

へ移送している。脳内においては、FMRP はシナプスの発達、可塑性、樹状突起の伸長などの神経発達に関係する蛋白の mRNA と結合することが知られている。加えて、FMR1 Knock-out ショウジョウバエは活動の周期性が消失し、生体リズムに関連する蛋白の周期的変動に異常が見られるという報告があり、着目されている。

Anterior pharynx defective 1 homolog B (APH-1B) は the γ -secretase enzyme の構成因子の一つで、Notch pathway を始めとする多くの神経発達経路に関与しているタンパクである。Notch pathway はシナプス可塑性に関与し、この経路が障害される常染色体優勢遺伝疾患である cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL) の患者では気分障害の発症率が高いことが報告されている。近年、apomorphine に強い感受性を示すラットの系列では APH-1B 遺伝子の発現が有意に低下していることが示され、また、これらのラットでは視床下部下垂体副腎皮質系のリズム性の異常やストレス反応性の過剰が報告されている。

Circadian locomotor output cycles kaput (CLOCK) は下等動物から人間に到るまでの時計遺伝子機構の中心的役割を果たす時計遺伝子の一つであり、これまでも既に mRNA の発現に関与する 3111T>C 多型が朝型・夜型傾向、うつ病の睡眠障害あるいはその SSRI への反応性、双極性障害の再発性に関与することが報告されており、リズム障害と気分障害への双方への関与が強く示唆される。

セロトニン(5-HT)受容体は不安・気分の双方に直接関与が想定されるほか、生体時計の主座である視交叉上核(SCN)にも発現しており、現在 5-HT 7 まであるサブタイプの内、1A、1B、7 受容体は SCN において生体リズムの調節に関与することが動物実験から示されている。さらに、5-HT7 受容体は risperidone, clozapine といった非定型抗精神病薬と高親和性を示す上、海馬にも豊富

に分布して認知機能に関与しており、統合失調症の病態とも関係しうる。また、5-HT4 受容体遺伝子の染色体上の位置(5q 33.2)は双極性障害発症脆弱性遺伝子の候補部位の近傍に位置しており、双極性障害との関係性が考えられる。

Glycogen synthase kinase 3- β (GSK3 β) は中枢神経発達に関わる様々な情報伝達系に関与する一方、SCN の時計遺伝子機構への調節、双極性障害の治療薬であるリチウムの作用点となること、双極性障害の発症年齢・全断眠への反応に関与が報告されていることなどから、生体リズムと双極性障害の双方に関与することが示唆されている。

以上の知見から我々は、a) FMR1、APH-1B、CLOCK、HTR4、7、GSK3 β と双極性障害との関連解析 b) HTR1A、1B とうつ病の早朝覚醒ならびに日内気分変動との関連解析を行った。

B. 研究方法

対象：DSM-IV に従って診断された以下の被験者を対象とし、文書による同意を得た上で抹消血を採取し、DNA を抽出した。

a) 272 名の双極性障害患者、383 名の統合失調症患者と 384 名の健常者

b) 151 名の双うつ病性障害患者：初診時の HAM-D において、早朝覚醒の項目で 0 点の群と 1 点以上の群に分割、また気分日内変動の項目で 0 点の群と 1 点以上の群に分割して解析した。

遺伝子解析：各遺伝子座位に関して HapMap data、あるいは自験 data をもとに LD mapping を行い haplotype tagging SNPs を選定した。それぞれの SNPs を PCR-RFLP 法、TaqMan 法、ダイレクトシーケンス法にてタイプを行った。

統計解析：アレル頻度、ハプロタイプ頻度を HAPLOVIEW version 3.0, cochaphase version 2.403, PowerMaker version 3.25 を用いて比較した。多重比較の補正には、SNPSpD software または 10,000 permutation tests を用いた。

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ならびに藤田保健衛生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

a)

1) FMR1, CLOCK, GSK3 β

Single-marker 解析、Haplotype 解析ともに、FMR1 遺伝子多型と双極性障害との間には有意な関連は見られなかった。

2) APH1B

APH1B 遺伝子は 2 つの LD ブロックを形成していた。intron1 に存在する rs7166881 の変異アレルが双極性障害患者で有意に多く観察され ($P = 0.033$)、この SNP を含むブロックのハプロタイプ頻度にも症例対象間で有意な差が見られた ($P = 0.00009$)。

3) HTR4

Exon 領域のアミノ酸置換を来さない多型 1 つと intron 領域の多型 6 つを同定した。頻度の高い 4 つの SNPs を用いて LD mapping を行った結果、 $D' = 1$ であり、ひとつの連鎖平衡ブロックを形成していることが確認できた。したがって、tag SNPs として branch site に位置する d-25T>C を用いた関連解析で、有意な関連が検出された ($p=0.011$, odds ratio 1.33)。

4) HTR7

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。

b) HTR1A, 1B

HTR1A について、早朝覚醒 (+: 86 名 - : 65 名)、気分日内変動 (+: 53 名 - : 32 名 データ欠損 66 名) いずれとの間にも有意な関連が認められなかった。HTR1B と早朝覚醒との間には有意な関連は認められなかったが、気分日内変動との関連は marginally significant であった (rs20000292 $p=0.059$ (allele))。

D. 考察と結論

本研究の結果はより、以下の結論を得た。1) 日本人における双極性障害の発症に、APH1B 遺伝子が関与していることが示唆された。本研究において有意な関連を示した SNP はアミノ酸置換を伴わない SNP であるが、exon 領域に近いイントロンに存在することから、この遺伝子の splicing に影響を与える可能性がある。

2) HTR4 上の tag SNP を選定して、双極性障害と有意な関連を示した。また、この関連は stratification の結果生じる見かけ上のもではなかった。この d-25T>C はランチサイトにあり、この変異がスプライシングバリエーション形成に影響を与え、その結果、双極性障害の発症に関与する可能性があると考えられる。

3) 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。

4) HTR1B と大うつ病性障害の気分日内変動との関連について marginally significant

であったが、サンプル数が少ないため $\alpha \cdot \beta$ error いずれの可能性もある。さらなるサンプルを用いた追試、およびこれらの遺伝子の機能解析が望まれる。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. -Ikeda M, Iwata N, Suzuki T, Kitajima T, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Inada T, Ozaki N: No association of haplotype-tagging SNPs in TRAR4 with schizophrenia in Japanese patients. *Schizophr Res* 2005
2. -Nishiyama T, Ikeda M, Iwata N, Suzuki T, Kitajima T, Yamanouchi Y, Sekine Y, Iyo M, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Sora I, Ujike H, Inada T, Furukawa T, Ozaki N: Haplotype association between GABAA receptor gamma2 subunit gene (GABRG2) and methamphetamine use disorder. *Pharmacogenomics J* 5 (2):89-95, 2005
3. -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
4. -Hakamata Y, Takahashi N, Ishihara R, Saito S, Ozaki N, Honjo S, Ono Y, Inada T: No association between monoamine oxidase A promoter polymorphism and personality traits in Japanese females. *Neurosci Lett* 389 (3):121-3, 2005
5. -Ikeda M, Iwata N, Kitajima T, Suzuki T, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Ozaki N: Positive Association of the Serotonin 5-HT(7) Receptor Gene with Schizophrenia in a Japanese Population. *Neuropsychopharmacology* 2005
6. -Iidaka T, Ozaki N, Matsumoto A, Nogawa J, Kinoshita Y, Suzuki T, Iwata N, Yamamoto Y, Okada T, Sadato N: A variant C178T in the regulatory region of the serotonin receptor gene HTR3A modulates neural activation in the human amygdala. *J Neurosci* 25 (27):6460-6, 2005
7. -Kinoshita Y, Suzuki T, Ikeda M, Kitajima T, Yamanouchi Y, Inada T, Yoneda H, Iwata N, Ozaki N: No association with the calcineurin A gamma subunit gene (PPP3CC) haplotype to Japanese schizophrenia. *J Neural Transm* 2005
8. -Ikeda M, Iwata N, Suzuki T, Kitajima T, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Sekine Y, Iyo M, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Sora I, Ujike H, Inada T, Ozaki N: Positive association of AKT1 haplotype to Japanese methamphetamine use disorder. *Int J Neuropsychopharmacol* 1-5, 2005
9. -Ikeda M, Iwata N, Suzuki T, Kitajima T, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Inada T, Ujike H, Ozaki N: Association Analysis of Chromosome 5 GABA(A) Receptor Cluster in Japanese Schizophrenia Patients. *Biol Psychiatry* 58 (6):440-5, 2005
10. -Ikeda M, Iwata N, Suzuki T, Kitajima T, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Ozaki N: No association of GSK3beta gene (GSK3B) with Japanese schizophrenia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2005
11. -Takano A, Uchiyama M, Kajimura N, Mishima K, Inoue Y, Kamei Y, Kitajima T, Shibui K, Katoh M, Watanabe T, Hashimoto-dani 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* 29 (10):1901-1909, 2004
12. -Ozaki N: Pharmacogenetics of antipsychotics. *Nagoya J Med Sci* 67 (1-2):1-7, 2004
13. -Okada M, Northup J, Ozaki N, Russell J, Linnoila M, Goldman D: Modification of Human 5-HT2C Receptor Function by Cys23Ser, an Abundant, Naturally Occurring Amino Acid Substitution. *Mol Psychiatry* 9 (1):55-64, 2004
14. -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
15. -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

16. -Hashimoto R, Yoshida M, Ozaki N, Yamanouchi Y, Iwata N, Suzuki T, Kitajima T, Tatsumi M, Kamijima K, Kunugi H: Association analysis of the -308G>A promoter polymorphism of the tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) gene in Japanese patients with schizophrenia. *J Neural Transm* 111 (2):217-21, 2004
17. -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
18. -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
19. -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
20. -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
21. -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
22. -Okada M, Goldman D, Linnoila M, Iwata N, Ozaki N, Northup JK: Comparison of G-Protein Selectivity of Human 5-HT2C and 5-HT1A Receptors. *Ann N Y Acad Sci* 1025 570-7, 2004
23. -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
24. -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
25. -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
26. -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
27. -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 34-8, 2004
28. -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
29. -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
30. -Kusunoki K, Kitajima T, Ozaki N: Does quazepam influence sleep and daytime activity in healthy adults? *Sleep and Biological Rhythms* 1 (2):171-172, 2003
31. -Yamanouchi Y, Iwata N, Suzuki T, Kitajima T, Ikeda M, Ozaki N: Effect of DRD2, 5-HT2A, and COMT genes on antipsychotic response to risperidone. *Pharmacogenomics J* 3 (6):356-361, 2003
32. -Ujike H, Harano M, Inada T, Yamada M, Komiyama T, Sekine Y, Sora I, Iyo M, Katsu T, Nomura A, Nakata K, Ozaki N: Nine- or fewer repeat alleles in VNTR polymorphism of the dopamine transporter gene is a strong risk factor for prolonged methamphetamine psychosis. *Pharmacogenomics J* 3 (4):242-247, 2003
33. -Ozaki N, Goldman D, Kaye WH, Plotnicov K, Greenberg BD, Lappalainen J, Rudnick G, Murphy DL: Serotonin transporter missense mutation associated with a complex neuropsychiatric phenotype. *Mol Psychiatry* 8 (11):933-936, 2003
34. -Noda M, Yasuda S, Okada M, Higashida H, Shimada A, Iwata N, Ozaki N, Nishikawa K, Shirasawa S, Uchida M, Aoki S, Wada K: Recombinant human serotonin 5A receptors stably expressed in C6 glioma cells couple to multiple signal transduction pathways. *J Neurochem* 84 (2):222-232, 2003
35. -Okada M, Irie S, Sawada M, Urae R, Urae A, Iwata N, Ozaki N, Akazawa K, Nakanishi H: Pepstatin A induces extracellular acidification distinct from aspartic protease inhibition in microglial cell lines. *Glia* 43 (2):167-174, 2003
36. -Suzuki T, Iwata N, Kitamura Y, Kitajima T, Yamanouchi Y, Ikeda M, Nishiyama T, Kamatani N, Ozaki N: Association of a haplotype in the serotonin 5-HT4 receptor gene (HTR4) with Japanese schizophrenia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 121 (1):7-13, 2003

H. 知的財産権の出願。登録状況

双極性感情障害、統合失調症等の精神病性障害の予防・治療剤、そのスクリーン具方法、及び該疾患の発症リスクの判定方法：特願2005-150215、出願中

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メイド治療法開発に
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：

ほ乳動物の生体時計を構成する要素の一つであり、PER 蛋白などの時計蛋白をリン酸化し、その安定性や細胞内局在をコントロールする casein kinase I epsilon (CK1ε) 遺伝子の多型解析を行い、睡眠相後退症候群 (DSPS)、非 24 時間睡眠覚醒症候群 (N-24) の発症抑制因子である S408N 多型を発見した。その機能解析を他施設と共同で行ったところ、S408N 多型によりリン酸化酵素活性が上昇することを見出した。この酵素活性の上昇が、概日リズム障害発症に対する抑制作用を生起させると考えられた。この多型を導入したモデルマウスを作成するため、targeting vector を作成した。

時計遺伝子である *Period2* (*Per2*) 遺伝子の全エクソンを対象に遺伝子多型解析を進め、非 24 時間睡眠覚醒症候群のうち 1 例のみが保有し、睡眠相後退症候群や健常対象者には認められない遺伝子変異を見つけた。

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。

遺伝子変異を導入したメラトニン受容体遺伝子を発現する細胞株を樹立した。

A. 研究目的

睡眠は、体内時計に支配される概日リズム性の要素と、覚醒が続くと疲労が蓄積し、眠ると疲労が解消するという恒常性維持機構との相互作用に制御されていると考えられている。このうち概日リズム性の要素を調べ、その異常が睡眠に与える影響を明らかにし、より良い睡眠ととる方策を立てる材料を提供するのがこの研究の目的である。

すでに家族性睡眠相前進症候群 (ASPS) の一家系では、時計遺伝子である *Per2* 遺伝子の S662G 変異が発症原因になることが発見されている。また、散発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 多型であることを我々がすでに報告した。

Per2 遺伝子の S662G 変異は Casein kinase I epsilon (CK1ε) による PER2 蛋白のリン酸化を低下させることが判明している。

また、*Per3* 遺伝子の 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 蛋白を含む時計蛋白は、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。従って上記の遺伝子変異・多型により時計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。

Per2 遺伝子でも概日リズム睡眠障害発症にかかわる可能性のある変異を検索した。

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

対象:

1. ゲノム DNA サンプル

睡眠相後退症候群 (Delayed sleep phase syndrome: DSPS) 患者 106 名、非 24 時間睡眠覚醒症候群 (Non-24-hour sleep-wake syndrome: N-24) 患者 40 名及び 140 名の健康被験者から静脈血を採取し、ゲノム DNA を抽出した。ヒューマンサイエンス研究資源バンクから 400 例の一般日本人集団のゲノム DNA を購入し、コントロールサンプルとして使用した。

2. 遺伝子多型解析

CK1ε 遺伝子、*Per2* 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 PCR-SSCP (Polymerase chain reaction/single strand conformation polymorphism) 法や denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) 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特定した。

酵素活性の解析:

1. 組み換え蛋白の精製

マウス PER1、ラット PER2、マウス PER3 の、CK1ε 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 CK1ε 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 CK1ε 遺伝子を発現ベクター pGEX4T-3 (α-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-CK1ε-WT, GST-CK1ε-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-CK1ε 蛋白は分解しやすいため、α-casein を使った酵素の反応速度の測定には、ラット CK1ε 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-CK1ε 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 CK1ε 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。

2. *In vitro* での酵素活性・反応速度の測定

酵素活性の測定は [γ - 32 P]、及び α-casein または GST-PER を含む 20 μL の反応バッファー中で、40 ng の GST-CK1ε 蛋白 (α-casein 使用時)、2 pmol のラット CK1ε 蛋白 (GST-mPER1, rPER2 使用時)、または 10 pmol のラット CK1ε 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 α-casein、または 20 pmol の GST-mPER1, GST-rPER2, GST-mPER3 を基質にした。α-casein に対する反応は 37°C で 10 分間行われた。反応は 20 μL の SDS-PAGE sample buffer 添加で停止し、反応液の一部は 12% (α-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。

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：

1. 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)。

2. Rat-1 細胞の培養

Rat-1 細胞は 10% FBS 入りの DMEM 溶液中で、5% CO₂ 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变化を数日間にわたって測定した。

ヒトメラトニン 1A 受容体発現細胞の樹立：

野生型及び R54W 変異を導入したヒトメラトニン 1A 受容体遺伝子を Neomycin 耐性遺伝子を持つ発現ベクター pcDNA3.1 に挿入し、Chinese Hamster Ovary cell に導入した。Neomycin 0.8mg/mL を含む培地で細胞を培養し、恒久的に導入遺伝子を発現している細胞株を単離した。細胞株の樹立は名古屋大学精神科尾崎紀夫教授、藤田保健衛生大学精神科山之内芳雄博士、岩田仲生助教授との共同研究で行われた。

時計遺伝子多型を導入したマウスの樹立

1. Targeting vector の作成

C57BL/6J 系雌マウス由来の BAC clone RP23-120A4 を Children's Hospital Oakland

Research Institute (CHORI, USA) から購入し、以下に述べる手順で pBlueScriptKS+ (pBS) に挿入し、Neomycin 耐性遺伝子やヒトの S408N 多型に相当する遺伝子多型を導入した。

まず、pBS を制限酵素 EcoRV と PstI で切断し、ベクター部分をアガロースゲルで電気泳動して QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) を用いて抽出してから 2 本鎖 DNA (attaattaagaattctgatcactgca と gtgatcagaattcttaattaagat をアニールさせたもの) を DNA Ligation Kit Ver. 2.1 (Takara) で挿入し、PacI/EcoRI/BclI の各制限酵素切断部位を持つベクターを作成した (pBS-PacEcoBcl)。そのベクターを SalI で切断してから DNA 末端を DNA Blunting Kit (Takara) で平滑にして結合させ、SalI 切断部位を消した (pBS-PacEcoBcl-SalX)。

RP23-120A4 は DH10B electrocompetent cells で増幅してから QIAGEN Large-Construct Kit (Qiagen) で精製した。RP23-120A4 及び pBS-PacEcoBcl-SalX を KpnI, SpeI で切断し、アガロースゲルで電気泳動してからそれぞれ 7.1 kbps, 3 kbps の DNA 断片を抽出した後、結合させた (120A4/KpnI, SpeI in pBS)。120A4/KpnI, SpeI in pBS と pBS-PacEcoBcl-SalX を大腸菌株 SCS110 Competent Cells (Stratagene) で増幅して dam/dcm メチル化を欠く DNA を作成してから精製し、メチル化感受性酵素 BclI で切断できるようにした。次に 120A4/KpnI, SpeI in pBS を BclI で、pBS-PacEcoBcl-SalX を BclI/BamHI で切断し、それぞれ 3.9 kbps, 3.0 kbps の断片を抽出し、互いに結合させた (120A4/BclI in pBS)。120A4/BclI in pBS と RP23-120A4 を PacI で切断し、それぞれ 4.5 kbps, 10.7 kbps の断片を抽出した (120A4/BclI in pBS/PacI, RP23-120A4/PacI)。120A4/BclI in pBS/PacI を Alkaline Phosphatase (BAP) で脱リン酸化し、RP23-120A4/PacI と結合させた

(120A4/Bcl1+Pac1 in pBS)。120A4/Bcl1+Pac1 in pBS を SCS110 Competent Cells で増幅し、dam/dcm メチル化を欠く DNA を作成し、Bcl1 で切断し、脱リン酸化処理した (120A4/Bcl1+Pac1 in pBS/Bcl1, BAP)。

理研から分与された LoxP/PGK-Neo-pA/loxP (PGK プロモーターに制御された Neomycin 耐性遺伝子を、loxP 配列ではさんだもの) を Mlu1/Not1 で切断し、末端を平滑化してから Bgl2 リンカー、Bcl1 リンカーをそれぞれの端に結合させ、120A4/Bcl1+Pac1 in pBS/Bcl1, BAP と結合させた (loxP-Neo-120A4)。

次に、loxP-Neo-120A4 を Sac2 で切断し、脱リン酸化した (loxP-Neo-120A4/Sac2, BAP)。また、理研から分与された pMCDT-A-cassetteA (MC1 プロモーターに制御された Diphtheria toxin-A fragment) を Xho1, Sal1 で切断し、平滑化してから Sac2 リンカーを結合させ、loxP-Neo-120A4/Sac2, BAP に挿入し、野生型 (S408) アリル導入用 targeting vector (loxP-Neo-120A4-DT-S408) を作成した。

pBS-PacEcoBcl を SCS110 Competent Cells で増幅し、Bcl1/Sal1 で切断した。120A4/Bcl1+Pac1 in pBS も Bcl1/Sal1 で切断した。それぞれベクター、1.4 kbps の断片を抽出し、結合させた (120A4/Bcl1, Sal1)。120A4/Bcl1, Sal1 を Af12 で切断して脱リン酸化処理してから電気泳動し、3.7 kbps の DNA 断片を抽出した (120A4/Bcl1, Sal1/Af12)。RP23-120A4 を鋳型としてヒトの S408N 多型に相当する多型を導入したプライマーで PCR 増幅し、S408N 多型を持つ DNA 断片を作成した。その DNA 断片を Af12 で切断し、660 bps の断片を抽出し、120A4/Bcl1, Sal1/Af12 と結合させた (120A4/Bcl1, Sal1-N408)。

loxP-Neo-120A4-DT, 120A4/Bcl1, Sal1-N408 を SCS110 Competent Cells で増幅し、Bcl1/Sal1 で切断してからそれぞれ 16.7 kbps, 1.4 kbps の DNA 断片を抽

出し、その断片同志を結合させ、変異型 (N408) アリル導入用 targeting vector (loxP-Neo-120A4-DT-N408) を作成した。

2. Control vector の作成

pBS, RP23-120A4 を Sal1/Kpn1 で切断し、それぞれ 3kbps, 3.2 kbps の断片を抽出した。その2つを結合させ、増幅し、精製してから Sal1/Kpn1 で切断し、3.2 kbps の断片を抽出した (120A4/Sal, Kpn)。

loxP-Neo-120A4 を Aat2/Cla1 で切断し、平滑化して結合させた。次に Kpn1 で切断して平滑化し、自己結合させて Kpn1 切断部位を消した。Sac2 で切断し、平滑化して脱リン酸化してから Kpn1 リンカーを結合させた。Kpn1/Sal1 で切断して 10.4 kbps の断片を抽出し、120A4/Sal, Kpn と結合させて Control vector とした。

3. PCR の確認

Neomycin 耐性遺伝子の配列に対応したプライマー 5組と、マウス CK1e に特異的な配列 5組とをそれぞれ組み合わせ、鋳型とする control vector をマウスのゲノム DNA 存在下でも増幅できる組み合わせを検討した。DNA polymerase には LA-Taq DNA polymerase (Takara) を使い、control vector を 0, 0.5 fg, 1 fg, 5 fg, 10 fg 加えて PCR 反応を行った。その結果、control vector が 0.5 fg でも良好に増幅できる条件が見出された。

(倫理面への配慮)

本研究は参加各施設の倫理委員会の承認を受けており、被験者には研究内容・研究対象となることを断ってもその患者の不利にならないこと、いったん同意してもいつでも断れることなどをよく説明し、文書による承諾を得ている。研究対象者の個人情報には厳密に守られている。患者に与える苦痛は採血時の疼痛であるが、なるべく少なくするよう注意している。「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」

(平成 16 年 12 月 28 日改訂)を遵守している。

C. 研究成果

1. CK1ε 遺伝子多型解析

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 CK1δ/ε 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較したところ $P=0.0067$, オッズ比=0.42 と高い有意差が示され、N408 アリルの存在と概日リズム障害の発症とは逆相関の関係にあると考えられた。

次に、S408N 多型と酵素活性との関係を調べた。野生型および S408N 多型を導入した CK1ε を GST と融合させて大腸菌で発現させて精製し、 α -casein を基質にしてその酵素活性を *in vitro* で測定した。予測通り、S408N 多型を導入した CK1ε は野生型に比べ、約 1.8 倍の高い酵素活性を示した (図 2)。また、時計蛋白 PER1, PER2, PER3 に対する酵素活性を調べたところ、やはり S408N 多型を導入した CK1ε の方が高い酵素活性を示した (図 3)。

2. Per2 遺伝子多型解析遺伝子

Per2 遺伝子の全翻訳領域を含む 23 エクソンについて多型解析を行ない、ミスセンス多型 6 個を含む計 15 個の遺伝子多型を見出した。その多型を対象に全被験者を対象に頻度を調べたが、健常被験者と疾患群との間で頻度に有意差があるものは見出されなかった。

しかし、ミスセンス多型のうち 2 個は N-24 患者のそれぞれ一例のみから見出され、DSPS 群や control 群からは見出されなかった。このミスセンス多型のうち一つはほとんどの脊椎動物の PER1/2/3 蛋白間で保存されているアミノ酸の変化をもたらし、また、PER2 蛋白の機能領域のすぐ近傍に存在した。そこで、ヒューマンサイエンス研究資源バンクから購入した 400 例の一般日本人集団のゲノム DNA を対象に上記 2 個のミスセンス多型の有無を検索したところ、2 つの変異のうち 1 つは 400 例のうち 1 例のみが保有していたが、他の一つは 400 例の中に保有者は全く見出されなかった。

3. 培養細胞を用いた体内時計機能の測定システム

生体時計は視床下部の視交叉上核などの中枢のみならず、末梢組織や培養細胞にも存在することが判明してきた。末梢組織や培養細胞では持続的に自律性リズムを生み出すことはできないが、刺激を加えると時計遺伝子の発現量が数日間ほぼ 24 時間周期で増減を繰り返すなど、一過性に概日リズムを生み出す。また、

時計遺伝子の変異マウスでは、行動リズムに異常を生じると同時に、そのマウスから得られた繊維芽細胞を培養して刺激を加えた場合、その細胞内での時計遺伝子の発現リズム周期も、行動リズムの異常と平行して変化を生じる。従って、培養細胞（末梢時計）を用いて中枢にある体内時計（中枢時計）の異常を調べることが可能である。そこで我々は、既に Dexamethasone 刺激により概日リズム周期を観察できることが知られている Rat-1 細胞を用いて体内時計の異常を調べる系を樹立した。Rat-1 細胞の体内時計機能を観察するため、1,000,000 個の Rat-1 細胞を 35 mm ディッシュにまいた 24 時間後、レポータープラスミド pGL3-Bmal1P-PEST を導入し、48 時間後に 0.1 μ M の Dexamethasone で 2 時間刺激し、発光量の変化を測定した。

その結果、ほぼ一定の 24 時間周期で発光量が増減するのが観察された（図 4）。従って、このシステムにより体内時計機能を調べることができることが示された。

4. 時計遺伝子多型を導入したマウスの作成

マウスに CK1 ϵ 遺伝子の S408N 多型を導入するために用いる targeting vector、及び targeting vector が相同組換えによりマウスゲノムに挿入されたか否かを調べるための PCR の条件設定をするための control vector の作成を終了した（図 5）。また、control vector を用いて、PCR 条件の設定を行った。

5. 多型を導入したメラトニン受容体を発現する細胞株の樹立

また、我々はメラトニン 1A 受容体遺伝子の多型解析を行い、概日リズム障害患者で多く見られ（有意差には至らず）、受容体の発現量やメラトニンとの結合性を変化させる R54W 変異を見出し、その多型により Gi, Gq 蛋白との結合性が変化することを見出していたが、さらに R54W 変異が細胞内刺激伝達系に与える影響

を探るため、藤田保健衛生大学、名古屋大学と共同で、R54W 変異を持つメラトニン 1A 受容体遺伝子が恒久的に発現する培養細胞（Chinese hamster ovary cell）を樹立した。今後、細胞内刺激伝達系に生じる変化を詳細に調べていく予定である。

D. 考察

1. CK1 ϵ の S408N 多型

CK1 ϵ は、最も近い構造を持つ CK1 δ と共に、自己リン酸化を受けると酵素活性が変化する。

In vitro では CK1 ϵ は高度に自己リン酸化されており、酵素活性の発現が阻害されている。Phosphatase による脱リン酸化や、自己リン酸化を受ける C 末端近くの配列の除去により、酵素活性は上昇する。S408 を含む C 末端近くの 8 個のアミノ酸が自己リン酸化を受けると標的部位ではないかと推測されている。従って 408 番目の serine が asparagine に変わる S408N 多型は自己リン酸化部位の一つを消失させ、酵素活性の一部を再活性化すると予測された。実際、自己リン酸化部位と推測される全 8 個のアミノ酸すべてを置換した CK1 ϵ では、野生型 CK1 ϵ と比較して酵素活性が約 8 倍と大きく増加することが報告されているが、S408N 多型のみを導入した GST-CK1 ϵ を使った我々の実験では、約 1.8 倍と中等度の酵素活性の増加が認められた。

また、CK1 ϵ の S408N 多型は、時計蛋白である PER1, PER2, PER3 蛋白のいずれにたいしても野生型 CK1 ϵ と比較して高い酵素活性を示した。その中で、特に PER3 蛋白に対する酵素活性が最も大きく変化していた（図 3）。PER3 蛋白のリン酸化に変化を生じると予測される多型が DSPS 発症の危険因子であることを考えると大変興味深い。PER3 蛋白が十分にリン酸化されるには PER1 蛋白の並存が必要との報告もあり、その解釈には注意が必要である。我々の見出した CK1 ϵ の多型が生体時計機構に直接作

用し、概日リズム障害の発症に影響することが裏付けられた。

ハムスターのCK1ε 遺伝子に *tau* 変異があると酵素活性は約 8 分の一へと大きく減少し、半優性遺伝する概日リズム周期の短縮を招く。一方で今回我々が見出した S408N 多型による酵素活性の増加は約 1.8 倍に過ぎず、そのため、概日リズム障害の発症率が約半分になるという、有意ではあるがより軽度の表現型の変化をもたらすのではないかと思われる。また、この多型は正常被験者の約五人に一人の割合で認められたことから、健常人の間での概日リズムの個体差にも関わっている可能性がある。今後更に詳細な解析が望まれる。

また、CK1ε 遺伝子の S408N 多型を導入したマウスを樹立するため、遺伝子多型導入用ベクターを樹立した。今後、他施設と共同で S408N 多型を持つマウスを作成し、この多型が概日リズムに及ぼす影響を調べる予定である。

Per2 遺伝子の全エクソンにわたって遺伝子変異解析を進めたが、概日リズム睡眠障害の多くの発症にかかわっている多型は見出されなかった。しかし、DSPS 106 例、N-24 40 例、健常被験者 140 例の中で N-24 の一例のみに見出された変異が 2 個見つかった。うち 1 個は 400 名の一般人口に検索対象を広げても多に保有者が見出せなかった。この変異は、PER2 蛋白の機能領域のすぐ近傍にあり、各脊椎動物間でよく保存されているアミノ酸の変化をもたらす多型だった。従って頻度は稀だが、概日リズム睡眠障害の発症に関わっている可能性があり、更なる解析が必要である。現在、当該多型を持つ *Per2* 遺伝子を培養細胞で発現させ、機能変化が生じているか確認中である。

メラトニン 1A 受容体遺伝子の R54W 多型については、cDNA を培養細胞に一過性に発現させた実験系を用いて受容体の発現量、リガンドとの親和性、G 蛋白との結合性など受容体の様々な性質を変化させることを突き止めてい

た。しかしこの系では細胞内刺激伝達系に与える影響を調べることは困難だったが、他施設と共同で多型を持つ受容体を恒久的に発現する培養細胞株を樹立し得たので、どのような細胞内刺激伝達系の変化が、概日リズムに変化をもたらすか詳細に解析することが可能となった。

Rat-1 細胞は既に Dexamethasone 刺激等により数日間、概日リズム周期を示すことが報告されているが、今回の結果もそれを確認するものとなった。このことは、Rat-1 細胞を使って、簡便に体内時計機能を調べることができることを示している。現在、ヒト由来の培養細胞で同様の現象を示すものがないか調べている。ヒトの体内時計機能を簡便に調べられるシステムの開発へと結びつける予定である。

このような多型の検出、機能解析の積み重ねにより、概日リズム周期の個体差をもたらす遺伝子要因が明らかになり、個人の体質にあった生活パターン、就労パターンの樹立が可能になっていくと思われる。

この研究は以下の研究者の協力を得て行われた。

埼玉医科大学精神医学教室；豊嶋良一、山内俊雄

国立精神神経センター；高橋清久

同・精神保健研究所；内山真、渋井佳代

同・国府台病院；亀井雄一

同・武蔵病院；梶村尚史、加藤昌明、渡辺剛、堀達

滋賀医科大学精神医学教室；尾関祐二、山田尚登、大川匡子

名古屋大学医学部精神医学教室；尾崎紀夫

藤田保健衛生大学精神医学教室；北島剛司

財団法人神経研究所；井上雄一

秋田大学精神医学教室；三島和夫

杏林大学医学部精神科；中島亨

大阪大学蛋白質研究所；高野敦子、橋本谷祐輝、磯島康史、永井克也

(順不同)

E. 結論

我々は、CK1ε から、概日リズム障害発症の防御因子と考えられる新たな多型 S408N を見出した。S408N 多型は CK1ε の自己リン酸化の低下を通じて酵素活性の上昇をもたらし、これが概日リズムの発症を抑えるのではないかと考えられた。

Per2 遺伝子から、稀だが概日リズム睡眠障害の発症に深く関与している可能性がある遺伝子変異を見出した。今後機能解析を行う予定である。

また、概日リズム発症の抑制因子である CK1ε 遺伝子の S408N 多型を導入したマウスを作成するためのベクターを構築し終えた。

体内時計の異常を簡便に詳しく調べる系を Rat-1 細胞を用いて確立した。今後、ヒトの体内時計異常を調べることのできるシステムへと発展させる予定である。

R54W 変異を持つヒトメラトニン 1A 受容体を恒久的に発現する培養細胞株を樹立した。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Satoh K, Mishima K, Inoue Y, Ebisawa T, Shimizu T. Two pedigrees of familial advanced sleep phase syndrome in Japan. *Sleep*, 26, 416-417, 2003.
- 2) 海老澤尚, hPer1 遺伝子 (「KEYWORD 精神第3版」樋口輝彦、神庭重信、染谷俊幸、宮岡等編集)、156-157、先端医学社、東京、2003.
- 3) 海老澤尚、オレキシンノックアウトマウス (「KEYWORD 精神第3版」樋口輝彦、神庭重信、染谷俊幸、宮岡等編集)、158-159、先端医学社、東京、2003.
- 4) 海老澤尚、メラトニン受容体 (「KEYWORD 精神第3版」樋口輝彦、神庭重信、染谷俊幸、宮岡等編集)、226-227、先端医学社、東京、2003.
- 5) 海老澤尚、体内時計機構の分子医学、*Molecular Medicine*, 40(3), 318-325, 2003.
- 6) 海老澤尚、概日リズムと睡眠障害- 時計遺伝子からみた睡眠障害、*医学のあゆみ*、204(11), 799-802, 2003.
- 7) Takano A, Uchiyama U, 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, and 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, 1901-1909, 2004.
- 8) 海老澤尚、医療従事者に対するケア-精神的ケア (「呼吸器研修医ノート」萩原弘一編集)、192-193、診断と治療社、東京、2004.
- 9) 海老澤尚、ヒトの時計遺伝子変異と疾患 (「時計遺伝子の分子生物学」岡村均、深田吉孝編集)、177-184、シュプリンガー・フェアラーク東京、東京、2004.
- 10) 海老澤尚、メラトニン受容体の分子生物学 (「メラトニン研究の最近の進歩」三池輝久、山寺博史監修、メラトニン研究会 編)、35-44、星和書店、東京、2004.
- 11) 海老澤尚、遺伝子からみた睡眠障害 (「睡眠障害」樋口輝彦、不安・抑うつ臨床研究会編著)、117-130、日本評論社、東京、2004.
- 12) 海老澤尚、睡眠覚醒リズム障害関連遺伝子と時間医学、*分子精神医学*、4(2)、14-20(126-132)、2004.
- 13) 海老澤尚、パイオインフォマティクスによる概日時計の分子機構の解明、*現代医療*、36 (5)、

- 135-140(1129-1134)、2004.
- 14) 海老澤尚、ヒト体内時計の分子機構、*Current Therapy*、22(7)、84-85、2004.
 - 15) 海老澤尚、睡眠障害と遺伝子、*Modern Physician*、25(1)、41-46、2005.
 - 16) 海老澤尚、概日リズム睡眠障害の分子生物学、*医学のあゆみ*、215(3)、196-200、2005.
 - 17) 海老澤尚、ナルコレプシーと自己免疫、*精神科*、7(6)、539-543、2005.
 - 18) 海老澤尚、睡眠障害・リズム障害の遺伝子、*メディカル・サイエンス・ダイジェスト*、32(2)、26-29、2006.
 - 19) 海老澤尚、時計遺伝子、*呼吸*、25(2)、132-136、2006.
 - 20) 海老澤尚、ゲノム医学とリズム異常—時計遺伝子多型はヒトに何をもちたすか、*医学のあゆみ*、216(3)、233-237、2006.
 - 21) 海老澤尚、ヒトの睡眠障害と時計タンパク質のリン酸化異常、*実験医学*、24(4)、479-483、2006.
- ## 2. 学会発表
- 1) 海老澤尚、内山真、高野敦子、梶村尚史、亀井雄一、三島和夫、井上雄一、北島剛司、山田尚登、加藤昌明、渋谷佳代、尾関祐二、長尾真理子、渡辺剛、金圭子、中島亨、工藤吉尚、堀達、磯島康史、豊嶋良一、尾崎紀夫、大川匡子、永井克也、高橋清久、山内俊雄(2003年4月17日) 睡眠覚醒リズム障害における Casein kinase 1 epsilon 遺伝子の多型、第25回日本生物学的精神医学会、金沢
 - 2) 海老澤尚、睡眠障害の基礎と臨床、第158回あさひセミナー、東京、2003年6月12日.
 - 3) Ebisawa T. Clock-gene variations and delayed sleep phase syndrome/non-24-hour sleep-wake syndrome. 1st World Congress of Chronobiology, Sapporo, 2003.9.9 (シンポジスト、チェア).
 - 4) Satoh K, Mishima K, Inoue Y, Ebisawa T, Shimizu T, Two pedigrees of familial advanced sleep phase syndrome in Japan. 1st World Congress of Chronobiology, Sapporo, 2003.9.10.
 - 5) 海老澤尚、WAVEを用いたヒト時計遺伝子多型解析、第6回DHPLC技法(WAVE法)による最新の遺伝子変異の解析のセミナー、東京、2003年10月2日.
 - 6) Ebisawa T. Human circadian behavior and clock-gene polymorphisms. International Symposium on Molecular Clock Tokyo 2004, Tokyo, 2004.2.26-28. (シンポジスト)
 - 7) 海老澤尚、リチウムと体内時計、第24回リチウム研究会、東京、2004年4月24日(教育講演).
 - 8) 海老澤尚、概日リズム睡眠障害と時計遺伝子、第29回日本睡眠学会学術集会シンポジウム「概日リズムと疾患」、東京、2004年7月1日.
 - 9) Takano A, Uchiyama U, Kajimura N, Mishima K, Inoue Y, Kamei Y, Kitajima T, Shibui K, Katoh M, Watanabe T, Hashimoto-dani 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. Sequence variations in human casein kinase epsilon gene and circadian rhythm sleep disorders. XIIth World Congress on Psychiatric Genetics, Dublin, Ireland, 2004.10.9-10.13.
 - 10) 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、磯島康文、海老澤尚(2004年11月11-12日) ヒト Casein 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
 - 11) 海老澤尚、ヒトの睡眠と時計遺伝子、名古屋生物リズム研究会(名古屋大学教育研究改

革・改善プロジェクト～時間生物学に関する学際的研究の推進～)、愛知、2005年3月17日

12) Ebisawa T, Takano A, Uchiyama M, Kajimura N, Mishima K, Inoue Y, Ozaki N, Okawa M, Takahashi K, Isojima Y. Inverse association between S408N variation of human casein kinase epsilon gene and circadian rhythm sleep disorders. 19th Annual Associated Professional Sleep Societies Meeting, Denver, USA, 2005. 6. 18-23.

13) 海老澤尚、内山真、梶村尚史、三島和夫、井上雄一、亀井雄一、北島剛司、渋谷佳代、中島亨、尾関祐二、堀達、渡辺剛、加藤昌明、山田尚登、尾崎紀夫、大川匡子、豊嶋良一、高橋清久 (2005年6月30日) 概日リズム障害と *Per2* 遺伝子多型、日本睡眠学会第30回定期学術集会、宇都宮

14) 海老澤尚、内山真、梶村尚史、渋谷佳代、三島和夫、井上雄一、亀井雄一、北島剛司、尾崎紀夫、中島亨、尾関祐二、大川匡子、豊嶋良一、高橋清久(2005年7月7日)概日リズム睡眠障害と *Per2* 遺伝子多型、第27回日本生物学的精神医学会・第35回日本神経精神薬理学会合同年会、大阪

15) 海老澤尚、睡眠覚醒リズム障害の遺伝子解析、大阪大学蛋白質研究所セミナー「体内時計と体内恒常性維持機構」(講演)、大阪、2005年10月24日

16) 海老澤尚、ヒトの睡眠覚醒リズムと時計遺伝子、第12回日本時間生物学会ワークショップ「睡眠リズムと発達」、つくば、2005年11月25日

17) 海老澤尚、ヒトゲノム医学とリズム異常、第28回日本分子生物学会年会ワークショップ「生物時計の動きの分子機構：リズム研究に未来はあるか?」、福岡、2005年12月9日

18) 海老澤尚、ヒトの睡眠障害と時計遺伝子、第79回日本薬理学会年会シンポジウム「体内時計遺伝子が持つ多彩な機能—疾病発現から治療薬まで」、横浜、2006年3月10日

19) 海老澤尚、睡眠覚醒リズムと時計遺伝子、第83回日本生理学会大会シンポジウム、「The circadian timing system: from clock gene expression to physiology」、前橋、2006年3月28日

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

なし

図1. 各種脊椎動物 CK1ε のアミノ酸配列の比比較

*は自己リン酸化部位と推測されているアミノ酸
 矢印は S408N 多型の位置

			N ↑ * * *
Human	CK1ε	TGRQEVSRI PASQT(S)VPFDHLGK	
Hamster	CK1ε	TGRQEVSRI SASQTSVPFDHLGK	
Mouse	CK1ε	TGRQEVSRLAASQTSVPFDHLGK	
Rat	CK1ε	TGRQEVSRIAASQTSVPFDHLGK	
Chicken	CK1ε	TGRQEVSRI SASQTSVPFDHLGK	
Xenopus	CK1ε	TGRQEVSRI SASQASVPFDHLGK	
Human	CK1δ	TGRQDTSRMSTSQNSIPFEHHGK	
Mouse	CK1δ	TGRQDTSRMSTSQNSIPFEHHGK	
Zebrafish	CK1δ	TGRQDTSRMSTSQNSIPFDHHGK	

408

図2. α-casein を基質にした CK1ε 蛋白の酵素反応速度の比較

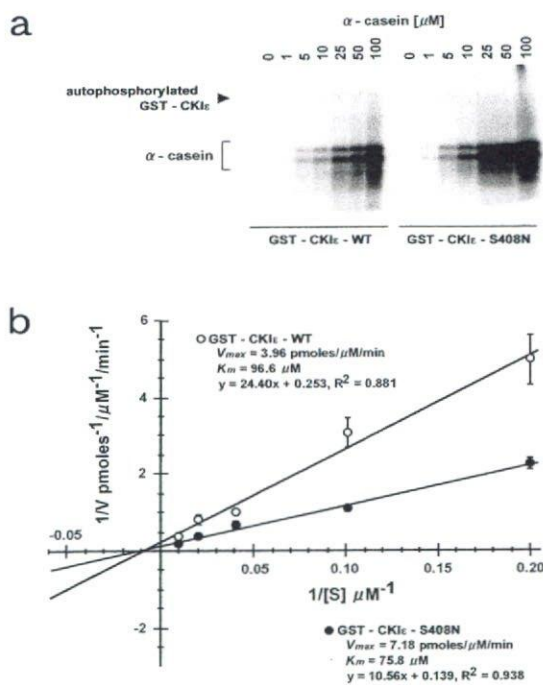


図3. PER 蛋白を基質にした、CK1ε蛋白の酵素活性の *in vitro* 測定

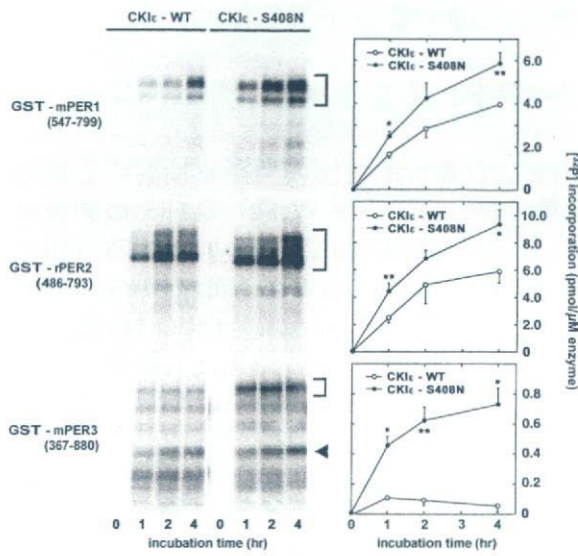


図4. ヒト Bmal1 プロモーターを連結させた luciferase による、Rat-1 細胞での生物発光量の変化

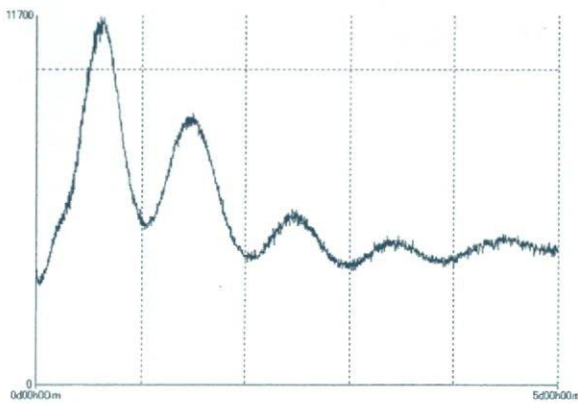
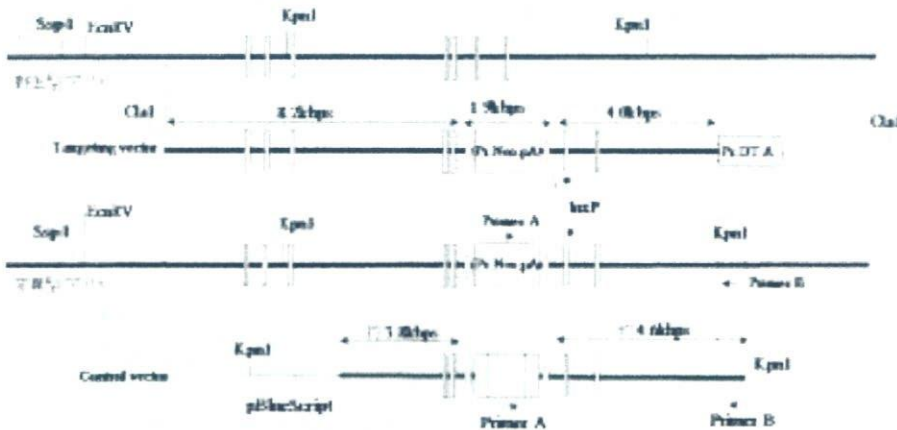


図5. Targeting vector, control vector の構造及び PCR プライマーの位置



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

ヒトの朝型夜型指向性を規定する要因に関する分子遺伝学的研究

分担研究者 三島和夫

秋田大学医学部 神経運動器学講座 精神科学分野 助教授

研究要旨 朝型夜型指向性に及ぼす遺伝的要因および環境的要因の関与を検討する目的で、第一次調査対象である健康成人 1030 人（平均年齢 36.0 歳，18 - 77 歳）及びその同居家族 784 名（平均年齢 43.4 歳，10 - 97 歳），計 1814 名（平均年齢 39.2 歳，M/F = 732/1082，有効回答回収率：85.7%）を対象として、Horne-Ostoberg スコア表、Pittsburg Sleep Quality Index、CES-D スケール（Center for Epidemiological Studies Depression Scale）を用いて朝型夜型指向性、睡眠状態、気分に関する質問紙調査を行った。その結果、入眠及び覚醒時刻に共通して強い影響を及ぼす要因として本人の日周指向性が抽出された。またそのほか、入眠時刻には本人の不眠傾向（強）と配偶者の入眠時刻（弱）が、覚醒時刻には本人の性別（弱）と配偶者の覚醒時刻（弱）が影響していた。年齢、交代勤務の有無、同居年数、寝室の共有、食事共有回数、配偶者の日周指向性は影響因子として抽出されなかった。夜型指向性の強いものは、総睡眠時間が短く、入眠困難があり、高い睡眠障害スコアを示した。同時に日中の眠気が強く、抑うつ傾向を示した。また、第一次調査対象となり解析が進んでいる 920 名を抽出して、Katzenberg ら（1998）により報告された朝型夜型指向性と *hClock*（*Homo sapiens clock homolog*）の 3' -flanking region に存在する 3111T/C 多型との関連について追試検討した。その結果、日本人集団においては 3111C homozygotes がその他の遺伝子型保有者に比較して Horne-Ostoberg の朝型夜型スコアが有意に低値であり、夜型指向性の感受性を増大させる可能性が示唆された。

A. 研究目的

ヒトの朝型夜型指向性は遺伝的要因と環境的要因の両者により規定されている。遺伝的側面については概日リズム睡眠障害の責任遺伝子に関する分子遺伝学的研究が精力的に行われてきた。これまでに睡眠相前進症候群や睡眠相後退症候群をメンデル型遺伝様式で発症する家系が幾つか報告されている。Johns らは 1999 年に睡眠相前進症候群を高浸透率の常染色体優性遺伝型式で発症する米国の三家系を報告した。その後の連鎖解析により、時計遺伝子である *hPer2*（*Homo sapiens period homolog 2*）の点突然変異がこれらの家系で認められた FASPS の原因である可能性が強く示唆された。実際、この家系の発症メンバーでは、極めて短い概日リズムのフリーラン周期（ τ ）が認められ、明暗サイクル下での睡眠の同調位相の極端な前進に寄与しているものと推測された。睡眠相後退症候群の疾患感受性を高める可能性のある遺伝子多型も報告されている。Ebisawa ら（2001）は、*hPer3*（*Homo sapiens period homolog 3*）のある SNP ハプロタイプが睡眠相後退症候群の罹患者において有意に不均衡連鎖をしていることを報告した。また、

Archer ら（2003）らは、やはり *hPer3* の Exon18 上にある繰り返し配列多型（4-repeat，5-repeat）のうち 4-repeat が睡眠相後退症候群の罹患者に有意に高率に認められると報告した。これらの報告では共通して、標的遺伝子の蛋白コード領域上に認められた突然変異や多型が Casein kinase I ϵ （CKI ϵ ）のリン酸化を修飾することが概日リズム睡眠障害の病因であると推定している。CKI ϵ は時計遺伝子蛋白のリン酸化を介して視交叉上核細胞内での translation-transcription feedback loop を律速するが、先に報告された遺伝子多型／遺伝子変異はリン酸化部位もしくはその近傍に位置することにより時計遺伝子のリン酸化の速度を変化させ、結果的に τ を修飾するとの仮説が提唱されている。 τ を変化させるような時計遺伝子の蛋白コード領域、プロモーター領域などに存在する遺伝子多型／遺伝子変異は、概日リズム睡眠障害以外にもさまざまな睡眠・覚醒リズムの表現型を取り得る。例えば、 τ の長短は朝型夜型指向性に有意に相関することが明らかにされている。すなわち、長い τ は夜型指向性の、短い τ は朝型指向性の生物学的基盤になるとされる。視点を変えれば、睡眠相前

進症候群や睡眠相後退症候群のような概日リズム睡眠障害に罹患者の少なくとも一部は、極端に強い朝型もしくは夜型指向性を引き起こす時計遺伝子機能の表現型を有する一群から構成されている可能性がある。時計遺伝子の一つである *hClock* (*Homo sapiens clock homolog*) の 3' -flanking region の多型が健常成人の夜型指向性に関連しているという報告がなされている。Katzenberg ら (1998) は、あるコホート研究の参加者 410 名を対象として、*hClock* の 3111C 保有者 (C/T, C/C) が 3111T/T 保有者に比較して、より強い夜型指向性を示すと報告した。しかしながら、Robilliard ら (2002) による追試では、3111T/C 遺伝子型と朝型夜型指向性との間に有意な相関を認めることはできなかった。相関研究にみられるこのような結果の食い違いはしばしば生じるが、その要因の一つに集団の階層化 population stratification effects がある。Katzenberg らの対象者の 95% は Caucasian であったが、その遺伝的背景の内訳は多岐にわたり、Germany, Great Britain, Scandinavia, Central Europe, South Europe 出身グループから構成されていた。彼らはそれぞれのグループについても 3111C 保有者と非保有者間で比較を行い 3111C 保有者で夜型指向性が強いと結論づけているが、各グループの対象者数は数十名の規模に留まり信頼性についてのさらなる検証が必要である。一方、Robilliard らの対象者の遺伝的背景についての情報は与えられていない。

我々は本研究班での課題として、集団の階層化のリスクが比較的強く抑えられる日本人を対象として、時計遺伝子およびその近傍に存在する遺伝子多型と朝型夜型指向性との相関研究を進めている。また、強い朝型指向性を遺伝的に引き継いでいる家系（もしくは睡眠相前進症候群を発症している家系）は極めて稀であると信じられているが、我々は、実はかなりの潜在群が一般人口中に存在し、睡眠維持障害などの睡眠障害リスクに晒されているものと推測している。そこで、調査対象者の中から強い朝型指向性を有している群を抽出したうえで、同群での表現型（睡眠覚醒特性）を評価するとともに、その遺伝的特徴を明らかにするための系統的な家族調査を進めることを目的とした。

一方、朝型夜型指向性は加齢・性差のほ

か、職業や同居家族などの環境要因の影響を受けることが示唆されている。就床起床時刻、食事時刻を含めた家庭内での生活習慣は家族構成員の睡眠及び朝型夜型指向性に影響を及ぼすと想像されるが、実際の影響度を調査した研究はこれまでほとんど行われていない。そこで本研究では、ヒトの朝型夜型指向性の形成における遺伝および環境要因の寄与を明らかにするため、健常一般成人（第一次調査対象者）及びその血縁および非血縁同居家族を対象として、朝型夜型指向性、睡眠状態、気分水準、生活同調因子の共有度に関する調査を行うとともに、第一次調査対象者からゲノム検索用の血液検体を採取した。なお、本研究は秋田大学医学部倫理委員会の審査を通過している。

B. 研究対象と方法

研究への同意が得られた第一次調査対象者 1030 人（平均年齢 36.0 歳，18 - 77 歳，M/F = 309/721）及びその同居家族 784 名（10 歳以上，平均年齢 43.4 歳，10 - 97 歳，M/F = 423/361），計 1814 名（平均年齢 39.2 歳，M/F = 732/1082，有効回答回収率：85.7%）を対象とした。調査項目は、朝型夜型指向性の指標として Horne 及び Ostoberg による Morningness- Eveningness Questionnaire (MEQ) を、睡眠状態評価の指標として Pittsburg Sleep Quality Index (PSQI) を、気分状態評価の指標として CES-D (Center for Epidemiological Studies Depression) スコアを用いた。第一次対象者からは末梢血を採取し、既存の方法で DNA を抽出し多型解析に供した。第二次調査対象者は第一次調査対象者の同居者である。同居者はいわゆる血縁関係者に限らず、食事、入浴などを含めた生活環境の少なくとも一部を共有しているものとし、同居年数、同居の形態、寝室の区別、睡眠覚醒の相互干渉の程度、食事を一緒にとる回数などについての質問項目を設けた。本研究は秋田大学医学部倫理委員会の承認を得て行った。研究の実施に際しては、研究の主旨と方法、遺伝子試料の取り扱い等に関して文書により説明し、書面による同意を得て行った。

C. 研究結果と考察

1) 本研究での対象者における MEQ スコアのヒストグラムを図 1 に示す。1814 名全体で

の ME スコアは平均 53.5 ± 0.24 (SEM) 点、
範囲 21 - 82 点の正規分布を示した。

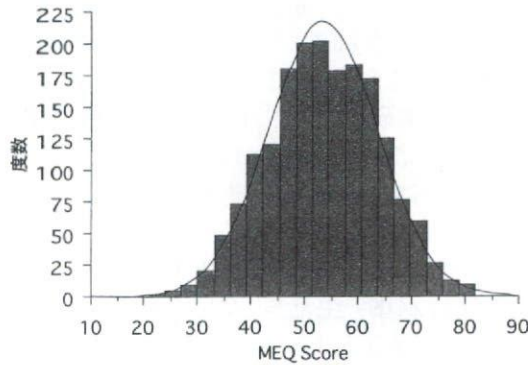


図 1: MEQ スコアの正規分布 (横軸がスコアを、縦軸が度数を示す)

2) 本研究での対象者においても MEQ の一般的な特徴である加齢に伴うスコアの増加が認められた ($r = 0.585$, $p < 0.0001$) (図 2)。

3) MEQ スコアと PSQI から算出した就床時刻 ($r = 0.649$, $p < 0.0001$; 図 3)、起床時刻 ($r = 0.538$, $p < 0.0001$; 図 4)との間にはそれぞれ有意な相関が認められた。このことは、今回の研究対象となった被験者の同調条件下での睡眠相を規定している概日リズム特性を予測するマーカーとして MEQ スコアが有用であることを示している。

ただし、MEQ スコアと起床時刻との相関は就床時刻とのそれに比較して弱かった。これは MEQ スコアが低得点の (すなわち夜型指向性の強い) 被験者の一部に極めて遅い起床時刻がみられたためである (図 4)。

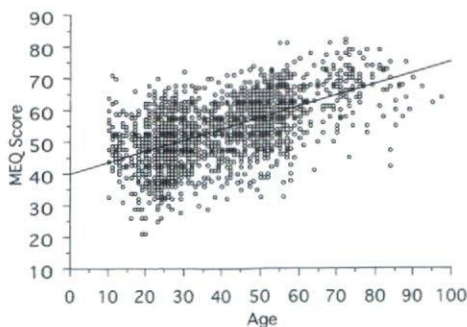


図 2: MEQ スコアと年齢との相関 (横軸が年齢を、縦軸がスコアを示す)

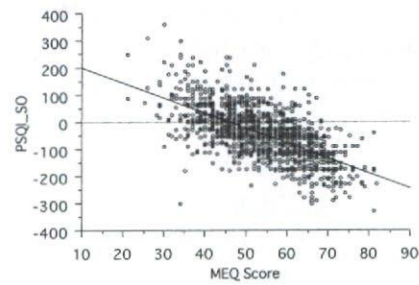


図 3: MEQ スコアと就床時刻との相関 (横軸がスコアを、縦軸が入眠時刻を示す。入眠時刻は午前 0 時を起点 0 分として算出した)

3) 各調査対象者の朝型夜型指向性 (MEQ スコア) を以下の基準に従って 5 グループに分類した。この際、加齢の影響を考慮して、図 2 で示した直線回帰式 $Y = 39.767 + 0.351 * X$ で年齢補正を行った (図 5)。

- Excessive Eveningness (EE) グループ : 16 点以上 30 点以下
- Eveningness (E) グループ : 31 点以上 41 点以下
- Neutral (N) グループ : 42 点以上 58 点以下
- Morningness (M) グループ : 59 点以上 69 点以下
- Excessive Morningness (MM) グループ : 70 点以上 86 点以下

これら朝型夜型指向性を有する各群における就床時刻、起床時刻を図 6 に示した。先に示したように、MM, M, N, E, EE 群と夜型指向性が強まるにつれて就床、起床時刻が遅れてゆくことが明瞭に示されている。

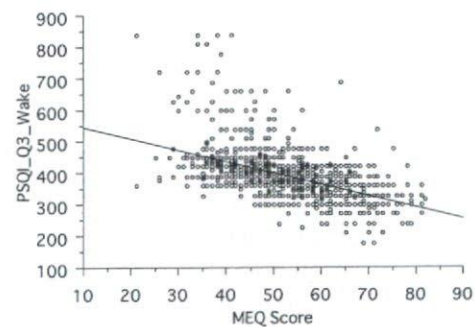


図 4: MEQ スコアと起床時刻との相関 (横軸がスコアを、縦軸が入眠時刻を示す。起床時刻は午前 0 時を起点 0 分として算出した)