

赤-緑色を感知するコーンオプシンの遺伝子は生後8日より (Bibb et al., 2001) 認められる。マントヒヒ早産児と同じように、マウス新生児に光刺激を与えた実験では、生後0日より視交叉上核 (生物時計) におけるc-fos遺伝子の発現が上昇し、マウスでは誕生日より明暗情報が脳に伝達することが明らかになっている (Leard et al., 1994; Weaver & Reppert, 1995; Hannibal & Fahrenkrug, 2004)。

ところが、メラノプシン遺伝子を取り除いたノックアウト・マウスでは、光刺激に対する視交叉上核のc-fos遺伝子発現の上昇は、生後15日まで確認できず、明暗情報の伝達が2週間遅れることが明らかになった (Sekaran et al., 2005)。生後2週間という時期はマウスのロドプシン・コーンオプシン機能が成熟する時期である。この結果から、マウスにおいては生後2週間まで脳への光伝達はメラノプシンのみが、生後2週間以降の光伝達には、ロドプシン・コーンオプシンが加わり処理されると推測される。

3 新生児期における知覚・認知システムにおける 新しい仮説：メラノプシン視覚システムの関与

未成熟な視覚機能にもかかわらず、生後1か月未満の新生児は周囲を取り巻く視覚環境によく反応している。実際、生後数日の赤ちゃんに接すると、時にはこちらの顔をよく見て、移動する顔の動きに合わせ、その小さな瞳を動かす場面に遭遇する。

この首を回転させながら大人の顔をとらえる追視行動だが、新生児の顔の正面で物体を動かすと、左右の振れが20~30度の範囲 (Salapatek, 1975)、奥行きが75cmの範囲で追視することがわかる (Braddick et al., 1979)。また、新生児は顔の形に似たパターンを好み (Goren et al., 1975; Johnson et al., 1991)、さらに見知らぬ顔よりも周囲の顔見知りの顔を好むことも確かめられている (Bushnell et al., 1989)。ところが、この顔認識の能力も完全ではなく、大人の髪型が変わってしまうだけで、同じ人物だと判断できなくなってしまう。これは新生児の顔認識の一般原則が対象物の輪郭の知覚に基づき、目・鼻・口といった顔の内部の特徴の知覚が十分でないために起こる現象である (Bushnell, 1982; Milewski, 1976)。ただこのルールには例外があり、顔の内部に舌を突き

出したり、口を開閉する動きを加えると、顔の内部の特徴にも新生児は注意を向けることができる (Bushnell, 1979)。

ここでひとつ問題提起をすると、これら新生児期に認められる視覚機能が、明暗情報を処理するメラノプシンを基礎としたシステムで処理されている可能性がある、ということである。動きに敏感な新生児期の視覚特性は、動きに伴って生じる背景の明暗情報の変化を知覚しているだけかもしれない。また、顔認識のルールが顔の輪郭の知覚になっている点も、顔とバックグラウンドの明暗コントラストで知覚処理が行なわれている可能性がある。しかし、新生児期の視覚機能がメラノプシンだけで構成される仮説を否定する例として、顔の中の動き (舌の突き出し、口の開閉) を新生児が真似る現象がある (Meltzoff & Moore, 1977)。新生児がメラノプシン機能のみを使い、影のコントラストから、舌・口といった顔の中のパーツの動きを認知することはむずかしく思える。以上のように考えると、メラノプシンが新生児の知覚・認知にかかわっている可能性を否定できないが、加えて白黒識別がメインのロドプシン、あるいは未熟なコーンオプシンを介した映像処理が同時に機能している可能性がある。

4 メラノプシンは早産児の発達にどのように影響するのか

早産児は少なくともメラノプシンを使って、明暗情報を脳で処理していると考えて良さそうだ。ヒト早産児の発達に与える光環境の影響を調べた代表的な研究として、明暗サイクルのある光環境と24時間明るい光環境 (恒明環境ともよばれる) の2つの環境で体重増加を比較した研究がある。

アメリカで行なわれた臨床研究では、明暗サイクルのある光環境で保育された早産児20名、恒明環境で保育された早産児21名が対象となった。その後の経過観察で、①体重増加、②ミルク投与が胃チューブから哺乳ビンに移行した時期、③核黄疸という神経症を予防するための光療法が必要だった期間、④人工呼吸器を使用した期間、といった点において明暗サイクルのある光環境で保育された早産児の方が、恒明環境の早産児より治療経過がよかったと報告されている (Miller et al., 1995)。同様の報告がイギリスからの臨床研究からも出ていて、明暗サイクルのある光環境で保育された早産児の方が、恒明環境の早産

児に比べ、睡眠時間が長く、体重増加がよかったと報告されている (Mann et al., 1986)。現在でも日本の早産児・新生児室では、恒明環境を光環境として選択している施設が多いのが現状である。赤ちゃんの発達を考えると、臨床研究で綿密な光条件の比較を行なった上で、明暗サイクルのある光環境の導入を検討する必要があるかもしれない。

恒明環境が生物時計 (視交叉上核) に与える影響を調べるために、マウス新生児を対象に私達が行なった実験によれば、新生児マウスの脳は、大人マウスの脳より光に対し感受性が高いことがわかっている (図11-5: カラー口絵参照)。出生当日より24時間明るい環境 (恒明環境) に3週間おかれた新生児マウスの生物時計は全例で不安定になり、明暗サイクルが存在する光環境では存在しない時計遺伝子の発現パターンが観察された。これに対し、大人マウスの生物時計を不安定にさせるためには、4か月という長期間、恒明環境に暴露する必要があった。加えて、大人マウスの生物時計が不安定になる割合は全体の10%のみで、恒明環境に抵抗性がある (Ohta et al., 2005)。これは、新生児マウスの生物時計が恒明環境ではほぼ100%不安定になるのに比べ対照的である (Ohta et al., 2006)。

この新生児期の光感受性の高さは、光刺激に対するメラノプシン反応の発達経過 (マウス) にも観察される。生後0-5日にかけて、メラノプシンを含有する網膜節細胞の数は増加し、その後しだいに大人レベルの密度に細胞数が減少する。また、光刺激に対する節細胞の反応をカルシウムイオン濃度の変化で評価した実験でも、生後0日の方が生後5日に比べ、反応性が高いことが示されている (Sekaran et al. 2005)。

新生児期の高い光感受性は、太陽光にコントロールされた出生直後からの明暗サイクルに体の生理メカニズムのリズムを同調させるという意味で、非常に重要な役割を担っているように思える。しかし、一方で光刺激に対する過度の暴露は、その高い感受性のために、新生児の発達に不利益な効果を与える可能性も残している。たとえば前述したように、恒明環境に暴露された早産児の体重増加が、明暗サイクルのある光環境で保育された早産児より悪いことが報告されている (Mann et al., 1986; Miller et al., 1995)。また、新生児突然死症候群は出生時体重1,000g以下の早産児で起こりやすく、光環境も含め保育器内の

不適切な人工環境が症候群の原因となっている可能性がある (Malloy & Hoffman, 1995)。

5 早産児・新生児の視覚研究が追求するテーマとして重要なものは何か？

生後の視覚環境は、体の成長スピードを決めるという生物学的な意味だけでなく、養育者の顔認識、それに続く母子間コミュニケーションという社会心理的な意味からも、発達初期の赤ちゃんの生存にとって重要な意味をもつ。赤ちゃんの視覚の発達が、明暗情報の処理（メラノプシン）から始まり、形・色を認識する映像情報の処理（ロドプシン・コーンオプシン）に移行していくことがわかった。しかし、その発達スピードは緩やかで、映像情報の処理に辿りつくのに生後5か月かかる。特に早産児では、明暗情報の処理を行なうメラノプシンのみが発達初期に働いている可能性が高く、早産児がもつ視覚の限界をサポートすることが、赤ちゃんの健やかな成長を達成するために重要だ。

早産児・新生児の成長を補助するという視点から、以下の3つが、赤ちゃんの視覚環境を考える上で重要なテーマである。

- ①早産児・新生児の発達と光環境の関係を明らかにすること：現在の知見では、メラノプシンを基礎とした生物時計は、ホルモン・神経伝達を介し、生後の光情報を体全体に伝達可能な唯一のメカニズムである。過去の臨床研究で指摘されたように、光環境は赤ちゃんの体重増加といった生後発達に影響する。このメカニズムを心理学・生物学・医学を通し明らかにし、赤ちゃんにとって最適な生後の視覚環境を見つけることが重要である。生物学（特に分子生物学）の弱点は、その実験技術の性質上、ほ乳類では対象がマウス・ラットに限られることが多く、ヒト・サルを対象とすることは通常倫理的に許されていない。この生物学の弱点を心理学の手法で補い、生物学で得られたマウスの知見を、効率よくヒトにフィードバックできる可能性がある。
- ②早産児の赤ちゃんと母親との愛着形成をサポートする情報提供を行なうこと：早産児は、妊娠40週で生まれた満期出産児に比べ、映像情報を扱うロドプシン・コーンオプシンが未熟で、養育者の顔認識が満期出産児と異なると

推測される。そのため、出生直後は養育者の視覚的な働きかけに対し早産児の反応は乏しく、その数週間後に周囲の視覚環境により敏感に反応する時期がやってくる。早産児においては、虐待児症候群の発生率が満期出産児に比べ高く (Leventhal et al., 1989; Stanton et al., 1994; DiScala et al., 2000; Kivlin et al., 2000), その原因の1つとして養育者が赤ちゃんへの愛着をスムーズに形成できない点が指摘されている。発達過程についての事前の情報提供が、反応の乏しい早産児のお子さんに対するご両親の理解をうながし、その後の適切な母子関係を育成する手助けになる可能性がある。視覚発達の科学的な記載・根拠を提示することは、早産児をもつ養育者の愛着形成をサポートする上で重要である。

- ③赤ちゃんの視覚・認知メカニズムにおけるメラノプシンの役割を明らかにすること：過去の研究において、新生児期の視覚メカニズムがロドプシン（網膜桿体細胞）の機能を中心に考察されてきた。しかし、最近の視覚研究により、そのメカニズムの一部は明暗情報の処理を主体とするメラノプシン（網膜節細胞）の機能で処理されている可能性が出てきた。ロドプシン・メラノプシンの2つの光受容体を基礎に、これまでの早産児・新生児の視覚メカニズムをとらえ直すことにより、視覚・認知研究に新たな展開・理論構築が生まれる可能性がある。たとえば、「メラノプシンは早産児の視覚認知にどのようにかかわっているのか」「初期のメラノプシンを基礎とした明暗情報処理の発達が、その後のロドプシン・コーンオプシンを中心とした映像情報処理の発達に影響するのか」といった疑問は赤ちゃんの視覚発達を考える上で興味深いテーマである。

触覚・嗅覚・聴覚・味覚といった他の知覚に比べ、赤ちゃんの視覚機能は出生時に未熟なため、生後環境の影響をより受けやすいといえる。特に保育器という人工環境で生後数週間も管理される早産児にとって視覚環境の整備の意義は大きく、多分野にわたるアカデミックな視覚研究が赤ちゃんのより健全な発達に直接つながることだろう。

37 光パルス

— Light Pulse

脊椎動物、無脊椎動物、植物を問わず多くの概日システムにおいて明暗サイクルは最も強力な概日時計の同調因子である。恒暗条件下において短時間の光処理を行い、概日時計の位相や振幅に与える影響を調べる実験を行う際のこの光処理は光パルスとよばれる。

概日時計に影響を与えるパルスを与えた概日時計の位相に対して、生じた位相変異の大きさをプロットした図は位相反応曲線 (phase response curve: PRC) とよばれ、概日時計の同調様式を検討するうえで重要である (図 1, 2)。主観的昼の光パルスはほとんど位相変異が起きないが、主観的夜の前半には位相の後退を、主観的夜の後半には位相前進を惹起する。光パルスに対する位相反応曲線の形はこれまでに調べられたほとんどすべての生物に共通で、光パルス型の位相反応曲線とよばれる。また、主観的夜の中心付近に位相変異の方向が位相後退から位相前進に変化する概日時計の位相が存在するが、この位相はクロスオーバーポイントとよばれる。この位相に強い光パルスを与えるとクリティカルパルスとして作用して概日時計が停止することがある。

位相反応曲線作成の際に得られた概日リズムのデータから、パルスを与えた概日時計の位相に対して、位相変異後の位相をプロットした図は位相転移曲線 (phase transition curve) とよばれる (図 2)。この曲線の傾きの平均値が 1 に近い値を示す場合、1 型の位相反応曲線、0 に近い傾き

を示す場合は 0 型の位相反応曲線に分類される。一般に光パルスの強度が強くなると位相変異の大きさは大きくなり、位相反応曲線は 0 型から 1 型に移行する。

様々な波長の単色光の光パルスを用いて位相変異の光用量依存性を調べることにより、概日時計の光同調に關与する概日光受容体の波長特異性を決定することができる。

一方、恒明条件下で短時間の暗処理を行うことを暗パルス (dark pulse) 処理とよぶが、この場合の位相反応曲線は光パルスタイプの位相反応曲線と形が異なり、主観的昼の中間から主観的夜の前半に位相の前進を、主観的夜の後半から主観的昼のはじめに位相後退が惹起される (図 3)。げっ歯類の自発行動の概日リズムを指標に概日時計からの出力を検証する場合、ハムスターを新しい輪回し型行動計測装置に移した場合やトリアゾラムなどの薬物を投与した場合に得られる位相反応曲線は暗パルスの位相反応曲線とよく似た形を示すことから、これら光刺激以外の刺激による位相変位は非光同調 (non-photic entrainment) と総称されることもある。(飯野雅之)

文 献

- 1) 高橋三郎他: 臨床時間生物学, pp.1-328, 朝倉書店, 1990.
- 2) Pittendrigh, C. S.: *Handbook of Behavioral Neurobiology, Volume 4, Biological Rhythms* (Aschoff, J. ed.), pp.95-124, Plenum, 1981.
- 3) Dwyer, S. M. and Rosenwasser, A. M.: *J. Biol. Rhythms*, 15, 491-500, 2000.

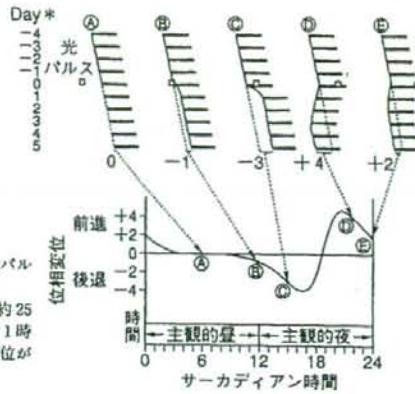


図1 ゴールデンハムスターの行動リズムの光パルスによる位相変位²¹⁾
 恒暗条件下でゴールデンハムスターの行動は約25時間周期の概日リズムを示すが、様々な位相で1時間の光パルス処理を施すと位相依存的な位相変位が惹起され、位相反応曲線を描くことができる。

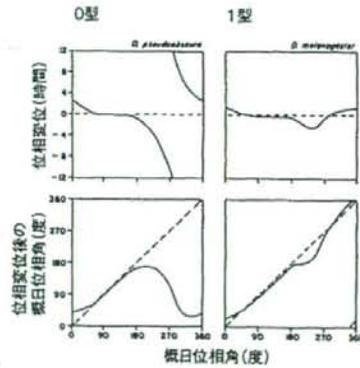


図2 2種のショウジョウバエ (ウスグロショウジョウバエ *Drosophila pseudoobscura* およびキイロショウジョウバエ *D. melanogaster*) における光パルスに対する位相反応曲線と位相転移曲線²²⁾
 恒暗条件下で飼育したショウジョウバエに15分間100ルクスの光パルスを与えると、ウスグロショウジョウバエでは0型、キイロショウジョウバエでは1型の位相反応曲線を描く。

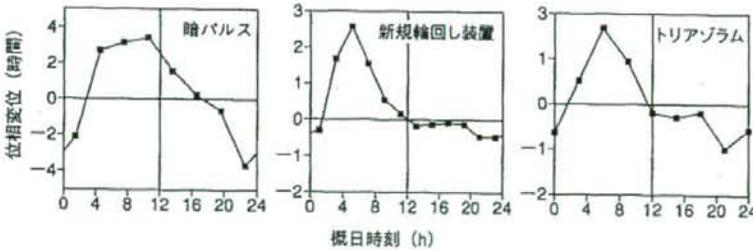


図3 暗パルス、新規輪回し型行動測定装置、ならびにトリアゾラムに対する位相反応曲線²³⁾
 三者の位相反応曲線はほぼ同じ形になっている。

54 松果体

— Pineal Organ

脊椎動物の松果体 (pineal organ; pineal gland; epiphysis) は、間脳の第三脳室背側壁が膨隆して発生する器官であり、通常、頭蓋骨の下、脳の表面に位置するが、ヒトにおいては大脳皮質の発達のため脳の中心部に位置する (図1)。解剖学的には非常によく目立つ器官であるが、その機能は長い間不明であった。17世紀にはデカルトをして松果体を「精神の座」と言わしめた。19世紀には松果体腫瘍の患者の春期発動が早まったことから松果体は性腺の発育に関与するといわれるようになった。

1917年にMcCordとAllenはウシ松果体がカエルや魚類の黒色素胞に作用して体色を明化させる物質を含むことを見だし、1958年にLernerらがN-アセチル-5-メトキシトリプタミンの構造をもつメラトニンをその原因物質として単離・同定して以来、松果体に関する研究は飛躍的に進展した。Kappersによる松果体への交感神経入力の実証、Axelrodらによるメラトニン合成系の解明、Quayによる日周リズムの発見、Oksche, Collinらによる電子顕微鏡観察やDodt, 森田らの電気生理学的研究による非哺乳類松果体の光感受性の証明、さらにはMenakerらによるイエズメ松果体移植実験による概日時計局在の証明や、出口らによるニワトリ松果体自身にメラトニン合成を制御する概日時計が存在することの発見など、松果体機能の解析は時間生物学研究の最先端を進んできた。現在では松果体は、概日時計と光により合成が制御されるメラトニンを介して様々な生理機能の日周リズム・年周リズムを制御する重要な器官として認識されている。

形態学的にみると、松果体は一般に遠位

部は発達して松果体叢を、基底側は脳室壁へ移行する細い松果体莖を形成する。メクラウナギ類や鯨類に松果体はみられない。ヤツメウナギや魚類は副松果体 (parapineal organ) をもち、松果体とともに松果体複合体 (pineal complex) を形成する。また、カエルでは松果体叢の一部が前方へ遊離して前頭器官 (frontal organ) を、爬虫類の副松果体は発達して頭頂眼 (parietal eye) を形成する (図1)。また、ヒト (とくに老人) の松果体には脳砂とよばれる石灰性の沈着物が見られるが、その機能は不明である。

松果体は系統発生の過程で光受容内分泌器官から内分泌器官へと変遷を遂げた (図1)。すなわち、魚類や両生類の松果体細胞は光受容細胞であり、形態学的には網膜の錐体とよく似た形状の発達した外節をもつ。また、魚類や両生類の松果体の光受容能は電気生理学的にも証明されている。爬虫類や鳥類の松果体においては、光受容細胞の外節は退化し遺残的となるが、光受容能はもち続けている。松果体に発現する光受容蛋白質としてはこれまでに魚類ではエクソロドプシン、Vertebrate Ancient オプシン、鳥類ではビノプシンなどが同定されている。また、これらのオプシンの発色団として11-*cis*-レチナールや11-*cis*-3-デヒドロレチナールの存在も知られている。哺乳類の松果体細胞は外節および内節を欠落し、光受容能はもたないが、胎児期には光受容関連蛋白質を発現することが知られている。

上述の通り系統発生の過程で松果体は光受容内分泌器官から内分泌器官へと変遷を遂げたが、それと同時に松果体の神経支配は求心性神経支配から交感神経支配へと変

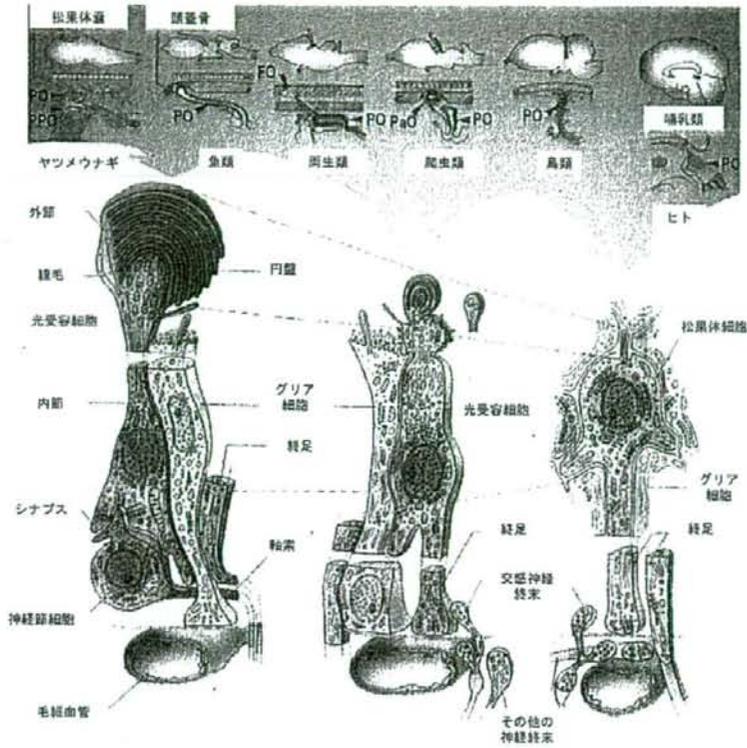


図1 系統発生における松果体の変遷¹⁾

各種脊椎動物の脳の矢状断、松果体付近の構造、ならびに松果体に存在する細胞の模式図。

PO: 松果体; PPO: 副松果体; FO: 前頭器官; PaO: 前頭眼。

系統進化の過程で松果体の光受容細胞の外節は退化して松果体細胞に変遷し、松果体は光受容内分泌器官から内分泌器官へと変遷を遂げた。

化した。すなわち、松果体茎を介して中枢神経系に直接投射する神経節細胞の数は魚類、両生類、鳥類の順に減少し、哺乳類ではみられない(図2)、その一方で松果体に投射する交感神経は両生類でごく少数みられるにすぎないが、鳥類、哺乳類では豊富に存在する。

松果体は脊椎動物を通じてメラトニンを合成する内分泌器官である。その合成には概日時計や光受容体が関与しており、メラトニン分泌は、明暗条件下では暗期に高く明期に低い日周リズムを、恒暗条件下では主観的に高く主観的に低い概日リズムを示すが、恒明条件下では光により抑制される。系統発生の過程でメラトニン合成を支配する概日時計、ならびに松果体からのメラトニン分泌を制御する光受容体の局在も変遷を遂げた(図3)。すなわち、魚類、両生類、爬虫類の松果体においては、松果体自身に概日時計とその同調に関与する光受容体が存在し、培養条件下でも松果体からのメラトニン分泌概日リズムは環境の明暗サイクルに同調できる。一方、哺乳類の松果体は光受容能をもたない。そのため、網膜の光受容細胞で受容された環境の明暗サイクルは、網膜一視床下部神経路を介して視交叉上核の概日時計を同調し、視交叉上核からの出力が室傍核、さらには上頸神経節を経由し、交感神経を介して松果体におけるメラトニン合成を調節する。哺乳類の松果体に存在する交感神経終末からは夜間にノルアドレナリンが放出され、主に β

受容体を介して松果体細胞に作用し、セカンドメッセンジャーであるcAMP合成を促進し、cAMPがメラトニン合成の律速酵素であるアリルアルキルアミンN-アセチルトランスフェラーゼ活性の発現を誘導する。鳥類の松果体におけるメラトニン合成制御はこれらの中間型をとり、松果体自身に存在する概日時計と光受容体による制御を受けるのみならず、網膜で受容された光も視交叉上核に存在する概日時計を介してメラトニン合成を制御する。ただし、交感神経終末から放出されたノルアドレナリンは α 受容体を介してメラトニン分泌を抑制する。

近年、時計遺伝子の発現・機能解析による概日時計分子機構の解明が進展した結果、自律的な概日時計をもつ魚類や鳥類の松果体においては、哺乳類の視交叉上核に存在する概日時計と同様の時計遺伝子群のネガティブフィードバックループを中心的なメカニズムとしてもつ概日時計分子機構が機能していることがわかってきた。

(飯野雅之)

文 献

- 1) Falcón, J.: *Prog. Neurobiol.*, 58, 121-162, 1999.
- 2) 佐藤哲二・和氣健二郎: 内分泌器官のアトラス(日本比較内分泌学会編), pp.16-25, 講談社, 1987.
- 3) 飯野雅之: 生物時計の分子生物学(海老原史樹文・深田吉孝編), pp.83-95, シュプリンガー・フェアラーク東京, 1999.

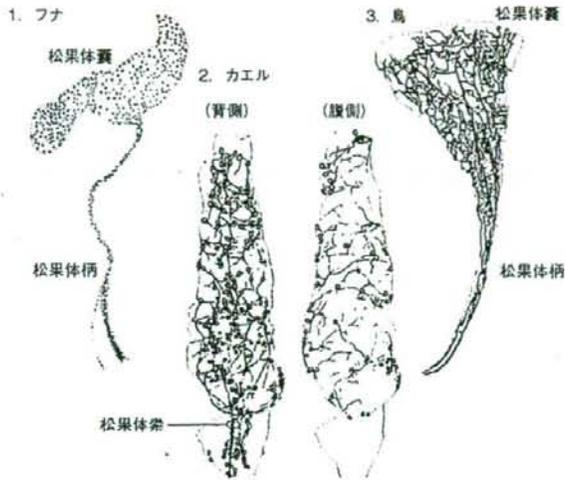
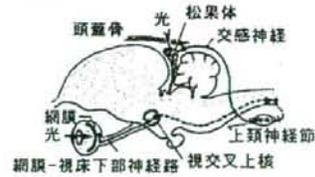


図2 魚類, 両生類, 鳥類の松果体における神経節細胞の分布²⁾

A. 魚類 (バイク)



B. 鳥類 (ニワトリ)



C. 哺乳類 (ラット)

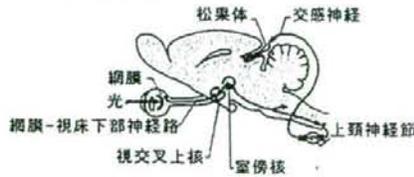


図3 松果体におけるメラトニン合成を制御する概日時計と光受容器の系統発生における変遷²⁾

Maternal Feeding Controls Fetal Biological Clock

Hidenobu Ohta^{1,2,3,5*}, Shanhai Xu^{1,2,3}, Takahiro Moriya^{4,5}, Masayuki Iigo^{5,6}, Tatsuya Watanabe^{1,3}, Norimichi Nakahata⁴, Hiroshi Chisaka^{1,2}, Takushi Hanita^{1,3}, Tadashi Matsuda^{1,3}, Toshihiro Ohura³, Yoshitaka Kimura⁶, Nobuo Yaegashi², Shigeru Tsuchiya³, Hajime Tei⁷, Kunihiro Okamura^{1,2}

1 Center for Perinatal Medicine, Tohoku University Hospital, Sendai, Japan, **2** Department of Obstetrics and Gynecology, Tohoku University Hospital, Sendai, Japan, **3** Department of Pediatrics, Tohoku University Hospital, Sendai, Japan, **4** Department of Cellular Signaling, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University, Sendai, Japan, **5** Department of Applied Biochemistry, Faculty of Agriculture, Utsunomiya University, Tochigi, Japan, **6** Tohoku University Biomedical Engineering Research Organization, Sendai, Japan, **7** Research Group of Chronogenomics, Mitsubishi Kagaku Institute of Life Sciences, Tokyo, Japan

Abstract

Background: It is widely accepted that circadian physiological rhythms of the fetus are affected by oscillators in the maternal brain that are coupled to the environmental light-dark (LD) cycle.

Methodology/Principal Findings: To study the link between fetal and maternal biological clocks, we investigated the effects of cycles of maternal food availability on the rhythms of *Per1* gene expression in the fetal suprachiasmatic nucleus (SCN) and liver using a transgenic rat model whose tissues express luciferase *in vitro*. Although the maternal SCN remained phase-locked to the LD cycle, maternal restricted feeding phase-advanced the fetal SCN and liver by 5 and 7 hours respectively within the 22-day pregnancy.

Conclusions/Significance: Our results demonstrate that maternal feeding entrains the fetal SCN and liver independently of both the maternal SCN and the LD cycle. This indicates that maternal-feeding signals can be more influential for the fetal SCN and particular organ oscillators than hormonal signals controlled by the maternal SCN, suggesting the importance of a regular maternal feeding schedule for appropriate fetal molecular clockwork during pregnancy.

Citation: Ohta H, Xu S, Moriya T, Iigo M, Watanabe T, et al. (2008) Maternal Feeding Controls Fetal Biological Clock. PLoS ONE 3(7): e2601. doi:10.1371/journal.pone.0002601

Editor: Naomi Rogers, University of Sydney, Australia

Received: October 4, 2007; **Accepted:** June 5, 2008; **Published:** July 2, 2008

Copyright: © 2008 Ohta et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: Grants-in-Aid for Scientific Research (to H.O.) from the Ministry of Education, Science, Sports and Culture and from the Ministry of Health, Labour and Welfare; a grant from Kanzawa Medical Research Foundation (to H.O.)

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: hideohta@mail.tains.tohoku.ac.jp

These authors contributed equally to this work.

Introduction

Most living organisms exhibit circadian rhythms, oscillations with a period of approximately 24 hours, in their behaviors and physiological functions, including activity, sleep, metabolism and body temperature. Circadian rhythms normally entrain to daily environmental cycles and free-run with a period of approximately 24 hours (called "circadian period") in the absence of environmental cues [1]. Circadian period is remarkably precise for each species and differs slightly from 24 hours [2,3]. In mammals, the circadian timing system is organized as a hierarchy of multiple organ oscillators [4,5]. Among them the suprachiasmatic nuclei (SCN) of the anterior hypothalamus function as the master pacemaker at the top of the hierarchy, which coordinates clocks in peripheral organs such as the heart, lung, liver, kidney, pancreas and uterus [6]. At the molecular level, cellular clocks in the organs are controlled by autoregulatory transcriptional and translational feedback loops of key "clock genes", in which BMAL1 and CLOCK proteins drive expression of the *Per* and *Cry* genes while the PER and CRY proteins in turn suppress the transcription of their own genes. In the circadian system, the light-dark (LD) cycle is the most reliable and effective external signal that synchronizes (entrains) biological rhythms with the environment. In mammals,

photonic information is perceived by specialized retinal photoreceptors and conveyed directly to the SCN of the hypothalamus, which is hypothesized to transfer circadian information to the other organs through hormonal signals or the nervous systems [1].

During fetal development, however, the situation is different. Fetuses do not respond directly to the entraining effects of light, but the timing of their biological clock is nevertheless coordinated with the environmental light-dark cycle. This prenatal entrainment of the fetal biological clock is the result of communication of time-of-day information from the mother to fetus in the uterus [7,8]. In addition, based on postnatal behavioral rhythms, maternal-fetal communication of circadian phase is considered to be disrupted by destruction of the maternal SCN, suggesting that the fetal clock is regulated by the maternal entraining signal [7,9]. Previous studies focused on the possibility that the maternal signal comes from hormones regulated by the maternal SCN since fetuses are anatomically separated from maternally-originated tissues by the placenta and maternal-fetal neural communication does not exist. Removal of selected maternal endocrine organs (pineal, pituitary, ovary, adrenal, thyroid and parathyroid), however, does not seem to disrupt maternal-fetal communication of circadian phase in the rat fetal clock, indicating that the rhythmic hormonal outputs from these glands may not be necessary [10].

In this study, we focused on a maternal signal, which is not directly controlled by the maternal SCN, by using a restricted feeding (RF) schedule to examine the possibility of feeding-related factors being a synchronizer for the fetal SCN. When food is available only for a limited time each day in an RF schedule, rats increase their locomotor activity 2 to 4 hours before the onset of food availability [11]. Entrainment of anticipatory locomotion by RF occurs independently of the LD cycle, suggesting that the circadian oscillators entrained by RF are distinct from those entrained by light. Surprisingly, RF does not influence the phase of clock gene expressions in the adult SCN but does influence locomotor activity and the clock gene rhythmicity in the other organs [12–14]. Thus, this is an ideal model to test the effect of maternal circadian signals independent of the maternal SCN on the fetuses. Moreover, synchronization can be found between the phase of locomotor activity of an SCN-lesioned mother rat who has been entrained through RF while still pregnant, and that of her newly born offspring, suggesting that fetal clocks can be controlled by RF on mothers [15]. With a transgenic rat model in which the mouse *Per1* gene promoter has been linked to a luciferase reporter, we continuously monitored the rhythmic expression of *Per1*, one of the key “clock genes”, by recording light emission from tissues *in vitro* [4]. We used this model to investigate the effects of maternal feeding on the communication between mother and the fetal SCN during pregnancy.

Results and Discussion

We first exposed pregnant *Per1-luc* rats to an RF regimen, in which food was available only for 4 hours during the light portion of a 12-hour:12-hour LD cycle, and recorded their locomotor activity, for 22 days of pregnancy after mating. Within 10 days, the rats began to increase their behavioral activity a few hours before food became available, and also shifted their locomotor-active period from night to daytime (Fig. 1). After 21 days of RF

and one following day of fasting, we sacrificed the animals; explanted both the fetal SCN and liver as well as the maternal SCN and liver and measured luciferase activities from each tissue *in vitro* (Fig. 2, Fig. 3 and Fig. 4). Despite the marked effects of this regimen on maternal locomotor behavior, the phase of the maternal SCN rhythm was unaffected (one-way ANOVA, $p > 0.05$; the peak times for ad lib and restricted feeding were 43.9 ± 1.4 h and 44.2 ± 0.8 h (mean \pm s.d., throughout) respectively) and remained phase-locked to the light cycle, even after 21 days of RF (Fig. 4). This result is consistent with previous studies which report that RF does not entrain the adult SCN and supports the general notion that entrainment to cycles of food availability does not directly involve the maternal SCN [12–14]. In contrast, the circadian clock in the fetal SCN was entrained by the 4-hour RF regimen (Fig. 2, Fig. 4) and phase-advanced by 4.7 h (one-way ANOVA, $p < 0.01$; the peak times for ad lib and restricted feeding were 50.0 ± 1.1 h and 45.2 ± 2.1 h respectively). This suggests that the fetal SCN may have a unique ability to adapt temporally to changes in the maternal feeding pattern unlike the adult SCN. The fetal SCN showed prominent *Per1-luc* circadian rhythms (23.3 ± 1.7 h, $n = 5$, in the ad lib feeding and 22.5 ± 2.0 h, $n = 5$, in the RF for the calculated free running periods of the fetal SCN *in vitro*; no statistical difference between the two groups) with smaller (0.32-fold) trough-to-peak amplitudes compared to those of the maternal SCN.

Our finding of *Per1-luc* circadian rhythms in the rat fetal SCN differs from the findings of some previous studies that did not detect clear *Per1* circadian rhythms in the rodent fetal SCN by *in situ* hybridization [16–21]. In addition to possible variation due to putative strain and species difference, this discrepancy might be explained by the technical difficulty in measuring the low-amplitude *Per1* circadian expressions in the developing SCN by *in situ* hybridization, which requires a delicate combination of the proper affinity of designed probes to the target *Per1* mRNA and the appropriate film exposure time for successful detection of weak

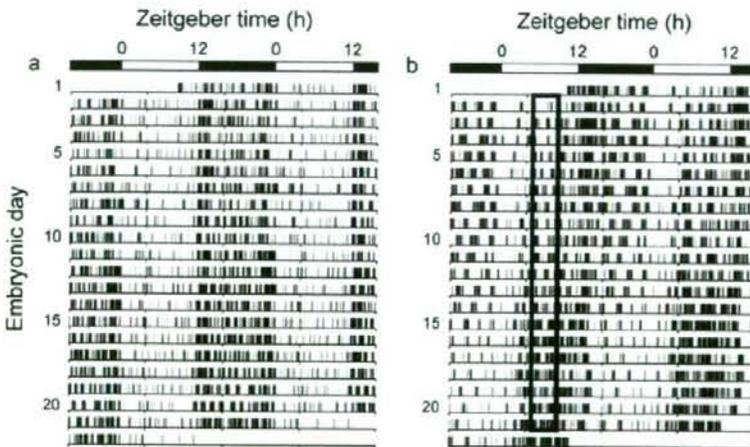


Figure 1. Representative locomotor activity records from pregnant *Per1-luc* transgenic rats. (a) shows activity in an animal under ad lib feeding. (b) shows activity in animals given access to food for 4 hours each day (the restricted feeding (RF) group). The open boxes in (b) indicate the daily food-access interval. The bars at the top indicate the light period in white and dark period in black. For rats in the RF group, food access was restricted to a 4-hour period at zeitgeber time (ZT) 5–9 for 21 days of pregnancy (where ZT is lights on and ZT 12 is lights off). RF in (b) resulted in typical anticipatory activity occurring before food access. During the RF, activity is generally increased and the nighttime activity is shifted forward toward the food-access period of daytime.

doi:10.1371/journal.pone.0002601.g001

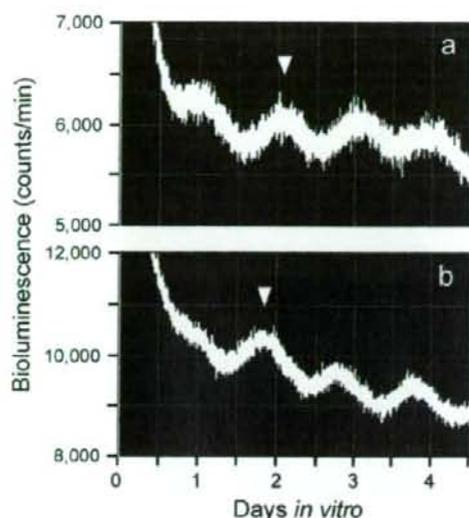


Figure 2. Rhythms of light emission by fetal SCN explants. Shown are raw data from (a) a fetus of an *ad lib* fed control pregnant animal and (b) a fetus of a pregnant animal that had been exposed to a 4-hour RF regimen for 21 days after mating. Because the pattern of light emission is quite variable during the first 12 to 14 hours after explantation, we consider that the phase of the tissue *in vivo* is best reflected by the phase of the peak during the first full subjective day (1 to 2.5 days after explant) as previously described [13]. The phase of these peaks is consistent from animal to animal (Fig. 4). Here, the phase statistically chosen is indicated by the inverted triangles. doi:10.1371/journal.pone.0002601.g002

radio-labeled *Per1* expression without over-saturation. To ensure correct measurements, we surgically made purely coronal SCN slices from *Per1-luc* transgenic fetal rats to detect *Per1-luc* signals directly from the fetal SCN and eliminate the background *Per1-luc* expressions from other neighboring brain tissue. In addition, highly-sensitive photo multiplier tubes were used to capture the low level *Per1-luc* signals. Our findings in the present study are consistent with previous reports on circadian rhythms in the firing rates and metabolic activities of the rat fetal SCN [7,22,23] and are also supported by *in-vivo* imaging data which demonstrated day-night differences in *Per1-luc* expressions throughout the whole body of *Per1-luc* rat fetuses during the late gestational period [24].

The circadian phases in the fetal liver in RF also showed phase-advance, advancing by 7.4 h compared to those in *ad lib* feeding ($n=5$ for each group, one-way ANOVA, $p<0.01$; the peak times for *ad lib* and restricted feeding were 39.1 ± 1.6 h and 31.7 ± 1.8 h respectively; Fig. 3, Fig. 4), indicating that the fetal liver clock as well as the fetal SCN was entrained by the maternal RF regimen. The relatively smaller phase advance in the fetal SCN compared to the fetal liver in maternal RF may be explained by a possible competition in the fetal SCN between a stronger maternal-feeding based synchronizer and other unknown signals which subtract from the phase advance induced by maternal RF. Although *Per1-luc* circadian rhythms were detected in the fetal liver (23.5 ± 1.1 h, $n=5$, in the *ad lib* feeding and 24.2 ± 1.5 h, $n=5$, in the RF for the calculated free running periods; no statistical difference between the two groups), the oscillations were damped with smaller (0.28-fold) trough-to-peak amplitudes compared to those of the maternal liver. This is in contrast to fetal SCN circadian rhythmicity which

displays more distinct oscillations, suggesting a more immature nature of the molecular clock in the fetal liver at this developmental stage. The phases in the maternal liver in RF also phase-advanced by 9.1 h compared to those in *ad lib* feeding as previously reported ($n=5$ for each group, one-way ANOVA, $p<0.01$; the peak times for *ad lib* and restricted feeding were 57.1 ± 1.1 h and 48.0 ± 1.2 h, respectively; Fig. 4) [13].

Our data invite a reexamination of the previous models of maternal-fetal communication in the mammalian circadian system. Previous studies have been trying to find the signals between maternal and fetal SCN based on a hypothesis that signals regulated by the maternal SCN, which is entrained by a daily light-dark cycle, exclusively control the fetal SCN [9,10]. This study, however, suggests that maternal-feeding signals might be an alternative mechanism controlling the fetal SCN. Since RF did not affect the maternal SCN (Fig. 4), the present study indicates that fetal SCN are not directly controlled by hormonal signals regulated by maternal SCN but by maternal feeding. Further study is still required to identify possible alternative signals from mother to fetuses in the RF paradigm. A more direct way to confirm the findings of this study would be to employ more advanced *in-vivo* *Per1-luc* imaging of the fetal SCN in the pregnant uterus, however, such a technique has yet to be developed [25,26].

Our results also have potential practical importance particularly for both normal and abnormal pregnancies [27–29]. During pregnancy, a regular daily-lifestyle schedule with appropriate amounts of sleep and nutrition is regularly recommended for pregnant women to achieve healthy fetal growth. So far studies on maternal feeding have only focused on the nutritional requirements for healthy fetal growth. However, this study illustrates that the maternal feeding schedule itself also has powerful effects on fetal physiology by influencing time information in maternal-fetal communication. In this rodent study, fetal biological clock as well as maternal behavior was strongly influenced by RF even though the maternal SCN remained adjusted to the light-dark schedule. This indicates that maternal-feeding signals can be more influential on fetuses than the maternal SCN during pregnancy and that perhaps time information relating to the LD cycle is relayed to the fetus via the mother's own LD-cycle based feeding cycle. The most appropriate maternal feeding schedules should be explored to achieve the sound physiology and healthy development of both fetuses *in utero* and preterm infants *ex utero*.

Materials and Methods

Animals and housing

Homozygous male and female transgenic *Per1-luc* rats (Japanese Wistar) expressing 6.7 kb of the mouse *Period1(Per1)* promoter driving firefly luciferase were used for this study. Timed-pregnant *Per1-luc* rats were housed individually in cages on a 12-hour:12-hour light-dark (LD) cycle (lights on at 08:00h and lights off at 20:00h; 200 lux at cage level during light period). The rats were exposed to a restricted feeding (RF) or *ad lib* feeding. For rats in the RF group, food access was restricted to a 4-h period at zeitgeber time (ZT) 5–9 for day 21 of pregnancy (where ZT0 is lights on and ZT12 is lights off). The RF rats adjusted the timing of their food intake to the limited feeding period within several days and also adjusted their daily food consumption to match normal daily intake levels as previously reported [11]. On day 22 of pregnancy, the last day of tissue culture, the pregnant rats under *ad lib* and restricted feeding were fasted to prevent the direct effects of food intake on the fetal SCN, to make sure not just one feeding event, but repeated feeding cycles over day 0–21 of pregnancy contributed to any changes in the fetal SCN rhythms. Locomotor

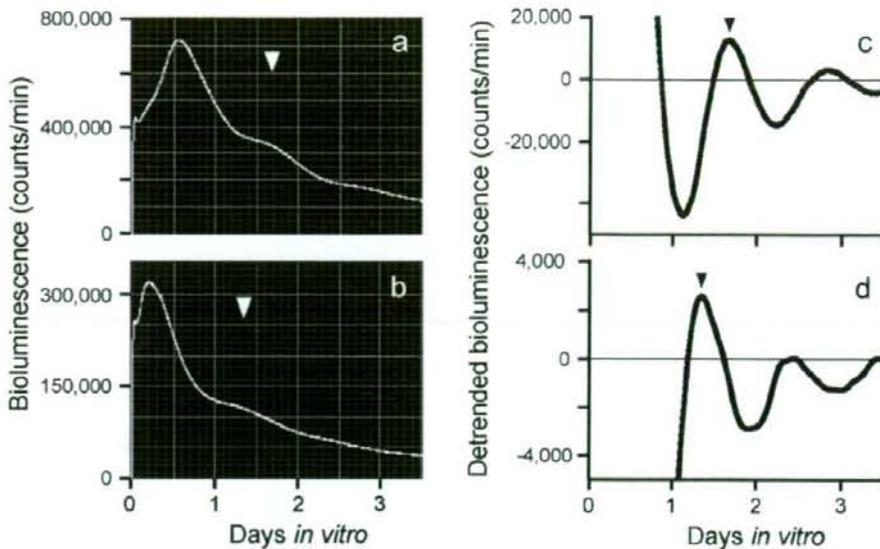


Figure 3. Rhythms of light emission by fetal liver explants. Shown are raw data (a) and detrended data (c) from a fetus of an *ad lib* fed control pregnant animal. (b) and (d) show raw and detrended data, respectively, from a fetus of a pregnant animal that had been exposed to a 4-hour RF regimen for 21 days after mating. The peak of the phase during the first full subjective day (1 to 2.5 days after explant) as statistically chosen is indicated by the white and black inverted triangles. The white inverted triangle in (a) and the black inverted triangle in (c) indicate the same peak time statistically chosen, as do the white and black triangles for (b) and (d), respectively.
doi:10.1371/journal.pone.0002601.g003

activity of the rats was recorded by infrared motion sensors using an online system (Actograph System, Rapid Fire Computer, Japan). Animal care and use were reviewed and approved by the Committee for Animal Research of Tohoku University.

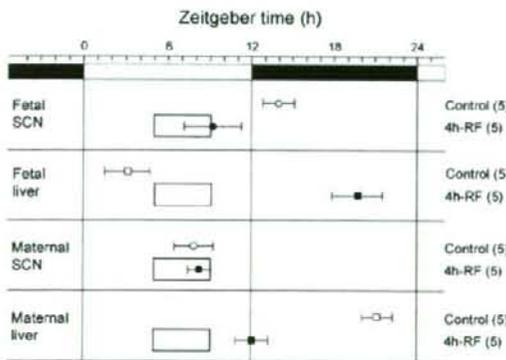


Figure 4. Effects of 4-hour restricted feeding on tissue luciferase rhythmicity. The average times (\pm s.d., shown by error bars) of peaks from the different tissues are plotted against the LD cycle shown at the top of each panel. The timing and duration of food availability at ZT5-9 is indicated by open boxes in each section. The sample size is shown in parentheses. The phases of fetal SCN, fetal liver and maternal liver rhythmicity were significantly different from control values in all groups of RF rats (one-way ANOVA, $p < 0.01$); the phase of maternal SCN rhythmicity was not significantly different between control and 4h-RF groups.
doi:10.1371/journal.pone.0002601.g004

Assessment of circadian periods and phases of the fetal and maternal SCN

Following behavioral assessment, both pregnant *Per1-luc* rats and their homozygous fetuses were sacrificed for recordings of SCN rhythmicity on day 22 of pregnancy, one day before expected birth. We sacrificed one fetus each from five different litters of both *ad-lib* and restricted-feeding type pregnant rats and their mothers at ZT11 and rapidly removed fetal and maternal brains ($n = 5$ for each) as well as maternal liver ($n = 5$). We also prepared a separate set of pregnant *Per1-luc* rats in *ad-lib* and RF to sample the fetal livers ($n = 5$ for each group) in the same manner. The paired SCN (coronal sections of 300 μ m thickness, made with a vibroslicer) and the liver tissues (1-mm thickness) were cultured on membrane inserts (Millicell-CM, Millipore, Bedford, MA) in 1 mL of medium (Dulbecco's modified Eagle's medium, Sigma, St. Louis, MO) supplemented with 10 mM HEPES (Sigma), 2% B27, 25 U/mL penicillin, 25 μ g/mL streptomycin, 2.2 mg/mL NaHCO₃, 4 mM L-glutamine, and 0.1 mM beetle luciferin (Promega, Madison, WI). Unless noted, medium ingredients were purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA). Each culture was sealed in a Petri dish and maintained at 36°C in darkness. Bioluminescence was collected in counts per minute for 4.5 days without a medium change using a photomultiplier tube (HC8259MOD, Hamamatsu Corp., Shizuoka, Japan).

Phase, period, and amplitude were determined using modified published methods [30–32]. First, original data (1-min bins) were smoothed by an adjusting-averaging method with 2-hour running means as described [30]. Then the data set were detrended by subtracting the 24 hour running average from the raw data using Exmax software (gift from Mr. Tuyoishi Yaita and Dr. Shigenobu Shibata, Waseda University, Tokyo, Japan). Peak time was defined as the highest point in detrended data. The period of *Per1-luc*

activity (recorded from 24 to 108 h *in vitro*) was assessed for each SCN culture and calculated by averaging the period between the first and second peaks and the period between the second and third peaks. The *Per1-luc* amplitude for an SCN culture was calculated as the difference between the first trough and second peak of the detrended curves of the bioluminescence. Statistical comparisons for these data from the RF and *ad lib* groups were performed by one-way ANOVA ($p < 0.05$).

Acknowledgments

We thank the Institute for Animal Experimentation at Tohoku University Graduate School of Medicine for use of its facilities and their technical

assistance. We also thank Dr. Shin Yamazaki, Mr. Seiji Suzuki, Mr. Masahiro Takemura, Mr. Yoshinori Takamatsu, Mr. Atsushi Kamoshida, Mr. Toshiro Takahashi, Dr. Noriyuki Kasai, Dr. Shinya Okano, Ms. Teruko Suetu, Ms. Tomomi Kibushi, Mr. Keiuke Nishio, Mr. Sei-ichi Ohtake, Mr. Akio Itoh and Mr. Thor Masuda for their technical advice.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: HO TM NN HC TH TM TO YK NY ST HT KO. Performed the experiments: HO SX TM MI TW. Analyzed the data: HO SX TM MI. Contributed reagents/materials/analysis tools: HT. Wrote the paper: HO SX TM MI.

References

- Hastings MH, Reddy AB, Maywood ES (2003) A clockwork web: circadian timing in brain and periphery, in health and disease. *Nat Rev Neurosci* 4: 649–661.
- Pittendrigh CS, Daan S (1976) A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents: I. The stability and lability of spontaneous frequency. *J Comp Physiol* 106: 223–252.
- Czeisler CA, Duffy JF, Shanahan TL, Brown EN, Mitchell JF, et al. (1999) Stability, precision, and near-24-hour period of the human circadian pacemaker. *Science* 284: 2177–2181.
- Yamazaki S, Numano R, Abe M, Hida A, Takahashi R, et al. (2000) Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science* 88: 682–685.
- Yoo SH, Yamazaki S, Lowrey PL, Shimomura K, Ko GH, et al. (2004) *PERIOD2::LUCIFERASE* real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 5339–5346.
- Hastings M, O'Neill JS, Maywood ES (2007) Circadian clocks: regulators of endocrine and metabolic rhythms. *J Endocrinol* 195: 187–198.
- Reppert SM, Schwartz WJ (1983) Maternal coordination of the fetal biological clock *in utero*. *Science* 220: 969–971.
- Parraguez VH, Valenzuela GJ, Vergara M, Ducsay GA, Yellon SM, et al. (1996) Effect of constant light on fetal and maternal prolactin rhythms in sheep. *Endocrinology* 137: 2355–2361.
- Davis FC, Gorski RA (1988) Development of hamster circadian rhythms: role of the maternal suprachiasmatic nucleus. *J Comp Physiol [A]* 162: 601–610.
- Reppert SM, Schwartz WJ (1986) Maternal endocrine extirpations do not abolish maternal coordination of the fetal circadian clock. *Endocrinology* 119: 1763–1767.
- Froy O (2007) The relationship between nutrition and circadian rhythms in mammals. *Front Neuroendocrinol* 28: 61–71.
- Damiola F, Le Minh N, Preitner N, Kornmann B, Fleury-Olela F, et al. (2000) Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev* 14: 2950–2961.
- Stokkan KA, Yamazaki S, Tei H, Sakaki Y, Menaker M (2001) Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding. *Science* 291: 490–493.
- Hara R, Wan K, Wakamatsu H, Aida R, Moriya T, et al. (2001) Restricted feeding entrains liver clock without participation of the suprachiasmatic nucleus. *Genes Cells* 6: 269–78.
- Weaver DR, Reppert SM (1986) Periodic feeding of SCN-lesioned pregnant rats entrains the fetal biological clock. *Brain Res Dev Brain Res* 46: 291–296.
- Shimomura H, Moriya T, Sudo M, Wakamatsu H, Akiyama M, et al. (2001) Differential daily expression of *Per1* and *Per2* mRNA in the suprachiasmatic nucleus of fetal and early postnatal mice. *Eur J Neurosci* 13: 687–693.
- Ohta H, Honma S, Abe H, Honma K (2002) Effects of nursing mothers on *rPer1* and *rPer2* circadian expressions in the neonatal rat suprachiasmatic nuclei vary with developmental stage. *Eur J Neurosci* 15: 1953–1960.
- Ohta H, Honma S, Abe H, Honma K (2003) Periodic absence of nursing mothers phase-shifts circadian rhythms of clock genes in the suprachiasmatic nucleus of rat pups. *Eur J Neurosci* 17: 1628–1634.
- Sládek M, Sumová A, Kováčiková Z, Bendová Z, Laurinová K, et al. (2004) Insight into molecular core clock mechanism of embryonic and early postnatal rat suprachiasmatic nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 6231–6236.
- Li X, Davis FC (2005) Developmental expression of clock genes in the Syrian hamster. *Brain Res Dev Brain Res* 158: 31–40.
- Kováčiková Z, Sládek M, Bendová Z, Illnerová H, Sumová A (2006) Expression of clock and clock-driven genes in the rat suprachiasmatic nucleus during late fetal and early postnatal development. *J Biol Rhythms* 21: 140–148.
- Shibata S, Moore RY (1987) Development of neuronal activity in the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res* 431: 311–315.
- Burgoon PW, Lindberg PT, Gillette MU (2004) Different patterns of circadian oscillation in the suprachiasmatic nucleus of hamster, mouse, and rat. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 190: 167–171.
- Saxena MT, Aton SJ, Hildebolt C, Prior JL, Abraham U, et al. (2007) Bioluminescence imaging of period1 gene expression *in situ*. *Mol Imaging* 6: 68–72.
- Abraham U, Prior JL, Granados-Fuentes D, Pwnica-Worms DR, Herzog ED (2005) Independent circadian oscillations of *Period1* in specific brain areas *in vivo* and *in vitro*. *J Neurosci* 25: 8620–8626.
- Yoshikawa T, Yamazaki S, Menaker M (2005) Effects of preparation time on phase of cultured tissues reveal complexity of circadian organization. *J Biol Rhythms* 20: 500–512.
- Mirmiran M, Ariagno RL (2000) Influence of light in the NICU on the development of circadian rhythms in preterm infants. *Semin Perinatol* 24: 247–257.
- Kennaway DJ (2002) Programming of the fetal suprachiasmatic nucleus and subsequent adult rhythmicity. *Trends Endocrinol Metab* 13: 398–402.
- Gluckman PD, Hanson MA (2004) Living with the past: evolution, development, and patterns of disease. *Science* 305: 1733–1736.
- Meerlo P, van den Hoofdakker RH, Koolhaas JM, Daan S (1997) Stress-induced changes in circadian rhythms of body temperature and activity in rats are not caused by pacemaker changes. *J Biol Rhythms* 12: 80–92.
- Abe M, Herzog ED, Yamazaki S, Straume M, Tei H, et al. (2002) Circadian rhythms in isolated brain regions. *J Neurosci* 22: 350–356.
- Ohta H, Yamazaki S, McMahon DG (2005) Constant light desynchronizes mammalian clock neurons. *Nat Neurosci* 8: 267–269.



光環境が早産児・新生児の脳に与える影響

—新しい光受容体「メラノプシン」のもつ意味—

東北大学病院 産婦人科センター 太田 英伸

はじめに

赤ちゃんの視覚に対する理解は、メラノプシン (melanopsin) とよばれる新しい光受容体の発見によって大きく変わろうとしている。光受容体とは、光 (光子) を捕まえるタンパク質のことで、おもに目の網膜に存在する。メラノプシンは、最近の「生物時計」の研究を通して発見され、メラノプシンを含む節細胞は、桿体・錐体細胞に次ぐ第3の光センサーであることが明らかになった。

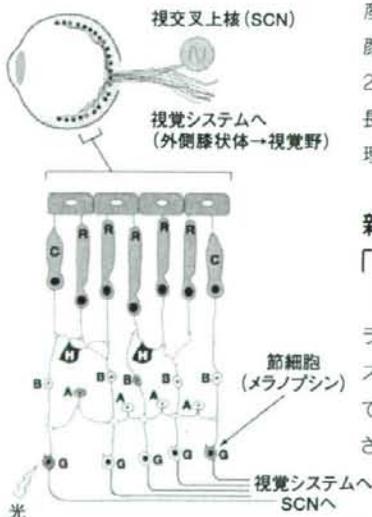


図1 網膜の視覚回路

メラノプシンを含む節細胞は、桿体・錐体細胞を経由せず、光に直接反応し視神経を通して光情報を生物時計に伝える。節細胞は桿体・錐体細胞からの入力も受けている。R (rod cell): 桿体細胞, C (cone cell): 錐体細胞, H (horizontal cell): 水平細胞, B (bipolar cell): 双極細胞, A (amacrine cell): アマクリン細胞, G (ganglion cell): 節細胞。文献2より引用改変。

メラノプシンの最大の特長は、明暗情報の処理 (明るい暗いの知覚) を行うことである。これは、以前から知られていたロドプシン (桿体細胞)・コーンオプシン (錐体細胞) といった光受容体が映像情報の処理 (形・色の知覚) を行うのと対照的である。メラノプシンのもう1つの特長は、ロドプシン・コーンオプシンより早い発達段階で働き始めることである。この点は赤ちゃんの生後発達と視覚環境を考えるうえでとくに重要な意味もっている。

メラノプシンの発見により、1) 早産児と満期出産児の間でお母さんの顔を見分ける能力に差があること、2) 光環境が早産児・新生児の体の成長に影響する可能性、をより明確に理解できるようになった。

新しい光センサー「メラノプシン」の発見

現在の視覚システムの理解は、メラノプシンの発見¹⁾によって新しいステージに入った。つい10年前まで、脊椎動物の視覚機能はほぼ解明されたと考えられていた。網膜外側

に位置する桿体・錐体細胞がまず光を検出し、網膜内側の節細胞から視神経を通して外側膝状体を經由、最終的に脳 (大脳皮質視覚野) に伝達、映像が認識されるという流れである (図1)。さらに、分子レベルでは、桿体細胞にはロドプシン、錐体細胞にはコーンオプシンという光受容体が存在し、光を11-シス型レチナール (11-cis-retinaldehyde) という分子で捕まえ、光を、生化学信号に変換、最終的には電気信号に変えて視神経へ伝達する。また、桿体細胞は弱い光にも反応し白黒の区別をするものの、詳細な映像を脳に伝達することはできない。錐体細胞は弱い光には反応しないが、青・緑・赤の3色に反応する複数のコーンオプシンをもち、詳細な映像を脳に伝達する。

一方、近年発見されたメラノプシンを含む節細胞は、形・色といった映像を脳に伝達することはできない。しかし興味深いことに、明るい暗いといった周囲の明暗情報を伝達できる。映像情報を伝達できないメラノプシンだが、ここ数年の「生物時計」の研究で、私たちの日常生活における睡眠・覚醒サイクルの形成に重要であることが明らかになってきた。

節細胞が捉えた光信号は、視神経を介し、視交叉上核に到達する。視交叉上核は私たちの頭のほぼ中心に位

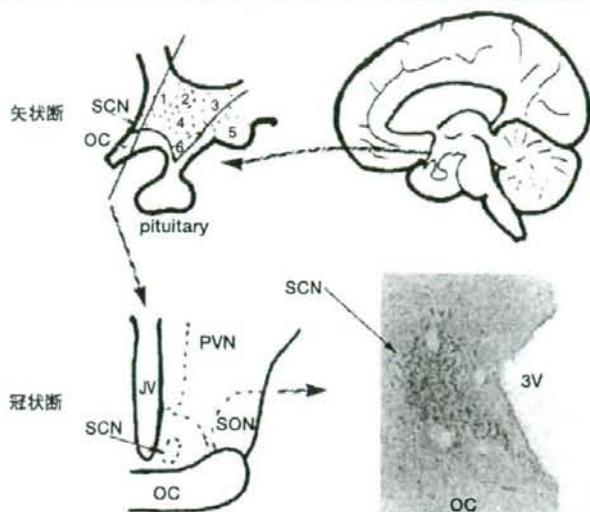


図2 ヒトの生物時計(視交叉上核)

SCN (suprachiasmatic nucleus): 視交叉上核、OC (optic chiasm): 視交叉、Pituitary: 下垂体、PVN (paraventricular nucleus): 室傍核、SON (supraoptic nucleus): 視索上核、3V (the third ventricle): 第三脳室。文献3より引用改変。

「生物時計」ともよばれ、睡眠覚醒を調節すると同時に、各臓器に昼・夜の24時間周期の情報を神経連絡・ホルモンを介して伝達する。また、メラノプシンを含む節細胞は、外側膝状体にも連絡している。外側膝状体は桿体・錐体細胞からの映像を受け取る大脳皮質視覚野の中の継地点である。このことは、節細胞から入力された明暗情報が桿体・錐体細胞の映像情報を修飾する可能性も示している(図2)。

赤ちゃんは外の世界をどのように見ているのか?

赤ちゃんはいつから光を感じ、外の世界をどのように見ているのだろうか?

この疑問に対する答えは、桿体細胞(ロドプシン)・錐体細胞(コーンオプシン)・節細胞(メラノプシン)の3つの光センサーの発達過程を考えることがヒントになる。

1. 節細胞は妊娠30週前後から働き始める

実は節細胞は、視蓋前域オリブ核(olivary pretectal nuclei)にも神経を伸ばし、光が誘導する瞳孔の縮小(瞳孔反射)を調節している。つまり、瞳孔反射によって節細胞が機能しているかどうかを簡単に確かめることができる。ヒト早産児においては、瞳孔反射が妊娠30週から確認できることから、節細胞(メラノプシン)は少なくとも妊娠30週から機能していることがわかる。また、視覚のしくみがヒトに近いマントヒヒ胎児

を調べた研究では、さらに早くヒト早産児が光に反応する可能性が示された⁴⁾。この研究では、妊娠25~28週のヒト早産児に相当するマントヒヒ胎児を帝王切開にて出生させ、夜間5,000ルクスの光を当て胎児の生物時計「視交叉上核」の反応を確かめた。この実験では、光刺激で視交叉上核における神経活動が高まるとc-fos遺伝子の発現が上昇することを利用して(c-fos遺伝子は元々、がん・成長分化にかかわる遺伝子の発現を調節するが、脳科学ではニューロン活動性の指標としても頻りに用いられる)。実際、この光照射によって視交叉上核のc-fos遺伝子の発現が上昇し、妊娠25~28週のヒト胎児においても節細胞から脳へ光信号が伝達されると推測された。

2. 桿体・錐体細胞は生後働き始める

一方、映像情報をキャッチする桿体・錐体細胞の発達には心理・電気生理の2つのアプローチから確かめられている⁵⁾。

心理学では、「選考注視法」という技法で新生児が顔の表情・色を見分ける時期を明らかにしている。「選考注視法」では、赤ちゃんが新しく提示された対象物をより長い時間注視するという特徴を利用して、対象物が同じものか、新しいものかを赤ちゃん



図3 早産児が下から見上げた大人の顔

a: 大人の目から見たモデルの顔(実際はカラー写真)、b: 妊娠35週相当の早産児から見た同じ顔のイメージ図(白黒写真)(向田茂氏(北海道情報大学情報メディア学部)作成)。

んが区別するのを確かめる。フィールドは、生後36時間の新生児に対し、女性の顔をモデルとした幸福・悲しみ・驚きの各表情刺激を提示した。

この実験では、表情刺激のタイプが変化した時点で、新しい表情刺激に対する新生児の注視時間が増加し、新生児が表情の違いを識別することが明らかになった。同様に選考注視法で赤ちゃんの色知覚(=錐体細胞の機能)の検討したところ、緑・赤の区別ができるのは生後2か月頃からで、新生児は色の識別が不完全なため白黒の世界に住んでいることがわかった。これらの研究から、形の識別にかかわる桿体細胞は生後36時間以降、色・形の識別にかかわる錐体細胞は生後2か月以降に働き始めると推測されている。

心理学の結果は、電気生理学的アプローチとも一致している。光刺激に対する網膜電位(Electroretinogram: ERG)は、おもに桿体・錐体細胞が存在する網膜外側の組織に由来している。このERGを各発達段階で確かめたところ、妊娠36週の早産児で観察されるERGの反応は大人の10分の1以下で、早産児では桿体・錐体細胞が十分に機能していない結果となった。発達が進み生後6か月になると、大人と同程度のERGの反応が認められるようになってくる。

これら3つの光センサーの情報から、妊娠35週の赤ちゃんが見る世界をシミュレーションすると図3のようになる。早産で生まれた赤ちゃんは、形といった映像の情報よりも、明暗の光情報をおもに取り込んでいるので、ぼんやりとした白黒テレビの世界を見ていると想像される。

3. ノックアウトマウスにおける光受容体の発達研究

節細胞が桿体・錐体細胞より早く発達することを直接証明した研究がある。それは、ヒトとは動物種が異なるが、メラノプシン遺伝子を取り除いたマウス(ノックアウトマウス)の研究である。

先述のマントヒヒ胎児と同じように、マウス新生児に光刺激を与えると、生後0日より視交叉上核(生物時計)のc-fos遺伝子の発現が上昇し、マウスでは出生日より光情報が脳(視交叉上核)に到達することが明らかになった。ところが、メラノプシン遺伝子を取り除いたノックアウトマウスでは、光刺激に対する視交叉上核のc-fos遺伝子の反応は生後しばらく確認できず、反応がようやく確認できたのは生後14日目だった⁷⁾。つまり、通常のマウスでは、生後2週間は桿体・錐体細胞が機能せず、その期間、節細胞のみが光の脳への伝達を行っていたことになる。この結果から、マウスにおいては生後2週間まで脳への光伝達はメラノプシンのみが、生後2週間以降は、ロドプシン・コーンオプシンが加わり処理が行われると推測された。

光環境は早産児の発達にどのように影響するのか?

以上の研究より、早産児は少なくともメラノプシンを使い、明暗情報を脳で処理していると考えてよさそうだ。早産児の発達と光環境について興味深い観察結果がある。これらの研究によると、昼夜の区別のある光環境(明暗環境)で保育された早産児は、24時間明るい環境(恒明環境)あるいは、反対に1日中暗い環境(恒暗環境)で保育された早産児より体

重増加がよかった⁸⁾。どうして明暗環境で育った早産児の体重増加がよいのか、そのメカニズムはまだよくわかっていない。

ただ、マウスを対象とした研究から、少なくともずっと明るい恒明環境が赤ちゃんの生物時計を細胞レベルで乱すことは明らかになった。赤ちゃんにかぎらず、大人のマウスも恒明環境に長期置かれると生物時計がうまく機能しなくなる。生物時計の本体は、数万個の神経細胞が集めた視交叉上核とよばれる神経細胞の固まりからできていて、頭のほぼ中央に2つ並び、1組のペアとして存在する(図4)。この個々の神経細胞は独立してサーカディアンリズムをもち、明暗環境では24時間周期で活動レベルの上昇・下降を一齐に繰り返している。ところが、恒明環境では、この神経細胞間の協調が崩れ、個々の神経細胞がバラバラのタイミングで活動し始める。この視交叉上核の活動の様子は、遺伝子工学を利用すると、生物時計を動かす遺伝子「時計遺伝子」をマーカーにして観察することができる。我々は、時計遺伝子Period1(ペリオド・ワン)のスイッチ(プロモーター)にクラゲ発光タンパク(Green Florescent Protein: GFP)の遺伝子を組み込み、視交叉上核のPeriod1の活動をGFPの光で観察した。赤ちゃんマウス、大人のマウスにおける視交叉上核の神経活動の様子は、米国ヴァンダービルト大学のWebサイト内(赤ちゃんマウス: <http://www.cas.vanderbilt.edu/PediatrRes2005OhtaMitcheIIcMcMahon>、大人のマウス: <http://vrc.vanderbilt.edu/NatNeurosci2005OhtaYamazakiMcMahon>)で、それぞれ約3日間の記録を早送



図4 マウス生物時計の神経細胞が刻むサーカディアン・リズム
生物時計(左右2つの視交叉上核)に存在する個々の神経細胞が24時間周期で発光を繰り返す。神経細胞内の生物時計の遺伝子Period1の働きに合わせ、遺伝子操作によって組み込まれたクラクダ発光タンパクが発色する(写真の白く光る部分。実際は緑色。1つ1つの粒が個々の神経細胞に対応している)。

りの動画として見る事ができる。

また、恒明環境で飼育されたマウスでは、睡眠覚醒サイクルも24時間周期ではなく1~3時間周期となり、1日に複数の睡眠・覚醒サイクルを頻繁に繰り返す。このような睡眠サイクルの乱れが、睡眠によって誘導される成長ホルモンなどの成長促進物質の分泌を乱している可能性がある。また、赤ちゃんマウスを対象とした研究から、大人の生物時計より赤ちゃんの生物時計の方が光環境により敏感であり、恒明環境で乱れた赤ちゃんの生物時計は、規則正しい明暗サイクルで効果的に矯正できることが明らかになった。^{9,10)}

おわりに一赤ちゃんの生体光回路を制御して一

従来から、心理学的アプローチを

中心に赤ちゃんの視覚発達の研究が多数行われてきた。しかし、その生理学的・分子生物学的メカニズムはまだよくわかっていない。触覚・嗅覚・聴覚・味覚に比べ、赤ちゃんの視覚は出生時に未熟なため、生後環境の影響を最も受けやすい知覚機能といえる。とくに、保育器という人工環境で平均3か月間も生活する早産児にとって、視覚環境の整備の意義は大きい。過去の臨床研究で指摘されたように、光環境は赤ちゃんの体重増加といった身体発達に影響する。これまでの知見では、節細胞(メラノプシン)を光センサーとする生物時計は、ホルモン・神経伝達を介し、光情報を体全体の器官に伝達できる唯一のシステムである。この体全体に張り巡らされた生体光回路「生物時計」の詳細を明らかにし、最適な視覚環境を

見つけることが赤ちゃんのより健全な発達を実現する1つの鍵になるだろう。将来、異なる波長の光を使い生体光回路のさまざまなスイッチを押すことにより、代謝・内分泌の視点から早産児のより適切な発育を実現することできるかもしれない。

参考文献

- 1) Provencio I, Rodriguez, I. R., et al.: J. Neurosci., 20: 600-605, 2000.
- 2) Reppert S M, Weaver D. R.: Nature, 418: 935-941, 2002.
- 3) Moore R Y: J Biol Rhythms., 8 Suppl: S3-9, 1993.
- 4) Hao H, Rivkees S A: Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 96: 2426-2429, 1999.
- 5) Atkinson J: The developing visual brain, Oxford University Press, pp.107-134, 2000.
- 6) Mukaida S, Miyuki K, et al.: IEICE (A), J85-A(10): 1126-1137, 2002.
- 7) Sekaran S, Lupi D, et al.: Curr. Biol., 15: 1099-1107, 2005.
- 8) Sernagor E: Curr. Biol., 15: R556-9, 2005.
- 9) Ohta H, Yamazaki S, et al.: Nature Neurosci., 8: 267-269, 2005.
- 10) Ohta H, Mitchell A, et al.: Pediatr. Res., 60:304-308, 2006.



太田 英伸

東北大学病院
周産母子センター 助教

神奈川県立こども医療センター
小児内科での勤務を経て、
北海道大学大学院医学研究科
博士課程修了。米国ヴァン
ダービルト大学生物科学部

Research associate, 東北大学病院周産母子センター
医師、助手を経て、2007年より現職。専門は、発達
生理学、小児科学、時間生物学、生物時計の発達、
環境センサー遺伝子、人工環境デザイン、次世代人
工保育器の開発研究に従事。早産児・新生児の保
育環境デザインについての研究成果を挙げている。
2004年、Butterworth dissertation Award (国際
乳幼児学会)、2005年、日本時間生物学学会奨励
賞を受賞。著書に、「きちんとわかる時計遺伝子」(分
担、白日社、2007年)。