

2005年5月2日校正版

日本生理学雑誌 LECTURES

**サーカディアンリズムの解析法
個体行動、神経活動から分子リズムに至るまで**

富山大学理学部生物学科生体制御学講座

助教授

池田 真行*

(msikeda@sci.toyama-u.ac.jp)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科

医療科学専攻病態解析・制御学講座神経機能学分野

講師

守屋 孝洋

(moriya@net.nagasaki-u.ac.jp)

三菱化学生命科学研究所

時間ゲノム学

研究グループリーダー

程 肇

(tei@libra.ls.m-kagaku.co.jp)

* 連絡先

〒930-8555

富山市五福 3190 富山大学理学部生物学科 A202 号室

電話：076-445-6636

FAX：076-445-6549

1. はじめに

サーカディアン (Circadian) リズムとは 1959 年に Halberg によって提唱されたことばで、*circa*「約」*dies*「一日」というラテン語に由来している。日本語では概日リズムという。多くの生命現象において観察される昼夜差のことを指して用いられる場合もあるが、狭義には環境からの時間の手がかりを遮蔽した後にも持続する内因性リズムのことを意味する。内因性リズムとは、いわば体内時計の出力である。生物種によってその周期が 24 時間より若干長かったり短かったりすることから、サーカディアンリズムといわれるのである。こうしたサーカディアンリズム研究は、「ありのまま」の生命現象を解き明かすことを目的とした生理学の典型的な対象である。

ほとんどの生物の行動 (例えば睡眠覚醒サイクル) や内的生理現象 (体温、ホルモン分泌、神経活動) には、概日リズムが存在する。実際、現代の人々は、海外渡航に際し、時差ぼけという体調不良を体験することで、概日リズムの存在をいやでも知ることになる。時差ぼけの主な身体症状は睡眠と消化器系の失調として体感されることが多い。現在、概日リズムの発生機構には三つの部分より構成される仮想的なモデルが提示されている。つまり、外界の変化を補正要因として取り込む入力系、時計本体、及び内分泌や行動を制御する出力系である (概日時計の三要素)。哺乳類の時計中枢は、視床下部にある視交叉上核 (SCN) に存在すると考えられている。SCN を破壊すると、活動、体温、脳内電気活動、血中ホルモンであるメラトニンやコルチコステロン等のリズムがすべて消失する。SCN 破壊により消失したリズムも、別の個体の SCN を移植することにより回復することが知られている。こうしたことから、SCN が概日時計機構に欠くことのできない神経核であることがよく理解できる。SCN が周囲の光サイクルに同調するためには、網膜から SCN へ達する神経連絡が必要である。実際、ラットでこの経路を遮断すると行動などの概日リズムは光に対する反応性を失う。こうした時計への入力経路が比較的良く理解されているのに対して、SCN からの出力機構は今なお不明な点が多い。これまでに、液性出力や神経連絡 (電氣的な) 出力の両方が存在すると推定されている。最近では、SCN 以外の幾つかの脳部位 (例えば線条体) や、あるいは末梢の組織 (例えば肝臓) にも弱い概日振動体が存在し、SCN は最高位の中枢としてこれら複数の時計を統合制御していることもわかってきている。こうしたことから体内時計システムの総合的な理解には、生命科学に対する広範囲な知識と、多種多様な解析法を用いることが必要になってきている。

この Lecture では、そうしたサーカディアンリズムの解析法の一部を入門者向けに概説することを心がけた。なお、行動リズム・神経発火リズム・神経細胞内カルシウム濃度リズムについては池田が、固定脳標本の時計遺伝子発現リズムについては守屋が、ルシフェラーゼレポーターを用いた living cell の時計遺伝子発現リズムについては程が担当した。これからサーカディアンリズム研究を行なおうとする若手研究者の一助となれば幸いである。

2. 自発行動にみられるサーカディアンリズムの研究手法（池田）

小生がサーカディアンリズム研究に出会ったのは、山口大学理学部生物学科千葉喜彦研究室での卒業研究であり、今からもう16年も前のことである。入門のきっかけは、時間生物学の講義の中で紹介される、蚊（千葉先生の研究対象）やコオロギ（当時助手であった富岡憲治先生[現：岡山大学理学部生物学科教授]の研究対象）の行動リズムが、規則正しく綺麗であったからという単純なものであったように覚えている。しかし、そうした小動物の自発行動リズムを、時には何十日にも及び観察することは、当時大変なことであった。今日のようにパーソナルコンピューターが普及する前の時代である。然るに、自動計測用のハード・ソフトウェアは限られており、昆虫の行動リズムの計測装置はセンサーの選択、入出力ボードの設計・製作から、記録・解析ソフトウェアの開発まで、すべて自前で行なう必要があったのだ。とても生物学科の一教室が気安く取り組めるものではなかったように思われる。しかし今日では、既製品のセンサーやデータ入出力ボードを用いて比較的簡単に多チャンネルの自動解析が行えるようになっている。

図1には、今日一般的に使われている機材の構成やデータ処理の流れをまとめた。哺乳動物のリズム解析では、動物から放出される赤外線的面積あたりの差分を検出する焦電型赤外線センサーを用いることが一般的となっており、センサー出力（ON/OFF シグナル）を多接点入出力ボード（例えばコンテック社の絶縁型パラレル入力ボード PI-128L PCI）を介してコンピューターに取り込む。このとき、一定のサンプリング間隔で24時間ごとに（例えば日付入りのファイルネームで）データを保存するソフトウェアを組んでおくと、データの管理が容易になる。上記の入出力ボードでは、一台のパーソナルコンピューターで128chの同時入力が行なえることから、通常は1研究室で1台の記録用コンピューターがあれば充分であろう。長期間の連続測定においては、停電に備えてUPS バックアップ電源を備えておけば安心である。エンドユーザーは記録用コンピューターに日々蓄積されるデータから、任意のチャンネル、解析期間を選択し、時系列解析用のファイルをつくるようにすると便利である（図1B）。なお、このようなサーカディアンリズムの記録や解析のためには、Stanford ChronoKit (<http://www.query.com/chronokit/>) や MiniMitter システム (<http://www.minimitter.com/Products/VitalView/index.html>) の記録システムに、アクチメトリックス (<http://www.actimetrics.com/>) のリズム解析ソフトである Clock Lab を加えて用いるのがポピュラーな組み合わせとなっている。これらの輸入品の入手が困難な場合には、例えば上記入出力ボードを制御するシステムは国内のソフトメーカー（例えば（有）クリアワークス <http://www.clear-works.co.jp/product>）を通して比較的安価に購入することも可能であるし、データ分配ソフトや時系列解析ソフトは、小生が三菱化学生命研究所のサポートのもと作成したシェアウェア（PACR for Windows、図2）を使うことも可能である。興味のある方はご連絡いただきたい。

「はじめに」で述べたとおり、サーカディアンリズムの解析には、環境からの時間の手

がかりを遮蔽する必要があるため、実際の行動リズム記録に際しては、環境光を恒暗や恒薄明条件に固定し、内因性リズム周期（自由継続周期：free-running period）を顕在化させる手法が良く用いられる。また、この条件下で、光パルスや暗パルスを与えることでリズム位相の変化（位相反応：Phase-response）を観察し、その様相から環境への同調能力を推定することもしばしば行なわれる。よって、環境光を自在に変えられる条件での動物飼育が望まれる。こうしたシステムレベルのリズム解析と、その理論については、膨大な実験データから様々な規則性が見出されており、その詳細については専門書[1]を参照されたい。

3. 神経活動リズムにみられるサーカディアンリズムの計測手法（池田）

哺乳類の体内時計中枢である視床下部視交叉上核（SCN）は、視交叉直上、第三脳室の両側に存在する神経核であり片側1万個弱のニューロンから構成されている。その自発神経発火頻度には明瞭なサーカディアンリズムが見られることが報告されている。一般的な急性脳スライス電気生理学の手法を用いて、「根気よく」発火頻度解析を行えば、その平均値にサーカディアンリズムが観察されることは古くから知られるところである。今日では、多電極アレイ培養皿上でSCNを培養することにより、自発発火頻度に見られるサーカディアンリズムを自動計測することが可能となっている。なお、スライス培養、分散培養のいずれの方法でも記録を行なうことが可能である[2]が、ここではスライス培養を用いた方法について説明する。

マウス SCN スライス培養の作成と自発発火頻度解析

マウスの系統にかかわらずスライスは生後3-4日齢のものを用いる。マウスを氷上で数分間放置することにより低温麻酔する。クリーンベンチ内で脳をすばやく取り出し、95% O₂・5%CO₂でバブリングした氷温の人工脳脊髄液（30cc程度）の中に落とす。用いる人工脳脊髄液の組成は以下のとおりである。NaCl:138.6、KCl:3.35、NaHCO₃:21、NaH₂PO₄:0.6、Glucose:9.9、CaCl₂:0.5、MgCl₂:4（単位はすべてmM）脳は、滅菌環境にセットされたビブラトームスライサーを用いて、厚さ350μmの連続コロナール切片を吻側より作成し、前交連（anterior commissure）より後方のスライスを保存する。小生の場合、最低3枚の連続切片を保存し、顕微鏡下でSCNの中心がどの切片に含まれているのかを確認することになっている。スライスは、先端をフラットに落としたパスツールピペットを用いて、ミリポア社の培養用0.4μmフィルターカップ（Millicell-CM）に移し、培養液1mlを満たした6穴培養プレート（例えばファルコン社マルチウエル：低蒸散タイプ）内で保持、培養する。なお培養液100mlの組成は以下のとおりである。50ml Basal Medium Eagle、25ml Earle's Balanced Salt Solution、25ml 馬血清（56-30分で非動化したもの）、2ml 25% D-Glucose、1ml Glutamax、2mg カナマイシン。神経細胞の生存率は、スライス作成手技の手早さ（10分以内に作成することが好ましい）、スライス作成中の人工脳脊髄液の温度（理想は4℃）

などに大きく依存する。通常、スライス作成後 3-4 日間に神経細胞の著しい減少と、アストログリアの増加が観察される。最終的に、スライス底面にはタイトなグリア細胞層が形成され、その上に 3 層程度の神経細胞層が形成される。全体の厚さは、培養後 1 週間で約 40 - 50 μm に落ち着く。

多電極アレイを用いて、自発発火頻度解析する場合には、メンブレンフィルターの代わりに、コラーゲンコートをした多電極アレイ培養皿 (MED: アルファメッドサイエンス社 P5155 など) にスライスを直接のせて培養するか、あるいは一度メンブレン上で培養したスライスを切り取り、裏表に逆転させ MED 上に再培養する (図 3 A, B) [3]。MED 上での培養は、メンブレンフィルター上での培養に比べ、スライスが酸欠に陥りやすいので、培養液はスライス表面をようやく覆う程度 (約 120-130 μl) に維持し、24-36 時間の間隔で培養液を交換する。500 μV 前後の振幅のスパイクが観察されるので、多チャンネルアンプ (アルファメッド社純正品のほか、日本光電 AB-610J, AB621G などでも代用可能) で増幅し、ウインドウ型スライサ (日本光電 EN 601J) で任意の振幅のスパイクをデジタイズする。このとき、モニター用に輝度入力をついたオシロスコープ (日本光電 VC-11 や日立 VC6523 など) が必要となる。ウインドウ型スライサからの TTL 出力を、24 点デジタル入出力カード (Contec PI0-24W PM) を通してパーソナルコンピュータに入力すると、行動リズムの解析と同じソフトウェアでリズムの解析が可能となる。

なお、ここでは動物の自発行動量や神経発火頻度に見られるリズム解析について述べたが、この他、センサー部分や入力インターフェイスを変更することにより、飲水量や体温リズムなどいろいろなサーカディアンリズム観察 [4] に応用が可能であることを付け加えておく。

SCN スライス培養における自発発火頻度リズムと細胞内 Ca^{2+} 濃度リズムの同時計測

SCN ニューロンの細胞内シグナルとして Ca^{2+} は幅広く研究されており、たとえば網膜からの神経伝達には、NMDA 受容体を介した細胞内 Ca^{2+} 流入が重要であると考えられている。上述した多電極アレイ培養皿を用いた自発発火頻度リズム計測手法は、様々なバイオイメージング技法との融合が可能であり、 Ca^{2+} イメージング技法もそのひとつである。もっとも、従来型の fura-2 イメージング実験では、色素の毒性、退色、細胞外への流出などが問題で、サーカディアンリズムという長い時間軸の変動をトレースすることは難しい。そこで小生は、FRET 原理を用いた蛍光タンパク質 Ca^{2+} センサー (Yellow Cameleon) 遺伝子をあらかじめニューロンに導入しておけば、神経発火と細胞内 Ca^{2+} 濃度リズムの同時測定が可能であるのではないかと考えた (図 3 B) [3]。SCN スライス培養の場合、遺伝子銃を用いて効率よく遺伝子導入することが可能であり、また発現のために神経特異的エノラーゼプロモーターを用いることにより、ニューロン特異的なセンサータンパク質の発現が可能であることがわかった。

興味深いことに、SCN ニューロンの細胞質 Ca^{2+} 濃度には、サーカディアンリズムが存在し、

そのリズムは活動電位発火頻度リズムより位相が約 4 時間前進していた (図 3 C)。また、テトロドトキシンによって活動電位を完全に遮蔽した後にも、この Ca^{2+} リズムは持続するが、リアノジン受容体ブロッカーにより抑制されることなどが明らかとなっている [3]。これらの結果は、小胞体 Ca^{2+} 貯蔵からの周期的な Ca^{2+} 放出がサーカディアン Ca^{2+} リズムのドライビングフォースになっていることや、活動電位リズムがサーカディアン Ca^{2+} リズムにより影響されていることを示唆するものである。今後は、後述する時計遺伝子の機能と Ca^{2+} リズムの関係が重要な研究課題になるものと思われる。

4. 遺伝子発現を指標にした SCN 固定標本のリズム解析法 (守屋)

SCN では、時計遺伝子として同定された *Period* (*Per*) 遺伝子や *BMAL1* 遺伝子の発現は、それぞれの遺伝子に特異的な位相で日内変動する。また、体内時計をリセットさせる光同調刺激や非光同調刺激は、*Per* 遺伝子や早期発現遺伝子の 1 つである *c-fos* 遺伝子の発現変化を引き起こし、この遺伝子の一過的発現変化が体内時計のリセットに重要な過程であることが報告されている [5]。したがって、SCN におけるこれらの遺伝子の発現を *in situ* hybridization 法や免疫染色法を用いて解析することは、体内時計の時刻を知るだけでなく、その時刻発振機構や外界への同調機構を解明する上で非常に有用である [6]。今回は、時計遺伝子の mRNA の発現量を定量に優れている放射性同位体標識 RNA プローブを用いた *in situ* hybridization 法 (図 4) を概説する。

SCN 薄切片の作成

SCN 固定標本を作製するために、マウス、ラットなどの実験動物を深麻酔下で、生理食塩水と 4%パラホルムアルデヒド溶液にて還流固定する。この際、SCN の遺伝子発現は光の影響を強く受けるので、暗期にサンプリングする際には、還流直前までは実験動物を暗環境に保つことが重要である。また、SCN は解剖学的に視交叉の背側に埋め込まれているように存在するので、脳を取り出す前に視神経をハサミで切断し、SCN が視神経と共に脳から外れない注意も必要である。サンプリングした脳は、4%パラホルムアルデヒド溶液にて後固定し、20%スクロース溶液に浸漬する。マウスやラットの SCN は、吻側から尾側まで 1mm ほどの長さを有し、また遺伝子発現は SCN の部位によって異なるので、SCN の前額断薄切片を作成する際には視神経や視交叉の形を見ながら、もれなく切片を作成する注意が必要である。

in situ hybridization 法

まず、作成した切片をセリンプロテアーゼである Proteinase K 溶液で処理し、内在性 RNase を不活化し、さらにプローブの浸透性を高める。この処理時間が長すぎたりすると、切片がぼろぼろになり以後の操作が難しくなるので、濃度や反応時間の事前調整が必要である。つぎに切片をアセチル化し、 $2\times\text{SSC}$ (NaCl 33 mM, Sodium Citrate 33 mM) 溶液にて

洗浄する。目的とする mRNA と特異的にハイブリダイズする相補的な放射性同位体 (^{33}P) 標識 RNA プロブを、RNA ポリメラーゼを用いて鋳型遺伝子から *in vitro* で作成する。RNA プロブを溶解させたハイブリダイゼーション溶液に切片をいれ、切片が溶液に浸かり、軽く振とうさせながら、60 でハイブリダイゼーションをオーバーナイトで行う。2×SSC/50%ホルムアミド溶液にて洗浄し、未結合の RNA プロブを RNase によって切断し、さらに 2×SSC/50%ホルムアミド溶液および 0.4×SSC (NaCl 6.7 mM, Sodium Citrate 6.7 mM) 溶液にて洗浄する。切片をスライドガラスに貼り付け、アルコール脱水後に乾燥させ、高感度 X 線フィルムに照射を行う。この際、均一に X 線フィルムに照射されるようにスライドガラスに凸凹ができないように注意する。現像液と定着液を用いて、フィルムの現像を行い、SCN の遺伝子発現量をデンストメーターにより定量する。

5 . 化学発光レポーターを用いた時計遺伝子発現リズムの解析 (程)

守屋が先に述べたように、固定標本における遺伝子発現リズムの解析は、時計遺伝子群が、SCN では特に高いレベルで発現し、またサーカディアンリズムをもって発現することを明らかにしてきた。これまでのところ *Per1* 遺伝子の場合、明暗及び恒暗条件下での主観的明期にピークを持つ遺伝子発現リズムを有することや、*Per1* タンパク質の発現量は、mRNA 量に比べて位相が約 4-6 時間遅れたリズムを示すことが明らかとなってきた [7]。加えて特徴的な *Per1* の性質は、光照射により SCN で転写誘導されることであるが、興味深いのは、SCN 以外の幾つかの脳部位や末梢組織においても、*Per1* 遺伝子が発現していることである。末梢組織における *Per1* mRNA 発現 (および *Per1* タンパク質量) もサーカディアン周期をもって変化しており、SCN よりそれぞれ位相が約 3 - 6 時間後退したリズムを示すことも明らかとなってきた。これらは、一個体の体内時計システムが複数の時計により構成されており、それらがルーズにカップリングしていることを示唆するものとして注目されている。

われわれのグループは、生きた中枢と末梢の計時機能 (細胞時刻) を、同時にしかも同一の方法で測定するために、*Per1* のプロモータ領域にホタルの発光酵素であるルシフェラーゼの遺伝子を連結させた融合遺伝子を、マウスやラットの受精卵に打ち込み、すべての細胞にこの遺伝子が挿入された系統を作製した [8]。このシステムでは、原理的にはすべての細胞での *Per1* 遺伝子の発現量を、ルシフェラーゼによる発光量に置き換えて観察できる。実際、この *Per1::luc* 融合遺伝子を導入したマウスとラットから採取して培養した組織は、ルシフェラーゼが発現しているため、ルシフェリン (ルシフェラーゼの基質) 添加培地中で光ってみえた。特に、SCN を培養すると、発光は昼強く夜弱い約 24 時間周期のリズムを刻み、それは約 1 ヶ月以上にわたり継続した (図 5)。一方で、他の末梢培養組織 (肺、肝臓、筋肉) では、発光の概日リズムこそ観察できるものの、それらは数サイクルを経て減衰してしまっ (図 5)。SCN 細胞は概日時計中枢といわれるだけあって、個体から切り離れた培養系でも自律的な概日リズム発振能を保持していることがわかる。それに対して生体内の末梢組織細胞の概日リズムは、培養系では減衰してしまうようである。

それでは、例えば冒頭で述べた時差ぼけや昼夜交代勤務時に、SCN と末梢組織が示す両概日リズムの関係はどう変化するのであろうか。この答えを得るために、12時間交代の明暗サイクルで飼育した *Per1::luc* 動物の光サイクルを急激に6時間ずつ前進または後退させた。この操作は、われわれが6時間の時差のある地域へ移動させられたことと同等であると考えられる。この結果、SCN の *Per1* 発現リズムは、光サイクルをシフトした1日後には早くも新たな光サイクルに同調することがわかった。一方で、肝臓や筋肉等の末梢組織にみられる *Per1* 発現リズムの再同調には、数日間を要することが明らかになった。これらの結果は、急激な光サイクルのシフト後には、概日時計中枢 (SCN) と末梢時計が、ある一定の期間、脱同調していることを示している。光サイクルシフトに対する個体行動リズムの再同調にも、末梢組織 *Per1* リズムの再同調と同様に、数日間の移行期を必要とすることが知られている。よって、個体行動リズムの顕在化には、SCN リズムのみならず、末梢時計リズムのカップリングも重要であると思われる。つまり、時差ぼけとは、中枢時計と末梢時計が脱同調したために生ずる不調和症状と考えられるのではなかろうか。

それでは、光サイクルのシフト以外でも、概日時計中枢と末梢との脱同調状態を人為的に作りだせるのであろうか。この疑問に答えるために、われわれは以下の実験を行なった。まず、先と同じ明暗サイクルでラットを飼育して、かつ給餌を明期にだけ与える制限給餌の実験を行った。この場合、夜行性動物のラットも、餌をとるために非活動期である明期にいやいや(?) 覚醒する。そして、制限給餌時のラットの SCN 及び肝臓等の末梢系の概日リズムを調べてみると、SCN は周囲の明暗サイクルに同調しているにもかかわらず、肝臓などの末梢組織は給餌サイクルに同調していた。即ち、肝臓などの末梢組織は SCN 由来のシグナルを受けているはずにもかかわらず、光とは関係ない給餌サイクルに同調していたわけである。これらの実験から、以下の二つの結論が導きだされる。(1) 光サイクルが SCN リズムの主要な同調因子である。(2) 末梢組織の概日リズムは、SCN によってのみその発振を支配されているわけではなく、おそらく組織や細胞特異的な同調因子にも依存している。今後は、光による SCN 時計の同調機構、SCN 出力やその他の同調因子による末梢時計制御の実態解明などが、時差ぼけなどの概日リズム障害の対症薬の開発のためにも必須であろう。また、これらを明らかにする上で、ルシフェラーゼレポーター遺伝子導入動物を用いた時計遺伝子リズムの解析法は大変有力な実験系であると確信している。

6. おわりに

以上のように、今日のサーカディアンリズムの研究は、動物行動、神経活動から分子に至るまで網羅的に行なわれるようになってきている。多くの研究は国内の研究者がイニシアティブをとってきたものが多く、研究手法のオリジナリティーも高い。ぜひ相互に情報交換を進め、さらなる研究の発展に結び付けたいものである。本稿の一つの論点は、新たな自動計測技術の開発・応用がサーカディアンリズム研究に如何に多くのブレークスルーをもたらしてきたかということである。よって、バイオイメージング技術など、飛躍的な

進化を見せる光学計測分野との融合は、これからのリズム研究にさらなる発展をもたらすことは間違いなからう。ルシフェラーゼレポーターを用いた時計遺伝子発現リズムの解析は、興奮性を持たない末梢細胞のリズム解析まで可能としており、そうした意味ではサーカディアンリズム研究はすでに「神経」生理学の守備範囲を超えているといえる。しかし一方で、SCN ニューロンが如何に時計中枢としての「固有の」機能を形成しているのか？といった根本的な問題は未解決であり、神経生理学者の活躍の場も広く残されているものと思われる。よって、様々なバックグラウンドをもった若手生理学研究者の新規参入を期待したいところである。

参考文献

1. 千葉喜彦: 概日リズムの性質と機構. 「時間生物学」佐々木隆, 千葉喜彦 編: 朝倉書店 pp 11-40, 1978
2. 本間さと: 多電極ディッシュ法. 「脳科学実験マニュアル」本間研一, 福島菊郎 編: 北海道大学プレス pp 75-83, 1999
3. Ikeda M, Sugiyama T, Wallace CS, Gompf HS, Yoshioka T, Miyawaki A & Allen CN: Circadian dynamics of cytosolic and nuclear Ca^{2+} in single suprachiasmatic nucleus neurons. *Neuron* **38**: 253-263, 2003
4. Ikeda M & Inoué S: Simultaneous recording of circadian rhythms of brain and intraperitoneal temperatures and locomotor and drinking activities in the rat. *Biol Rhythm Res* **29**: 142-150, 1998
5. Akiyama M, Kouzu Y, Takahashi S, Wakamatsu H, Moriya T, Maetani M, Watanabe S, Tei H, Sakaki Y & Shibata S: Inhibition of light- or glutamate-induced mPer1 expression represses the phase shifts into the mouse circadian locomotor and suprachiasmatic firing rhythms. *J Neurosci* **19**: 1115-1121, 1999
6. Moriya T, Horikawa K, Akiyama M & Shibata S: Correlative association between N-methyl-D-aspartate receptor-mediated expression of period genes in the suprachiasmatic nucleus and phase shifts in behavior with photic entrainment of clock in hamsters. *Mol Pharmacol* **58**: 1554-1562, 2000
7. Tei H, Okamura H, Shigeyoshi Y, Fukuhara C, Ozawa R, Hirose M & Sakaki Y: Circadian oscillation of a mammalian homologue of the *Drosophila* period gene. *Nature* **389**: 512-516, 1997
8. Yamazaki S, Numano R, Abe M, Hida A, Takahashi R, Ueda M, Block GD, Sakaki Y, Menaker M & Tei H: Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science* **288**: 682-685, 2000

図説

図1 . A . 哺乳動物の自発行動に見られるサーカディアンリズムを記録・解析するためのシステム例。 B . 記録システムでのデータ処理の流れ。計測用コンピューターには、毎日、日付のファイルネーム入りの全チャンネルデータを蓄積しておき、エンドユーザーはそこから任意のチャンネル（黒く塗りつぶして表示）と解析期間（この場合 2005 年 4 月 1 日から 4 月 12 日まで）を選択し、解析用データファイルを作成する。

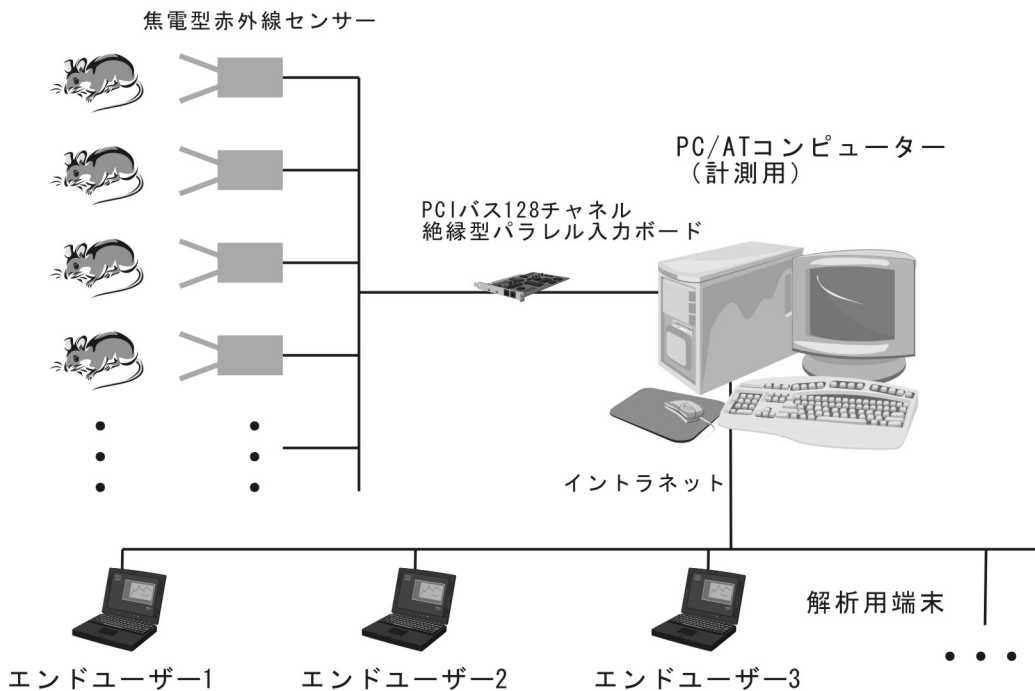
図2 . シェアウェア PACR を用いたラット自発行動リズム解析の様子。 A . 6 匹の動物の 30 分おきの活動量をプロットしたもの。 B . 一匹の動物の 62 日間の行動をデジタル化しダブルプロット法にて表示したもの。実験者はウインドウズ上で A B をスイッチしながら、行動の様子を観察できる。また、視察（アイフィッティング）やカイ自乗ピリオドグラム等で周期性を解析することが可能である。

図3 . 視交叉上核(SCN)スライス培養における自発発火頻度と細胞内 Ca^{2+} 濃度の同時測定。 A . スライス是一次メンブレンフィルター上で 1 週間程度培養し、それから Ca^{2+} センサー（Yellow Cameleon 2.1）遺伝子を遺伝子銃により導入する。センサータンパク質の蛍光を確認してから、裏表になるようにして、多電極アレイ培養皿にのせ再培養することができる。 B . 多電極アレイ上で再培養された SCN スライスの透過光像と蛍光像。 C . 同一スライスから計測した自発発火頻度と細胞内 Ca^{2+} 濃度のサーカディアンリズム。* は培養液交換のタイミングを表す。培養液の交換により活動電位発火頻度は一時的に不安定になっているのがわかる。文献 3 より引用。

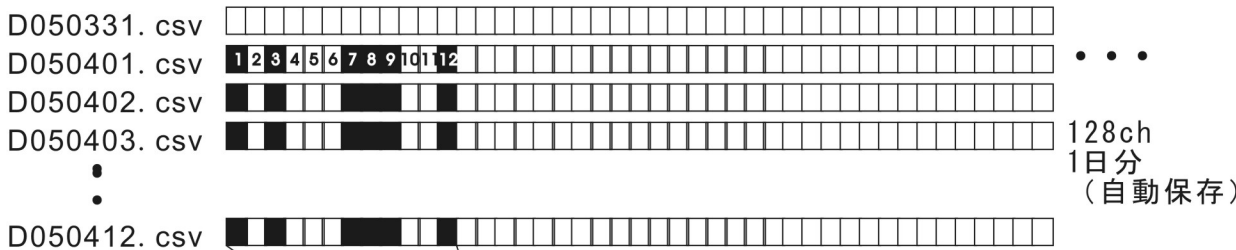
図4 . 放射性同位体 (^{33}P) 標識 RNA プローブを用いた in situ hybridization 法によるマウス SCN の Per 遺伝子 (Per1, Per2, Per3) 発現解析。いずれの Per 遺伝子も明期に高く、暗期にはほとんど認められない。

図5 . Per1::luc ラットの培養 SCN 及び末梢組織での Per1 遺伝子発現日周振動。導入した Per1::luc 遺伝子の構造を上を示す。実線は Per1 のプロモータ領域。luc はルシフェラーゼ遺伝子。

A



B



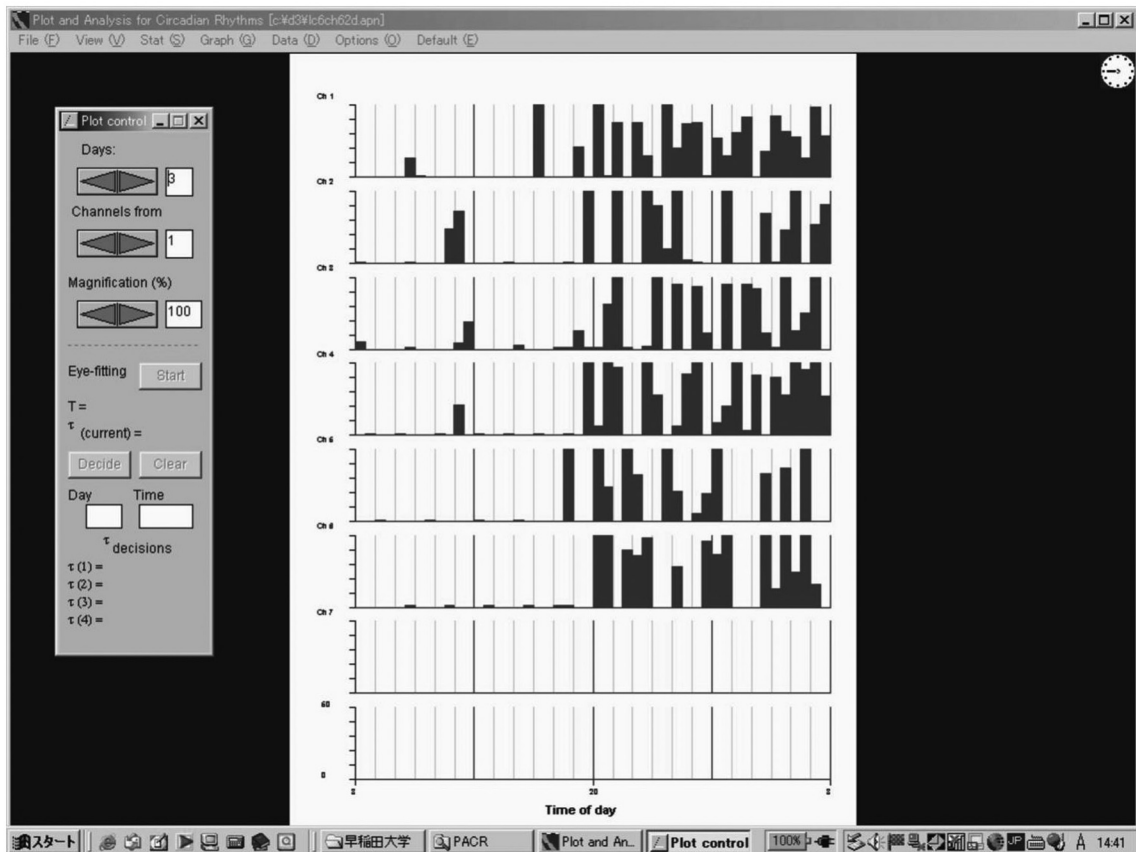
データの分配
(エンドユーザーファイルの作成)

USER-1. APN

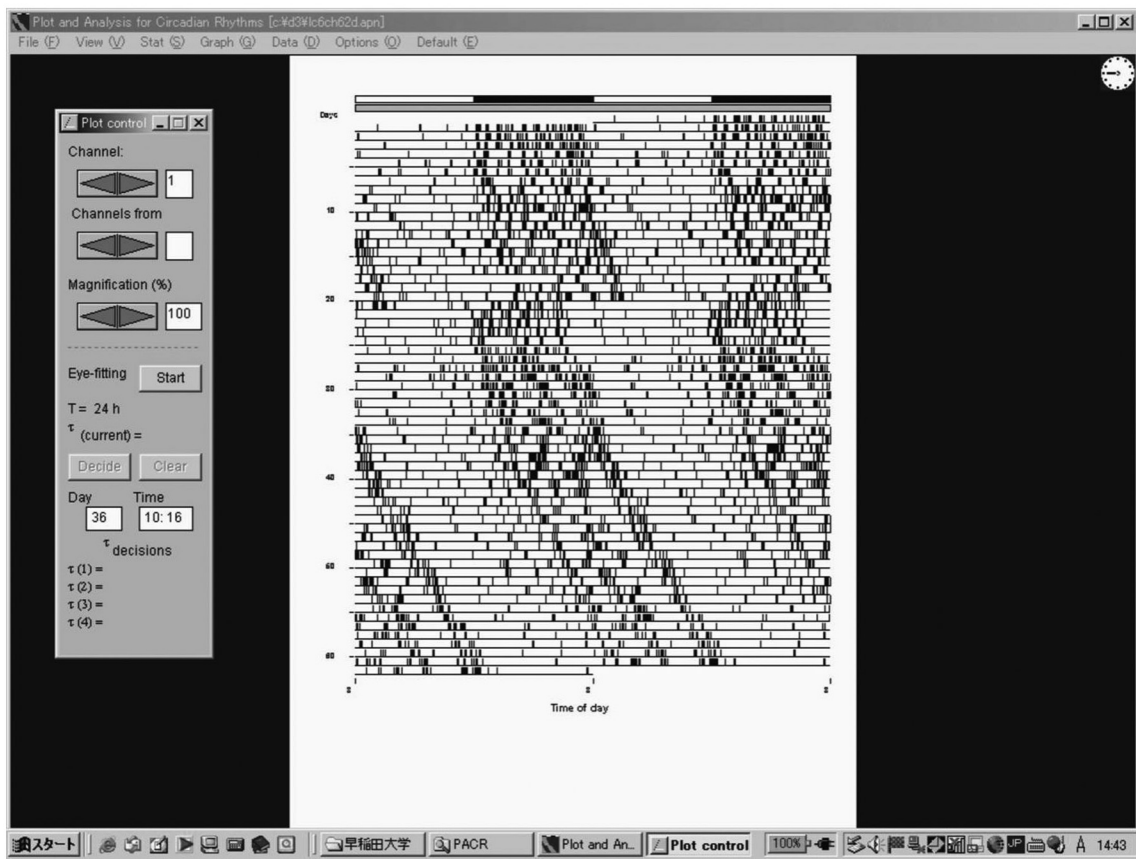
Day1	1	3	7	8	9	12
Day2						
Day3						
Day4						
Day5						
Day6						
Day7						
Day8						
Day9						
Day10						
Day11						
Day12						

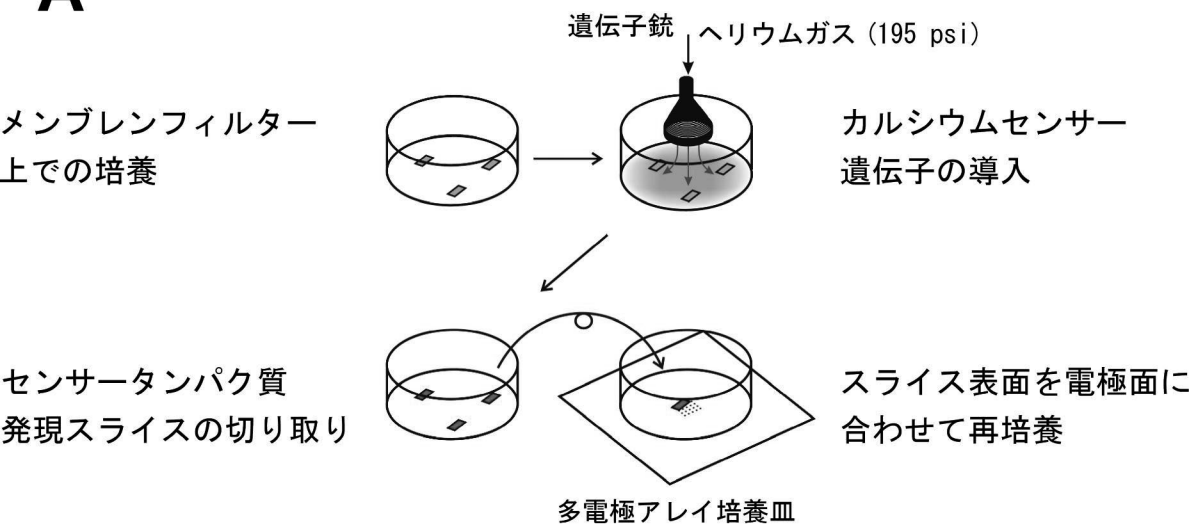
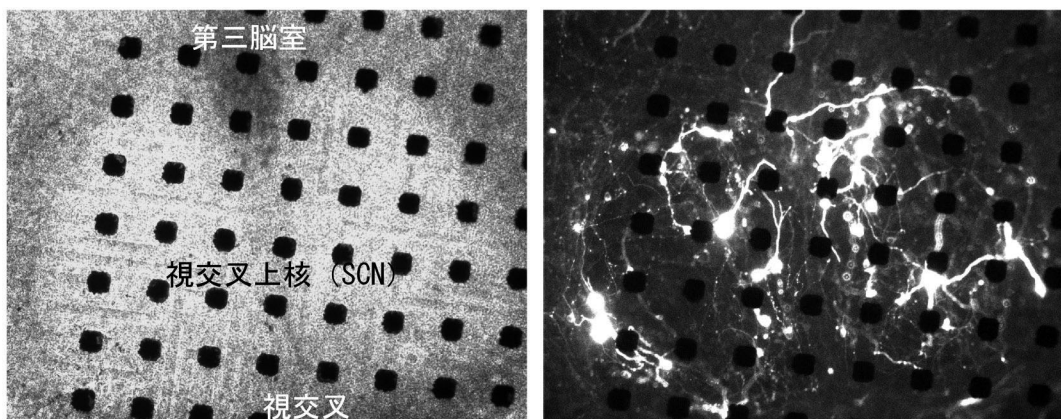
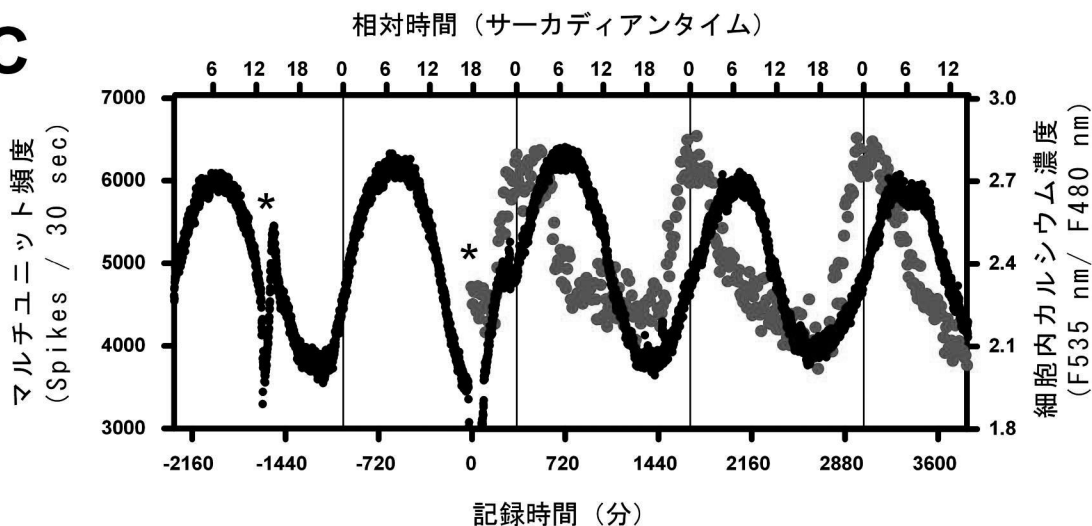
ダブルプロット解析

A



B



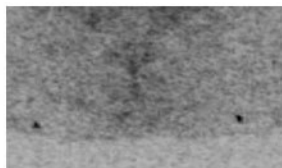
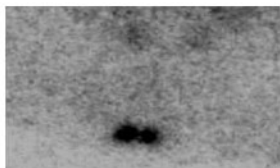
A**B****C**

ZT6

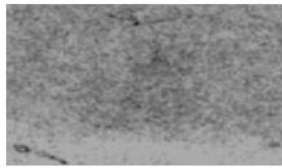
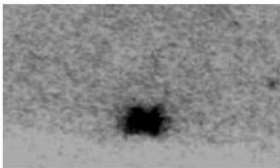
ZT18



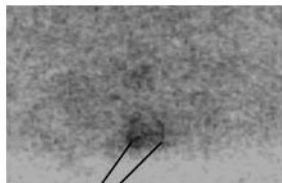
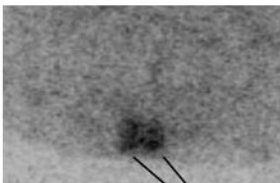
Per1



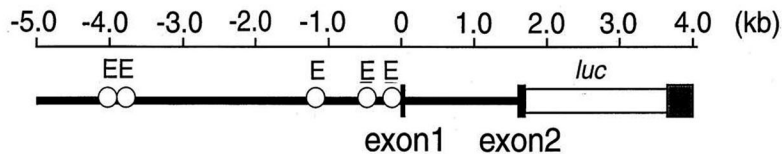
Per2



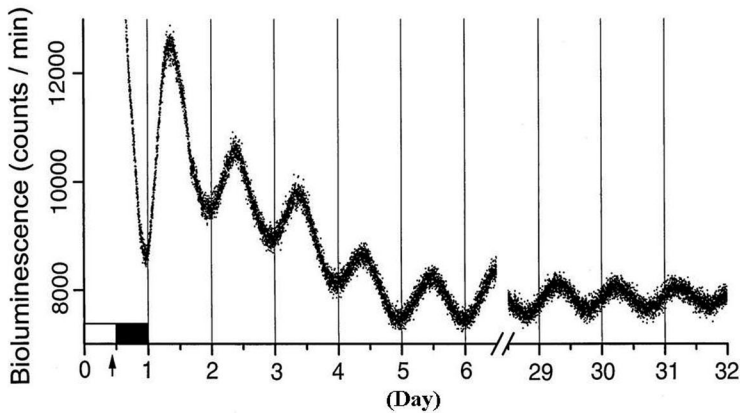
Per3



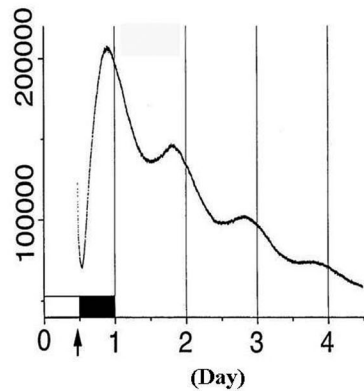
視交叉上核 (SCN)



Per1::luc レポーター遺伝子



SCN(時計中枢)



肝臓(末梢組織)