

博士論文

論文題目 時計遺伝子 Per1 と Per2 の協調による
体内時計制御機構とその病的破綻

氏 名 田宮 寛之

【目次】

	頁
要旨	3
序文	4
目的	18
方法	25
結果	72
考察	96
結語	123
謝辞	125
文献	127
表	147
図の説明	152

時計遺伝子 Per1 と Per2 の協調による体内時計制御機構とその病的破綻

生殖・発達・加齢医学専攻

指導教員名 秋下 雅弘

申請者名 田宮 寛之

【要旨】

Per1 と Per2 は概日振動に必須の遺伝子であるが，両遺伝子の協調性に関しては未解明な部分が多い．本研究では新しい実験手法の開発とそれに基づく解析を行った．個体レベルでは 12 灯用 LED 光照度制御装置を開発し，任意のパターンの光をマウスに照射した際の概日リズム応答を検出可能な系を構築した．細胞レベルでは細胞レベルの Per2 ノックアウトレスキュー系を構築し，睡眠相前進症候群 (FASPS) の周期短縮を細胞レベルで再現することに成功した．これらの実験系を用い，短周期親和性の PER1 蛋白と長周期親和性の PER2 蛋白は協調し，非生理的な環境条件下において概日周期長を 24 時間に限定する役割を持っている反面，低柔軟性のため病的破綻しうることを示した．

【序文】

〈概日時計とその重要性〉

概日時計 (Circadian clock) とは、ラテン語の Circa (約) と dian (1 日) という語源からきており、約 1 日の時計という意味である。喘息発作は明け方に多く、心筋梗塞は午前中に発症しやすいなど、様々な生理現象や疾患の症状には日内変動があり、これらは概日時計の支配を受けている。この他にも概日時計は、睡眠覚醒リズム、血圧・体温調節、代謝、内分泌などの多様な生理的現象を制御している[1]。また、臨床的にも、睡眠障害や血圧変動のみならず、薬の代謝や薬物有害反応などとも密接に関係しているため、このメカニズムの理解は重要である。概日時計は地球の自転に合わせて光や温度などの環境に積極的に適応するために進化してきたと考えられており、シアノバクテリアのような原核生物から、赤パンカビ、シロイヌナズナといった植物、ショウジョウバエ、ニワトリ、ヒトといった動物まで進化的に保存されたシステムである。概日時計を生物が持つ利点としては、生理機能を十分発揮することができるよう、生体内の様々なリズム（例えば、睡眠覚醒リズムなど）を、1 日の環境変化を予測し予め準備しておくことが可能になる点が挙げられる。この他にも、生物は季節の変化を感知する際に概日時計を使用して光の長さを感じている例が知られている[2, 3]。また、渡り鳥の中には、太陽の位置と概日時

計が示す時刻を比較することで方角を感知しているものがあることも知られている[4].

概日時計は 1) 自律振動性, 2) 同調性, 3) 温度補償性の 3 つの特徴を持っている(図 1 A). 1) 自律振動性とは, 概日時計は地球の自転に近い約 24 時間の内在性のリズムを持っていることをいう. 例えば我々は外界の手がかりの全くない洞窟の中で過ごしていても, 約 24 時間の行動周期を保ち続ける. 2) 同調性とは, 概日時計は昼夜の変化に由来する外界からの刺激(特に光)によってリセットされることをいう[5]. 概日時計をリセット可能な刺激には様々なものがあるが, 最も強力な同調因子は光であり, 睡眠障害やせん妄などに対して施行される高照度光療法が例として挙げられる. 日没直後の光は位相(時刻)を後退させ, 夜明け前の光は位相を前進させる. 3) 温度補償性とは, 概日時計の周期は気温の変化によらずあまり変化しないことをいう. 通常 of 化学反応は 10°C 変化すると約 2 倍反応速度が変化するが, 地球の自転は南極であれ熱帯であれ 24 時間であるので, 気温変化で周期が変化すると意味をなさない. よって, 概日時計は普通の生物反応と違い, 温度変化に影響されないような機構を持っている[6, 7]. 地球の自転は, 46 億年前には 5-8 時間程度であったが, 多細胞生物が生まれた 8.5 億年前頃(新原生代)には一日は 20.1 時間と既に現在の 24 時間に近くなってきたと考えられる. 概日時計に使用される分子は植物

と動物では大きく異なっており、更に動物の中でも、分類群により異なる。例えば、後述する転写抑制に重要な時計遺伝子 Period (Per) の結合パートナーとしてショウジョウバエでは Timeless (Tim) が使われているが、哺乳類では、下等動物では全く別の役割をしている Cryptochrome (Cry) が使用されている[8]。このように分子のレベルで必ずしも保存されていない部分もある。尚、用語の確認であるが、周期とは任意のある時点の状態から、同じ状態に一度循環して戻るまでの時間のことをいい、振幅とはその振れ幅のことをいう(図 1 B)。

従来、哺乳類概日時計の本態は転写のフィードバックループであると考えられ、図 2A のようであると考えられてきた[9]。E-Box (Enhancer Box) といわれる DNA 上の配列に Bmal1 (Brain-Muscle Arnt Like Protein 1), Clock (Circadian Locomotor Output Cycles Kaput) と呼ばれる時計遺伝子から転写翻訳された蛋白が結合し、これによって Per, Cry という遺伝子群が転写翻訳される。これらは、蓄積してくると、自分自身の転写を抑制する。転写が止まるとやがて PER はリン酸化、分解され、また再度 Per, Cry の転写が回復してくる。このような自己フィードバックループが概日時計の本体と考えられてきた。しかしシステムズバイオロジーを主体とした近年の詳細な解析によってこのモデルは不正確な部分もあることが示され、より正確には、哺乳類概日時計の本体は遺伝子の転写のネットワークであり、約 20 の遺伝子群が互いに順序良く活性

化，抑制し合うようなネットワークであるという説が主流となった．これら約 20 個の遺伝子のうち，機能しなくなると概日リズムがなくなったり，周期が変わったりする大事な遺伝子のことを時計遺伝子という．各々の遺伝子のプロモーター領域には朝，昼，夕の 3 つの転写調節エレメント(スイッチ)が存在し，各スイッチが順々にオンになることで約 24 時間の周期をもつ自律的な遺伝子発現変化を保っている[10-13]．尚， 鵜飼-蓼沼らの報告から，この概日時計の転写ネットワークは，リプリッシレーターと遅れをもった負のフィードバックループという，自律的に振動するとされる 2 つの構造の組み合わせであるとの説が提唱されている[14]．

個々の細胞が概日時計を持っているため，NIH3T3 線維芽細胞に時計遺伝子 Per2 のプロモーター下にルシフェラーゼ(Luciferase: Luc)遺伝子を挿入したベクターをトランスフェクションし，ルシフェリン(Luciferin)入りの培地で培養し，光電子倍增管(photomultiplier tube:PMT)で測定すると，明瞭なリズムを観察することができる(図 2C, D)[11]．一方，私達の全身の数十兆個の細胞の概日時計の時刻が分散してしまうと，個体としての統制がとれなくなる．哺乳類ではこの問題を，視床下部の視交叉上核(suprachiasmatic nucleus: SCN)といわれる左右各々約 1 万個のニューロンからなる小さな神経核が中枢時計として全身の時計を制御することで解決している(図 2B)．このことは，げっ

歯類では実験的に証明されており[15]，ヒトでも 多系統委縮症，腫瘍，術後，認知症などで視床下部の前部が障害されると，概日リズム障害が惹起されるという報告がある[16, 17].

視交叉上核は外界からの光を，網膜を介して受け取るなどして概日時計の位相を決定する．更に，神経投射や液性因子でのシグナルを使用し，全身の概日時計が同じ位相を示すように指令している．未解明な点も多いものの，経路の一つの例としては，副腎を介して強い同調因子であるコルチゾールの日内変動に変換される経路が挙げられる[18-20]．一方，連日固定の限定された時刻に給餌されたラット(図 2B の食事(制限給餌))は，給餌前に行動量が増え，体温が上がり，コルチゾールの血中濃度も増加する[21]．この現象は，視交叉上核を手術的に壊されて概日リズムの無いラットでも起こることや，制限給餌によってマウスの全身臓器の位相は動くが視交叉上核の位相は変わらないことを示唆する報告などから，外界からの刺激が視交叉上核を経由せず，直接末梢時計に入力されることもあると考えられている[22, 23].

また，宗教的な断食で日中の摂食を断つと血中コルチゾールのリズムが二峰性になると報告されており，人間においても外界からの刺激が直接末梢時計に入力されることもあると考えられる[24]．尚，様々な生物において夜間に強い光を浴びた場合，概日リズムが消失すること(シンギュラリティー現象)

が1970年に報告されていた[25]。このメカニズムに関しては近年、鵜飼らの解析により、1個1個の細胞レベルの概日時計の位相が分散することで、全身レベルでは概日リズムが消失して見えることが解明された[26]。

概日時計は臨床的にも重要である。概日時計が制御していることが最も明らかなのは睡眠覚醒リズムであり、この異常は睡眠障害を引き起こす。時差ぼけやシフトワーカーにおける睡眠障害は、急激な外界の変化や勤務時間の変化に概日時計が追従できないことによって起こる。認知症患者や高齢入院患者でみられる昼夜逆転を伴うせん妄も、概日時計の位相が外界の位相と合わなくなることで起こるものである。また、夕暮れ前に眠くなってしまい、早朝に起床してしまう睡眠相前進症候群と呼ばれる睡眠障害がある。この疾患群の中に常染色体優性遺伝病のもの(家族性睡眠相前進症候群, familial advanced sleep phase syndrome: FASPS)があり、時計遺伝子 *Per2* の点突然変異により、概日時計の周期が短くなることで引き起こされることが明らかとなっている[27]。

概日時計が外環境に追従できない場合、生産性の低下や不注意による事故が増加することは容易に想像がつくが、それに加えて長期的な健康においても悪影響を及ぼす。疫学的には、シフトワーカーは肥満、脂質異常[28]、糖尿病発症[29]、血圧上昇[30]のリスクが高い。また、大腸がん、乳がんのリス

ク[31]や虚血性心疾患[32, 33]のリスクも上昇する。更に概日時計を実験的に崩した際の代謝調節異常も数多く報告されている。具体的には、明期(休息期)のみ摂食したマウスは暗期(活動期)のみ摂食したマウスと比較して、同じカロリー摂取量でも体重が増えやすいこと[34]や、28 時間周期で生活した被験者における血中レプチン濃度の低下、血中インスリン濃度、血糖値、血圧の上昇が起こること[35]や、20 時間の明暗周期でマウスを飼育すると、体重増加が多く、前頭前野の前辺縁皮質(実行機能と感情に関連)の神経細胞形態異常がおこり、行動にも異常がおこる[36]ことなどが示されている。

このように臨床的にも重要な概日時計であるが、受精卵の時点では概日時計は存在しておらず、妊娠後期から急速に形成されてくることが知られている[37]。このメカニズムとしては、時計遺伝子のエピゲノム変化や視交叉上核の形成の影響などが考えられている。また、老化と共に徐々に時計の振幅が弱まってくることも分かってきており、視床下部ニューロンの老化や、後述する SIRT1 (sirtuin 1)活性の減少などが考えられている。この発生による変化は細胞レベルでも再現できることが知られており、ES 細胞 (Embryonic stem cell) レベルでは概日時計を持っていないが、分化誘導をさせることで、時計遺伝子の概日振動が発現してくることが示されている[38](図 3)。更に、iPS (induced pluripotent stem cell) 化することで概日時計を失うことも示されてきている。

近年、長寿遺伝子として知られる SIRT1 が概日時計と老化、代謝を結ぶ重要な因子であると考えられるようになってきた。幅広い生物種において寿命を延ばすことが知られる唯一の方法はカロリー制限であり、代謝と老化の関係が示唆されるが、この作用に SIRT1 が重要であると言われている。また、動脈硬化の抑制作用やインスリン抵抗性改善作用を持つアディポカインであるアディポネクチンは AMPK (AMP (Adenosine monophosphate)-activated protein kinase) 経由で SIRT1 を活性化し、骨格筋でのミトコンドリアの機能とインスリン感受性を調節すると報告されており [39], SIRT1 は老化現象やインスリン抵抗性に重要である。一方、SIRT1 は酸化還元反応の補酵素である NAD⁺ (nicotinamide adenine dinucleotide の酸化型) の合成が時計遺伝子群の制御を受けることで、NAD⁺ 依存的な脱アセチル化酵素である SIRT1 の活性は概日変動を示す。逆に、SIRT1 は PER の脱アセチル化や CLOCK 依存的なクロマチンリモデリングを調節することで時計遺伝子発現を調節し、この相互作用は概日時計の振動を強固なものにする [40, 41]。更に、SIRT1 と概日時計老化の間の関連も示されつつある。SIRT1 は重要な代謝調節遺伝子である PGC-1 α (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1- α) の脱アセチル化を介して古典的な概日時計のループとは別のループを作成し、概日振動を増幅していると報告された。更にこの研究では、SIRT1 の発現が増加すると、概日時計

の老化が遅延することも示された[42]。以上のように、SIRT1は代謝と概日時計をリンクする極めて重要な蛋白質であると考えられる。上記の AMPK や PGC-1 α に加えて REV-ERB α (NR1D1 : nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1), PPAR α (peroxisome proliferator-activated receptor- α)なども代謝と概日時計に関わる蛋白質と考えられている。

老化関連疾患や精神疾患においても概日時計は極めて重要であり、様々な時計遺伝子変異マウスにおいて、老化関連疾患や精神疾患が発症することが示されている(図 4)。また、様々な時計遺伝子の SNP (single nucleotide polymorphisms: 一塩基多型) と様々な疾患の関連も示唆されてきている[43]。特に双極性障害は背景に概日リズム障害の関与が示唆されている点から興味深い[44]。以下に具体的な例を挙げていく。1) Bmal1: 脂肪細胞分化促進と機能をコントロールする役割がある[45]。Bmal1 遺伝子を破壊したマウスでは、脂肪細胞の分化が阻害され、脂肪を蓄えることができなくなり、高脂肪食の摂取により脂質異常症が引き起こされる[46]。更に、内皮依存性の血管拡張不良[47]や血管傷害時の内膜肥厚の亢進が示されている[48]。また、Bmal1 を脾臓のみに破壊したマウスでも、インスリンの放出が低下することで糖尿病を発症することが示されている[49]。ヒトにおいても、Bmal1 と Timeless の SNP と、双極性障害 1 型の関連も指摘されている[50]。更に、Bmal1 のハプロタイプは 2 型

糖尿病の有病率とも有意に関連することが知られている[51]. 2) Clock: Clockの変異体マウスでは, ランゲルハンス島の形成が阻害され, インスリンの放出が減少し, 糖尿病を発症する[49]ことや, 摂食量の増加を介して肥満やメタボリックシンドロームを発症する[52]ことが示されている. 更に, 血管傷害時の内膜肥厚の亢進が示されている[48]. ヒトでも, Clockのハプロタイプは, 肥満やメタボリックシンドロームの有病率と関連することが言われている[53]. また, ClockのT3111C多型をもつ双極性障害患者では, 持たない患者と比較し, 再発率が高く[54]高度な不眠になりやすいと報告されている[55]. 3) Cry: Cry1/2ダブルノックアウトマウスは, 特発性アルドステロン症様の食塩感受性高血圧を発症することが示されている[56]. 特に, 本研究成果が出る前は特発性アルドステロン症のモデルマウスは存在しなかったため, 内分泌学的にもこの知見は興味深い. Cryは肝臓での糖新生を抑制する働きがあり, 遺伝性の肥満症モデルマウス(db/dbマウス)の肝臓でCryを過剰発現させると, インスリンの感受性が上昇し, 血糖値が低下したという報告もある[57]. ヒトでも, Cry2の一塩基多型は2型糖尿病の有病率と有意に相関することが知られている[58]. 4) Per: Perは腫瘍発生との密接な関係が言われており, 破壊された場合, 腫瘍発生の増加, 寿命の短縮, 生殖能の低下などがしめされている. 骨量の増加も言われているが, この機序はレプチン依存的な交感神経の制御によるものと考え

えられている[59]。また、Per2 変異体マウスでは、グルタミン酸作動系に変調があり、アルコール摂取量が増加することも示されている[60]。更に、Per2 ノックアウトマウスは内皮依存性の血管拡張不良[47]や心筋虚血における梗塞範囲が広いことを示した報告も出てきており、午前中発症の心筋梗塞が重症化しやすいこととの関連も示唆され興味深い[61]。また、PER2 は白色脂肪細胞内で、PPAR γ 2 と結合することで Elovl3 (Elongation of very long chain fatty acids 3)などのプロモーター上にリクルートされ、不飽和脂肪酸の増加を促進しているとする報告もある[62]。近年ではPer2 の SNP と血清中の遊離脂肪酸濃度の関連も言われてきている[63]。また、Per3 と Timeless の SNP は統合失調症との関連が示唆されている[50]。更に、Bmal1, Npas2 (Neuronal PAS domain-containing protein 2), Per2 の 3 遺伝子の SNP が、冬季うつ病の発症に関与するという報告もある[64]。Per3 の多型の一種である VNTR (variable-number tandem-repeat) と双極性障害 1 型の発症年齢との関連も言われてきている[65]。他にも、Bmal1 と Per3 の SNP が双極性障害と関連するとする報告もある[66, 67]。更に、PER のリン酸化酵素には CK1 の他にも GSK3 β も知られており、PER のリン酸化による核移行調節などの概日時計の調整機構が言われている[68, 69]が、双極性障害の治療薬であるリチウムのターゲットでもある[70]。GSK3 β の T50C 多型は双極性障害の晩発性と断眠療法への反応性[71]、

リチウムの長期有効性[72]と関連があったとする報告がある。このように老化関連疾患や精神疾患など[66]における概日時計や時計遺伝子の役割はますます注目されており、今後の研究の発展が期待される[73] (図 4)。ただしこれらの影響は、時計遺伝子の概日時計を介した影響と介さない影響を切り分けることは難しく、解釈には慎重を要する。また、各時計遺伝子の変異体で共通する表現型が、概日時計を介した影響である可能性もあるが、概日時計の停止している位相が異なっているだけという可能性もある。このあたりにネットワークを対象とした研究の難しさがあり、今後の画期的な研究手法の開発が期待される場所である。更に、ヒトの多型の報告はいずれも因果関係を示すものではない。

症状や生理現象だけではなく、Pharmacokinetics (薬物動態学)や Pharmacodynamics (薬力学)にも日内変動が存在する。よって、体内時刻に合わせた投薬により薬効を上げ、有害事象を軽減できると考えられている。このような方法は時間治療と呼ばれる。もっとも、一般的な内科診療においては、脂質異常症治療薬、降圧薬、血糖降下薬、喘息治療薬などで時間治療は以前より行われてきた。近年では更に、抗がん剤の投与メニュー[74, 75]やインターフェロンの投与[76]などに関しても、効果の増大と有害事象の予防が可能だと報告されている。

時間治療を実際に行う場合、実際の時刻ではなく概日時計の時刻に合わせた投与が必要になる。かつて、概日時計の時刻の測定には長時間の拘束と多数の血液サンプリングが必要であった。ところが近年、2つの簡便かつ画期的な手法が開発されたため、ここで紹介する。一つ目は分子時刻表という手法であり、たくさんの血中代謝産物をマスマススペクトロメトリーで一度に測定することで、少ない採血回数で概日時計の時刻を測定することが可能である[77, 78]。もう一方は3時間おきに採取した毛根から mRNA を抽出し、定量的 PCR (quantitative polymerase chain reaction, qPCR) を施行する方法であり、採血することなく低侵襲な方法で概日時計の時刻を測定できるようになった[79]。今後、更に簡便に概日時刻を測定できるようになれば、個々の患者の概日時計に合わせた医療の実践につながるであろう。

老化関連疾患の中でも主要な位置を占めている認知症においても、概日リズム障害が多数報告されている。更に近年、先述の光による同調機構などを用いた時間生物学的治療が注目を集めている。三島らは、認知症患者14人を対象に、朝の高度光照射療法を行うことで、夜間睡眠の質が向上し、異常行動が減少すると報告した[80]。また、オランダの介護施設では、認知症患者189人を対象に2*2群のランダム化比較試験が行われ、高度光照射療法とメラトニン(行動リズムの位相調節もある[81])投与により、認知機能評価尺度と睡

眠の改善が得られることが示された[82]。更に、日本の 67 名の高齢者を対象にした多施設共同プラセボ対照ランダム化臨床試験において、メラトニンアゴニストであるラメルテオンのせん妄予防効果に関する効果が証明されている[83]。このように、高度光照射療法などの睡眠・覚醒障害、夜間せん妄などにおける有効性は次々と示されてきており、時間生物学的治療の益々の発展が期待される。高度光照射療法はこれらの疾患には保険適応になっていないが、概日リズム障害、冬季うつ病などでは標準治療のひとつである[84]。最低 2500 ルクス程度で、プロトコールにもよるが 2-3 時間のケースが多い。

【目的】

申請者の生涯目標としての研究の動機は、「全身性の生理的な現象を分子の言葉で因果性を持って記述する」ことである。内科病棟におけるコルチゾールの日内変動の測定や、昼夜逆転を伴うせん妄患者による夜間呼び出しの経験などから、概日時計の生理学的、病態生理学的、臨床内科学的な重要性を実感した。更に、早朝白血球減少症の 2 例の発見を通じて、一般診療で通常意識されないところにも概日時計の重要性が潜んでいることも実感した[1]。また、概日時計は細胞内で起こっている分子レベルの現象が、個体レベルの表現型に直結するため、個体レベルの現象を細胞レベルでモデル化しやすい。したがって、分子レベルでの因果関係を証明する実験系を組みやすいため、全身性の現象を分子の言葉で因果性を持って記述するには最適な系である。序章で見てきたように、概日時計は臨床的にも極めて重要であるため、その本態である時計遺伝子群も極めて重要であることが示唆されるが、ヒトの概日リズム障害や疾患における時計遺伝子の働きは殆ど知られていない。そもそも、視交叉上核が本当にヒトで重要であるかどうか明確に証明された論文も、検索範囲内では認められなかった。尚、申請者が後期レジデントとして勤務した虎の持病院内分泌センターには、下垂体手術の権威である山田正三先生がいらしたため、申請者も多数の視床下部障害患者を診療する機会があった[85]。これらの患者で

は、摂食、体温調節、認知機能、電解質コントロールなど様々な機能が一度に障害されており、概日リズムだけ取り出してみるのは難しいのではないかとと思われる。そもそも、様々な疾患と時計遺伝子の多型の関連は示されているにもかかわらず、狭義の概日リズム障害性疾患と関連が知られている多型は、非 24 時間睡眠覚醒障害における Melatonin 1A 受容体の R54W と A157V ミスセンス多型[86]、睡眠相後退症候群における Per3 遺伝子の V647G 多型[87]、Clock の T3111C 多型[88, 89]など、極めて限られている。概日リズム障害は環境要因や社会的要因の影響も大きく、厳密な評価に必要な恒常条件や脱同調条件の作製は膨大な労力とコストがかかる。更に、倫理面での制約もあるため、ヒトでの研究は難しいのだと考えられる。また、概日時計には進化的淘汰圧が強くかかってきており、概日リズム障害が出るような個体は淘汰されている可能性も考えられる。実際、F1 ハイブリッドマウスのコホートを用い、明暗 12 時間:12 時間の条件で飼育し、自律振動周期長と寿命の関係をみた研究がある。この研究では、自律振動周期長が 24 時間から 7 分以上離れている群と離れていない群で比較すると、24 時間に近い群の寿命が約 20%長いことが示されており、内因性概日周期長と環境周期の一致の度合いは、強力な淘汰圧になると考えられる[90]。また、律速段階以外の反応を担う遺伝子群に多少の変異が入っても、概日時計の周期が 24 時間からずれにくいロバストなネットワークになっていたり、

多因子疾患のように多数の遺伝子の影響で複雑に表現型が出ていたりすること
も、ヒトの概日リズム障害における時計遺伝子の変異が殆ど知られていない原因
として考えられる。近年の研究では、11 人の若年者と 13 人の高齢者を対象に、
強制脱同調プロトコールによって外界の影響を取り除き、内因性の概日周期
長を測定した研究では、自律振動周期長は 24.18 時間であり、個人差はほぼ 30
分以内と極めて精密なものであった（尚、この研究結果は、ヒト概日時計の 25
時間仮説と、加齢に伴う周期短縮による朝型化仮説の双方に否定的な結果とな
っている）[91]。また、遺伝子発現量の概日リズムの周期性の測定のためには、
最低 4 時間おきの 3 周期分程度のサンプルが必要であり、究極的には視交叉上
核で測定する必要があることから、ヒトでの内因性の遺伝子の変化やエピゲノ
ムの変化などを測定することは現状の技術ではほぼ不可能である。更に、この
ような理由から、加齢による遺伝子発現量変化を測定するような研究も困難で
ある。近年 うつ病患者の白血球では Clock, Per1, Bmal1 の mRNA の発現量が変
化するとする報告がみられたが[92]、単一点の測定にとどまっており、これ
では位相がずれているのか、絶対値が変わっているのか、振幅が変わっているの
か、末梢時計の問題なのか、中枢時計の問題なのか分からない。更に、恒常条
件の測定でもないため、内因性の問題なのか外因性の問題なのかが分からず、
概日時計の状態に関する示唆は殆どない。以上のように、技術的側面や煩雑さ

などの障壁の影響からも、ヒトにおける時計遺伝子と疾患の関係は不明な点が多い。しかし、ヒト概日リズム障害と時計遺伝子の異常の因果関係が示されている疾患は、検索範囲内において家族性睡眠相前進症候群のみではあるが、存在する。更に変異が起こると知られている遺伝子も Per2 の S662G 変異とカゼインキナーゼ 1δ (Casein kinase 1δ: CK1 δ) の T22A 変異 [93] の 2 種類のみであり、各々 1 家系から見つかっているのみである。後述のように CK1 による Per2 の順序だったリン酸化は”概日周期長を決定するために最も重要な機構”であるため、この過程を制御することは、概日周期長を制御するような治療のターゲットとなりうる。また、先述のように、概日時計の同調機構に最も重要なのは、光刺激による視交叉上核における Period 遺伝子群の誘導である。もしこの過程を自在に制御できるようになれば、様々な概日リズム障害の治療において有用である。したがって、本研究では上述のように概日時計において最も重要な遺伝子のひとつである Period 遺伝子に着目して研究を行った。Period は PAS (Per-Arnt-Sim) 領域を持つ転写制御因子と考えられている。Period は光応答において重要であるため臨床的な重要性も示唆される反面、単独での転写抑制機能は弱いなど、機能においては不明な点が多い。尚、Period 遺伝子はショウジョウバエでは 1 種類だが、哺乳類では Per1, Per2, Per3 の 3 種類のホモログ (Period homolog 1, 2, 3) が存在し、Per1 と Per2 の相同性は極めて高い(図

5) [94]. Period 遺伝子は概日振動に必須の遺伝子であり, Per1/2 ダブルノックアウトマウスは恒常条件下では無周期になる[95]. ただし, 明暗条件ではマスキング(様々な外的要因により, リズムの振動体そのものは影響を受けていないが, 観察される出力が修飾されたり, 覆い隠されたりしている状態[96])と言われる現象で, 見かけ上リズムがあるように見える. また, “時間の定規”の主要構成遺伝子と考えられており, 多数のリン酸化サイトが存在している(図5). このPER 蛋白の順序だったリン酸化が概日周期長決定に決定的に重要であると考えられており[97], 温度補償性もカゼインキナーゼ 1 (CK1)による PER 蛋白のリン酸化過程に内在されていると考えられている[7]. すなわち, CK1 による Period のリン酸化反応には, 温度補償性やロバストな周期決定などの様々な重要な要素が内在されている. この反応は概日時計のフィードバックループにおける律速反応であるため, この反応の速度が一定である限り, 他の反応が温度など様々な摂動に影響を受けたとしても 24 時間周期のロバストな時を刻み続けることができると思われる. また, シアノバクテリアでは転写フィードバックループよりも, リン酸化サイクルが重要なことが知られており, 翻訳後振動体と呼ばれている[98]. 哺乳類では翻訳後振動体の存在は明らかではないが, PER 蛋白は, Tet On システムを用い, 恒常的に Per2 mRNA を少量発現させても PER2 蛋白の蓄積は概日振動することが知られており[99], 翻訳後振動体の

実体の可能性も考えられている[100, 101]. 更に, Period 遺伝子の発現誘導は同調機構において主要な役割を果たし, 光刺激が視神経からの神経伝達によって視交叉上核(suprachiasmatic nucleus: SCN)の細胞に入り, Period 遺伝子が誘導されることが重要であると考えられている[94, 102-104]. 特に, 後述のように Per1 と Per2 の応答パターンの違いが示されており, プロモーターや 3' UTR を介した制御の違いの可能性が考えられている(反面, 翻訳領域の違いはあまり注目されていない)[105-107]. このように, Period 遺伝子群は概日周期の決定においても, 位相(体内時計の時刻)の決定においても, きわめて重要な役割を果たしていることが分かる. 尚, Per3 の SNP は様々な疾患との関連が言われているが, Per1, Per2 に関しては殆ど知られていない. Per1 や Per2 は概日振動に必須な反面, Per3 は必須ではないことから, 淘汰圧が弱かった(重要でなかった)ことが推察される.

次に, 夜間にマウスに光を照射した際の視交叉上核の遺伝子発現変化のパターンをみた複数の研究をまとめて概説する(図6)[94, 102, 108, 109]. これらの研究では, 夜間マウスに光を照射し, 経時的に視交叉上核(SCN)をサンプリングし, RNA の変化をマイクロアレイや In situ hybridization を用いて検出している. これらの結果を大きくまとめると, 主に 2 つのパターンの遺伝子群に分けられる. 一方は, Per1, Fos, NR4A1 (nuclear receptor subfamily 4,

group A, member 1)のような” Early type gene” , すなわち光に応答して素早く mRNA 量が増加し, その後の光の状態にかかわらず, すぐに減少する遺伝子群である. もう一方は Per2 のような” Late type gene” , すなわち光照射後, ゆっくりと増加し, その後も長時間光を当て続けると発現上昇が持続するタイプの遺伝子群である. 以上まとめると, Per1 と Per2 は光刺激, 特に長時間の光刺激に対して, 異なった反応を示す. したがって, Per1 や Per2 のノックアウトマウスでは長時間続く光や緩徐に変化する光に対して, 異なった反応を示すのかどうかという疑問が生じる. したがって今回申請者は, Per1, Per2 の各々のノックアウトマウスの恒常明(LL)条件下, 緩徐に変化する光条件下での概日周期長, 概日時計の振幅, 追従性を観察した. 更に, その結果から導かれた Per1 と Per2 の協調機構の分子メカニズムの追求を行った. これらの実験には, 申請者が新規に開発した実験系を用いた.

【方法】

〈本研究で用いた pMU2, pMU2-Per2 などのプラスミドの由来〉

まず本研究で使用するコンストラクトの用語の確認であるが、プラスミドのバックボーンは pXXX というように小文字の p で表記する。またある遺伝子のプロモーター配列は、P(XXX) というように表記する。尚、Per2 のプロモーターは近位 296 bps の Per2 short プロモーター：P(Per2s) と、3518 bps を使用した Per2 long プロモーター：P(Per2L) の 2 種類を使用している。これら 2 つのプロモーターは Repoter を用いた解析から、位相が同じことが示されている [110]。また、Luc(c) という表現は、Luciferase 遺伝子の N 末側に PI-Psp1 site を追加することで目的に蛋白の C 末融合を可能にした Luciferase 遺伝子のことを指す。更に、XXX::Luc という表現は、XXX の C 末 Luciferase 融合遺伝子(蛋白)を意味する。遺伝子名を表記する場合は Per1, Per2 と最初の文字のみを大文字にし、蛋白を指す場合は、PER1, PER2 と全て大文字で表記した。

pCMV-Sport2 mPer1 は Baylor College of Medicine の Cheng Lee 様 [111] より AddGene 社経由で譲渡頂いた。pCR8-P(Per2L)-Luc(c), pTVCI2-RareCutSite -ROSA 4k arm- Gateway <attR1/2>- FRT <P(PGK) - puro - polyA> - ROSA short arm は鶴飼-蓼沼磨貴様より譲渡頂いた。pMU2-Per2, pMU2, pGL3-P(Per2s)-dLuc, pCAGGS-ROSA-TALEN-N153C63-R, pCAGGS-ROSA-TALEN-

N153C63-L は鵜飼英樹先生より譲渡頂いた。pMU2-P(CAG)-EGFP は村松万里江様より譲渡頂いた (CAG: CMV early enhancer/chicken β -actin[112])。また、申請者自身が理化学研究所で作製したものも含め、理化学研究所の研究成果有体物として、pCAGGS-ROSA-TALEN- N153C63-R, pCAGGS-ROSA- TALEN- N153C63-L, pTVCI2-Rosa26-P(Per2L)-Per2(WT)::Luc, pTVCI2-Rosa26-P(Per2L)-Per2(FASPS)::Luc, pCR8-P(Per2L)-Luc(c), pCR8-P(Per2s)-Luc(c), pMU2-Per2(WT), pMU2-Per2(FASPS), pTVCI2-P(Per2s)-Per2::Luc, pTVCI2-DT-Rare-ROSA long 4k-Gateway(attR)-FRT(P(PGK)puro)-short arm, pMU2, pGL3-P(Per2s)-dLuc, pGL4-P(Per2s)-Luc2CP の各ベクターを東京大学医学部附属病院との MTA により移転して使用した。また、pIRES2-EGFP は細胞分子薬理学教室の飯野正光先生より譲渡頂いた。オリゴ DNA は主に北海道システムサイエンス社の簡易カラム精製のものを用いたが、一部 Eurofin 社の OPC 精製のものも含まれている。

〈各ベクターの作製〉

用いた大腸菌は DH5 α (TOYOBO と Takara の双方の製品を使用), HST08 (Takara), SURE2 (アジレント・テクノロジー), One Shot® ccdB Survival™ 2 T1R (Invitrogen), HB101 (Takara) の 5 種類である。培地は全て LB 培地を用いた。pMU2 ベクターは DH5 α , Chloramphenicol 30 μ g/ml, 37°C で培養した。pCR8 ベ

クターは DH5 α , Spectinomycin 37.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 30°Cで培養した. pTVCI2 ベクターは HST08, Ampicillin 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 30°Cで培養した. pCAGGS-ROSA-TALEN は SURE2 を用いて Ampicillin 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 30°Cで培養した. pTVCI2-DT-Rare-ROSA long 4k-Gateway(attR)- FRT(P(PGK)puro)-short arm は One Shot® ccdB Survival™ 2 T1R を用い, Ampicillin 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Chloramphenicol 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 30°C, 攪拌速度 60 rpm 程度で培養した. pIRES2-EGFP は HB101, 37°C, Kanamycin 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で培養した. pEGFP-N3 (Clontech)は DH5 α , 37°C, Kanamycin 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で培養した. pCMV, pGL3, pGL4 ベクターは DH5 α , Ampicillin 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 37°Cで培養した. 各ベクターは Wizard SV Miniprep kit (Promega), Pureyield MiniPrep kit (Promega), Pureyield MidiPrep kit (Promega)のいずれかを用いて精製した. トランスフェクションに使用するものは Pureyield を用いた. 更に, ターゲッティングに使用するものは Endotoxin の残存を減らしターゲッティング効率を大幅に上昇させるため, Pureyield MidiPrep kit を用いた.

pGL4-P(Per2s)-Luc2CP: pGL3-P(Per2s)-dLuc の P(Per2s)を Nhe1, Xho1 で切り出し, ゲル切り出し(Wizard SV gel and PCR clean-up system:Promega), BAP (Bacterial Alkaline Phosphatase) C75 (Takara)処理後ライゲーションを行い, pGL4-Luc2CP (Promega)に挿入した.

pMU2-Per1: pCMV-Sport2 mPer1 をテンプレートに, KOD Plus Neo を用いて増幅

した. 0.5 ng の Template を取扱説明書の通り, 25 μ l の系で

I-Sce1_mPer1_F_modified : ATTACCCTGTTATCCCTAATAGTGGTCCCCTAGAAGGGGC

PI-Psp1_mPer1_R: ACCCATAATACCCATAATAGCTGTTTGCCAGCTGGTGCTGTTTTCTTCTG

の 2 つのプライマー各 0.3 μ M を用いて増幅した. 条件は 98°C 2 分 1 サイクル, 98°C 10 秒 68°C 1 分 56 秒 (30 秒/kb) 35 サイクル, 68°C 3 分 1 サイクル, 4°C である (kb: kilobase). ゲル切り出しの後, PI-Psp1, I-Sce1 で切断し, pMU2-Luc(c) にクローニングした. フルシークエンス (Greiner) を行い, 変異が入っていないことを確認した. シークエンスに使用したプライマーは, T7_eev: AAGGCTAGAGTACTTAATACGA, Per1Seq_N1: GCTCAAACCTCGACTGCCAC, Per1Seq_N2: TACTCATTGCCGAGCGCATC, Per1Seq_N3: CTCCTGCTCCAGTGACTTTC, Per1Seq_N4: ATGATGGAAGACCTGCCTGG, Per1Seq_N5: CCTTGGTGCTCCCTAACTATC, Per1Seq_N6: CCAGGTCATTAAGTGTGTGC, LucSeqR1: AGGGCGTATCTCTTCATAGC である.

<FASPS, mut6, TRCP 変異体の作製>

まず申請者は予備実験として, 各ポリメラーゼを用いて Per2 に FASPS 変異を導入した際に, 翻訳領域にどの程度ランダム変異が入るかを確認した. FASPS 変異を入れたプライマーを用い, pMU2-Per2 に対し Inverse PCR (polymerase chain reaction) を行い, 354 nm 70% の UV (ultraviolet) を 5-10 秒だけ当ててゲル切り出しを行った. その後リン酸化 (T4 Polynucleotide

Kinase (Takara)), ライゲーション(DNA Ligation Kit <Mighty Mix> Takara)を行った後, DH5 α に形質転換を行い, 各 5 クローンをピックアップして Per2 の翻訳領域のフルシーケンスを行い, Gflex TKS (Takara), KOD plus Neo (TOYOBO), KOD Fx Neo (TOYOBO)の変異率(変異/base)による変異率を計算すると, Gflex TKS で 1/7548, KOD Plus NEO で 1/11322, KOD Fx Neo で 1/3235 であり, KOD Plus Neo が最も変異率が低かった. PrimerSTAR MAX (Takara)では欠失により増幅はできなかった. したがって本研究では以降 KOD Plus Neo を用いて Per2 を増幅している. 尚, mut6, TRCP Per1 の各コンストラクトでは, 更に変異を減らすため, UV を当てずに切り出している. (隣のレーンに少量流し, 切り出す分は隣のレーンに流す. レーン間を切り分けて, reference 用のレーンにだけ UV を当てて目印を入れ, それを指標に UV を当てずに切り出しを行う). PCR は上述とほぼ同じ条件だが, 伸長反応は 4 分 12 秒に伸ばしている. PCR で変異導入した後には必ず翻訳領域のフルシーケンス (Greiner) を行い, 変異が入っていないことを確認した. シーケンスに使用したプライマーは, Per2Seq_N1: AGCTGCTAATGTCCAGTGAG, Per2Seq_N2: ATCTGATCGAGACGCCTGTG, Per2Seq_N3: ATAGAAAGGGACAGCTCAGG, Per2Seq_N4: AACTATCTCCAGGAGCGGTC, Sequence_Flag_Per2_F_2966: TCTTCCAGTCCAGAGGCAGT, Sequence_Flag_Per2_F_3532: GTGTTGAAGGAGGACCAGGA である.

pMU2 に入った Per1, Per2 の各変異体は PI-Psp1 (NEB), I-Sce1 (NEB), Ssp1 (Takara) で切断後, ゲル切り出しを行い, pCR8-P(Per2L)-Luc(c) の PI-Psp1 site, I-Sce1 site にクローニングした. これらのエントリーベクターに対し, pTVCI2-DT-Rare-ROSA long 4k-Gateway(attR)-FRT(P(PGK)puro)-short arm を UV を当てずにゲル切り出しを行い, 欠失変異体を除去したものと LR 反応 (LR clonase, Invitrogen) を行い, pTVCI2-Rosa26-P(Per2L)-Per2(or Per1)::Luc の各変異体を得た. ターゲッティングを行う前には必ず, 制限酵素切断による各フラグメントの長さの確認と, 翻訳領域のフルシーケンスを行った.

pMU2-::Luc(c): pCR8-P(Per2L)-Luc(c) の Luc(c) を PI-Psp1, PI-Sce1 で切り出し, PI-Psp1, PI-Sce1 で切断し BAP 処理した pMU2-::Luc(c) にクローニングした. 更に, PI-Psp1, I-Sce1 で切り出した Per1, Per2 の変異体をクローニングした. 増幅に用いたプライマーは, FASPS_Forward: GGTGTGGTGTCCCTCACCAGCCAGT, FASPS_Reverse: CTCGGCCTTGCCTGGCAGCGT, mut6_Foward: CGCCTACGCCGCCGCCATCGTGCATGTGGGCGACAAAAAG, mut6_Reverse: CACTGGGCGGTGAGGGCCACCACACTCTCGGCCTTGCCT, TRCP_Foward: GCCTATGGGAGCCTGGGCAGTAACG, TRCP_Reverse: ACTGGCGCCGCTGTGGGGGACAGGCT である.

pTVCI2-Rosa26-(Antisense)-P(Per2s)-Per2-IRES2-Luc2CP: まず pMU2 より Pvu1

(ThermoScientific, FastDigest), Pst1(ThermoScientific, FastDigest) で P(CMV) (cytomegalovirus promoter)を切り出すことで、代わりに P(Per2s)を挿入し, pMU2-P(Per2s)を得た. pMU2-P(Per2s)を Kpn1 (ThermoScientific, FastDigest)と Sal1-HF (NEB)で切断し, P(Per2s)に HU2 カセットがついたものを切り出した. 次に pCR8-P(Per2L)-Luc(c)のバックボーンと AttL 配列を pCR8_F1454 Kpn1: TAA GGTACC GAATTCGACCCAGCTTTCTTG と pCR8_R684_Sal1: CTC GTCGAC AGAAGGGCGAATTCGGAGCC を用い, KOD Plus Neo で増幅し(伸長反応が 1 分 24 秒の他は先述と同様), Kpn1, Sal1 で切断後, 両者をライゲーションすることで, pCR8-(Antisense)-P(Per2s)を得た. 次に, pGL4-P(Per2s)-Luc2CP と pIRES2-EGFP を Bgl2 (ThermoScientific, FastDigest) と Nco1 (ThermoScientific, FastDigest) で切断し, IRES2 配列を 挿入することで, pGL4-P(Per2s)-IRES2-Luc2CP を得た. 更に, pGL4-P(Per2s)-IRES2-Luc2CP と pCR8-(Antisense)-P(Per2s)を Sal1(NEB)で切断し, IRES2-Luc2CP を挿入することで pCR8-(Antisense)-P(Per2s)-IRES2-Luc2CP を得た. ここからは先述の方法で Per2 や Per1 の 翻 訳 領 域 を 挿 入 し, LR 反 応 を 行 う こ と で, pTVCI2-Rosa26-(Antisense)-P(Per2s)-Per2 (or Per1)-IRES2-Luc2CP を得た. pTVCI2-Rosa26-P(Per1)-Per2::Luc: Per1 プロモーターは-4.0 kb から転写開始点近傍まで, 散らばる 5 つの E-Box の全てが位相の決定に重要であることが

示されていた[110, 113]ため, -5.0 kb から+1.6 kb まで先行文献に沿ってクローニングした. pMU2-P(Per2s)-Luc(c)より P(Per2s)-Luc(c)を Kpn1 (Takara) と Bam H1 (Takara)で切断し, 切り出した. また, pCR8-P(Per2L)-Luc(c)の AttL 配列を含むバックボーンを pCR8_F1445_BamH1: TAAGGATCCGAATTCGACCCAGC と pCR8_R693_Kpn1: CTCGGTACCAGAAGGGCGAATTCGGAGCCT を用い, PCR にて増幅し, Kpn1 と Bam H1 で切断し, これらの断片をつなぎ合わせることで, pCR8-P(Per2s)-Luc(c)を得た. Per1 プロモーター6752 bps をマウスゲノムより KOD Plus Neo を用いた PCR にて増幅した. プライマーには, P_Per1_5Prime_For: GATGCCCTCTTCTGGTGTGTCTG と, P_Per1_3Prime_Rev: CCATACAGTGGAGGACGAAACAG を用いた(伸長反応が 3 分 45 秒の他は先述と同様). pCR8-P(Per2s)-Luc(c)を Kpn1 と Bgl2 で切断し, T4 Polymerase(Takara)で断端を平滑化した. その後, P(Per1)の PCR 産物とライゲーションを行い, pCR8-P(Per1)-Luc(c)を得た. その後は先述の方法で Per2 (or Per1)の翻訳領域を入れ, LR 反応を行うことで, pTVCI2-Rosa26-P(Per1)-Per2 (or Per1)::Luc を得た. ターゲッティングの前には翻訳領域のフルシーケンスを行った.

<Per1/2 キメラの作製>

pMU2-::Luc(c)の PI-Psp1, I-Sce1 切断後のベクターをバックボーンとして用いた. pMU2-Per1, pMU2-Per2 を鋳型に, 各々PCR をかけ, 取扱い説明書

の四分の一スケールで InFusion クローニングを行った．つなぎ目のみシーケ
 ンス確認をし，大腸菌 2 クローンの表現型をアッセイに用い，表現型が同じで
 あることを比較している．プライマー配列は，Per1(L638)-Rev：
 AGCTCTCCAAATACCTGAGGATGCTGTCCAG, Per2(E618)-For：
 GGTATTTGGAGAGCTGCAGCGAGGCAGCC PI-Psp1:Luc-Rev：
 TCACCCATAATACCCATAATAGCTGTTT, I-Sce1-For: ACAAGAATTACCCTGTTATCCCTAAT,
 Per1(Q314)-Rev：CGGAAGGGCTGGTACCGAGGCCCTGGATC, Per2(P286)-For：
 GTACCAGCCCTTCCGCATGACACCCTACC, Per1(S53)-Rev：
 CGTTTCCACTTGAGCCATTGCTGTTTGCATC, Per2(G40)-For：
 GCTCAAGTGGAACGAGAACTGCTCCACGG を使用した．

＜行動リズム解析＞

理化学研究所発生再生科学総合研究センター(CDB)の行動解析室にて行
 った．具体的には 3 重遮光構造になっている 36 匹用(6 段*6 ケージ)の行動解析
 ラック(日本医化)を用いて行った．マウスは理研 CDB 中ケージ(15 cm * 21 cm *
 高さ 15 cm)にて 1 匹ずつ飼育した．恒常明条件(LL: Light-Light)，明暗条件
 (LD: Light-Dark)，の光刺激は冷陰管を用いて行った[77]．また，光条件には，
 恒常暗条件(DD: Dark-Dark)の条件も存在する．この行動解析データは赤外線セ
 ンサー(NS-AS01, Neuroscience)により蓄積され，ClockLab (Actimetry)を用

いてダブルプロット法[114]にてプロットし， 周期長の計測はカイ二乗ピリオドグラム[115]による解析を行った． 尚， 雌マウスは性周期によって行動周期長が若干変化することが知られているため， 本解析は原則雄マウスを用いて解析を行っている． 色彩照度計(コニカミノルタ CL-200A)を用いてラック内の底面での照度を測定したところ， 赤外線センサーの真下で 500 Lux 程度， 冷陰管直下で 1000 Lux 程度であった． 暗条件での明るさは色彩照度計の検出限界(0.1 Lux)を下回り， 測定不能であった． 行動解析を始める前のマウスは， 原則理化学研究所発生再生科学総合研究センターの飼育室(105B 室)にて飼育した． 明暗 12 時間:12 時間(8-20 時が明期)の条件であったが， 各ラック， 各段には照明はついていないため， 飼育していた段や位置により日中の照度差は大きい(申請者が測定したところ， 数Lux-数十Lux程度)と思われる． 更に行動解析に用いたのと同じケージの場合， 最大 5 匹までまとめて飼っているなど， 飼育密度の違いもある． 尚， アクトグラムの表示に際しては， 代表的な一匹のみを示しているが， 周期などの数理解析には死亡や無周期化などで脱落した個体を除いて全て用いて解析を行っている．

予備実験: C57B6(Cg)-Tyrc-21/J X C57B6/N background) (ジャクソンより購入) を C57B6/J とかけあわせ， 更に F1 を交配 (Per2 (WT/mut) Tyr (WT/mut) X Per2 (WT/mut) Tyr (WT/mut)) したマウスを升本耕平先生より譲渡頂き， 申

請者が Per2, Tyrosinase の双方のジェノタイピングを施行した上で行動解析を行った。測定開始時で 40-48 週齢であった。また, Tyrosinase の (+/+), (+/mut), (mut/mut) の 3 通りの遺伝子型に加え, 雄と雌が混在していた。ただ, Tyrosinase 遺伝子型や性別による表現型の差は無かった。数が少なかったこともあり, まとめて解析した。尚, 先行文献では色素変異体と概日行動リズムの関連が示唆されていた[116]が, 結局差はなかった。周期解析はこの実験のみ, 二階堂愛先生に解析頂いた。解析は, 自己回帰(Autoregressive: AR) モデルを用いて行われている。AR モデルの次数決定法には, 赤池情報量基準 (Akaike Infomation criterion, AIC) を用いた。Yule-Walker 法, 最小 2 乗法, 最尤法では次数を決定できなかった。周期はスペクトル密度の値がピークになる周波数により決定した。WT の恒常暗 (DD) 条件では 2 匹で外れ値が出現している。Per2 (+/mut) の恒常暗 (DD) 条件では 2 匹で外れ値が, 1 匹で脱落が起きており, 更に, Per2 (mut/mut) の恒常明 (LL) 条件では脱落が 1 匹, 外れ値が 1 匹おり, これらは最終的な平均値の解析より除外している。

実験 1-1: 使用したマウスは, 図 10A に示してあり, 使用したノックアウトマウスは ldc ラインである[95]。遺伝的背景を揃えるため, Per1(-/-)Per2(-/-)雄と C57B6/J 野生型 (Wilde Type: WT) の雌マウスをかけ合わせ, F1 の Per1(+/-)Per2(+/-)マウスを得た。具体的には砂川玄四郎先生より譲渡頂いた

Per1(-/-)Per2(-/-) (2011 年 8 月 10 日生まれ(IVF 番号 113930, 両親共に 2011 年 3 月 23 日生まれ)) と日本 SLC より購入した野生型の雌マウス 8 匹 (2011 年 11 月 23 日生まれ) を交配し, 雄 13 匹, 雌 22 匹を得た. 更に, 理化学研究所に Per1(-/-)Per2(-/-) を導入する際のクリーニングの IVF ストック (Per1(-/-)Per2(-/-)と C57B6/J をかけ合わせたもの) の受精卵を井上健一先生に移植して(I115067)頂き, Per1(+/-)Per2(+/-)マウスを雄 23 匹, 雌 17 匹を得た. これらの F1 マウス同士を雄 17 匹*雌 36 匹でかけ合わせた. そこで得られた F2 の 97 匹の雄をジェノタイピングして各遺伝子型 6 匹ずつを実験に用いた. 尚, Per1(+/+)Per2(+/+), Per1(+/+)Per2(-/-)の各マウスは 6 匹未満 (各々 4 匹, 2 匹) しか得られなかったため, WT は日本 SLC の C57B6/J を 4 週齢 (2012/6/25 生) で購入して用いた. また, Per2(-/-)マウスは Per1(+/-)Per2(-/-)マウス (2012/4/3 生) 同士を体外受精させてえられた Per1(+/+)Per2(-/-)マウス (2012/6/27 生) を砂川玄志郎先生より 6 匹譲渡頂いて実験に用いた. Per1(+/-)Per2(+/-) 同士の交配で得たものとは当初は別々に解析したが, 周期長の表現型には差を認めなかったため, 最終的には合わせて解析している. 実験開始時点での週齢は 8-16 週齢である. 尚, 各遺伝子型での生下率が異なっている件に関しては, SPSS Version 22 (IBM) を用いて, 適合度検定を行った. 雄と雌の生下率を 0.5 であることを帰無仮説として二項検定を

行っても、 $p=0.271$ であり有意ではなかった。更に、211 匹の遺伝子型がメンデルの法則に従っているかを検討するため、9 つの遺伝子型が理論通りの分離比通りであることを帰無仮説としてカイ二乗検定を用い、適合度検定をしたところ、雄のみ ($p=0.399$)、雌のみ ($p=0.476$)、合計 ($p=0.211$) であり、メンデルの法則と有意に外れているということとはなかった。更に Per1 と Per2 各々の遺伝子型に対してカイ二乗検定を行っても、雄のみ ($p=0.592$)、雌のみ ($p=0.317$)、合計 ($p=0.258$) となっており、Per1 と Per2 の遺伝子型は独立であると考えられた。

実験 1-2: 実験に使用したマウスの遺伝子型と数は図 12A に示してある。全て雄マウスである。実験 1-1 の行程で用意した Per1(-/-)Per2 (+/+)マウス同士、Per1(+/-)Per2(-/-)マウス同士を各々交配させて用意した。WT (Per1 (+/+)Per2 (+/+))マウスは別途 C57B6/J マウス(2012 年 10 月 7 日-13 日生まれのもの)を 2013 年 1 月 24 日に 15 週齢でチャールズリバーより購入した。Per1(-/-), Per2(-/-)も含め、本実験に使用したマウスは全て 2012 年 8 月 17 日-2012 年 10 月 13 日生まれである。2013 年 2 月 7 日から実験を行い、実験開始時のマウスは全て 16-24 週齢である。実験行程の模式図は図 12B に示してある。各遺伝子型のマウスを 6 匹ずつ図 12B の a と b の行程に分けて実験を行った。周期性の指標は、恒常明(LL)条件下 4 週間の内後半 2 週間を解析に用い、カイ二乗ピリオドグラムで周期長を決定した後、Q(p) 値 (カイ二乗ピリオドグラムにおける

各々の仮周期における値) の周期長から前後 1 時間の有意水準を上回った値の平均値を周期性の指標として定義した。尚、本指標は一般的なものではなく、本研究で定義されたものである。周期性の指標の計算は山田陸裕先生に行って頂いた。その後の t 検定は申請者が行った。エラーバーは標準偏差(Standard deviation: SD)を用いている。

実験 2: WT のマウスは (2012 年 6 月 25 日生) C57B6/J を日本 SLC より 8 週齢で購入した。Per1(-/-), Per2(-/-) のマウスは各々実験 1-1 の行程で得られたマウス同士を交配してコロニーを作製し、この中から用いた。実験に使用したマウスは 8 週齢以上である。光を当てるプログラムは下記の式を用い、 $I=128+[0.5+A\sin 2\pi (x_{min}/(T_{hour}*60))]$ という式を用いた。個々のパラメーターは、I: 光の照射強度 (0-255 の整数値) , excel で ROUND(y, 0) で行う, A: 光照射強度の振幅。今回は” 127” とし、128 を中心に 1-255 の最大振幅で行った, T_{hour} : 光照射の周期, 22 時間から 27 時間までの 1 時間刻みで行う, x_{min} : 実験開始 x 分後, という意味である。このように、1-255 の間でサイン波状に光が変化するように、完全な暗 (Complete darkness) にならないように工夫した。尚、Per1(-/-), Per2(-/-) は各々 6 匹を用い、同時に実験を行い、最低 2 週間ずつ全ての周期長を経験させた。一方、野生型(WT) のマウスでは、12 匹のマウスを用い、短周期の刺激と長周期の刺激を与えたマウスは別のマウスとした。尚、

この時、長周期のマウスの方が消費した餌の量が 10-20%程度多かった。餌はケージのフタの上にはおかず、マウス用給餌器バスケット No. 4 (日本クレア)を用いた。本実験では環境(光)の周期の変わり目では位相を合わせることは行わず、20 時(飼育環境での ZT 12)を実験開始として照度が低下する位相(ZT 12)より開始のサイン波状の光を与えた。本装置はタイマー式にすることも可能なため、ケージ交換もしくはある周期の 2 週間の行程終了は、次の周期の 2 週間が始まる日の日中(8時から20時)に行い、午後20時までは一定の光量をキープした。

〈ジェノタイピング〉

1dc ライン：原則先行文献の通り行っている[95]。概して理化学研究所内で行われていた PCR のプロトコールを踏襲したが、紛らわしい長さの非特異的バンドが出やすく、申請者自身がプライマー濃度とアニーリング温度を再検討し、下記プロトコールを決定した。マウスの尻尾を離乳直後に切り出し、1.5 ml microtube (Watson) に入れた上で、360 μ l 50 mM 水酸化ナトリウムを加える。ヒートブロックで 95°C 10 分処理した後、On Ice にする。Vortex の後、微量高速冷却遠心機 (Tomy) で 13,000 rpm 3 分で遠心を行い。上清 1 μ l を反応に使用した。反応には Mighty Amp DNA polymerase Ver. 2 (TAKARA, R071A)を用い、プライマーは F: 0.3 μ M, R 0.15 μ M, Neo 0.15 μ M の 10 μ l の系で 98°C 2 分 1

サイクル, 98°C10 秒 64.8°C15 秒 68°C60 秒を 35 サイクル, 68°C2 分 1 サイクル, 4°Cキープ, である. Per1 も Per2 も同様のプロトコールである. 6 X Dye を足して 1.5% TAE (Tris-Acetate-EDTA) ゲルに全量流すと, Per1 (WT: 773 bp, KO: 540 bp) Per2 (WT: 810 bp, KO: 400 bp) に各々検出されるため, それを用いて判定を行った. プライマーは, Per1_ldc_F : CAGTACTTCTCTTTCTACATCCTGAGGACCG, Per1_ldc_R_common : CATTGCTATCACTGGAGGAGCCAGG, Neo_ldc_F : TGCCCCAAAGGCCTACCCGCTTCC, Per2_ldc_F : AGAACTTGTTGCTCCTGCTT, Per2_ldc_R_common : GGAAGCTTGTAAGGGGTGGT を用いた.

Brd ライン: 本研究では予備実験において Per2 の変異マウスのみを用いた [117]. ジェノタイピングのプロトコールは Jacson 003819 において公開されているものに則った. 成熟したマウスの尻尾を 5 mm 程度確保したのち, 核酸自動精製機 (KURABO) でプロトコール通りに精製したのち, 1 μ l を PCR に用いた. 反応には LA taq with GC (Takara) を用い, GC buffer I のもと, プライマー は Neo (neomycin) のセットは 0.076 μ M ずつ, Per2 のセットは 0.1 μ M ずつ入れ, 25 μ l の系で反応させた. 反応は, 94°C30 秒 1 サイクル, 94°C 30 秒 57°C30 秒 72°C 30 秒 35 サイクル, 72°C5 分 1 サイクルの後, 4°Cの行程である. 2% TAE ゲル 100 V 30 分で電気泳動をすると, Mutant =290 bp, Heterozygote = 308 bp and 290 bp, Wild type = 308 bp にバンドが得られた. 使用しているプライマーは,

oIMR0160_Per2_Neo_F : TCTGGACGAAGAGCATCAGGG, oIMR0161_Per2_Neo_R :
CAAGCAGGCATCGCCATG, oIMR8720_Per2_WT_F : TGGGAGGAACTCTTGTAAGCAGA,
oIMR8737_Per2_WT_R : AGCATCATGGCTGCAACACA である.

Tyrosinase: Primer3 (Andreas Untergasser and Harm Nijveen) を用いて申請者が設計した. まず, 点突然変異部位を PrimeSTARMAX により増幅を行った. プライマーは, mTyr_79_F: TCTAAGAACTTGTTGGCAAAAGAAT, mTyr_361_R: TTCTAATCAAGACTCGCTTCTCTGT を 0.3 μ M ずつ用いた. 反応は, 98°C 10 秒 1 サイクル, 98°C 10 秒 55°C 5 秒 72°C 30 秒 (30-60 秒/kb) 45 サイクル, 72°C 2 分 1 サイクル, 4°C の行程である. 核酸自動精製機 (KURABO) で精製した DNA 溶液を 1 μ l 加えて 25 μ l の系で反応させた. 2% TAE ゲルで電気泳動後, Gel and PCR Cleanup kit (Promega) で精製し, 増幅用と同じプライマーを用いて Big Dye terminator 3.1 (ABI) でサイクルシーケンスを行い, Tyrosinase の点突然変異を判定した.

〈NIH3T3 でのサイクリングアッセイ〉

NIH3T3 細胞は指定されたロットの血清 (JRH 12603C-500ML Lot: 4C0702, 6K0357, Sigma 17012-500ML Lot: S. 12H183 のいずれか, 56°C 30 分で非働化済) を用い, DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, High Glucose, Pyruvate, Gibco 11995-065) 10% FBS, Penicillin Streptomycin (Gibco 15140-122) 1% (100

U/ml Penicillin, 100 mg/ml Streptomycin, P/S) 下で培養した。継代は 2 日に 1 回 約 2×10^5 /10 cm dish (Falcon 100 mm スタンダードディッシュ 353003, もしくは Iwaki tissue culture dish 3020-100) で行った。継代のポイントは 2 点ある。1) Trypsin/EDTA は 0.05% のものを用い、厳密に 2 分間で行うことが重要である。2) 10 cm dish にまき込む際には揺すったりせず、真ん中目にジグザグを描きながら注ぎ、10 分程静置し、できるだけ揺らさないようにそっとインキュベーターに運び、ドアをそっと閉める。この作業により、dish の縁に細胞の塊が出来にくくなり、長期に接触抑制がかかる細胞を維持可能である。ストックの作製は Cell Banker (十慈フィールド) を用いた。0.05% Trypsin/EDTA (Gibco) は 50 ml コニカルチューブ (Greiner もしくは Falcon) に分注して -20°C ストックをし、1 週間を目安に使い切るようにした。

実験行程は、まず、NIH3T3 細胞を 2×10^5 /35 mm dish にまき込む (Day 0)。NIH3T3 は 1 ml の培地が入ったところに 2×10^5 /ml に調整した細胞溶液 1 ml を Blue tip (QSP Standard Pipette Tips, Volume: 100-1000 μl) を使って測り取ってまき込む。dish を斜めに傾け、Blue tip で dish の底面と端の部分を洗い、張り付いた細胞を落とす。その後そっと dish を水平にし、Blue tip で 1 ml を中央近傍にジグザグに描きながら落としていく。水滴が出来たり底をひっかいたりしないよう注意しながら、水面上を動かしてまく。波の影響を受けぬよ

う 10 分静置した後、揺らさないようにそっと CO2 インキュベーターに戻す。こうすることで、揺らしたことにより端へ細胞が固まることを軽減(測定中に細胞が剥がれて概日振動検出ができなくなる)することができる。翌日 (Day 1) に 0.5 μg の pGL4-P(Per2s)-Luc2CP と pMU2 1.5 μg を、FuGene6 (Roche) 3 μl とともにトランスフェクションする。FuGene 6 は Expire 後 3-4 年経っても問題なく使用できるが、ロットチェックは必須である。FuGene 6 はプロトコールに沿って、Opti-MEM Reduced Serum Medium GlutaMAXSup (Gibco51985-034) と UltraPure Water(Gibco) を用いて行った。ピペッティングをできるだけせず、Yellow tip (200 μl QSP) で 40-50 回 Swirl することで混ぜるのがポイントである(ピペッティングすればするほど効率が落ちる)。翌日 (Day 2) 1 ml の培地を加え、更に 2 日後 (Day 4) より DMEM (High Glucose, HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid), no Phenol Red, Gibco: 21063-029) 10%FBS, P/S 1%, Beetle Luciferin, Potassium Salt (Promega E1601) 100 μM , Forskolin (A.G.Scientific Inc F-1026, FK) 10 μM の Medium に置換、30°C 大気中でシリコングリース(東レ)によりシールし、Low level light detection unit (C8801-01R, 浜松ホトニクス: 1ch PMT) で測定した。測定に用いたソフトは Lm300122 である。周期解析には Mathematica 9.0 (Wolfram) を用い、先行文献に習って自己相関解析を行った [12]。元のプログラムは粕川雄也先生が作

製したものだが、実際に使用したのは Circadian oscillation analysis tool (WebTSAnalysis_local_130808) という山田陸裕先生が改訂したバージョンである。大まかには、発光の時系列データからトレンドカーブを 42 時間スケールで引いてデトレンドし、相当する stiffness で smoothing spline method をかける。デトレンドされたデータを 15 時間から 30 時間の間の自己相関解析で最も自己相関の強い周期を概日周期と特定する。ホワイトノイズとの比較で p 値を計算し、p 値が 0.01 未満の場合に概日振動ありと判定する。原則生細胞発光測定の実験では、波形は測定された絶対値をそのまま提示している。1 ch PMT の場合には、1 分ごとの発光量が記録されるため、30 分の値を合計し、1 分あたりの平均値を計算し、それを 30 おきの値と読み替えて解析に用いた。コンドートロン[118]を用いた場合は、30 分おきの値がそのまま出てくるため、そのまま周期解析に用いた。尚、波形の表示に関しては、複数の dish があるときは 1 本 1 本の線が各 dish (well) に相当する。コンドートロンで 60 mm dish を測定する場合は、フラットファイル (KOKUYO) を切って作製した紙の仕切りをおいて測定している。4 つのチャンネルが 1 枚の dish に相当するため、4 つのチャンネルを平均値として提示した。原則そのままの波形 (cpm (count per minute) 値) を提示しているが、ノックアウトレスキューを行った細胞では相対振幅が小さいため、デトレンド波形の値を各点のベースライン(トレンドライン)の値

で割り算し、各 dish の波形を平均したもので提示している。

〈NIH3T3 の Forskolin 刺激による mRNA 応答の測定〉

NIH3T3 を Forskolin (Control は滅菌エタノール) で刺激し、 RNeasy kit (Qiagen) で RNA の回収を行う実験である。まず、光応答遺伝子はエタノール (EtOH) の刺激群でも数倍上昇してしまうため、これが極力見られないような実験系の構築を目指した。この理由は、光応答経路の CREB (cAMP response element binding protein) のリン酸化に MAPK (Mitogen-activated Protein Kinase) も関与しているからだと考えられる [119-121]。温度変化(熱い培地や冷えた培地を加える)や振とう (Swirl 5 回)、CO₂ インキュベーターから出す時間が長引く (pH 変化) だけでも光応答遺伝子群は上昇が見られたため、極力注意して手早く行った。条件検討の結果同じ条件で飼っていた細胞由来の conditioned medium に混ぜて試薬を与えるのが最も Negative control の刺激を下げる事が出来た (もっとも動きやすい nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1 (NR4A1) の変化を 2 倍以内まで抑えられた)。エタノール (EtOH) を 1 μ l だけ加えて優しく攪拌した場合もほぼ同程度であったが、定量性の問題などを考え、conditioned media の使用を行った。温度変化を抑えるため Hot Plate の使用も試みたが、使用すると逆に刺激になってしまった。Internal control は 2 種類を試したが、glyceraldehyde-3-phosphate

dehydrogenase (G3PDH) の方が値のばらつきは少ないが、FK 依存的に変化 (2 倍程度に上昇) するため、TATA box binding protein (TBP) の方が Internal control としては良さそうだった。したがって、 2×10^5 /35 mm dish で NIH3T3 をまき込み、3 日後に Forskolin (FK) 10 μ M (Final EtOH 0.05%) in conditioned media 1 ml で刺激し、経時的に RNeasy kit で回収するプロトコルを用いた。

Forskolin 刺激後 RNeasy kit を用いて mRNA を回収した。RLT 350 μ l で Cell Scraper を用いて Lysis を行ったのはメーカーのプロトコル通りだが、溶出の際はダイヤモンドチップ (Gilson, DL10) でカラムの端に残った RPE を除く工夫をした。RNA の濃度は NanoDrop にて測定 (濃度のバラつき 1 割以内が目標) し、UltraPure water (Gibco) を用いて 100 ng/ μ l に調整した。8 連チューブで random hexamer 1 μ l, RNase free water 8.5 μ l と RNA 溶液 2.5 μ l を混ぜ、Takara のサーマルサイクラーで 70°C 10 分処理し、すぐシャーベット上で急速冷却する。その間 5XBuffer 4 μ l, 0.1M DTT 2 μ l, 10 mM dNTP 1 μ l を混ぜておき、加熱が終わったらすぐ、SuperScriptII (Invitrogen Superscript 18064) を 1 μ l 混ぜて 8 μ l とし、tip は変えずに tube に素早く加え 25°C 15 分 42°C 50 分 70°C 15 分 1 サイクルで逆転写を行い、このまま -80°C へすぐに保存した。溶解後、この液を 10 倍希釈して定量的 PCR (quantitative PCR: qPCR) を行った。各サンプルは duplicate して行った。qPCR は Power SYBR (ABI), Prism 7900

(ABI)を用い、プライマーは各 2 μ M, 384 well plate で行った。Plate へのアプライはサンプルを最初にアプライし、次に Master Mix をアプライした。Master Mix はクロスコンタミの影響を最小にするため、薄いサンプルから順にアプライした。アプライにはEDP3-Plus (レイニン)を用いた。StandardはMouse Genome (G36402, Clontech) を 1/5 希釈から 1/15625 倍希釈までの段階希釈を使用した。希釈の際には Yellow tip を用いて 80 μ l + 20 μ l で行い、吸着分を意識して Yellow tip は変えずに行った。Master Mix 6 μ l, サンプル 4 μ l の計 10 μ l の系を用い反応を行った。反応条件は 95°C10 分 1 サイクル, 95°C15 秒 59°C1 分 45 サイクル, 4°Cである。各々使用したプライマーは各遺伝子の 3' UTR に設計された下記の配列である。Primer Express (ABI)を用いて Min length 60, Max length 150. で設計した。mPer1-4470F: CCTCACCCCAAGATGGGAG, mPer1-4531R: GGGTTCACGGACCTGGATC, Nr4a1#1-2189F: CACTCTGTTGTAAATAAGCTGACGC, Nr4a1#1-2249R : CCCCATCTCAACCTCTTCCTTT, Fos#1-1179F: ACTGTAGTCCTTCAGCGTCAATGT, Fos#1-1239R : CCACCTCGACAATGCATGATC, mPer2-5643F : TGTGCGATGATGATTCGTGA, mPer2-5713R: GGTGAAGGTACGTTTGGTTTGC, G3PDH-F : CAAGGAGTAAGAAACCCTGGACC, G3PDH-R : CGAGTTGGGATAGGGCCTCT, Tbp#3-1352F : CCCCTCTGCACTGAAATCA, Tbp#3-1412R : GTAGCAGCACAGAGCAAGCAA, mSox9_F: GGTTCAGATGCAGTGAGGAG, mSox9_R:

TCACAACACACGCACACATC

〈NIH3T3 での Sox9 のノックダウン実験〉

まず, Sox9 による siRNA の評価を 3 回の実験で行った. Silencer Select (Ambion) の #1 と #3 の 2 種類のコンストラクトを Xtreme siRNA transient transfection kit (Roche) を用い, 35 mm dish にまいた NIH3T3 にトランスフェクションした. 100 nM, 36 nM を比較すると, 36 nM は殆ど効果が無かった. 2×10^5 /dish と 4×10^5 /dish を比較すると, 2×10^5 の方がノックダウン効率は多少上昇したが, ダメージが大きかったため, 4×10^5 /dish を採用した. 更に Xtreme の Dose を 5 μ l, 10 μ l, 15 μ l, 27.5 μ l の 4 通りで検討した. fluorescent siRNA (BLOCK-iT Alexa®Red Fluorescent Oligo, invitrogen: transfection efficiency control) の導入効率を見ながら観察したところ, Xtreme を 15 μ l 使用するのが 2 回の独立した実験において最も効率がよかった. 27.5 μ l では毒性も強く, 逆に効率が下がってしまった. 更に #3 よりも #1 のノックダウン効率が若干良かったため, 以下に示すようなプロトコールでノックダウン実験を行った. Day 0: NIH3T3 4×10^5 /35 mm dish でまき込んだ. Day 1: 培地交換の後にトランスフェクションを行った. 具体的には, Xtreme 15 μ l (in OptiMEM (Gibco) 100 μ l を混ぜて 5 分), siRNA 100 nM (2.75 μ g in OptiMEM 100 μ l) にて行い, 混和 15 分後細胞の上から注ぎ, 揺すって攪拌し, 37°C の CO2 インキ

ュベーターに戻した. siRNA のコンストラクトは 1) negative control siRNA (Ambion#2), 2) Sox9 siRNA (Ambion #1) を用いた. Day 3: 先述の検討した条件で刺激実験を行った. すなわち, Hot plate は用いず, トランスフェクションする細胞と全く同じ条件で培養した細胞の conditioned media を使用した. 具体的には, アッセイに使用しない dish から conditioned media を回収し 15 ml コニカルチューブ (Greiner) に入れる. そして, 30 μ M になるよう FK を混ぜて CO2 インキュベーター内で 30 分処理した. 刺激では, 無刺激以外のサンプルに 1 ml の FK 溶液 (3X) をそっと入れた後 (final 10 μ M), インキュベーター内に戻した. その後, 時系列に沿ってサンプリングを行った. cold PBS 2 ml で 1 回 wash し, RNeasy kit (Qiagen) の RLT 500 μ l にて 15-20 回ピペッティングし回収 \Rightarrow 80°C へストックした. 尚, Dbp (albumin D site-binding protein) も測定したが, FK 依存的に減少傾向であり, Sox9 のノックダウンの影響ははっきりとは見えなかった.

<HEK293 細胞の培養>

基本的には NIH3T3 と同様である. 3×10^5 /10 cm dish でまいて 3 日おきに継代を行った. 0.05% Trypsin/EDTA 処理は 37°C 1 分に留めている.

<ウエスタンブロットによる NIH3T3 の内因性 Sox9 の発現確認>

Sox9 の発現ベクターは pCMV-Sport6-mSox9 を用いた. Control のベクタ

ーには pCMV-Sport6 を用いた. 更にトランスフェクション効率の確認用に pEGFP-N3 (EGFP: enhanced green fluorescent protein)ベクターも用いている. Day 0 で NIH3T3 と HEK293 細胞を 2×10^5 /35 mm dish にアプライし, Day 1 に FuGene6 3 μ l とベクター 2 μ g を混ぜてトランスフェクションを行った. Day 2 に培地を 1 ml 追加し, Day 3 に蛋白の回収を行った. ただしこの時の FuGene6 のロット(12171100)と NIH3T3 の相性は悪く, 他の実験で使用しているロット(93513925)よりも大幅にトランスフェクション効率が悪かった. Day 4 に蛋白を回収している. 溶解は RIPA buffer 500 μ l に Complete protease inhibitor cocktail EDTA (-) (Roche)推奨量と phosphatase inhibitor cocktail 100X (ナカライ)を混ぜ, ピペッティングをした後, Rotator RT50 (タイテック)を用い, 4°Cで Rotation を 1 時間行った. 12,000 g 4°Cで 20 分遠心した後, 上清を回収, Sample buffer を同量混ぜ, 96°C 5 分ボイルしたのち, -80°Cで保存した. 蛋白量の定量は Bradford 法 (BIORAD) 595 nm OD で定量したが, RIPA が干渉したため, 1/10 希釈で再検し 5-10 μ g/lane と概算された. いずれも少量だったため, 15 μ l で load し容量を揃えた. 電気泳動は XCell SureLock™ Mini-cell (Invitrogen), NuPAGE Bis-Tris 4-12%, MOPS gel (BIORAD), Buffer は MOPS buffer (Upper buffer には Antioxidant 添加) を用い, 200 V 50 分で行った. 転写は Xcell II™ Blot module (Invitrogen) と PVDF Filter paper Sandwich 0.45

μm poresize (Invitrogen)、Bicine buffer を用い、30 V 1 時間で行った。ブロッキングはBlocking One (ナカライ) 1 時間で行った。一次抗体はRbx Sox9 LV 1390359 (Chemicon, polyclonal) を block One solution 1.5 ml に 2000 倍希釈で溶かし、ハイブリバッグに入れて 4°C でオーバーナイトで Rotation して反応させた。二次抗体は Anti rabbit HRP (Donckey) を TBST 10% ブロッキング溶液に 10000 倍希釈し室温で 1 時間振盪した。Wash は TBST で 5 分*3 回行った。検出には LAS-1000 (富士)、ケミルミワン (ナカライ) を用いた。リブロットには R0 水で洗った後 restore western reblot stripping buffer (ThermoScientific) で 30 分処理し、TBST で 3 回洗った後、ブロッキングから一次抗体と同様に行った。Tublin 抗体を 300 倍希釈し、先述同様のハイブリバッグ法で反応させ、2 次抗体は Anti mouse (Amersham) を 5000 倍希釈して 1 時間反応させた。

〈Rosa 26 へのターゲッティング〉

この実験は Per2 ノックアウト ES 細胞と pCAGGS-Rosa-TALEN-N153C63-R, pCAGGS-Rosa-TALEN-N153C63-L, pTVCI2 シリーズのプラスミドを譲渡契約により理研から譲渡頂いた上で、申請者が東京大学医学部附属病院にて施行した。

〈ES 細胞の培養〉

Per2::Luciferase Knock in/Knock in (Per2::Luc KI/KI) [122] ES 細胞は理化学研究所発生再生科学総合研究センター変異マウス開発ユニットで樹

立され、洲崎悦男先生が馴化させたものを譲渡頂いた。Per2(-/-) ES 細胞は申請者が Per2(-/-) 同士の交配を行い、プラグのついた雌マウスを小出直史先生に御渡しし、ES 細胞を樹立頂き、譲渡頂いた。本 ES 細胞が正しく Per2(-/-) であることは、3i キメラマウスの行動解析で概日周期長の表現型により確認されている。Per1/2 ダブルノックアウト ES 細胞は、合成生物学研究グループで樹立されたものを、洲崎悦男先生よりフィーダー無で培養をはじめて 2 継代目の状態で譲渡頂き、申請者が 2i/LIF/gelatin の条件に馴化させた。

Dish のコーティングには、Gelatin from porcine skin (Sigma G2500) を超純水(MiliQ 水: Millipore)に溶かしたものをを用いた。Autoclave 後、dish に注ぎ、37℃30 分以上処理した上で使用した。ES 細胞の培養には、GMEM (Glasgow Minimum Essential Medium , Gibco 11710-035), KnockOutSR (KnockOut™ Serum Replacement Gibco 10828-028: KSR) 10%, Fetal bovine serum (Sigma, NIH3T3 と同じロット指定: FBS) 1%, 1 mM Sodium Pyruvate (Gibco), 1X MEM NEAA (Gibco 11140-050, NEAA: Non-Essential Amino Acids), 100 μ M β -Mercaptoethanol (Wako, β -ME) を用いた [123]。SteriCup (0.22 μ m, Millipore) でろ過滅菌した後に使用した。更に、培養用の培地には 3 μ M CHIR99021 (Axon 1386, DMSO (Dimethyl sulfoxide) で 1000X ストック), 1 μ M PD0325901 (Wako, DMSO で 1000X ストック) (以下 2i と略) [124] を加えて

SteriCup (0.22 μm : Millipore)でろ過滅菌した。その後, ESGRO mLIF (500X, Millipore ESG1106: 以下 LIF と略) を 2×10^3 Unit/ml で添加して培養を行った[125]。継代は 60 mm dish で2日に1回行った。PBS (Gibco) でwashし, 0.05% Trypsin/EDTA (Gibco) 0.5 ml で 37°C 5%CO₂ 2 分処理し, 1 ml 2i(-)LIF(-) の培地を加え, Blue tip (QSP)で 10 回ほぐした。3.0 ml GMEM 培地 (2i(-) LIF(-)) を加えて更に 5 ml pipet でピペッティングしたのち, 35 μm Cell Strainer (BD Falcon) を通し, コニカルチューブにうつして 1000 rpm 5 分 室温でバケット型遠心機 (Tomy LC-121, EX-125, EX-126) で遠心を行い, 上清を Yellow tip (QSP) 付のパスツールピペット (Iwaki, IK-PAS-9P) で吸引した上で, 1 ml 2i(-)LIF(-)の培地で 20 回ピペッティング(Blue tip, QSP)を行った。Trypan Blue と等量混ぜ細胞数をカウントした後, GMEM 2i(+)LIF(+) 培地 4 ml の入った Gelatin coated 60 mm dish (Easy grip, Falcon)へ 2×10^5 細胞をまき込んだ。ES 細胞のストックには, GMEM/KSR/FBS 培地 55%, FBS 25%, DMSO 20%の割合で混ぜ, Millex GP PES filter (Millipore) でろ過滅菌したもの(ストック培地)を用いた。400 μl を Cryotube (Corning 2.0 ml tube もしくは Nalgene 1.5 ml tube) に入れておき, 1×10^6 に調整した細胞溶液を 400 μl 入れる。BICELL (日本フリーザー) を用いて -80°C にストックした。更に長期保存する際には液体窒素に保存している。融解には 37°C の Water Bath (タイテック) を用

い急速融解を行った。10 ml の GMEM/KSR/FBS/2i(-) 培地で希釈し、遠心後 60 mm gelatin coated dish にまき込んだ。

〈ターゲッティングと Colony pick up〉

安全キャビネット BIO-LABO CLEANBENCH (十慈フィールド NS-16B, NS-10B) を用い、吸引には VPUMP-140 (Iwaki) を用いた。Day 0 で 0.2% gelatin で処理した 35 mm dish (Falcon, easy grip) に 5×10^5 の Per2(-/-) ES 細胞をまき込み、5 時間後に Xfect Stem mESC reagent (Clontech) を用いて、pTVCI2 のターゲッティング ベクター 1 μ g, pCAGGS-ROSA-TALEN-N153C63-R 2 μ g, pCAGGS-ROSA-TALEN-N153C63-L 2 μ g を各々メーカーのプロトコール通りにトランスフェクションをした。ただし、以下の点を変更している。培地 2 ml でまき込み、1 ml を直前にとり除いた上で、Mixture を加えている。また、Polymer の Mixture と DNA の Mixture は swirl して混ぜている。更に、10 分処理した直後に 5% BSA (Sigma, Millex GP (0.22 μ m) で滅菌後) を終濃度 1% になるように加えることで、細胞へのダメージを最小限とした。トランスフェクション 4 時間後には培地交換をしている。その後は連日培地交換を行い、Day 3 に継代を行い、 1×10^6 細胞/60 mm dish (easy grip, Falcon) でまき込んだ。Day 4-Day 5, Day 6-Day 7 の 24 時間 *2 回各々 Puromycin (Sigma) 1.2 μ g/ml で選択を行った。Day 8 以降でタイミン グを見て Colony pick up を行った。具体的には、0.2% gelatin で処理した 24

well plate (TPP) と滅菌 1.5 ml microtube (Watson) に 50 μ l/tube で trypsin/EDTA (0.05%, Gibco) を入れて準備する. Ca と Mg 入りの PBS (Gibco) で 2 回洗った後, PBS 3 ml で浸し, クリーンベンチ内で位相差顕微鏡(40X) 下に清潔操作を行い, Yellow tip (QSP) で正円形, 均一で辺縁の明瞭なコロニーを吸い取る. これを滅菌 1.5 ml tube 内の trypsin の中に入れ, 37°C 5 分処理する. 100 μ l の GMEM/KSR/FBS 2i(-) の培地を入れ, Yellow tip で数回ピペッティングしたのち, 500 μ l の GMEM/KSR/FBS/2i/LIF の入った well に 100 μ l まき込む. 残りの約 60 μ l はスクリーニング PCR に回した.

<Screening PCR>

ES 細胞をピックアップした際の残りを遠心機 (Tomy, MRX-151) で 15000 rpm 1 分 4°C で遠心を行い, 約 30 μ l ずつ Sup を廃棄し, 100 μ L/tube の cold PBS (Ca(-), Mg(-), Gibco) で洗い, 15000 rpm 1 分 4°C で遠心する. PBS をできるだけ捨てた後, 0.2 mg/mL Protease K (PCR grade, Roche) を 50 μ L/tube で加えて 55°C 30 分 95°C 10 分 1 サイクルで, Thermal Cycler Dice (Takara) を用いて反応を行う. Plate 遠心機 (Plate Spin, Kubota) を用い, 2500 rpm 10 分で遠心を行った後, 上清 5 μ L を使用して 3' Arm 側の PCR にかけた. プライマーは ESP055/ESP056 を使用している. ESP は ES primer の略である. 配列は, ESP055 : TCCATCAGAAGCTGGTCGATC, ESP056 : GGTGAAATGCTTGACTCCTAGACTT である. KOD Fx

Neo (TOYOBO)を用い、プライマー各 0.3 μ M の合計 25 μ l の系で行った。ProK 反応溶液は 5 μ l 使用した。反応は 98°C2 分 1 サイクル, 98°C10 秒 60°C30 秒, 68°C4 分を 30 サイクルで行った。0.8% TAE gel に泳動し、4.0 kb のバンドの検出の有無で判定した。

<Arm PCR>

Screening PCR で組換えが確認された ES 細胞クローンを 60 mm dish でコンフルエント(培地が黄色くなる程度)になるまで増殖させ、半分を-80°Cストックに、その他をゲノム精製用の Pelet に回し、ゲノムを精製した。具体的には 60 mm dish 上の ES 細胞を Confluent (培地の色が黄色くなった) になったところで Trypsin/EDTA 0.05%で 2 分処理して剥がし、上清を除去した後、2 ml の 2i(-)LIF(-)培地で懸濁した。300 l*3 は各々ストック培地に溶かし、BICELL を用いてストックした。残りの 5.5 ml*2 は各々1.5 ml microtube に入れた後、遠心機 (Tomy, MRX-151)を用い 5000 rpm (1930 g) 2 分で遠心, Sup を吸引した。PBS (Ca(-)Mg(-))を 1 ml 添加, 遠心機 5000 rpm (1930 g) 2 分で遠心後, Sup を吸引し, -80°Cへ保管した。ゲノム精製の際には, ペレットに Salcosine lysis buffer (0.5% N-lauroyl sarcosine (Wako), 10 mM Tris (pH7.5), 10 mM NaCl, 10 mM EDTA, autoclaved) 500 μ l を加え, 10 mg/mL ProK 50 μ l (final 約 1 mg/ml) を加え, その Yellow tip の先で Pelet を優しくかき混ぜて浮かせた

上で、優しく 10 回 Invert し、65°C の heat block (10 分おきに優しく invert 3 回程度) 上で 1 時間処理する。20 分位かけて室温まで冷やしたのち、RNase A (Ribonuclease A, ウシ膵臓由来 (Roche) DNase inactivated with 80°C 30 分) を 1 μ l 加え、20 回優しく Invert した上で、15 分処理した。その後 550 μ l の TE 飽和フェノール(ナカライ)を添加、エッペン建てに乗せてゲノムが壊れないようにゆっくり Invert 100 回 し、15000 rpm (17000 g) 3 分遠心、500 μ l 程度 Sup を回収して、500 μ l の Ph/CIAA(ナカライ)を添加し、ゆっくり Invert を 100 回 行い、15000 rpm 3 分 (17000 g) 遠心を行った。Sup を約 450 μ l 回収した上で、同量のクロロホルム(Wako)を添加しゆっくり Invert を 100 回行い、15000 rpm 1 分 (17000 g) で遠心を行った。350 μ l の Sup を回収し、35 μ l NaOAc (3M pH 5.2, ThermoScientific), 350 μ l Isopropanol(Wako)を添加 3 回 Invert の後すぐ 8000 rpm (5000 g) で 5 分遠心を行い、上清をできるだけ除去し、70% EtOH (Wako) 800 μ l 追加して 8000 rpm (5000 g) で 5 分遠心の後上清をできるだけ除去して 30 分乾燥させたのち、TE (Tris EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) pH 7.5) 30 μ l で溶解し、濃度を NanoDrop 1000 (ThermoScientific) にて測定した。50 ng/ μ l に濃度を合わせた上で 5 μ l を 0.8% TAE ゲルに流して Integrity を確認したのち、問題なければこのゲノムを用いて PCR を行った。Embryonic stem cell primer (ESP)を用い、正しい

位置にターゲティングベクターが相同組換えで挿入されているかを確認するため、Target 5' (ESP222/PerPer-South-R2, 9.0 kb), WT 5' (ESP245/246, 8.5 kb), WT 3' (ESP247/056, 4.5 kb) に対し各々PCRを行った。いずれも KOD FxNeo (TOYOBO), プライマーは両側 0.3 μ M, Genome 200 ng の 25 μ l の系で行った。プライマー配列は ESP222 : GACAGGGTCTCTTACTAGCCTAAAC, ESP245 : TGCTGGCCTACTGCTGCCTCGATCTTAC, ESP246 : AGGACAACGCCCACACACCAGGTTAGC, ESP247 : CGTGGTGGAGCCGTTCTGTGAGACA, PerPer-South-R2 : GTACCAGAAGGGCGAATTCGGAGCC, 具体的な PCR 行程は、下記の通りである。

WT 5' : 94°C2 分 1 サイクル, 98°C10 秒 68°C4 分 30 サイクル

WT 3' : 94°C2 分 1 サイクル, 98°C10 秒 61°C30 秒 68°C2 分 25 サイクル

Target 5' : 94°C2 分 1 サイクル, 98°C10 秒 68°C6 分 32 サイクル

Marker は Perfect DNA Markers, 0.5-12 kbp (Novagen) を用いた。

全ての PCR で正しい長さのバンドが確認されたもののみを qPCR に回した。

<コピー数確認のための qPCR>

TATA box binding protein (TBP: Tbp#3-1352F/1412R) と Puromycin resistant gene (Puro: ESP243/244) 遺伝子の定量を行った。SYBR Premix Ex Taq GC (TAKARA #RR071A) を使い, 30 μ l の系にて行った。各配列は, Tbp#3-1352F: CCCCTCTGCACTGAAATCA, Tbp#3-1412R: GTAGCAGCACAGAGCAAGCAA, ESP243:

CTCGACATCGGCAAGGTGTG, ESP244: GGCCTTCCATCTGTTGCTGC である。プライマー濃度は TBP 0.5 μ M, Puro 0.2 μ M である。理化学研究所において Prism 7900 (ABI) で行われていたプロトコールでは Puro は 0.6 μ M, 15 μ l の系であったが, Prism 7300 (ABI) の装置では外れ値が出やすいため, 申請者自身の条件検討の後, 0.2 μ M, 30 μ l の系に固定した。サイクルは Preheat: 95°C60 秒 1 サイクル, Cycle step: 95°C10 秒, 60°C50 秒 45 サイクル, Dissociation: 95°C15 秒, 64°C60 秒, 99°C15 秒 1 サイクル, にて行った。定量方法は, 標準ゲノム (同様のターゲッティングを行った他の ES 細胞) の Standard Curve を用いた絶対定量にて行った。Standard は duplicate, サンプルは triplicate で行い, 外れ値 (Puro は dimer が発生しやすく, 外れ値を除外する必要がある) を除外した上で, Puro/TBP を計算し, 1 コピーのものを 2 つ選んで分化誘導アッセイに用いた。

<ES 細胞分化誘導プロトコール>

概略は図 19 に示してある。レチノイン酸(RA) 50 mg (Sigma R2625) を滅菌 DMSO (ナカライテスク) 1.25 ml に溶かし, 0.133 M のストックを作製し, 滅菌済みの Amber1.5 ml microtube (Camlab) に分注し, パラフィルム (Pechiney Plastic Packaging Company) を巻いて -80°C 遮光保存した。各実験開始時には 1 本ずつ溶かして 50 μ l + DMSO 615 μ l を 50 μ l ずつ小分注し, -20°C 保存, 1 回の培地交換ごとに使い切っていく方針とした。尚, レチノイン酸を使用する時

にはクリーンベンチの電気を消した上で操作を行った（色彩照度計で確認したところ照度を約 1/10 に落とせることが分かった）。分化誘導で Day 8 まで用いる培地の組成は DMEM（NIH3T3 と同じ）20%FBS（ロット指定）、0.1 mM MEM NEAA(Gibco), Penicillin 100 Units/ml, 100 µg/ml Streptomycin (Pen Strep, Gibco), 2 mM L-Glutamine (Gibco), 100 µM β-Mercaptoethanol(実験ごとに PBS 希釈し 0.1 M の濃度で調整, Millex GP, 0.22 µm (Millipore)によりろ過滅菌してから培地に添加する) を使用し、レチノイン酸は 1 µM になるように直前に用事調整した。ES 細胞は Day 0 に 2i(-) の GMEM/KSR/FBS で 1×10^6 / ml に懸濁したのち、10 ml の培地 (RA(+))が入った 10 cm 0.2% gelatin 処理した dish に Blue tip でまき込んだ。まき込む細胞数は細胞株ごとに Day 5 で subconfluent になるような微調整が必要である。まき込む際は細胞を真ん中目において前後左右に軽くゆすった。実験中は必ず 2 日に 1 回培地交換した。培地は 50 ml コニカルチューブに分注し、少しフタを緩めた上で、CO₂ インキュベーター内で Prewarm + CO₂ で平衡化してから、直前にレチノイン酸を加えた上で使用した。培地交換の際の吸引はクロスコンタミと剥がれるのを防ぐため、パスツールピペットの先に Yellow tip (QSP)をつけて行った。培地は 4 日に 1 回作製しなおした。Day 5 には下記のプロトコールで継代を行った。Trypsin EDTA0.05% 1.5 ml 2 分処理の後、FBS 3 ml（ロット指定無し、Expire したも

ので可，実際に使用したのは，JRH 12105-78P 002030D or 8D2097 or JRH 12103-78P 002020C)を 3 ml を加えて 5 ml Pipet (Greiner, Falcon でも可だが，太さは肝要であり，端の方の塊をほぐし過ぎるとよくない)で 10 回ピペッティングを行い，100 μ m Cell Strainer (BD Falcon)と 35 μ m Cell Strainer (BD Falcon)を連続で通した． DMEM 10% FBS (ロット指定無し) 培地を 7 ml 加えて 1000 rpm 5 分遠心を行い，Blue tip で 5 回ピペッティングして再懸濁を行い，指定の濃度で 35 mm の 0.2 % Gelatin coated easy grip dish (Falcon)へまき込んだ． Day 5 でまき込む数も，Day 20 で subconfluent になるように微調整が必要である． まき込む際には 1 ml の培地の入ったところへ濃度調整をした細胞を 1 ml Blue tip で真ん中目において前後左右に優しくゆすることで，正確な濃度でまき込むようにした． Day 8 では DMEM (without phenol red, without pyruvate, with 25 mM HEPES, Gibco) 10%FBS, 1X Penicillin Streptomycin (Gibco) の培地に置換した． この培地も，上記と同様に Prewarm+CO₂ で平衡化し，直前にレチノイン酸を 1 μ M で加えた培地を用いて 2 日に 1 回培地交換をした． Day 20 には同じ培地に FK 10 μ M, Luciferin 100 μ M を加え，シリコングリース (東レ) で密封した上で，30℃大気下の条件で Low level light detection unit (浜松ホトニクス, C8801-01R)を用い測定し，5-7 日間測定を行った． 解析には Mathematica 9.0 (Wolfram) を用い，自己相関解

析を行った.

図に示した実験は東京大学医学部附属病院老年病科において申請者が行った.

<未分化 ES 細胞の発光測定>

Day 0: Per2::Luc ES 細胞を DMEM/20% FBS の分化誘導培地に溶かし, RA の代わりに LIF 1,500 U/ml で添加した上で, 35 mm 0.1% gelatin coated dish に, 1×10^5 / 2 ml / 35 mm dish でまき込んだ. Day 1 に DMEM (without phenol red, with 25 mM HEPES) に 20% FBS, NEAA, P/S, L-Glutamine, β -Mercaptoethanol, LIF 1,500 U/ml, 100 μ M Luciferin, 10 μ M Forskolin を添加し, 分化細胞と同様の方法で, コンドートロンで測定した.

<ES 細胞の増殖速度の測定>

Per1/2 Double knockout ES (Per1/2 DKO, フィーダー細胞を抜いて馴化させてから 10 継代目) を Day 0 で 0.5×10^5 , 1.0×10^5 , 1.5×10^5 / 35 mm dish (0.2% gelatin coated) で各々まき込み, DMEM 20%FBS の分化誘導培地 + RA 1 μ M の条件での増殖速度を測定した. 血清は Lot: 6K0357 を用いた. 2 日に 1 回培地交換を行い, 2, 4, 5, 6, 9, 12 日後各 1 枚ずつ, Trypsin/EDTA 0.25% (Gibco) で 5 分処理し, Blue tip でピペッティングし, 1.5 ml microtube 平底 (Watson) に回収, 16000 g 程度で 1 分遠心し, 少量 (1 つのマス目に 100 個以上の細胞が入るように調整) を trypan blue と 1 対 1 で混ぜてアブライシ, Burker-Turk 血

球計算板で4マス分の細胞数を計測した。

〈継代数の影響を見る実験〉

基本的には先述の方法と同様であるが、以下に示す部分が異なっている。Day 0 で 24 well black plate (Wallack, 表面積 1.65 cm^2) を 0.1% gelatin で処理し、 $1.6 \times 10^4/\text{well}$, $1.2 \times 10^4/\text{well}$, $0.8 \times 10^4/\text{well}$, $0.4 \times 10^4/\text{well}$ で各々 $n=6$ で 500 μl の培地にまき込んだ。2 日に 1 回培地交換を行った。Day 15 に HEPES 培地への置換を行っている。Day 20 から先述と同様の方法で測定を行った。Per2::Luc KI/KI ES 細胞の継代を繰り返して同様の実験を続けて行い、差を比較した。継代も先述の方法とほぼ同様だが、35 μm Cell Strainer を遠心、再懸濁後に通している点で異なる。48 時間あたりの増殖率は、継代間隔が必ずしも厳密に 48 時間ではないことから、48 時間あたりの値に補正した。具体的には、ES 細胞はまき込んでから 6 時間でほぼ完全に dish に接着するという予備実験の結果をもとに、その後一定速度で増殖をすると仮定の上、48 時間あたりの増殖率に換算した。使用した計算式は、Excel2010 (Microsoft) の POWER (増殖率 (倍), $42/(\text{継代間隔}(\text{hours})-6)$) である。尚、この式は、増殖率が速くなった細胞を薄くまき込む際の目安にも使用可能である。

〈アルカリフォスファターゼ染色〉

評価には Per1/2 DKO ES 細胞を用いた。RA の分化効率を、Day 3 と Day 7 のア

ルカリフォスファターゼ染色，位相差顕微鏡（40 倍，IX-51，Olympus）にて観察した．Day 0 に 6 well plate（Falcon）を 0.2% gelatin で処理し， 1×10^5 /well で ES 細胞をまき込み，RA 濃度を 0，0.33，1，3，10 μM で各々まき込んだ．対照には，GMEM/KSR/FBS/2i/LIF 条件で 1×10^4 /well でまき込んだ細胞を用いた．2 日に 1 回培地交換を行った．アルカリフォスファターゼ染色は，8 Leukocyte alkaline phosphatase kit（Sigma，5L3R-1KT）を用いて染色した．Citrate Working solution，Fixative solution，Staining solution は取扱説明書の通りに作製した．細胞は，PBS で洗った後，Fixative solution で 30 秒固定し，純水で 2 回リンスし，Staining solution を添加し，1 時間室温でインキュベートした．その後 3 回純水で洗った後風乾した．

<トランスフェクションによる Per1/2 ダブルノックアウトレスキューと Per2 ノックアウトレスキューの試み>

申請者は先述の One passage protocol において，Day 6 にトランスフェクションを行う系を開発できたため，トランスフェクションによるノックアウトレスキューも試みた．申請者が開発した ES 分化のトランスフェクション系は FuGene6 を 3 μl ：1 μg の割合で用い，プラスミドが 1.25 μg 以下の場合は pMU2 を Mock として上乗せした．細胞数はおよそ Day 5 で 5×10^5 /35 mm dish でまき込むことが多かった．先述の One passage protocol との違いは，トランスフェ

クシオン直前と翌日に培地交換するが、その他には特記すべき変更点はない。ただし、発光量を稼ぐため、Luciferin (Biosynth) を 500 μ M 使用した。この場合、1) レスキューする Per1 や Per2 に Luciferase を融合して 1 個のプラスミドで Effector と Reporter を兼ねる方法と、2) Luciferase のついていないコンストラクトを用い Reporter (pMU2-P(Per2s)-Luc) を別のプラスミドにしてトランスフェクションする方法の 2 つの方法があるため、下記の全ての組み合わせで両方の実験を別個に行った。Reporter 量はコンドートロンの場合は 0.75 μ g, 1ch PMT の場合は 0.2 μ g で測定を行った。Per1/2 DK0 ES では Per2 が pMU2-P(Per2s) 下に発現するものと pCR8-P(Per2L) 下に発現するもの、Per1 は pCR8-P(Per1) 下に発現するものを試みた。Per2 KO に関しても、Per2 を pMU2-P(Per2s) 下に発現させることと pCR8-P(Per2L) 下に発現させることを試み、双方で Luc 融合と別 Reporter 組み合わせを試した。Effector の Dose は 0.01 μ g から 6-9 μ g まで 3 倍程度ずつ刻み、各々 N=2-3 とした実験を行った。

<PER1, PER2 の半減期測定>

基本的には NIH3T3 のサイクリングアッセイと同じ方法で行った。まず、NIH3T3 細胞を 2×10^5 /35 mm dish にまき込む (Day 0)。NIH3T3 は 1 ml の培地が入った dish に 2×10^5 /ml に調整した細胞溶液 1 ml を Blue tip (QSP) を使って測り取ってまき込む。Dish を斜めに傾け、Blue tip で dish の底面と端の部分

を洗い、張り付いた細胞を落とす。その後そっと dish を水平にし、Blue tip で 1 ml を中央近傍にジグザグに描きながら落としていく。水滴が出来たり底をひっかいたりしないよう注意しながら、水面を動かしてまく。波の影響を受けぬよう 10 分静置した後、揺らさないようにそっと CO2 インキュベーターに戻す。こうすることで、揺らしたことによる端への細胞が固まることを軽減(測定中に細胞が剥がれて概日振動検出ができなくなる)することができる。翌日 (Day 1) に pMU2-::Luc(c) 構造のベクター 1 μ g を FuGene6 3 μ l とともにトランスフェクションする。FuGene 6 はプロトコールに沿って、Opti-MEM Reduced Serum Medium GlutaMAXSup (Gibco51985-034) と UltraPure Water (Gibco) を用いて行った。ピペッティングをできるだけせず、Yellowtip で 40-50 回 Swirl することで混ぜるのがポイントである(ピペッティングすればするほど効率が落ちる)。翌日 1 ml の培地を加え、更に 2 日後より DMEM (High Glucose, HEPES, no Phenol Red Gibco: 21063-029) 10%FBS, P/S 1%, Beetle Luciferin, Potassium Salt (Promega E1601) 100 μ M, シクロヘキシミド (CHX, Cycloheximide, Wako, DMSO 溶解 100 mg/ml ストック, Millex GP (0.22 μ m) で滅菌) 400 μ g/ml の培地に置換, 30°C 大気中でシリコングリースによりシールし, Low level light detection unit (浜松ホトニクス, C8801-01R) で測定した。測定に用いたソフトは Lm300122 である。半減期測定のコードは R (R Development Core Team) で

書いた。指数関数への fitting を行っている。具体的には、CH1_cpm という測定データと min という時間(単位は分)のデータが入った degradation という csv ファイルに対し、下記のコードを適用した。

```
degradation <- read.csv("degradation.csv")

df <- data.frame(v=degradation$CH1_cpm, t=degradation$min)

out <- nls(v~a*exp(-k*t)+(100-a), data=df, start=list(a=100, k=0.001))

a=coef(out)[1]

k=coef(out)[2]

t_half_CH1=-(1/k)*log((a-50)/a)

t_half_CH1

rm(df, out, a, k)
```

これによって出力された t_half_CH1 を半減期として提示した。

全ての実験は東京大学医学部附属病院で申請者が行った。

〈Per2::Luciferase KI/KI マウスを用いた恒常明(LL)条件の影響を見る実験〉

Aftereffect (履歴効果) は組織レベルでも観察できると報告されていたため[126, 127], 恒常明(LL)条件の後 2 週間経っても履歴効果が残るかどうか, 個体レベルと組織レベルで確認した実験である。最終的なスライス作製と測定は升本耕平先生, 山田陸裕先生に補助頂いたが, その他の実験は申請者が

行った。2012 年 10 月 18 日生まれの Per2::Luciferase KI/KI マウスを山田陸裕先生より譲渡頂き、2013 年 2 月 24 日（開始時 18 週齢）より実験を行った。光条件としては、3 通りで各 6 匹ずつ実験を行った。LL 群：LD 2 週間⇒LL 4 週間，LL_DD 群：LD 2 週間⇒LL 2 週間⇒DD 4 週間，DD 群：LD 2 週間，DD 4 週間である。各々 LL：恒常明条件，DD：恒常暗条件，LD：明暗条件を意味する。行程終了直後に断頭，赤色光下で眼球摘出，脳摘出を行い，視交叉上核のスライスを作製した。Hank's Balanced Salt Solution (Invitrogen) 存在下で Linear Slicer で前頭断を行い，200 μ m 厚のスライスを作製し，テフロン膜上で 24 well plate に入れて培養した[7]。Macrozoom で観察した。測定期間は 8 日間，測定条件は 37°C，Obj 1.6x，Zoom 3.2x，EM-Gain 300x，Gain 5x，露光 180 秒，である。アクトグラムは ClockLab の出力をそのまま提示してあるが，カイ二乗ピリオドグラムの解析には ActogramTools を用いている。

<Luc 融合遺伝子を用いた Per1/2 ダブルノックアウトレスキューES の作製と分化誘導，行動解析>

本実験は全て理化学研究所発生再生科学総合研究センターで行った。先述の方法で作製した pTVCI2-P(Per2L)-Per2(WT or FASPS)::Luc を，LB 500 ml で培養し，Pureyield MidiPrep kit (Promega) のカラム 2 本で精製し，FseI で完全に線状化した。安全キャビネット内で Phenol（ナカライ）処理 2 回，

Phenol/CIAA (Chloroform-isoamyl alcohol: ナカライ)処理 2 回, Chloroform 処理 2 回を行った後, 滅菌されたエタノール, 酢酸ナトリウムを用いてエタノール沈殿を行い, Hank's Balanced Salt Solution (Gibco) 110 μ l に 60 nM になるように調整した. この溶液を理化学研究所の個体作製チームに依頼し, Per1/2 ダブルノックアウト ES 細胞にノックインを行って頂いた. この際は TALEN を使用せず, エレクトロポレーション法にてノックインして頂いた. 吉田淳子様に双方のコンストラクトに対し 96 クローンの ES 細胞を 2 日に分けてピックアップして頂き, その Lysate は申請者自身が先述の方法で Screening PCR を行い, 陽性だったクローンのみの増幅を依頼した. WT で陽性だったクローンは #9, #18, #23, #36, #41, #50, #65, #71, #81, #89 であり, ターゲッティング効率は 10.4%であった. FASPS で陽性だったクローンは, #1, #7, #22, #38, #39, #40, #44, #60, #62, #68, #69 であり, ターゲッティング効率は 11.4%であった.

増幅後の 3i on feeder の条件の ES 細胞を分与頂き, 申請者自身が上記と同様の方法で Arm PCR, qPCR と gelatin coated dish feeder free の条件への馴化を行った. qPCR には ABI 7900 (384 well plate)を使用している. Arm PCR, qPCR で 1 コピーが正確に入った ES 細胞株から 2-3 クローンを選び, ICR の 8 細胞期の胚へのインジェクションも施行頂き, F0 の 3i キメラマウス[128]の行動

リズムの表現型を観察する実験も行って頂いた。具体的には、各 2-3 ラインより 11 匹の評価を行って頂いた。光条件は、明暗(LD)条件 2-3 週間 ⇒恒常暗(DD)条件 2 週間⇒明暗(LD) 2-3 週間⇒恒常明(LL)条件 4 週間、である。データの周期性の解析は申請者自身が先述の方法（ただし、この際は山田陸裕先生が作製した R のコード: ActogramTools.R）で行った。概日振動の判定は、カイ二乗ピリオドグラムで有意線を超えた単一ピークがみられるかどうかで行っている。ES 細胞の GMEM/KSR/FBS/2i/LIF on gelatin coated dish への馴化は申請者自身が行った。分化誘導には Without passage protocol を用い、35 mm dish に 0.6×10^5 , 1.0×10^5 , 1.5×10^5 の 3 通りで triplicate して行った。上記の分化誘導プロトコールとは Day 5 の継代が無い点、Day 0 から 35 mm でまき込む点、測定には理化学研究所のコンドートロンを用いたほかは特記すべき相違点はない。測定開始時には、Positive Control の Per2::Luc KI/KI ES は接触抑制の弱い細胞群が多数見られたが、レスキューされた ES 細胞では均一な細胞がコンフルエントに広がっていた。

<その他の検定>

その他、周期、半減期などの平均値の差の検定においては、t 検定（両側、非等分散仮定）を行った。有意水準は $p=0.05$ とした。Microsoft Excel 2010 を用いている。

【結果】

以下，結果の項に示される実験は特記されない限り，申請者が行ったものである．

〈光応答遺伝子パターンの細胞レベルでの検討〉

まず，申請者は NIH3T3 線維芽細胞に，SCN での光応答に重要な cAMP (Cyclic adenosine monophosphate) 経路[129]を刺激可能な Forskolin 添加を行い，mRNA の発現量の経時的な測定を行った．Per1, Fos, NR4A1 といった Early type genes では刺激後すぐ上昇し，すぐに減少するパターンが見られ，Late type genes の Per2 では緩徐に上昇し，発現上昇は持続した(図 7)．このように光応答遺伝子の誘導パターンは神経細胞以外の細胞レベルにおいても再現され，細胞種によらない普遍的なメカニズムであると考えられた．

〈個体レベルの実験〉

上記の実験で Per1 や Per2 の光応答性の違いは細胞種によらない普遍的メカニズムによることが示されたため，次に Per1, Per2 の各々のノックアウトマウスではどのような光応答性がみられるか，個体レベルの実験を行った．具体的には，図に示す 2 種類の実験を行った(図 8)．

実験 1-1(予備実験)：夜行性動物においてはアショフの法則という法則が知られている[96]．これは，“恒常明(LL)条件下において，照度依存的に自

律振動周期が延長する” というものである。Per1, Per2 のノックアウトマウスのラインは ldc ラインと Brd ラインの 2 種類が存在するが、まず brd マウスにて検討を行った。恒常暗 (DD) 条件 2 週間と恒常明 (LL) 条件 2 週間における Per2 (+/+), Per2 (+/mut), Per2 (mut/mut) の周期長を計測した (図 9)。Per2 (+/mut) では、実際恒常明 (LL) 条件での周期長が Per2 (mut/mut) と同じであり、ドミナントネガティブ効果がこの恒常明 (LL) 条件における周期延長効果において示唆されたため、メインの実験では使用しないこととした。実際、Per2 brd マウスは PER2 1258 アミノ酸の内 PAS ドメインの 87 アミノ酸の欠失変異体のため、ドミナントネガティブ効果があることが指摘されている。したがって、以降の実験では ATG 近傍を確実に欠損させ、Per1 や Per2 が発現しないようになっている ldc ラインを使用した。更に行動量の多い若齢マウスを用い、遺伝的背景をできるだけ揃えることで、精密な実験を行えるようにした。

実験 1-1 (本実験)：次に、申請者は、Per1 と Per2 の ldc ラインを用い、WT, Per1 (+/-), Per1 (-/-), Per2 (+/-), Per2 (-/-) の 5 種類のマウスにおける恒常明 (LL) 条件下 2 週間における行動周期を観察した (図 10)。この実験の結果、予想通り、WT のマウスでは周期長が恒常暗 (DD) 条件の 24.1 時間と比較して、恒常明 (LL) 条件では 25.4 時間と延長していたが、Per1 (+/-) では 26.6 時間と長く、Per1 (-/-) では 27.9 時間と更に延長していた。逆に、Per2 (+/-) では 24.9

時間と短縮傾向であり，Per2(-/-) では 22.8 時間と更に短縮していた(図 11). 尚，恒常暗(DD)条件下においても，WT のマウスでは周期長が 24.1 時間なのに対し，Per1(-/-)では 24.4 時間，Per2(-/-)では 23.6 時間と似たような傾向は認められたが，遺伝子型ごとの表現型の差は恒常明(LL)条件と比較すると遥かに小さかった. 以上まとめると，恒常明(LL)条件下での周期長は Per1 と Per2 の量比に依存しており，Per1 には短周期親和性，Per2 には長周期親和性があることが示唆された.

実験 1-2: 次に，恒常明(LL)条件下で長期飼育すると無周期化したりスプリッティング(後述)したりすることが知られている[130]. これは幅広い動物でしめされている[131]が，哺乳類においては視交叉上核での個々の神経細胞の同期の減弱によるものと考えられている[132]. 無周期化に必要な期間に関しては，報告にもよるが，ハムスターで 40 日以上必要だという報告[133]や，マウスで 100 日以上必要だという報告[132]もある一方，500 Lux で 10 日程度でも十分無周期化する個体も出てくるという報告もある[134]. 恐らく照度の条件にもより，個体差にもよるものと思われる. また，恒常暗(DD)条件では無周期化しやすい Clock の変異体マウスでは恒常明条件下では無周期化しにくいとの報告もあり，時計遺伝子との関係も示唆されている[135]. Per のノックアウトマウスではどうかを確かめるため，申請者は WT, Per1(-/-), Per2(-/-)

のマウスを用い、恒常明(LL)条件4週間の実験を行った(図12)。結果、WTのマウスでは恒常明(LL)条件になって約2週間経過したあたりから徐々に行動リズムが無周期化してくるが、Per1(-/-)やPer2(-/-)のマウスでは行動リズムの周期性が残存していた。後半2週間のカイ二乗ピリオドグラムを利用し、定量化したグラフを示す(図13)。以上の結果より、Per1とPer2の片方が無いと、恒常明(LL)条件下においても周期性が残存しやすいことが示された。

実験2: 次に、緩徐に変化する光条件下でのPer1, Per2の役割を確かめるための実験を行った。光には同調作用があるが、この働きには大きく2つの働きが考えられ、一つは点灯、消灯の一過性の働きで、もう一つは点灯中の連続的な作用である。前者の概日時計に対する作用をノンパラメトリック同調と呼び、後者の作用をパラメトリック同調と呼ぶ[5, 136]。多くの光応答性を観察する概日時計の研究は、ある位相で光パルスを与えた際の位相変化の方向性(前進か後退か)とその度合を描いた位相応答曲線を用いて行われてきた。尚、この位相応答は瞬時に起こると考えられている[137]。したがって、光の変化をRectangular patternで周期長を変えた場合、Light Onによる位相シフト(ジャンプ)を起こすため、その影響を受けてしまう。ところが、そもそも自然界では突然光がついたり消えたりすることではなく、緩徐に変化するため、このような位相ジャンプは非生理的な現象と考えられる。この影響を排除して

より自然な条件下で追従可能か検証するため、緩徐な光変化をおこしその中でマウスの行動パターンを観察する実験を行った。既存の機械ではこのような光パターンを作成することは困難であるため、バイオテックスの三上隆様にご協力いただき、12 灯用 LED (Light-emitting diode) 光照度制御装置の開発を行った(図 14)。この装置は光量と電流の比例関係を利用し、8 個の抵抗を上手く組み合わせれば、256 段階に線形に変化する光量を作り出せる。本体は幅 160 mm、高さ 90 mm、奥行 210 mm の直方体で手前と奥から各 6 本のコードが出ており、各コードが 1 個の円盤の照度を制御する。1 個の円盤は 9 個の LED から構成される。手前の 6 個の LED と奥の 6 個の LED は別個のパターンでの照射が可能である。インターフェイスはパソコンで制御され、0-255 までの 256 段階で照度をコントロールすることが可能である。更に、TEST Mode (入力した値で照射するモード)、Time Comand Mode (任意の時間と段階の間隔で、階段上に照射パターンを変化させる)、File Data Mode (テキストファイルを読み込むことで、任意のパターンの光照射をプログラムできる) の 3 つのモードがある。File Data Mode では、12 匹(2 パターン*6 匹分)のマウスに対し、256 段階の光を 1 分間隔で任意のパターンで制御可能である。テキストファイルの形で年余の期間にわたる指令を与え続けることも可能である。LED の円盤は ClockLab の赤外線センサーの横に取り付けている。真下にマウスのケージをおき、LED 照射時の

マウスの行動を赤外線センサーで観察する。また、通常のマウスケージでは餌が蓋の上に載っているため、マウスが影に隠れた場合と直接当たっている場合でマウスの受ける光の強度が変わってしまう。したがって、餌の蔭にマウスが入らないように、餌箱の使用をした。また餌箱の中にマウスが入って身動きが取れなくなることもあったため、日本クレアの No.4 型を用い、マウスケージの蓋を通常と逆の向きで閉めるようにした。ケージは理研 CDB 小ケージを使用している。更に、通常の行動解析ラックと比較すると、パソコンや照射装置の電源などのコードが行動解析ラックの遮光に隙間を作ってしまうことになるため、特に遮光には気を配った。具体的には、サンゲツ製カーテン（遮光率 99.9%）を取り付け、扉を押し込む金具を取り付ける工事を行い、左右のまき込みを行うマジックテープ、L字を取り付けた。カーテンはラックの下部に洗濯ばさみで取り付けた。

まずこの装置では、0-255 まで目盛を変化させ、行動解析ラック内の真下での光量を照度計により計測したところ、LED による照度(Lux)は目盛に対してのほぼ線形に変化することが分かった(図 15)。装置の元の抵抗は、10 倍、100 倍に上げることができるので、これらの条件での光量の変化も確認したが、全体の光量がほぼ 1/100 になることで 256 段階に線形に変化させうることが分かった。まず各々のダイヤルでの中間の明るさ(127)の恒常条件で予備実験を行

った。300 Lux 前後だと LED の光がラック内の床や壁で反射し、行動リズムを検出する赤外線センサーで拾われてしまうことがわかった。したがって、このような強い光を使用すると赤外線センサーで検出されたカウント数がマウスの行動に由来するものか LED の光強度の変化に由来するものかの区別が困難なため、実験での使用が困難であった。また 30 Lux 前後だと 周期長が 2 時間程度延長してしまい、照度変化をつけていても、マウスが恒常明(LL)条件として感知してしまうことがあることが分かった。すなわち、明暗変化を実験者がつけているのに、マウスの概日時計は明暗変化として感知しないということである。先行文献ではせつかく緩徐に変化するような装置を開発しても実験動物が恒常明(LL)条件と認知してしまうことが問題となっていたため[138]、できるだけ照度を下げた条件下で最大限の振幅を作製し、できるだけマウスが恒常明(LL)条件と認識しないような条件で予備実験を行った。LED の回路の抵抗値を装置の最大である 100 倍まで上昇させ、中央の目盛(3 Lux 程度)で一定(2 週間)にした時の行動周期 を計測したところ、概日周期長は 25 時間前後となった。30 Lux 前後での 26 時間前後と比較すると、有意差はないものの 1 時間弱短縮し(26.1 時間 VS 25.3 時間, $p=0.20$)、無周期化している個体の数も減り(2 匹 VS 1 匹)、周期長の個体間差も小さくなった(標準偏差 0.91 時間 VS 0.37 時間)。恒常暗(DD)での行動周期長よりは長い(25.3 時間 VS 24.1 時間 $p<0.001$)ものの、

明暗 (LD) 条件でもマウスに一定量の光はあたっている点や、極端に暗くすると遮光条件の厳密性を担保することが難しくなる (行動解析ラックの外環境からの 24 時間周期の光漏れの影響は、暗くなるほど大きくなると考えられる) 点などから、0.01 Lux 程度~5.4 Lux 程度の中で 256 段階変化させる方針とした (図 15)。

以上開発してきた装置を用いて WT, Per1(-/-), Per2(-/-) 各 6 匹を用い、22 時間周期-27 時間周期の緩徐に変化する光条件下で 2 週間飼育し、追隨性を観察した。各々の周期で緩徐に変化する光条件下での行動リズムの周期長をカイ二乗ピリオドグラムで解析し、環境周期と行動周期をプロットした。解析には、各周期の全行程 2 週間を用いた解析と、同調できてきている最後 1 週間のみを用いた解析の双方を行った。結果は、22 時間周期は Per2(-/-) のみ追隨可能であり、23, 24, 25 時間周期は全ての遺伝子型で追隨可能であり、26, 27 時間周期は Per1(-/-) のみ追隨可能だった。まとめると、Per1(-/-) は長周期で同調しやすく、Per2(-/-) は短周期で同調しやすく、WT は同調できる範囲が少なかった (図 16)。したがって、緩徐に変化する光条件下において、Per1 と Per2 は共に存在することで、24 時間に近い周期長に限定する役割を持っていることが示された。

以上本個体レベルの実験で見られた結果をまとめると、下記の通りである。

- 恒常明条件下において、Per1 と Per2 の量比に依存して Per1 には短周期親和性、Per2 には長周期親和性があることが示唆された。
- 緩徐に変化する光条件下において、Per1 と Per2 は共に存在することで、24 時間に近い周期長に限定する役割を持っていることが示唆された。（すなわち Per1 と Per2 は協調して働いている。）

以上総じて、Per1 と Per2 は協調し、非生理的な条件下において、24 時間からはずれた概日振動を阻止するが、逆にこの機構は柔軟でなく、病的な破綻（外環境への追従不能や無周期化）をきたしうることが示された。

〈細胞レベルの実験〉

次に Per1 と Per2 の協調性の分子メカニズムをより詳細に解析するため、細胞レベルの解析を行った。この目的のため、申請者は Per2 ノックアウトレスキュー系の構築を目指した。細胞レベルの解析は申請者が東大病院老年病科において行った。

時計遺伝子のノックアウトレスキュー実験は Cry では報告されており [14]、概日振動の見られない時計遺伝子のノックアウト細胞に WT の時計遺伝子を外来導入することで、概日振動を回復させることができれば、様々な変異体

の概日時計における表現型を解析することができるようになる(図 17). Per でも同様のことが可能になれば様々な変異体の表現型を見ることができるようになる. 更に, Per は序文や目的の項で述べたように, ヒト疾患での重要性が示されている上, 概日時計の本質が凝集されている遺伝子であり, ノックアウトレスキュー系が構築出来れば, 生物学的にも医学的にも非常に有用なツールとなる. しかし, Per でもノックアウト初代線維芽細胞に対し, リポフェクションによる一過性発現のレスキューも様々な条件で試みられてきたが, 成功できなかった. この一つの原因として, 樹立されたノックアウト細胞株が本当にレスキュー可能なものかが問題となったため, レスキュー可能性が担保可能な ES 細胞を使用することにした. なぜならば, ES 細胞は個体にして行動リズム解析をすることで, 細胞株のレスキュー可能性が担保でき, 尚且つ興味ある表現型の細胞が得られた際, そのまま個体にすることができる. また一過性発現系でのレスキューが成功しなかった原因の一つに, 一過性発現系におけるプラスミド導入量のバラつきが考えられる. Cry は過剰発現しても概日振動が破壊されないのに対し, Per は過剰発現すると概日振動が破壊される[139]. また, Per1 を human elongation factor-1 α (EF-1 α) もしくは rat neuron-specific enolase (NSE) プロモーター下で過剰発現したラットでは行動周期が 0.6-1.0 時間程度延長する[140]. 更に マウスでは Per2 はゲノム中のコ

ピー数を増やしたりしていくと、1.4時間程度の周期延長がおきることが示されている[141]。また、Per 蛋白は1細胞内の個数がとても少ない(1000個程度)と予想されており[142, 143]、概日振動を破壊しないようにレスキューするためには、各細胞に少数のプラスミドを導入する必要がある。申請者自身が行った予備的な検討において、Per2 ノックアウト ES 細胞に Per2 のコンストラクトをトランスフェクションして分化誘導させたところ、Forskolin に反応するような一周期分の波形を見えるようにすることは可能であった。しかし、プラスミドを多く持った細胞が一斉に Apoptosis をしたときにおこると思われる Spike 状のノイズと、二周期目、三周期目の概日振動の区別が難しく、総じて一過性発現系におけるレスキュー系の構築は難しかった(図 17)。したがって、本研究では Rosa 26 へのターゲッティングを用い、1 コピーが正しく同じゲノム領域に挿入された ES 細胞のみを用いて評価を行うこととした。Rosa 26 とはマウス第 6 染色体に存在するゲノム領域であり、外来性の遺伝子を恒常的発現プロモーター下に Rosa 26 領域で発現させると、全身すべての細胞で外来性遺伝子の発現が陽性となる。更に本領域は破壊されても表現型が出ないため、LoxP site やレポーターコンストラクトの挿入に頻用されている[144, 145]。

〈ES 分化誘導系の構築〉

導入の項でも示した通り，ES 細胞は概日時計を持っていないが分化誘導を行うことで，概日振動を検出できるようになる．申請者はこの実験系を改良することで，より明瞭で精密に周期長を検出できるような実験系の構築を目指し，100 回強の実験(2012 年上半期で 11 個， 下半期で 44 個，2013 年上半期で 20 個，2013 年下半期以降に 30 個以上，各実験は N=6-120)を行い，分化誘導プロトコールにおける幅広い実験パラメーター(まき込む細胞数， 継代回数， 継代するタイミング， レチノイン酸濃度， 概日振動測定開始日， 分化誘導や測定時に使用する培地組成， dish の種類， dish の coating， 血清のロット， ES 細胞の維持条件， 継代時のプロトコール (trypsin 処理時間や Cell Strainer の使用)， 同調刺激剤， Luciferin 濃度， 測定温度など)の探索を行うことで， 長期にわたり減衰が少なく， 周期長も精密に検出可能な実験系を構築した(図 18)．尚， 申請者がパラメーターサーチ中に， ES 細胞を分化誘導すると概日振動が検出可能であることを報告したグループから続報が報告された． 本グループは ES 細胞から分化させた Embryoid body (胚様体)を植え継いで， 24 well plate にまき込む手法で， 様々な ES 細胞の周期長を測定でき， 3 時間程度の周期差であれば検出可能であるとしている． この実験系と比較し， 申請者の実験系は 35 mm dish を用いているのでスループットは低いものの， Per2::Luc KI/KI ES 細胞から検出できる概日振動の幅が 1 時間程度の範囲内に収まっており， 先行文献の

実験系よりもばらつきが小さいので、より精密な実験系であると考えられる [146, 147]. 更にコンドートロンのような大掛かりな装置も必要なく、 スモールスケールの実験にも対応可能である. 申請者は、個々の実験においては、分化誘導の際のパラメーターを 1, 2 個ずつ振って 2-4 週間分化させ、振動を数日観察し、最も振動が明瞭に出る条件を採用して次のパラメーターを検討するといった具合で、検討に検討を重ねた. 中には何度も振り続けたパラメーターもある. まき込む細胞数は最も重要である反面、他の条件に合わせて変える必要があるものであり、この条件は現在も検討し続けている(図 19) .

個々の実験の詳細な結果は割愛するが、条件検討の実験から導かれた結論と、明瞭な振動（振幅が大きく周期が安定する）を検出するためのポイントは表にまとめてある. 振幅が大きく周期が安定する振動を検出するためには、レチノイン酸刺激後 2-3 週間の培養をする際、測定時に丁度分化した細胞がコンフルエントかつ生存し、増殖もあまりしない状態で広がってくれるようにすることが重要である. 薄くまいた方が分化はしやすく増殖も止まりやすいが死滅しやすくなり、発光量も稼げないため、ノイズに負けて発光量の概日変化を検出しにくくなる. 特に、測定中は大気下で行うため、CO₂ が揮発して培地の pH が一気にアルカリ性になるため、これを中和するためにも一定数の細胞が呼吸をして CO₂ を排出していた方がいいと考えられる（申請者は pH の実測を行

っていないが、Phenol red 入りの培地で行った予備実験では、CO₂ インキュベーターから出すと相当に Phenol red は赤色になる（アルカリ性に傾く）が、グリースで密封することや細胞を多く捲き込むことによって Phenol red の赤味が軽減される。また、薄くまくと死滅傾向になってベースラインが下降傾向になったり、周期長の外れ値が出やすくなったりするというデータは多数持っている）。一方、濃くまき込むと生存はいいが増殖を続ける未分化な塊が残ってしまう（図 20）。途中で継代をすることで、未分化な細胞が解れる。およそ大多数の細胞の増殖が急激に遅くなるのが、レチノイン酸刺激後 4-6 日目になるので、ここを境に、前半と後半で、戦略が異なってくる。増殖が止まる前（前半）に confluency が高い塊になる細胞が増え、不均一になりやすい。したがって、前半はある程度薄めにまき込むのがポイントであり（図 21）、Day 0 の細胞数の調整が必要である。一方、後半の confluency は高くても不均一化はしにくく、むしろ生存性が良くなり振動が持続しやすくなる。したがって、前半は薄めにまき、後半濃いめにまくと明瞭に振動しやすい。一方、前半でもある程度の細胞数はないと生存や増殖せず、また実験に必要な細胞数が確保できない。後半でも濃くまきすぎるとわずかに残った未分化な細胞が増えてきたりする。更に、本実験系では、後半での増殖コントロールのため、培地の大幅な置換（FBS 濃度を 20%から 10%に下げ、pyruvate や非必須アミノ酸、メルカプトエタ

ノールを抜き、HEPES 25 mM を加える)を行っている。このこともあってか、Confluency の高過ぎる領域は一斉に apoptosis をはじめてしまうことがあり、後半濃くまきすぎる逆に殆ど死滅してしまうこともある。したがって、ある程度の幅はあるものの、前半、後半各々の細胞数の titration が重要である。また、2 週間よりも 3, 4 週間と時間をおいて分化すればするほど振幅は大きくなるが、周期長には影響が無さそうであった。ただし、振幅が小さいほど、判定される周期長はベースラインの変動や細胞数の影響を受けやすい。また、1 割程度（特に薄まきの場合に多い）の dish では死滅するなどして主に長周期の外れ値が出ることがあるので、N=2 可能なら N=3 は実験内で確保をする必要がある。N=3 であれば、1 枚で外れ値が出たとしても、揃った 2 枚の値が真値である可能性が高い。この実験系は、2 時間程度の周期差であれば明確に区別できるため、遺伝子変異体 ES 細胞の小さな周期変化や、薬剤添加の際の周期変化を、個体にすることなく検出可能なすぐれた実験系であると考えられる。尚、本実験系では、ES 細胞の継代を重ねると振動性の悪化がみられた。従来 ES 細胞は老化しないとされているものの、何らかの形の老化現象を見ている可能性もあり、注目される（図 22）。

〈Rosa 26 ターゲッティングを用いた Per2 ノックアウトレスキュー系の構築〉

ある遺伝子型の ES 細胞から内在の概日周期を正確に測定する実験系を開発したため、申請者は次に、ES 細胞を用いた Per2 ノックアウトレスキュー系の開発を目指した。すなわち、Per2 ノックアウト ES 細胞に野生型の Per2 を導入することで、振動を回復させる実験系である。今回申請者は様々な戦略を模索したが、最終的に Rosa 26 へ Per2 の遺伝子を導入する戦略をとった。Rosa 26 は 1991 年 Soriano らが同定したマウス第 6 染色体に存在するゲノム領域である。外来性の遺伝子を染色体に組み込む際、仮に恒常的発現プロモーター下に発現したとしても、組み込まれた染色体の部位によって発現組織が異なる。一方、先述のように、Rosa 26 領域に発現させると、全身すべての細胞で外来性遺伝子の発現が陽性となるため、LoxP site やレポーターコンストラクトの挿入に頻用される[144]。本研究では導入したコンストラクトが確実に発現するように、この Rosa 26 に Per2 を導入した。更に、Rosa 26 に相同組み換えで遺伝子を導入しようとしても、Rosa 26 以外の領域にランダムに挿入されてしまうことが多いため、効率上昇のため Rosa 26 のゲノムを特異的に切断可能な TAL effector nuclease (TALEN)を使用した。TALEN とは特異的なゲノム配列を切断可能なヌクレアーゼであり、人工的に設計すれば任意の配列を切断可能なため、相同組換え効率の大幅な上昇が可能である[148]。しかし、仮に Per2 ノックアウトの細胞に Per2 を導入して振動が回復したとしても、ベースラインがランダ

ムに揺れているだけの可能性や、(インキュベーター(東京理化 LTI-700)の性能上本来無いはずであるが)、測定環境の外気温や電氣的環境などの日内変動による影響もありうるため、判断が難しい。したがって本研究では、Per2 ノックアウトレスキュー系の構築が上手く行ったかどうかの判定のために、先述の家族性睡眠相前進症候群(familial advanced sleep phase syndrome: FASPS)の変異体を使用した。FASPS は、先述のように夕暮れには既に眠くなり、早朝に覚醒してしまう疾患で、概日時計の周期が短くなることによっておきる。Per2 の Ser662Gly という変異による常染色体優性遺伝病であり、Per の唯一知られている疾患変異体である。また、Per2 をリン酸化するキナーゼ(CK1)の変異体も知られている。マウスでもヒトの Ser 662 に相当する Ser 659 Gly の変異体を作製し Per2 ノックアウトマウスに BAC (Bacterial Artificial Chromosome) クローンを用いて導入することで、行動レベルでの周期短縮を再現したモデル系が報告されている[149]。ただし、この実験系はマウスレベルであり、スループットが低い。更に、BAC クローンを用いるため、変異の導入が大変である。また、Per1 と Per2 のプロモーターや翻訳領域を入れ替えたりすることなどが困難であり、Per1 と Per2 の協調性の解析には用い辛い。この他にも、FASPS のモデル系として、FASPS 変異体を PiggyBac トランスポゾン系の系を用いて Stable transfection した NIH3T3 を用いたモデル系がある。この場合、PiggyBac の系

であるため、発現量比の問題や位置効果の問題はクリアされるが、NIH3T3 には内因性の Per2 が存在するため、内因性の Per2 を全て入れ替えるような実験系は困難である[150]。更にこの実験系は波形の変化は報告されているが、周期変化は計測出来ていない。その他、FASPS 変異体が分解されやすいというのは様々な報告があるが、周期長を実際に測定している訳ではないため、本当に周期長を反映しているかどうかは別途検証が必要である。一方、Per2 ノックアウトや Per1 のノックアウトの線維芽細胞にレポーターを組んでおいて、その上で P(Per2)-Per1 もしくは P(Per2)-Per2 をアデノウイルスで導入するノックアウトレスキュー系は報告されており、Per1 と Per2 の翻訳領域の効果は同じと結論されていた。この実験系の場合、アデノウイルスのため導入効率は高いが細胞間のコピー数のばらつきが考えらる。Per はコピー数が重要な意味を持つにもかかわらず、厳密な titration は困難である[151]。更に周期判定がなされていないなど問題点がある。したがって、申請者が Rosa 26 ターゲッティング、ES 分化誘導系は、位置効果に依存せず、コピー数と発現量も厳密にコントロールした上で、細胞レベルにおいて、疾患モデル変異を検証可能な有用な実験系と考えられる。更に近年では、ゲノムを直接 TALEN や CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat)[152]を用い、ゲノム領域にダイレクトに変異を導入することも可能な時代ではあるが、2 Allele を同時

に組み替えることは困難が伴う点、レポーターを別途用意する必要性がある点、また点変異であれば可能だが、プロモーターや翻訳領域の丸ごとなどの入れ替えは難しい点などから、申請者の実験系は優れた点があると思われる。また、後に触れる Per1/2 ダブルノックアウトに対する個体レベルのレスキュー系は、Per のコピー数が少なすぎるためか、PER1 の表現型が見えない、Per1 と Per2 の協調効果が見づらい、蛋白量をモニターできない、細胞レベルで評価ができないなどの難点があるため、本実験系はこれら上述の実験系と比較しても有用性があるものと考えられる。

今回申請者はまず、Per2 ノックアウト ES 細胞を GMEM/KSR/FBS/2i/LIF、フィーダー細胞無ゼラチンコート下の培養条件に馴化させ、この ES 細胞に対して、TALEN を用いたリポフェクションと Puromycin の選択により、レスキューされた ES 細胞を確保した(図 23, 図 24)。WT, FASPS 各々のコンストラクトでレスキューした ES 細胞は、独立した 2 ラインの周期長がおおむね揃っており、FASPS 変異体での周期短縮を細胞レベルで再現することに成功した(図 25)。検索範囲内で、FASPS 変異体の周期短縮を細胞レベルで再現した系は存在しない。

このような実験系を構築できたため、次に申請者は、Per1 と Per2 の協調性を確かめるため、Per2 の翻訳領域を入れない実験を行った(図 26)。この場合振動判定率が低く、周期が短かった。更に、Per2 ノックアウト ES 細胞に

Per2 プロモーター下に Per1 を導入し、Per2 の場合と比較する実験を行った (図 27). Per1 と Per2 は図 7 にあるように mRNA の発現パターンが異なり、3' UTR を介した安定性も異なる [105]. 更に、アデノウイルスを用いた Per1, Per2 各々のノックアウトレスキュー系を行った論文では、周期判定はされていないものの、Per2 プロモーター下に Per2 を導入しても Per1 を導入しても振動が回復すると報告されていたため、Per1 を導入しても Per2 の場合と同様の表現型がみられると考えていた [151]. ところが予想に反し、Per1 を導入したところ、周期短縮が見られ (図 27)、独立した 2 ラインで再現も確認された. 一方、申請者は Per2 の FASPS 以外の先行文献で報告されている既知の変異体 (いずれも周期長を測定された報告はない) を 2 種類導入する実験も行った. 具体的には、mut6 (FASPS 下流の 6 個のリン酸化されるアミノ酸の変異体、先行文献では FASPS も加えた mut7 [150] を使用しているが、今回は FASPS 以外の変異である mut6 を用いた) と TRCP (β -transducin repeats-containing proteins (β -TrCP) 結合部位変異体 [153, 154]: E3 リガーゼの β -TRCP が結合するアミノ酸の変異体) の 2 つの変異体を評価した. mut6 は FASPS 同様の短周期が検出されたが、TRCP では大きな周期変化は検出できなかった (図 28). ここまでの実験結果の結論は全てまとめて統計解析することでも確認された. 周期長が大きく 3 つに大別されることが分かる. WT, TRCP の 24 時間前後のグループ、FASPS, mut6 の 20

時間前後のグループ，翻訳領域無，Per1 の 22-23 時間前後のグループである (図 29).

〈PER1 蛋白，PER2 蛋白の半減期の測定〉

これらの PER1 蛋白と PER2 蛋白の翻訳領域の違い，ひいては短周期，長周期親和性の違いがどのようなメカニズムによるものかを確かめるために，NIH3T3 線維芽細胞を用い，細胞内での半減期を測定する実験を行った．FASPS 変異体は PER2 の野生型と比較して半減期が短いことが複数のグループより報告されており，半減期は周期長を反映するものと考えられている．実際，NIH3T3 に PER2 蛋白の野生型と FASPS 変異体に Luciferase を融合したプラスミドをトランスフェクションしたところ，PER2 の WT は半減期が 200 分程度であったのに対し，PER2 の FASPS 変異体は半減期が 160 分程度であり，半減期の短縮が見られた．一方，この実験系において PER1 は予想に反し，半減期が 260 分程度と長かった (図 30)．更に，mut6 と TRCP 変異体の結果も含め，必ずしも Per 蛋白の半減期と概日周期長は相関しないことも明らかとなった (図 31)．これは PER1 の短周期親和性のメカニズムと FASPS の周期短縮のメカニズムは独立のメカニズムによるものであることが示唆される．更に，予備実験の段階ではあるが，N 末 Per1:C 末 Per2 のキメラ蛋白を用いた実験により，この上記の違いは

PER1 と PER2 の N 末 50 アミノ酸の領域に由来する可能性が示唆された(図 30).

〈Luciferase 融合コンストラクトの問題点〉

ここまで主に Per1 や Per2 の Luciferase 融合遺伝子を用いた実験結果を記してきたが、これらが本当に Per1 や Per2 の機能が残存しているかが随所にて問題となったため、関連する実験結果をまとめて記載する。まず図 18 に示すように、Per2::Luciferase KI/KI 細胞の振動周期は 21-22 時間程度であり、24 時間よりもかなり短かった。また、申請者は恒常明(LL)条件 2 週間による履歴効果が恒常暗(DD)条件 2 週間の後にも残るか、行動レベルと組織レベルで確かめるための実験も行った。履歴効果に関しては評価が困難であったが、この際 Per2::Luciferase KI/KI を恒常明(LL)条件で 4 週間飼育したところ、一旦は位相後退が起こり、見かけ上周期延長しているようにも見えるが、長期に飼うとスプリッティングが起こり、どちらかというとも短周期(23.6 (SD 0.2) 時間)で自律振動を始めた(図 32)。スプリッティング現象とは、行動のフリーランリズムが 2 つに分割する現象のことをいい、ハムスターを高照度の恒常明(LL)条件に 50-100 日置いた時などに起こることが知られており[133, 155]、この時の SCN では Per1 遺伝子の発現位相が左右で異なることなども知られている[156]。マウスでは起こりにくく、実際申請者が PubMed で検索しても 14 件しか Hit し

なかったものの、Cry 1 transgenic[157], CS mice (Inbred)[158], SAMP8 (Senescence Accelerated Mouse-Prone 8)[159]などのマウスで起こることが知られており、SAMP8のような老化促進マウスでもみられることから、老化とPerの関係の観点からも興味深い。更に、pTVCI2-P(Per2L)-Per2(WT or FASPS)::Lucを、Per1/2 ダブルノックアウト ES 細胞に同様のコンストラクトをノックインして頂き、3i キメラマウスの行動リズムの表現型を解析したところ、周期性が認められる個体の割合は少なく、また周期性が出たり出なかったりする個体も多かった。WT では 恒常暗(DD)だと振動する個体数 5/11, 周期 22.6(SD 1.5) 時間, 恒常明(LL)条件だと振動する個体数 7/11, 周期 18.5 (SD 0.7) 時間であり、FASPS では恒常暗(DD)条件下での行動にははっきりした周期性は認められず、恒常明(LL)条件だと振動する個体数 6/11, 周期 19.0 (SD 0.9)時間であった(図 33)。また transient 期間が長く、徐々に周期性が出てくるような個体も見られた。Luciferase を融合しないコンストラクトのマウスの自律振動周期は安定かつ一貫しているのに対し、それと比較して短周期であった。

更に、Per2 ノックアウト ES 細胞では弱い振動は観察されるのに対し、上記行程で作製されたダブルノックアウト ES 細胞に Per2::Luc を戻した ES 細胞を分化させたところ、一部に増減を認めるものもあったが、総じて一貫性はなく、はっきりとした振動は観察できなかった(図 34)。以上より、

Per2::Luc 融合蛋白は Per2 としての活性が低い可能性が示唆される。ここでいう活性とは、Per が安定、一貫したロバストな概日周期を作る能力、Per2 が増加すると周期長が増加することの両方を指している。

〈Sox9 による Per1 と Per2 の独立制御の可能性〉

Per1 と Per2 の違いが見えて来たため、両者を独立に制御することは治療のターゲットとなりうると考えられた。図 7 で示した実験系において、視交叉上核で発現の高い Sox9[108]を NIH3T3 線維芽細胞でノックダウンしたところ、Per2 特異的な発現減少が見られた。(図 35) 尚、NIH3T3 において内因性の Sox9 が発現していることは、ウェスタンブロットにおいても確認している。

【考察】

本研究では、Per1 には短周期親和性があり、Per2 には長周期親和性があり、これら2つが協調することで24時間からはずれた概日振動を阻止する役割があることを示した。また細胞レベルの解析から、Per1 の短周期親和性、Per2 の長周期親和性には翻訳領域の違いが重要であることを示した。

従来生物は地球上の定点において生活していたため、地球の自転に最適化した時計の機構になっている。哺乳類では Per1 と Per2 の協調によって、夜間の雷鳴などの多少の摂動では揺るがない強固なリズムを刻むことができるが、それから大幅に外れた条件下では適応できず、病的な破綻(外環境への追従不能や無周期化)が起きてしまうと考えられる[160]。また、恒常暗(DD)条件は洞窟の中で暮らすことなどで、自然界で曝露される機会もあるだろうが、恒常明(LL)条件は極地の白夜などの例外を除けば、恒常明(LL)条件は自然界では存在しないと考えられる。したがって、24時間から外れた光サイクルや恒常明(LL)条件というのは現代社会が生み出した極めて非生理的な光条件であると考えられる。また、先行報告では時計遺伝子の Redundancy によって同調性を制限しているという報告もある。すなわち、Per や Cry といった時計遺伝子は複数のホモログが存在し、片方が破壊されただけでは無周期化は起きない。しかし、各々片方ずつを破壊したマウスは同調可能な周期幅が大幅に増加すると結論付

けられている。“時計遺伝子が野生型の状態であるほど柔軟性が低く同調できる範囲が狭い”という大まかな概念は本研究とも矛盾しないものと考えられる[161].

尚、月明かりはどうかというと、晴れた日の満月の明るさは 0.7 Lux 程度であるのに対し、昼間の光は天気にもよるが、5,000-10 万 Lux であり、月明かりは相対的に十分弱いため、昼夜がある限り相対的に暗の条件と考えられる。このように月の照度は極めて低く、天候の影響も受けやすいため、自然環境下ではあまり信頼できない外環境の手がかりと考えられる。実際、ヒトの場合は 300 Lux 程度の明暗条件では自律振動を阻止できないなど閾値が高い[162]ため、月明かりはヒトのリズムには殆ど影響が無いと考えられる。月経周期も環境の影響を受けない自律的なものであり、月の公転とは関係ないものと考えられている。一方、げっ歯類などの哺乳類は数 Lux の光にも同調可能であるため、時計に対する影響が無いわけではない(予備検討では、2.7 Lux 1 分 12 時間おきの刺激で Per1 ノックアウトマウスは同調可能であった)が、太陽光と比較すれば十分影響は小さいものと思われる。更に、ウミユスリカの幼虫は温度や波などを用いて潮汐リズムを感知するが、その中でも下田産のツシマウミユスリカは夜間の月明かりと内因性の生物時計を組み合わせる潮汐リズムを感知する[163]。他にも、カメムシの仲間には満月をピークとする 1 か月の活動の周期性

変動のあるものもいる[164] (ただし, こちらは内因性の生物時計が感知しているかは明らかでない).

本研究は夜行性動物を用いた検討であり, 昼行性動物に当てはまるかという問題はある. ただし, 昼行性と夜行性の動物における体内時計の時刻の違いは末梢時計の位相の違いのみによるものであると考えられている. 実際, 加齢や季節などで同一個体が昼行性から夜行性に切り替わるような現象が知られている生物もあり, 恐らくは中枢時計と末梢時計の間に何らかのスイッチがあるものと推察される. 更に, 昼行性動物であれ, 夜行性動物であれ, 中枢時計の位相は同位相であり光応答性も同様と考えられている[165-167]ので, 本研究結果は十分昼行性動物においても適用可能なものであると考えられる. また人類がそもそも昼行性の生活になったのはたかだか数千万年前と考えられており, 霊長類の中にも昼行性のものと夜行性のものが存在する[168]. 更に, 人間が一峰性の活動性パターンになったのは産業革命以降だとする見解[169]もあり, 恐らくは活動性パターンは内因性の概日時計よりも外環境への依存性が大きいと考えられ, 本研究結果は現代人にも十分適用可能であると考えられる.

細胞レベルの Per2 ノックアウトレスキュー系は先行文献で 1 報のみ報告されている[151]. しかし, この実験系はアデノウイルスを用いており, 細

胞内に入っているコピー数が一定でない．細胞内での量が振動性や周期長において重要な Per2 の変異体を評価する系としては有用性が低いと考えられ，実際にこの系では周期長の測定がなされていない．したがって，今回の ES 細胞の Rosa 26 へのターゲティングを用いた Per2 ノックアウトレスキュー系は，有用な実験系であると考えられる．先行文献では Per1 と Per2 の違いが見いだせなかったのに対し，本実験系では見いだせた理由は，本実験系では各細胞に正確に 1 コピーが入っていることによるものと推察され，本実験系の方がより信頼性の高い結果と考えられる．この結果は，少なくとも部分的には Per1 の短周期親和性，Per2 の長周期親和性は蛋白レベルの制御によるものであることを示している．現在 Per1 のプロモーターに入れ替えた場合どのようなことが起こるか検討中である．検索した範囲内において，Per1 と Per2 の役割の違いや協調の効果をみた論文は複数存在した[151, 170-172]が，いずれも Per1: 短周期親和性，Per2: 長周期親和性という視点から書かれたものではなかった(言及されていないわけではないが，Per2 ノックアウトマウスの内因性の概日時計の周期が短い可能性を示唆する一文があるといった程度であり，この結論が主要な論旨になっている論文はない)．恐らくは，細胞レベルで周期判定の可能な系が存在しないことや，恒常暗(DD)条件の周期長が野生型，Per1(-/-)，Per2(-/-)で殆ど同じであることなどが理由として考えられる．尚，申請者の行った実験では

Per1(-/-)とPer2(-/-)では恒常暗(DD)条件での周期長は先行文献と異なり、0.8時間異なっていたが、本研究ではPer1(-/-)もPer2(-/-)もPer1(+/-)Per2(+/-)の親を持つマウス同士であり、遺伝的背景がそろっているため、先行文献よりも信頼性が高い実験結果であると考えられる。また、後述するが、内因性の周期長の決定において、Per1:Per2比に加えて、Per1+Per2の総量も重要であると考えられる(後述)ため、後者の影響を考慮しないとPer1:Per2比の重要性は見えてこないため、あまり注目されていないのだと思われる(図 36)。

なぜ恒常暗(DD)条件では個体レベルでは24時間に近い周期を示しているのに対し、恒常明(LL)条件では周期長の大幅な変化が見られるのであろうか。可能性としては、1) Perの発現誘導 2) カップリング機構の影響の2つが考えられる。まず、恒常明(LL)条件下ではPerの発現量が上昇する。Perは過剰発現すると概日振動が破壊されることが知られており[139, 140]、この影響により概日振動が不安定化することが考えられる。本研究で、長期間(約2週間以上)の光刺激においてWTが無周期化したのに対し、Per1やPer2のノックアウトマウスでは無周期化がおこらなかったのも、Perの量の問題と考えれば説明がつく。すなわち、Per1もしくはPer2のコピー数が減るほど、一細胞内のPerの絶対量(総量)が減少するため、恒常明(LL)条件でPerの発現量が増加しても、概日振

動が破壊されるレベルまで Per 蛋白量が増加しないのだと考えられる。また、Per1(-/-) と Per2(-/-) の行動リズムを詳細にみた先行文献では、恒常明(LL) 条件における Per1(-/-), Per2 (-/-) の周期変化は既に報告されており、個々の時刻の位相反応曲線の積分値としての説明がなされている[172]。恒常暗(DD) 条件での周期長はほぼ揃っている。本研究との整合性については、恐らく、同じ現象を別の角度からみているのではないかと考えられる。すなわち、蛋白レベルの周期親和性の違いは各概日時刻の部分のみを切り取ると、位相応答性の違いとなりうると考えられる。言い換えれば、各時刻で光を照射された時の反応を積算し一周分足し合わせていくと、恒常明(LL) 条件での周期長の違いが見えてくるということである。ただし、個々の位相で何が起きて Per1(-/-) と Per2(-/-) の位相応答の違いが起きているかは、Per1 と Per2 の協調性の分子メカニズムの更なる解明が必要である。尚、Per2 (mut/mut) brd マウスでも周期延長が起こらないことは報告されており[173, 174]、本研究の予備実験と同様の結果であった。ただし、この周期性に関しては WT や Per2 変異マウスと比較して Per1 変異マウスでは周期性が消失しやすいとの結論であったが、本研究の結論との違いは、ドミナントネガティブ効果と Signal to Noise Ratio という解析方法（解析方法によっては、長周期程周期性を消失しやすいと判定してしまう）の違いによるものと思われる。また、カップリングの影響も重要

であると考えられる。カップリングとは、視交差上核の神経細胞同士が互いに神経接続によって刺激しあうことにより互いに同調し、同じ時刻を刻むようになることをいう。実際、Per2 の C 末に Luciferase 遺伝子を融合させたマウスの組織を切り出して組織培養を行うと、視交差上核以外の組織では徐々に組織内の個々の細胞の位相がばらけてくるため、全体としてみると減衰してくるのに対し、視交差上核では同期しているため減衰がほとんど起きない [170]。Per1 や Cry1, Cry2 のノックアウトマウスと Per2::Luc ノックインマウスをかけ合わせて、時計遺伝子のノックアウトの効果と組織、細胞レベルでの概日振動を観察した Liu らの報告では、Per1 ノックアウト細胞、Per2 ノックアウト細胞は振動せず、個体レベルでは振動を刻めると報告されている。この Per1 や Per2 が片方ノックアウトされても個体レベルでは概日リズムが残存する現象において、カップリング機構の重要性が示唆されている [170]。一方、恒常明 (LL) 条件下では神経細胞同士の接続 (同期) が弱まることが知られており、無周期化が起こったり、周期長が 24 時間より外れていたりするのは、この影響があるのかもしれない。尚、この先行報告では、Per1 ノックアウトマウスの SCN レベルでは振動があるが WT と周期長が同じだったと報告している [170]。Per2::Luc KI をレポーターとして使用しているため、Per2 KO の SCN の評価は厳密にはなされていない。SCN レベルでは Per1 (-/-) は周期長が同じとのことで、

本研究と一見矛盾するように見えるが、Per1(-/-)Per2(Luc/+)という遺伝子型であり、NativeなPerが1コピーしか無いため、周期長が減少している可能性や、恒常暗(DD)条件に近い状況であるため本研究結果と異なるのではないかと考えられた。したがって、このマウスのSCNを恒常明(LL)様の条件、例えばForskolinを持続的に灌流するような条件で培養すれば、周期長の延長がみられるかもしれない。また、彼らはPer3(-/-)やCry2(-/-)が行動レベル、SCNレベルの振動と比較して、末梢組織での周期長が24時間から外れている(各々26.6時間、22.0時間)ことを報告しており、個体レベルでの周期長が個々の細胞と比較して24時間に近い周期長を実現することを報告している。この他にも個体レベルの方が周期のばらつきが少なかったり、24時間に近かったりするようなことが複数の報告で観察されており、カップリング機構は細胞レベルの振動が24時間から離れていても24時間に近づけるようなネットワーク機構を内在しているのではないかと推察される[175, 176]。実際、恒常明(LL)刺激[132]やForskolin刺激によりカップリングが減弱するという報告もあり[177]。本研究で恒常暗(DD)条件と恒常明(LL)条件での周期長が大幅に異なったのは、恒常明(LL)刺激をすることで、個体レベルでも個々の細胞レベルの周期長が見えているのかもしれない。言い換えれば、Per1やPer2がノックアウトされることで大幅に周期長が24時間よりずれていたとしても、カップリング機構の存在で

24 時間に近い周期を刻めていたが、恒常明(LL)条件におくとカップリング機構が減弱することで、細胞レベルの周期長が個体レベルでも見えてきたのではないということである。尚、先述のようにPer2 ノックアウト細胞は振動しないと先行報告では書かれていたが、申請者の検討では、条件よく振動させればPer2 ノックアウト細胞でも概日振動を検出出来た。この時の周期長は23時間未満と推定され、個体での恒常暗(DD)の周期長よりも恒常明(LL)条件の周期長に近かった。ただし、振幅が小さく振動判定率も低かったため、厳密にこれを証明するためには、より鋭敏な実験系(Rosa 26 のプロモーターの影響を受けず半減期の短いレポーターコンストラクト)により証明する必要がある。また本論文では結論を単純化するため、Per1:短周期親和性、Per2:長周期親和性の1本の軸で議論したが、実際にはPerは量比のみならず、絶対量も重要である。Per2はコピー数が増えると周期が延長することが示されている[141]。また、BAC クローンを用いてPer1 ノックアウトレスキューを行った論文[171]では、Per1のコピー数を増やしても、恒常暗(DD)での周期長は殆ど変らなかったと報告されている。これは、Per1による短周期の効果と、Per全体の量が増加する効果で相殺されていると考えられる。

これらのPER1とPER2の違い、協調メカニズムはどのようなものからきているのだろうか。先行文献ではPER1はホモダイマーを創れないがPER2は

創れると報告されている[178]. また半減期の違いは蓄積速度の違いとなって現れてくると考えられ, 実際に Per の mRNA, PER 蛋白の細胞質内非リン酸化体, PER 蛋白の細胞質内リン酸化体, PER 蛋白の核内リン酸化体の 4 つのコンパートメントからなるシンプルなモデルを用いた分子シミュレーションの報告では, PER の半減期が短いほど周期が長いという結論になっている[179]. したがって, 申請者は図 37 のようなモデルを考えているが, 今後の検討課題である. PER 蛋白が徐々にリン酸化などの状態を変えていくことは, 時計の針として機能していると考えられている. しかし, 今回の結果の, 状態の変化が速い Per1 と状態の変化が遅い Per2 が協調して 24 時間周期を作っているというモデルから図 36, 図 37 のモデルに戻ってみると, 問題があることが分かる. なぜならば, PER1 が先に進んで早い時刻に揃うことは説明がついても, 状態の変化が遅い蛋白が状態の変化が速い蛋白の状態の変化を遅らせること (例えるならば, 足の遅い人が足の速い人の足を引っ張るようなこと) が説明できない. 更に, Per1 の短周期変異体を BAC クローンで多コピー導入した報告では, Per2 が 2 コピー存在していたとしても, Per1 の Dose 依存的に短周期化していったと報告されている[171]. これらの結果から, 細胞内に数千から数万個あるとされる PER 蛋白同士の時刻をシンクロナイズさせるような機構が存在しないと, 今回明らかになった協調機構は働きえないと考えられる. シアノバクテリアの KaiC という時

計蛋白では、6 量体内の 12 か所のリン酸基が 24 時間かけてゆっくり順々にリン酸化されることが 24 時間の時を刻む仕掛けとなっており、6 量体同士の交換反応によって細胞内の蛋白同士の時刻がシンクロナイズすると考えられている [180]。また、翻訳後振動体の理論を説明した論文では Enzyme sequestration という機構で同調機構がおきうると説明している [101]。PER でもこのようなことが起こりうるのではないかと想像されるが、今後の検討課題である。

本研究の Per2 ノックアウトレスキュー系を用いて見出された Per1 と Per2 の翻訳領域の違いに関しては、確固たるデータであるとは考えられるものの、いくつか本研究方法の限界もある。まず、細胞内での PER2 蛋白量の変化がどうかについては、間違いなく振動しているものと思われる。なぜならば、Per2 ノックアウト細胞内にはターゲッティングにて導入した Per2::Luc 融合蛋白しか存在せず、その発光量（すなわち蛋白量を反映する）が約 24 時間周期の変動を再現性良く示しているからである。ただし、内因性の Per1 mRNA 量や PER1 量は恐らく概日振動をしているであろうが、評価は難しいと思われる。レポーターのついていない mRNA 量や蛋白量を評価するためには定量的 PCR 法や Western blot 法を用いるしかないが、多点の評価が必要になるため、大量の ES 細胞を用意する必要がある。また、dish 間、dish 内の細胞のバラつきも大きいいためか、全体でみると Per2::Luc の発光量では 3 周期目の振動は絶対値の

10%程度、4周期目の振動は絶対値の数%であり、内因性の振動がこの程度であった場合、定量的 PCR では限界（メーカー保証で2倍の差まで、NIH3T3のような均一な細胞であっても、10%未満の差を正確に見分けることは困難と思われる。）であるし、蛋白レベルの内因性の振動を検出するのは尚更難しいものと推察される。更に、PERは構造の変化が激しいためか、抗体の作製が困難と言われている。逆に言えば、生細胞発光測定系は同じ細胞の前の時点をコントロールにして、蛋白量の増減を比較可能な上、数%の発光量(蛋白量)増減も鋭敏に読み取ることが出来、尚且つ数日間の徹夜の時系列サンプリングを置き換えることができる優れた系であるといえることができる。ただし、内因性の蛋白の変化も見える系でも PER1 と PER2 の差を比較したいと考えており、現在そのような実験系を模索中である。また本研究では Per1 や Per2 のコピー数の影響をみる実験は行っていないため、一見するとこれは弱点かもしれない。しかし、先行文献の Per2 ノックアウトレスキュー系において、ゲノムの同じ位置に正確に1細胞あたり1コピーのみを導入して比較した研究は本研究が初めてであり、この点において、ゲノム内のランダムな箇所に複数導入した研究結果や、細胞あたりの Per2 遺伝子のコピー数がばらついている研究結果よりも、より信頼性が高いのではないかと考えられる。また、Per2 ノックアウト細胞の振動判定されたものと Per1::Luc でレスキューしたものの周期長が似通っているため、

Per1 がこの実験系では機能していない可能性については、厳密な意味ではこの実験系から否定することは難しく、裏の実験(Per1 ノックアウト ES 細胞に Per1 と Per2 の蛋白をレスキューする実験)が必要である。しかし、Per1::Luc でレスキューした場合は 9 割以上の dish で振動判定されたのに対し、Luc の場合は 3 割程度の dish でしか振動判定されなかった。また、Luc しか入れない場合は相対振幅が大幅に小さいのに対し、Per1::Luc を入れた場合は Per2::Luc を入れた場合と比較して遜色ないことから、Per1::Luc は機能しているのではないかと考えられる。Per1::Luc と Luc の半減期の差の影響を見ているだけの可能性もあるが、少なくとも NIH3T3 で行った検討では、Per1::Luc と Luc の半減期の差はそれほど大きくない。

本研究では 12 灯用 LED 光照度制御装置の開発を行った。自然界では実験室内のように環境は瞬間的に変化することはない。実際、動物の行動パターンは実験室内と屋外では大幅に異なることが知られている。ショウジョウバエでは、研究室内の実験条件においては光の On off に一致した 2 峰状の行動パターンを示すが、屋外で実験すると、日中の真中をピークにした 3 つ目の行動ピークが出現することが知られており、光の緩徐な変化や気温の日内変動の双方の影響を受けていると考えられている[181]。ラットを用いた先行報告では緩徐に光を変化する光で飼育した方が短周期での同調性が良くなる[138, 182]と

の報告がある。また、ハムスターで、日の出と日の入りの照度パターンを再現すると、同調できる周期幅が広がる[183]との報告もあり、このような系はより自然な光の変化を探ることができる。更に、疾患モデルと合った光条件のパターンなどを探ることができるようになる。その他任意のパターンの光条件を作製できるため、時間医学の研究のみならず、様々な研究に利用が可能である有用な装置であると考えられる。次に、白色 LED を使用するメリットを次に記載する。白色 LED は種類によらず必ず青色 LED の成分を使用しているため、400-500 nm の成分が多い[184]。したがって、哺乳類で概日時計への光の入力に最も重要な、網膜神経節細胞に発現しているメラノプシン（吸収極大約 480 nm）[26]を効率的に刺激可能である。更に、白熱灯のような発熱も少ない。また、蛍光灯のように蛍光体の発光波長の部分がシャープなピークとして現れるようなことが無い分、白熱光程ではないものの、より生理的なブロードスペクトラムの光に近い。尚、本研究で作製したものと類似の機械の報告は先行報告では 2 つ報告があった。まず、白色 LED を用いて緩徐な光変化を作製している報告 [183]が存在するが、この Naturalistic illumination system (Patent US5343121) というシステムは光源に覆いをかぶせ、遮蔽具合を周期的に変えることで達成している。他にも類似の白色光を用いてサイン波状の光を作製 [185]しているものもあるが、システム状任意のパターンの光を使うことは

困難であり、尚且つ光量のダイナミックレンジに限界があると思われる。また、白熱電球とパナソニックのライトコントローラー、照度計をコンピューター制御したシステムも報告されている[138, 182, 186-188]が、LED に与える電流量を変更する 12 灯用 LED 光照度制御装置の方が、ダイナミックレンジが広いものと考えられる。また、白熱灯のライトコントローラー (NQ20346) は通常位相制御方式のため、調光すると点滅がおきてしまい、これが光の On off の繰り返しの繰り返しとして概日時計に影響を与える可能性がある。したがって、本システムのように電流量を変化させるシステムは、概日時計研究において都合が良い。更に、LED は寿命も長く、照度も変化しにくいため、長期間の測定にも最適である。以上より、本 12 灯用 LED 光照度制御装置には先行文献の系と比較しても優位性があるのではないかとと思われる。

緩徐に光変化をさせ、1 時間ごとの周期長で Per1, Per2 のノックアウトマウスの表現型をみた実験の結果は、先行研究の結果とは異なっていた。Pendergast らの検討によれば周期長を振った実験では、WT, Per1(-/-), Per2(-/-) の同調性において、いずれの遺伝子型でも 26 時間同調は可能であり、21 時間同調は WT では不能だが Per1(-/-) マウスや Per2 (-/-) では可能であり、遺伝子型ごとの大きな差はないと結論づけられている[172]。両者の違いは光のパターンの違いによるものと考えられる。光を突然 On にする場合、ノンパラ

メトリック同調と言われる同調が起こり、位相応答 (Phase shift: 体内時計の時刻が光を当てた瞬間にジャンプする) が起こるとされるが、この位相応答という時刻を無理やり動かすような方法ではなく、ゆっくり変化する自然界に近い光のパターンで内在性の周期を引き出すことで、より生理的な Per1 と Per2 の協調的な役割を示すことに成功したのではないかと考えられる。尚、ノックアウトマウスの方が同調できる概日周期長の幅が広いのはリミットサイクルが小さくなった影響をみているだけだという指摘も考えうる。ただし、この解釈の場合 Per1 と Per2 の違いが説明できないため、仮にその影響があったとしても、Per1 の短周期親和性、Per2 の長周期親和性の違いは想定しないと説明がつかない。

本研究では長時間の光という表現をしているが、どの程度からが”長時間の光の効果”となるのであろうか。これに関しては、実際数百 Lux の光を 1 分、5 分、15 分と振って位相応答を確かめた論文の結果が興味深い。位相応答の大きさは 1 分で 0.9 時間、5 分で 1.2 時間、15 分で 1.5 時間となっており、5 分と 15 分での位相応答は殆ど変らなかった[189]。光パルスは与えた瞬間に概日時計は位相をずらすとする研究結果もあり、概日時計は恐らく光をつけた瞬間にジャンプしていると考えられ、緩徐な光の変化とは影響が大きく違うのであろう[137]。

本研究ではES細胞の分化誘導による概日振動検出系の開発(周期長の誤差の小さい系への改良)に成功した。本実験系でレチノイン酸を使用した理由は、先行文献で使用されていた[38]ことが一番の理由であり、その文献で使われた理由は、レチノイン酸によって初期胚の Hox 遺伝子群の発現パターンを再現することができるからとされている[190]。その他にも、ES細胞を直接刺激するのによく使用されている点、遺伝子導入などを必要とせず、培地に添加することで全ての細胞に効かせることが出来、FACS (fluorescence activated cell sorting)などによる Sorting を必要としない点、安価である点などが挙げられる。尚、本研究で開発した One passage protocol では増殖が止まって生存を続けるほぼ1層のコンフルエントな比較的均一に近い細胞群が得られるため、他の分化刺激剤は使用していない。尚、分化した先の細胞の種類が何かは、本実験系ではあまり問題にならない。なぜならば、多能性を持った分化細胞で無い限り、全身の大半の細胞は殆ど同じ周期の概日時計を持っているため、個々の細胞が三胚葉のいずれの組織になつていようと全体として概日振動が検出できれば問題にならないからである。(ただし、細胞が均一であればあるほど個々の細胞の概日振動の周期の差が小さくなり、位相がばらけにくくなるので、全体として減衰しにくくなる。よって、ある程度均一な細胞を得る努力は必要である。)したがって、本研究では分化細胞の概日振動以外については、

1) 平坦に広がり、核が明瞭で、接触抑制のある突起の少ない細胞が主体を占める時に明瞭な振動が得られやすいこと。2) 場合によっては線維性の細胞や神経様の細胞が主体になることもあること。の 2 点の形態学的な観察による評価に留めている。形態的特徴においては、プロトコールは勿論のこと、血清のロット差や実験間の誤差も大きく、実験内でも細胞数やディッシュ間の誤差も大きく、更に同じディッシュ内でも様々な形態の細胞が存在する。ただ、何の細胞になっているかの疑問に答えるために先行文献をみると、まず、ES 細胞から分化誘導を行う際には浮遊培養により胚様体(三胚葉への分化が始まる初期胚と似た構造)を形成するのが一般的だが、ここでレチノイン酸を添加すると、神経系以外への発生を抑制することが知られており、その後の終分化(グリアや神経細胞)の促進もすることが知られている[191-194]。また、N2B27 培地 (N2 培地 (DMEM/F12 に N2 サプリメント (Insulin, Apotransferrin, Progesterone, putrescine, selenium)を加えたもの)と B27 培地 (Neurobasal に B27 サプリメントを加えたもの)を 1 対 1 で混合した神経分化能と生存性の双方に優れた無血清培地[195])にレチノイン酸を添加することで、胚様体を介さなくとも神経初期分化を促せるとする報告もある[196]。ただし、ES 細胞から直接神経細胞を分化させるためには、FGF2 (Fibroblast Growth Factor 2)の存在が必須であり、また BMP (Bone Morphogenetic Protein)系の阻害も効率を高める

ためには重要である[197]．本実験系ではそのようなものは添加しておらず，DMEM のような汎用培地を使用しているため，最終段階で神経細胞になっているものは少数と考えられる．その他にも，レチノイン酸添加によりネスチン陽性の筋前駆細胞が一部できるとする報告[193]や，低濃度では神経よりも心筋細胞が誘導されるとする報告[198, 199]，Pdx1 陽性の内胚葉が形成されたとする報告[200]，生殖細胞系列ができるとする報告[201]などもあり（ただし，生殖系列だと時計を持っていない細胞も多い），微妙な条件(恐らくは同じディッシュ内でも局所の濃度や周りの ES 細胞との関係など)の違いによって，様々な雑多な細胞になっていると思われる．総じて，細胞の肉眼観察の印象と合わせると，神経細胞，グリア細胞，筋芽細胞，線維芽細胞などの雑多な集団が，最終的な状態であると考えられるが，これを証明するためには次世代シーケンサーなどを用いた mRNA のプロファイリングと，それに基づく免疫染色などの確認が必要である．

分解速度と周期長の報告は様々なものがある．まず，FASPS 変異体を NIH3T3 で発現して波形パターンを見た先行文献では，シクロヘキシミド添加後，V5 tag を用いたウェスタングロットにより，野生型と比較して FASPS 変異体の方が，分解速度が速い(半減期が短い)ことを報告している[150, 202]．また，個体レベルの Per1 のノックアウトレスキューを行った論文では，PER1 の FASPS

相当サイトを変異させると、マウスの行動リズムは更に短周期化することを報告している。この際、C 末 Myc tag を用いたウェスタンブロットを施行することで、FASPS 相当変異をした PER1 の半減期が短くなっていることを確認している。更に、Kramer らのグループはウイルスベクターを用い、CMV プロモーター下に (DsRED)-IRES-(EGFP と時計遺伝子翻訳領域の融合蛋白) をコードする遺伝子を U20s に導入し、EGFP/DsRED 比を測定することで、各々の安定性を測定する実験系を構築している。FASPS サイトと下流の 6 つのリン酸化される残基を変異させるコンストラクトの分解が促進し、TRCP E3 リガーゼ結合部位を変異させることで安定性が向上することを報告している[203]。一方、PER1 と PER2 の半減期を比較した論文を申請者は見つけられていないが、Liver での蛋白量変化の概日変化を見た論文では、PER1 の方が増えやすく減りにくいように見える[143]。また、膨大な参考文献をもとに細胞内の転写翻訳フィードバックをシミュレーションし、時計遺伝子の変異マウスの表現型を再現した論文では、PER1 の方が PER2 よりも分解されやすいようなパラメーター設定になっている[204]。更に、Per 単一の転写翻訳、核移行だけでフィードバックループを説明したシンプルなモデルでは、PER の分解が速いほど、周期が長くなる傾向がみられた[179]。したがって、PER1 の方が PER2 よりも分解されにくいというのは必ずしも先行文献と矛盾せず、FASPS の周期短縮と独立したメカニズムが PER1 の

短周期親和性に関与していると考えられる。ショウジョウバエの PER では、セリン集積部位が順序だってリン酸化されることにより、最終段階で起こるユビキチンリガーゼ結合部位のリン酸化が抑制されることが示されている [205, 206]。またアカパンカビの FREQUENCY という時計蛋白においても、順序だったリン酸化により分解が亢進する事が知られている [207, 208]。恐らく哺乳類の Per でも FASPS サイト近傍では同様のことが起きており、この部位が変異するとユビキチンリガーゼ結合部位のリン酸化が促進し、周期が短縮するのだと考えられる [97]。FASPS の周期短縮や半減期現象は順序だったリン酸化の時間が短縮することによるものと考えられるのに対し、PER1 と PER2 の周期親和性の違いは、順序だったリン酸化とは別個の蛋白安定性の違いというのが一つの可能性として考えられるが、今後の検討課題である。また、PER1 蛋白と PER2 蛋白の半減期の違いは、8 回の実験で様々なコンストラクトやプラスミド精製方法、シクロヘキシミド添加方法で試し、全ての実験で再現が取れているため、NIH3T3, C 末 Luc の条件での結果は揺るぎないものと考えている。更に、キメラ蛋白を用いた実験により、N 末側の違いが重要な可能性が示唆されているが、シクロヘキシミドの加え方 (培地交換と同時に加えるべきか 1 週間飼って位相がばらけた時点で加えるべきか) や PMT で測定開始後何分後からのデータを解析すべきか (必ずしも分解速度が一定でなく、傾向もコンストラクトによって異なる) など検討

すべき課題も多く、まだ予備的な実験の段階である。ただし、PER1 の C 末には 46 アミノ酸の PER2 には存在しない領域があり、セリン残基がクラスターを形成していることなどから、この領域が PER1 と PER2 の違いに重要な可能性も否定できない。更に、C 末の Luciferase 融合の影響の可能性もある。したがって、現在 N 末 PER2, C 末 PER1 のキメラ蛋白の評価も含め、PER1 蛋白と PER2 蛋白の機能の違いがどの領域からきているのか、詳細に解析中であり、違いを示す領域を絞り込んだのち、その領域を入れ替えたキメラ蛋白によるノックアウトレスキューと分子メカニズムの探索を計画している。ただし、本実験系では pMU2-Per2::Luc 1 μ g/ 35 mm dish という相当な量 (pMU2-Per2 は数 μ g をトランスフェクションすると振動が破壊されてしまう) を入れた条件での検討であり、非生理的な条件での検討の可能性もある。理想的には Rosa 26 に戻した ES 細胞を分化誘導させての比較だが、ES 細胞クローンごとの性格の違い (増殖率など) があるため、測定開始時の細胞の種類や数を揃えることは難しい。すなわち、概日振動周期は細胞数の影響を受けにくい、半減期の測定は自家発光やノイズも含めて初期値に載ってしまうため、発光量の初期値の影響を受けやすい。更に、概日振動周期は細胞種 (何細胞に分化したか) の影響を受けにくいことは知られているものの、半減期もそうかは分からない。したがって、少量 NIH3T3 にトランスフェクションするなど、より生理条件に近い環境で正確に比

較した場合にも同じ結果が得られるかなどを検討している。

本研究では主に Per2 に Luciferase を融合したコンストラクトを用いたが、Luciferase 融合をしても本当に Per2 の機能が残存しているかが問題となった。Per2::Luciferase ノックインマウスは 2004 年に報告され、Per2 と機能が大きくは変わらないことが示されている[122]。ただし、その後の多くの研究では Per2::Luciferase(+/-KI)ヘテロマウスを使用しているケースが多い。申請者の検討では、まず図 18 に示すように、Per2 Luciferase KI/KI 細胞の振動周期は 21-22 時間程度であり、24 時間よりもかなり短かった。また、Per2::Luciferase KI/KI を恒常明(LL)条件で飼育すると、スプリッティングが起こり、どちらかというとも短周期で自律振動を始めた(図 32)。更に、P(Per2L)-Per2(WT or FASPS)::Luc を Per1/2 ダブルノックアウト ES 細胞にノックインした 3i キメラマウスの行動リズムは周期性が認められる個体の割合は少なく、周期性が出たり出なかったりする個体も多く、周期長も短かった(図 33)。また、Per2 ノックアウト ES 細胞では弱い振動は観察されるものの、ダブルノックアウト ES 細胞に Per2::Luc を戻した ES 細胞では全く振動が見られなかった(図 34)。以上より、Per2::Luc 融合蛋白は Per2 としての活性が低い可能性が示唆される。ここでいう活性とは、Per が安定、一貫したロバストな概日周期を作る能力、Per2 が増加すると周期長が増加することの両方を指してい

る。Per そのものは転写抑制因子としての活性は弱く、Cry との結合による相互安定化作用や核移行作用など、様々な因子と結合・協調することで概日時計を刻み、それら全体が”Per の活性”だと思われる。では、このような問題点があるにもかかわらず、本Per2 ノックアウトレスキュー系が細胞レベルで表現型を再現出来た理由は何であろうか？ まず、内因性の Per1 が存在しており、活性の弱い Per2::Luc でも十分にレスキュー可能であったことが考えられる。また、Rosa 26 領域は Sense 方向にプロモーター 活性を持っていることが知られている。レスキューしたコンストラクトは1コピーのみであり、Per2::Luc 融合蛋白の影響で活性が落ちていることでPer2 の活性が下がっている一方、Rosa 26 の Sense 鎖側で導入した効果により、Native Allele と比較して大幅に発現量が多いため、丁度個体における表現型を再現できたのではないかと考えられる。実際、申請者がPer2::Luc KI/KI ES細胞とPer2K0:R26:P(Per2L)-Per2::Luc レスキューES細胞を分化誘導後、PMTで計測した発光量の概算値(cpm)と測定終了後の細胞数を、血球計算板を用いて算出し、発光量/細胞数 を概算して比較すると、1細胞あたりで7-8倍、Alleleあたりで14倍程度異なると考えられた。したがって、この系の弱点としては、活性の弱い蛋白を多めに発現することで野生型に近い表現型を担保しているため、少し生理的でない点が挙げられる。Rosa 26 は Antisense 方向に挿入すると Rosa 26 のプロモーター活性の影響を受

けにくいことが知られている。更に、Per2L プロモーターの振幅は Per2s プロモーターと比較して小さいことも知られている。したがって申請者は pTVCI2-Rosa26 4k-4k, (Antisense)-P(Per2s)-Per2-IRES2-Luc2CP ベクターも作成しており、今後、Native に近い条件でのレスキュー系の構築を目指しており、より正確な Per1 と Per2 の翻訳領域の違いを検出することをめざしている (図 38)。

また、本研究では Per1 と Per2 の翻訳領域の違いは示せたものの、プロモーターの違いが周期長に影響を与える可能性を完全に排除は出来ていない。したがって申請者は、現在 P(Per1)-Per2::Luc でのターゲッティングも行っており、プロモーターレベルの違いが周期長親和性において重要ではないことの証明を目指している (図 38)。

最後に、本研究の臨床的な展望を記載する。加齢により概日時計の振幅 (Period 遺伝子の発現の振幅や行動リズムの振幅など) は減少することが知られている。現在では高齢者のせん妄などによるサーカディアンリズム睡眠障害において使用できる治療は、ベンゾジアゼピン受容体の作動薬やメラトニン受容体の作動薬などである。ベンゾジアゼピン受容体の作動薬は転倒骨折のリスクや常用性[209-213]がある点、メラトニンアゴニストは様々な概日時計以

外への影響がある点や即効性が無い点、慢性不眠症患者には効果が薄い点が指摘されている[214-216]。またその他の治療法は時間療法や光、社会的因子の同調などであるが、いずれも看護、介護側の負担は膨大なものになってしまう。したがって、光同調、社会的同調を薬で置き換えることができるようになれば、また Per1 や Per2 を別々に活性化、抑制をすることが可能であれば、せん妄などにおける昼夜逆転の創薬の主要ターゲットになるかもしれない。せん妄患者での概日時計制御に使用するのは勿論のこと、医療従事者側におけるシフトワーカーの夜勤時に、主観的昼を仕事時間と合わせることもできるようになるかもしれない。たとえば、申請者が1年目初期研修医として勤務した日立製作所日立総合病院においては、看護師の勤務は変則2交替性という制度であり、当時の総看護師長によれば、“様々な交替性を試したが、その中で最も働きやすい”制度であるとのことであった。ヒトの概日時計は進めるよりも遅らせる方が容易であることから、この制度は看護師の概日時計を意識した、身体に易しい夜勤形態であると考えられる。この時の基本的な勤務体系は、日勤、日勤、超勤（日勤だが通常よりも夜まで勤務する）、夜勤、明け、休み、日勤となっていた。例えばこの間 Per1 と Per2 を独立に制御できるような薬を用い、Per2 の量を増加させることで28時間周期を作り出すことが出来れば、大まかに主観的昼が勤務時間と重なるようになり、勤務効率もよく、医療事故も減らせるの

ではないかと考えられる.

尚, 申請者が行った実験では視交叉上核で発現の高い Sox9[108]をノックダウンすると, Per2 特異的な発現減少が見られており, Sox9 は別々に活性化抑制する際の創薬の一つのターゲットとして有望であると考えられる.

【結語】

個体レベルでは、短周期親和性の Per1 と長周期親和性の Per2 は協調し、非生理的な条件下において、24 時間からはずれた概日振動を阻止するが、逆にこの機構は柔軟でなく、病的な破綻（外環境への追従不能や無周期化）をきたしうることを示された。また、細胞レベルの解析により、Per1 と Per2 の協調機構は細胞レベルでも重要であり、翻訳領域の差異が Per1 の短周期親和性と Per2 の長周期親和性を規定している可能性が示唆された。更に、実験系の開発の観点からは、任意のパターンの光を照射した際の個体レベルの概日時計が測定可能な 12 灯用 LED 光照度制御装置、細胞レベルで正確に周期長を測定可能な ES 分化誘導系、FASPS 変異体の周期短縮を初めて細胞レベルで再現可能な Per2 ノックアウトレスキュー系の 3 つの新しい実験系を構築することにより、Per1 と Per2 の協調性の重要性を個体レベルと細胞レベルで証明することが可能となった（図 39）。概日時計のメカニズムの解明が、時差ボケや認知症における昼夜逆転など、概日時計の変調が関与する多くの疾患の治療薬の開発のみならず、概日時計の影響を受ける疾患の予防や、概日時計に合わせた治療（時間治療）の実現などにつながることを期待したい。

＜倫理面の配慮に関して＞

本研究の倫理面に関しては、 規定のガイドラインに沿って行われ、 下記の計画書の申請の承認を受けた上で施行された。

動物実験計画書： 理研発生再生科学総合研究センター： マウス生体内における

概日リズム機構の解析 承 AH15-10-22

第二種使用等拡散防止措置申請： 東京大学医学部： 細胞レベルの Per2 ノックア

ウトレスキュー系の構築. 部局承認番号 32-6

【謝辞】

本研究は東京大学医学系研究科老年病学教室と理化学研究所発生再生科学総合研究センターの双方にて行われました。多大なる御指導を頂きました老年病学教室の大内尉義前教授，秋下雅弘教授，小川純人准教授，システムズ薬理学教室の上田泰己教授に厚く御礼申し上げます。また，細胞レベルの概日時計の実験と分子生物学的な実験において熟練の技術を惜しみなくお教え下さった理化学研究所生命システム研究センターの鵜飼英樹先生，個体レベルの行動解析と数理解析に関し他大なる御指導を下さった理化学研究所生命システム研究センターの山田陸裕先生に厚く御礼申し上げます。

またこの他にも沢山の方々のご協力を頂きましてこの研究は進められました。ここに挙げた方々は，決して関係のない方ではなく，全て本研究の実験に関わりのあった方々になります。山口泰弘先生，東浩太郎先生，浦野友彦先生，小島太郎先生，石井正紀先生，高山賢一先生，秋好沢諭先生，石川里紗様，横山菜穂子様，佐々木典子様，坂本江里様，井角香子様，中村友美様，榎木陽子様，丸田菜央様をはじめとする老年病学教室の皆様，洲崎悦雄先生，田井中一貴先生，大出晃司先生，佐野俊春先生をはじめとするシステムズ薬理学教室の先生方，小出直史様，宇野健一郎様，村松万里江様，橋口朋代様，平原志乃様，土師達也様，木藤良沢様，辻野薫里様，中尾和貴先生，井上健一先

生，清成寛先生，日野すみれ様，野元万起様，徳嶺友香様をはじめとする発生再生科学総合研究センターの皆様，鵜飼-蓼沼磨貴様，丹羽康貴先生，藤島博史様，原淳子様，砂川玄志郎先生，鳴海良平先生，吉田淳子様，今井智佳子様，神田元紀様，平野佳子様，渡邊雅子様，エルハラル美和様をはじめとする生命システム研究センターの皆様，情報基盤センターの二階堂愛先生，笹川洋平先生，團野宏樹先生，ライフサイエンス技術基盤研究センターの 粕川雄也先生，近畿大学の重吉康史先生，升本耕平先生，中嶋正人先生，京都府立医科大学の八木田和弘先生，南陽一先生，バイオテックスの三上隆様には，この研究にご協力頂き，多大なる感謝の意をここに表させて頂きたく存じます．またこの中にも書ききれないほどの多くの方々に支えて頂き，改めて感謝申し上げます．

pCMV-Sport2-mPer1 のプラスミドを譲渡下さった Baylor College of Medicine の Cheng Lee 様，pIRES2-EGFP ベクターを譲渡下さった細胞分子薬理学教室の飯野正光先生にも感謝申し上げます．

尚，本研究は一部学術振興会特別研究員奨励費（研究代表者，田宮寛之）を使用して行われました．

【文献】

1. Tamiya, H., Hagino, N., Okamoto, A., and Yamamoto, K., *Morning granulocytopenia in two patients with connective-tissue disease treated with oral corticosteroids*. BMJ Case Rep, 2011. **2011**.
2. Nakao, N., Ono, H., Yamamura, T., Anraku, T., Takagi, T., Higashi, K., Yasuo, S., Katou, Y., Kageyama, S., Uno, Y., Kasukawa, T., Iigo, M., Sharp, P.J., Iwasawa, A., Suzuki, Y., Sugano, S., Niimi, T., Mizutani, M., Namikawa, T., Ebihara, S., et al., *Thyrotrophin in the pars tuberalis triggers photoperiodic response*. Nature, 2008. **452**(7185): p. 317-22.
3. Masumoto, K.H., Ukai-Tadenuma, M., Kasukawa, T., Nagano, M., Uno, K.D., Tsujino, K., Horikawa, K., Shigeyoshi, Y., and Ueda, H.R., *Acute induction of Eya3 by late-night light stimulation triggers TSHbeta expression in photoperiodism*. Curr Biol, 2010. **20**(24): p. 2199-206.
4. Merlin, C., Gegear, R.J., and Reppert, S.M., *Antennal circadian clocks coordinate sun compass orientation in migratory monarch butterflies*. Science, 2009. **325**(5948): p. 1700-4.
5. Johnson, C.H., Elliott, J.A., and Foster, R., *Entrainment of circadian programs*. Chronobiol Int, 2003. **20**(5): p. 741-74.
6. Hastings, J.W. and Sweeney, B.M., *On the Mechanism of Temperature Independence in a Biological Clock*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1957. **43**(9): p. 804-11.
7. Isojima, Y., Nakajima, M., Ukai, H., Fujishima, H., Yamada, R.G., Masumoto, K.H., Kiuchi, R., Ishida, M., Ukai-Tadenuma, M., Minami, Y., Kito, R., Nakao, K., Kishimoto, W., Yoo, S.H., Shimomura, K., Takao, T., Takano, A., Kojima, T., Nagai, K., Sakaki, Y., et al., *CKIepsilon/delta-dependent phosphorylation is a temperature-insensitive, period-determining process in the mammalian circadian clock*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(37): p. 15744-9.
8. Kume, K., Zylka, M.J., Sriram, S., Shearman, L.P., Weaver, D.R., Jin, X., Maywood, E.S., Hastings, M.H., and Reppert, S.M., *mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop*. Cell, 1999. **98**(2): p. 193-205.
9. Ohdo, S., Koyanagi, S., and Matsunaga, N., *Chronopharmacological strategies: Intra- and inter-individual variability of molecular clock*. Adv Drug Deliv Rev, 2010. **62**(9-10): p. 885-97.

10. Ueda, H.R., Chen, W., Adachi, A., Wakamatsu, H., Hayashi, S., Takasugi, T., Nagano, M., Nakahama, K., Suzuki, Y., Sugano, S., Iino, M., Shigeyoshi, Y., and Hashimoto, S., *A transcription factor response element for gene expression during circadian night*. Nature, 2002. **418**(6897): p. 534-9.
11. Ueda, H.R., Hayashi, S., Chen, W., Sano, M., Machida, M., Shigeyoshi, Y., Iino, M., and Hashimoto, S., *System-level identification of transcriptional circuits underlying mammalian circadian clocks*. Nat Genet, 2005. **37**(2): p. 187-92.
12. Ukai-Tadenuma, M., Kasukawa, T., and Ueda, H.R., *Proof-by-synthesis of the transcriptional logic of mammalian circadian clocks*. Nat Cell Biol, 2008. **10**(10): p. 1154-63.
13. Sato, T.K., Yamada, R.G., Ukai, H., Baggs, J.E., Miraglia, L.J., Kobayashi, T.J., Welsh, D.K., Kay, S.A., Ueda, H.R., and Hogenesch, J.B., *Feedback repression is required for mammalian circadian clock function*. Nat Genet, 2006. **38**(3): p. 312-9.
14. Ukai-Tadenuma, M., Yamada, R.G., Xu, H., Ripperger, J.A., Liu, A.C., and Ueda, H.R., *Delay in feedback repression by cryptochrome 1 is required for circadian clock function*. Cell, 2011. **144**(2): p. 268-81.
15. Tousson, E. and Meissl, H., *Suprachiasmatic nuclei grafts restore the circadian rhythm in the paraventricular nucleus of the hypothalamus*. J Neurosci, 2004. **24**(12): p. 2983-8.
16. Wang, T.L., Chiang, F.T., Hsu, K.L., Tseng, C.D., Lee, T.K., and Tseng, Y.Z., *Abnormal circadian blood pressure changes in patients with acute cerebrovascular disorders*. J Formos Med Assoc, 1997. **96**(9): p. 710-7.
17. Cohen, R.A. and Albers, H.E., *Disruption of human circadian and cognitive regulation following a discrete hypothalamic lesion: a case study*. Neurology, 1991. **41**(5): p. 726-9.
18. Terazono, H., Mutoh, T., Yamaguchi, S., Kobayashi, M., Akiyama, M., Udo, R., Ohdo, S., Okamura, H., and Shibata, S., *Adrenergic regulation of clock gene expression in mouse liver*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(11): p. 6795-800.
19. Ishida, A., Mutoh, T., Ueyama, T., Bando, H., Masubuchi, S., Nakahara, D., Tsujimoto, G., and Okamura, H., *Light activates the adrenal gland: timing of gene expression and glucocorticoid release*. Cell Metab, 2005. **2**(5): p. 297-307.
20. So, A.Y., Bernal, T.U., Pillsbury, M.L., Yamamoto, K.R., and Feldman, B.J., *Glucocorticoid regulation of the circadian clock modulates glucose homeostasis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(41): p. 17582-7.
21. Honma, K.I., Honma, S., and Hiroshige, T., *Feeding-associated corticosterone peak in rats under various feeding cycles*. Am J Physiol, 1984. **246**(5 Pt 2): p. R721-6.

22. Wakamatsu, H., Yoshinobu, Y., Aida, R., Moriya, T., Akiyama, M., and Shibata, S., *Restricted-feeding-induced anticipatory activity rhythm is associated with a phase-shift of the expression of mPer1 and mPer2 mRNA in the cerebral cortex and hippocampus but not in the suprachiasmatic nucleus of mice*. Eur J Neurosci, 2001. **13**(6): p. 1190-6.
23. Shibata, S., Hirao, A., and Tahara, Y., *Restricted feeding-induced entrainment of activity rhythm and peripheral clock rhythm*. Sleep and Biological Rhythms, 2010. **8**(1): p. 18-27.
24. Bogdan, A., Bouchareb, B., and Touitou, Y., *Ramadan fasting alters endocrine and neuroendocrine circadian patterns. Meal-time as a synchronizer in humans?* Life Sci, 2001. **68**(14): p. 1607-15.
25. Winfree, A.T., *Integrated view of resetting a circadian clock*. J Theor Biol, 1970. **28**(3): p. 327-74.
26. Ukai, H., Kobayashi, T.J., Nagano, M., Masumoto, K.H., Sujino, M., Kondo, T., Yagita, K., Shigeyoshi, Y., and Ueda, H.R., *Melanopsin-dependent photo-perturbation reveals desynchronization underlying the singularity of mammalian circadian clocks*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(11): p. 1327-34.
27. Toh, K.L., Jones, C.R., He, Y., Eide, E.J., Hinze, W.A., Virshup, D.M., Ptacek, L.J., and Fu, Y.H., *An hPer2 phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phase syndrome*. Science, 2001. **291**(5506): p. 1040-3.
28. Karlsson, B., Knutsson, A., and Lindahl, B., *Is there an association between shift work and having a metabolic syndrome? Results from a population based study of 27,485 people*. Occup Environ Med, 2001. **58**(11): p. 747-52.
29. Pan, A., Schernhammer, E.S., Sun, Q., and Hu, F.B., *Rotating night shift work and risk of type 2 diabetes: two prospective cohort studies in women*. PLoS Med, 2011. **8**(12): p. e1001141.
30. Suwazono, Y., Dochi, M., Sakata, K., Okubo, Y., Oishi, M., Tanaka, K., Kobayashi, E., and Nogawa, K., *Shift work is a risk factor for increased blood pressure in Japanese men: a 14-year historical cohort study*. Hypertension, 2008. **52**(3): p. 581-6.
31. Schernhammer, E.S., Laden, F., Speizer, F.E., Willett, W.C., Hunter, D.J., Kawachi, I., and Colditz, G.A., *Rotating night shifts and risk of breast cancer in women participating in the nurses' health study*. J Natl Cancer Inst, 2001. **93**(20): p. 1563-8.
32. Fujino, Y., Iso, H., Tamakoshi, A., Inaba, Y., Koizumi, A., Kubo, T., and Yoshimura, T., *A prospective cohort study of shift work and risk of ischemic heart disease in Japanese male workers*. Am J Epidemiol, 2006. **164**(2): p. 128-35.
33. Vyas, M.V., Garg, A.X., Iansavichus, A.V., Costella, J., Donner, A., Laugsand, L.E.,

- Janszky, I., Mrkobrada, M., Parraga, G., and Hackam, D.G., *Shift work and vascular events: systematic review and meta-analysis*. BMJ, 2012. **345**: p. e4800.
34. Arble, D.M., Bass, J., Laposky, A.D., Vitaterna, M.H., and Turek, F.W., *Circadian timing of food intake contributes to weight gain*. Obesity (Silver Spring), 2009. **17**(11): p. 2100-2.
 35. Scheer, F.A., Hilton, M.F., Mantzoros, C.S., and Shea, S.A., *Adverse metabolic and cardiovascular consequences of circadian misalignment*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(11): p. 4453-8.
 36. Karatsoreos, I.N., Bhagat, S., Bloss, E.B., Morrison, J.H., and McEwen, B.S., *Disruption of circadian clocks has ramifications for metabolism, brain, and behavior*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(4): p. 1657-62.
 37. Inada, Y., Uchida, H., Umemura, Y., Nakamura, W., Sakai, T., Koike, N., and Yagita, K., *Cell and tissue-autonomous development of the circadian clock in mouse embryos*. FEBS Lett, 2014. **588**(3): p. 459-65.
 38. Yagita, K., Horie, K., Koinuma, S., Nakamura, W., Yamanaka, I., Urasaki, A., Shigeyoshi, Y., Kawakami, K., Shimada, S., Takeda, J., and Uchiyama, Y., *Development of the circadian oscillator during differentiation of mouse embryonic stem cells in vitro*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(8): p. 3846-51.
 39. Iwabu, M., Yamauchi, T., Okada-Iwabu, M., Sato, K., Nakagawa, T., Funata, M., Yamaguchi, M., Namiki, S., Nakayama, R., Tabata, M., Ogata, H., Kubota, N., Takamoto, I., Hayashi, Y.K., Yamauchi, N., Waki, H., Fukayama, M., Nishino, I., Tokuyama, K., Ueki, K., et al., *Adiponectin and AdipoR1 regulate PGC-1alpha and mitochondria by Ca(2+) and AMPK/SIRT1*. Nature, 2010. **464**(7293): p. 1313-9.
 40. Nakahata, Y., Kaluzova, M., Grimaldi, B., Sahar, S., Hirayama, J., Chen, D., Guarente, L.P., and Sassone-Corsi, P., *The NAD+-dependent deacetylase SIRT1 modulates CLOCK-mediated chromatin remodeling and circadian control*. Cell, 2008. **134**(2): p. 329-40.
 41. Asher, G., Gatfield, D., Stratmann, M., Reinke, H., Dibner, C., Kreppel, F., Mostoslavsky, R., Alt, F.W., and Schibler, U., *SIRT1 regulates circadian clock gene expression through PER2 deacetylation*. Cell, 2008. **134**(2): p. 317-28.
 42. Chang, H.C. and Guarente, L., *SIRT1 mediates central circadian control in the SCN by a mechanism that decays with aging*. Cell, 2013. **153**(7): p. 1448-60.
 43. Ciarleglio, C.M., Ryckman, K.K., Servick, S.V., Hida, A., Robbins, S., Wells, N., Hicks, J., Larson, S.A., Wiedermann, J.P., Carver, K., Hamilton, N., Kidd, K.K., Kidd, J.R., Smith, J.R., Friedlaender, J., McMahon, D.G., Williams, S.M., Summar, M.L., and Johnson, C.H., *Genetic differences in human circadian clock genes among worldwide*

- populations*. J Biol Rhythms, 2008. **23**(4): p. 330-340.
44. Wehr, T.A., Duncan, W.C., Jr., Sher, L., Aeschbach, D., Schwartz, P.J., Turner, E.H., Postolache, T.T., and Rosenthal, N.E., *A circadian signal of change of season in patients with seasonal affective disorder*. Arch Gen Psychiatry, 2001. **58**(12): p. 1108-14.
 45. Shimba, S., Ishii, N., Ohta, Y., Ohno, T., Watabe, Y., Hayashi, M., Wada, T., Aoyagi, T., and Tezuka, M., *Brain and muscle Arnt-like protein-1 (BMAL1), a component of the molecular clock, regulates adipogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(34): p. 12071-6.
 46. Shimba, S., Ogawa, T., Hitosugi, S., Ichihashi, Y., Nakadaira, Y., Kobayashi, M., Tezuka, M., Kosuge, Y., Ishige, K., Ito, Y., Komiyama, K., Okamatsu-Ogura, Y., Kimura, K., and Saito, M., *Deficient of a clock gene, brain and muscle Arnt-like protein-1 (BMAL1), induces dyslipidemia and ectopic fat formation*. PLoS One, 2011. **6**(9): p. e25231.
 47. Viswambharan, H., Carvas, J.M., Antic, V., Marecic, A., Jud, C., Zaug, C.E., Ming, X.F., Montani, J.P., Albrecht, U., and Yang, Z., *Mutation of the circadian clock gene Per2 alters vascular endothelial function*. Circulation, 2007. **115**(16): p. 2188-95.
 48. Anea, C.B., Zhang, M., Stepp, D.W., Simkins, G.B., Reed, G., Fulton, D.J., and Rudic, R.D., *Vascular disease in mice with a dysfunctional circadian clock*. Circulation, 2009. **119**(11): p. 1510-7.
 49. Marcheva, B., Ramsey, K.M., Buhr, E.D., Kobayashi, Y., Su, H., Ko, C.H., Ivanova, G., Omura, C., Mo, S., Vitaterna, M.H., Lopez, J.P., Philipson, L.H., Bradfield, C.A., Crosby, S.D., JeBailey, L., Wang, X., Takahashi, J.S., and Bass, J., *Disruption of the clock components CLOCK and BMAL1 leads to hypoinsulinaemia and diabetes*. Nature, 2010. **466**(7306): p. 627-31.
 50. Mansour, H.A., Wood, J., Logue, T., Chowdari, K.V., Dayal, M., Kupfer, D.J., Monk, T.H., Devlin, B., and Nimgaonkar, V.L., *Association study of eight circadian genes with bipolar I disorder, schizoaffective disorder and schizophrenia*. Genes Brain Behav, 2006. **5**(2): p. 150-7.
 51. Woon, P.Y., Kaisaki, P.J., Braganca, J., Bihoreau, M.T., Levy, J.C., Farrall, M., and Gauguier, D., *Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like (BMAL1) is associated with susceptibility to hypertension and type 2 diabetes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(36): p. 14412-7.
 52. Turek, F.W., Joshu, C., Kohsaka, A., Lin, E., Ivanova, G., McDearmon, E., Laposky, A., Losee-Olson, S., Easton, A., Jensen, D.R., Eckel, R.H., Takahashi, J.S., and Bass, J., *Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice*. Science, 2005.

- 308(5724): p. 1043-5.
53. Scott, E.M., Carter, A.M., and Grant, P.J., *Association between polymorphisms in the Clock gene, obesity and the metabolic syndrome in man*. Int J Obes (Lond), 2008. **32**(4): p. 658-62.
 54. Benedetti, F., Dall'aspezia, S., Fulgosi, M.C., Lorenzi, C., Serretti, A., Barbini, B., Colombo, C., and Smeraldi, E., *Actimetric evidence that CLOCK 3111 T/C SNP influences sleep and activity patterns in patients affected by bipolar depression*. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, 2007. **144B**(5): p. 631-5.
 55. Serretti, A., Benedetti, F., Mandelli, L., Lorenzi, C., Pirovano, A., Colombo, C., and Smeraldi, E., *Genetic dissection of psychopathological symptoms: insomnia in mood disorders and CLOCK gene polymorphism*. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, 2003. **121B**(1): p. 35-8.
 56. Doi, M., Takahashi, Y., Komatsu, R., Yamazaki, F., Yamada, H., Haraguchi, S., Emoto, N., Okuno, Y., Tsujimoto, G., Kanematsu, A., Ogawa, O., Todo, T., Tsutsui, K., van der Horst, G.T., and Okamura, H., *Salt-sensitive hypertension in circadian clock-deficient Cry-null mice involves dysregulated adrenal Hsd3b6*. Nat Med, 2010. **16**(1): p. 67-74.
 57. Zhang, E.E., Liu, Y., Dentin, R., Pongsawakul, P.Y., Liu, A.C., Hirota, T., Nusinow, D.A., Sun, X., Landais, S., Kodama, Y., Brenner, D.A., Montminy, M., and Kay, S.A., *Cryptochrome mediates circadian regulation of cAMP signaling and hepatic gluconeogenesis*. Nat Med, 2010. **16**(10): p. 1152-6.
 58. Dupuis, J., Langenberg, C., Prokopenko, I., Saxena, R., Soranzo, N., Jackson, A.U., Wheeler, E., Glazer, N.L., Bouatia-Naji, N., Gloyn, A.L., Lindgren, C.M., Magi, R., Morris, A.P., Randall, J., Johnson, T., Elliott, P., Rybin, D., Thorleifsson, G., Steinthorsdottir, V., Henneman, P., et al., *New genetic loci implicated in fasting glucose homeostasis and their impact on type 2 diabetes risk*. Nat Genet, 2010. **42**(2): p. 105-16.
 59. Fu, L., Patel, M.S., Bradley, A., Wagner, E.F., and Karsenty, G., *The molecular clock mediates leptin-regulated bone formation*. Cell, 2005. **122**(5): p. 803-15.
 60. Spanagel, R., Pendyala, G., Abarca, C., Zghoul, T., Sanchis-Segura, C., Magnone, M.C., Lascorz, J., Depner, M., Holzberg, D., Soyka, M., Schreiber, S., Matsuda, F., Lathrop, M., Schumann, G., and Albrecht, U., *The clock gene Per2 influences the glutamatergic system and modulates alcohol consumption*. Nat Med, 2005. **11**(1): p. 35-42.
 61. Eckle, T., Hartmann, K., Bonney, S., Reithel, S., Mittelbronn, M., Walker, L.A., Lowes, B.D., Han, J., Borchers, C.H., Buttrick, P.M., Kominsky, D.J., Colgan, S.P.,

- and Eltzschig, H.K., *Adora2b-elicited Per2 stabilization promotes a HIF-dependent metabolic switch crucial for myocardial adaptation to ischemia*. Nat Med, 2012. **18**(5): p. 774-82.
62. Grimaldi, B., Bellet, M.M., Katada, S., Astarita, G., Hirayama, J., Amin, R.H., Granneman, J.G., Piomelli, D., Leff, T., and Sassone-Corsi, P., *PER2 controls lipid metabolism by direct regulation of PPARGamma*. Cell Metab, 2010. **12**(5): p. 509-20.
 63. Garcia-Rios, A., Perez-Martinez, P., Delgado-Lista, J., Phillips, C.M., Gjelstad, I.M., Wright, J.W., Karlstrom, B., Kiec-Wilk, B., van Hees, A.M., Helal, O., Polus, A., Defoort, C., Riserus, U., Blaak, E.E., Lovegrove, J.A., Drevon, C.A., Roche, H.M., and Lopez-Miranda, J., *A Period 2 genetic variant interacts with plasma SFA to modify plasma lipid concentrations in adults with metabolic syndrome*. J Nutr, 2012. **142**(7): p. 1213-8.
 64. Partonen, T., Treutlein, J., Alpmann, A., Frank, J., Johansson, C., Depner, M., Aron, L., Rietschel, M., Wellek, S., Soronen, P., Paunio, T., Koch, A., Chen, P., Lathrop, M., Adolfsson, R., Persson, M.L., Kasper, S., Schalling, M., Peltonen, L., and Schumann, G., *Three circadian clock genes Per2, Arntl, and Npas2 contribute to winter depression*. Ann Med, 2007. **39**(3): p. 229-38.
 65. Benedetti, F., Dallaspezia, S., Colombo, C., Pirovano, A., Marino, E., and Smeraldi, E., *A length polymorphism in the circadian clock gene Per3 influences age at onset of bipolar disorder*. Neuroscience Letters, 2008. **445**(2): p. 184-187.
 66. Nievergelt, C.M., Kripke, D.F., Barrett, T.B., Burg, E., Remick, R.A., Sadovnick, A.D., McElroy, S.L., Keck, P.E., Schork, N.J., and Kelsoe, J.R., *Suggestive evidence for association of the circadian genes PERIOD3 and ARNTL with bipolar disorder*. American Journal of Medical Genetics Part B-Neuropsychiatric Genetics, 2006. **141B**(3): p. 234-241.
 67. Artioli, P., Lorenzi, C., Pirovano, A., Serretti, A., Benedetti, F., Catalano, M., and Smeraldi, E., *How do genes exert their role? Period 3 gene variants and possible influences on mood disorder phenotypes*. Eur Neuropsychopharmacol, 2007. **17**(9): p. 587-94.
 68. Martinek, S., Inonog, S., Manoukian, A.S., and Young, M.W., *A role for the segment polarity gene shaggy/GSK-3 in the Drosophila circadian clock*. Cell, 2001. **105**(6): p. 769-79.
 69. Ko, H.W., Kim, E.Y., Chiu, J., Vanselow, J.T., Kramer, A., and Edery, I., *A hierarchical phosphorylation cascade that regulates the timing of PERIOD nuclear entry reveals novel roles for proline-directed kinases and GSK-3beta/SGG in circadian clocks*. J Neurosci, 2010. **30**(38): p. 12664-75.

70. McClung, C.A., *Circadian genes, rhythms and the biology of mood disorders*. Pharmacol Ther, 2007. **114**(2): p. 222-32.
71. Benedetti, F., Serretti, A., Colombo, C., Lorenzi, C., Tubazio, V., and Smeraldi, E., *A glycogen synthase kinase 3-beta promoter gene single nucleotide polymorphism is associated with age at onset and response to total sleep deprivation in bipolar depression*. Neuroscience Letters, 2004. **368**(2): p. 123-6.
72. Benedetti, F., Serretti, A., Pontiggia, A., Bernasconi, A., Lorenzi, C., Colombo, C., and Smeraldi, E., *Long-term response to lithium salts in bipolar illness is influenced by the glycogen synthase kinase 3-beta -50 T/C SNP*. Neuroscience Letters, 2005. **376**(1): p. 51-5.
73. Yu, E.A. and Weaver, D.R., *Disrupting the circadian clock: gene-specific effects on aging, cancer, and other phenotypes*. Aging (Albany NY), 2011. **3**(5): p. 479-93.
74. Okazaki, F., Matsunaga, N., Okazaki, H., Utoguchi, N., Suzuki, R., Maruyama, K., Koyanagi, S., and Ohdo, S., *Circadian rhythm of transferrin receptor 1 gene expression controlled by c-Myc in colon cancer-bearing mice*. Cancer Res, 2010. **70**(15): p. 6238-46.
75. Levi, F., Zidani, R., and Misset, J.L., *Randomised multicentre trial of chronotherapy with oxaliplatin, fluorouracil, and folinic acid in metastatic colorectal cancer*. International Organization for Cancer Chronotherapy. Lancet, 1997. **350**(9079): p. 681-6.
76. Ohdo, S., Koyanagi, S., Suyama, H., Higuchi, S., and Aramaki, H., *Changing the dosing schedule minimizes the disruptive effects of interferon on clock function*. Nat Med, 2001. **7**(3): p. 356-60.
77. Minami, Y., Kasukawa, T., Kakazu, Y., Iigo, M., Sugimoto, M., Ikeda, S., Yasui, A., van der Horst, G.T., Soga, T., and Ueda, H.R., *Measurement of internal body time by blood metabolomics*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(24): p. 9890-5.
78. Kasukawa, T., Sugimoto, M., Hida, A., Minami, Y., Mori, M., Honma, S., Honma, K., Mishima, K., Soga, T., and Ueda, H.R., *Human blood metabolite timetable indicates internal body time*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(37): p. 15036-41.
79. Akashi, M., Soma, H., Yamamoto, T., Tsugitomi, A., Yamashita, S., Nishida, E., Yasuda, A., Liao, J.K., and Node, K., *Noninvasive method for assessing the human circadian clock using hair follicle cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(35): p. 15643-8.
80. Mishima, K., Okawa, M., Hishikawa, Y., Hozumi, S., Hori, H., and Takahashi, K., *Morning bright light therapy for sleep and behavior disorders in elderly patients with dementia*. Acta Psychiatr Scand, 1994. **89**(1): p. 1-7.

81. Claustrat, B., Brun, J., and Chazot, G., *The basic physiology and pathophysiology of melatonin*. Sleep Med Rev, 2005. **9**(1): p. 11-24.
82. Riemersma-van der Lek, R.F., Swaab, D.F., Twisk, J., Hol, E.M., Hoogendijk, W.J., and Van Someren, E.J., *Effect of bright light and melatonin on cognitive and noncognitive function in elderly residents of group care facilities: a randomized controlled trial*. JAMA, 2008. **299**(22): p. 2642-55.
83. Hatta, K., Kishi, Y., Wada, K., Takeuchi, T., Odawara, T., Usui, C., and Nakamura, H., *Preventive effects of ramelteon on delirium: a randomized placebo-controlled trial*. JAMA Psychiatry, 2014. **71**(4): p. 397-403.
84. Golden, R.N., Gaynes, B.N., Ekstrom, R.D., Hamer, R.M., Jacobsen, F.M., Suppes, T., Wisner, K.L., and Nemeroff, C.B., *The efficacy of light therapy in the treatment of mood disorders: a review and meta-analysis of the evidence*. Am J Psychiatry, 2005. **162**(4): p. 656-62.
85. Tamiya, H., Fukuhara, N., Yoshida, N., Suzuki, H., Takeshita, A., Inoshita, N., Nishioka, H., Takeuchi, Y., Sano, T., and Yamada, S., *A Silent Follicle-Stimulating Hormone-Producing Pituitary Adenoma in a Teenage Male*. Endocrine Pathology, 2011. **22**(4): p. 212-217.
86. Ebisawa, T., Uchiyama, M., Kajimura, N., Kamei, Y., Shibui, K., Kim, K., Kudo, Y., Iwase, T., Sugishita, M., Jodoi, T., Ikeda, M., Ozeki, Y., Watanabe, T., Sekimoto, M., Katoh, M., Yamada, N., Toyoshima, R., Okawa, M., Takahashi, K., and Yamauchi, T., *Genetic polymorphisms of human melatonin 1b receptor gene in circadian rhythm sleep disorders and controls*. Neuroscience Letters, 2000. **280**(1): p. 29-32.
87. Ebisawa, T., Uchiyama, M., Kajimura, N., Mishima, K., Kamei, Y., Katoh, M., Watanabe, T., Sekimoto, M., Shibui, K., Kim, K., Kudo, Y., Ozeki, Y., Sugishita, M., Toyoshima, R., Inoue, Y., Yamada, N., Nagase, T., Ozaki, N., Ohara, O., Ishida, N., et al., *Association of structural polymorphisms in the human period3 gene with delayed sleep phase syndrome*. EMBO Rep, 2001. **2**(4): p. 342-6.
88. Iwase, T., Kajimura, N., Uchiyama, M., Ebisawa, T., Yoshimura, K., Kamei, Y., Shibui, K., Kim, K., Kudo, Y., Katoh, M., Watanabe, T., Nakajima, T., Ozeki, Y., Sugishita, M., Hori, T., Ikeda, M., Toyoshima, R., Inoue, Y., Yamada, N., Mishima, K., et al., *Mutation screening of the human Clock gene in circadian rhythm sleep disorders*. Psychiatry Res, 2002. **109**(2): p. 121-8.
89. Mishima, K., Tozawa, T., Satoh, K., Saitoh, H., and Mishima, Y., *The 3111T/C polymorphism of hClock is associated with evening preference and delayed sleep timing in a Japanese population sample*. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, 2005. **133B**(1): p. 101-4.

90. Libert, S., Bonkowski, M.S., Pointer, K., Pletcher, S.D., and Guarente, L., *Deviation of innate circadian period from 24 h reduces longevity in mice*. Aging Cell, 2012. **11**(5): p. 794-800.
91. Czeisler, C.A., Duffy, J.F., Shanahan, T.L., Brown, E.N., Mitchell, J.F., Rimmer, D.W., Ronda, J.M., Silva, E.J., Allan, J.S., Emens, J.S., Dijk, D.J., and Kronauer, R.E., *Stability, precision, and near-24-hour period of the human circadian pacemaker*. Science, 1999. **284**(5423): p. 2177-81.
92. Gouin, J.P., Connors, J., Kiecolt-Glaser, J.K., Glaser, R., Malarkey, W.B., Atkinson, C., Beversdorf, D., and Quan, N., *Altered expression of circadian rhythm genes among individuals with a history of depression*. J Affect Disord, 2010. **126**(1-2): p. 161-6.
93. Xu, Y., Padiath, Q.S., Shapiro, R.E., Jones, C.R., Wu, S.C., Saigoh, N., Saigoh, K., Ptacek, L.J., and Fu, Y.H., *Functional consequences of a CK1delta mutation causing familial advanced sleep phase syndrome*. Nature, 2005. **434**(7033): p. 640-4.
94. Shearman, L.P., Zylka, M.J., Weaver, D.R., Kolakowski, L.F., Jr., and Reppert, S.M., *Two period homologs: circadian expression and photic regulation in the suprachiasmatic nuclei*. Neuron, 1997. **19**(6): p. 1261-9.
95. Bae, K., Jin, X., Maywood, E.S., Hastings, M.H., Reppert, S.M., and Weaver, D.R., *Differential functions of mPer1, mPer2, and mPer3 in the SCN circadian clock*. Neuron, 2001. **30**(2): p. 525-36.
96. Aschoff, J., *Exogenous and Endogenous Components in Circadian Rhythms*. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 1960. **25**: p. 11-28.
97. Shanware, N.P., Hutchinson, J.A., Kim, S.H., Zhan, L., Bowler, M.J., and Tibbetts, R.S., *Casein kinase 1-dependent phosphorylation of familial advanced sleep phase syndrome-associated residues controls PERIOD 2 stability*. J Biol Chem, 2011. **286**(14): p. 12766-74.
98. Nakajima, M., Imai, K., Ito, H., Nishiwaki, T., Murayama, Y., Iwasaki, H., Oyama, T., and Kondo, T., *Reconstitution of circadian oscillation of cyanobacterial KaiC phosphorylation in vitro*. Science, 2005. **308**(5720): p. 414-5.
99. Yamamoto, Y., Yagita, K., and Okamura, H., *Role of cyclic mPer2 expression in the mammalian cellular clock*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(5): p. 1912-21.
100. O'Neill, J.S. and Reddy, A.B., *Circadian clocks in human red blood cells*. Nature, 2011. **469**(7331): p. 498-503.
101. Jolley, C.C., Ode, K.L., and Ueda, H.R., *A design principle for a posttranslational biochemical oscillator*. Cell Rep, 2012. **2**(4): p. 938-50.
102. Zylka, M.J., Shearman, L.P., Weaver, D.R., and Reppert, S.M., *Three period*

- homologs in mammals: differential light responses in the suprachiasmatic circadian clock and oscillating transcripts outside of brain.* Neuron, 1998. **20**(6): p. 1103-10.
103. Albrecht, U., Zheng, B., Larkin, D., Sun, Z.S., and Lee, C.C., *MPer1 and mper2 are essential for normal resetting of the circadian clock.* J Biol Rhythms, 2001. **16**(2): p. 100-4.
 104. Albrecht, U., Bordon, A., Schmutz, I., and Ripperger, J., *The multiple facets of Per2.* Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2007. **72**: p. 95-104.
 105. Kojima, S., Shingle, D.L., and Green, C.B., *Post-transcriptional control of circadian rhythms.* J Cell Sci, 2011. **124**(Pt 3): p. 311-20.
 106. Woo, K.C., Kim, T.D., Lee, K.H., Kim, D.Y., Kim, W., Lee, K.Y., and Kim, K.T., *Mouse period 2 mRNA circadian oscillation is modulated by PTB-mediated rhythmic mRNA degradation.* Nucleic Acids Res, 2009. **37**(1): p. 26-37.
 107. Ogawa, Y., Koike, N., Kurosawa, G., Soga, T., Tomita, M., and Tei, H., *Positive autoregulation delays the expression phase of mammalian clock gene Per2.* PLoS One, 2011. **6**(4): p. e18663.
 108. Kasukawa, T., Masumoto, K.H., Nikaido, I., Nagano, M., Uno, K.D., Tsujino, K., Hanashima, C., Shigeyoshi, Y., and Ueda, H.R., *Quantitative expression profile of distinct functional regions in the adult mouse brain.* PLoS One, 2011. **6**(8): p. e23228.
 109. Hatori, M., Gill, S., Mure, L.S., Goulding, M., O'Leary, D.D.M., and Panda, S., *Lhx1 maintains synchrony among circadian oscillator neurons of the SCN.* Elife, 2014. **3**.
 110. Yamajuku, D., Shibata, Y., Kitazawa, M., Katakura, T., Urata, H., Kojima, T., Nakata, O., and Hashimoto, S., *Identification of functional clock-controlled elements involved in differential timing of Per1 and Per2 transcription.* Nucleic Acids Res, 2010. **38**(22): p. 7964-73.
 111. Albrecht, U., Sun, Z.S., Eichele, G., and Lee, C.C., *A differential response of two putative mammalian circadian regulators, mper1 and mper2, to light.* Cell, 1997. **91**(7): p. 1055-64.
 112. Niwa, H., Yamamura, K., and Miyazaki, J., *Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector.* Gene, 1991. **108**(2): p. 193-9.
 113. Hida, A., Koike, N., Hirose, M., Hattori, M., Sakaki, Y., and Tei, H., *The human and mouse Period1 genes: five well-conserved E-boxes additively contribute to the enhancement of mPer1 transcription.* Genomics, 2000. **65**(3): p. 224-33.
 114. Richter, C.P., *A behavioristic study of the activity of the rat.* Comparative psychology monographs 1922, Baltimore,: Williams & Wilkins Company. 55 p.
 115. Sokolove, P.G. and Bushell, W.N., *Chi Square Periodogram - Its Utility for Analysis*

- of Circadian-Rhythms*. J Theor Biol, 1978. **72**(1): p. 131-160.
116. Possidente, B., Hegmann, J.P., Carlson, L., and Elder, B., *Pigment mutations associated with altered circadian rhythms in mice*. Physiol Behav, 1982. **28**(3): p. 389-92.
 117. Zheng, B., Larkin, D.W., Albrecht, U., Sun, Z.S., Sage, M., Eichele, G., Lee, C.C., and Bradley, A., *The mPer2 gene encodes a functional component of the mammalian circadian clock*. Nature, 1999. **400**(6740): p. 169-73.
 118. Kondo, T. and Ishiura, M., *Circadian rhythms of cyanobacteria: monitoring the biological clocks of individual colonies by bioluminescence*. J Bacteriol, 1994. **176**(7): p. 1881-5.
 119. Obrietan, K., Impey, S., and Storm, D.R., *Light and circadian rhythmicity regulate MAP kinase activation in the suprachiasmatic nuclei*. Nat Neurosci, 1998. **1**(8): p. 693-700.
 120. Akashi, M. and Nishida, E., *Involvement of the MAP kinase cascade in resetting of the mammalian circadian clock*. Genes Dev, 2000. **14**(6): p. 645-9.
 121. Dziema, H., Oatis, B., Butcher, G.Q., Yates, R., Hoyt, K.R., and Obrietan, K., *The ERK/MAP kinase pathway couples light to immediate-early gene expression in the suprachiasmatic nucleus*. Eur J Neurosci, 2003. **17**(8): p. 1617-27.
 122. Yoo, S.H., Yamazaki, S., Lowrey, P.L., Shimomura, K., Ko, C.H., Buhr, E.D., Siepk, S.M., Hong, H.K., Oh, W.J., Yoo, O.J., Menaker, M., and Takahashi, J.S., *PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(15): p. 5339-46.
 123. Wataya, T., Ando, S., Muguruma, K., Ikeda, H., Watanabe, K., Eiraku, M., Kawada, M., Takahashi, J., Hashimoto, N., and Sasai, Y., *Minimization of exogenous signals in ES cell culture induces rostral hypothalamic differentiation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(33): p. 11796-801.
 124. Ying, Q.L., Wray, J., Nichols, J., Batlle-Morera, L., Doble, B., Woodgett, J., Cohen, P., and Smith, A., *The ground state of embryonic stem cell self-renewal*. Nature, 2008. **453**(7194): p. 519-23.
 125. Niwa, H., Ogawa, K., Shimosato, D., and Adachi, K., *A parallel circuit of LIF signalling pathways maintains pluripotency of mouse ES cells*. Nature, 2009. **460**(7251): p. 118-22.
 126. Aton, S.J., Block, G.D., Tei, H., Yamazaki, S., and Herzog, E.D., *Plasticity of circadian behavior and the suprachiasmatic nucleus following exposure to non-24-hour light cycles*. J Biol Rhythms, 2004. **19**(3): p. 198-207.

127. Molyneux, P.C., Dahlgren, M.K., and Harrington, M.E., *Circadian entrainment aftereffects in suprachiasmatic nuclei and peripheral tissues in vitro*. Brain Res, 2008. **1228**: p. 127-34.
128. Kiyonari, H., Kaneko, M., Abe, S., and Aizawa, S., *Three inhibitors of FGF receptor, ERK, and GSK3 establishes germline-competent embryonic stem cells of C57BL/6N mouse strain with high efficiency and stability*. Genesis, 2010. **48**(5): p. 317-27.
129. Obrietan, K., Impey, S., Smith, D., Athos, J., and Storm, D.R., *Circadian regulation of cAMP response element-mediated gene expression in the suprachiasmatic nuclei*. J Biol Chem, 1999. **274**(25): p. 17748-56.
130. Pavlidis, T., *Free-Run Period of Circadian-Rhythms and Phase Response Curves*. American Naturalist, 1973. **107**(956): p. 524-530.
131. Abe, Y., Ushirogawa, H., and Tomioka, K., *Circadian locomotor rhythms in the cricket, Gryllodes sigillatus - I. Localization of the pacemaker and the photoreceptor*. Zoological Science, 1997. **14**(5): p. 719-727.
132. Ohta, H., Yamazaki, S., and McMahon, D.G., *Constant light desynchronizes mammalian clock neurons*. Nat Neurosci, 2005. **8**(3): p. 267-9.
133. Pittendrigh, C.S. and Daan, S., *Functional-Analysis of Circadian Pacemakers in Nocturnal Rodents .5. Pacemaker Structure - Clock for All Seasons*. Journal of Comparative Physiology, 1976. **106**(3): p. 333-355.
134. Chen, R., Seo, D.O., Bell, E., von Gall, C., and Lee, C., *Strong resetting of the mammalian clock by constant light followed by constant darkness*. J Neurosci, 2008. **28**(46): p. 11839-47.
135. Spoelstra, K., Oklejewicz, M., and Daan, S., *Restoration of self-sustained circadian rhythmicity by the mutant clock allele in mice in constant illumination*. J Biol Rhythms, 2002. **17**(6): p. 520-5.
136. Yoshida, T., Murayama, Y., Ito, H., Kageyama, H., and Kondo, T., *Nonparametric entrainment of the in vitro circadian phosphorylation rhythm of cyanobacterial KaiC by temperature cycle*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(5): p. 1648-53.
137. Aschoff, J., King, F.A., and Stricker, E.M., *Handbook of Behavioral Neurobiology: Biological rhythms* 1981: Plenum Press.
138. Usui, S., Takahashi, Y., and Okazaki, T., *Range of entrainment of rat circadian rhythms to sinusoidal light-intensity cycles*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2000. **278**(5): p. R1148-56.
139. Chen, R., Schirmer, A., Lee, Y., Lee, H., Kumar, V., Yoo, S.H., Takahashi, J.S., and Lee, C., *Rhythmic PER abundance defines a critical nodal point for negative feedback within the circadian clock mechanism*. Mol Cell, 2009. **36**(3): p. 417-30.

140. Numano, R., Yamazaki, S., Umeda, N., Samura, T., Sujino, M., Takahashi, R., Ueda, M., Mori, A., Yamada, K., Sakaki, Y., Inouye, S.T., Menaker, M., and Tei, H., *Constitutive expression of the Period1 gene impairs behavioral and molecular circadian rhythms*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(10): p. 3716-21.
141. Gu, X., Xing, L., Shi, G., Liu, Z., Wang, X., Qu, Z., Wu, X., Dong, Z., Gao, X., Liu, G., Yang, L., and Xu, Y., *The circadian mutation PER2(S662G) is linked to cell cycle progression and tumorigenesis*. Cell Death Differ, 2012. **19**(3): p. 397-405.
142. Forger, D.B. and Peskin, C.S., *Stochastic simulation of the mammalian circadian clock*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(2): p. 321-4.
143. Lee, C., Etchegaray, J.P., Cagampang, F.R., Loudon, A.S., and Reppert, S.M., *Posttranslational mechanisms regulate the mammalian circadian clock*. Cell, 2001. **107**(7): p. 855-67.
144. Friedrich, G. and Soriano, P., *Promoter traps in embryonic stem cells: a genetic screen to identify and mutate developmental genes in mice*. Genes Dev, 1991. **5**(9): p. 1513-23.
145. Abe, T., Kiyonari, H., Shioi, G., Inoue, K., Nakao, K., Aizawa, S., and Fujimori, T., *Establishment of conditional reporter mouse lines at ROSA26 locus for live cell imaging*. Genesis, 2011. **49**(7): p. 579-90.
146. Umemura, Y., Yoshida, J., Wada, M., Tsuchiya, Y., Minami, Y., Watanabe, H., Kondoh, G., Takeda, J., Inokawa, H., Horie, K., and Yagita, K., *An in vitro ES cell-based clock recapitulation assay model identifies CK2alpha as an endogenous clock regulator*. PLoS One, 2013. **8**(6): p. e67241.
147. Umemura, Y., Koike, N., Matsumoto, T., Yoo, S.H., Chen, Z., Yasuhara, N., Takahashi, J.S., and Yagita, K., *Transcriptional program of Kpna2/Importin-alpha2 regulates cellular differentiation-coupled circadian clock development in mammalian cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(47): p. E5039-48.
148. Bogdanove, A.J. and Voytas, D.F., *TAL effectors: customizable proteins for DNA targeting*. Science, 2011. **333**(6051): p. 1843-6.
149. Xu, Y., Toh, K.L., Jones, C.R., Shin, J.Y., Fu, Y.H., and Ptacek, L.J., *Modeling of a human circadian mutation yields insights into clock regulation by PER2*. Cell, 2007. **128**(1): p. 59-70.
150. Vanselow, K., Vanselow, J.T., Westermarck, P.O., Reischl, S., Maier, B., Korte, T., Herrmann, A., Herzog, H., Schlosser, A., and Kramer, A., *Differential effects of PER2 phosphorylation: molecular basis for the human familial advanced sleep phase syndrome (FASPS)*. Genes Dev, 2006. **20**(19): p. 2660-72.
151. Lee, Y., Chen, R., Lee, H.M., and Lee, C., *Stoichiometric relationship among clock*

- proteins determines robustness of circadian rhythms.* J Biol Chem, 2011. **286**(9): p. 7033-42.
152. Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P.D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L.A., and Zhang, F., *Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems.* Science, 2013. **339**(6121): p. 819-23.
 153. Eide, E.J., Woolf, M.F., Kang, H., Woolf, P., Hurst, W., Camacho, F., Vielhaber, E.L., Giovanni, A., and Virshup, D.M., *Control of mammalian circadian rhythm by CKIepsilon-regulated proteasome-mediated PER2 degradation.* Mol Cell Biol, 2005. **25**(7): p. 2795-807.
 154. Reischl, S., Vanselow, K., Westermark, P.O., Thierfelder, N., Maier, B., Herzelt, H., and Kramer, A., *Beta-TrCP1-mediated degradation of PERIOD2 is essential for circadian dynamics.* J Biol Rhythms, 2007. **22**(5): p. 375-86.
 155. Bittman, E.L., Costello, M.K., and Brewer, J.M., *Circadian organization of tau mutant hamsters: aftereffects and splitting.* J Biol Rhythms, 2007. **22**(5): p. 425-31.
 156. Pickard, G.E. and Turek, F.W., *Splitting of the circadian rhythm of activity is abolished by unilateral lesions of the suprachiasmatic nuclei.* Science, 1982. **215**(4536): p. 1119-21.
 157. Okano, S., Akashi, M., Hayasaka, K., and Nakajima, O., *Unusual circadian locomotor activity and pathophysiology in mutant CRY1 transgenic mice.* Neuroscience Letters, 2009. **451**(3): p. 246-51.
 158. Abe, H., Honma, S., Honma, K., Suzuki, T., and Ebihara, S., *Functional diversities of two activity components of circadian rhythm in genetical splitting mice (CS strain).* J Comp Physiol A, 1999. **184**(3): p. 243-51.
 159. McAuley, J.D., Miller, J.P., Beck, E., Nagy, Z.M., and Pang, K.C., *Age-related disruptions in circadian timing: evidence for "split" activity rhythms in the SAMP8.* Neurobiol Aging, 2002. **23**(4): p. 625-32.
 160. Yamaguchi, Y., Suzuki, T., Mizoro, Y., Kori, H., Okada, K., Chen, Y., Fustin, J.M., Yamazaki, F., Mizuguchi, N., Zhang, J., Dong, X., Tsujimoto, G., Okuno, Y., Doi, M., and Okamura, H., *Mice genetically deficient in vasopressin V1a and V1b receptors are resistant to jet lag.* Science, 2013. **342**(6154): p. 85-90.
 161. Erzberger, A., Hampf, G., Granada, A.E., Albrecht, U., and Herzelt, H., *Genetic redundancy strengthens the circadian clock leading to a narrow entrainment range.* J R Soc Interface, 2013. **10**(84): p. 20130221.
 162. Wever, R.A., *Influence of Physical Workload on Freerunning Circadian-Rhythms of Man.* Pflugers Archiv-European Journal of Physiology, 1979. **381**(2): p. 119-126.
 163. Neumann, D. and Heimbach, F., *Circadian Range of Entrainment in the Semilunar*

- Eclosion Rhythm of the Marine Insect Clunio Marinus*. Journal of Insect Physiology, 1985. **31**(7): p. 549-557.
164. Ito, K., Sugiyama, H., Salleh, N.M.N.B.N., and Min, C.P., *Effects of Lunar Phase on Light Trap Catches of the Malayan Black Rice Bug, Scotinophara-Coarctata (Heteroptera, Pentatomidae)*. Bulletin of Entomological Research, 1993. **83**(1): p. 59-66.
 165. Krubitzer, L., Campi, K.L., and Cooke, D.F., *All rodents are not the same: a modern synthesis of cortical organization*. Brain Behav Evol, 2011. **78**(1): p. 51-93.
 166. Todd, W.D., Gall, A.J., Weiner, J.A., and Blumberg, M.S., *Distinct retinohypothalamic innervation patterns predict the developmental emergence of species-typical circadian phase preference in nocturnal Norway rats and diurnal Nile grass rats*. J Comp Neurol, 2012. **520**(14): p. 3277-92.
 167. Schwartz, M.D., Nunez, A.A., and Smale, L., *Differences in the suprachiasmatic nucleus and lower subparaventricular zone of diurnal and nocturnal rodents*. Neuroscience, 2004. **127**(1): p. 13-23.
 168. Heesy, C.P. and Ross, C.F., *Evolution of activity patterns and chromatic vision in primates: morphometrics, genetics and cladistics*. Journal of Human Evolution, 2001. **40**(2): p. 111-149.
 169. Wehr, T.A., *In short photoperiods, human sleep is biphasic*. J Sleep Res, 1992. **1**(2): p. 103-107.
 170. Liu, A.C., Welsh, D.K., Ko, C.H., Tran, H.G., Zhang, E.E., Priest, A.A., Buhr, E.D., Singer, O., Meeker, K., Verma, I.M., Doyle, F.J., 3rd, Takahashi, J.S., and Kay, S.A., *Intercellular coupling confers robustness against mutations in the SCN circadian clock network*. Cell, 2007. **129**(3): p. 605-16.
 171. Liu, Z., Huang, M., Wu, X., Shi, G., Xing, L., Dong, Z., Qu, Z., Yan, J., Yang, L., Panda, S., and Xu, Y., *PER1 phosphorylation specifies feeding rhythm in mice*. Cell Rep, 2014. **7**(5): p. 1509-20.
 172. Pendergast, J.S., Friday, R.C., and Yamazaki, S., *Photoc entrainment of period mutant mice is predicted from their phase response curves*. J Neurosci, 2010. **30**(36): p. 12179-84.
 173. Steinlechner, S., Jacobmeier, B., Scherbarth, F., Dernbach, H., Kruse, F., and Albrecht, U., *Robust circadian rhythmicity of Per1 and Per2 mutant mice in constant light, and dynamics of Per1 and Per2 gene expression under long and short photoperiods*. J Biol Rhythms, 2002. **17**(3): p. 202-9.
 174. Spoelstra, K. and Daan, S., *Effects of constant light on circadian rhythmicity in mice lacking functional cry genes: dissimilar from per mutants*. J Comp Physiol A

- Neuroethol Sens Neural Behav Physiol, 2008. **194**(3): p. 235-42.
175. Hastings, M.H. and Herzog, E.D., *Clock genes, oscillators, and cellular networks in the suprachiasmatic nuclei*. J Biol Rhythms, 2004. **19**(5): p. 400-13.
 176. Herzog, E.D., Aton, S.J., Numano, R., Sakaki, Y., and Tei, H., *Temporal precision in the mammalian circadian system: a reliable clock from less reliable neurons*. J Biol Rhythms, 2004. **19**(1): p. 35-46.
 177. Koinuma, S., Asakawa, T., Nagano, M., Furukawa, K., Sujino, M., Masumoto, K.H., Nakajima, Y., Hashimoto, S., Yagita, K., and Shigeyoshi, Y., *Regional circadian period difference in the suprachiasmatic nucleus of the mammalian circadian center*. Eur J Neurosci, 2013. **38**(6): p. 2832-41.
 178. Yagita, K., Yamaguchi, S., Tamanini, F., van Der Horst, G.T., Hoeijmakers, J.H., Yasui, A., Loros, J.J., Dunlap, J.C., and Okamura, H., *Dimerization and nuclear entry of mPER proteins in mammalian cells*. Genes Dev, 2000. **14**(11): p. 1353-63.
 179. Kurosawa, G. and Iwasa, Y., *Temperature compensation in circadian clock models*. J Theor Biol, 2005. **233**(4): p. 453-468.
 180. Ito, H., Kageyama, H., Mutsuda, M., Nakajima, M., Oyama, T., and Kondo, T., *Autonomous synchronization of the circadian KaiC phosphorylation rhythm*. Nat Struct Mol Biol, 2007. **14**(11): p. 1084-8.
 181. Vanin, S., Bhutani, S., Montelli, S., Menegazzi, P., Green, E.W., Pegoraro, M., Sandrelli, F., Costa, R., and Kyriacou, C.P., *Unexpected features of Drosophila circadian behavioural rhythms under natural conditions*. Nature, 2012. **484**(7394): p. 371-5.
 182. Usui, S., *Gradual changes in environmental light intensity and entrainment of circadian rhythms*. Brain Dev, 2000. **22 Suppl 1**: p. S61-4.
 183. Boulos, Z., Macchi, M.M., and Terman, M., *Twilights widen the range of photic entrainment in hamsters*. J Biol Rhythms, 2002. **17**(4): p. 353-63.
 184. Kido, J., Kimura, M., and Nagai, K., *Multilayer White Light-Emitting Organic Electroluminescent Device*. Science, 1995. **267**(5202): p. 1332-1334.
 185. Ruis, J.F., Rietveld, W.J., and Buys, J.P., *Properties of parametric photic entrainment of circadian rhythms in the rat*. Physiol Behav, 1991. **50**(6): p. 1233-9.
 186. Usui, S., Takahashi, Y., Honda, Y., and Ebihara, S., *Circadian behavioral rhythms during various light-intensity cycles in rats*. Physiol Behav, 1989. **46**(3): p. 521-8.
 187. Usui, S., Okazaki, T., and Takahashi, Y., *The lower entrainable limit of rat circadian rhythm to sinusoidal light intensity cycles: a preliminary study*. Psychiatry Clin Neurosci, 1999. **53**(2): p. 215-7.
 188. Usui, S., Takahashi, Y., and Honda, Y., *Rat circadian rhythms entrain to a*

- descending saw-tooth light intensity cycle*. *Physiol Behav*, 1992. **51**(1): p. 185-93.
189. Dkhissi-Benyahya, O., Gronfier, C., De Vanssay, W., Flamant, F., and Cooper, H.M., *Modeling the role of mid-wavelength cones in circadian responses to light*. *Neuron*, 2007. **53**(5): p. 677-87.
 190. Forrester, L.M., Nagy, A., Sam, M., Watt, A., Stevenson, L., Bernstein, A., Joyner, A.L., and Wurst, W., *An induction gene trap screen in embryonic stem cells: Identification of genes that respond to retinoic acid in vitro*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(4): p. 1677-82.
 191. Bain, G., Kitchens, D., Yao, M., Huettner, J.E., and Gottlieb, D.I., *Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro*. *Dev Biol*, 1995. **168**(2): p. 342-57.
 192. Kim, M., Habiba, A., Doherty, J.M., Mills, J.C., Mercer, R.W., and Huettner, J.E., *Regulation of mouse embryonic stem cell neural differentiation by retinoic acid*. *Dev Biol*, 2009. **328**(2): p. 456-71.
 193. Fraichard, A., Chassande, O., Bilbaut, G., Dehay, C., Savatier, P., and Samarut, J., *In vitro differentiation of embryonic stem cells into glial cells and functional neurons*. *J Cell Sci*, 1995. **108 (Pt 10)**: p. 3181-8.
 194. Glaser, T. and Brustle, O., *Retinoic acid induction of ES-cell-derived neurons: the radial glia connection*. *Trends Neurosci*, 2005. **28**(8): p. 397-400.
 195. Ying, Q.L. and Smith, A.G., *Defined conditions for neural commitment and differentiation*. *Differentiation of Embryonic Stem Cells*, 2003. **365**: p. 327-+.
 196. Xu, J., Wang, H., Liang, T., Cai, X., Rao, X., Huang, Z., and Sheng, G., *Retinoic acid promotes neural conversion of mouse embryonic stem cells in adherent monoculture*. *Mol Biol Rep*, 2012. **39**(2): p. 789-95.
 197. Varga, A.C. and Wrana, J.L., *The disparate role of BMP in stem cell biology*. *Oncogene*, 2005. **24**(37): p. 5713-21.
 198. Okada, Y., Shimazaki, T., Sobue, G., and Okano, H., *Retinoic-acid-concentration-dependent acquisition of neural cell identity during in vitro differentiation of mouse embryonic stem cells*. *Dev Biol*, 2004. **275**(1): p. 124-42.
 199. Rohwedel, J., Guan, K., and Wobus, A.M., *Induction of cellular differentiation by retinoic acid in vitro*. *Cells Tissues Organs*, 1999. **165**(3-4): p. 190-202.
 200. Micallef, S.J., Janes, M.E., Knezevic, K., Davis, R.P., Elefanty, A.G., and Stanley, E.G., *Retinoic acid induces Pdx1-positive endoderm in differentiating mouse embryonic stem cells*. *Diabetes*, 2005. **54**(2): p. 301-5.
 201. Chen, W., Jia, W., Wang, K., Zhou, Q., Leng, Y., Duan, T., and Kang, J., *Retinoic acid regulates germ cell differentiation in mouse embryonic stem cells through a Smad-dependent pathway*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012. **418**(3): p. 571-7.

202. Vanselow, K. and Kramer, A., *Role of phosphorylation in the mammalian circadian clock*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2007. **72**: p. 167-76.
203. Wallach, T., Schellenberg, K., Maier, B., Kalathur, R.K., Porras, P., Wanker, E.E., Futschik, M.E., and Kramer, A., *Dynamic circadian protein-protein interaction networks predict temporal organization of cellular functions*. PLoS Genet, 2013. **9**(3): p. e1003398.
204. Kim, J.K. and Forger, D.B., *A mechanism for robust circadian timekeeping via stoichiometric balance*. Mol Syst Biol, 2012. **8**: p. 630.
205. Chiu, J.C., Ko, H.W., and Edery, I., *NEMO/NLK phosphorylates PERIOD to initiate a time-delay phosphorylation circuit that sets circadian clock speed*. Cell, 2011. **145**(3): p. 357-70.
206. Kivimae, S., Saez, L., and Young, M.W., *Activating PER repressor through a DBT-directed phosphorylation switch*. PLoS Biol, 2008. **6**(7): p. e183.
207. Querfurth, C., Diernfellner, A.C., Gin, E., Malzahn, E., Hofer, T., and Brunner, M., *Circadian conformational change of the Neurospora clock protein FREQUENCY triggered by clustered hyperphosphorylation of a basic domain*. Mol Cell, 2011. **43**(5): p. 713-22.
208. Baker, C.L., Kettenbach, A.N., Loros, J.J., Gerber, S.A., and Dunlap, J.C., *Quantitative proteomics reveals a dynamic interactome and phase-specific phosphorylation in the Neurospora circadian clock*. Mol Cell, 2009. **34**(3): p. 354-63.
209. Woolcott, J.C., Richardson, K.J., Wiens, M.O., Patel, B., Marin, J., Khan, K.M., and Marra, C.A., *Meta-analysis of the impact of 9 medication classes on falls in elderly persons*. Arch Intern Med, 2009. **169**(21): p. 1952-60.
210. Obayashi, K., Araki, T., Nakamura, K., Kurabayashi, M., Nojima, Y., Hara, K., Nakamura, T., and Yamamoto, K., *Risk of falling and hypnotic drugs: retrospective study of inpatients*. Drugs R D, 2013. **13**(2): p. 159-64.
211. Kolla, B.P., Lovely, J.K., Mansukhani, M.P., and Morgenthaler, T.I., *Zolpidem is independently associated with increased risk of inpatient falls*. J Hosp Med, 2013. **8**(1): p. 1-6.
212. Wang, P.S., Bohn, R.L., Glynn, R.J., Mogun, H., and Avorn, J., *Zolpidem use and hip fractures in older people*. J Am Geriatr Soc, 2001. **49**(12): p. 1685-90.
213. Berry, S.D., Lee, Y., Cai, S., and Dore, D.D., *Nonbenzodiazepine sleep medication use and hip fractures in nursing home residents*. JAMA Intern Med, 2013. **173**(9): p. 754-61.
214. Uchimura, N., Ogawa, A., Hamamura, M., Hashimoto, T., Nagata, H., and Uchiyama, M., *Efficacy and safety of ramelteon in Japanese adults with chronic*

- insomnia: a randomized, double-blind, placebo-controlled study.* Expert Rev Neurother, 2011. **11**(2): p. 215-24.
215. Uchiyama, M., Hamamura, M., Kuwano, T., Nagata, H., Hashimoto, T., Ogawa, A., and Uchimura, N., *Long-term safety and efficacy of ramelteon in Japanese patients with chronic insomnia.* Sleep Med, 2011. **12**(2): p. 127-33.
216. Uchiyama, M., Hamamura, M., Kuwano, T., Nishiyama, H., Nagata, H., and Uchimura, N., *Evaluation of subjective efficacy and safety of ramelteon in Japanese subjects with chronic insomnia.* Sleep Med, 2011. **12**(2): p. 119-26.

【表】

表 1: ES 分化誘導のパラメーター

パラメーター	評価した結果のまとめ
細胞数	<p>分化の均質性はまき込む細胞数である程度コントロール可能である。初期: 薄いほど線維性の細胞が増えて明瞭な振動が得られやすくなる。ただし、薄くまきすぎると死滅してしまったり、増殖しなくなったりするため、継代するタイミングに合わせて至適な細胞数をまく必要がある。..凡その目安としては、$2.0-2.5 \times 10^5/10 \text{ cm dish RA } 1 \mu\text{M}$ (Per2::Luc) $3.0-4.5 \times 10^5/10 \text{ cm dish RA } 1 \mu\text{M}$ (DKO), $4.5-6.0 \times 10^5/10 \text{ cm dish RA } 1 \mu\text{M}$ (Per2 KO)</p> <p>後期: 分化した細胞の場合、できるだけ多くまき込んで Confluent にした方が、生存が良く、振動が明瞭に出る。ただし、未分化な細胞が残っている場合は残存してしまうため、ある程度数をおさえた方が良い。また、One passage protocol の場合、濃くまき込み過ぎると、細胞が集まった部分から Apoptosis が始まる。多少であれば問題ないが、殆どの細胞が死滅してしまうこともありうるので、最適な細胞数を探る必要がある。Day 5, Day 10 の2回継代を行えば相当に明瞭な振動は得られるが、用意すべき細胞数もかなり多くなってしまう。Per2::Luc ES の場合、Day 10 での最適な細胞数は $6-9 \times 10^5$ 程度である。</p> <p>. Day 5 の One passage protocol の場合、$6 \times 10^5/35 \text{ mm dish}$ ($4-9 \times 10^5/35 \text{ mm dish/Per2::Luc}$)程度であり、DKO では $5 (4-8) \times 10^5/35 \text{ mm dish}$ 程度が最適である。Per2 KO でも $5 (4-8) \times 10^5/35 \text{ mm dish}$ 程度が最適である。</p> <p>測定中は後半徐々にノイズが増えてくる。これは細胞由来のものもかなり多いと推察され、濃くまき込んで生存をよくした方が、影響を受けにくい。</p> <p>これは分化誘導に限った話ではないが、濃くまき込むほど増殖も速くなるのは、この実験系でもそうであり、継代が Day 0 か Day 2 か Day 5 かにもよらない。</p>
継代回数	<p>継代をしない場合塊の細胞が残りやすく、多様な細胞が残りやすい。一方、継代を加えた場合、活きが悪くなりやすい。相対振幅は継代をするほど増加するが、発光の絶対量が減っていく。</p> <p>Day 2 で継代をした場合、Day 6 でほぼ完全に Growth が止まり、減少傾向になる。継代を加えた場合、24 well plate での測定は厳しくなり、コ</p>

	<p>ンドートロンでの測定は厳しくなる。</p> <p>⇒準備する細胞数，生存具合，性格の違う細胞でも Day 5 の継代の際の細胞数を制御しやすい点などから，1 回とした。</p>
継代する日	<p>継代が早すぎると死ぬ細胞が多くなる。(One passage protocol では Day 2-Day 7 まで検討, Two passage protocol では Day 10 まで検討した) 早く (Day 3) 継代する場合，相当に濃く ($9 \times 10^5/\text{dish}$) でまかないと十分な生存細胞数が得られないのに対し，Day 5 で継代するのであれば，$3\text{--}6 \times 10^5$ 程度で明瞭な振動が見られる (Per2::Luc ES の場合)。ただし，逆に遅すぎても増殖が止まっていて Confluent にし辛くなる。恐らく Day 4-6 程度が至適である。細胞数の用意の面や，生存に関する安定性の観点より，One passage Day 5 とした。</p>
レチノイン酸濃度	<p>継代をしない場合特に重要となるが，細胞数が増えるほどレチノイン酸濃度を高くしたほうが明瞭な分化誘導が見られる。ただし，細胞数が $0.25 \times 10^5/\text{dish}$ を下回ったりするとレチノイン酸が低濃度でも死滅してしまう。$0.33 \mu\text{M}$ でも十分細胞の形態は変わるが，$1\text{--}10 \mu\text{M}$ 程度が至適濃度である (細胞数 $0.5\text{--}1.5 \times 10^5/35 \text{ mm dish}$, Per2::Luc ES の場合)。また，濃度が高くなればなるほど，突起の多い細胞が増えてくる。低濃度のレチノイン酸はレチノイン酸が無い場合と比べて増殖が増えるものの，基本的には濃度が高くなればなるほど分化が早まり，増殖は抑えられる。基本的には，一度でも継代をする場合，$1 \mu\text{M}$ で十分である。溶媒はエタノールでも DMSO でも変わらず振動するが，DMSO の方が溶解性は良い。ただし，レチノイン酸は光分解，酸化により溶媒に溶かして調整後密封遮光・80°C で保存していても劣化が激しいので，保存方法には注意する必要がある。操作時の遮光は，クリーンベンチの電気を消しておけばおおむね問題ないようである (ある条件下で比較すると，ベンチ内の電気をつけた場合と部屋の照明のみにすると照度 (Lux) は 1/10 に減少した)。調整後半年経った RA と調整直後の RA を比較した実験では，振動に大きな差は見られなかったが，至適な細胞数は異なっていた。実効濃度が変わっていることが推察される。また，途中で RA 無の培地に変えることも可能であるが，RA は入れ続けた方が明瞭な振動が得られる。</p>
測定開始日	<p>Day 15 より Day 20 の方が，振幅が大きい，更に Day 20 前後よりも Day 28 の方が大きい。ただし，継代を 2 回する場合，Day 15 よりも Day 20 の方が，生存が悪く，振動も悪くなりやすく，一概には言えない。Per2::Luc ES の One passage protocol では Day 15 より Day 20, Day 20 よりも Day 27 の方が良いが，レスキュー ES ではむしろ Day 20 前後が</p>

	<p>ベストのようである。総じて、濃い時ほど長く待った方が良いと考えられる。</p>
分化誘導に使用する培地	<p>3種類の分化誘導培地を試した。</p> <p>1) DMEM/20%FBS/NEAA/L-Glu/β-ME/抗生剤, 2) DMEM/10%FBS/抗生剤 3) GMEM/10%KSR/1%FBS である。原則としては、分化誘導に使用する培地の中では1)の振動が明瞭で生存も良かった。</p>
測定時に使用する培地	<p>1) DMEM (without phenol red) /20%FBS/ NEAA/L-Glu/ β-ME/HEPES 10 mM), 2) DMEM (without Pyruvate , without phenol red, with HEPES25 mM) /10%FBS/ 抗生剤 3) GMEM/10%KSR/1%FBS である。鶴飼先生がNIH3T3で行った経験上[7], 2)の培地にできるだけ早く置換しておくことがもっともベースラインが安定すると伺ったため、試したところ、実際これが最も明瞭な振動が得られた。また、置換した培地は新しい培地をCO₂ インキュベーター内で温めるともっとも振動がいい。2)の培地に置換するタイミングは厳密な検討はしていないが、継代後早すぎると増殖しきっておらず、遅すぎても増殖を止められないので、3日後のDay 8を採用している。</p>
Dish の Coating	<p>基本的に”未分化な細胞をdishに残しておくための”ものである。</p> <p>Fibronectin, Collagen と比較して、Gelatin は大きな差は無かった。0.1% gelatin よりも0.2% gelatinの方が初期の剥がれる現象はコントロールしやすい、また24 well plateの場合も同様である。Day 5でのコートに関しては、No coatだと分化した細胞の割合は増えるが、生存性、発光量が下がるため、必ずしも明瞭な振動が得られるとは限らなかった。Day 10だとほぼ完全に分化して接着性の高い細胞が多いのでcoatする必要はない。</p>
培地交換の頻度	<p>細胞数が多い場合、2日に1回変えた方が5周期目は観察されやすかった。</p>
血清のロット	<p>JRH 12603C-500ML, Lot: 4C0702, 6K0357</p> <p>Sigma: 172012-500ML, Lot: S.11D255(オーストラリア)S.12D142(パナマ) S.12D165(コスタリカ) S.12E109 (ホンジュラス), S.12H183(グアテマラ), S.12E183-A(アメリカ)</p> <p>HyClone: SH30910</p> <p>Biowest: S1820 S05239S1820 Exp 01/2010</p> <p>の計10種類の血清を評価した。どれでも振動は見られるものの、ESの初期増殖性、振動の持続性などには差がある。6K0357が最も振動が明瞭に出て、増殖もそこそこ稼げる優れた培地であった。ただし、現在</p>

	<p>は枯渇しており, S12H183を使用している. 振動はJRHを除く血清の中では最も明瞭だが, 増殖に難がある.</p> <p>4C0702, 6K0357, S12H183 のいずれも ES の維持に使用できる.</p> <p>短期の ES の維持に関しては 6K0357 と S.12H183 に差はなく, これらから得られる分化細胞の振動も差は認められなかった.</p> <p>血清によって Day 0 の至適細胞数は大幅に, Day 5 でまき込む至適細胞数は多少 (Per2::Luc ES で $4 \cdot 6 \cdot 10^5/35$ mm dish の範囲) 異なる. Per2::Luc ES を Day 0 で $3 \cdot 10^5/10$ cm dish でまいた場合, Day 5 での細胞数は血清により, 増殖の遅いものでは $1 \cdot 10^6$ であったのに対し, 速いものでは $3.7 \cdot 10^6$ であった. 判定される周期長は, (恐らく最終的な細胞数やベースラインの違いで) 1 時間程度の違いは出てきてしまうので, 同じ血清で比較する必要がある.</p>
分化させる ES 細胞の維持条件	<p>GMEM/10%KSR/1%FBS (フィーダー細胞無, gelatin coated dish) で馴化させた ES 細胞を使用した. 継代の条件は, Cell Strainer を用いても用いなくても(遠心の前に使用しても後に使用しても), Trypsin 処理でも TrypLE Express (Gibco)の処理でも, 0.25% Trypsin/EDTA でも 0.05%Trypsin/EDTA でも振動することが確認されている. 継代でまき込む細胞数は, $1 \cdot 10^5/60$ mm dish, $2 \cdot 10^5/60$ mm dish, $3 \cdot 10^5/60$ mm dish のいずれにおいて 10 継代維持しても, 振動性に差がなかった. また, 30 継代位続けると, 増殖は速くなり, 振動しにくくなっていった.</p>
Day 5 の継代での Cell Strainer の使用	<p>総じて大差はないが, $100 \mu\text{m}$ と $35 \mu\text{m}$ の双方を使用したときの結果が安定しているように見えた. 更に, Cell Strainer を使用すると, 細胞の塊が減り, 血球計算板での細胞数のカウントが容易であることから, この条件を採用した. Day 10 位になると, 逆に分化して大きい細胞も増えてくるため, $35 \mu\text{m}$ Cell Strainer を通してしまうと, 逆効果になる. $35 \mu\text{m}$ Cell Strainer は 5 ml しか通せないため, Trypsin 処理後の反応停止には FBS 3 ml の実験系を採用した.</p>
Day 0 でまき込む 10 cm dish のメーカー	<p>Falcon (35-3003: 表面積 58.95 cm^2)でも Iwaki (3020-100: 表面積 55 cm^2)でも, 振動の明瞭さに差は無かった. ただし, 面積が微妙に違うため, Iwaki の方が相対的な局所細胞濃度は高くなるため, 増殖は良い(5 日間の増殖率でおよそ 1.3 倍程度). したがって至適細胞数も若干少ないと思われる.</p>
同調刺激剤	<p>Dexamethazone, TPA (12-O-Tetradecanoylphorbol 13-acetate)と比較して Forskolin が良い. Forskolin $10 \mu\text{M}$ と $30 \mu\text{M}$ では $30 \mu\text{M}$ の方が relative amplitude は高いが, $10 \mu\text{M}$ の方が安定するよう見える. Forskolin は調整後 -20°C で保存し, 2-3 年経っても問題ない. メーカー</p>

	による差もあまりない.
Luciferin 濃度	プロトコールと測定器によるが, 原則 100 μ M で十分. Promega のものよりも Biosynth 社(L-8220)の方が明るい. 300 μ M, 500 μ M と増加させることで数倍までなら明るくすることが可能.
測定温度	33°Cも試したが, 大幅に振動が悪くなったため, 30°Cが適切であると思われる. また温度ができるだけ安定したインキュベーターを使用すべきである. 温度変化の影響は如実に現れる. 特にレスキューES の場合, 2°Cの上下には耐えられない.
トランスフェクションによるレポーターの追加	途中で P(Per2s)-Luc などのレポーターをトランスフェクションすることで, 発光量を稼ぐことは可能. 分化誘導開始前後に XfectStem で数十%(30%以上)の細胞に導入することや, Day 2 周辺に FuGene6 で導入することは可能だが, トランスフェクションしても, (恐らく増殖による希釈により) 殆ど残らない. Day 20 周辺では 35 mm dish 内の 10 か所程度にコロニー状に GFP 残存細胞が存在するため, Random integration されたものしか発現が残っていないものと思われる. 一方, Day 5 に継代し, Day 6 に FuGene6 を用いてトランスフェクションすると相当量 (10% 以上) の導入効率と Day 20 以降の残存 (pMU2-P(CAG)-EGFP プラスミドで測ると数%の残存効率) が狙える. FuGene6 とプラスミドの比は 3:1 が最もよく入りやすい. 生存との兼ね合いから, 導入できる DNA 量は 1 μ g/ 1×10^5 個 程度が上限である. ただし, 本実験系は細胞由来のノイズが測定開始後徐々に増えていくが, それが大幅に増えてしまうのが難点である. 細胞が多すぎると濃い部分が剥がれ落ちる現象が起こり, 基線に Spike が入る. また, 薄すぎて生存が悪い時にも, 恐らく Luc のプラスミドの沢山入った細胞が纏まって細胞が死ぬときに基線に Spike が入ってしまう. 総じてトランスフェクションとの相性がそれほどいい系ではなく, 今後の検討が必要である.

【図の説明】

図 1：概日時計 3 つの特徴

A: 概日時計は地球の自転に合わせて進化してきたものであり 1. 自律振動性, 同調性, 温度補償性の 3 つの特徴を持っている. 地球の歴史に関しては下記を参照されたい.

http://www7b.biglobe.ne.jp/~h_northwest/135_EarthHistory.html

B: リズム現象における周期, 振幅の概念. 振れ幅のことを振幅, 周期性事象がある点から同じ点まで戻る間隔を周期, 各時刻での周期性に対する時刻のことを位相という.

図 2: 概日時計の分子メカニズムと細胞レベルにおいての検出

A: 古典的な概日時計の転写翻訳フィードバックのモデル図. B: 概日時計の全身制御機構の模式図. C, D: pGL4-P(Per2s)-Luc2CP プラスミドを NIH3T3 線維芽細胞にトランスフェクションし, Luciferin 100 μ M 入りの培地で培養し, PMT (光電子増倍管: photomultiplier tube)を用いて計測したところ, 明瞭なリズムが観察される. cpm: count per minute.

図 3: 哺乳類体内時計の時間軸変化

A: 細胞レベルでは, ES, iPS 細胞は概日時計を持っていないが, 分化すると明瞭なリズムを刻むようになる. 老化細胞では振幅が減少することが予想されるが, このモデル化は今後の検討課題である. (写真は各々位相差顕微鏡 40 倍 (IX-51, Olympus), 約 100 倍 (BZ-9000, キーエンス) による写真であり, Per2::Luc ES 細胞の各段階における代表的なものを示している. 分化細胞は同じプロトコールだが, 同じ dish ではない). B: 個体レベルでは, 受精卵の時点では概日時計を持っていない. 概日時計は妊娠後期に急速に形成される. 生涯にわたり時を刻むが, 加齢により徐々に衰える.

図 4: 時計遺伝子変異と老化関連疾患

様々な時計遺伝子の変異マウスでは, 様々な老化関連疾患の表現型を示す. 一般的に寿命の短縮や, 腫瘍発生の増加など, 老化関連の表現型がみられる. 特に Bmal1(-/-)は老化関連疾患やメタボリックシンドロームのモデルとして注目を集めており, Cry1(-/-)Cry2(-/-)は特発性アルドステロン症のモデルマウスとして注目を集めている. 本研究で着目する Per は腫瘍発生や骨量との関係が言われている.

図 5: Per1 と Per2 の相同性とセリン残基

Per1 蛋白と Per2 蛋白のアミノ酸配列を比較している. Per1 と Per2 は極めて類似性の高い蛋白である. またどちらもセリン残基が極めて多い. セリン残基

は赤. 家族性睡眠相前進症候群 (Familial advanced sleep-phase syndrome: FASPS サイト) は矢印でしめしてある. 尚, 使用した配列は NCBI Reference Sequence, Per1: NP_001152839.1, Per2: NP_035196.2 である. 相同比較には, Crustal W2 (EMBL-EBI) を使用した. Identity: 601/1411 (42.6%), Similarity: 760/1411 (53.9%) との結果であった. a. a.: amino acids, bps: base pairs.

図 6: 光応答遺伝子の 2 群

A: 先行文献で報告されている視交叉上核における mRNA 発現の光応答プロファイルを確認した複数の実験のまとめ. いずれの報告も夜間に光をマウスに照射し, その後の経時的な mRNA 発現量の応答を In situ hybridization 法か Microarray analysis において確認している. これらの光に反応する遺伝子群は大きく, Early type genes と Late type genes の 2 通りに分けられる. 前者は光刺激後 1 時間以内に誘導され, その後の光照射の有無にかかわらず減少する遺伝子群である. 後者は緩徐に誘導され, 長期間光が当たり続けると遺伝子発現上昇が持続する遺伝子群である. B: Hatori et al., 2014[109]において公開されていたマイクロアレイデータの抜粋. CT16 もしくは CT22 に照射した際の経時的变化をプロットしている. CT16 と CT22 は各々光によって位相が後退する時刻と前進する時刻にあたる. CT: Circadian time 日の出を 0 時とする時計を概日時計の時刻に合わせて表記した際の表記法, したがって, 大まかには, CT16: 午後 10 時 (日の入後), CT22: 午前 4 時 (日の出前) ということになる. h: hours.

図 7: 光応答遺伝子の誘導パターンは Forskolin 刺激を行った細胞レベルにおいても再現される.

図 6 で示したパターンは NIH3T3 線維芽細胞に光刺激と同じ経路を刺激する Forskolin を使用しても再現される. SCN での光応答に重要な cAMP (cyclic AMP) 経路を刺激可能な Forskolin 添加を行い, mRNA の発現量の経時的な測定を行った. SCN での光応答に重要な経路は Gs からアデニルシクラーゼ, cAMP の経路であると知られており, アデニルシクラーゼの刺激で細胞レベルでの光刺激のパターンが再現できると考えられる. 実際, RNA を回収し定量的 PCR (qPCR) を行ったところ, Per1, NR4A1, c-Fos は刺激後すぐ上昇し, すぐに減少するパターンが見られ, Per2 では (1 時間後にも小さなピークはあるが) 総じて緩徐に上昇していた. このように光応答遺伝子の誘導パターンは神経細胞以外の細胞レベルにおいても再現された. 尚, EtOH 添加時の発現変化が問題となっていたが, 条件検討により Fos の発現上昇を 2 倍程度まで抑えた実験系を構築した上で評価を行っている. エラーバーは標準偏差 (SD) を用いている, 定量値はゲノムをスタンダードとして絶対定量を行い, TBP で標準化した値を示している.

図 8: 個体レベルの実験の実験の模式図と交配結果.

A: Per1 と Per2 は特に長時間の光に応答性が異なるため、申請者は Per1, Per2 の各々のノックアウトマウスが長時間の光や、(位相応答を起こさないような) 緩徐に変化する光条件下での応答性を確かめる実験を行った。使用するマウスは Per1/2 ダブルノックアウトマウスと野生型(WT)のマウスをかけ合わせ、F1 同士を更にかけて合わせることで行い、極力遺伝的背景が揃うようにした。B: 表は 211 匹の F2 の性別と Per1, Per2 の遺伝子型である。赤字と桃色の部分の雄マウスを実験に用いた。M: Male, F: Female

図 9: 予備実験, Per2 brd Allele のドミナントネガティブ効果

A: Per2 の PAS ドメインを欠落させる mutant マウスでの恒常明(LL : Light-Light)条件の実験の結果をしめす。アクトグラムは代表的な 1 匹のものを載せてある。B: 自己回帰分析による周期長の評価。Per2(+/-)マウスでは恒常明(LL)条件での周期延長は見られている。しかし、Per2(WT/mut)では恒常明(LL)条件での周期延長が認められず、更に Per2(WT/mut)と Per2(mut/mut)の恒常明(LL)条件での周期長に差が無かった。BarはSDを示す。アクトグラムは左から順に、#54 ♀ Per2 (WT/WT) Tyr (WT/WT), #81 ♀ Per2 (WT/mut) Tyr (WT/mut), #66 ♂ Per2 (mut/mut) Tyr (mut/mut)のものを代表的なものとして示してある。明暗条件: LD (Light-Dark), 恒常明条件: LL (Light-Light), 恒常暗条件: DD (Dark-Dark)。

図 10: 実験 1-1 の模式図とアクトグラム。

A: 恒常明条件下において、Per1, Per2 の、ヘテロ、ホモノックアウトマウスはどのような行動表現型を示すかを確かめるために行った、恒常明(LL)条件 2 週間の実験に使用したマウスの遺伝子型である。Per1(-/-)Per2(-/-)X WT の F1 同士をかけ合わせた F2 の 97 匹の雄をジェノタイプングし、その結果用意したマウスである。Per1(+/-)Per2(+/-)と Per1(+/-)Per2(-/-)は各々6匹に満たなかったため、別途用意した。ただし、表現型が同じで合ったため、最終的にはまとめて解析している。全てのマウスは 8-16 週齢の間である。B: 実験の模式図。ZT: Zeitgeber time (ツァイトゲバー時間)。ツァイトゲバー時間とは、明周期の開始時刻を ZT0, 暗周期の開始時刻を ZT12 とする明期 12/暗期 12 時間の明暗周期における環境周期の時刻。明暗条件: LD, 恒常明条件: LL, 恒常暗条件: DD。C: 各遺伝子型のアクトグラムを示す。

図 11: 実験 1-1 の周期長解析結果

ClockLab (Actimetrics)のカイ 2 乗ピリオドグラムを用いて計算した周期長を示す。エラーバーは標準偏差 (SD) を用いている。恒常明(LL)条件下での周期長は Per1 と Per2 の量比に依存することが示された。尚、恒常明(LL)条件から明暗(LD)条件に入る際にみられる行動量の増加はケージ交換によるものである。

図 12: 実験 1-2 に用いたマウスの遺伝子型, 模式図とアクトグラム.

A: 多くの動物は恒常明(LL)条件下で長期飼育すると無周期化することが知られているが, Per のノックアウトマウスではどうかを確かめるために恒常明(LL)条件 4 週間の実験を行った際に使用したマウスの遺伝子型. B: 実験の模式図. 恒常明(LL)条件 4 週間と恒常暗(DD)条件 4 週間のクロスオーバー(a, b)で行っている. 理由は, 特に Per1(-/-) マウスにおいて LD 2 週間を跨いだとしても, 恒常明(LL)条件による Aftereffect (履歴効果) がありうるのではないかと懸念されたためである. Per1(-/-)においては恒常暗(DD)条件で長期に飼っている場合, 徐々に周期長が伸びてくることがや, LL で飼った後はわずかに周期長が長めに見えることなどが観察されていた. 結果的には, 大きな影響はなかったようである. また ZT 0 を 14 時にセットした理由は LD 条件の明条件の時刻での計画停電の回避のためである. 結果的に測定期間中に停電は起きておらず, アクトグラムの抜けは存在しない. C: 実験のアクトグラム. WT は恒常明(LL)条件で 2 週間を過ぎたあたりから周期性が消失し始めているのに対し, Per1(-/-), Per2(-/-) マウスではいずれも周期性が残存している.

図 13: 実験 1-2 の周期性の指標.

グラフはカイ二乗ピリオドグラムの周期長前後の 1 時間の Power の値を有意線の値で引いた値を周期性の指標として定義し, プロットしている. エラーバーは標準偏差を示している. 尚, 測定終了前にみられる行動量の増加はケージ交換によるものである. 調整 3 日はケージ交換直後に設けており, LD での行動量測定もケージ交換のノイズによらず測定可能にしてある. 明暗条件: LD, 恒常明条件: LL, 恒常暗条件: DD. Per1 と Per2 の片方が無いと, 恒常明(LL)条件下においても周期性が残存しやすいことが示された.

図 14: 12 灯用 LED 光照度制御装置の開発の写真. 行動解析ラックの概観, 外扉を開けたラック内部と本体, 赤外線センサーの横に設置された LED, 遮光カーテン, 餌箱, (光を直接マウスに当てるために餌をフタの上に置かないよう使用した) 餌箱の写真, 本体拡大図, インターフェイス, 遮光のための留め金, ブロックダイアグラムを載せてある. コードが入る分遮光扉が開きがちになるため, 遮光の工夫を様々に凝らした. 遮光カーテンを用い, 留め金で扉を押し込んで閉めるようにした. 更に, 銀のテープや洗濯ばさみで遮光を補強した. 本体の手前にはダイヤルが 2 個ついている. 左が下段 6 個の LED に, 右が上段 6 個の LED に対応する. ダイアルは 4 段階になっており, 右に回すと, 10 倍ずつ回路の抵抗を上げることで, 照度を 1/10, 1/100 に落とすことができる. 4 段階目にすると, 無光となる.

図 15: 12 灯用 LED 光照度制御装置の予備実験

A: 抵抗値を変化させるダイヤルを通常の電流量の場合と, 通常の 1/100 の電流

量の場合の2点で、各々の256段階の目盛のうち、約10点ずつの照度を測定した。

B, C: WTのマウスを6匹ずつ各ダイヤルにおける真中の照度(127)で飼ったときの周期長の測定。B: 周期長, C: アクトグラム。通常の点だと光が赤外線センサーに拾われてしまうため、1/10 (30 Lux 程度), 1/100 (3 Lux 程度), 無点灯の3種類で測定した。30 Lux 程度だと26時間まで周期延長してしまうため、照度1/100で256段階に変化させる方針とした。測定途中で無周期化したマウスに関しては30 Lux 前後では2匹, 3 Lux 前後では1匹いたが、これは除外している。

図16: 環境周期と行動周期。

A: 実験1-2の模式図。図14で決めた条件下で22時間周期から27時間周期まで変化させ、WT, Per1(-/-), Per2(-/-)のマウスを6匹ずつ計測し、行動周期長を計測した。B: 実際に装置に読み込んだ環境周期のファイルの波形。C: 環境周期と行動周期の2次元プロット。各々全行程を用いた解析と、同調がなかった後の最後1週間を用いた解析の双方を行っている。2週間の行程で振動判定されなかったマウスはいなかった。1週間行程ではWTの22時間と27時間周期で各1匹ずつ周期判定されない個体があったため、これは周期解析から除外している。それ以外は全てN=6の解析である。尚、無周期化していないマウスの環境周期と行動周期が異なる場合、光変化とは無関係に行動を続けていることを示す。

図17: Rosa 26 ノックインとES細胞分化を用いたPer2 ノックアウトレスキュー系の模式図

A: Per2 のノックアウト細胞にPer2を導入し、振動が回復する系が構築出来れば、様々なPer2の変異体の変異体がこの系を用いて評価できるようになる。ただしPer遺伝子は細胞内の絶対量が重要であり、一過性発現などとの相性が悪い。本研究ではRosa 26 ノックインとES細胞分化を組み合わせることで、Per2 ノックアウトレスキュー系の構築を目指した。写真はPer2 ノックアウトES細胞の未分化な写真(約100倍, 位相差, BZ-9000で撮影)と、P(Per2L)-Per2(FASPS)::Lucでレスキューしたクローン(#3)を20日間分化誘導した細胞(40倍, 位相差, Nikon Eclipse TS-100で撮影)。B, C: トランスフェクションによるPer2 ノックアウトレスキューの困難さ。Bは後述のES分化誘導系にてPer2 ノックアウトES細胞をDay 5で継代、Day 6でFuGene6でトランスフェクションすることでDay 20より測定した際の波形。代表的なもののみを示す。振動らしきものがみられるdishもあるが、一貫性はない。また不規則に出現するスパイクがみられ、振動の観察が困難である。CはBと同様のプロトコールでpMU2-P(CAG)-EGFPベクターをトランスフェクションした際のDay 10

の写真. 位相差写真と蛍光写真は対応しており, 個々の細胞によって大幅に GFP の発現量が異なることが分かる. この他にも様々な条件でトランスフェクションによるノックアウトレスキューを試みたが, 困難であり, 1 細胞に 1 コピーずつ正確に導入可能な Rosa 26 へのターゲティングを用いることとした.

図 18: レチノイン酸分化誘導による概日振動検出系の構築

A: ES 細胞は時計を持っていないが, 分化誘導させると概日時計が発生してくることに着目し, 幅広いパラメーターサーチを行うことで最適化し, 最大 10 山の振動を精密に(およそ 1 時間程度の幅で)検出できる系の構築に成功した. 左上は当初先行文献を追試した時の振動, 中央は半年後の, 右端は 1 年半後の実験結果. 左下は分化していない ES 細胞の波形. 具体的には, 相対的に振幅が大きく, 減衰が小さく, 判定される周期のばらつきが小さい振動が得られるように改良をしている. 測定は Per2::Luc KI/KI の ES 細胞を用いている. 測定は Luciferin 100 μ M の存在下で, PMT を用いて行った. 写真は Per2::Luc ES 細胞の未分化状態, 分化状態の代表的な位相差顕微鏡写真を示しており, 波形を示した細胞と分化誘導のプロトコールは同じものだが, dish は対応していない(左の 3 枚は IX-51 (Olympus) で撮影されたもので, 右端のものは BZ-9000 (キーエンス) で撮影されている. 右端のグラフと写真は図 3 の再掲載である. B: Per2::Luc KI/KI ES 細胞を最終的なプロトコールで分化誘導した際の, 各 dish の周期長のドットプロット. JRH Lot: 6K0357 の血清で測定した周期長(独立した 6 回の実験, 細胞数は $3-7.5 \times 10^5/35$ mm dish). プロットには R を用いている.

図 19: ES 細胞の評価プロトコール

詳細は方法の欄を参照頂きたい. 大まかには, GMEM/KSR/FBS で培養していた C57B6/J の ES 細胞を, 10 cm dish へ DMEM/20% FBS/RA 1 μ M の培地にまき込み, Day 5 に継代をする. この際に塊の細胞を除けるように, 100 μ m の Cell Strainer と 35 μ m の Cell Strainer を使用することがポイントである. また, Day 8 からは測定時に使用する DMEM(Phenol Red(-)/HEPES 25 mM)/10% FBS の培地に置換しておくこともベースラインを安定化させるために重要である. One passage protocol のメリットは細胞数のコントロールも容易である. Day 0 のまき込む細胞数は Per2::Luc ES 細胞の大まかな目安を書いたが, 至適な細胞数は, 細胞と, 継代数, 血清 Lot により若干異なる. たとえば 48 時間で 5 倍程度増殖する細胞は $6-9 \times 10^5$ 細胞/10 cm dish 程度が最適であり, 10 倍程度の細胞は, $2-3 \times 10^5$ 細胞/10 cm dish 程度が最適であると思われる. Day 5 でまき込む細胞数も大まかな目安であり, ES 細胞株, 継代数, 血清ロットにより至適細胞数は若干異なる. 凍結状態から起こした細胞は, 継代を 3-10 回程度行い, 飼いつづけてから実験に使用した. 1 コンストラクトあたり 2 ラインを評価した.

ES 細胞の維持条件は、継代 1 回/2 days, 2×10^5 細胞/60 mm dish である。細胞を起こして 30-45 日後に最初の評価が完了する。血清は JRH (Sigma) のロット指定のものを使用する。10 種類チェックしてあるが、血清により振動の優劣、増殖具合は異なる。10 cm dish は Falcon 製も Iwaki 製でも同様に使用可能であった。赤字は特に精力的に条件検討を行った項目。NEAA: Non-Essential Amino Acids. DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium. GMEM: Glasgow Minimum Essential Medium.

図 20: 初期の細胞密度と分化効率

A: Per2::Luc KI/KI ES 細胞を Day 2 で継代する際、濃くまき込んだ場合と薄くまき込んだ場合の比較である。濃くまき込んだ場合には、ロゼット様の塊の細胞が出現してくる。薄くまき込んだ場合はそのような細胞は出現してこない。
B: Per1/2 Double knock out ES 細胞を 6 well plate にまき込み、3 日後にアルカリフォスファターゼ染色を行った。RA 濃度 5 点と未分化培地の 6 条件を検討した。レチノイン酸が無いと、ロゼット様の細胞が出現してくる。レチノイン酸 $1 \mu\text{M}$ でも多少は残ってしまうが、ロゼット様の細胞は紫色に染まっており(赤丸)、未分化なことが分かる。ロゼット様の囲まれた形の細胞は後から接触抑制のない塊となり盛り上がってくるため、振動評価に悪影響を及ぼす。顕微鏡写真は 40 倍の位相差写真を載せてある。撮影には IX-51 (オリンパス) を用いた。

図 21: 増殖曲線と分化戦略

A: 分化誘導時の戦略をしめす。Early phase と Late phase では細胞の性格が異なり、Early phase は増殖が速く、Late phase は増殖が止まってくる。したがって、Early phase は薄くまき込み、増殖が止まったところで濃くまき込むと、明瞭な振動が見られる。B: Per1/2 ダブルノックアウト ES 細胞で 35 mm dish に 3 通り (0.5 , 1 , $1.5 \times 10^5/35 \text{ mm dish}$) の濃度でまき込み、 $1 \mu\text{M}$ の RA 存在下で飼った時の増殖曲線をプロットしている。カウントは Burkner-Turk 血球計算板を用い、申請者が顕微鏡下目視にて数えた。他の検討で、Day 0 から Day 1 は殆ど増殖しないことを検討してあるため、実際の Day 1-Day 2 の増殖はもっと急峻である。Day 7 の前後で急激に増殖速度が減少する。この時、大多数の細胞が分化して線維性の細胞に変化するため、このタイミングの前後で培養の仕方を変えることが重要である。他の C57B6/J ES 細胞ラインでも、基礎的な増殖スピードなどは異なるが、大まかな特徴は同じであった。しっかり分化させるためには、局所的にコンフルエントにならないようにまき込むことが重要である。尚、7 日目以降も増殖しているように見えるが、実際は局所的に塊となった細胞(はがれやすい)が増えているのみである。

図 22: 継代回数と概日振動

上のグラフは2つの継代数の異なる Per2::Luc ES 細胞の振動を比較したものである。P+の後の数は、フィーダー細胞を抜いてからの継代回数を意味する。24 well plate の No passage protocol を用いている。初日の細胞数が上に、継代回数が左横にプロットされており、横軸はhours, 縦軸はcpmを示す。最適な細胞数が異なるため、最も明瞭に振動した条件を赤枠で囲ってある。28回と40回では28回の方が明瞭な振動が観察されている。ES細胞のコロニーの形態の良さ(分化傾向がない: 正円形で辺縁明瞭)も28回と41回では相当異なっていた(右下写真)。これはもしかしたらES細胞の老化をみているのかもしれない。B: 継代ごとに2*10⁵/60 mm dish でまき込んだ時の Per2::Luc ES 細胞の増殖曲線。下図は増殖曲線を示す。継代を重ねるごとに徐々に48時間でのFold increaseが増えていくことが分かる。(最後の方で減っているのは、まき込む数を減らした影響がある)。

図 23: ROSA 26 ターゲッティング

A: pTVC12-RareCutSite-ROSA long 4k arm-Gateway[attB1/2] **P(Per2L)-Per2::Luc-FRT**[P(PGK)-puro-polyA]-ROSA Short arm には Rosa 26 と相同組換えできるアームがついており、TALEN で切断した Rosa 26 の領域と相同組換えを起こすことで、下段にあるようなノックイン Allele を作製することができる。B: 今回使用した WT と FASPS 変異体の配列の抜粋。波形は ApE (A plasmid Editor v2.0.46, M. Wayne Davis)を用いて示している。カーソル位置が FASPS サイトであり、1塩基置換を導入出来ていることが分かる。

図 24: ターゲッティング行程

申請者が行ったターゲッティングの模式図。Per2(-/-)のES細胞を初日にまき込み、ターゲッティングベクターとTALENベクターをリポフェクションする。Puromycinで24時間*2回選択を行い、出来たコロニーを12個程度顕微鏡下(クリーンベンチ内)でYellow tipを用いてピックアップする。Trypsinで解したのち、半分の細胞はProteinase Kで溶かしてScreening PCR (3' Arm)を行い、半分の細胞は24 well plateにまき込んでScale Upする。Screening PCRで正しい長さのTarget Alleleが確認されたもののみ、保存し、その際にゲノムを確保し、PCRで5' Target allele, 5' WT allele, 3' WT alleleの全てが確認され、Puromycin 遺伝子のqPCRにおいて1コピーが正しく挿入されたESクローンを2個選んでアッセイに使用する。もし2クローンの表現型が異なった場合は、3クローン目を評価して揃った方を採用する。電気泳動写真は、FASPSを導入したときのものである。左端のマーカは4 kbのところ濃いバンドとなっており、この長さが3' Target Armの正しい長さである。P (positive control), N (Negative control)。数字はES細胞クローンの番号を示す。PCRの結果77%のESクローンで組換えが起こっていることが分かり、TALENを用い

た組換え効率の高さがうかがえる。右下の棒グラフは Puromycin 遺伝子のコピー数を数えるための qPCR の図。これは Per1/2 ダブルノックアウト ES 細胞に Per2(WT)::Luc を導入した際のものである。#9 が 2 コピーであり、それ以外が 1 コピーということが分かる。

図 25: FASPS 変異体の周期短縮を細胞レベルで再現することに成功。

A: 実験の模式図。WT と FASPS の Per2 を Per2 プロモーター下に繋いだコンストラクトを導入した。ES 細胞を各々別々の 2 クローンに分分化誘導を行った。B: デトレンド波形。#の後ろの数字は、クローン番号。C: 各ラインと、まとめて解析した際の周期長。解析は Mathematica を用いた自己相関解析。P=0.01 をカットオフとして振動判定、周期長計算を行った。周期長のエラーバーは標準偏差を用いている。WT では 24 時間前後の周期長がみられ、振動が回復していたのに対し、FASPS 変異体では周期が短縮していた。

図 26: 翻訳領域が無い場合の模式図。

A: Per2(WT) と 翻訳領域 (Coding) が無い場合の振動を比較する実験の模式図。各々のコンストラクトを導入した Per2 (-/-) を 2 クローン用意し、分化誘導させて振動を比較した。B: デトレンド波形。独立した 2 回の実験をまとめて解析している。C: 振動判定率と周期長の解析。翻訳領域がないと振動が弱く、振動判定されない dish も多かった。また、振動判定された dish では周期長が短めの傾向がみられた。Per1 と Per2 の協調機構は細胞レベルでも重要なことが示された。

図 27: Per1 の翻訳領域を入れた場合の模式図と実験結果。

A: Per1 と Per2 の協調性に重要なのが翻訳領域かどうかを確かめるために、Per1 と Per2 の翻訳領域を入れ替える実験を行った際の模式図。従来、Per1 と Per2 の翻訳領域を入れ替えても振動への影響はないとされている(先行文献では周期判定がなされていない)。B: デトレンド波形。C: 周期長。予想に反し、Per1 の翻訳領域で周期短縮がみられた。

図 28: その他の Per2 の既知の変異体を入れた場合の模式図と実験結果。

A: 既知の 2 つの変異体の表現型も確かめた実験の模式図。Per2 ノックアウトレスキュー系で既知の変異体の表現型がみられるかどうかを確認するため、mut6 (FASPS 下流の 6 個のリン酸化されるアミノ酸の変異体) と TRCP (E3 リガーゼの TRCP が結合するアミノ酸の変異体) の 2 つの変異体を評価した。いずれも独立した 2 ラインを評価に用いた。B: mut6 のデトレンド波形。C: 周期長。mut6 は FASPS 同様の短周期が検出されたが、TRCP では 大きな周期変化は検出できなかった。

図 29: 今回評価した ES 細胞の周期長のまとめ。

今回レスキュー実験で使用した細胞の全ての dish (振動判定されたものに限る)

のN=約10で10回分の結果をプロットしたもの。これらの結果から、周期長が大きく3つに大別されることが分かる。WT, TRCPの24時間前後のグループ, FASPS, mut6の20時間前後のグループ, 翻訳領域無, Per1の22-23時間前後のグループである。

図30: 分解速度とPer1:Per2キメラ

A: 実験の模式図。Per1, Per2に各々Luc融合蛋白を発現するベクターをNIH3T3にトランスフェクションし、シクロヘキシミドを加えた際の分解曲線をPMTを用いて検出した。B: Per1:Per2キメラ蛋白の模式図, C: 半減期測定波形。1本の曲線は1枚のdishを表している。D: Rのプログラムを用いて計算した半減期, $n=2-4$ 。大腸菌2-4クローンよりとったプラスミドの平均を示している。PER1の方がPER2よりも半減期が長いため、睡眠相前進症候群変異体の周期短縮とは独立したメカニズムの存在が示唆される。E: Per2の変異体とPer1の評価, $n=2$, 大腸菌2クローンから取ったプラスミドの平均を示す。F: Per1:Per2キメラの評価。

図31: 分解速度と周期長の関係

縦軸は各コンストラクトのNIH3T3で測定した半減期を、横軸はES細胞で測定した周期長をプロットしたものである。赤線は、Per2(WT)とPer2(FASPS)を結ぶ線であり、半減期と周期長の相関が強ければ、この線上に乗るはずである。従来相関性が強いとされていた半減期と周期長の関係は必ずしもそうではなかった。特にPER1の外れ方が顕著である。尚、FASPS変異体の半減期が短いことは数回の実験で再現可能であった。

図32: Per2::Luc KI/KIマウスの恒常明(LL)条件での周期長

Per2::Luc KI/KIマウスを1) 恒常明(LL)条件4週, 2) 恒常暗(DD)条件4週, 3) 恒常明(LL)条件2週⇒恒常暗(DD)条件2週のいずれかで飼育し、終了後に視交叉上核(SCN)スライスを作製し、組織培養を行って概日振動を観察する実験を行った際の結果。恒常明(LL)条件ではSCNスライスの振動は不安定で振幅が小さかった。恒常明(LL)条件での周期延長はこのマウスでは見られなかった。

図33: Per1/2 ダブルノックアウトレスキューでのLuc融合の問題点: 個体レベル

Per1/2 ダブルノックアウト ES細胞に本研究で用いたものと同じベクターをターゲティングし、3iキメラの手法でF0表現型解析を行った結果。行動の測定は明暗(LD)条件2-3週間⇒恒常暗(DD)条件2週間⇒明暗(LD)2-3週間⇒恒常明(LL)条件4週間にて計測を行っている。各々2ラインのES細胞由来の11匹を計測した結果である。概日行動周期の有無はカイ二乗ピリオドグラムで判定した。

図34: Per1/2 ダブルノックアウトレスキューでのLuc融合の問題点: 細胞レベ

ル

図 33 と同じターゲティングで得られた ES 細胞の独立した 2 ラインを 20 日間継代無で分化誘導させた結果. 各曲線は 1 枚の dish の結果を, 右上の写真は分化誘導後の 40 倍の位相差写真を示す. Day 0 の細胞数は 3 点を検討している. # の後ろの番号はクローンの番号を, P+の後ろの番号は, フィーダー細胞無で培養を始めてからの継代回数を示す. Per2::Luc ES 細胞は増殖が速く, 本実験の細胞数はやや高密度すぎたため, 振幅は小さいものの, 振動はみられている. Rescued ES では形態的にはよく分化しているにもかかわらず, 振動が見られていない.

図 35: Sox9 は Per2 のみを Target とする:治療薬ターゲットとしての展望

A: NIH3T3 に対し Sox9 siRNA をトランスフェクションし, Forskolin 刺激をした際の各光応答遺伝子の変化を示す. Per2 のみの発現量が減少していることが分かる. エラーバーは標準偏差. B: NIH3T3 の内因性 SOX9 発現のウェスタンブロットでの確認. HEK293 と NIH3T3 細胞に Sox9 の発現ベクターをトランスフェクションした細胞としていない細胞を用いた. 各々 Sox9 と Tubulin の抗体でウェスタンブロットを行った. NIH3T3 ではトランスフェクションしなくとも SOX9 蛋白の高い発現があることが確認された.

図 36: Per1 と Per2 の協調の模式図

A: 蛋白蓄積速度が速く短周期親和性のある PER1 と蛋白蓄積速度が遅く長周期親和性である PER2 が協調することで, 24 時間周期の強固かつ頑健, 明瞭なリズムを作り出している. 非生理的条件下では 24 時間から外れた概日振動を防ぐ反面, 低柔軟性のため, 病的破綻(外環境への追従不能や無周期化)しうると考えられる. B: 先行文献と本研究から得られた内在周期長決定のイメージ図. Per1:Per2 (Per1 側に寄るほど周期が短く, Per2 側に寄るほど周期が長くなる)比と Per1+Per2 の総量(総量が多いほど周期が長くなる)が内在周期長を決定していると考ええると, およそ全ての先行文献と辻褄があう.

図 37: Per1 と Per2 の協調の分子メカニズムの仮説.

PER1 と PER2 がどのようにして協調しているかの分子メカニズムの仮説. PER1 は半減期が短く蓄積が速い. また PER2 は半減期が短く蓄積が遅い. 更に PER1 と PER2 の蛋白レベルのカップリング機構の存在も想像される.

図 38: 現在ターゲティング中の IRES2 ベクターと P(Per1)ベクターの構造.

pTVCI2-RareCutSite-ROSA long 4k arm-Gateway[attB1/2] P(Per1)
-Per2::Luc-FRT[P(PGK)-puro-polyA]-ROSA Short arm と
pTVCI2-RareCutSite-ROSA long 4k arm-Gateway[attB1/2] Antisense
<(P(Per2s)-Per2-IRES2-Luc2CP)-FRT[P(PGK)-puro-polyA]-ROSA Short arm の
構造を示す. どちらも現在ターゲティング中である.

図 39: 実験系の開発からまとめた本研究の概要. 申請者は Per1 と Per2 の協調性を解析するため, 1) 12 灯用 LED 光照度制御装置, 2) ES 分化誘導系 3) Per2 ノックアウトレスキュー系の 3 つの新規実験系の開発に成功し, Per1 と Per2 の協調性の重要性を個体レベルと細胞レベルで証明した.

概日時計の3つの特徴

A

1. 自律振動性

- 概日リズムは地球の自転に近い約24時間の内在性のリズムを持っている。

2. 同調性

- 概日リズムは昼夜サイクルに由来する外界からの入力 **(特に光)** によってリセットされる。

3. 温度補償性

- 概日リズムの周期は温度が変わってもほぼ一定に保たれる。

B

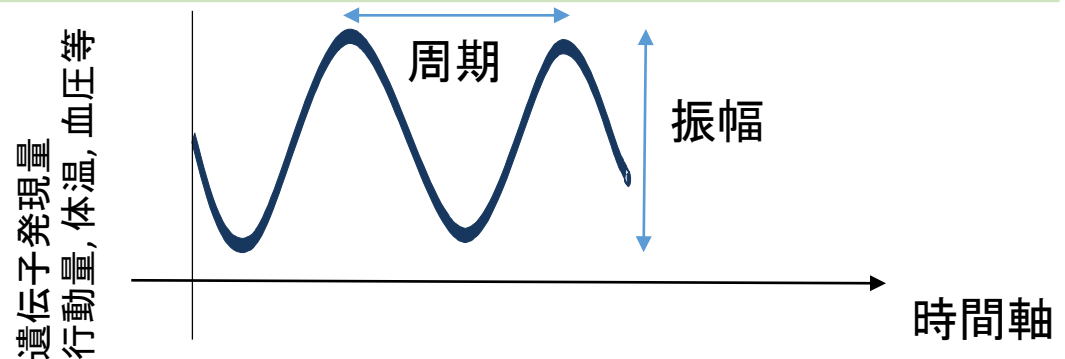
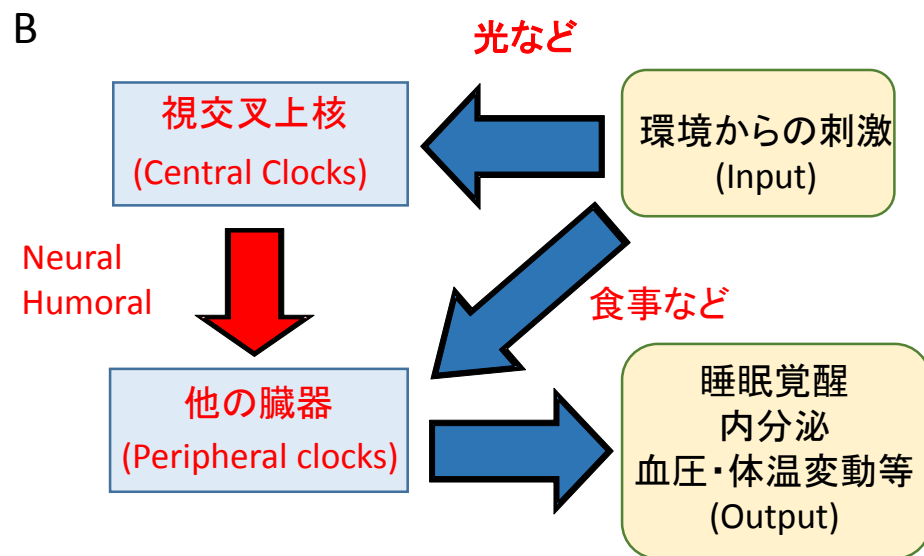
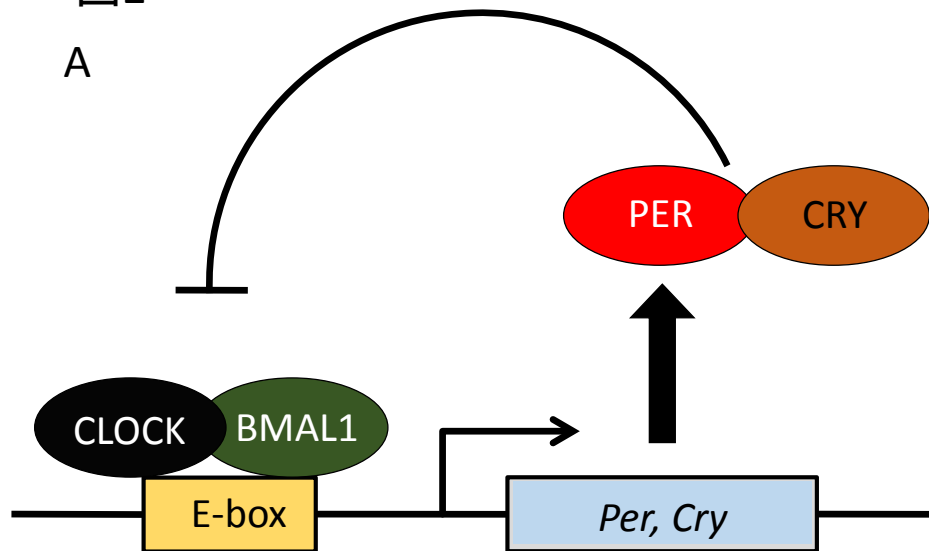


図2



C NIH3T3線維芽細胞に
pGL4-P(Per2s)-Luc2CPプラスミドを
一過性発現

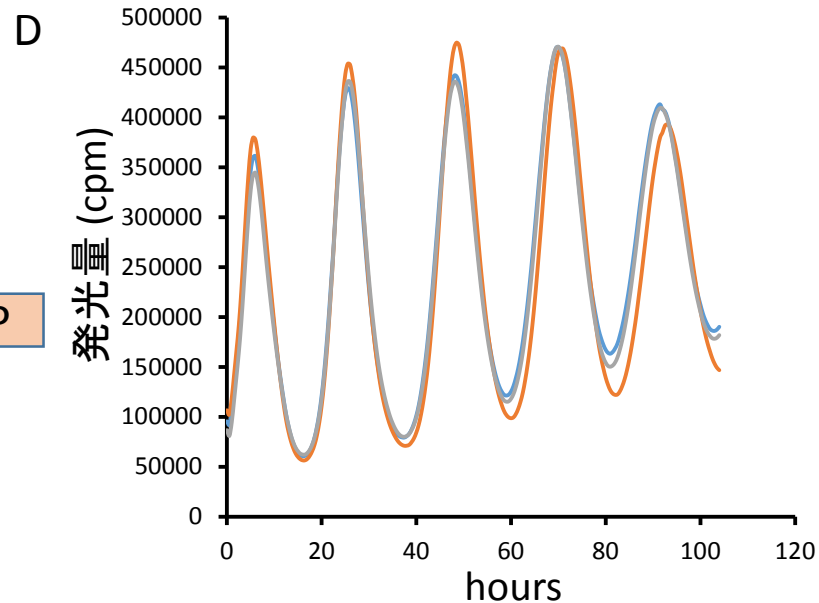
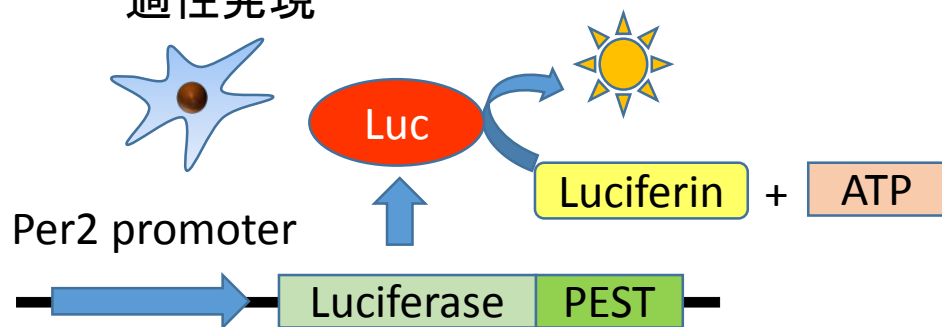


図3

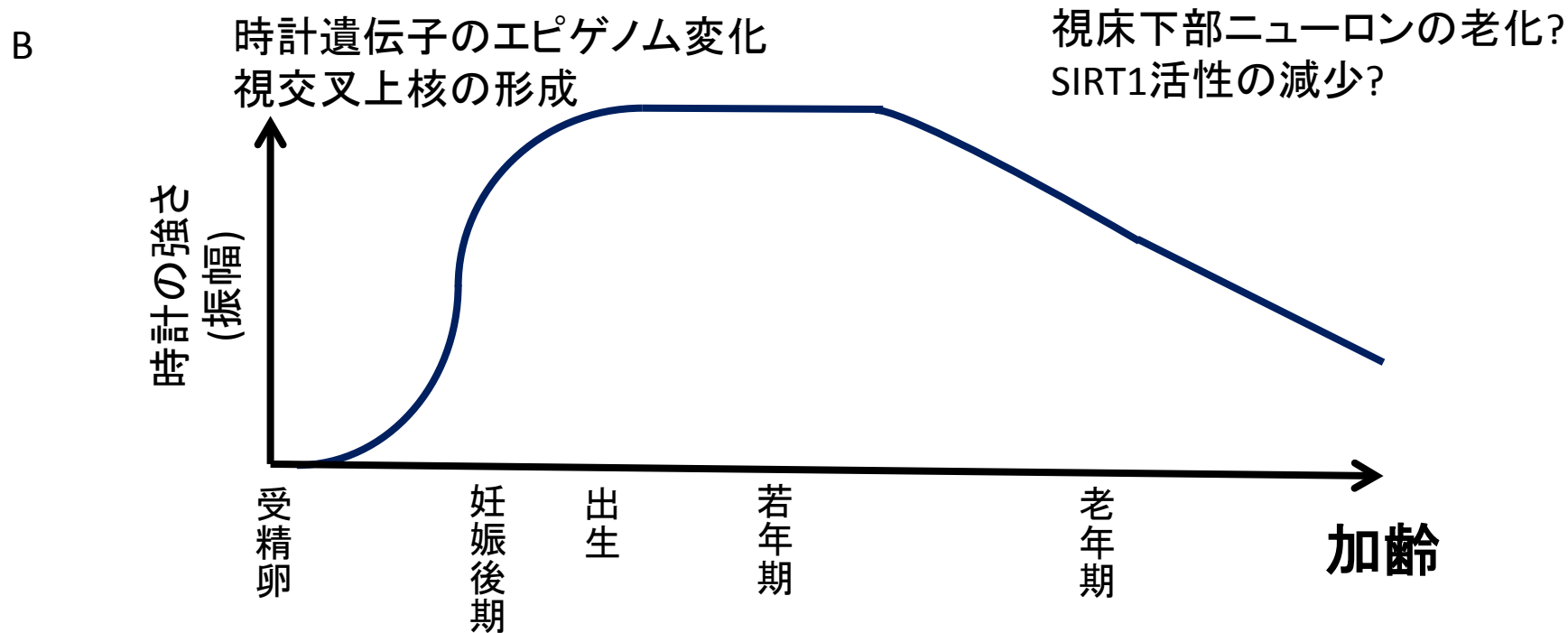
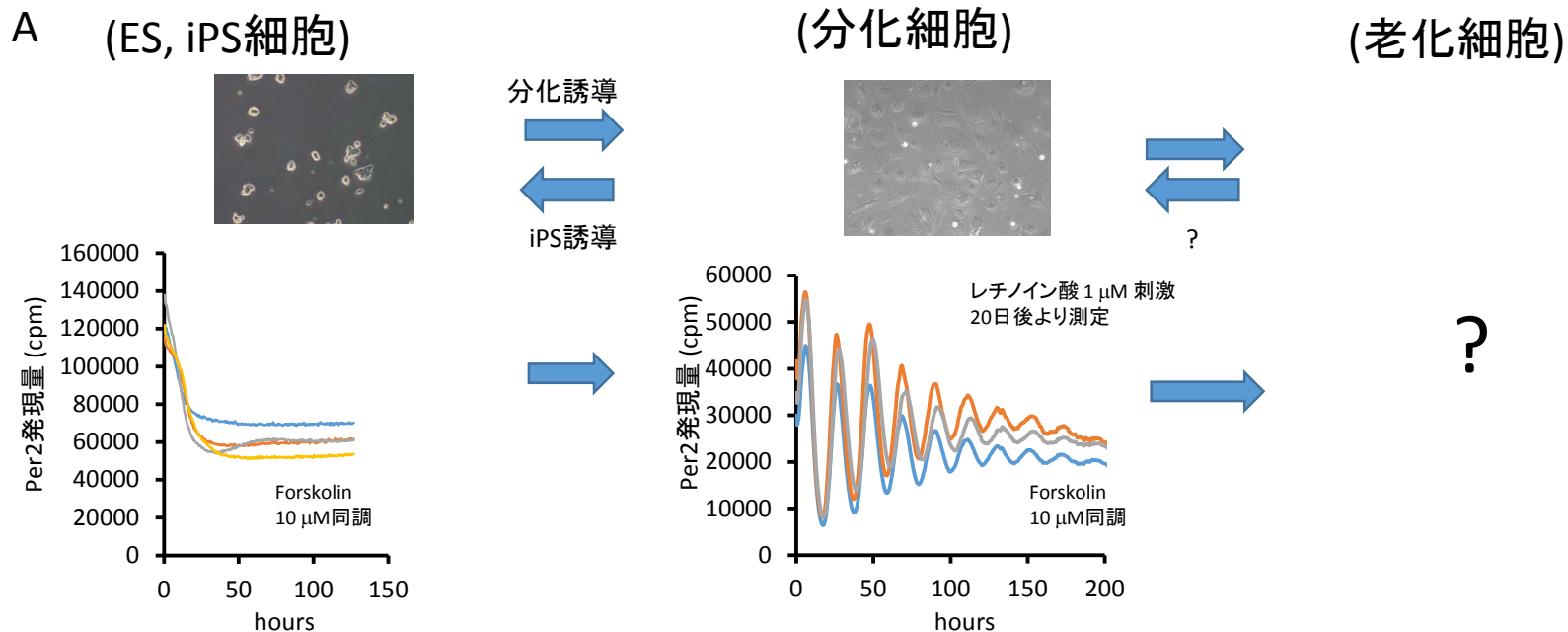


図4

	Clock(-/-) Npas2 (m/m)	Bmal1 (-/-)	Cry1(-/-), Cry2(-/-)	Per2(mut/mut)	Per1(-/-), Per2 (mut/mut)
概日リ時計	無周期	無周期	無周期	短周期	無周期
寿命	短縮	短縮	ND	短縮	ND
体重	減少	減少	減少	増加	減少
白内障	ND	増加	ND	ND	ND
皮膚炎	ND	正常	増加	正常	正常
異所性石灰化	ND	あり	なし	なし	なし
骨量	あり	ND	増加	正常	増加
生殖能	不妊	不妊	正常	雌のみ減少	雌のみ減少
腫瘍発生率	ND	ND	増加	増加	増加
その他		サルコペニア 皮下脂肪減少 活性酸素増加 糖尿病 インスリン分泌不全	特発性アルドステ ロン様食塩感受性 高血圧		

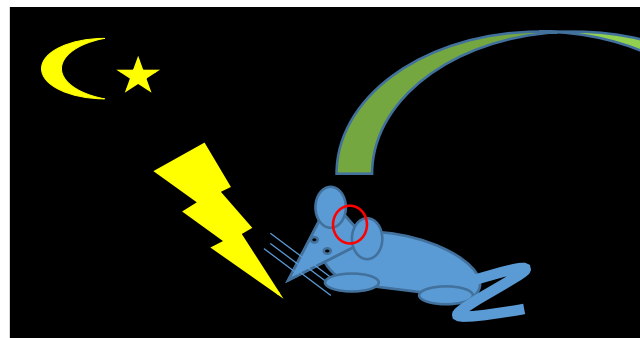
Per1	1	MSGPLEGADGGDPRPGEPCPGGVSPGAPQHRPCPGPS—LADDTDANSNGSSGNE—SNGPESRGASQRSSSSSSNGKDSALLETTESKSTNSQSPSPSSSIAYSLLSASSEQDNPSSTSGCSSEQSARARTQKELMTALREL	145
Per2	1	MNGYVDFS—PSTSP—TKEPGAQ—PTQAVLQEDVDM—SSGSSGNENCSTGRDSQG—SDCDDNGKELRML—VESSNT—HPSPDD—AFRLMMTEAEH—NPSTSGCSSEQSAKADAHKELIRTLKEL	116
Per1	146	KLRLPPERRGKGRSGTLATLQYALACVKQVQANQEYYQQWSLEEGEPCAMDMSSTYLEELEHITSEYTLRNQDFTSVAVSFLTGRIVYISEQAGVLLRCKRDVFRGARFSELLAPQDVGVFYGSTTPSRLPTWGTGTSGAGSLKDFQT—	293
Per2	117	KVHLPADKKAKGKASTLATLKYALRSVKQVKANEYYQLLMSSESQPCSVDDVPSYTMQEVEGITSEYIVKNADMFAVAVSLVSGKILYISNQVASIFHCKKDAFSDAKFVEFLAPHDVSFVHSYTTTPYKLPW—SVCSGLDSFTQEC	262
Per1	294	—EKSVFCRIRGGPDRDPGRYPQFRLTPYVTKIRVSDGAPAQPCCLLIAERIHSGYEAPRIPDPKRIFTTRHTPSCLFQDQVDERAAPLLGYLPQDLLGAPVLLFLHPEDRPLMLAIHKVLLQAGQPFDSPIRFCARNGEYVTMDTSW	441
Per2	263	MEEKSFFCRVSVGKHHENIERYPFRMTPYLVKVQEQQGAESQLCCLLAAERVHSGYEAPRIPPEKRIFTTHTPNCLFQAVDERAVPLLGYLPQDLIETPVLVQLHPSDRPLMLAIHKKILQAGGQPFDSPIRFRTRNGEYITLDTSW	412
Per1	442	AGFVHPWSRKVAVFLGRHKVRTAPLNEDVFT—PPAPSPAPSLDSIQELSEIQHRLLLQPVHSSTPTGLCGVGPLMSPGPLHSPGSSSDSNGGDAGGPGPPAPVTQQICKDVHLVKHQGQQLFIESRAKPPPRPRL—ATGTFKA	585
Per2	413	SSFINPWSRKISFIIGRHKVRVGPLNEDVFAASPCPEEKTPHPS—VQELTEQIHRLLMQPVPHSGSSGYGSLGNSGSHELMSQTSSSDSNGGEE—SHRRRSIGIFKTSKGIQTKSHVSHESGGQKEA	537
Per1	586	KVLPCCSPNPELEVAPV—PDQASLALA—PEEPERKETSGCSYQQINCLDSILRYLESNIPSTAKRKCASSSYTASSASDDDKQRAQVPVGAKKDPSAMLSGEGATPRK—EPVVGGTLSPLALANKAESVSVTSQCSF	724
Per2	538	SVAEMQS—SPPAQVKAVTTIERDSSGASLPKASFPEELAYKNQPPCSYQQISCLDSVIRYLESCEAATLKRKCEFPANIPSRKAT—VSPGLHSGEAARPSKVTSHTEVSAHLSSLTLPKAEVSVSLTSQCSY	669
Per1	725	SSTIVHVGDKKP—PESDIIMMEDPLGAPGAPSPAPSPTVAPDPTDAYRPVGLTKAVLSLHTQKEEQAFNRFRLGRL—RGLDTSVAPSPAGCHHGPIPPGRRHCRSKAKRSRHHHQT—PR	848
Per2	670	SSTIVHVGDKKPQE—LETVEDMASGPESLDGAAGGLSQEKG—LQKGLTKEVLAHTQREEQGFLQRFREVSRLSALQAHQNYLQERSRAQASDRGLRNTS—GLESSWKKTGKNRKLKSKRVKTRDSSSETGSGGP—	805
Per1	849	PETPCYVSHSPVP—SSGPWPPPA—TTPFPAMVQYPLPVFSPRG—GPQLPPAPT—SVSPATFSPPLVTPMVALVLPNYLFP—TP—PSYPYGVSQAPVEGPPTPASHSPSPS—	956
Per2	806	—VSHRPPLMGLNATAWSPSDTSQSSCPSAPFPTAVPAYPLPVFQAPGIVSTPGTVVAPPAATHGTFTMPVVMGTQPEFAVQPLPFAAPL—APVMAFMLPSYPFPATPNLPQAFLPSQPHFPAHPTLASEITPASQAEFFSRTS	948
Per1	957	—LPPP—PLSPP—HRPDSPLFNSRCSPLQLNLLQLEESPRTEGGAAA—GGPGSSAGPLPPSEETA—EPEA—RLVEVTESSNQDALSGSSDLLELLQEDSRSGTGSAASGLGSLGSGSGSGSHEGGSTASITRSSQ	1089
Per2	949	TLRQPCACPVTPAGTVALGRASPPLFQSRGSSPLQLNLLQLEEAPEGSTGAAGLTGTTGTAAAGLDCTSGTSRDRQPKAPPTCNEPSDTQNSDAISTSSDLLNLLGEDLCSATGSALSRSGASATSDSLGSSS—LFGFTSQSGAGSSD	1097
Per1	1090	SSHTSKYFGSIDSSAEAGAAR—ARTEPGDQVICKVLQDPIWLLMANADQRVMYTVQVPSRDAASVLKQDRERLRAMQKQQPRFSEDQRRELGAHVHSVVRKGQLPRALDVMACVDCGSSVQDPGHSDDDLFSLEDGLGLEPMEEGGEGG	1238
Per2	1098	TSHTSKYFGSIDSSENNHHAKMIPDTEESQEQIKYVLQDPIWLLMANTDDSIMMYQLPSRDLQAVLKEDQEKLLQRSQPRFTEGQRRELREVPVWHTGGLPTAIDVTGCYCE—SEEKGNICLPYEEDSPSPG	1233
Per1	1239	GCGVGGGGGGGGE—EAQTQIGAKGSSSQDSAMEEEEGGGSSSPALPAEENSTS* 1292	
Per2	1234	LCDTSEAKEEEGEQLTGPRIEAQT* 1258	

家族性睡眠相前進症候群 (FASPSサイト) ↑

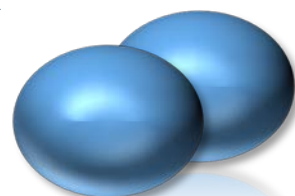
Per2: Serine: 162 residues. Coding (1258 a.a., 3774 bps)

Per1: Serine: 166 residues. Coding (1292 a.a., 3876 bps)

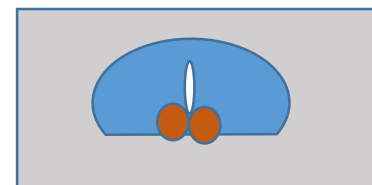
図6 A



夜間の光刺激



視交叉上核 (~10,000 cells)

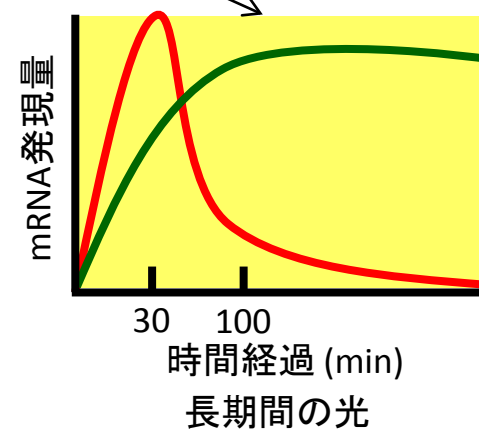
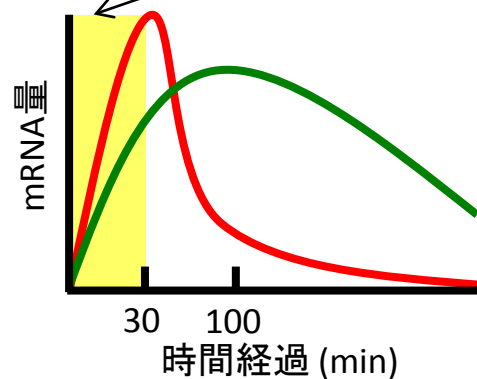


Microarray

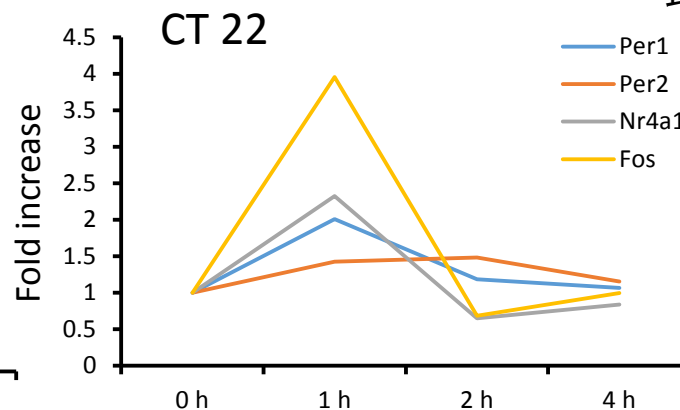
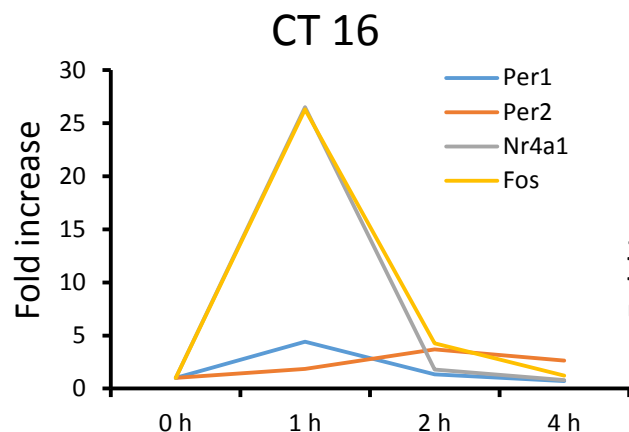
In situ hybridization

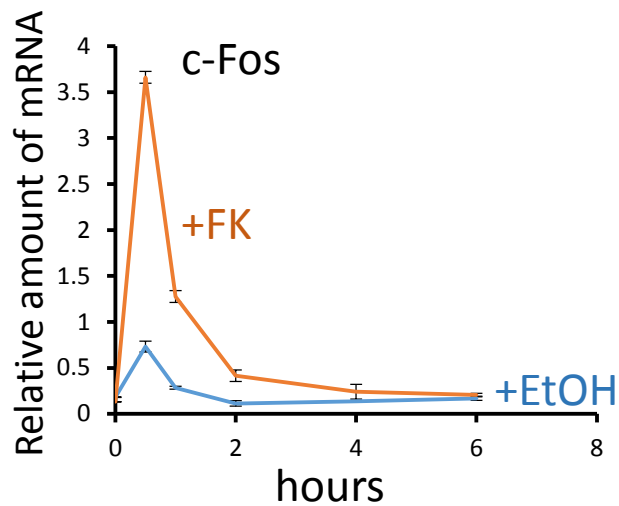
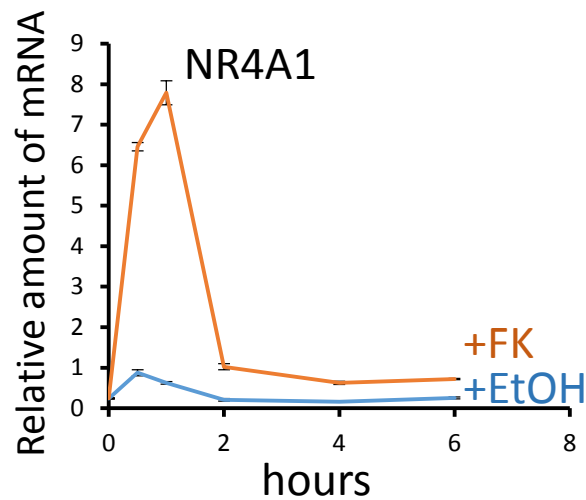
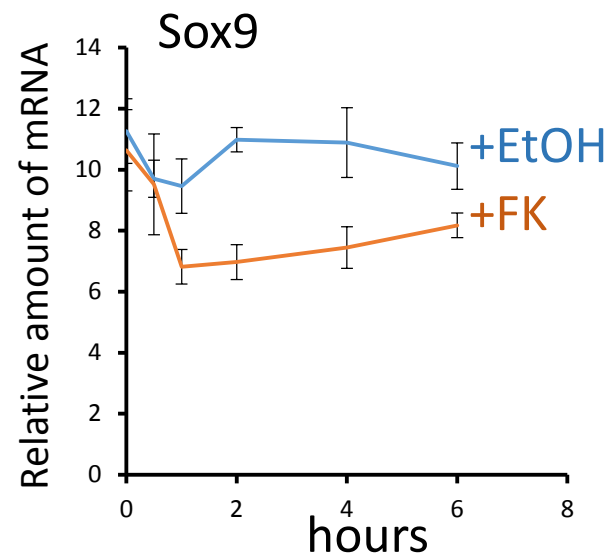
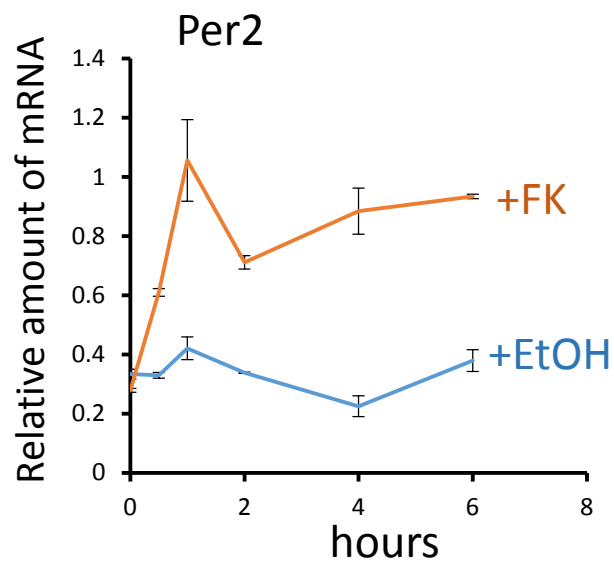
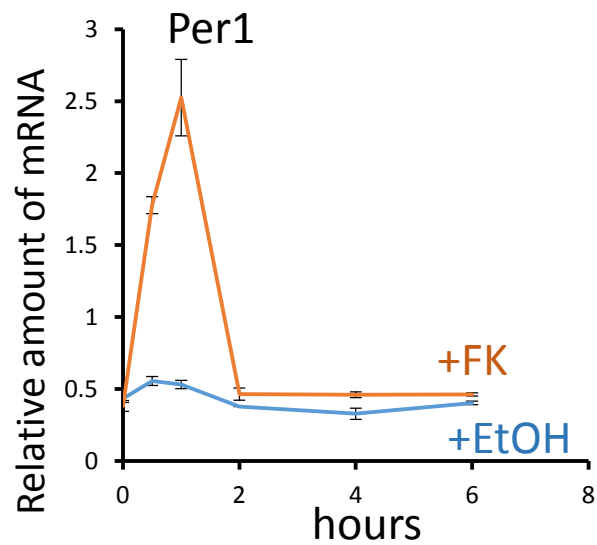
光応答遺伝子は
2グループに分けられる.

- Early type genes
Per1 等..
- Late type genes
Per2 等..



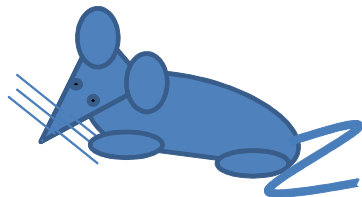
B





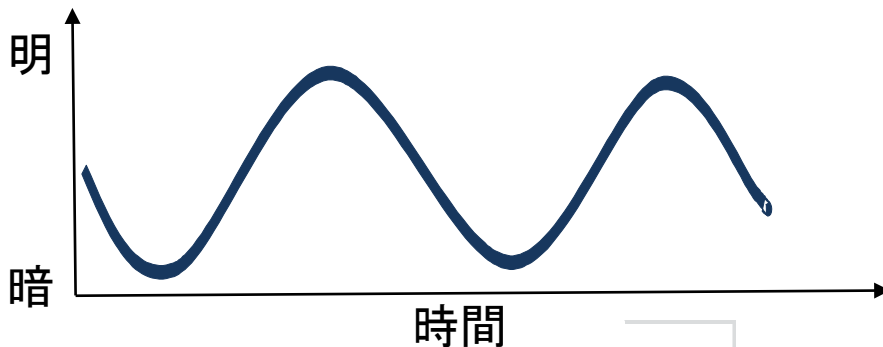
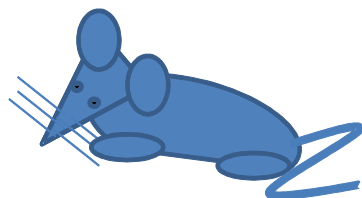
● 実験1: 恒常明条件下におけるPer1, Per2の役割

WT, Per1 or Per2ノックアウトマウス



● 実験2: 緩徐に変化する光条件下でのPer1, Per2の役割

WT, Per1 or Per2ノックアウトマウス



B

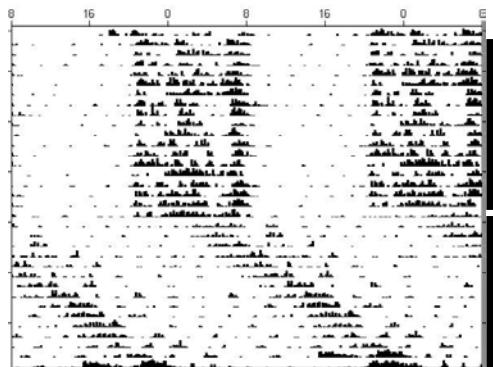
M		Per2			Tot
		+/+	+/-	-/-	
Per1	+/+	4	13	2	19
	+/-	8	31	11	50
	-/-	8	15	5	28
Tot		20	59	18	97

F		Per2			Tot
		+/+	+/-	-/-	
Per1	+/+	5	22	4	31
	+/-	15	25	12	52
	-/-	9	15	7	31
Tot		29	62	23	114

9

A

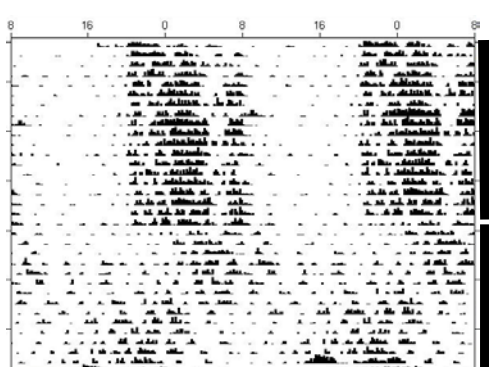
Per2 (WT/WT)



LD

LL

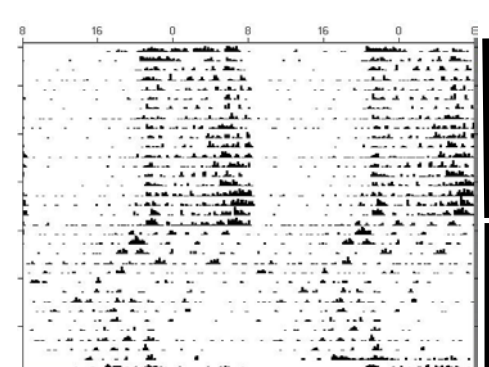
Per2 (WT/mut)



LD

LL

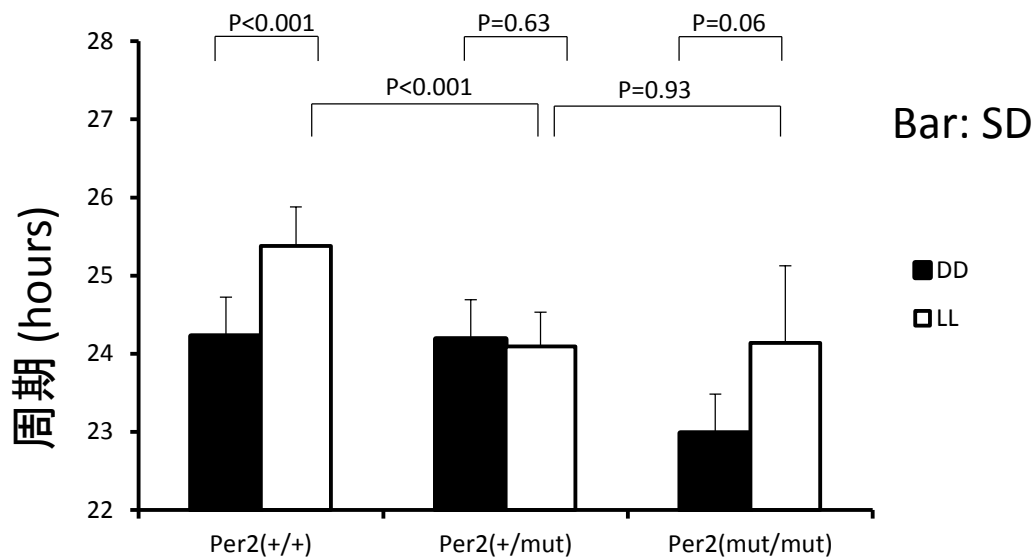
Per2 (mut/mut)



LD

LL

B



	Per2(+/+)	Per2(+/-)	Per2(-/-)
DD (hours)	24.2	24.2	23.0
LL (hours)	25.4	24.1	24.1

(n=12)

(n=14)

(n=7)

図10A

遺伝子型	N
Per1(+/-)Per2(+/-)	4 (+6)
Per1(+/-)Per2(+/-)	6
Per1(-/-)Per2(+/-)	6
Per1(+/-)Per2(+/-)	6
Per1(+/-)Per2(-/-)	2 (+6)
合計	24 (+12)

B

(ZT0: 8時)

(ZT 12: 20時)

調整期間3日

LD 14日

LL 14日

ケージ交換

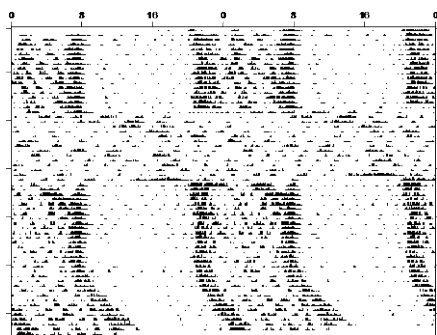
調整期間3日

LD 14日

DD 14日

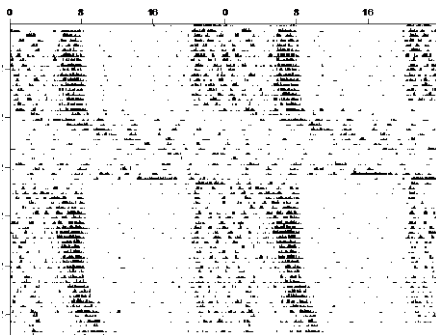
C

Per1(-/-)



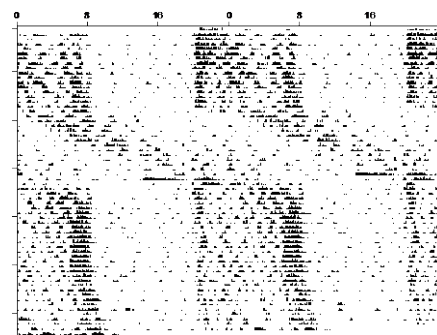
LD
LL
LD
DD

Per1(+/-)



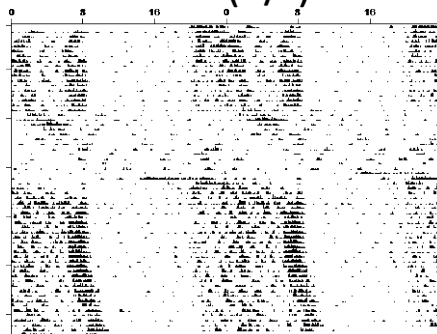
LD
LL
LD
DD

WT



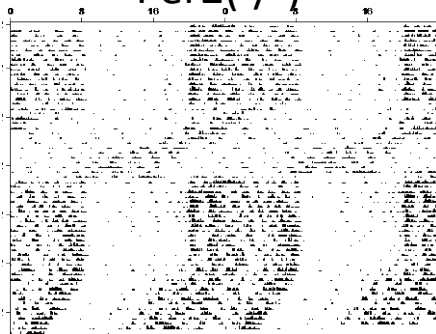
LD
LL
LD
DD

Per2(+/-)



LD
LL
LD
DD

Per2(-/-)



LD
LL
LD
DD

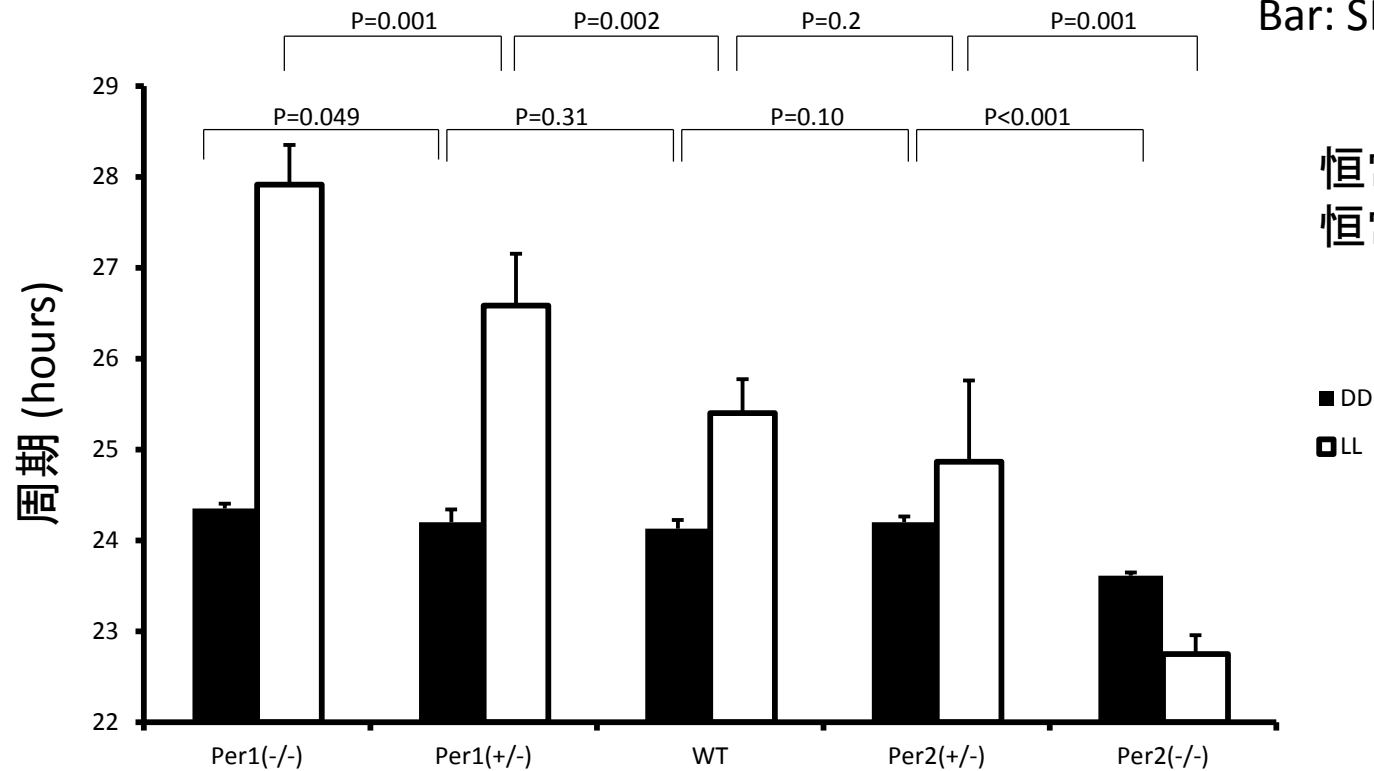
図11

自律振動周期の平均

解析: カイニ乗ピリオドグラム
ClockLabを使用

N=6-10

Bar: SD



恒常明条件: LL
恒常暗条件: DD

	Per1 (-/-)	Per1 (+/-)	WT	Per2(+/-)	Per2 (-/-)
LL (hours)	27.9	26.6	25.4	24.9	22.8
DD (hours)	24.4	24.2	24.1	24.2	23.6

図12

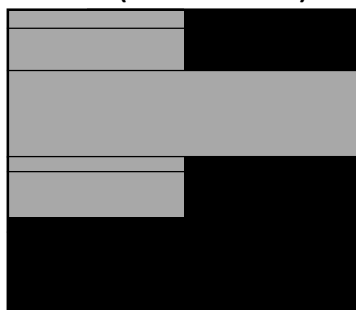
A

遺伝子型	N
Per1(+/-)Per2(+/-)	12
Per1(-/-)Per2(+/-)	12
Per1(+/-)Per2(-/-)	12
合計	36

B

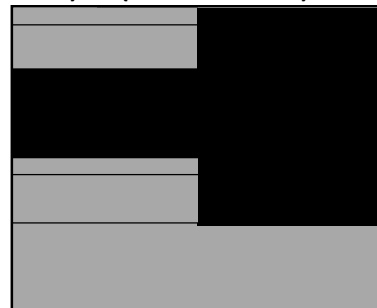
a

(ZT0: 14時) (ZT12: 2時)



b

(ZT0: 14時) (ZT12: 2時)



調整期間3日
LD 14日

LL 28日
調整期間3日
LD 14日

DD 28日

調整期間3日
LD 14日
DD 28日
調整期間3日
LD 14日

LL 28日

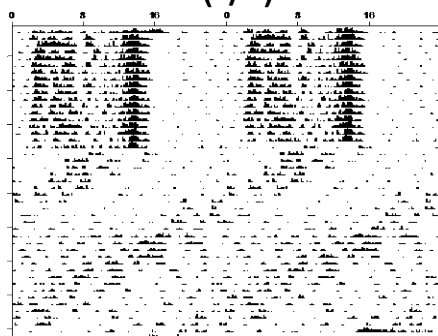
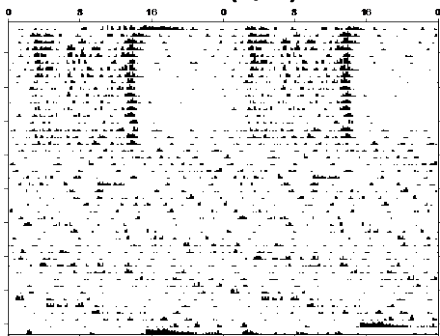
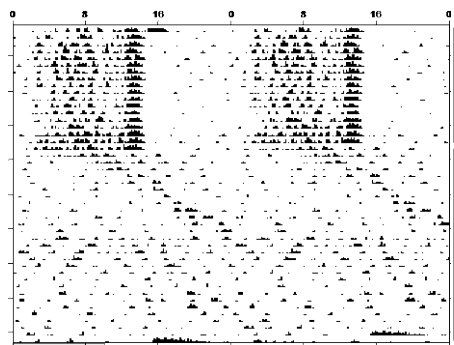
C

WT

Per1(-/-)

Per2(-/-)

LL



DD

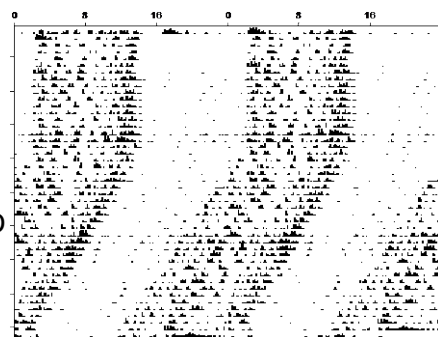
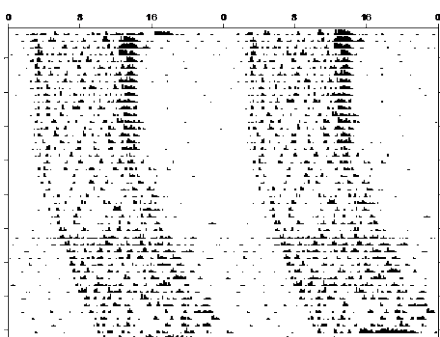
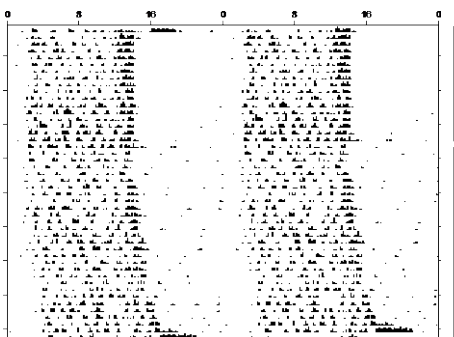
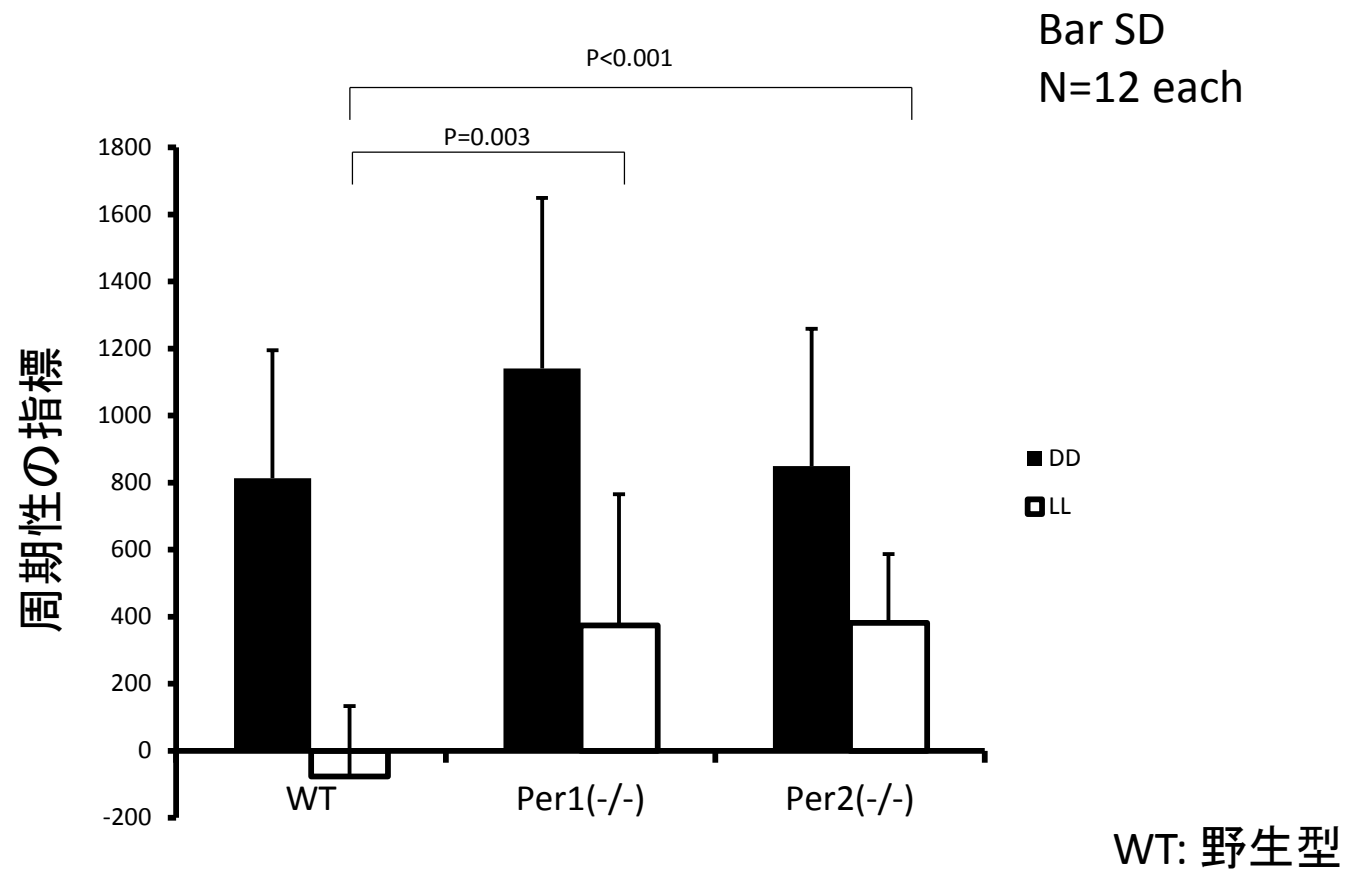


図13

周期性の指標



恒常明条件: LL
恒常暗条件: DD

図14

行動解析ラックの概観 外扉を開けた所 本体



赤外線センサー

LED

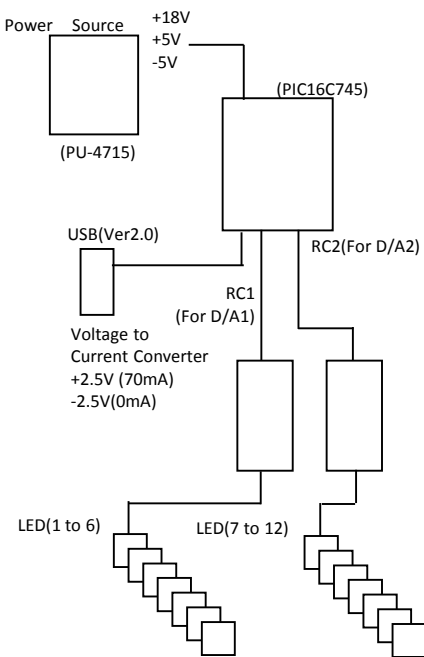
遮光カーテン

餌箱の使用

本体拡大図

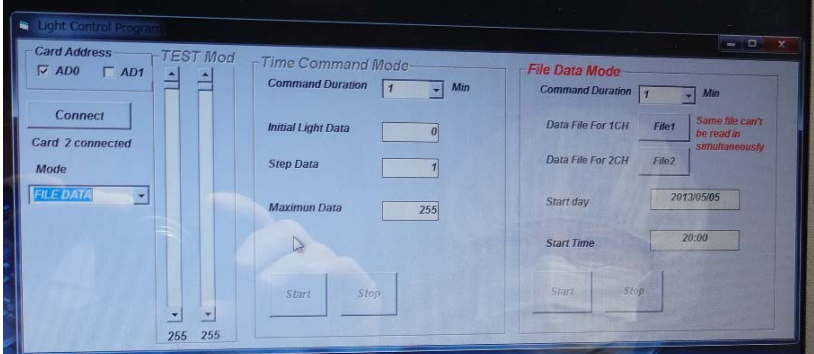


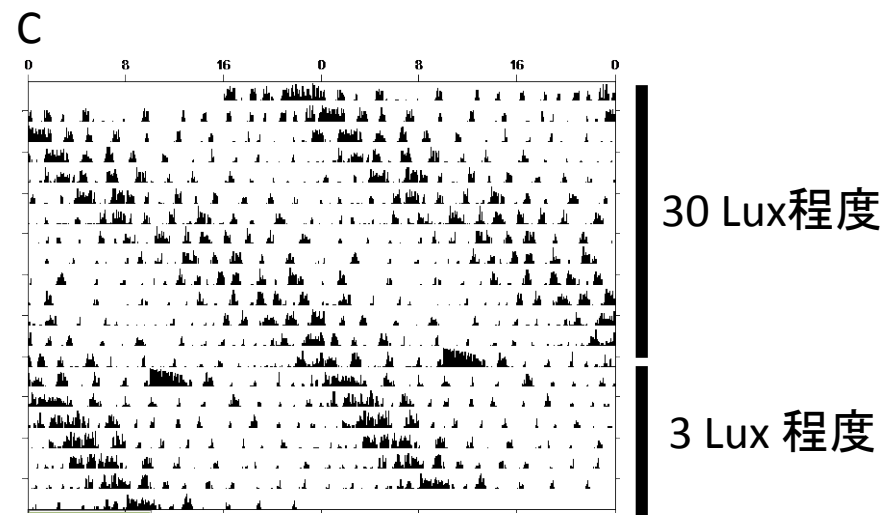
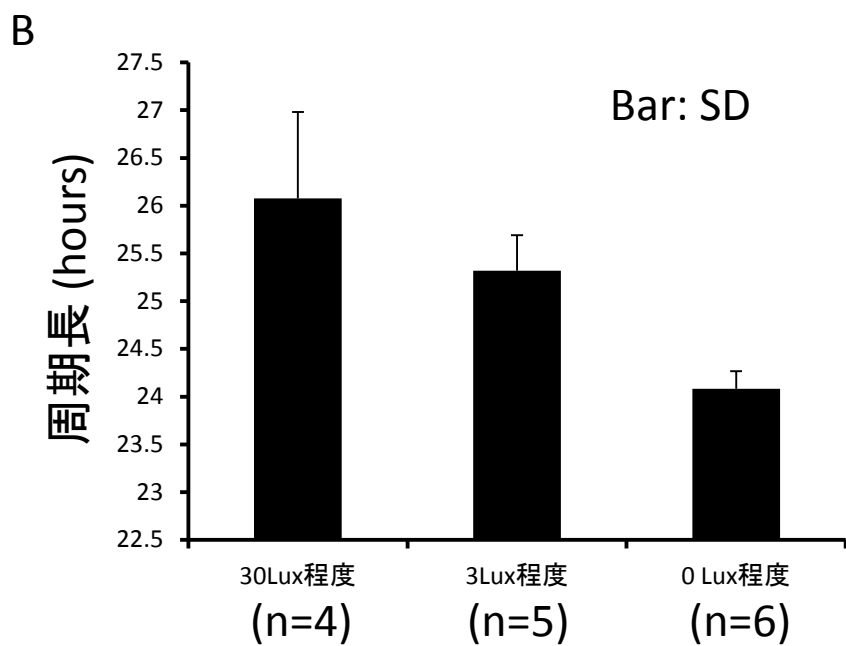
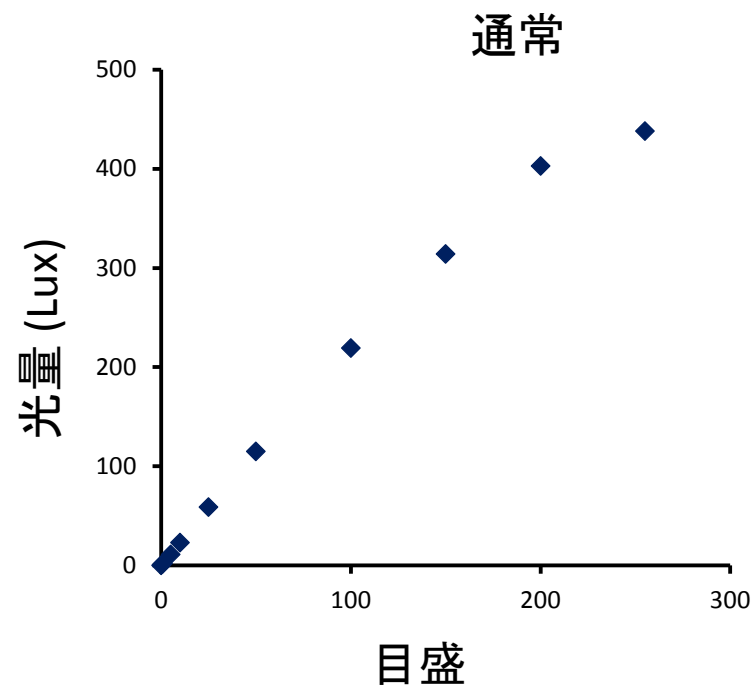
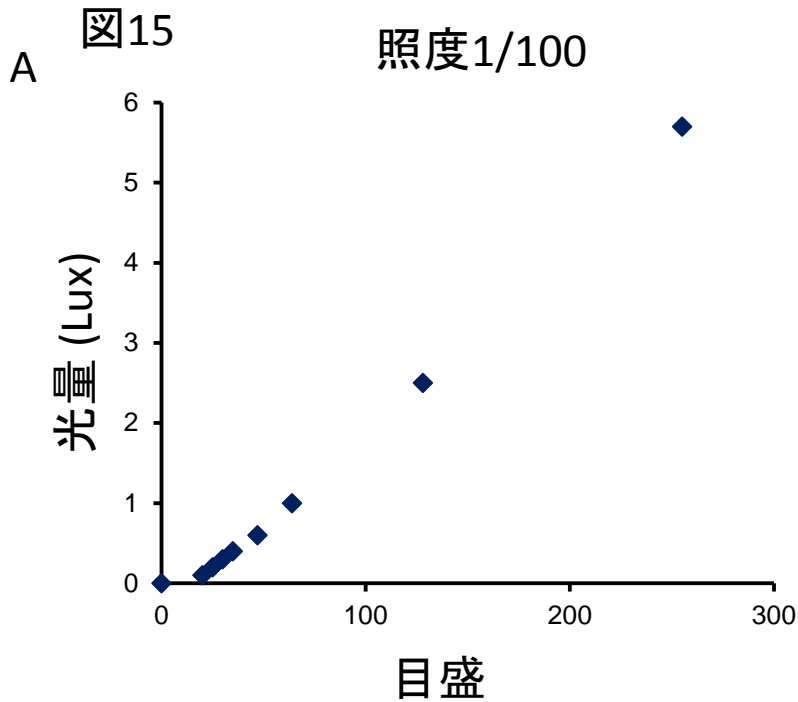
ブロックダイアグラム



インターフェイス

留め金





A

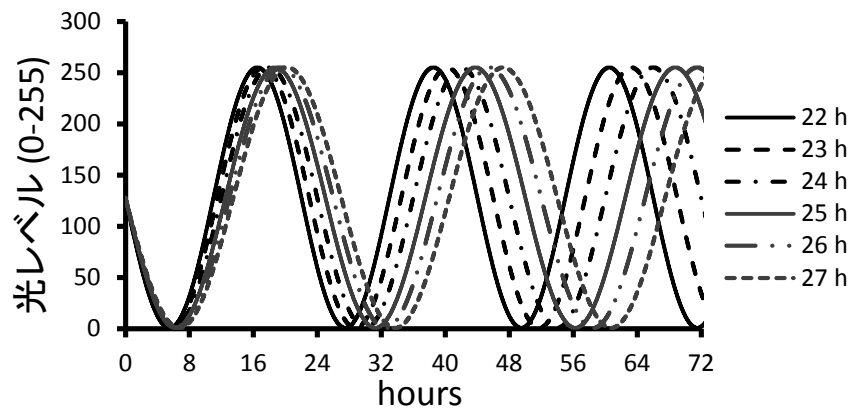
暗



約5.4 Lux

約0.001Lux

B



C

行程の最後1週間

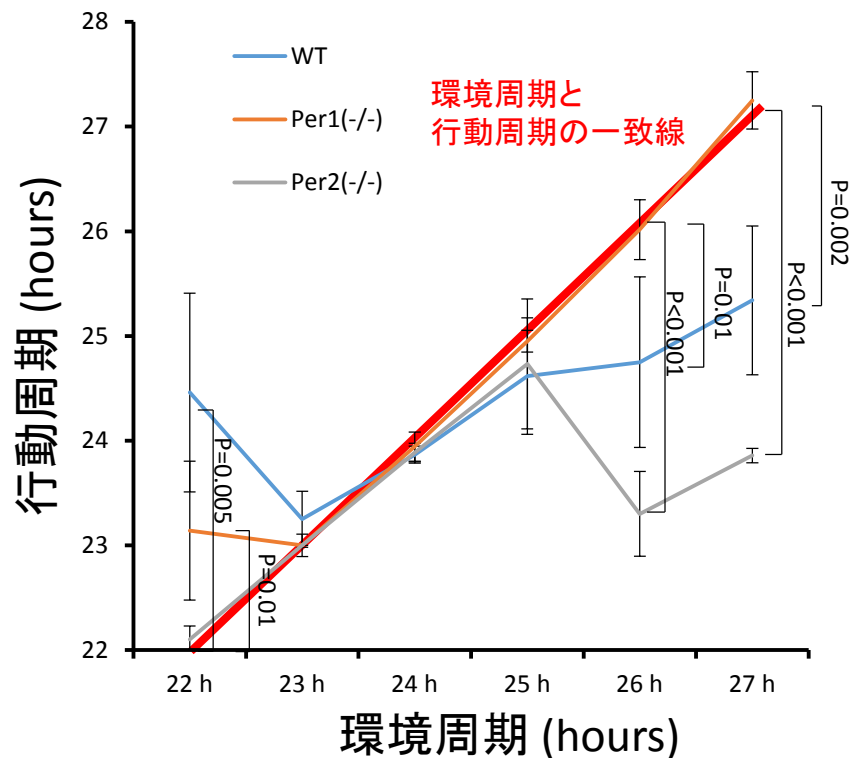
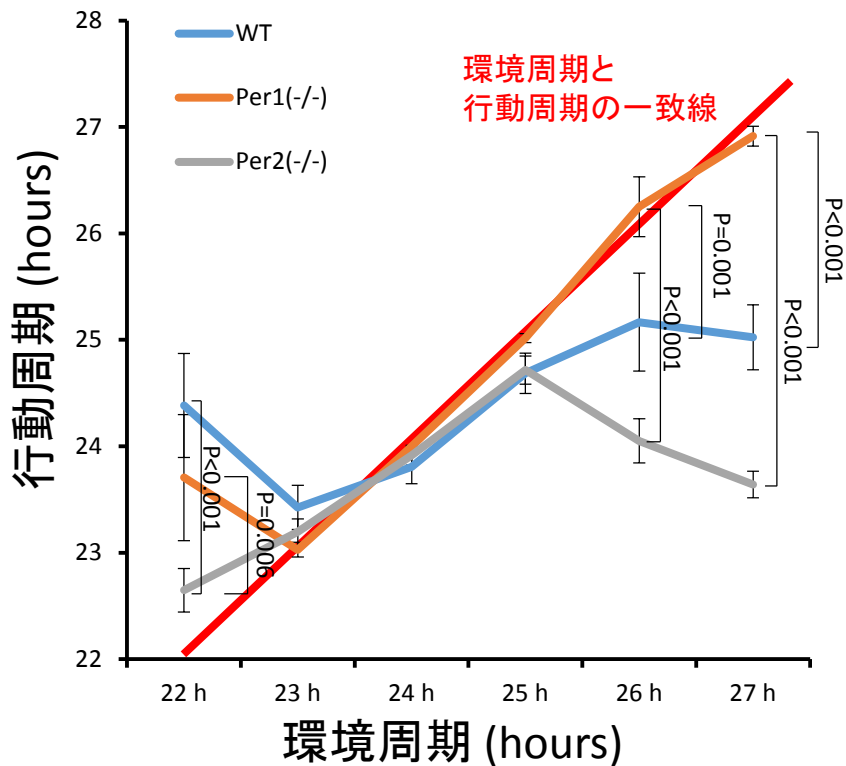
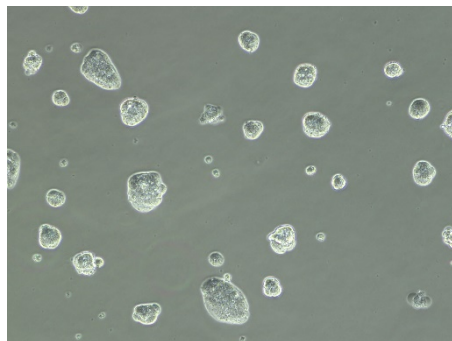
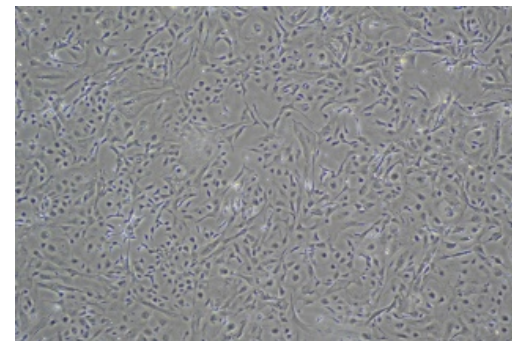


図17

Per2ノックアウト ES細胞



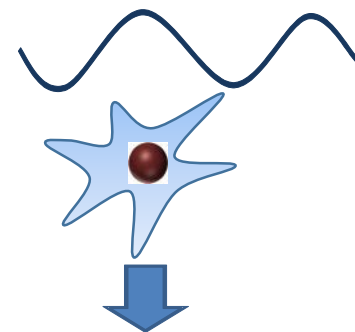
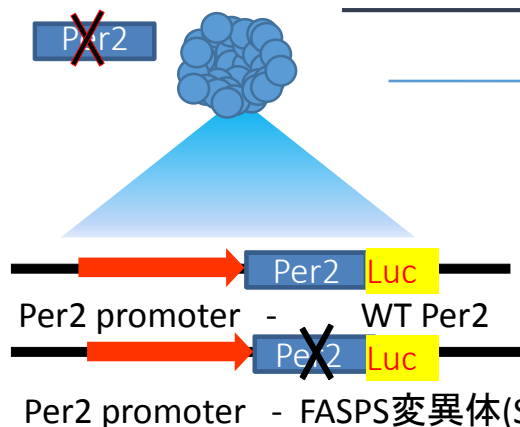
Rosa 26ノックインし、 分化誘導した細胞



Per2ノックアウト ES 細胞

分化誘導

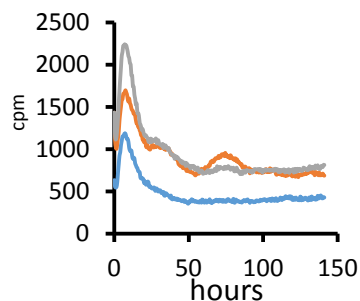
TALEN
を用いた
ROSA 26
ノックイン



様々な変異体の表現型解析
Per1とPer2の機能解析

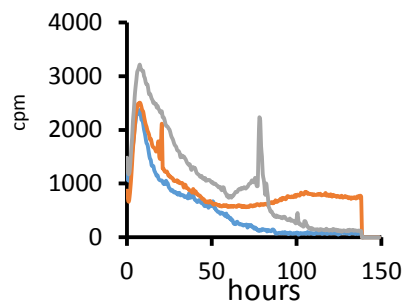
B

pMU2-P(Per2s)-Per2::Luc 1.25 μ g



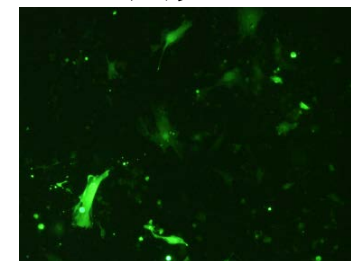
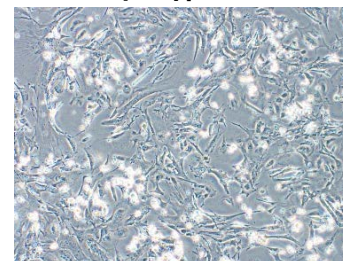
C

pCR8-P(PerL)-Per2::Luc 1.25 μ g



位相差

蛍光

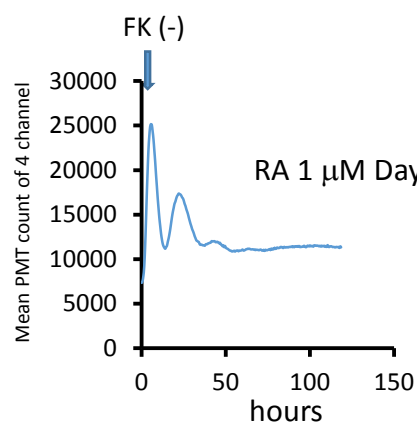
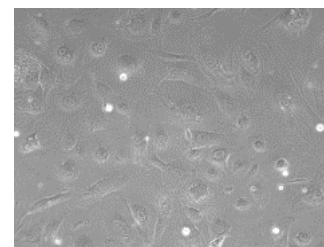
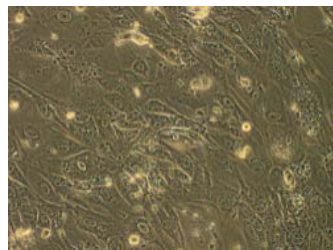
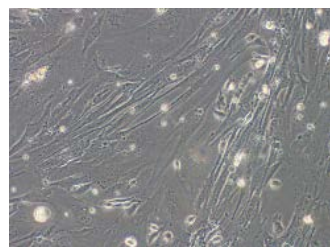


Day 5: 6×10^5 /35 mm dish, Day 6: 12 μ g P(CAG)-EGFP, Day 10:顕微鏡観察

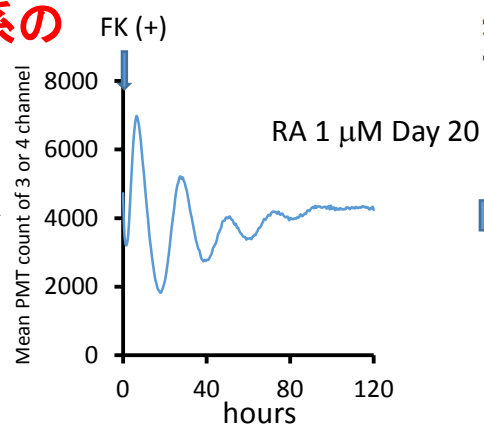
図18

A

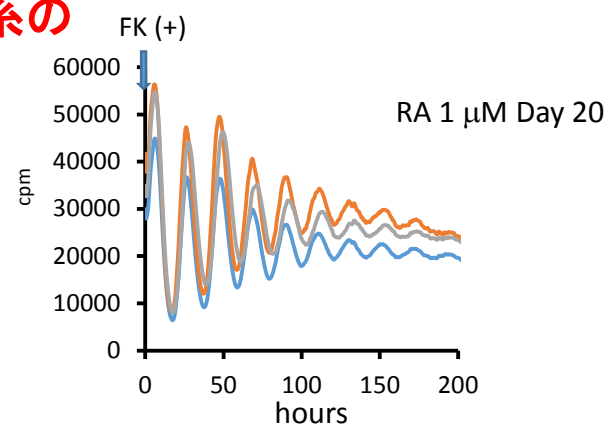
分化細胞



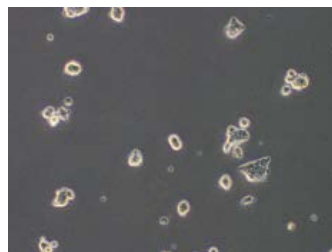
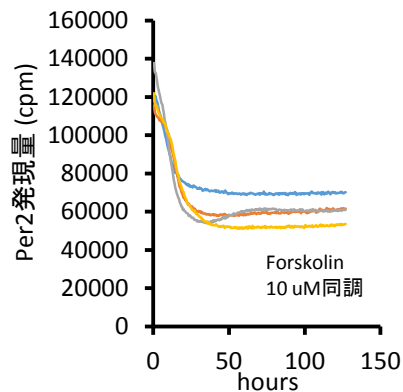
実験系の
改良



実験系の
改良



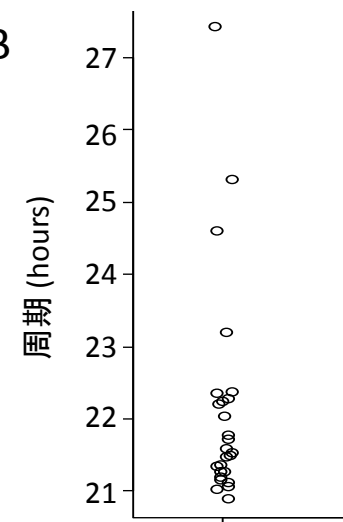
(Cf: ES細胞)



Per2::Luc knock in ES細胞

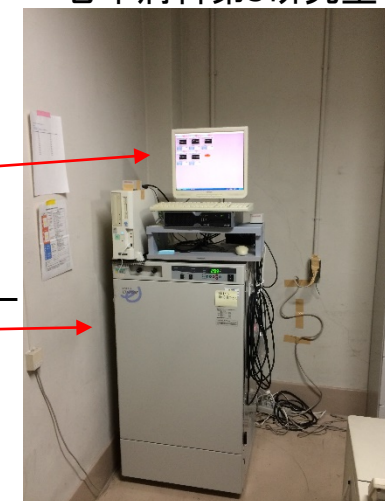


B





老年病科第3研究室



インターフェイス

インキュベーター
(LTI-700)

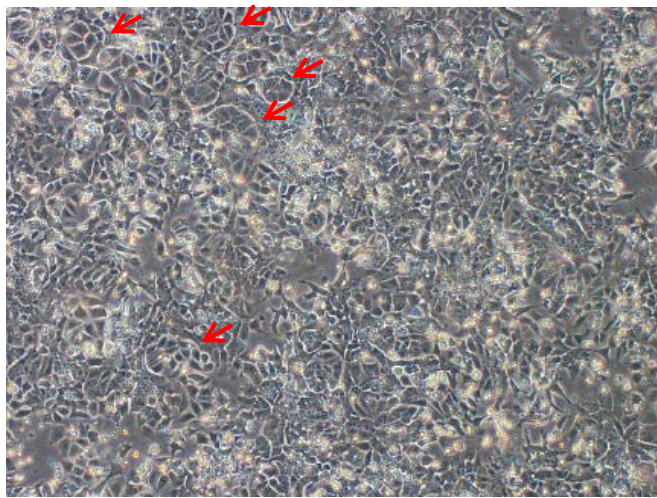
PMT

dish



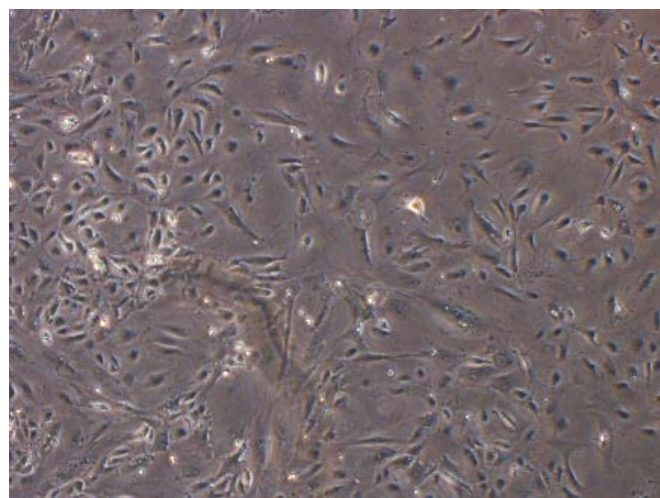
図20 A

高密度



Day 2 : 8×10^5 /35 mm dish
Day 6 : 撮影
顕微鏡倍率: 40倍

低密度

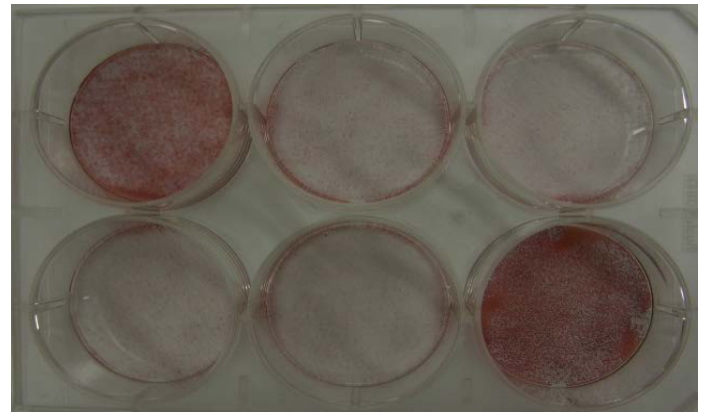


Day 2 : 2×10^5 /35 mm dish
Day 6 : 撮影
顕微鏡倍率: 40倍

B

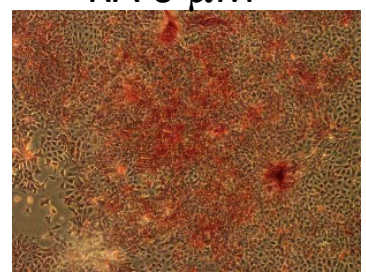
レチノイン酸濃度感受性評価
(アルカリフォスファターゼ染色)

0 0.33 1 (μ M)

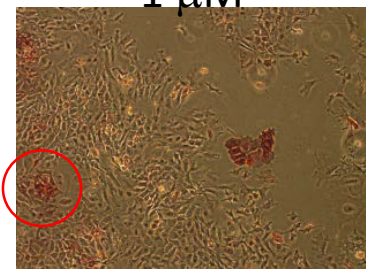


3 10 (μ M) コントロール

RA 0 μ M



1 μ M



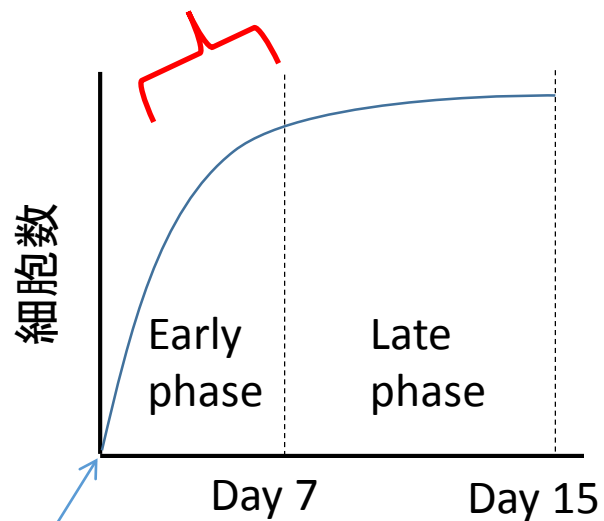
顕微鏡倍率: 40倍

Day 0: 1×10^5 /35 mm dish
Day 3: アルカリフォスファターゼ染色

図21

A

この周辺で35 mm dishに
適切な細胞数で継代する
(細胞数が制御しやすい)



10 cm dishにまき込む

B

分化時の増殖曲線

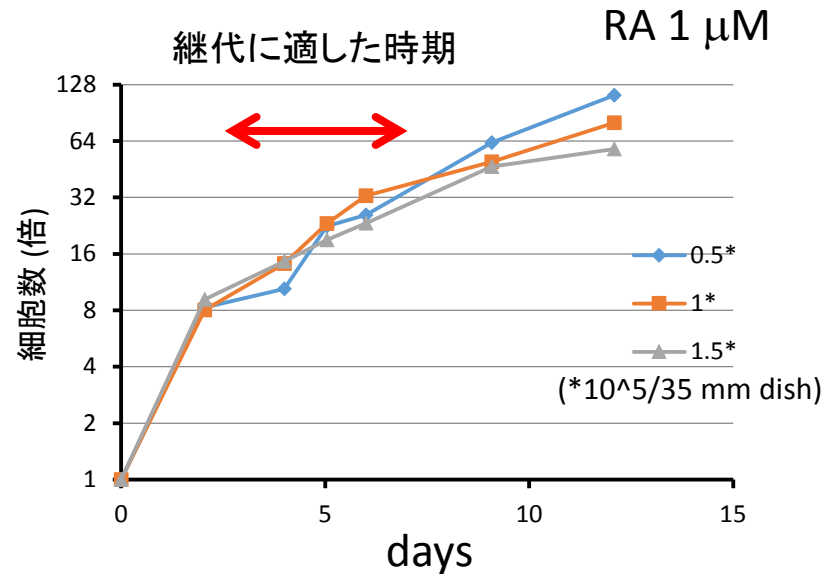
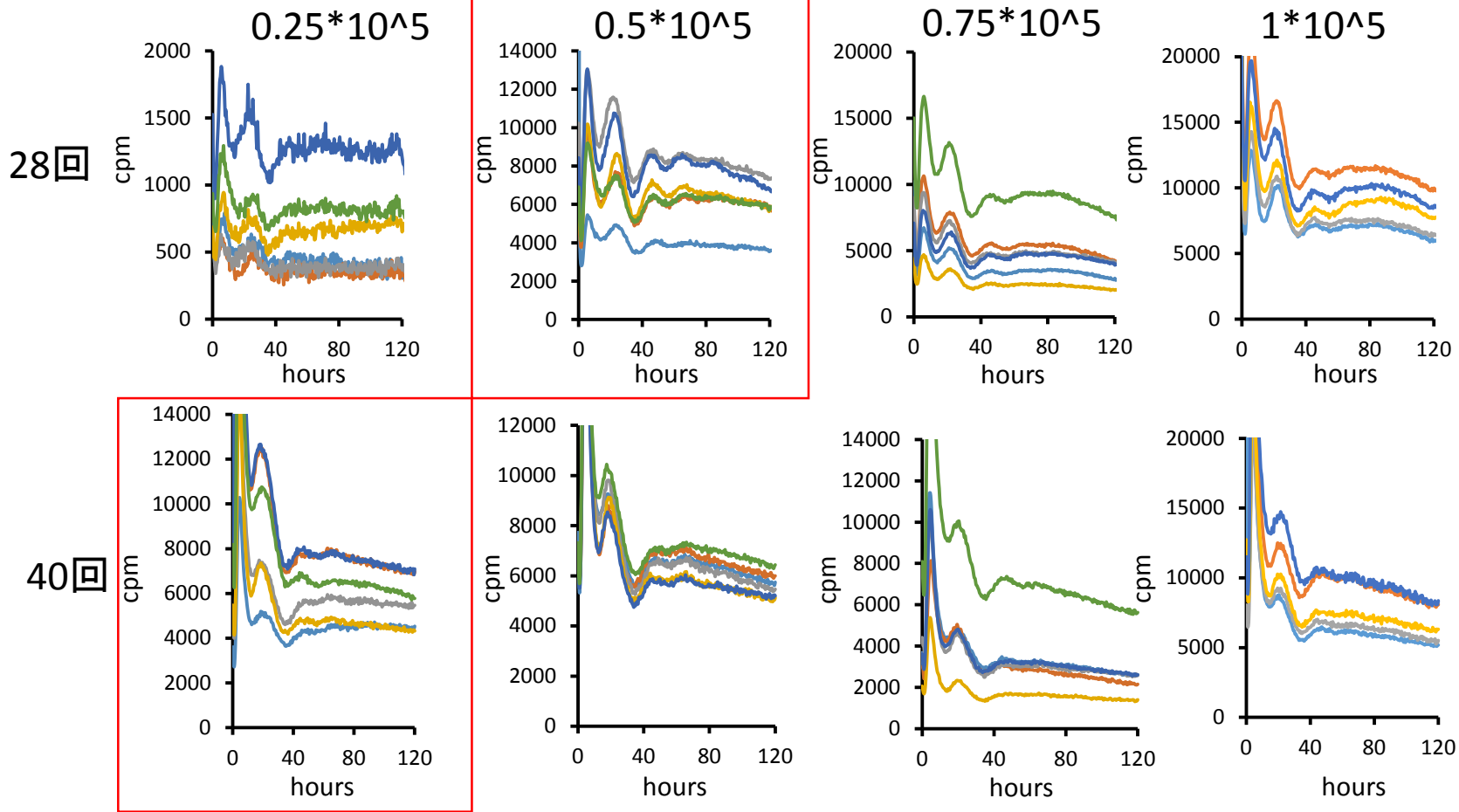


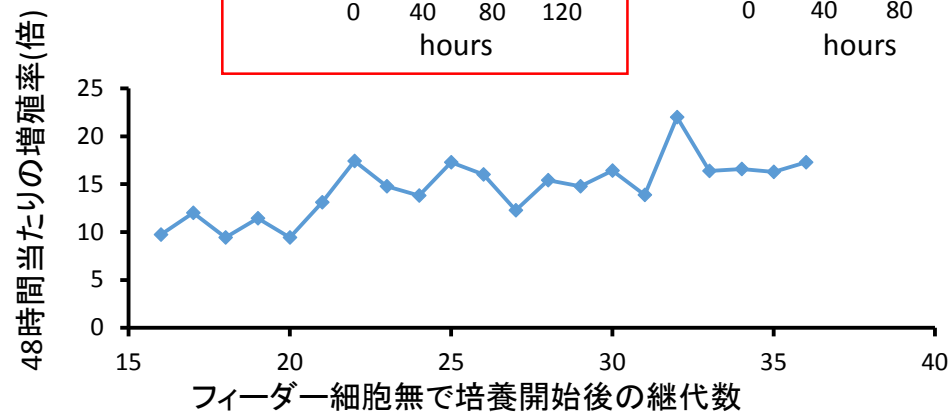
図22

細胞数/well (35 mm dish相当に換算)

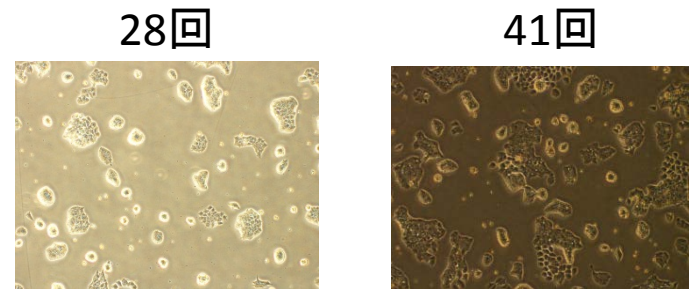
A



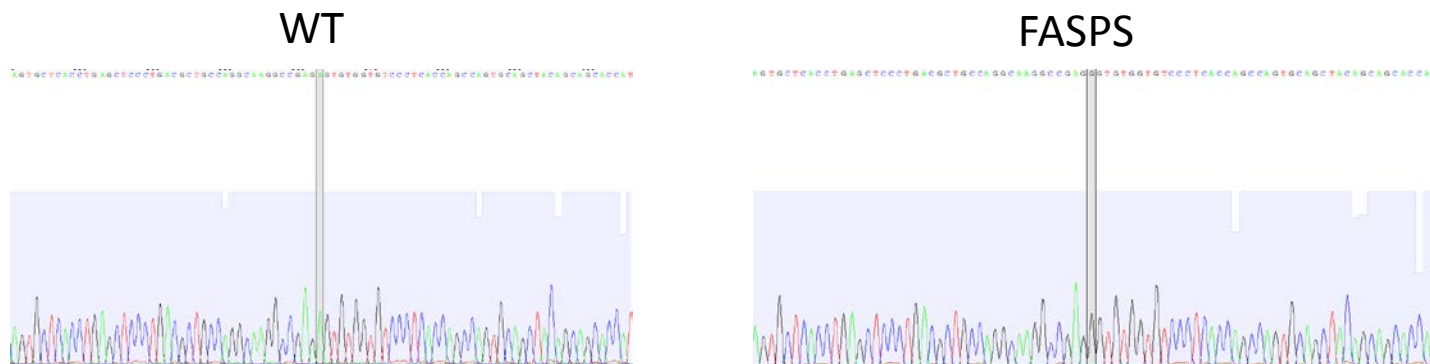
B



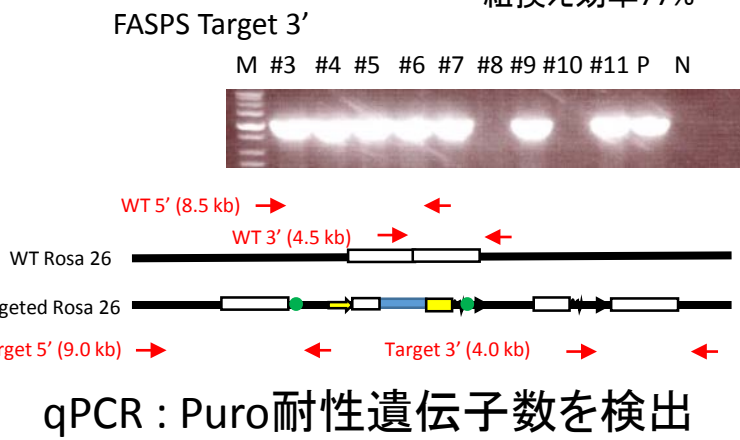
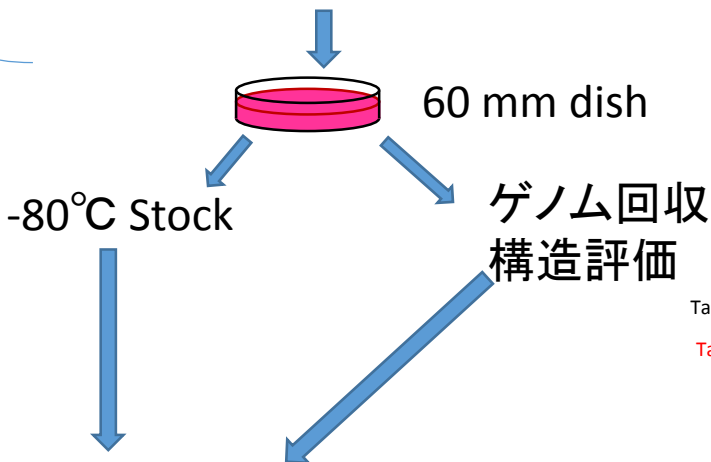
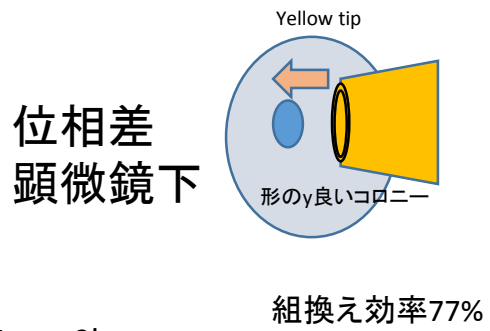
C



pTVCI2-RareCutSite-ROSA long 4k arm-Gateway[attB1/2] **P(Per2L) -Per2::Luc**-FRT[P(PGK)-puro-polyA]-ROSA Short arm (23 kb)



培地
(抗生剤無)
交換連日



1コピーがRosa 26に正しく挿入されたクローンを
2クローン選んでアッセイに使用する。

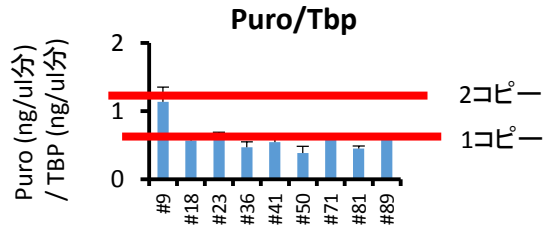


図25

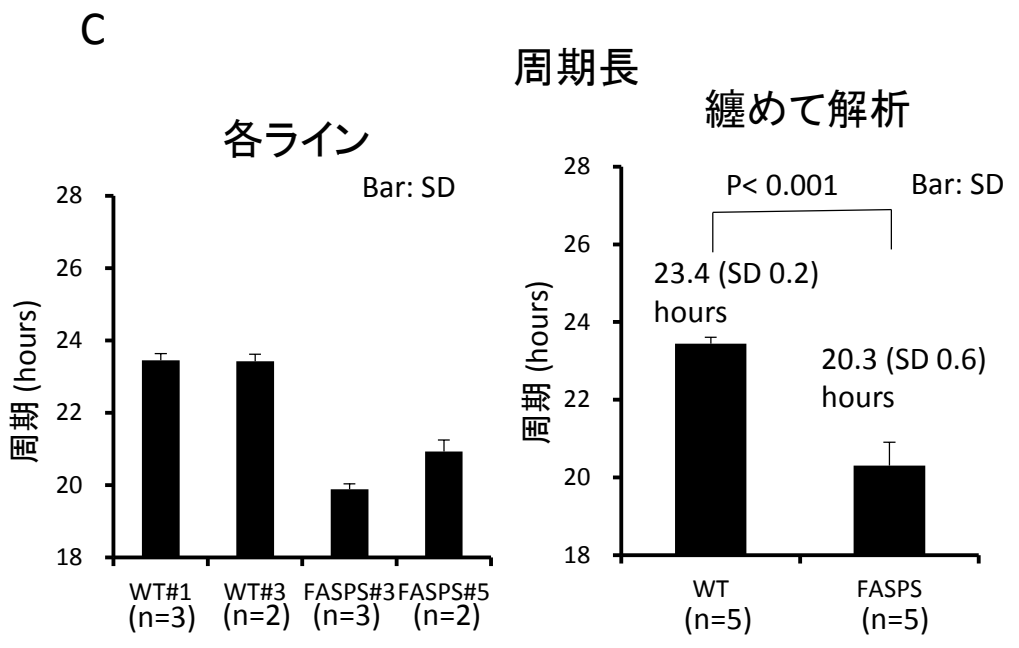
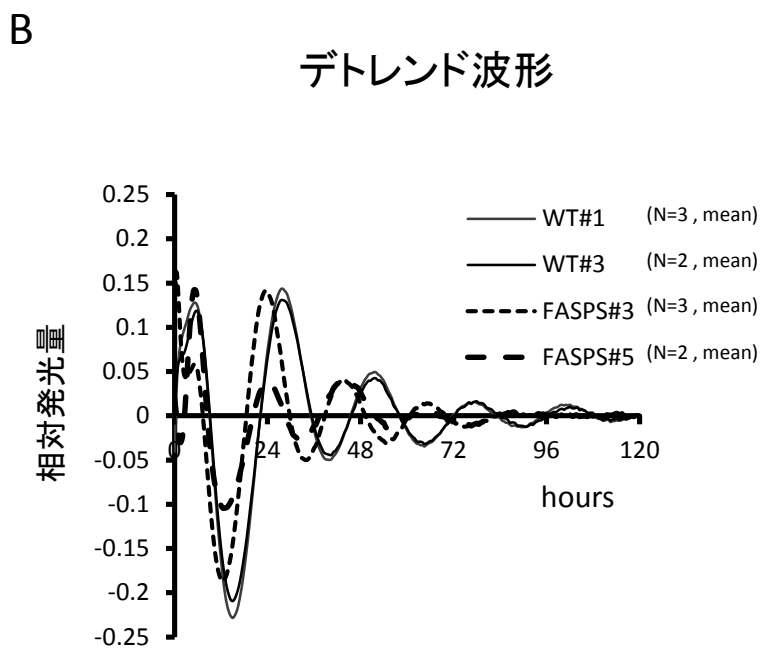
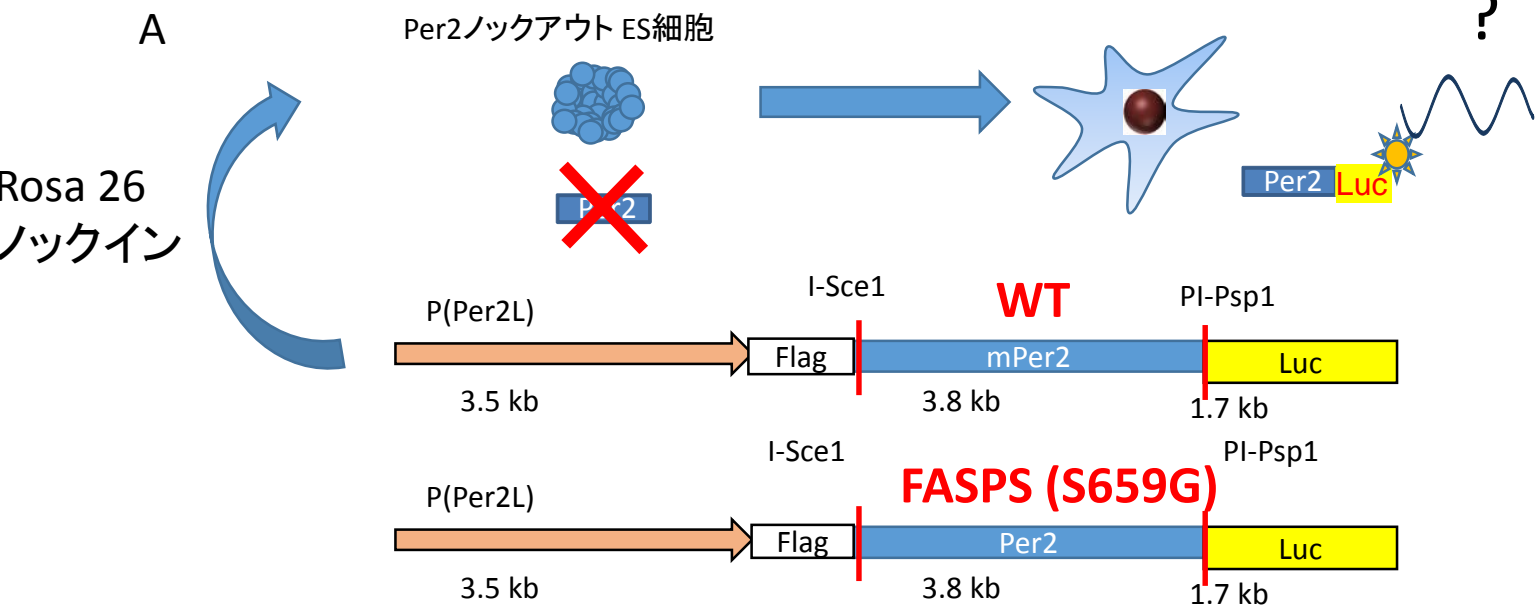
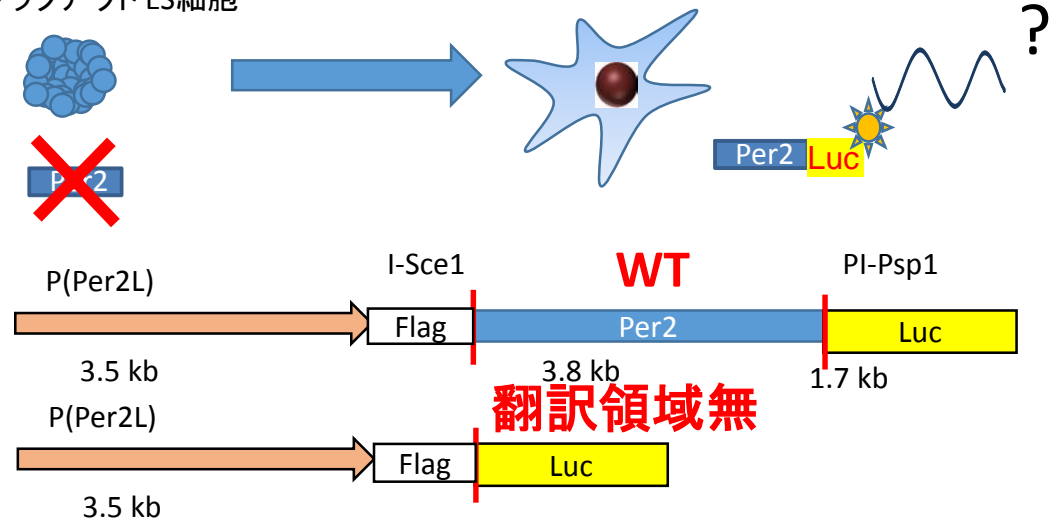


図26

A クローニング後独立した
2ラインを分化誘導

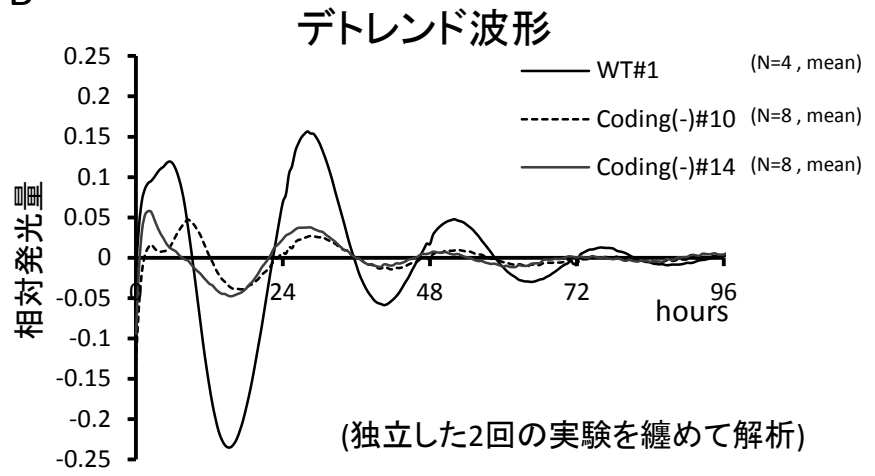
Per2ノックアウト ES細胞

Rosa 26
ノックイン



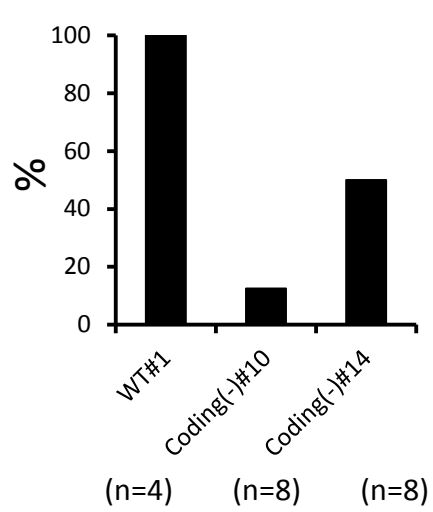
振動は本当に回復
しているのか?
周期長は異なるか?

B



C

振動判定率



周期長

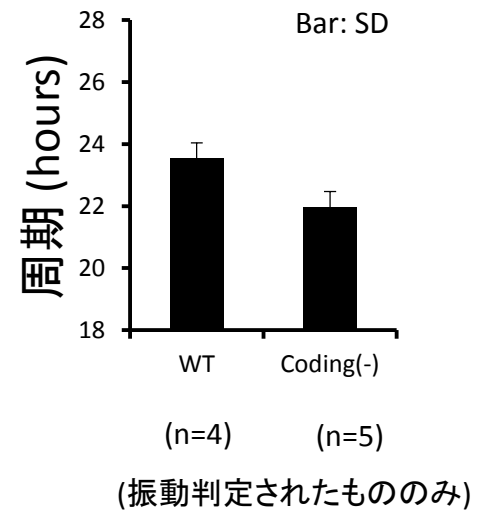
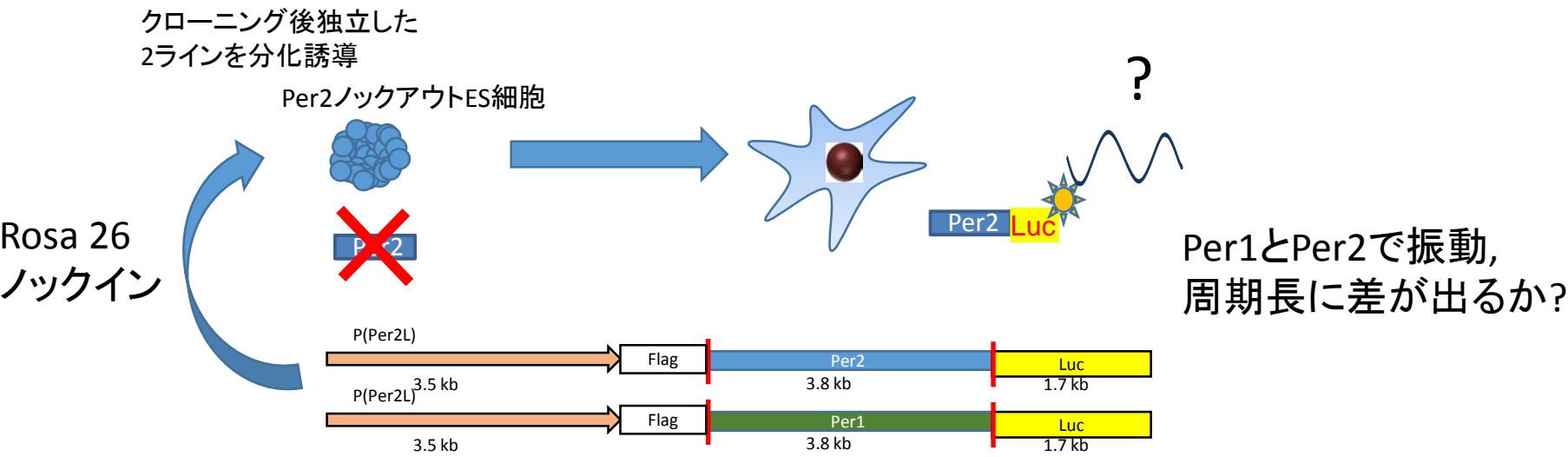


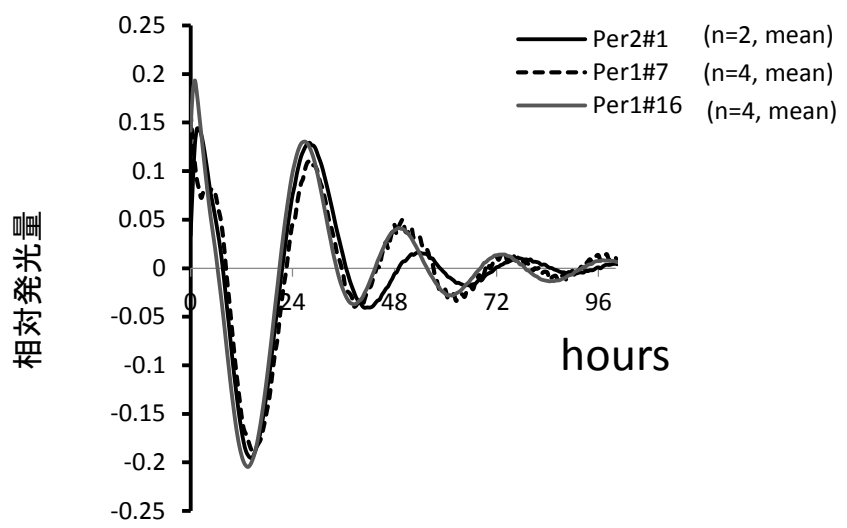
図27

A



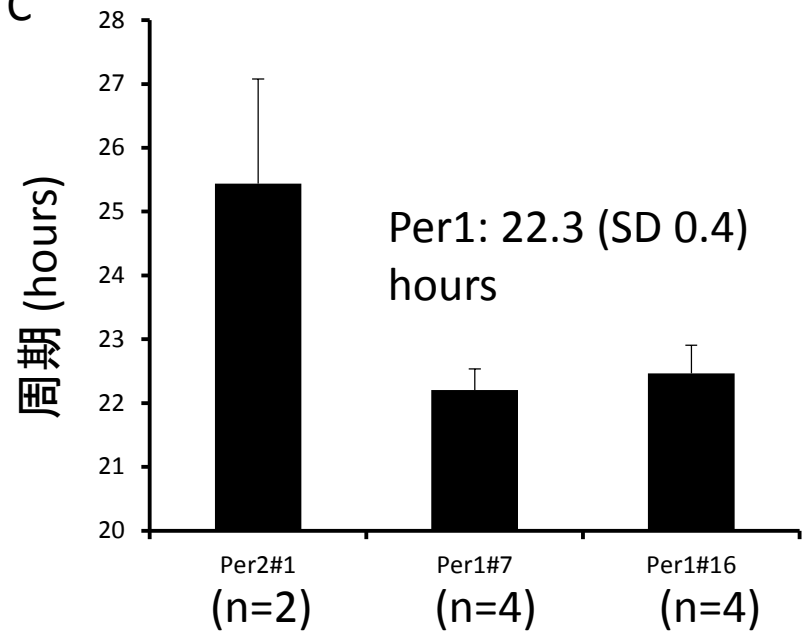
B

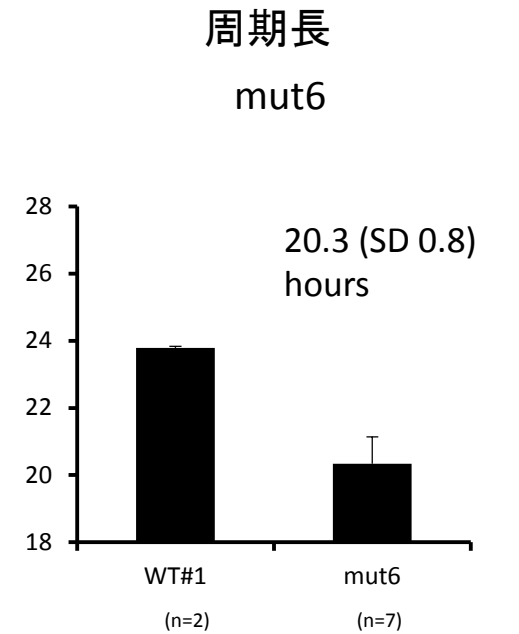
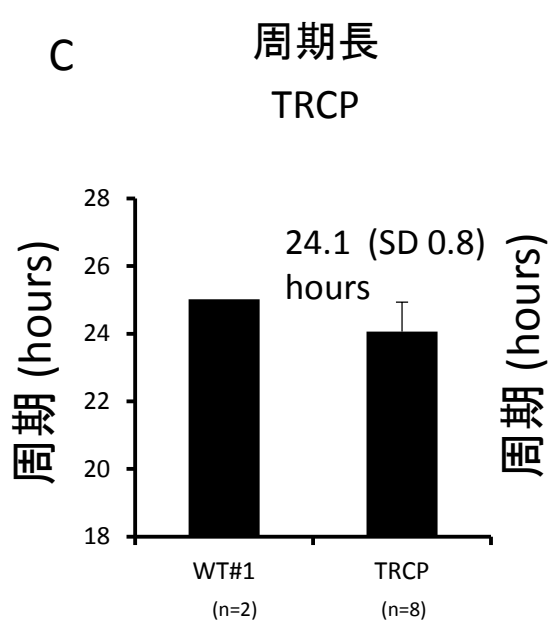
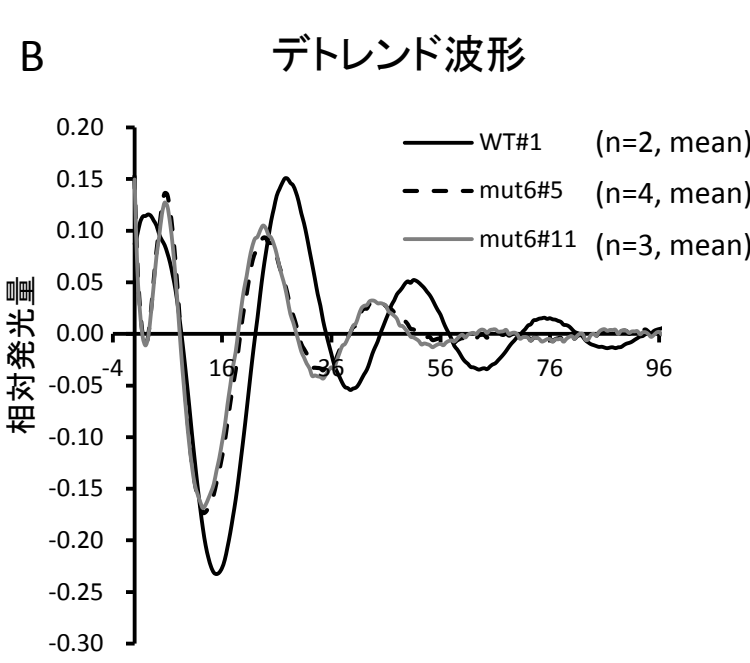
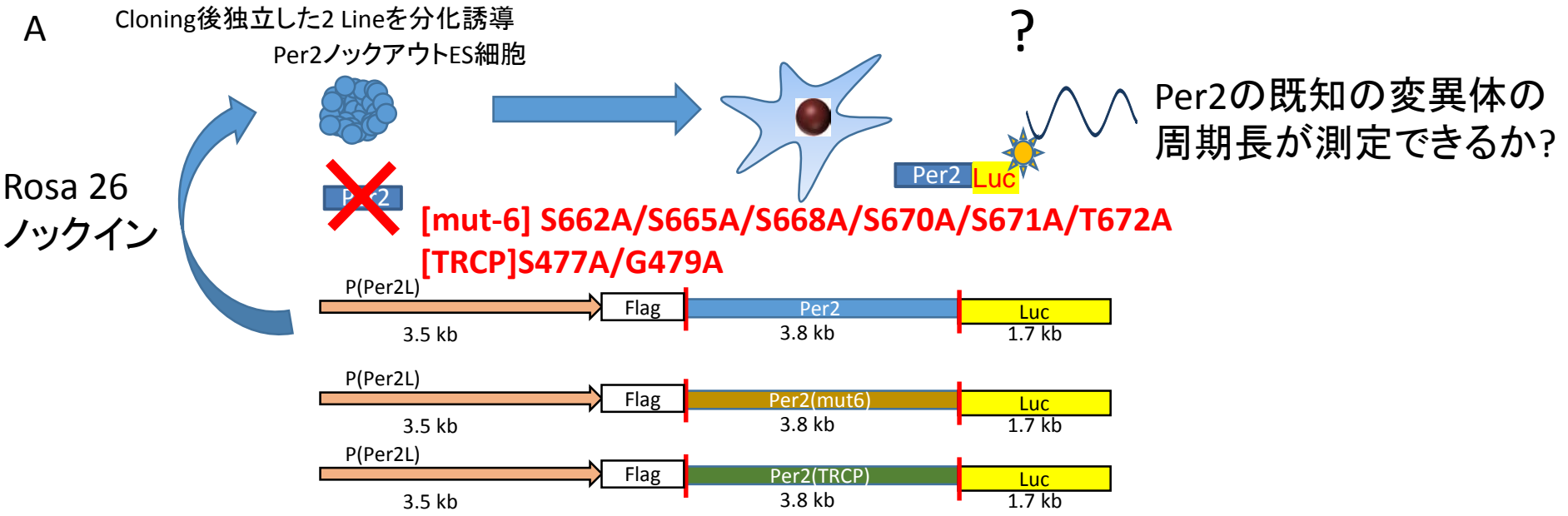
デトレンド波形

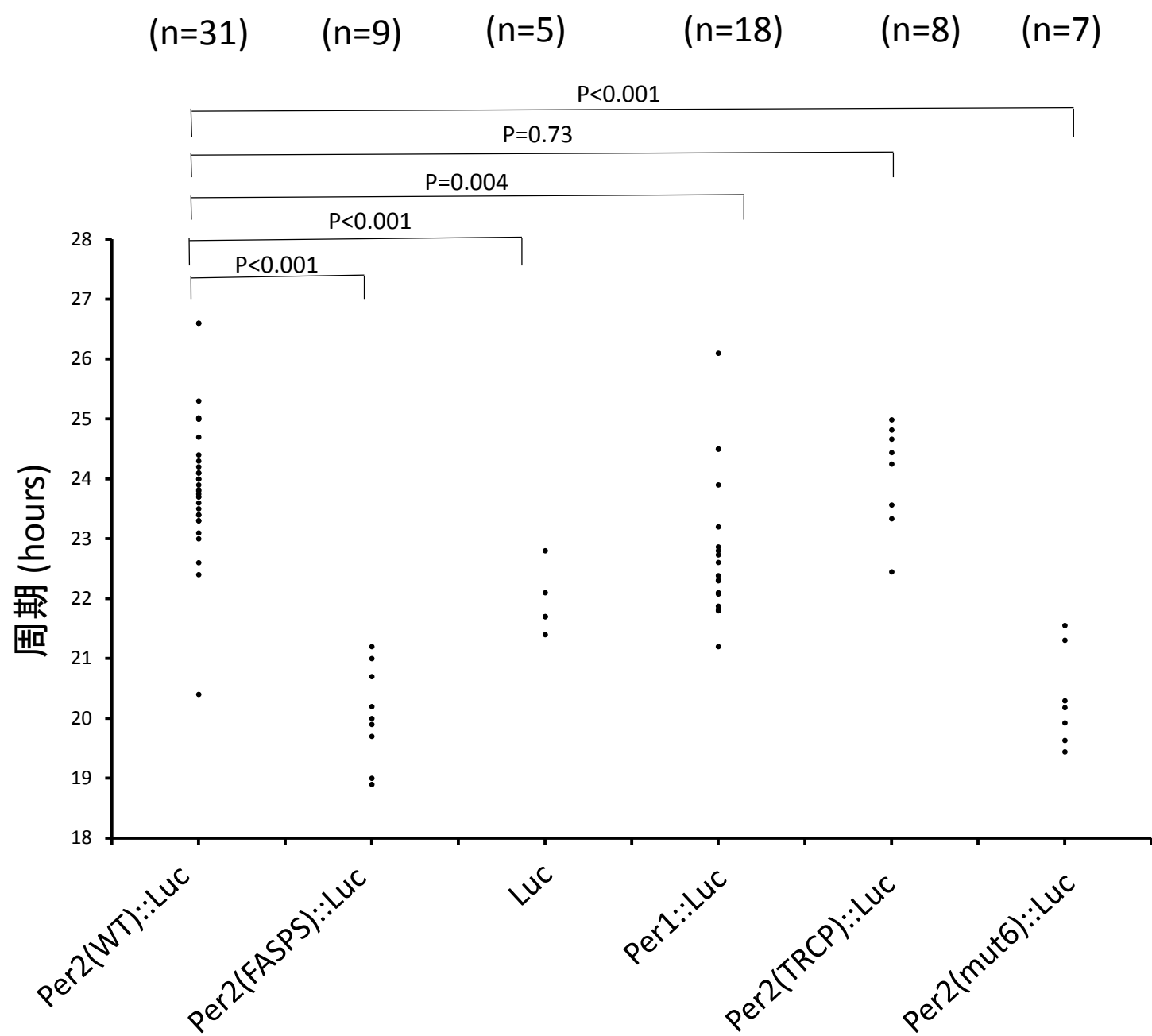


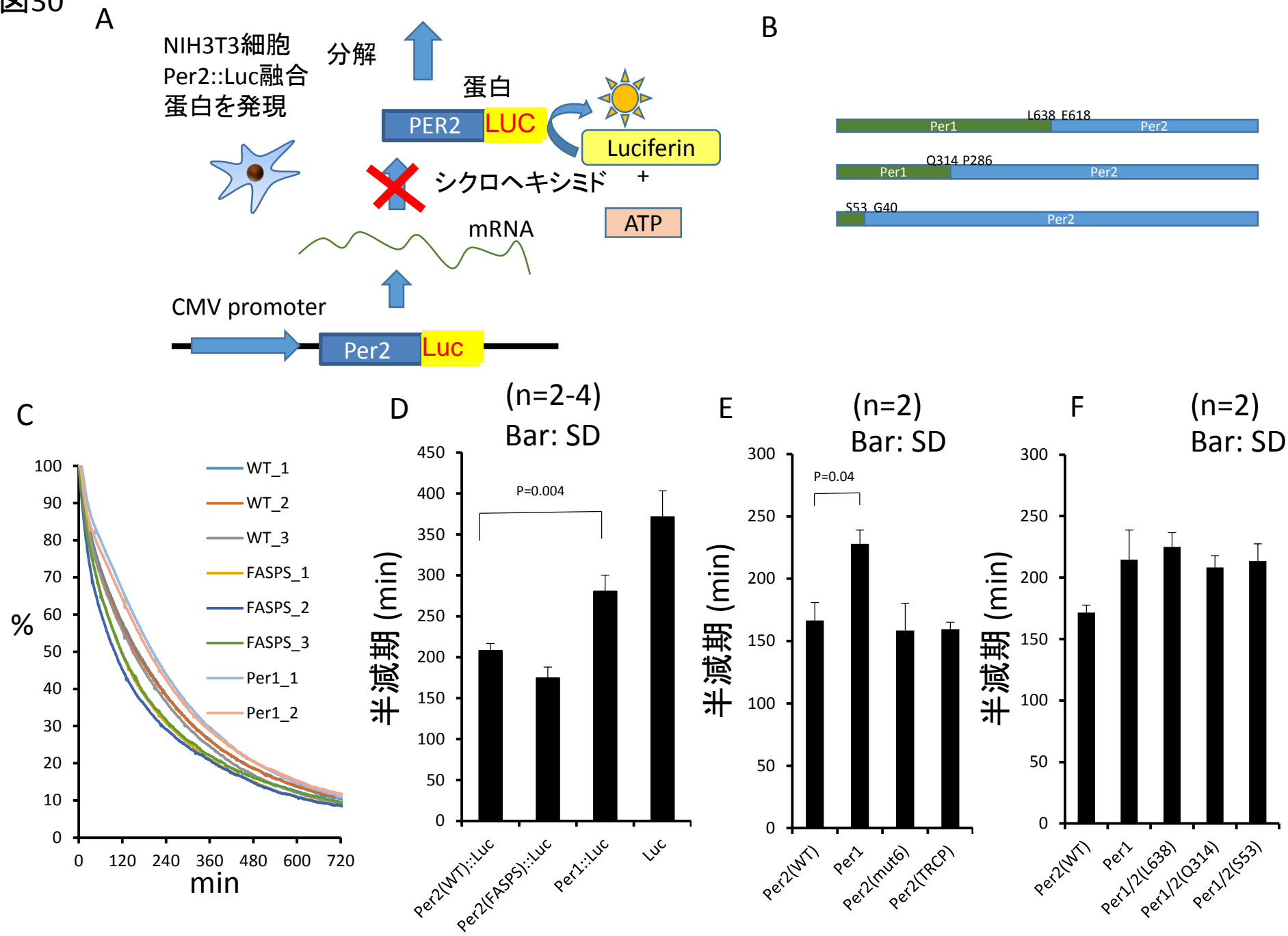
C

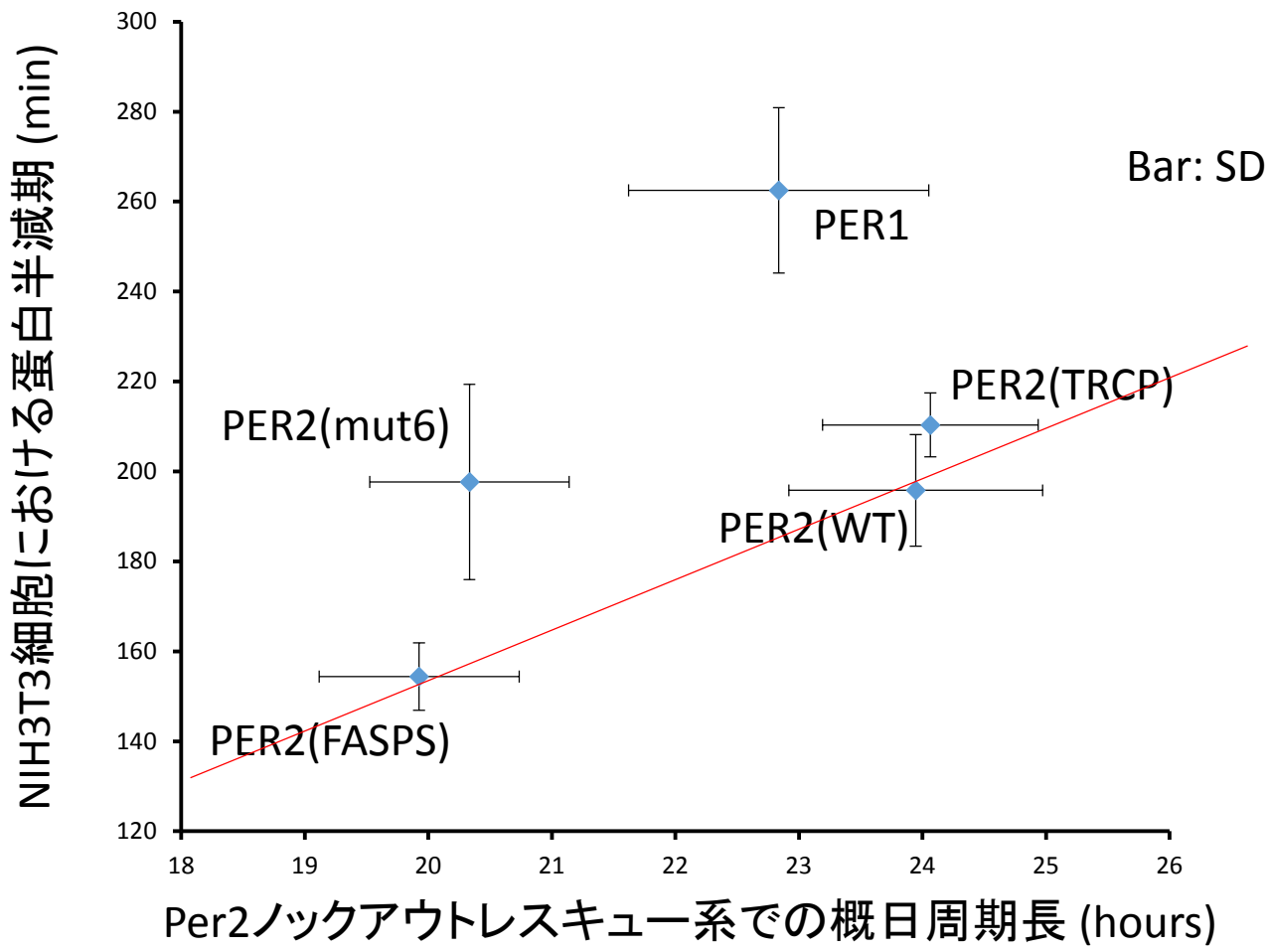
周期長



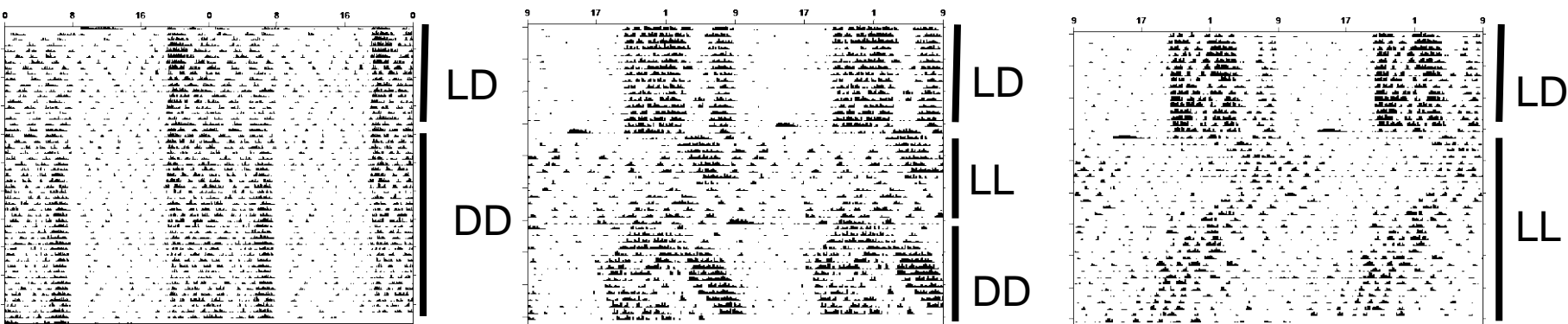






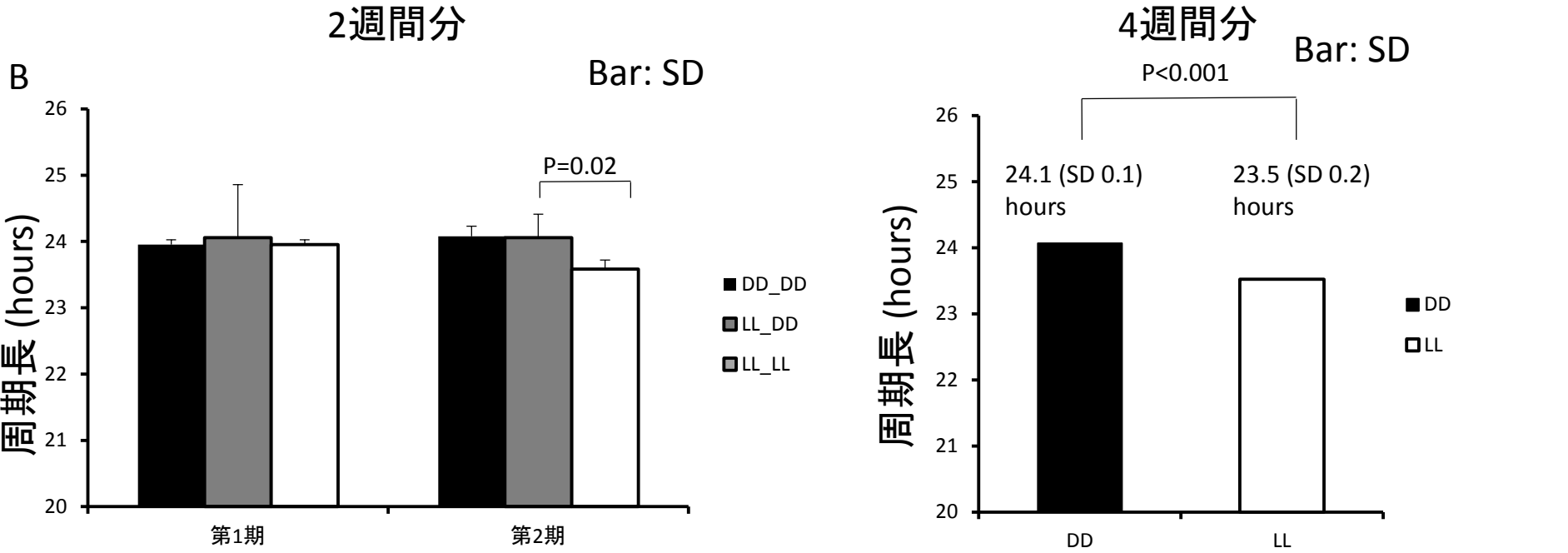


A

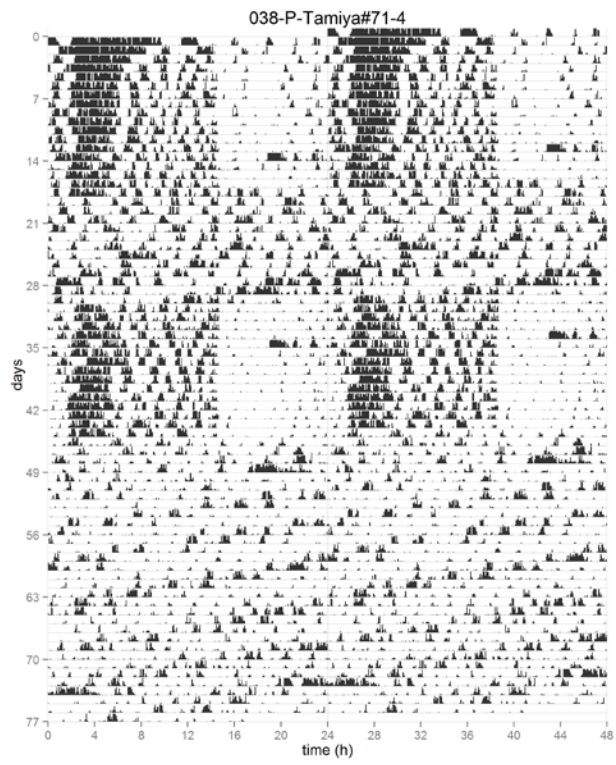


SCN Sliceの周期長
23.7 (SD 0.4) hours
SCN Sliceの周期長
24.4 (SD 0.5) hours
SCN Sliceの周期長
23.3 (SD 0.7) hours
各n=6, 代表的な1匹のActogramを表示

B

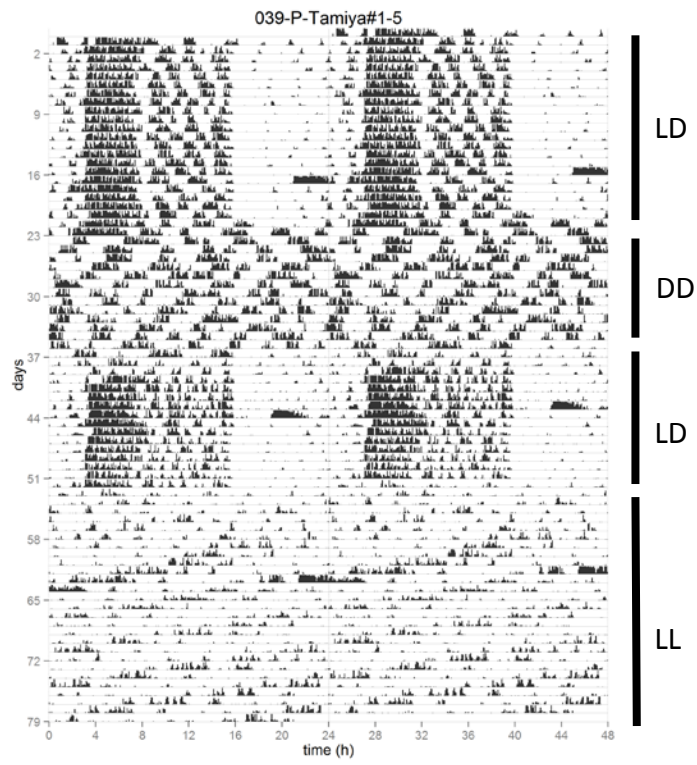


WT



DD振動判定率: 5/11匹
DD周期: 22.6 (SD 1.5) 時間
LL振動判定率: 7/11匹
LL周期: 18.5 (SD 0.7) 時間

FASPS



DD振動判定率: 0/11匹
DD周期: 計測不能
LL振動判定率: 6/11匹
LL周期: 19.0 (SD 0.9)時間

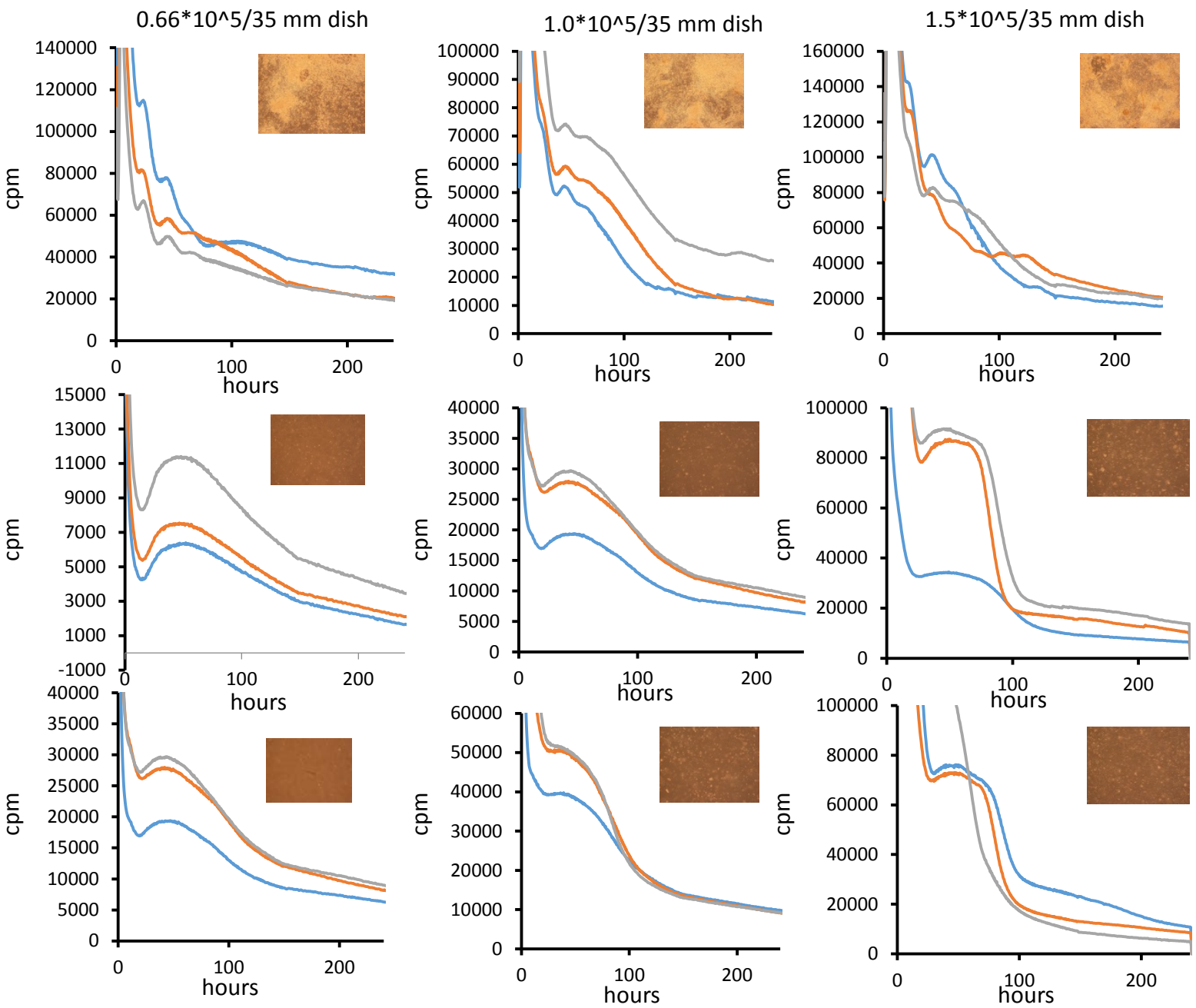
Per2::Luc ES
P+19

Rescued#23
P+4

Rescued#89
P+4

Day0の細胞数

N=3



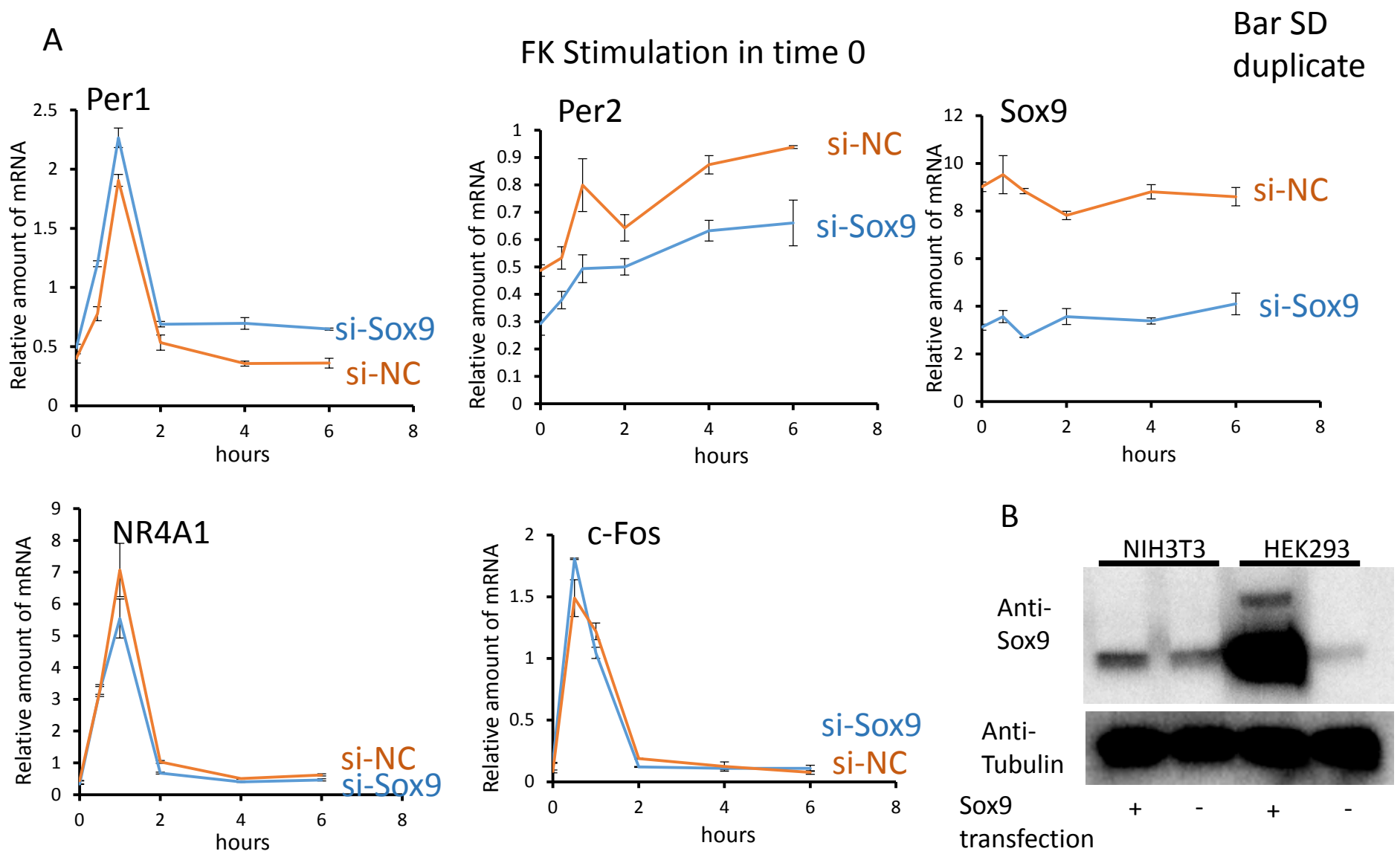
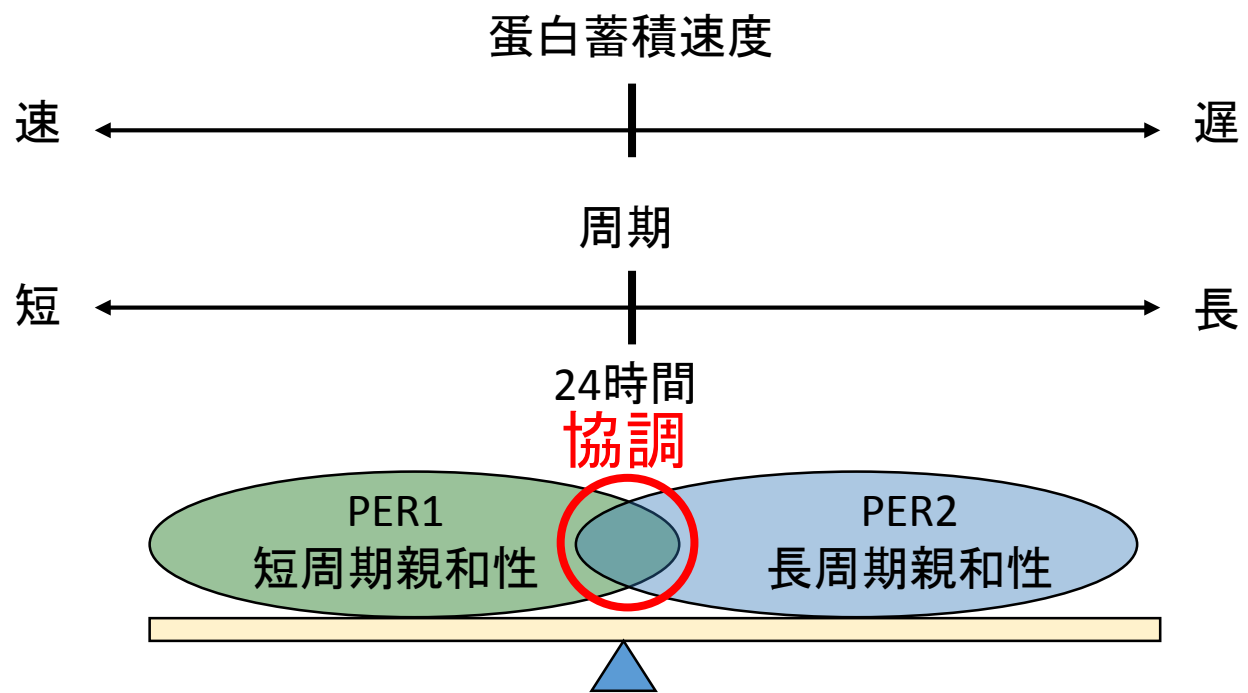


図36



生理的条件下 : 強固かつ頑健, 明瞭なリズム
非生理的条件下: 24時間から外れた概日振動を防ぐ⇒低柔軟性, 病的破綻

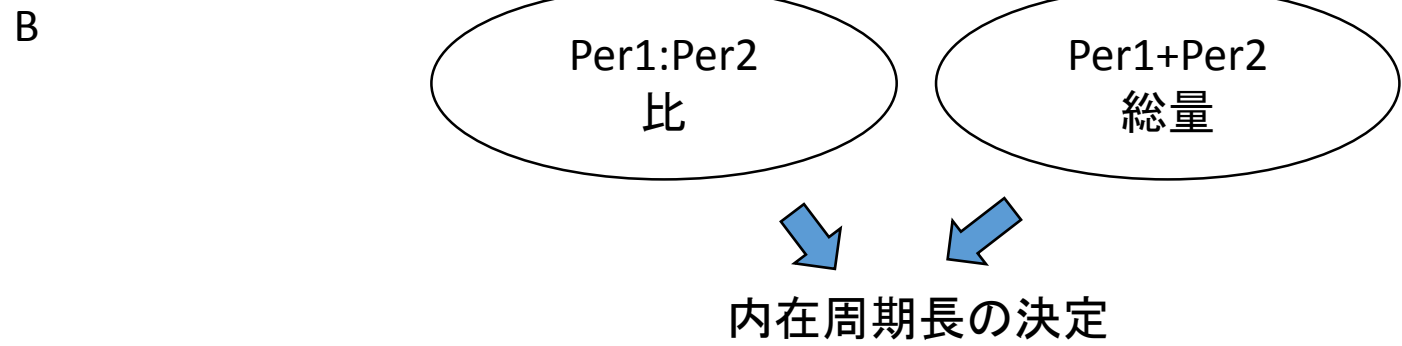
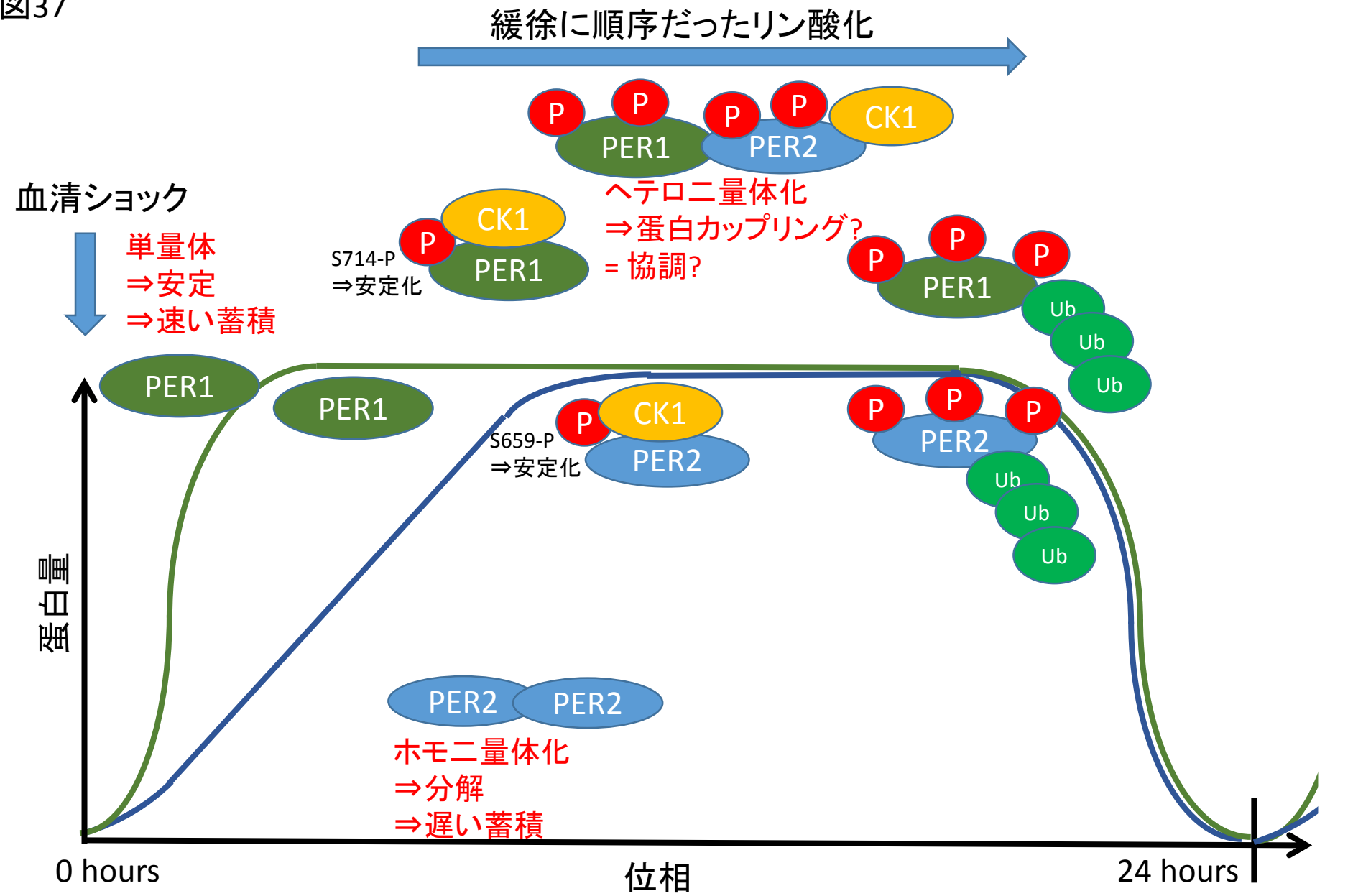
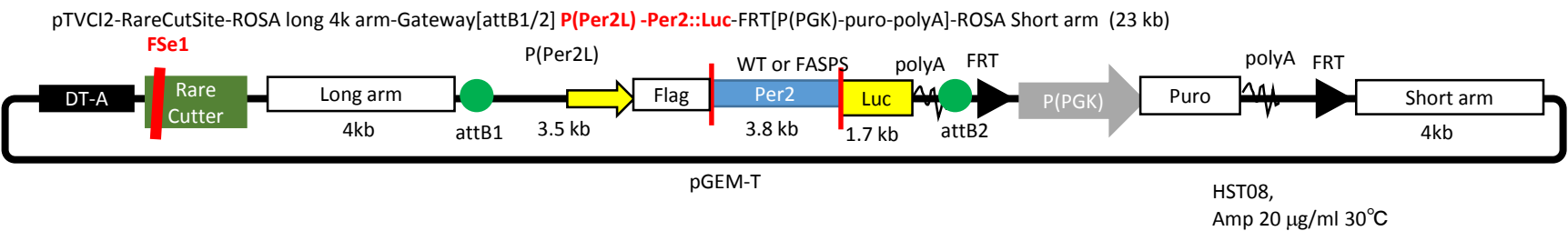


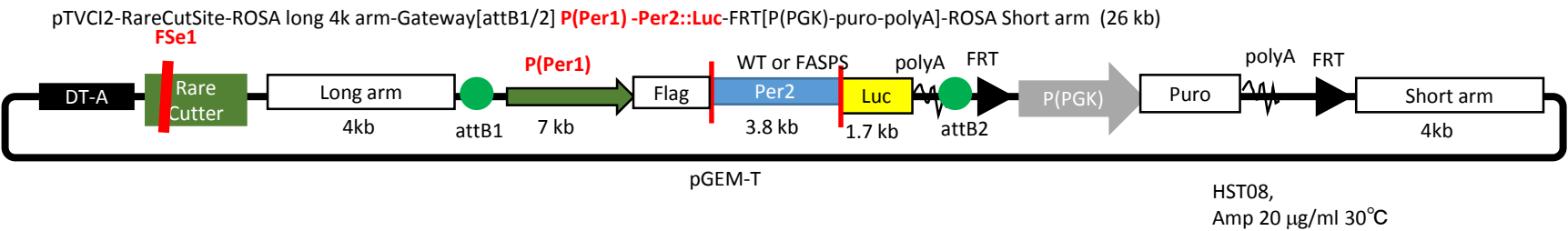
図37



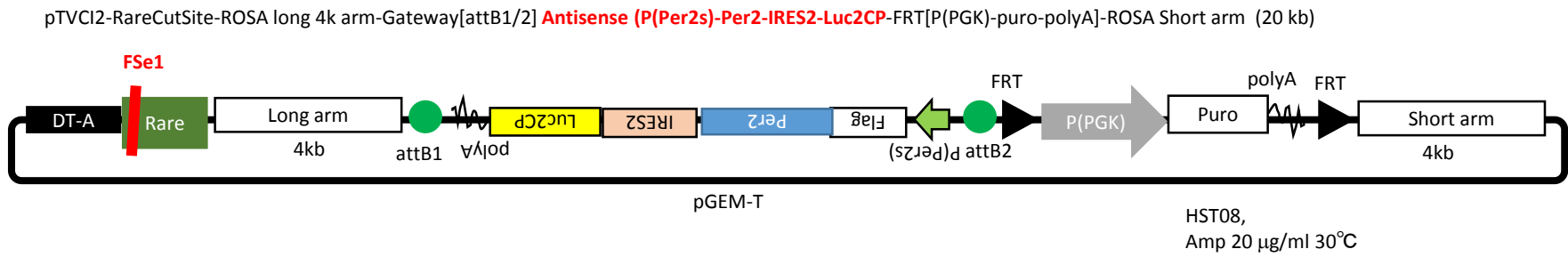
本論文で使用したベクター



現在評価中のベクター: Now targeting



改良ベクター: Now targeting



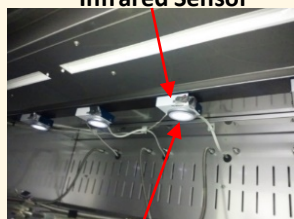
申請者はPer1とPer2の協調性を解析するための新しい実験系を構築した。

LED 光照度制御装置

Main unit

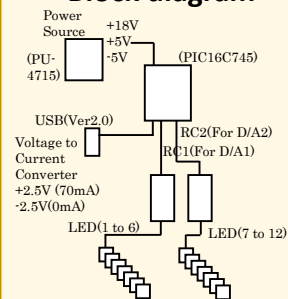


Infrared Sensor

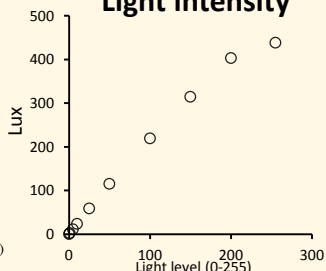


LED

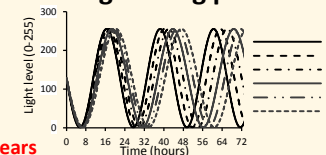
Block diagram



Light intensity



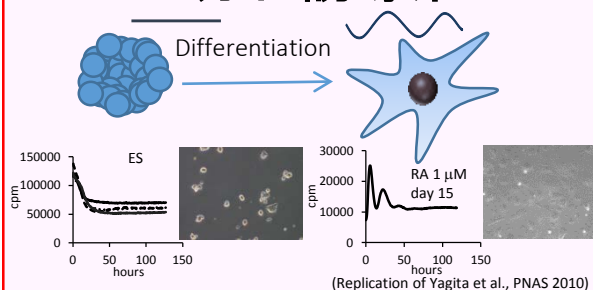
Lightening pattern



Light intensity: 256 levels
Time resolution: 1 min
Programmable time: Several years

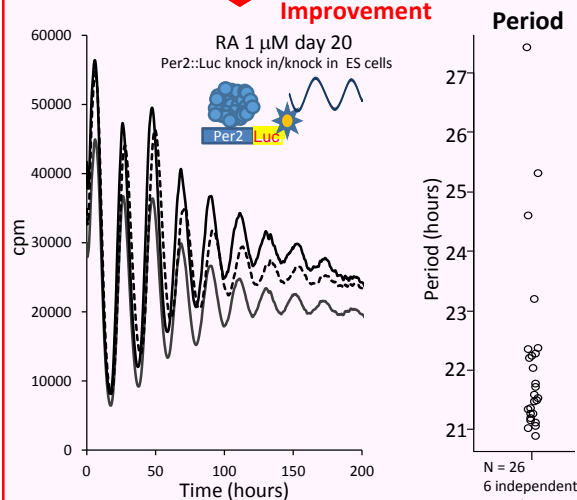
任意のパターンの光を照射した際の個体レベルの概日リズムが測定可能

ES分化誘導系



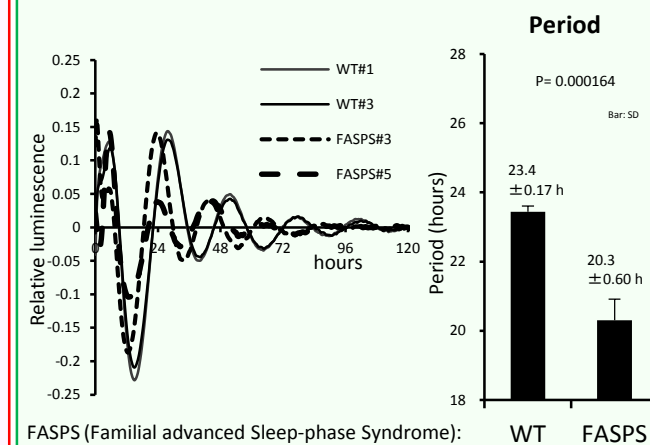
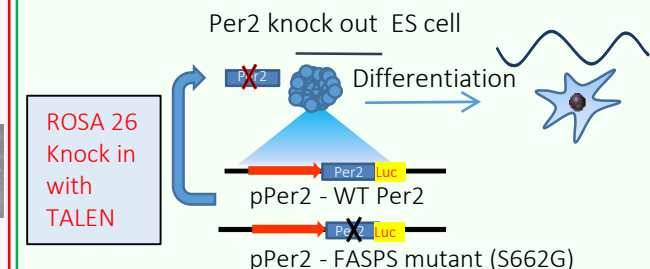
(Replication of Yagita et al., PNAS 2010)

Broad parameter Search Improvement



細胞レベルで正確に周期長を測定可能

Per2ノックアウトレスキュー系



FASPS (Familial advanced Sleep-phase Syndrome): Autosomal dominant disease caused by Per2 mutation. Short endogenous circadian period.

FASPS変異体の周期短縮を初めて細胞レベルで再現することに成功

Per1とPer2の協調性の重要性を個体レベルと細胞レベルで証明する事に成功