPPLV	GLNATAWSPS	DTSQSSCPSA	FFPAAVFP-AY	TLPVFQAPGI	VSTPGTVVAP	PAAVHTSFTM	FVVPMGTQPE
rPER2	RDSESTGSG	GPVSHRPPLV	GLNATAWSPS	DTSQSSCPSA	FFPAPVFP-AY	PLPVFPAPGI	VSTPGTVVAP	PAAHTGFTM	FVVPMGTQPE
hPER2	RDSESTGSG	GPVSARPLV	GLNATAWSPS	DTSQSSCPAV	FFPAPVFAAY	SLPVFPAP--	---GTVAAP	PAPPHASFTV	PAVFPDLQHQ
AnPER2	FAVQPLPFAA	PLAPLVAFML	PSYFFPATP	NLPQAFFPSQ	PHFPAHPTLA	SEITPASQAE	IPSRTSMLRQ	FCACFVTPPA	GTVALGRASP
rPER2	FAVQPLPFAA	PLAPVMAFML	PSYFFPATP	NLPQAFFPSQ	PHFPAHPTLA	SEITPASQAE	FPSRTSMLRQ	FCACFVTPPA	GTVALGRASP
hPER2	FAVQPPFPFA	PLAPVMAFML	PSYFFPSGTP	NLPQAFFPSQ	PQFFSHPTLT	SEMASASQPE	FPSRTSIPRQ	FCACFATRAT	PPSAMGRASP
AnPER2	PLFQSRGSSP	LQLNLLQLEE	APEGSTGAAG	TLGTTGTAAS	GLDCTSGLTSR	DRQPKAPPTC	DEPSDTQNSD	AISTSSDLLN	LLLGEDLCSA
rPER2	PLFQSRGSSP	LQLNLLQLEE	APESSTGAAG	TLGTTGTAAS	GLDCTSGLTSR	DRQPKAPPTC	SEPSDTQNSD	AISTSSDLLN	LLLGEDLCSA
hPER2	PLFQSRSSSP	LQLNLLQLEE	APEGGTGAMG	TTGATETAAY	GADCKPFTSR	DQPKAPLTR	DEPSDTQNSD	ALSTSSGLLN	LLLNEDLCSA
AnPER2	TGSALSRSGA	SATSDSLGSS	SLGCNTSQSG	AGSSDTSHTS	KYFGSIDSSE	NNHKAKMTD	TEESEQFIKY	VLQDPIWLLM	ANTDDNIMMT
rPER2	TGSALSRSGA	SATSDSLGSS	SLGCDSRSRG	AGSSDTSHTS	KYFGSIDSSE	NNHKAKMID	TEESEQFIKY	VLQDPIWLLM	ANTDDNIMMT
hPER2	SGSA-----	--ASESLGSG	SLGCDAASPSG	AGSSDTSHTS	KYFGSIDSSE	NNHKAKMNTG	MEESEHFIRK	VLQDPIWLLM	ADADSVMMT
AnPER2	YQLPSRDLIQ	VLKEDQEKLK	LLQRSQPRFT	EGQRQELQEV	HPVWHTGGFL	TAIDVTGCVY	CETEEKGNIC	LPYEEDSPSP	GLCDTSEAKE
rPER2	YQLPSRDLIQ	VLKEDQEKLK	LLQRSQPHFT	EGQRRELREV	HPVWHTGGFL	TAIDVTGCVY	CESEKGNIC	LPYEEDSPSL	GLCDTSEAKE
hPER2	YQLPSRNLEA	VLKEDREKLK	LLQKLPQPRFT	ESQRQELREV	HQWMTGGFL	AAIDVAECVY	CENKEKGNIC	IPYEEDIPSL	GLSEVSDTRK
AnPER2	EESGELMSPR	KETQT							
rPER2	EESGQLANPR	KEAQT							
hPER2	DENGSPLNHR	IEEQT							

Figure 11

Figure 11. 時計タンパク質 PER2 アミノ酸配列の配列比較

Fig. 10 と同様の表記で、ここでは PER2 の結果を示す。

AnBMAL1	MADQRMDISS	TISDFMSPGF	TDLLSGSLGT	SGVDCNRKRK	GSATDYQESM	DTDKDDPHGR	LEYAEHQGRI	KNAREAHSQI	EKRRRDKMNS
rBMAL1	MADQRMDISS	TISDFMSPGF	TDLLSGSLST	SGVDCNRKRK	GSATDYQESM	DTDKDDPHGR	LEYAEHQGRI	KNAREAHSQI	EKRRRDKMNS
hBMAL1	MADQRMDISS	TISDFMSPGF	TDLLSSSLGT	SGVDCNRKRK	GSSTDYQESM	DTDKDDPHGR	LEYTEHQGRI	KNAREAHSQI	EKRRRDKMNS
<b>bHLH</b>									
AnBMAL1	FIDELASLVP	TCSAMSRKLD	KLTVLRMAVQ	HMKTLRGATN	PYTEANYKPT	FLSDDELKHL	ILRAADGFLF	VVGCDRGKIL	FVSESVFKIL
rBMAL1	FIDELASLVP	TCNAMSRKLD	KLTVLRMAVQ	HMKTLRGATN	PYTEANYKPT	FLSDDELKHL	ILRAADGFLF	VVGCDRGKIL	FVSESVFKIL
hBMAL1	FIDELASLVP	TCNAMSRKLD	KLTVLRMAVQ	HMKTLRGATN	PYTEANYKPT	FLSDDELKHL	ILRAADGFLF	VVGCDRGKIL	FVSESVFKIL
<b>PAS-A</b>									
AnBMAL1	NYSQNDLIGQ	SLFDYLHPKD	IAKVKEQLSS	SDTAPRERLI	DAKTGLPVKT	DITPGPSRLC	SGARRSFFCR	MKCNRPVVKV	EDKDFASTCS
rBMAL1	NYSQNDLIGQ	SLFDYLHPKD	IAKVKEQLSS	SDTAPRERLI	DAKTGLPVKT	DITPGPSRLC	SGARRSFFCR	MKCNRPVVKV	EDKDFASTCS
hBMAL1	NYSQNDLIGQ	SLFDYLHPKD	IAKVKEQLSS	SDTAPRERLI	DAKTGLPVKT	DITPGPSRLC	SGARRSFFCR	MKCNRPVVKV	EDKDFPSTCS
<b>PAS-B</b>									
AnBMAL1	KKKADRSKFC	TIHSTGYLKS	WPPTKMGLDE	DNEPDNEGNC	LSCLVAIGRL	HSHMVPQPVN	GEIRVKSMEY	VSRHAIDGKE	VFVDQRATAI
rBMAL1	KKKADRSKFC	TIHSTGYLKS	WPPTKMGLDE	DNEPDNEGNC	LSCLVAIGRL	HSHMVPQPVN	GEIRVKSMEY	VSRHAIDGKE	VFVDQRATAI
hBMAL1	KKKADRSKFC	TIHSTGYLKS	WPPTKMGLDE	DNEPDNEGNC	LSCLVAIGRL	HSHVVPQPVN	GEIRVKSMEY	VSRHAIDGKE	VFVDQRATAI
<b>PAC</b>									
AnBMAL1	LAYLPQELLG	TSCYEYFHQD	DIGHLAECHR	QVLQTREKIT	TNCYKFKIKD	GSFITLRSRW	FSFMNPWTK	VEYIVSTNTV	VLANVLEGGD
rBMAL1	LAYLPQELLG	TSCYEYFHQD	DIGHLAECHR	QVLQTREKIT	TNCYKFKIKD	GSFITLRSRW	FSFMNPWTK	VEYIVSTNTV	VLANVLEGGD
hBMAL1	LAYLPQELLG	TSCYEYFHQD	DIGHLAECHR	QVLQTREKIT	TNCYKFKIKD	GSFITLRSRW	FSFMNPWTK	VEYIVSTNTV	VLANVLEGGD
<b>PAS-B</b>									
AnBMAL1	PTFPQLTASP	HSMDSMLPSG	EGGPKRTHPT	VPGIPGGTRA	GAGKIGRMIA	EEIMEIHRIR	GSSPSSCGSS	PLNITSTPPP	DASSPGGKKI
rBMAL1	PTFPQLTASP	HSMDSMLPSG	EGGPKRTHPT	VPGIPGGTRA	GAGKIGRMIA	EEIMEIHRIR	GSSPSSCGSS	PLNITSTPPP	DASSPGGKKI
hBMAL1	PTFPQLTASP	HSMDSMLPSG	EGGPKRTHPT	VPGIPGGTRA	GAGKIGRMIA	EEIMEIHRIR	GSSPSSCGSS	PLNITSTPPP	DASSPGGKKI
<b>PAC</b>									
AnBMAL1	LNGGTPDIPS	TGLLPGQAQE	TPGYPYSDSS	SILGENPHIG	IDMIDNDQGS	SSPSNDEAAM	AVIMSLLEAD	AGLGGPVDFS	DLPWPL
rBMAL1	LNGGTPDIPS	AGLLPGQAQE	TPGYPYSDSS	SILGENPHIG	IDMIDNDQGS	SSPSNDEAAM	AVIMSLLEAD	AGLGGPVDFS	DLPWPL
hBMAL1	LNGGTPDIPS	SGLLSGQAQE	NPGYPYSDSS	SILGENPHIG	IDMIDNDQGS	SSPSNDEAAM	AVIMSLLEAD	AGLGGPVDFS	DLPWPL

Figure 12

Figure 12. 時計タンパク質 BMAL1 アミノ酸配列の配列比較

Fig. 10 と同様の表記で、ここでは BMAL1 の結果を示す。

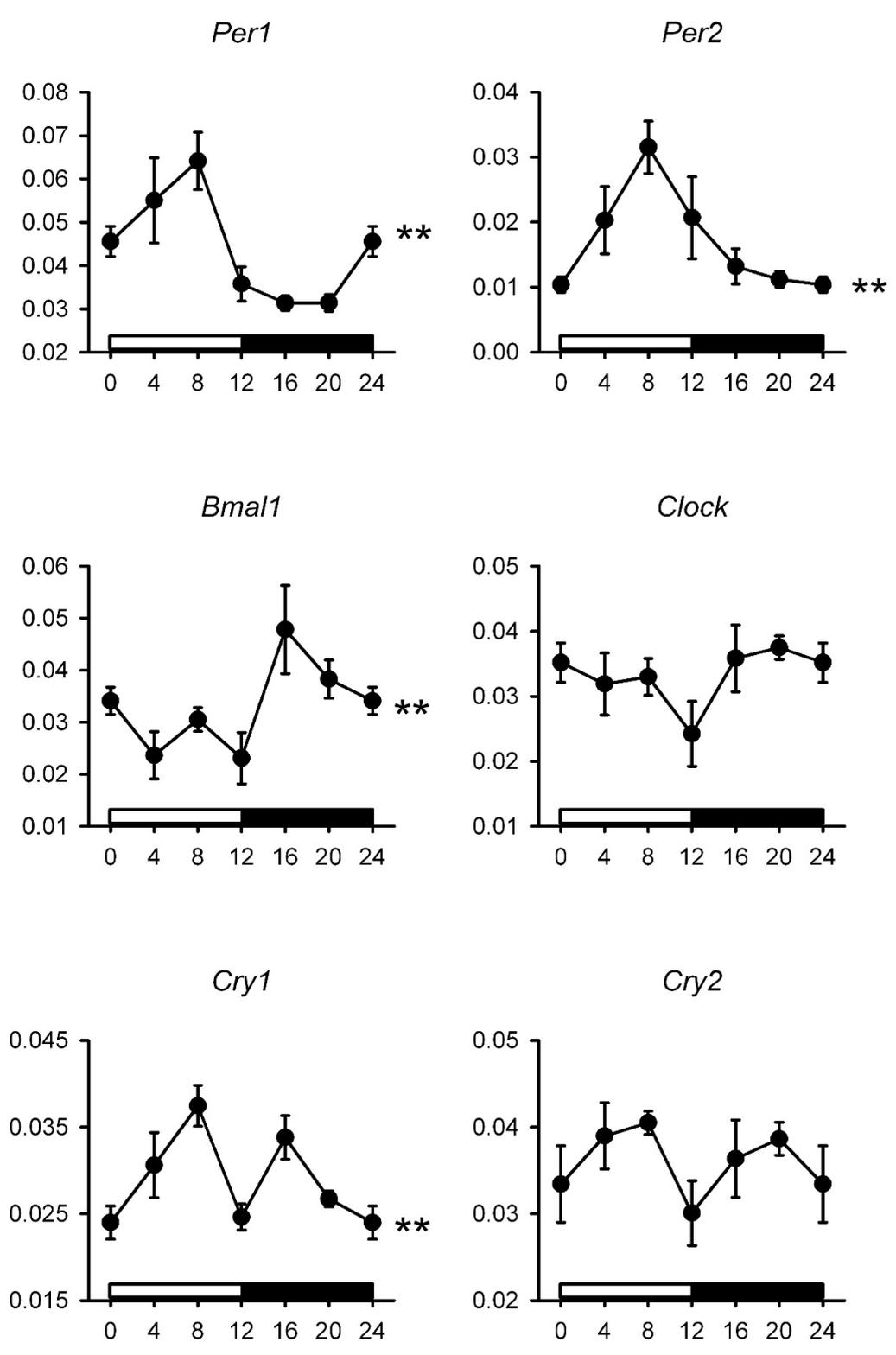
AnCLOCK	MLFTVSCSKM	SSIVDRDDSS	IFDGLVEEDD	KDKAKRVSRN	KSEKKRRDQF	NVLIKELGSM	LPGNARKMDK	STVLQKSIDF	LRKHKEITAQ
rCLOCK	MLFTVSCSKM	SSIVDRDDSS	IFDGLVEEDD	KDKAKRVSRN	KSEKKRRDQF	NVLIKELGSM	LPGNARKMDK	STVLQKSIDF	LRKHKEITAQ
hCLOCK	MLFTVSCSKM	SSIVDRDDSS	IFDGLVEEDD	KDKAKRVSRN	KSEKKRRDQF	NVLIKELGSM	LPGNARKMDK	STVLQKSIDF	LRKHKEITAQ
							<b>bHLH</b>		
AnCLOCK	SDASEIRQDW	KPTFLSNEEF	TQLMLEALDG	FFLAIMTDGS	IIVVSESVTS	LLEHLPSDLV	DQSIFNFIPE	GEHSEVYKML	SAHLESDSL
rCLOCK	SDASEIRQDW	KPTFLSNEEF	TQLMLEALDG	FFLAIMTDGS	IIVVSESVTS	LLEHLPSDLV	DQSIFNFIPE	GEHSEVYKIL	STHLESDSL
hCLOCK	SDASEIRQDW	KPTFLSNEEF	TQLMLEALDG	FFLAIMTDGS	IIVVSESVTS	LLEHLPSDLV	DQSIFNFIPE	GEHSEVYKIL	STHLESDSL
					<b>PAS-A</b>				
AnCLOCK	TPEYLKSKNQ	LEFCCHMLRG	TIDPKPESTY	EYVRFIGNFK	SLNNVSTSTH	NGFEGTIQRT	HRPSYEDRVC	FVATVRLATP	QFIKEMCTVE
rCLOCK	TPEDLKSKNQ	LEFCCHMLRG	TIDPKPESTY	EYVRFIGNFK	SLNSVSTSTH	NGFEGTIQRT	HRPSYEDRVC	FVATVRLATP	QFIKEMCTVE
hCLOCK	TPEYLKSKNQ	LEFCCHMLRG	TIDPKPESTY	EYVKFIGNFK	SLNSVSSSAH	NGFEGTIQRT	HRPSYEDRVC	FVATVRLATP	QFIKEMCTVE
AnCLOCK	EPNEEFTSRH	SLEWKFLFLD	HRAPPIIGYL	PFEVLGTSGY	DYYHVDDLEN	LAKCHEHLMQ	YGKSKSCYYR	FLTKGQQWIW	LQTHYIITYH
rCLOCK	EPNEEFTSRH	SLEWKFLFLD	HRAPPIIGYL	PFEVLGTSGY	DYYHVDDLES	LAKCHEHLMQ	YGKSKSCYYR	FLTKGQQWIW	LQTHYIITYH
hCLOCK	EPNEEFTSRH	SLEWKFLFLD	HRAPPIIGYL	PFEVLGTSGY	DYYHVDDLEN	LAKCHEHLMQ	YGKSKSCYYR	FLTKGQQWIW	LQTHYIITYH
		<b>PAS-B</b>				<b>PAC</b>			
AnCLOCK	QWNSRPEFIV	CTHTVVSYAE	VRAERRRELG	IEESLPETAA	DKSQDSGSDN	RINTVSLKEA	LERFDHSPTP	SASSRSSRKS	SHTAVSDPSS
rCLOCK	QWNSRPEFIV	CTHTVVSYAE	VRAERRRELG	VEESLPETAA	DKSQDSGSDN	RINTVSLKEA	LERFDHSPTP	SASSRSSRKS	SHTAVSDPSS
hCLOCK	QWNSRPEFIV	CTHTVVSYAE	VRAERRRELG	IEESLPETAA	DKSQDSGSDN	RINTVSLKEA	LERFDHSPTP	SASSRSSRKS	SHTAVSDPSS
AnCLOCK	TPTKIPTETS	TFPRQHLQVH	EKMAQRSSF	SSQSINSQSV	GPSLTQPAMS	QAANLPIPQG	MSQFQFSAQL	GAMQHLKQDL	EQTRMIEAN
rCLOCK	TPTKIPTETS	TFPRPHLPAH	EKMTQRSSF	SSQSINSQSV	GSSLTQPAMS	QAANLPIPQG	MSQFQLSAQL	GAMQHLKQDL	EQTRMIEAN
hCLOCK	TPTKIPTETS	TFPRQHLPAH	EKMVQRSSF	SSQSINSQSV	GSSLTQFVMS	QATNLPIPQG	MSQFQFSAQL	GAMQHLKQDL	EQTRMIEAN
AnCLOCK	IHRQQEELRK	IQEQLQMVHG	QGLQMFQQS	NPGLNFGSVQ	LSSGN-SNIQ	QLTPINMQGQ	VVVAQLQSG	MNAGHISTGQ	HMIQQQTLQS
rCLOCK	IHRQQEELRK	IQEQLQMVHG	QGLQMFQQS	NPGLNFGSVQ	LSSGN-SNIQ	QLTPINMQGQ	VVPVNIQSG	VNAGHVSTGQ	HMIQQQTLQS
hCLOCK	IHRQQEELRK	IQEQLQMVHG	QGLQMFQQS	NPGLNFGSVQ	LSSGNSNIQ	QLAPINMQGQ	VVPTNIQSG	MNTGHIGTTQ	HMIQQQTLQS
AnCLOCK	TST--QSVM	SGHSQQTSLP	NQTPSTLTAP	LYNTMVISQP	AAGSMVQIPS	SMPQNSTQSA	TVTTFQDRQ	IRFSQQQLV	TKLVTAPVAC
rCLOCK	TSTQSQSVM	SGHSQPTSLE	NQTPSTLTAP	LYNTMVISQP	AAGSMVPIPS	SMPQNSTQSA	TVTTFQDRQ	IRFSQQQLV	TKLVTAPVAC
hCLOCK	TSTQSQQNVL	SGHSQQTSLP	SQTQSTLTAP	LYNTMVISQP	AAGSMVQIPS	SMPQNSTQSA	AVTTFQDRQ	IRFSQQQLV	TKLVTAPVAC
AnCLOCK	GAVMVPSTML	MGQVVTAIPT	FATQQQAQT	LSVTQQQQQQ	QQQQQQQQQQ	QPQQQQ-QQ	QSSQEQLP	SVQQFAQAQL	TQPPQQFLQT
rCLOCK	GAVMVPSTML	MGQVVTAIPT	FATQQQAQA	LSVTQQQQQQ	QQQQQQQQQQ	QPQAQQPQS	QSSQDQPH	SVQQP--AQL	TQPPQQFLQT
hCLOCK	GAVMVPSTML	MGQVVTAIPT	FATQQQSQT	LSVTQQQQ--	-----	-----	QSSQEQLT	SVQQPSQAQL	TQPPQQFLQT
AnCLOCK	SRL LHGNPST	QLILSAAFPL	QQSTFFPSHH	QQHQPPQQQQ	LRRHRTDSL	DPSKAQPQ			
rCLOCK	SRL LHGNPST	QLILSAAFPL	QQSTFFPSHH	QQHQ---QQQ	LRRHRTDSL	DPSKVQPQ			
hCLOCK	SRL LHGNPST	QLILSAAFPL	QQSTFFPSHH	QQHQSQQQQQ	LRRHRTDSL	DPSKVQPQ			

Figure 13

Figure 13. 時計タンパク質 CLOCK アミノ酸配列の配列比較

Fig. 10 と同様の表記で、ここでは CLOCK の結果を示す。

Relative abundance / GAPDH



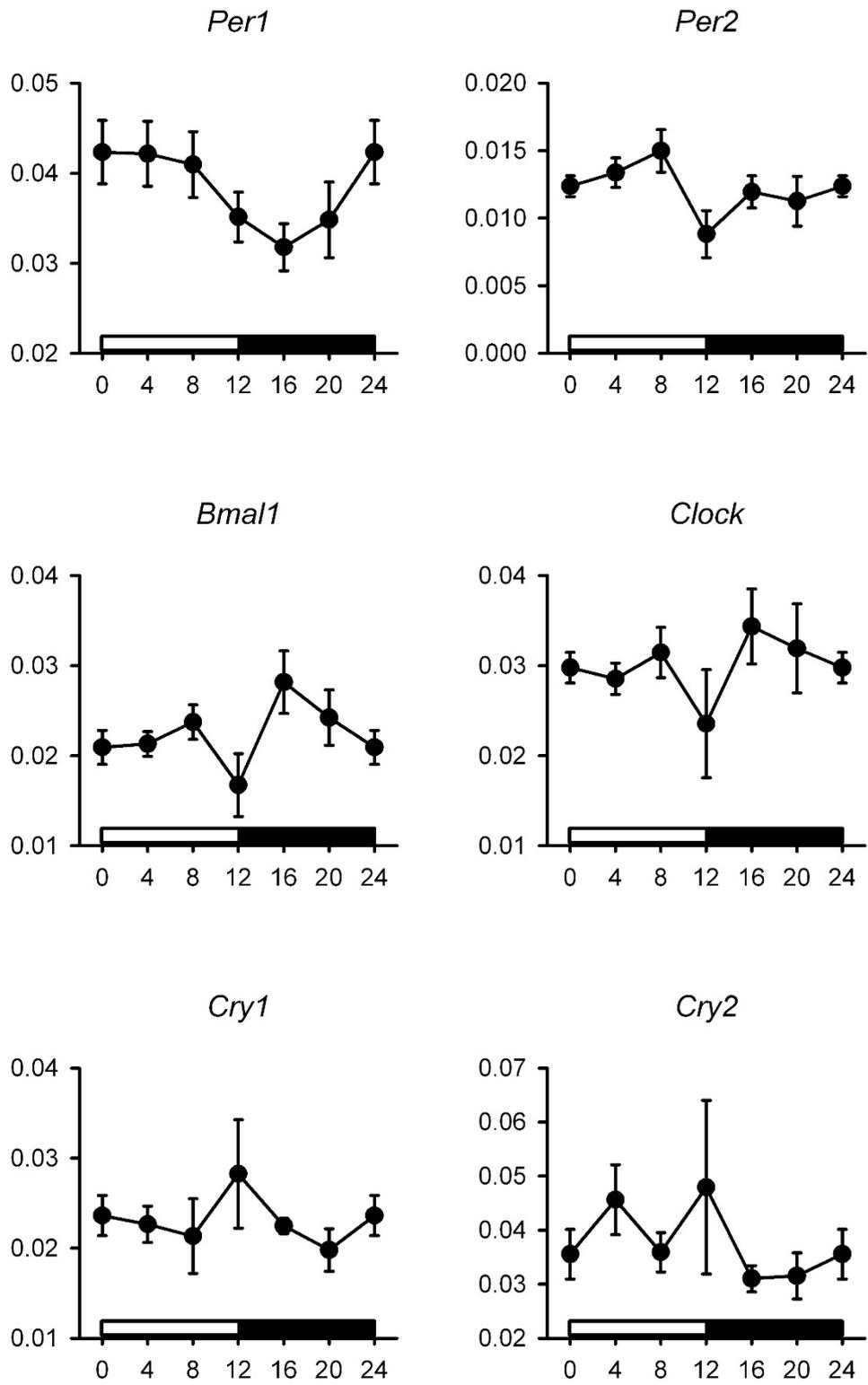
ZT

Figure 14

Figure 14. ナイルグラスラット視交叉上核 (SCN) における時計遺伝子 mRNA 発現リズム

ナイルグラスラット SCN における時計遺伝子 *Per1*, *Per2*, *Bmal1*, *Clock*, *Cry1*, *Cry2* の発現量を、*GAPDH* を内部標準として比較定量した (各時刻 n = 6-8)。各点は各時刻における平均値、エラーバーは標準誤差を示す。*Per1*, *Per2*, *Bmal1*, *Cry1* において有意な時刻による変動がみられた (\*\*: $P < 0.01$  by one-way ANOVA)。

Relative abundance / GAPDH



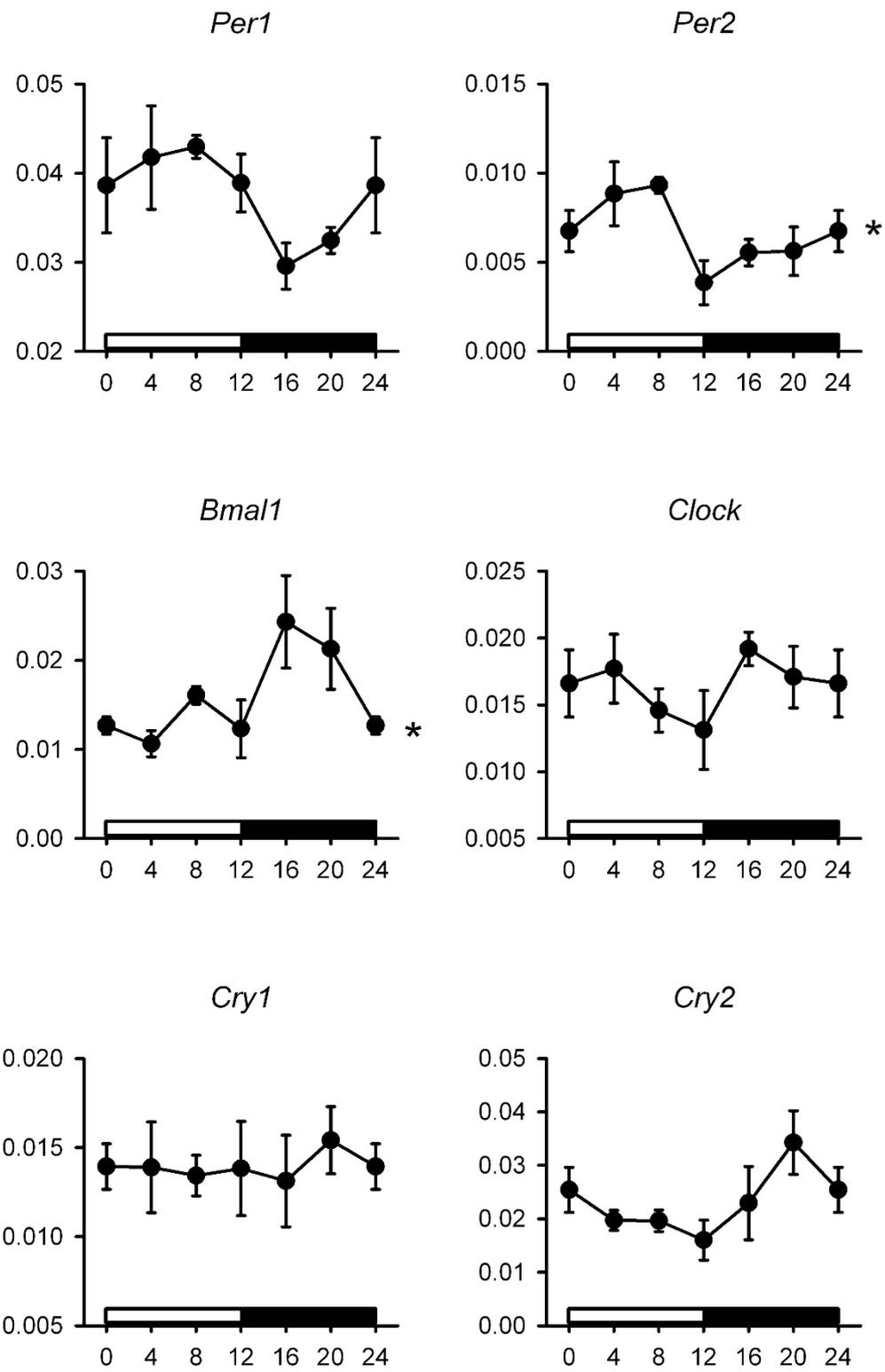
ZT

Figure 15

Figure 15. ナイルグラスラット室傍核 (PVN) における時計遺伝子 mRNA 発現リズム

ナイルグラスラット PVN における時計遺伝子 *Per1*, *Per2*, *Bmal1*, *Clock*, *Cry1*, *Cry2* の発現量を、*GAPDH* を内部標準として比較定量した (各時刻 n = 4-7)。各点は各時刻における平均値、エラーバーは標準誤差を示す。解析を行ったすべての遺伝子において有意な時刻による変動はみられなかった。

Relative abundance / GAPDH



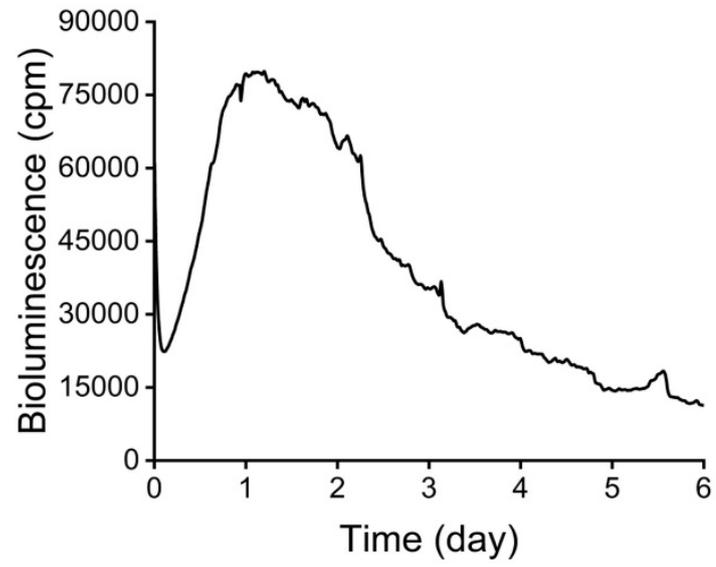
ZT

Figure 16

Figure 16. ナイルグラスラット海馬における時計遺伝子 mRNA 発現リズム

ナイルグラスラット海馬における時計遺伝子 *Per1*, *Per2*, *Bmal1*, *Clock*, *Cry1*, *Cry2* の発現量を、*GAPDH* を内部標準として比較定量した (各時刻 n = 5-7)。各点は各時刻における平均値、エラーバーは標準誤差を示す。*Per2*, *Bmal1* において有意な時刻による変動がみられた (\* $P < 0.05$  by one-way ANOVA)。

A



B

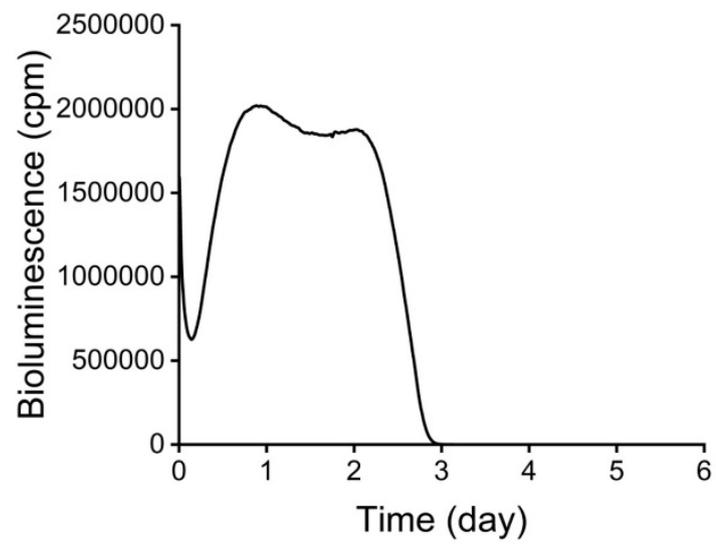


Figure 17

Figure 17. 時計遺伝子 *Bmal* 発光レポーターを一過的に導入した細胞の発光リズム

ナイルグラスラットの肺または皮膚から単離し、不死化した線維芽細胞に *Bmal* 発光レポーター (*AnBmal1-ELuc*) を一過的に導入し、同調処理を行った後発光リズムを記録した。皮膚 (A) および肺 (B) に由来する線維芽細胞株の結果をそれぞれ示す。

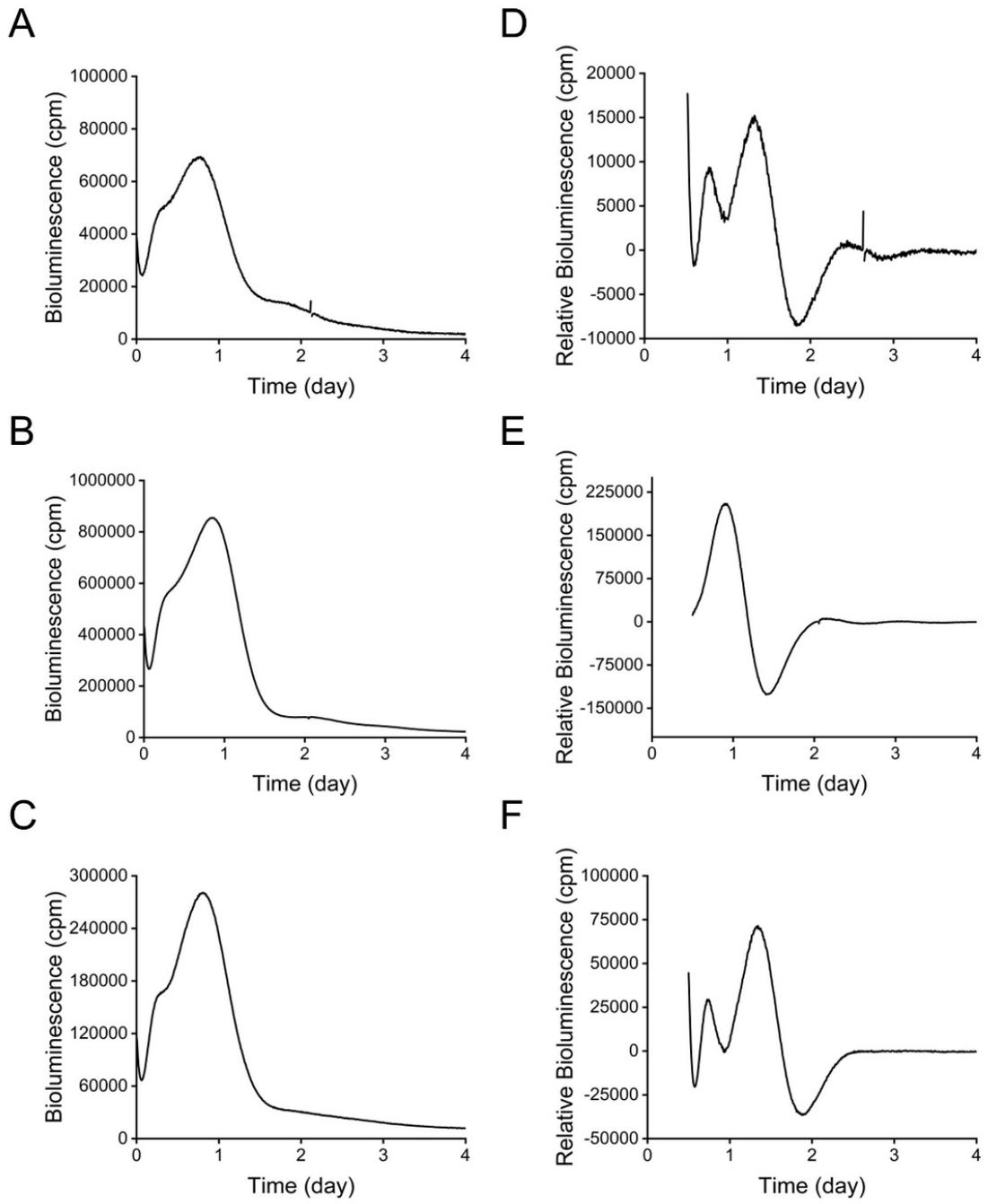


Figure 18

**Figure 18. 時計遺伝子 *Bmal* 発光レポーターを安定発現させた皮膚由来細胞の発光リズム**

ナイルグセラットの皮膚に由来する不死化線維芽細胞に *Bmal* 発光レポーター (*AnBmal1-ELuc*) を導入後、セクションを行うことで3つの細胞集団を得た。(A-C) それぞれの細胞集団から得られた発光リズムを示す。(D-F) (A-C) の発光リズムからトレンド除去を行ったトレースをそれぞれ示す。

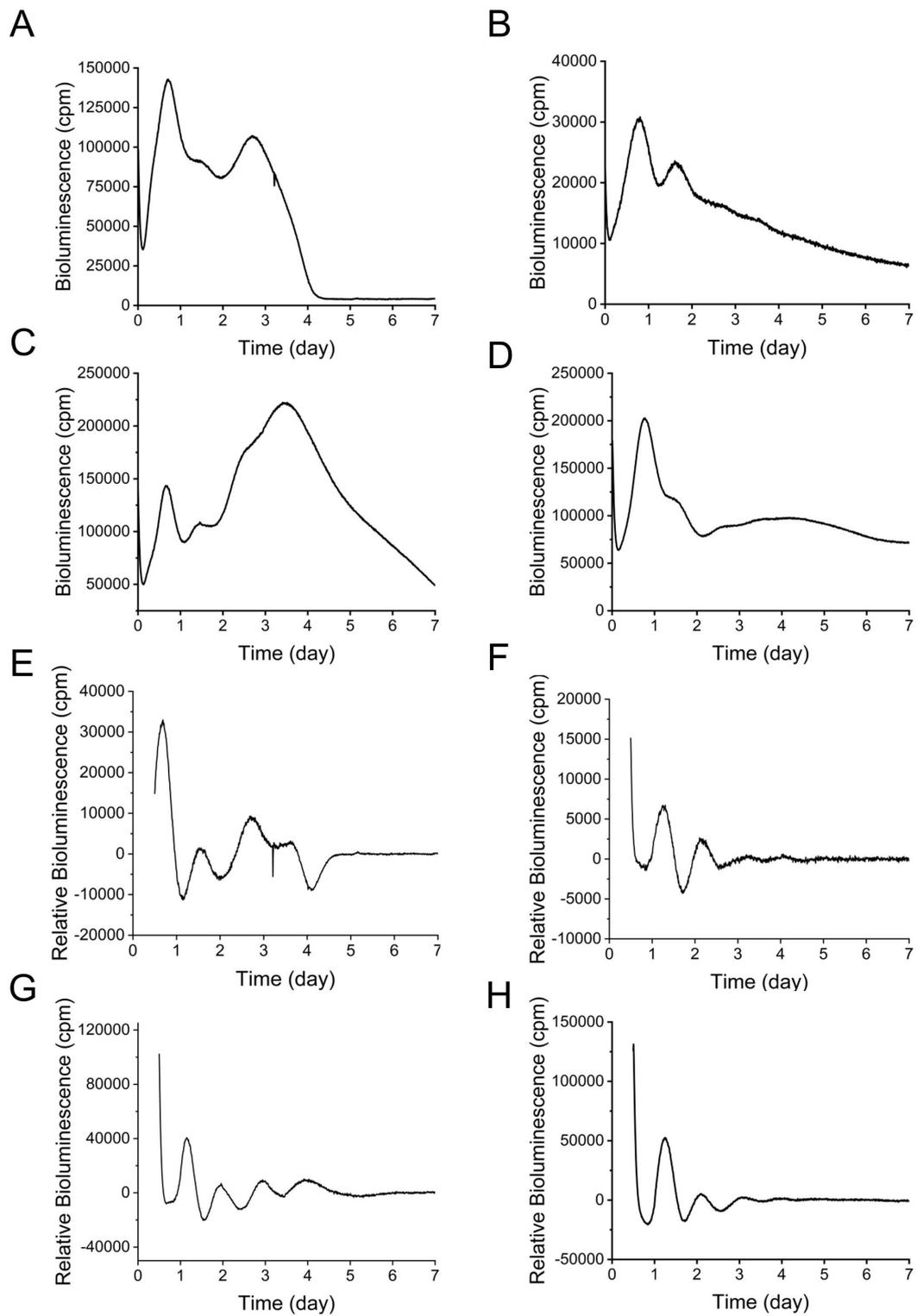


Figure 19

**Figure 19. 時計遺伝子 *Bmal* 発光レポーターを安定発現させた肺由来細胞の発光リズム**

ナイルグラスラットの肺に由来する不死化線維芽細胞に *Bmal* 発光レポーター (*AnBmal1-ELuc*) を導入後、セレクションを行うことで4つの細胞集団を得た。**(A-D)** それぞれの細胞集団から得られた発光リズムを示す。**(E-H)** (A-D) の発光リズムからトレンド除去を行ったトレースをそれぞれ示す。

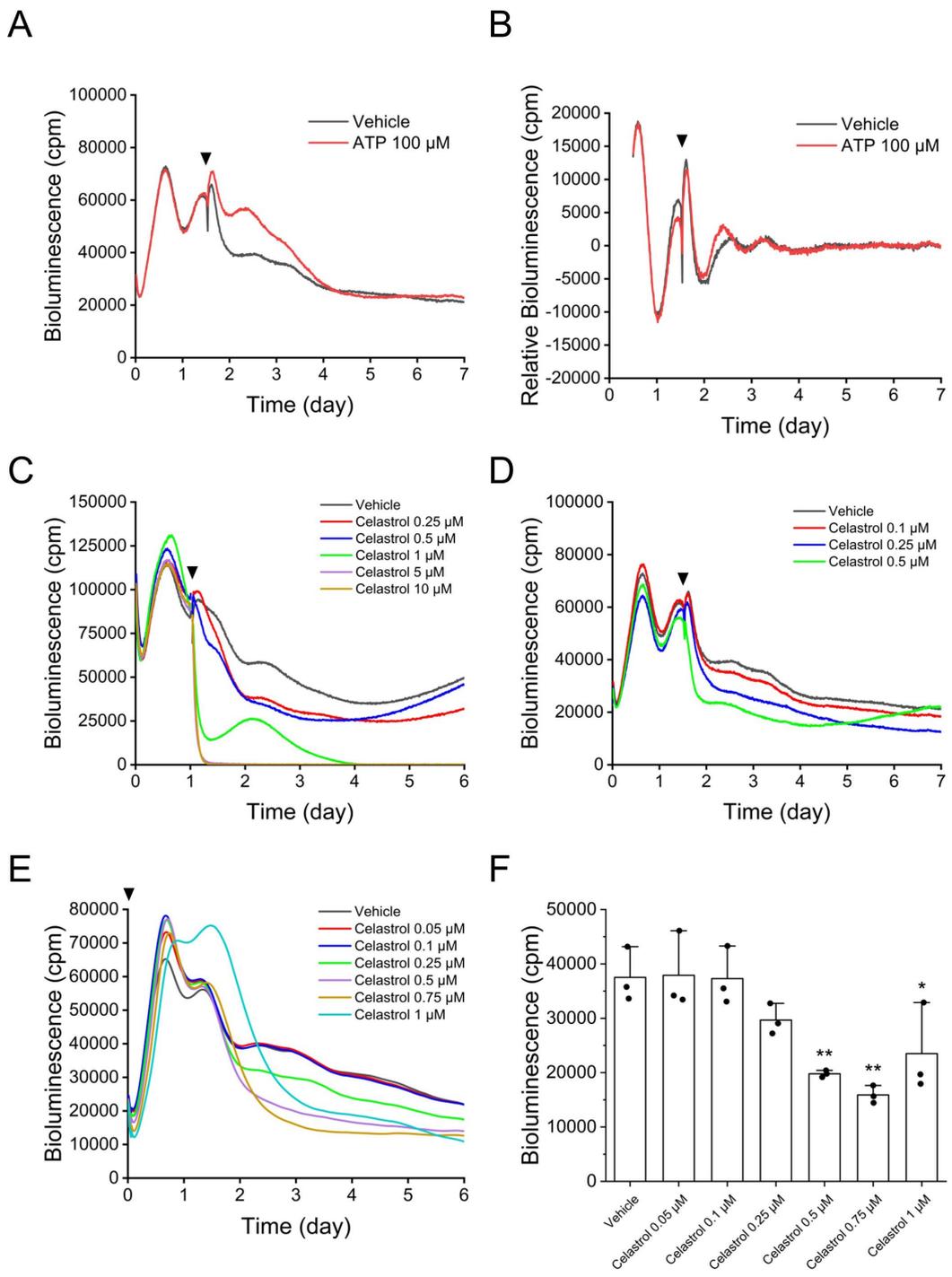


Figure 20

Figure 20. NLF-Luc 細胞を用いた Bmal1-ELuc リズムに対する ATP とセラストロールの影響

NLF-Luc 細胞を用いて時計遺伝子 *Bmal1* 発現リズムに対する薬物の作用を解析した。

(A) Dex による同調処理から 36 時間後に ATP 100  $\mu\text{M}$  を投与した時の発光リズムに対する影響を示す。ATP 投与により発光量の増加が見られた。(B) (A) のグラフをトレンド除去したグラフを示す。(C) Dex による同調処理から 24 時間後にセラストロール 0.25-10  $\mu\text{M}$  を投与した時の発光リズムに対する影響を示す。濃度依存的に発光量の低下が観察された。(D) Dex による同調処理から 36 時間後にセラストロール 0.1-0.5  $\mu\text{M}$  を投与した時の発光リズムに対する影響を示す。(E) 発光測定の開始時にセラストロール 0.05-1  $\mu\text{M}$  を投与した時の発光リズムに対する影響を示す。3 ディッシュの平均値を示す。(F) (E) のグラフの測定開始 3 日後の発光量を定量した結果を示す。セラストロール 0.5  $\mu\text{M}$  以上の濃度で有意に発光量が減少することが示された。\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  by Dunnett's test.

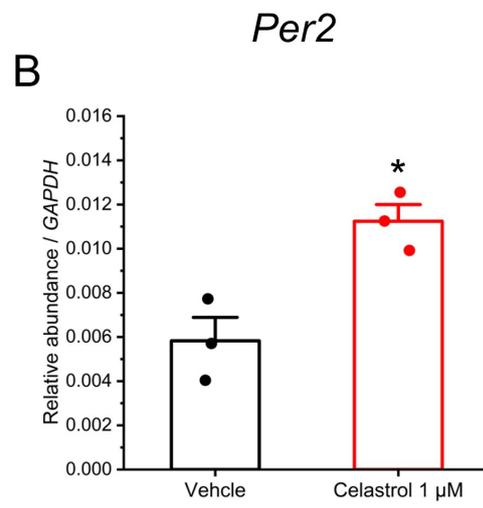
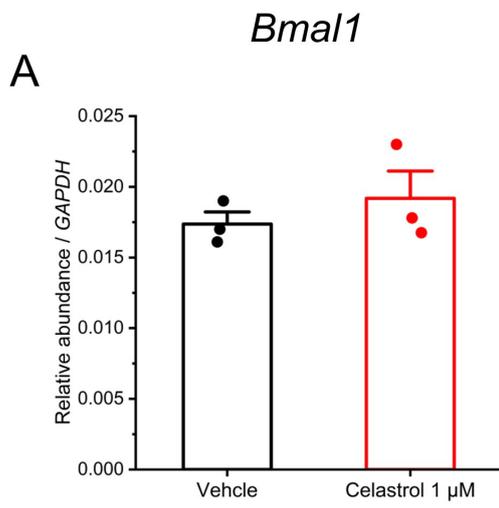


Figure 21. NLF-Luc 細胞における時計遺伝子転写量に対するセラストロールの影響

(A) メディウムチェンジから 24 時間後の細胞に対してセラストロール 1  $\mu\text{M}$  を 4 時間投与し、リアルタイム RT-PCR により時計遺伝子 *Bmal1* の転写量を解析した。セラストロール投与による変化は観察されなかった。(B) 時計遺伝子 *Per2* の結果を示す。セラストロール 1  $\mu\text{M}$  投与により、有意に転写量が増加した。(n=3, \* $p < 0.05$  by Welch's *t*-test.)