

# モデルマウスを用いた睡眠・覚醒リズム障害の遺伝要因の解析と疾患メカニズムの解明、気分障害モデルマウスの遺伝要因の解明

●海老原史樹文 ◆吉村崇

名古屋大学大学院生命農学研究所 応用分子生命科学専攻 バイオモデリング講座 動物行動統御学研究分野

## ＜研究の目的と進め方＞

我々は、これまでに周期が24時間より長くリズムsplittingを起こすCSマウス（野生型は周期が24時間より短い）、野生キャストネウスマウス集団から分離した無周期マウス、明暗周期下で明期に活動する昼行性マウス（野生型は夜行性）、さらに、既存系統の交配過程で偶然発見した8時間周期を示すマウスなどを見いだしてきた。平成13年度では、これらのマウスのうち、CSマウスと無周期マウスについて概日リズムの特性を明らかにすると共に、QTL解析により原因遺伝子をマッピングすることを目的とした。さらに、その後CSマウスが強制水泳試験や尾懸垂試験においても異常を示すことを見出した。これらの行動試験は、古くから抗うつ薬の評価法として利用され、無動時間の変化をもって薬効の評価をするが、CSマウスでは何れのテストにおいても無動時間が全く認められず、いわゆる「絶望状態」が形成されない。これらの結果をもとに平成16年度では、CSマウスの尾懸垂行動や強制水泳行動における異常を引き起こす原因遺伝子を解明することを目指した。

## ＜研究開始時の研究計画＞

平成13年度

- CS及び無周期マウスの脳波・リズム異常の原因遺伝子を同定する。
- CS及び無周期マウスのSCN単一細胞におけるリズム特性を明らかにする。
- 上記以外のリズム異常マウスについてリズム特性の把握とQTL解析を進める

平成16年度

- 強制水泳、尾懸垂テストにおけるCSマウスとC57BL/6Jマウスの表現型の把握
- マーカー遺伝子のタイピングとQTL遺伝解析
- 候補遺伝子の検索

## ＜研究期間の成果＞

平成13年度

CSマウス

- リズム異常と行動リズムとの関連を、概日時計である視交差上核における時計遺伝子の発現を中心に調べ、CSマウスのリズム異常は視交差上核に依存しないことを見出した（2, 7）。
  - 概日周期を対象としてQTL解析を行い、複数のQTLを検出した。このうち、特に第19染色体上の遺伝子が周期延長に強く関与していることを示した。さらに、その領域に存在する候補遺伝子の一つが概日時計である視交差上核に発現していることを見出し、その遺伝子のノックアウトマウスのリズムについて検討した（3, 8）。
  - 睡眠脳波を測定し、REM睡眠圧が高く、覚醒からREMへ直接ステージが頻繁に移行するナルコレプシー様の異常脳波を示すことを示した（6）。
- 野生マウス集団から分離した無周期マウス

- フィリピンで捕獲した野生キャストネウス・マウスから、恒暗条件下でリズムを消失する無周期マウスを発見した。リズム異常の原因遺伝子を明らかにする目的でQTL解析を行い、原因遺伝子をマッピングした。SMXAリコンビナント近交系マウス

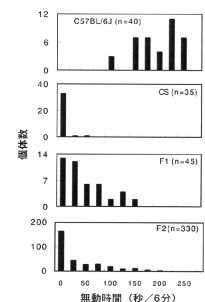
- 活動量が多く概日周期が短いSM系統と、活動量が少なく周期が長いA系統を起源とするSMXAリコンビナント近交系を用いて活動リズムのQTL解析を行った。その結果、フリーラン周期、活動開始時刻（位相相角）及び活動量において有意な相関を示す複数のQTLを検出した（1）。

概日光感受性低下マウス

- 単一光パルスによる位相変位量が有意に小さいマウスを見出し、QTL解析により概日光感受性に関与する遺伝子をマッピングした（5）。

平成16年度  
表現型の把握

- CS (n=35)とC57BL/6J (n=40)及びそのF1 (n=45)、F2 (n=330)について強制水泳、尾懸垂行動の表現型を把握した（図1）。



マーカー遺伝子のタイピングと遺伝解析

図1 尾懸垂テスト

- 各染色体最低3本のマーカー遺伝子を用いてselective genotypingを行い、高いスコアが得られた染色体についてさらに詳細なマッピングを行った。その結果、尾懸垂テスト及び強制水泳テストに共通して、ある染色体に強いロッド値（それぞれ9.5, 5.4）を持つQTLを見出した（図2）。

コンジェニックマウスの育成

- C57BL/6Jをバックグラウンドとして、マーカードライブで上記染色体領域の近辺を様々な長さで含むコンジェニックマウス9系統の育成を進め、7.2Mbの領域に原因遺伝子を追いつめた（図2）。

候補遺伝子の検索

- 上記領域に限定して、タイリングアレイ解析(NimbleGen社)により塩基配列の違いをコンジェニックマウスとC57BL/6Jマウスで比較している。

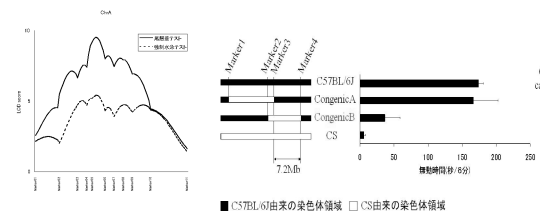


図2 尾懸垂テストのQTL解析とコンジェニック系統における染色体断片と表現型の関係  
その他時計遺伝子に関する研究（4, 9, 10）

#### 〈国内外での成果の位置づけ〉

従来の研究結果から、活動リズムは視交差上核のリズムを反映するものと考えられてきた。事実、視交差上核非依存的な活動リズムが生じるのは薬物投与により動物が非生理的状态におかれた時に限られている。一方、CSマウスでは通常の状態でも視交差上核非依存的な活動リズムが現れる。これまでこのような特徴を示す例は報告がない。従って、CSマウスは視交差上核から行動リズム発現に至るリズムの出力系を調べる上での貴重なモデルといえる。また、CSマウスは尾懸垂行動にも異常が認められることから、ヒトの気分障害に関する遺伝要因の解明に有用なモデル動物といえる。こうしたユニークな特徴を持つ動物は他にはなく、概日リズムや気分障害の分子機構解明に向けて新しい研究の方向性を与えたものと位置付けることができる。

#### 〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

当初、CSマウスと無周期マウスのリズム異常に関する遺伝子を同定する目標を立てたが、遺伝解析の結果いずれも複数のQTLにより制御されていることが分かり、遺伝子の同定までには今のところ至っていない。すなわち、コンジェニック系統で表現型が再現できないからである。しかし、尾懸垂行動や強制水泳行動についてはコンジェニック系統で表現型が維持できるため、遺伝子の同定が視野に入ってきた。

#### 〈今後の課題〉

最優先の課題は、尾懸垂行動に関わる遺伝子を同定することである。そのためには、定法通りコンジェニックマウス、サブコンジェニックマウスで候補領域を絞り込み、検討する候補遺伝子の数を減らす。その後、逆遺伝学により確認する。

#### 〈研究期間の全成果公表リスト〉

1. T.Suzuki, T.Yoshimura, A.Ishikawa, T.Namikawa, M.Nishimura, S.Ebihara. Mapping Quantitative trait loci for behavioural circadian rhythms in SMXA recombinant inbred strains. *Behav. Genet* 30:447-453, 2000
2. H.Abe, S.Honma, M.Namihira, S.Masubuchi, M.Ikeda, S.Ebihara, K.Honma. Clock gene expressions in the suprachiasmatic nucleus and other areas of the brain during rhythm splitting in CS mice. *Mol. Brain Res* 87:92-99, 2001
3. T.Suzuki, A.Ishikawa, T.Yoshimura, T.Namikawa, H.Abe, S.Honma, K.Honma, S.Ebihara. Quantitative trait locus analysis of abnormal circadian period in CS mice. *Mammalian Genome* 12:272-277, 2001
4. S-I. Yokota, K. Horikawa, M. Akiyama, T. Moriya, S. Ebihara, G. Komuro, T.Ohta, S.Shibata. Inhibitory action of brotizolam on circadian and light-induced Per1 and Per2 expression in the hamster suprachiasmatic nucleus. *Br. J. Pharmacol.* 131:1739-1747,2000.
5. T.Yoshimura, Y.Yokota, A.Ishikawa, S.Yasuo, N.Hayashi, T.Suzuki, N.Okabayashi, T.Namikawa, S.Ebihara. Mapping quantitative trait loci affecting circadian photosensitivity in retinally degenerate mice. *J. Biol. Rhythms.* 17:512-519,2002
6. S.Ebihara, S.Miyazaki, H. Sakamaki, T.Yoshimura. Sleep properties of CS mice with spontaneous rhythm

- splitting in constant darkness. *Brain Res.*980:121-127,2003
7. T.Watanabe, T.Yoshimura, DG. McMahon, S.Ebihara. Unimodal SCN rhythms in splitting mice. *Neurosci.Lett.*345:49-52,2003
  8. N.Hayashi, S.Yasuo, S.Ebihara, T.Yoshimura. Expression of IKK  $\alpha$  mRNA in the suprachiasmatic nucleus and circadian rhythms of mice lacking IKK  $\alpha$  . *Brain Res.*993:217-221,2003.
  9. T.J. Nakamura, K. Fujimura, S.Ebihara, K.Shinohara. Light response of the neuronal firing activity in the suprachiasmatic nucleus of mice. *Neurosci Lett.* 371:244-248,2004
  10. T.J.Nakamura, T.Moriya, S.Inoue, T.Shimazoe, S.Watanabe, S.Ebihara, K.Shinohara. Estrogen differentially regulates expressions of Per1 and Per2 genes between central and peripheral clocks, and between reproductive and non-reproductive tissues in female rats. *Journal of Neuroscience Research* (in press)
  11. T.Watanabe, M.Kojima, S.Tomida, T.J.Nakamura, T.Yamamura, N.Nakao, S.Yasuo, T.Yoshimura, S.Ebihara. Peripheral clock gene expression in CS mice with bimodal locomotor rhythms. *Neurosci Res.*(in press)