

間中の脳波記録から1日の眠気の変動をとらえるものである。超短時間睡眠・覚醒スケジュール法を24時間以上にわたって行うことで、夜間睡眠と日中の眠気を一元的にとらえることができる。

今回、8名の健常人を対象として、20分の睡眠許可時間と40分の強制覚醒時間よりなる60分を1サイクルとした超短時間睡眠・覚醒スケジュールを78時間にわたり行った。同時に、1時間おきに唾液中メラトニンおよびコルチゾール測定、連続的に深部体温測定を行った。眠気のリズムの指標としては、20分の睡眠許可時間におけるノンレム睡眠の段階2~4、およびのレム睡眠の合計時間を用いた。これらの結果をもとに眠気のcircasemidian rhythm および circadian rhythm について検討した。

## B. 研究方法

研究参加者は、研究に参加するにあたり、十分な説明を行い、書面による同意を得た。各実験セッション1週間前から規則正しい生活をし、飲酒をしないこと、睡眠に影響するような薬物（風邪薬など）を服用しないことを指示した。

実験セッションに先立ち、被験者に1週間の睡眠日誌を記録させると同時に、アクチウォッチ（Mini Mitter社）を用いて連続活動量記録を行った。アクチウォッチは1分間あたりの非利き手の活動量を連続的に記録するようセットした。実験セッション1日目は11時に集合し、昼食をとらせ、簡単な健康に関するアンケートを記入させた。実験1日目の16時に実験を開始するまで実験室の照度は200luxに保った。13時より電極の装着を行った。脳波は3チャンネル（C3-A2, C4-A1, O1-A1）で行ない、その他に眼球運動を右側耳朶（A2）を基準として左右と

もに外眼角約1cmの位置から導出した。筋電図は下おとがい筋より双極導出した。さらに心電図記録も行った。

実験セッション1日目16時より実験セッション4日目の22時まで、78時間の間、20分-40分の超短時間睡眠覚醒スケジュール法による脳波測定を行った。20-40分法では60分を1サイクルとし、うち40分間は実験室において座位安静を保たせ、20分間はシールドルーム内で安静臥床させ脳波記録を行った（Nap試行）。40分間の安静・覚醒時には、実験実施者による監視のもと、ビデオ鑑賞、読書、音楽鑑賞、手作業などは許可した。実験室内は温度24℃、湿度60%、照度10lux以下と一定、脳波検査中のシールドルーム内は照度1lux以下に保った。実験中は2時間ごとに150kcalの栄養食品と200ccのカフェインを含まないノンカロリーの飲み物を与えた。1時間おきに、ホルモン測定のため、専用のスピッツ（BUEHLMANN社）を用いて、唾液を採取した。唾液サンプルは、直ちに-40℃で凍結保存し、RIA法により、唾液中のメラトニンとコルチゾールを測定した。

実験セッション前1週間の睡眠日誌とアクチウォッチの記録より毎日の入眠時刻と起床時刻を求め、その中間値を各被験者の日常生活における習慣的入眠・起床時刻とした。Nap試行の脳波記録は、睡眠段階の国際分類に従って、30秒ごとに段階判定し、睡眠段階2, 3, 4, REM (rapid eye movement) の合計をもって1試行の睡眠傾向 (sleep propensity: sp) とした。

## C. 研究結果

昼夜の活動や環境照度を統制した恒常条件下においても、眠気のリズムは3周期にわたり規則正しい概日リズムを示し

た。深部体温最低値出現時刻を 6 時として標準化すると、夜間のノンレム睡眠のピーク時刻は 3 時となり、レム睡眠のピークは 8 時～9 時の間にあった。最も眠気のない時刻（睡眠禁止時間帯）は 21 時であった。日中の眠気は、14 時～15 時にピークを示した。実験前 1 週間の習慣的起床時刻は 8 時であり、習慣的就床時刻は 0 時～1 時であった。これらの時刻の関係から、夜間ノンレム睡眠のピークと日中の眠気がほぼ 12 時間の位相関係を示すこと、睡眠禁止時間帯と起床時刻がほぼ 12 時間の位相関係を示すことがわかった。これらから、眠気の日内変動を考える上で circadian rhythm だけでなく、circasemidian rhythm の視点から現象をとらえる必要があると考えられた。

#### D. 考察

ヒトの深部体温リズムの内因性成分を明らかにする方法として、コンスタントルーチン法がある。これは、恒常暗条件において、およそ 30 時間にわたって覚醒状態を保ち、半臥床状態で深部体温を測定する方法である。この方法を用いることで、血中メラトニン濃度の連続的測定と同様な正確さで生物時計の発振する内因性リズムの位相を観察することができる。この方法を用いたビタミン B12 の概日リズムに与える影響の実験について紹介する。

生物時計が発振する内因性リズムがヒトの睡眠・覚醒に与える影響について調べるには、生物時計の発振するリズムを正確に測定すると同時に眠気の日内変動を神経生理的手法で測定する必要がある。超短時間睡眠・覚醒スケジュール法は、

脳波を用いて客観的に眠気の日内変動を測定する方法として重要である。超短時間睡眠・覚醒スケジュール法では、恒常暗条件において、30 分あるいは 60 分を 1 サイクルとした睡眠・覚醒スケジュールを 30 時間以上にわたり繰り返す。30 分を 1 サイクルとする場合には、20 分間の覚醒の後 10 分間の安静臥床を繰り返す。安静臥床中に脳波を測定し、10 分間の記録中に何分間睡眠脳波が含まれていたかで、1 サイクルにおける眠気を数量化する。この方法を用いることで、朝型・夜型の個体における睡眠発現タイミングの違いを明らかにすることができる。高照度光が睡眠のタイミングを変える機構についても明らかにできた。健康人において、レム睡眠だけでなく、深いノンレム睡眠が概日リズムに強く支配されていることが明らかにできた。

超短時間睡眠・覚醒スケジュール法を概日リズム睡眠障害患者（睡眠相後退症候群）に対して行うことにより、こうした患者において深部体温リズムやメラトニンリズムなどの内因性リズムに対して睡眠の発現が遅れていることを客観的に明らかにできた。さらに、これらの患者においては、断眠後の日中の回復睡眠が出現しにくいことが明らかにできた。

#### E. 結論

ヒトの睡眠・覚醒リズムおよびその病態を明らかにするためには時間生物学的生物リズムの測定方法と臨床神経生理学的な睡眠測定を組み合わせる検討することが不可欠であると考えられる。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kaneita Y, Ohida T, Uchiyama M, Takemura S, Kawahara K, Yokoyama E, Miyake T, Harano S, Suzuki K, Yagi Y, Kaneko A, Tsutsui T, Akashiba T: Excessive daytime sleepiness among Japanese General population. *Journal of Epidemiology* 15: 1-8, 2005.
- 2) Suzuki H, Uchiyama M, Tagaya H, Ozaki A, Kuriyama K, Aritake S, Shibui K, Tan X, Kamei Y, Kuga R. Dreaming During Non-rapid Eye Movement Sleep in the Absence of Prior Rapid Eye Movement Sleep. *SLEEP* 27: 1486-1490, 2004.
- 3) Hiroki M, Uema T, Kajimura N, Ogawa K, Nishikawa M, Kato M, Watanabe T, Nakajima T, Takano H, Imabayashi E, Ohnishi T, Takayama Y, Matsuda H, Uchiyama M, Okawa M, Takahashi K, Fukuyama H. Cerebral White Matter Blood Flow Is Constant During Human Non-Rapid Eye Movement Sleep: A Positron Emission Tomographic Study. *J Appl Physiol.* 2004 Dec 23;
- 4) Suzuki K, Ohida T, Kaneita Y, Yokoyama E, Miyake T, Harano S, Yagi Y, Ibuka E, Kaneko A, Tsutsui T, Uchiyama M: Mental health status, shift work, and occupational accidents among hospital nurses in Japan. *J Occup Health* 46: 448-454, 2004.
- 5) Masudomi I, Isse K, Uchiyama M, Watanabe H. Self-help groups reduce mortality risk: a 5-year follow-up study of alcoholics in the Tokyo metropolitan area. *Psychiatry Clin Neurosci* 58: 551-7, 2004.
- 6) Aritake S, Uchiyama M, Tagaya H, Suzuki H, Kuriyama K, Ozaki A, Tan X, Shibui K, Kamei Y, Okubo Y, Takahashi K: Time estimation during nocturnal sleep in human subjects. *Neurosci Res* 49: 387-93, 2004.
- 7) Takano A, Uchiyama M, Kajimura N, Mishima K, Inoue Y, Kamei Y, Kitajima T, Shibui K, Katoh M, Watanabe T, Hashimotodani Y, Nakajima T, Ozeki Y, Hori T, Yamada N, Toyoshima R, Ozaki N, Okawa M, Nagai K, Takahashi K, Isojima Y, Yamauchi T, Ebisawa T. A Missense Variation in Human Casein Kinase I Epsilon Gene that Induces Functional Alteration and Shows an Inverse Association with Circadian Rhythm Sleep Disorders. *Neuropsychopharmacology.* 29: 1901-09, 2004.
- 8) Tagaya H, Uchiyama M, Ohida T, Kamei Y, Shibui K, Ozaki A, Tan X, Suzuki H, Aritake S, Li L, Takahashi K: Sleep habits and factors associated with short sleep duration among Japanese high-school students: A community study. *Sleep and Biological Rhythms* 2: 57-64, 2004.
- 9) Kajimura N, Nishikawa M, Uchiyama M, Kato M, Watanabe T, Nakajima T, Hori T, Nakabayashi T, Sekimoto M, Ogawa K, Takano H, Imabayashi E, Hiroki M, Onishi T, Uema T, Takayama Y, Matsuda H, Okawa M, Takahashi K. Deactivation by benzodiazepine of the basal forebrain and amygdala in normal humans during sleep: a placebo-controlled [<sup>15</sup>O]H<sub>2</sub>O PET study. *Am J Psychiatry.* 161: 748-51, 2004.
- 10) Uchiyama M, Kamei Y, Tagaya H, Takahashi K: Poor compensatory function for sleep loss in delayed sleep phase syndrome and non-24-hour sleep-wake syndrome. *SLEEP AND BIOLOGICAL RHYTHMS* vol. 2 supplement 1: s 5-s 6, 2004.
- 11) 内山真: 不眠に対する非薬物療法. *こころの科学* 116: 57-63, 2004.

- 12) 内山真, 田ヶ谷浩邦, 尾崎章子, 亀井雄一, 渋井佳代, 譚新, 栗山健一, 鈴木博之, 有竹清夏: 概日リズム睡眠障害について. 精神保健研究 49: 121-126, 2004.
- 13) 田ヶ谷浩邦, 内山真: 時間生物学からみたうつ病. CLINICAL NEUROSCIENCE 22: 158-160, 2004.
- 14) 田ヶ谷浩邦, 内山真: 不眠症薬物療法の新しい展開. 臨床精神薬理 7: 173-181, 2004.
- 15) 田ヶ谷浩邦, 内山真: 薬によらない不眠治療. Clinical Neuroscience 22: 80-82, 2004
- 16) 内山真: 概日リズムの睡眠障害のうつ病について. 臨床精神薬理 7: 1037-1047, 2004.
- 17) 内山真: 不眠症につきあうために. Prog. Med 24: 1828-1837, 2004.
- 18) 内山真: 知っておきたい睡眠の知識. 調剤と情報 11月号: 1626-1631, じほう, 2004.
- 19) 阿部又一郎, 栗山健一, 内山真: 不眠と睡眠の科学①睡眠を科学する 睡眠と記憶・学習. こころの科学: 48-52, 2004.
- 20) 内山真, 土井永史: (監修) 睡眠障害ハンドブック. 診療新社, 2004.
- 21) 内山真: 成人の睡眠覚醒リズム障害に対するメラトニンの効果. メラトニン研究会 編: メラトニン研究の最近の進歩. 星和書店, 東京, pp177-190, 2004.
- 22) 内山真, 田ヶ谷浩邦, 亀井雄一: 睡眠薬. 山田信博編: 治療薬イラストレイテッド. pp179-182, (株)羊土社発行, 東京, 2004.
- 23) 内山真: 精神保健福祉用語辞典. 社団法人日本精神保健福祉士協会、日本精神保健福祉学会: 監修, 中央法規出版(株)発行, 東京, 2004.
- 24) 亀井雄一, 内山真: 睡眠障害(不眠). 日本医師会雑誌特別号 vol.131, 上島国利, 牛島定信, 武田雅俊, 丹羽真一, 宮岡等 監・編: 精神障害の臨床, pp154-157, 2004.
- 25) 亀井雄一, 内山真: 高照度光療法. 久保木富房, 中村純, 山脇成人 編: NAVIGATOR, pp222-223, メディカルレビュー社発行, 東京, 2004.
- 26) 内山真: 不眠症. Medical Practice 編集委員会 編: 内科外来診療実践ガイド pp306-308, 文光堂, 東京, 2004.
- 27) 内山真: 睡眠時無呼吸症候群. Medical Practice 編集委員会 編: 内科外来診療実践ガイド pp309-310, 文光堂, 東京, 2004.
- 28) 尾崎章子, 内山真: すこやかな眠りを導くための看護実践ハンドブック. (株)社会保険研究所, 東京都, 2004.
- 29) 内山真: 睡眠障害. 高久史麿, 北村惣一郎, 猿田享男, 福井次矢 監修 家庭医学大全科 p835-837, (株)法研, 東京, 2004.
- 30) 内山真: ナルコレプシー. 高久史麿, 北村惣一郎, 猿田享男, 福井次矢 監修 家庭医学大全科 p837-838, (株)法研, 東京, 2004.
- 31) 内山真: 睡眠時無呼吸症候群. 高久史麿, 北村惣一郎, 猿田享男, 福井次矢 監修 家庭医学大全科 p838-839, (株)法研, 東京, 2004.
- 32) 内山真: 睡眠相後退症候群. 高久史麿, 北村惣一郎, 猿田享男, 福井次矢 監修 家庭医学大全科 p839, (株)法研, 東京, 2004.
- 33) 内山真: 神経内科のトピック 6. 睡眠障害の最新治療. 金澤一郎, 柴崎浩, 東儀英夫, 小林祥泰, 祖父江元, 佐

古田三郎、西澤正豊、水澤英洋、梶籠兒  
編：神経内科の最新医療。Pp33-38, 先端医療技術研究所, 東京, 2004.

## 2. 学会発表

1) Uchiyama M: Are there cultural differences in the alertness concept? 2nd International Sleep Disorders Forum. Paris, France, 2004. 9. 10-12.

2) Uchiyama M: Abnormal circadian organization in delayed sleep phase syndrome and non-24-hour sleep-wake syndrome. Presidential symposium: Circadian rhythm sleep disorders. 17th CONGRESS OF THE EUROPEAN SLEEP RESEARCH SOCIETY, 2004. 10. 6-10, Prague, Czech Republic.

3) Tagaya H, Uchiyama M, Ohida T, Kamei Y, Shibui K, Ozaki A, Tan X, Suzuki H, Aritake S, Li L, Takahashi K: Sleep habits and factors associated with short sleep duration among Japanese high-school students: A community study (proceeding). 17th Congress of The EUROPEAN SLEEP RESEARCH SOCIETY, Prague, Czech, 2004 Oct 5-9.

4) Tagaya H, Uchiyama M, Kamei Y, Shibui K, Ozaki A, Tan X, Suzuki H, Aritake S, Li L: Subjective sleep duration under high and low sleep pressure conditions (proceeding). 17th Congress of The EUROPEAN SLEEP RESEARCH SOCIETY, Prague, Czech, 2004 Oct 5-9.

5) 亀井雄一, 早川達郎, 渋井佳代, 田ヶ谷浩邦, 内山真. 2004. 非 24 時間睡眠覚醒症候群に対するメラトニン治療の有効性. 日本睡眠学会第 29 回学術集会, 東京, 2004. 7. 1-2.

6) 栗山健一, 内山真, 鈴木博之, 田ヶ谷浩邦, 尾崎章子, 有竹清夏, 渋井佳代, 亀井雄一. 2004. 時間知覚の概日変動. 日本睡眠

学会第 29 回学術集会, 東京, 2004. 7. 1-2.

7) 田ヶ谷浩邦, 内山真, 亀井雄一, 渋井佳代, 尾崎章子, 譚新, 鈴木博之, 有竹清夏, 李嵐. 2004. 異なる睡眠圧による主観的睡眠時間への影響. 日本睡眠学会第 29 回学術集会, 東京, 2004. 7. 1-2.

8) 田ヶ谷浩邦, 内山真, 大井田隆, 亀井雄一, 渋井佳代, 尾崎章子, 譚新, 鈴木博之, 有竹清夏, 李嵐, 高橋清久. 2004. 高校生の短い睡眠時間に関与する要因—千葉市、四街道市におけるコミュニティー研究—. 日本睡眠学会第 29 回学術集会, 東京, 2004. 7. 1-2.

9) 藤井猛, 亀井雄一, 宇佐見政英, 齋藤万比古, 田ヶ谷浩邦, 内山真. 2004. 家庭内暴力、集団不適應をおこした学童期発症のナルコレプシーの一例. 日本睡眠学会第 29 回学術集会, 東京, 2004. 7. 1-2.

10) 尾崎章子, 渋井佳代, 李嵐, 譚新, 鈴木博之, 栗山健一, 有竹清夏, 田ヶ谷浩邦, 内山真. 2004. 100 歳以上の高齢者における睡眠と心身の健康、生活習慣、生活環境. 日本睡眠学会第 29 回学術集会, 東京, 2004. 7. 1-2.

11) 有竹清夏, 鈴木博之, 栗山健一, 尾崎章子, 譚新, 李嵐, 渋井佳代, 亀井雄一, 田ヶ谷浩邦, 松浦雅人, 内山真. 2004. 昼間睡眠中の時間認知. 日本睡眠学会第 29 回学術集会, 東京, 2004. 7. 1-2.

12) 李嵐, 尾崎章子, 渋井佳代, 関口夏奈子, 譚新, 栗山健一, 鈴木博之, 有竹清夏, 田ヶ谷浩邦, 内山真. 2004. 睡眠不足、日中の眠気と心身不調との関連—全国一般成人における疫学的検討—. 日本睡眠学会第 29 回学術集会, 東京, 2004. 7. 1-2.

13) 鈴木博之, 有竹清夏, 栗山健一, 渋井佳代, 李嵐, 譚新, 尾崎章子, 田ヶ谷浩邦, 内山真. 2004. 睡眠後の手続き記憶向上と睡眠脳波の関係. 日本睡眠学会第 29 回学術集会, 東京, 2004. 7. 1-2.

14) 譚新, 鈴木博之, 有竹清夏, 尾崎章子,

李嵐, 渋井佳代, 栗山健一, 松浦雅人, 田ヶ谷浩邦, 内山真. 2004. 暗条件下のメラトニン分泌リズムと睡眠習慣の関係. 日本睡眠学会第 29 回学術集会, 東京, 2004. 7. 1-2.

15) 内山真: (ワークショップ) 超短時間睡眠・覚醒スケジュールによる眠気の日内変動測定. 第 11 回日本時間生物学会, 滋賀県大津市, 2004. 11. 11-12.

16) 高野敦子, 内山真, 梶村尚史, 三島和夫, 井上雄一, 豊嶋良一, 尾崎紀夫, 大川匡子, 高橋清久, 磯島康史, 海老澤尚: ヒト Case in Kinase epsilon 遺伝子の機能的多型と概日リズム睡眠障害との相関. 第 11 回日本時間生物学会, 滋賀県大津市, 2004. 11. 11-12.

17) 譚新, 渋井佳代, 尾崎章子, 鈴木博之, 李嵐, 有竹清夏, 栗山健一, 亀井雄一, 田ヶ谷浩邦, 内山真: 概日リズムと睡眠との位相関係. 第 11 回日本時間生物学会, 滋賀県大津市,

2004. 11. 11-12.

18) 栗山健一, 内山真, 鈴木博之, 田ヶ谷浩邦, 尾崎章子, 有竹清夏, 渋井佳代, 亀井雄一: 時間知覚の概日変動. 第 11 回日本時間生物学会, 滋賀県大津市, 2004. 11. 11-12.

19) 鈴木博之, 有竹清夏, 栗山健一, 渋井佳代, 李嵐, 譚新, 尾崎章子, 田ヶ谷浩邦, 内山真: 睡眠前半後半の定量的脳波活動と手続き記憶の向上. 第 11 回日本時間生物学会, 滋賀県大津市, 2004. 11. 11-12.

20) 有竹清夏, 鈴木博之, 栗山健一, 尾崎章子, 譚新, 李嵐, 渋井佳代, 亀井雄一, 田ヶ谷浩邦, 内山真: 昼夜逆転させた昼間睡眠中における時間認知. 第 11 回日本時間生物学会, 滋賀県大津市, 2004. 11. 11-12.

厚生労働科学研究費補助金(こころの健康科学研究事業)

分担研究報告書

ヒト睡眠・覚醒リズム障害の分子生物学的成因解明とテーラーメイド  
治療法開発に関する基盤的研究

研究分担者 岡村 均

神戸大学大学院医学系研究科 教授

[研究要旨]

体内時計は細胞内の時計遺伝子の転写振動によって生起されるリズムがその本体である。今回、この転写振動を司るのに、どのような蛋白質機構が関与するのかを新しい細胞系を樹立して検索した。その細胞系とは、テトラサイクリン非存在下で Per2 時計遺伝子が発現する Per2-Tet-off 細胞系である。この発現系で Per2 を非常に強く発現させると、リズムが傷害される。しかし、これは大過剰発現させたときにおこる現象で、少量ある一定量コンスタントに発現させてもリズムは傷害されない。プロテアソームを阻害する MG132 を加えると時計蛋白の減少は抑制されるので、ユビキチン・プロテアソーム系による時計蛋白分解機構が時計発振に必須であると想定される。次に、ユビキチン・プロテアソーム系に関与する酵素を視交叉上核に同定する試みをしたところ、脱ユビキチン化酵素である UCHL1 が大量に存在していた。この酵素を欠損するマウスでは、行動リズムの異常が認められた。従って、ユビキチン・プロテアソーム系は時計発振機構に深く関与しており、今後、特異的なユビキチンリガーゼの同定がリズム治療にも応用できる重要な鍵になると想定される。

では、脳の視交叉上核の振動はどのようにして、自律振動能の弱い末梢臓器の時計を動かしているのでしょうか？末梢時計は毎日視交叉上核にある中枢時計からの指令をもらってやっと動くような時計と考えられる。この経路として交感神経がひとつ考えられ、我々は、肝臓における時計遺伝子のリズムが交感神経により制御されることを、時計遺伝子の発現、神経切断実験等で証明した。さらに、メラトニンが視交叉上核を介し、全身の交感神経活動を制御することを証明した。また、我々はマウス髄液内マイクロダイアリシスプローブで数ヶ月もメラトニンとともにコルチコステロン分泌をモニターできる系を開発した。これら新しい末梢時計の測定系により、末梢時計の解明が進むことが期待される。

## A. 研究目的

生体リズム (circadian rhythm; サークアディアンリズム) 機構は、植物、菌類、シアノバクテリア、無脊椎動物、脊椎動物など、現存の大部分の生物に認められる。実際、睡眠覚醒、体温、ホルモンの分泌などの生理現象がリズムを示すことはよく知られている。近年の研究で、生体リズムが遺伝子の転写レベルで制御されていることが明らかになった。哺乳類でみると、発振の中心となる振動子は Per1 と Per2 の二つの遺伝子であり、この転写は CLOCK と BMAL1 のヘテロダイマーにより促進される。続いてできた mRNA から PER 1、PER 2 蛋白質が産生される。抑制系の PER1、PER2、CRY1、CRY2 の蛋白質が転写を制御する。

時計遺伝子の転写を制御するのが時計蛋白質であるが、その量はどのようにして調整されているのであろうか？蛋白質の量を分解のレベルで調整する大きなシステムにユビキチン・プロテアソーム系であることが知られている。ユビキチン (ubiquitin; Ub) は 76 残基のアミノ酸からなる分子量 8.6kDa の蛋白質で、酵母から哺乳類までのすべての真核生物に存在し、きわめて高度に保存されている。26S プロテアソームは ATP 依存性プロテアーゼ (分子量 250 万の巨大な多成分複合体) である。ユビキチンはまず E1 (ubiquitin activating enzyme; ユビキチン活性化酵素)、E2 (ubiquitin conjugation enzyme; ユビキチン結合酵素)、E3 (ubiquitin protein ligase; ユビキチンリガーゼ) から構成された複合酵素系であるユビキチンシステムによって標的蛋白質に共有結合し、分解シグナルを形成する。生じたポリ Ub 鎖が付加された標的蛋白質は 26S プロテアソームにより認識され、ATP 依存的に分解される。ユビキチン・プロテアソーム系とサーカディアン振動の関係に関しては、哺乳類では不明であるが、ショウジョウバエの時計蛋白 PER、TIM、アカパンカビ時計蛋白の FRQ で E3 が同定されている。今回、哺乳類の分子時計の分解機構を解明するため、視交叉上核と細胞系におけるユビキチン・プロテアソーム系を検索

する。

この蛋白レベルでできたリズムは、どのようにして、全身の時計で同調しているのであろうか？時計遺伝子は全身の大部分の細胞に発現し、その多くがリズムに発現しており、従来リズム発振機能が全く無いとされてきた肝臓や胃腸などの末梢臓器にも、食餌に同調する、基本的な時計発振機構が備わっていることが明らかとなっている。最近、リズム異常の線維芽細胞を正常の個体に移植してこの線維芽細胞の時計遺伝子発現を検索すると、正常のリズムを示すことがわかった。これは、末梢臓器の時計は自律振動機能が弱く数周期で止まり、毎日中枢時計からの指令をもらってやっと動くような時計と考えられる。今回、視交叉上核からリズムが伝達される機構を検索した。

## B. 研究方法

ユビキチン関連酵素の視交叉上核での同定は、マウス脳で *in situ* hybridization 法により行った。実験は全て、神戸大学の倫理委員会の承認の元に行った。テトラサイクリンによって Per2 発現が調節される線維芽細胞系の作成するためには、Tet-Off system を用いた。脳室内マイクロダイアリスプローブにより、メラトニン、コルチコステロンの同定を EIA、RIA にて行った。

## C. 研究成果

今回、時計蛋白の分解機構によるリズム生成機構を検証するため、我々は哺乳類の主要時計遺伝子である Per2 をテトラサイクリンによって発現調節できる Per2-Tet-off 線維芽細胞系を作成した。持続的に Per2 遺伝子を極めて強く発現させると、時計遺伝子の発現振動が強く障害された。これに対し、Per2 遺伝子を、一定レベルで中等度ないし弱いレベルで発現させても、時計遺伝子の周期的発現は障害されなかった。この時、注目されるのは、Per2 mRNA が一定レベルで変動しないのに、mPER2 蛋白は周期的なリズムを示していたことである。このことは生体時計のフィードバックループ振動発



生には、Per2 転写振動は必ずしも必要でないことを示唆している。しかし、Per2 遺伝子の転写振動を欠いた状態では、発現リズムが減衰したので、周期的な Per2 時計遺伝子転写変動がリズム維持には不可欠であると考えられた。また、プロテアソームを阻害する MG132 を加えると、時計蛋白の下降が抑制される。従って、ユビキチン・プロテアソーム系は時計発振機構に深く関与しており、今後、特異的なユビキチンリガーゼの同定がリズム治療にも応用できる重要な鍵になると想定される。

次に、リズム中枢のある視交叉上核におけるユビキチン・プロテアソーム関連酵素の発現を検索した。検索したのは視交叉上核でリズムがあるといわれている、E2 (Ubc5, UbcM4, Ube2v, Ube2d2)、脱ユビキチン化酵素 (de-ubiquitinating enzyme; DUB: UchL1, UchL3, Ubp41)、E3 ( $\beta$ -TrCP)、ユビキチン結合蛋白 (Ufd1L) である。このうち、UchL1 が最も発現が強く、次いで Ubc5 で、UbcM4、Ube2d、 $\beta$ -TrCP、Ufd1L は非常に発現が弱く、他は全く認められなかった。このうち、最も発現の強かった UchL1 について、さらなる解析を行った。

我々は今回、UCHL1 の欠損による末梢神経障害である GAD マウスでは行動の周期性が変動することを発見した。免疫組織染色で野生マウスより GAD マウスの場合にはユビキチン量が著しく減っている事も明らかになった。UCHL1 の欠損による時計蛋白質のユビキチン・プロテアソーム系による分解の障害が原因であろうと推測している。

また、ユビキチン・プロテアソーム系と同期して、分子シャペロンとして働く valocin containint peptide (VCP) に着目した。これは、脳内で最も高い濃度がリズムセンターの視交叉上核で認められるからである。この日内変動を検索したが、概日リズムは認められなかった。視交叉上核において高い発現を示す VCP のターゲットはわかっていないが、PER、CRY などの時計蛋白質がターゲットであり、恒常的に発現することでシャペロンの役割を果たすと考えられる。

視交叉上核で、以上のような蛋白機構で発振されたリズムは、どうして末梢臓器に伝達されるのであろうか？我々は、この不完全な肝臓の時計遺伝子のリズムが交感神経により制御されることを、時計遺伝子の発現、神経切断実験等で証明した。さらに、メラトニンが視交叉上核を介し全身の交感神経活動を制御することを電気生理学的に検証した。また、我々はマウス髄液内マイクロダイアリシスプローブで数ヶ月もメラトニン分泌をモニターできる系を開発し、これにより、松果体よりのメラトニン分泌は、アミン神経性制御性と非神経制御性の 2 峰性の分泌があることを報告した。さらに、この脳内プローブ法にて、脳室内コルチコステロンの 24 時間リズムを観察し、さらに光による誘導を検出した。これらの方法により、従来は行動リズムしかなかったリズムモニターを、初めて直接ホルモンで見ることが可能となった。

#### D. 考察

今回、細胞系を用いて、時計遺伝子発振とユビキチン・プロテアソーム系の関連を追及した。そのために樹立したのは、NIH3T3 細胞で Per2 の発現がドキシサイクリンによって調節される Tet-Off 細胞系である。これにより強発現した PER2 は、機能的には CLOCK/BMAL を介した E-box の活性化を抑制し、生体内での代謝と同じく、リン酸化をうけ分解されるという経路をたどった。驚くべきことに、*mPer2* 弱～中程度に一定量発現する条件では、*mPER2* 蛋白は周期的なリズムが保たれていた。このことは *mPer2* は遺伝子発現に続いて、post-transcriptional レベルでの調節が働いていることを示唆しており、MG132 のデータはユビキチン・プロテアソームによる分解がこの調節に関与していると想定された。今後は、まだ明らかでない蛋白合成レベル制御機構も混ぜて、今後の検討課題である。哺乳類の時計蛋白 PER、CRY はユビキチン化を容易に受けるが、残念ながら哺乳類時計蛋白では E3 は同定されていない。しかし、アカパンカビとショウジョウバエが同じく SCF 型ユビキチンリガーゼ複合

体を経て、サーカディアンフィードバックループのネガティブ因子のユビキチン化、分解を行っていることから、Slimbの脊椎動物ホモログである $\mu$ -TRCPは哺乳類PERに同じく役割を果たす可能性がある。

視交叉上核での脱ユビキチン化酵素UCHL1の欠損では、末梢神経障害であるGADマウスでは行動の周期性が変動することを、今回の検索で発見した。脱ユビキチン化酵素はユビキチン化された蛋白質が分解するとき、それを回収して、フリーのユビキチンを産生するシステムである。その一つであるUCHL1は神経系に非常に高く発見しており、パーキンソン病のレビー小体においてUbと共に大量に蓄積している事も知られている。さらに、ドイツの家族性パーキンソン病の家系においてUCHL1遺伝子にミスセンス変異があることが発見された。今回、GADマウスでユビキチン量の減少は、リズム異常の程度とよく相関していた。この結果は、時計蛋白質のユビキチン・プロテアソーム系による分解の障害は、リズム異常を来たすという、哺乳類で初めての事実である。

概日リズムの重要な特質に、遺伝子の転写リズムがほぼ完璧な形で行動リズムに反映している事がある。具体的に述べると、リズムセンターである視交叉上核の各細胞におけるごく少数の遺伝子で構成されるコア・ループによる遺伝子レベルの時計発振が、視交叉上核という神経核レベルで同期・増幅され、全脳に伝播し、ついには行動・ホルモン分泌など個体レベルの概日リズムを生み出す。発振は視交叉上核の各細胞であるが、振動の増幅・伝達機構は脳機能の効率性・特殊性が活かされていると言える。

#### E. 結論:

遺伝子から行動まで同じ現象を追うことができる事は生体リズムの重要な特質で、同じレベルの追求が可能な脳や生体機能はほとんど無いと言ってよい。この時計遺伝子からホルモンにいたるまでの一連のアッセイ系を確立することにより、脳機能の一端が明らかになることが期待さ

れる。今回、ユビキチン・プロテアソーム系の時計振動への関与が明らかになったことにより、リズム障害の分子機序を基にした、テーラーメイド医療の開発につながることを期待される。

#### F. 健康危険情報 特に無し

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Okamura H: Clock genes and cell clocks: Roles, actions and mysteries. *J. Biol. Rhythms*, 19, 388-399, 2004.
- 2) Okamura H: Integration mechanism of molecular rhythm in biological clock. *Sleep Biol. Rhythms*, 2, S40-S41, 2004.
- 3) 岡村 均: 体内時計の分子機構に関する研究、*日本医師会雑誌*、131、45-51, 2004.
- 4) 岡村 均、上山友子: 体内時計による内分泌・自律神経の生体リズムの制御、*ブレインメディカル*、16、149-155、2004.
- 5) 岡村 均、藤本義人、董 新: ユビキチンと体内時計、*医学のあゆみ*、211、142-146、2004.
- 6) 岡村 均、深田吉孝編: 時計遺伝子の分子生物学、*シュプリンガー・フェアラーク東京*、B5 版 219 頁、ISBN:4-431-71023-X、2004.
- 7) Yamamoto Y, Yagita Y, Okamura H: Role of cyclic mPer2 expression in mammalian cellular clock. *Mol. Cell Biol.*, 25, 1912-1921, 2005.
- 8) Zhang J, Dong X, Fujimoto Y, Okamura H: Molecular Signals of Mammalian Circadian Clock. *Kobe J. Med. Sci.* 50, 2004, in press.
- 9) Dong X, Yagita K, Zhang J, Okamura H: Expression of ubiquitin-related enzymes in the suprachiasmatic nucleus with special reference to ubiquitin carboxy-terminal hydrolase Uchl1. *Biomed. Res.*, 26, 2005, in

press.

- 10) Masubuchi S, Kataoka K, Sassone-Corsi P, Okamura H: mPER1 acts as a circadian adaptor to entrain the oscillator to environmental light-dark cycles by regulating mPER2 protein, *J. Neurosci.*, 2005, in press.

## 2. 学会発表

- 1) Okamura H, Masubuchi S, Ishida A, Ueyama T, Katayose K: Molecular machinery of clock oscillation in central and peripheral clocks. Symposium "Circadian clocks in the central nervous system". 16<sup>th</sup> International Congress of the International Federation of Association of Anatomists (IFAA), Kyoto, August 24, 2004.
- 2) Okamura H, Where the circadian cycle and cell cycle meet, Computational Chronobiology, National Academies Keck Futures Initiative Workshop, Irvine, CA, 2005. 1.6-1.8.
- 3) 岡村 均: 時計遺伝子による時間システムの構築、招待講演、日本分子生物学会第4回春季シンポジウム(奈良)、2004年5月20日
- 4) 岡村 均: 体内の時間は遺伝子で決まる、公開講演会、京都府臨床衛生検査技師会(京都)、2004年5月22日
- 5) 岡村 均: 身体の時間を刻む時計遺伝子、シンポジウム、第29回日本睡眠学会定期学術集会(東京)、2004年7月1日
- 6) 岡村 均: 時の伝達系としての光シグナルと時計システム、第26回日本光医学・光生物学会(大阪)、特別講演、2004年7月23日
- 7) 岡村 均: 体内時計はリズム的な生命活動を生起する、第40回姫路市医師会夏季大学(姫路)、招待講演、2004年7月25日
- 8) 岡村 均: 時計遺伝子から生体リズムへ、日本臨床薬理学会、招待講演、静岡、2004年9月18日
- 9) 岡村 均: 生物時計—細胞はいかにして時を刻むか—、福山大学講演会、福山、2004年9月24日
- 10) 岡村 均: 第49回日本人類遺伝学会、招待講演、東京、2004年10月14日
- 11) 上山友子、岡村 均: 無麻酔無拘束マウスモデルを用いた血中コルチコステロン濃度の概日リズムの測定、第11回日本時間生物学会、教育講演、大津、2004年11月12日
- 12) 岡村 均: 個体としての時計遺伝子: 光・ホルモン・行動、第11回日本時間生物学会、教育講演、大津、2004年11月12日
- 13) 岡村 均: 脳の時計と体の時計、第9回 KIBI-KIDS セミナー(岡山)、招待講演、2004年11月16日
- 14) 董新、和田圭司、岡村均: Expression of ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 (Uch-L1) in the mice suprachiasmatic nucleus and circadian locomotor rhythm on the gracile axonal dystrophy (*gad*) mutant mice. 解剖学会近畿地方会、高槻、2004年11月27日
- 15) 張晶、董新、岡村均: Brain expression of valosin-containing protein (VCP) mRNA in the mouse with special reference to the suprachiasmatic nucleus. 解剖学会近畿地方会、高槻、2004年11月27日
- 16) 岡村 均: 脳の時計と体の時計、関西動物研究会、特別講演、京都、2004年12月10日
- 17) 岡村 均: 脳の時計と体の時計、第132回和歌山県医師会内科医会講演会、招待講演、和歌山、2004年12月11日
- 18) 岡村 均: 脳の時計と体の時計、芦屋市医師会学術講演会、特別講演、芦屋、2005年2月18日

H. 知的財産権の出願・登録状況  
特になし

厚生労働省科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）  
分担研究報告書

ヒト睡眠・覚醒リズム障害の分子生物学的成因解明と  
テラーメイド治療法開発に関する基盤的研究

分担研究者 尾崎紀夫 名古屋大学大学院医学系研究科精神医学分野

**研究要旨：**セロトニン(5-HT) 7 受容体は、睡眠覚醒リズムや認知機能に関与し、抗うつ薬、非定型抗精神病薬の薬理作用との関係、さらに染色体上の位置情報からも、双極性障害および統合失調症の病態生理と関係している可能性が示唆されている。そこで、HTR7 を候補遺伝子として連鎖不平衡地図を加味した関連解析を行った。その結果、プロモータ領域の SNP と統合失調症との関連が検出された。本 SNP の機能的意義は CHO 細胞を用いた Dual-luciferase reporter assay では立証されなかった。

A. 研究目的

セロトニン(5-HT) 7 受容体は、最も新しく同定された 5-HT 受容体の一つで、G 蛋白共役型受容体である。最近まで本 5-HT7 受容体の機能は不明であったが、近年、ノックアウトマウスの解析や選択的アンタゴニストが開発され、漸く中枢神経系における分布と生理的機能が明らかになってきた。その結果、本受容体は 1) 視床下部、特に視交叉上核に豊富に分布しており、覚醒・睡眠リズムの調節に関与していることから気分障害との関係が、2) 海馬にも豊富に分布し認知機能に関与していることから統合失調症との関係に興味を持たれるようになった。加えて、抗うつ薬投与により本受容体がダウンレギュレーションを起こすことや、risperidone, clozapine といった非定型抗精神病薬との親和性も高いことが報告された。さらに、本受容体遺伝子(HTR7)の染色体上の位置 10q23 は全ゲノム解析の結果、双極性気分障害と統合失調症の双方の発症脆弱性遺伝子存在部位として報告されている。

一方、統合失調症および双極性障害と HTR7 の関連に関する検討は、多型性の低い単一の SNPs を用いた関連解析がな

され、negative との結果が報告されているに過ぎない。

以上の諸点を踏まえ、HTR7 は双極性気分障害ならびに統合失調症の双方の病態生理に関連しうる候補遺伝子と考え、今回 LD map を加味した関連解析を行った。

B. 研究方法

・対象：DSM-IVTR によって診断した統合失調症患者 383 名、双極性気分障害患者 116 名、健常者 351 名から末梢血を採取して、ゲノム抽出を行った。

・関連解析：96 人の日本人正常対照者の DNA を用いて HTR7 の LD mapping を行い、haplotype-tagging (ht)SNPs を選択した。さらに選択した htSNPs による genotyping を拡張し、日本人統合失調症患者、双極性障害患者、正常対照者の遺伝子型を決定し、haplotype based の関連解析を行った。

発現実験：関連が示唆された SNP はプロモータ領域に存在したので CHO cell を用いた Dual-luciferase reporter assay を行って本 SNP が HTR7 の転写活性に対して与える影響を検討した。

新たな多型検索：HTR7 の 14 領域（すべ

ての exon、alternative splice exon (exonD)、branch site と exon1 から上流 1000bp を含む intron 領域)を対象とし、dHPLC を用いて新たな変異検索を行った。

・倫理的配慮：本研究は三省合同のゲノム研究に関する倫理指針に則った名古屋大学倫理審査委員会の承認を得ており、対象者には本研究に関して十分な説明を行い、文書にて同意を取得した。

#### C. 研究結果

LD mapping の結果、4 個の htSNPs を選出、そのうち 2 個の htSNPs (SNP2, SNP5) とその組み合わせからなる haplotypes で統合失調症との関連を得たが、双極性障害との関連は否定された。

Dual-luciferase reporter assay を行ったが、SNP2 は転写に影響しなかった。

HTR7 の多型検索を行ったが、機能に影響する可能性のある多型は同定できなかった。

#### D. 考察と結論

今回、HTR7 のプロモータ領域の SNP と統合失調症とは関連を検出した。HTR7 の様に、従来の検討が不十分 (LD mapping の加味、表現型の検討、サンプル数、SNP の機能的意義など) になっている遺伝子も多い。新規遺伝子の検討とともに、これら遺伝子の再検討もあわせて行う予定。

CHO cell を用いた発現実験では本 SNP の機能的意義が確認はされなかった。しかしながら、CHO は神経系由来ではなく、今後他の細胞種等を用いた検討を行う予定にしている。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

• Saito S, Ikeda M, Iwata N, Suzuki T, Kitajima T, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Takahashi N, Inada T, Ozaki N: No association was found between a functional SNP in ZDHHC8 and schizophrenia in a Japanese case-control population. *Neurosci Lett* 374 (1):21-24, 2005

• Miura H, Qiao H, Kitagami T, Ohta T, Ozaki N: Fluvoxamine, a selective serotonin reuptake inhibitor, suppresses tetrahydrobiopterin levels and dopamine as well as serotonin turnover in the mesoprefrontal system of mice. *Psychopharmacology (Berl)* 177 (3):307-14, 2005

• Hashimoto R, Suzuki T, Iwata N, Yamanouchi Y, Kitajima T, Kosuga A, Tatsumi M, Ozaki N, Kamijima K, Kunugi H: Association study of the frizzled-3 (FZD3) gene with schizophrenia and mood disorders. *J Neural Transm* 112 (2):303-307, 2005

• Hashimoto R, Yoshida M, Ozaki N, Yamanouchi Y, Iwata N, Suzuki T, Kitajima T, Tatsumi M, Kamijima K, Kunugi H: A missense polymorphism (H204R) of a Rho GTPase-activating protein, the chimerin 2 gene, is associated with schizophrenia in men. *Schizophr Res* 73 (2-3):383-385, 2005

• Takano A, Uchiyama M, Kajimura N, Mishima K, Inoue Y, Kamei Y, Kitajima T, Shibui K, Kato M, Watanabe T, Hashimoto Y, Ozeki Y, Hori T, Yamada N, Toyoshima R, Ozaki N, Okawa M, Nagai K, Takahashi K, Isojima Y, Yamauchi T, Ebisawa T: A Missense Variation in Human Casein Kinase I Epsilon Gene that Induces Functional Alteration and Shows an Inverse Association with Circadian Rhythm Sleep Disorders. *Neuropsychopharmacology* (4):1-9, 2004

2004

• Ozaki N: Pharmacogenetics of antipsychotics. *Nagoya J Med Sci* 67 (1-2):1-7, 2004

• Okada M, Goldman D, Linnoila M, Iwata N, Ozaki N, Northup JK: Comparison of G-Protein Selectivity of Human 5-HT<sub>2C</sub> and 5-HT<sub>1A</sub> Receptors. *Ann N Y Acad Sci* 1025:570-7, 2004

• Okada M, Northup J, Ozaki N, Russell J, Linnoila M, Goldman D: Modification of Human 5-HT<sub>2C</sub> Receptor Function by Cys23Ser, an Abundant, Naturally Occurring Amino Acid Substitution. *Mol Psychiatry* 9 (1):55-64, 2004

• Numakawa T, Yagasaki Y, Ishimoto T, Okada T, Suzuki T, Iwata N, Ozaki N, Taguchi T, Tatsumi M, Kamijima K, Straub RE, Weinberger DR, Kunugi H, Hashimoto R: Evidence of novel neuronal functions of dysbindin, a susceptibility gene for schizophrenia. *Hum Mol Genet* 13 (21):2699-2708, 2004

• Nokura K, Kanbayashi T, Ozeki T, Koga H, Zettsu T, Yamamoto H, Ozaki N, Shimizu T, Kawase T: Hypersomnia, asterixis and cataplexy in association with orexin A-reduced hypothalamic tumor. *J Neurol* 251 (12):1534-5, 2004

• Munakata K, Tanaka M, Mori K, Washizuka S, Yoneda M, Tajima O, Akiyama T, Nanko S, Kunugi H, Tadokoro K, Ozaki N, Inada T, Sakamoto K, Fukunaga T, Iijima Y, Iwata N, Tatsumi M, Yamada K, Yoshikawa T, Kato T: Mitochondrial DNA 3644T-->C mutation associated with bipolar disorder. *Genomics* 84 (6):1041-1050, 2004

• Kunugi H, Iijima Y, Tatsumi M, Yoshida M, Hashimoto R, Kato T, Sakamoto K, Fukunaga T, Inada T, Suzuki T, Iwata N, Ozaki N, Yamada K, Yoshikawa T: No association between the Val66Met polymorphism of the brain-derived neurotrophic factor gene and bipolar disorder in a Japanese

population: a multicenter study. *Biol Psychiatry* 56 (5) :376-8, 2004

• Koizumi H, Hashimoto K, Kumakiri C, Shimizu E, Sekine Y, Ozaki N, Inada T, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Sora I, Ujike H, Takei N, Iyo M: Association between the glutathione S-transferase M1 gene deletion and female methamphetamine abusers. *Am J Med Genet* 126B (1) :43-45, 2004

• Kobayashi H, Ide S, Hasegawa J, Ujike H, Sekine Y, Ozaki N, Inada T, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Iyo M, Shen HW, Ikeda K, Sora I: Study of Association between {alpha}-Synuclein Gene Polymorphism and Methamphetamine Psychosis/Dependence. *Ann N Y Acad Sci* 1025 325-334, 2004

• Iwata N, Inada T, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Sekine Y, Iyo M, Sora I, Ujike H, Ozaki N: No Association Is Found between the Candidate Genes of t-PA/Plasminogen System and Japanese Methamphetamine-Related Disorder: A Collaborative Study by the Japanese Genetics Initiative for Drug Abuse. *Ann N Y Acad Sci* 1025 34-38, 2004

• Iwata N, Suzuki T, Ikeda M, Kitajima T, Yamanouchi Y, Inada T, Ozaki N: No Association With the Neuregulin 1 Haplotype to Japanese Schizophrenia. *Mol Psychiatry* 9 (2) :126-127, 2004

• Itoh K, Hashimoto K, Shimizu E, Sekine Y, Ozaki N, Inada T, Harano M, Iwata N, Komiyama T, Yamada M, Sora I, Nakata K, Ujike H, Iyo M: Association study between brain-derived neurotrophic factor gene polymorphisms and methamphetamine abusers in Japan. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 132B (1) :70-73, 2004

• Inada T, Iijima Y, Uchida N, Maeda T, Iwashita S, Ozaki N, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Sekine Y, Iyo M, Sora I, Ujike H: No Association Found between

the Type 1 Sigma Receptor Gene Polymorphisms and Methamphetamine Abuse in the Japanese Population: A Collaborative Study by the Japanese Genetics Initiative for Drug Abuse. *Ann N Y Acad Sci* 1025 27-33, 2004

• Ikeda M, Iwata N, Suzuki T, Kitajima T, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Inada T, Ozaki N: Association of AKT1 with schizophrenia confirmed in a Japanese population. *Biol Psychiatry* 56 (9) :698-700, 2004

• Ide S, Kobayashi H, Tanaka K, Ujike H, Sekine Y, Ozaki N, Inada T, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Iyo M, Ikeda K, Sora I: Gene polymorphisms of the mu opioid receptor in methamphetamine abusers. *Ann N Y Acad Sci* 1025 316-324, 2004

• Hashimoto R, Yoshida M, Ozaki N, Yamanouchi Y, Iwata N, Suzuki T, Kitajima T, Tatsumi M, Kamijima K, Kunugi H: Association analysis of the G308A promoter polymorphism of

the tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) gene in Japanese

patients with schizophrenia. *Journal of Neural Transmission* 111 (2) :217-222, 2004

• Harano M, Uchimura N, Abe H, Ishibashi M, Iida N, Yanagimoto K, Tanaka T, Maeda H, Sora I, Iyo M, Komiyama T, Yamada M, Sekine Y, Inada T, Ozaki N, Ujike H: A Polymorphism of DRD2 Gene and Brain Atrophy in Methamphetamine Psychosis. *Ann N Y Acad Sci* 1025 307-315, 2004

• Deng XX, Shibata HH, Ninomiya HH, Tashiro NN, Iwata NN, Ozaki NN, Fukumaki YY: Association study of polymorphisms in the excitatory amino acid transporter 2 gene (SLC1A2) with schizophrenia. *BMC Psychiatry* 4 (1) :21, 2004

## 2. 学会発表

Yamanouchi Y, Iwata N, Suzuki T, Kitajima T, Ikeda M, Ozaki N: Can a SNP on splicing variant of HTR4 predict post psychotic depression or anxiety?, in 12th World Congress on Psychiatric Genetics. Dublin, 2004

Ujike H, Iwata N, Ozaki N: Central cannabinoid receptor gene (CNR1) and schizophrenia, in International Congress of Biological Psychiatry Symposium: Endocannabinoids: A Novel Signaling System in Schizophrenia Research. Sydney, 2004

鈴木竜世, 山本香代子, 村上裕子, 山之内芳雄, 北島剛司, 池田匡志, 美根和典, 尾崎紀夫, 岩田仲生: 5-HT<sub>2C</sub> 受容体遺伝子 (HTR2C) の多型検索と統合失調症との関連研究, in 第 26 回日本生物学的精神医学会. 東京, 2004

鈴木敦子, 中村和彦, 関根吉統, 長田奈穂子, 竹林淳和, 三辺義雄, 武井教使, 鈴木勝昭, 岩田泰秀, 河合正好, 伊豫雅臣, 尾崎紀夫, 稲田俊也, 岩田仲生, 原野陸生, 小宮山徳太郎, 山田光彦, 曾良一郎, 氏家 寛, 森 則夫: 覚醒剤精神病における SOD2 の関連研究, in 第 26 回日本生物学的精神医学会. 東京, 2004

Ozaki N, Iwata N, Inada T: Genomic research of schizophrenia: from candidate gene and pharmacogenetic approach to whole genome study, in WFSBP Asian Pacific Congress: Plenary Lecture. Korea, 2004

野村 晃, 氏家 寛, 中田謙二, 勝 強志, 大谷恭平, 森田幸孝, 田中有史, 黒田重利, 稲田俊也, 原野陸正, 小宮山徳太郎, 山田光彦, 関根吉統, 曾良一郎, 岩田仲生, 伊豫雅臣, 尾崎紀夫: Prodynorphin 遺伝子のプロモーター領域の機能的多型と覚せい剤依存症との関連研究, in 第 26 回日本生物学的精神医学会. 東京, 2004

尾崎紀夫, 稲田俊也, 岩田仲生: 統合失調症ゲノム研究と臨床薬理学研究との架橋を目指して, in 第 14 回日本臨床精神

神経薬理学会 シンポジウム「分子精神医学の進歩と精神科薬物療法」. 神戸, 2004

飯嶋良味, 坂元 薫, 福永貴子, 中平進, 大槻露華, 吉川武男, 山田和男, 功刀 浩, 岡田武也, 加藤忠史, 尾崎紀夫, 岩田仲生, 巽 雅彦, 南光進一郎, 樋口輝彦, 有波忠雄, 稲田俊也: 双極性障害における ChromograninB 遺伝子の大規模関連解析, in 第 26 回日本生物学的精神医学会. 東京, 2004

池田匡志, 鈴木竜世, 山之内芳雄, 北島剛司, 西山 毅, 稲田俊也, 岩田仲生, 尾崎紀夫: AKT1 と日本人統合失調症との関連解析, in 第 26 回日本生物学的精神医学会. 東京, 2004

Ikeda M, Iwata N, Nishiyama T, Suzuki T, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Ozaki N: No Association between GABAA cluster on 5q and Japanese schizophrenia in 12th World Congress on Psychiatric Genetics. Dublin, 2004

大西哲生, 山田和男, 茂野佳美, 大羽尚子, 鷹雄 瞳, 豊田倫子, 飯嶋良味, 稲田俊也, 坂元 薫, 功刀 浩, 巽 雅彦, 南光進一郎, 岩田仲生, 尾崎紀夫, 加藤忠史, 吉川武男: IMPA2 遺伝子プロモーター領域に存在する気分障害リスクハプロタイプ, in 第 26 回日本生物学的精神医学会. 東京, 2004

大掛真太郎, 橋本謙二, 清水栄司, 関根吉統, 稲田俊也, 尾崎紀夫, 岩田仲生, 原野陸生, 小宮山徳太郎, 山田光彦, 曾良一郎, 中田謙二, 氏家 寛, 伊豫雅臣: NQO 遺伝子多型と覚醒剤乱用との関連研究, in 第 26 回日本生物学的精神医学会. 東京, 2004

村上裕子, 小林大介, 鈴木竜世, 岩田仲生, 尾崎紀夫, 原口浩一, 家入一郎, 細井昌子, 澤田康文, 久保千春, 美根和典: Paroxetine の副作用発現と CYP2D6 及びセロトニン系遺伝子多型との関連, in 第 14 回日本臨床精神神経薬理学会. 神戸, 2004

千崎康司, 野田幸裕, 永井 拓, 楠 和憲, 岩田仲生, 鍋島俊隆, 尾崎紀夫: 大うつ病患者における治療前後の状態像と



血漿神経ステロイドの関係, in 第 26 回  
日本生物学的精神医学会. 東京, 2004

小林秀昭, 井手聡一郎, 長谷川準子, 氏家 寛, 尾崎紀夫, 関根吉統, 稲田俊也, 原野睦生, 小宮山徳太郎, 山田光彦, 伊豫雅臣, 岩田仲生, 岩橋和彦, 糸川昌成, 池田和隆, 曾良一郎: メタンファタミン依存とオピオイド関連受容体遺伝子多型に関する相関研究, in 第 26 回日本生物学的精神医学会. 東京, 2004

小泉裕紀, 橋本謙二, 熊切 力, 清水栄司, 関根吉統, 尾崎紀夫, 稲田俊也, 原野睦生, 小宮山徳太郎, 山田光彦, 曾良一郎, 氏家 寛, 武井教使, 伊豫雅臣: グルタミン酸 S トランスフェラーゼ M1 (GSTM1) 遺伝子欠損と覚醒剤乱用者の関連研究, in 第 26 回日本生物学的精神医学会. 東京, 2004

高橋長秀, 稲田俊也, 石原良子, 三浦英樹, 斉藤真一, 岡本英治, 樽井俊介, 尾崎紀夫: 統合失調症患者における血中クロモグラニン A 濃度の変動, in 第 14 回日本臨床精神神経薬理学会. 神戸, 2004

橋本亮太, 沼川忠広, 矢ヶ崎有希, 石本哲也, 鈴木竜世, 岩田仲生, 尾崎紀夫, 田口隆久, 巽 雅彦, 上島国利, Straub R, Weinberger D, 功刀 浩: 統合失調症脆弱性遺伝子ディスバインジンの関連解析と神経細胞における機能解析, in 第 26 回日本生物学的精神医学会. 東京, 2004

橋本亮太, 尾崎紀夫, 岩田仲生, 山之内芳雄, 鈴木竜世, 北島剛司, 巽 雅彦, 上島国利, 功刀 浩: Chimerin2 遺伝子の H204R ミスセンス多型は男性において統合失調症と関連する, in 第 26 回日本生物学的精神医学会. 東京, 2004

橋本謙二, 伊藤加奈子, 清水栄司, 関根吉統, 稲田俊也, 尾崎紀夫, 岩田仲生, 原野睦生, 小宮山徳太郎, 山田光彦, 曾良一郎, 中田謙二, 氏家 寛, 伊豫雅臣: BDNF 遺伝子と覚醒剤乱用者の関連研究, in 第 26 回日本生物学的精神医学会. 東京, 2004

H. 知的財産権の出願。登録状況なし。

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）

分担研究報告書

ヒト睡眠・覚醒リズム障害の分子生物学的成因解明とテラーム  
イド治療法開発に関する基盤的研究

分担研究者 海老澤 尚

東京大学大学院医学系研究科 睡眠障害解析学 客員助教授

研究要旨

Casein kinase Iepsilon (CK1ε)から睡眠相後退症候群発症の抑制因子である S408N 多型を見出し、その多型がCK1εのリン酸化酵素活性を上昇させることを見出した。また、培養細胞を用いて体内時計機能を調べるシステムを樹立した。

A. 研究目的

家族性睡眠相前進症候群 (ASPS) の一家系では、時計遺伝子の一つ *Per2* 遺伝子の S662G 変異が原因であること、散发性睡眠相後退症候群 (DSPS) 発症の危険因子の一つが *Per3* 遺伝子の V647G 多型であることが報告されている。

機能解析により、S662G 変異は Casein kinase Iepsilon (CK1ε) による PER2 蛋白のリン酸化を低下させることが判明した。V647G 多型は PER3 蛋白が CK1ε によるリン酸化を受ける標的配列の近傍にあり、そのリン酸化に影響を与えると推測された。PER 蛋白は、そのリン酸化により、蛋白の安定性や細胞内局在が変化することが知られている。従って上記の *Per* 遺伝子変異・多型により PER 蛋白のリン酸化

が変化を受け、蛋白の代謝や細胞内局在が変化し、ASPS・DSPS をもたらすと考えられている。また、ショウジョウバエの場合、CK1ε ホモログである Double-time (dbt) 遺伝子に機能的変異があると概日リズム周期が変化・消失し、ハムスターでは CK1ε 遺伝子の *tau* 変異でリン酸化酵素活性が低下すると概日リズム周期が短縮するなど、CK1ε 活性の変化は概日リズムに異常をもたらすことが証明されている。

そこで今回我々は、時計蛋白のリン酸化に関わる CK1ε 遺伝子に概日リズム睡眠障害の発症に影響を及ぼす多型があるのではないかと考え、多型解析を行った。そして概日リズム睡眠障害発症に影響すると考えられる多型を見出し、その多型により PER 蛋白のリン酸化が変化するこ

とを示した。また、体内時計機能の異常を培養細胞を用いて簡便に調べられるシステムの開発を開始した。

## B. 研究方法

### 1. ゲノム DNA サンプル

DSPS 患者 98 名、非 24 時間睡眠覚醒症候群 (N-24) 患者 39 名及び 138 名の健常被験者から静脈血を採取し、ゲノム DNA を抽出した。

### 2. 遺伝子多型解析

CK1 $\epsilon$  遺伝子の翻訳領域を含む全エクソンをカバーできるプライマーを合成して PCR を行い、その産物を用いて SSCP 法や D-HPLC 法により多型の有無を検索した。多型が存在すると思われる領域はさらに別のプライマーを用いて PCR で増幅し、その産物を直接シーケンスして多型の位置を決定した。

### 3. 組み換え蛋白の精製

マウス PER1、ラット PER2、マウス PER3 の、CK1 $\epsilon$  結合領域を含む cDNA 断片をベクター pGEX4T-3 または pGEX6P-1 にサブクローニングし、glutathione-S-transferase (GST) との融合組み換え蛋白を産生するプラスミドを構築した (GST-mPER1, GST-rPER2, GST-mPER3)。ラット CK1 $\epsilon$  の cDNA に PCR 法を使って S408N 多型を導入した。野生型ならびに S408N 多型を導入した CK1 $\epsilon$  遺伝子を発現ベクター pGEX4T-3 ( $\alpha$ -casein 用) または pGEX6P-1 (PER 蛋白用) にサブクローニングし、それぞれ GST との融合蛋白を産生するプラスミドを作成した (GST-CK1 $\epsilon$ -

WT, GST-CK1 $\epsilon$ -S408N)。それぞれのプラスミドを大腸菌 BL21 株に導入し、融合蛋白を発現させ、glutathione sepharose 4B で精製した。GST-CK1 $\epsilon$  蛋白は分解しやすいため、 $\alpha$ -casein を使った酵素の反応速度の測定には、ラット CK1 $\epsilon$  蛋白の C 末端側に特異的な抗体を使って精製し、部分分解したものを取り除いた GST-CK1 $\epsilon$  蛋白を用いた。GST-PER 蛋白を基質に使い *in vitro* での酵素活性を測定する場合は、リン酸化された GST-PER 蛋白と自己リン酸化された CK1 $\epsilon$  蛋白とを電気泳動上区別するため、GST タグを PreScission Protease で取り除いてから使用した。

### 4. *In vitro* での酵素活性・反応速度の測定

酵素活性の測定は [ $^{32}$ P]、及び  $\alpha$ -casein または GST-PER を含む 20  $\mu$ L の反応バッファー中で、40 ng の GST-CK1 $\epsilon$  蛋白 ( $\alpha$ -casein 使用時)、2 pmol のラット CK1 $\epsilon$  蛋白 (GST-mPER1, rPER2 使用時)、または 10 pmol のラット CK1 $\epsilon$  蛋白 (GST-mPER3 使用時) を混合して行なった。さまざまな濃度 (0-100 mM) の  $\alpha$ -casein、または 20 pmol の GST-mPER1, GST-rPER2, GST-mPER3 を基質にした。 $\alpha$ -casein に対する反応は 37 $^{\circ}$  C で 10 分間行われた。反応は 20  $\mu$ L の SDS-PAGE sample buffer 添加で停止し、反応液の一部は 12% ( $\alpha$ -casein 使用時)、または 7.5% (GST-PER 使用時) のポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、基質に取り込まれた  $^{32}$ P の量を測定した。

## 5. レポータープラスミドの構築

pGL3-Basic vector 中の firefly luciferase 遺伝子の C 末端側に、マウス ornithine decarboxylase の蛋白分解を促進する領域 (PEST 配列) を改変した配列を結合させ (pGL3-Basic-PEST)、luciferase 蛋白の半減期を短くして発現量が概日リズムに従って変化するのを観察しやすくした。pGL3-Basic-PEST のプロモーター領域に、時計遺伝子の一つヒト Bmal1 遺伝子のプロモーターを連結した (pGL3-Bmal1P-PEST)。

## 6. Rat-1 細胞の培養

Rat-1 細胞は 10% FBS 入りの DMEM 溶液中で、5% CO<sub>2</sub> 存在下、37° C で培養した。1,000,000 個の細胞を 35mm ディッシュにまき、24 時間後に Lipofectamine2000 を用いて pGL3-Bmal1P-PEST を導入した。その 24 時間後、0.1 μM の dexamethasone を培地に加えて刺激し、2 時間後に 0.1 μM luciferin を含む培地に代え、微弱発光測定装置を使って発光量の経時的変化を数日間にわたって測定した。

### (倫理面への配慮)

この研究は、埼玉医科大学ならびに各共同研究施設の倫理委員会の承認を得、被験者には研究内容を説明し、書面による承諾を得た上で実施された。

## C. 研究成果

### 1. 多型解析

35 名の概日リズム障害患者から抽出し

た DNA サンプル (DSPS; 17 名、N-24; 18 名) を対象に、CK1ε 遺伝子の翻訳領域を含む全エクソンならびにその周囲の配列について、PCR-SSCP 法、PCR 産物の直接シーケンス法で核酸配列の多型を検索したところ、うち 1 個はアミノ酸配列の置換を伴う S408N 多型だった。S408N 多型は CK1ε 蛋白の C 末端近くに存在し、脊椎動物の CK1delta/epsilon 間でよく保存されているアミノ酸の多型だった (図 1)。CK1ε は自己リン酸化を受けると酵素活性が低下するが、S408 は自己リン酸化の標的アミノ酸のひとつと推測されている。従って S408N 多型により自己リン酸化部位の一つが消失し、自己リン酸化が減少して酵素活性の上昇が生じるのではないかと考えられた。

そこでまず S408N 多型と概日リズム障害発症との関連を探るため、全サンプルを対象に多型解析を行ったところ、N408 アリルの頻度は、コントロールサンプルでは 12.3% だったのに対し、DSPS 群では 6.1%、N-24 群では 3.8% と概日リズム障害群で有意に低頻度だった (それぞれ P=0.028, P=0.035) (表 2)。N-24 はしばしば経過中に DSPS 様の症状を示すこと、DSPS と N-24 とでは、深部体温が最低を示す時刻と自然覚醒時刻との間隔が広がるなど、共通の特徴があることなどから、N-24 と DSPS は本質的に同じ病態生理を持つ、重症度が異なる疾患なのではないかと考えられている。そこで DSPS 群と N-24 群をひとつの疾患群としてまとめ、N408 アリルの頻度をコントロール群と比