

令和 2 年度大阪大学未来基金「学部学生による自主研究奨励事業」研究成果報告書

ふりがな 氏 名	いわもとりょうたろう 岩本涼太郎	学部 学科	理学部 生物科学科	学年	3 年
ふりがな 共 同 研究者氏名		学部 学科		学年	年
					年
					年
アドバイザー教員 氏名	富永恵子	所属	生命機能研究科 (理学研究科兼任)		
研究課題名	マウス概日リズムの社会性因子による調節				
研究成果の概要	研究目的、研究計画、研究方法、研究経過、研究成果等について記述すること。必要に応じて用紙を追加してもよい。(先行する研究を引用する場合は、「阪大生のためのアカデミックライティング入門」に従い、盗作剽窃にならないように引用部分を明示し文末に参考文献リストをつけること。)				
(昨年度のオーナーセミナーからの引継ぎ実験のため、これも含めた概要となる。)					
<p>地球上のほとんどの生物は自身の持つ体内時計と呼ばれる仕組みによって約 24 時間の概日リズムを形成している。ヒトやマウスといった哺乳類では、最も主要な体内時計として SCN(視交叉上核)と呼ばれる脳の領域があり、これが自律的に振動する、つまりこの神経核で時計遺伝子と呼ばれる特定の遺伝子の発現が周期的に変化して神経伝達物質が分泌されることで概日リズムを作り出している。この体内時計による振動周期には個体差があり、24 時間よりわずかにずれているが、地球上においては日光による明暗により正確に 24 時間に合わせられるとされている。</p> <p>一方、ヒトなどの霊長類では、他者との相互作用(社会因子)もまた体内時計の位相に作用する同調因子の 1 つといわれ、その影響は光よりも強い可能性すらあるとされている。他方でげっ歯類においてはその詳細は分かっておらず、これまでのマウスを用いた実験では、この社会性因子が概日リズムに影響を及ぼすかどうかについて結果が分かっている。そこで今回自分は、ヒトと同様社会性のある、つまり集団で生活するマウスを実験動物として用い、こうした社会性因子が概日リズム位相に影響を与えるかどうかについて確かめることを考えた。</p> <p>我々の実験では概日リズムを示す生理現象として一般的な体温の経時変化(マウスは夜行性であり、主観的昼に体温低下を伴い睡眠をとり、主観的夜に体温上昇を伴って活動する)を測定して概日リズムの指標とするため、まずは安価な Maxim integrated 社の iButton という小さな(直径 1.5cm 程度の)記録可能な体温計をマウスの腹部に埋め込み、その体温を測定した。iButton は、測定間隔によって測定期間が異なり、測定間隔が 5 分毎なら約 1 週間、10 分毎なら 2 週間、15 分毎なら 3 週間分の体温測定が可能であり、その間の体温データを記録する。</p> <p>まず予備実験として 2019 年 12 月より、適した測定間隔を決定するために測定間隔 5 分、10 分、15 分の設定で iButton をそれぞれ 7 週齢のマウスに埋め込む手術を行い、体温の経時変化を測定した。この iButton によって得られたこれらのマウスの体温経時変化データを確認したところ、術後数日は体温データが乱れ、体温リズムの位相を決定できないことが分かったため、以後の本実験では、iButton の測定間隔を 15 分にし、出来るだけ長い測定期間を確保することにした。</p> <p>続く 2020 年 1 月より始めた第 1 の本実験では、まず近い概日リズム位相を持つマウス同士での社会的同調の有無、つまり他者(他個体)との相互作用(社会性因子)がその個体の持つ概日リズム位相に影響を与えるかどうかを観察するために、まず全 6 匹のマウスを LD (12 時間明期 12 時間暗期)条件下で 6 週間集団飼育して各個体の概日リズム位相を全てこの明暗周期にそろえた後、体温測定のために手術によって iButton をマウス腹部に埋め込み、これらのマウスを 3 つの実験条件(各 2 匹)に</p>					

分けた。グループ 1 は、2 匹のマウスが 3 週間、1 つのケージで同居する条件、グループ 2 は、前半の 10 日間は 2 匹で同居し、後半の 11 日間は独居する条件。グループ 3 は、前半の 10 日間は独居し、後半の 11 日間は 2 匹を同居させる条件である。この 21 日間では光による影響を除外するため、いずれの条件も恒常暗 (DD) 条件下で飼育した。

これにより 6 匹分の体温データを得たが、活動中でもある程度体温変化があることや、睡眠中の微小な体温変化も記録されていることから、同居によるリズム位相への影響をより明確に評価するために、リズム位相を決定する指標として体温の上昇相の“PS50”の点を用いた。本実験では、“PS50”を、体温に相当する波の高さ(測定温度が 35℃未満の時高さは 0、35℃以上の時は (測定温度-35℃) で高さが表される)が最大値の半分未満から半分以上となった時刻の中で、最大値側に最も近い時刻と定義した。

そしてそれぞれのマウスの体温リズムについて PS50 を求め、体温リズムの変化を解析したところ、3 週間同居させたグループ 1 では二匹の概日リズムが同調しているように見えた(図 1 上)。次に同居から個別飼育へと途中で変更したグループ 2 についても PS50 処理後のデータを見ると、同居時には同調していた概日リズム位相が、個別飼育となって以降ずれてきているように見えた(図 1 左)。さらにグループ 3 の 2 匹分のデータを見ると、やはり個別飼育ではある程度ずれが生じていた概日リズムが、同居になって以降同調し、ずれが小さくなっているように見えた(図 1 右)。

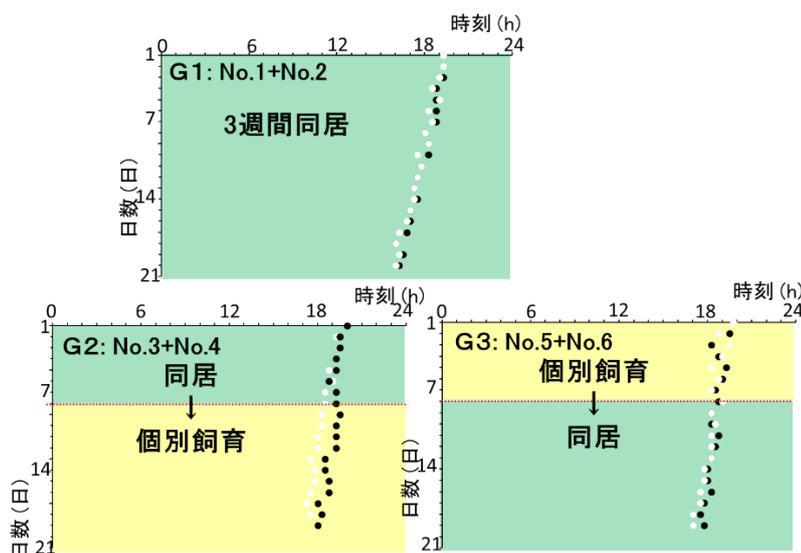


図 1 PS50 処理後の各グループのマウスの体温リズム
横軸が時刻、縦軸が経過日数、各 1 匹の体温上昇位相を 1 色で表した。ただし測定開始から数日分のデータはリズムを決定できない為除外。(上)グループ 1: 2 匹を 3 週間同居。(左)グループ 2: 最初の 10 日間同居、後半の 11 日間個別飼育(破線以降個別飼育)。(右)グループ 3: 最初の 10 日間個別飼育、後半 11 日間同居(破線以降同居)

これらの結果から、同居により差がおおよそ 1 時間程度までの概日リズム位相同士では同調する可能性が認められ、少なくともある程度近い概日リズム位相を持つマウス同士では社会性因子が正の同調因子となる可能性があるといえた。しかし野生型のマウスのもつ概日リズム周期は互いにかなり近い為、偶然に同調したように見えただけという可能性もあり、概日リズムの位相差が大きいマウス同士を同居させた場合でも社会的相互作用が同調因子として働くかどうか不明な点として残った。

そのため次に 2020 年 7 月より、各個体の初期概日リズム位相を 3 時間あるいは 8 時間ずらしたうえで恒常暗条件下で同居させ、概日リズムの位相差が大きいマウス同士を同居させた場合でも社会的相互作用が同調因子として働くかどうか確かめることで同調因子の働きを評価するという実験を行った。

詳しい実験系としては、まず 4 匹のマウスをある 12 時間明期 12 時間暗期の明暗周期の下で 2 週間飼育して概日リズム位相をその明暗周期に同調させる一方、他の 4 匹のマウスをこの明暗周期とは 8 時間ずれた(前進した)明暗周期の下で飼育してリズム位相をこれに同調させ、これらを 1 匹ずつ同じケージに移し、恒常暗条件にしてその位相の変化を 3 週間分確かめた。この際先の実験と同様に

体温計 iButton を手術によってマウスの腹部に導入し、その体温変化を概日リズム位相の指標として捉えた。(この際、各 2 匹のケージ四つは、便宜上それぞれペア 1~4 とし、先の 4 匹のマウスを+0h マウス、8 時間分位相を前進させたものを+8h マウスと呼ぶ) 次に、これと同様に 3 時間ずれの系についても実験を行った。(この際も各ケージをペア 5~8 とし、先のマウスを+0h マウス、3 時間分位相を前進させたものを+3h マウスと呼ぶ)

このようにして 8 ケージ 16 匹分の体温データが得られたが、先の実験同様それぞれのケージの 2 匹分のデータについてそのまま重ね合わせても位相の変化を理解しにくいいため、グラフの各ピークについて活動開始、つまり体温の上昇が起こる時期をやはり”PS50”の点として取っていくことでデータをさらに明確にした。

このようにして各ケージの 2 匹の体温データについて PS50 をとり、重ね合わせたもののうちペア 1-4、つまり 8 時間ずれの 4 ケージ 8 匹分のデータが以下の図 2-1 である(最初数日間のデータは体温リズムが明確でないため除外)。

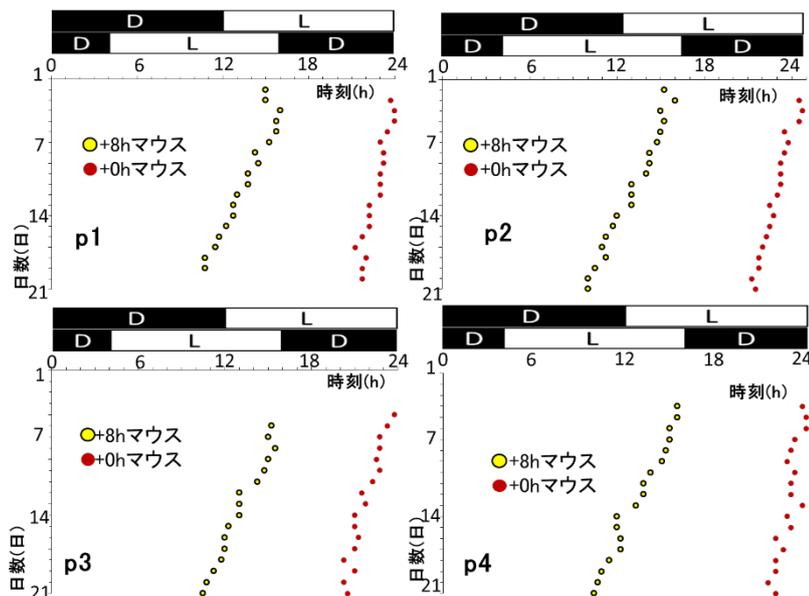


図 2-1 初期位相 8 時間ずれの系の実験結果

このデータを見るとペア 3 以外では位相のずれが増大しているように見え、ペア 3 もその位相差が縮まっているわけではないと分かった。そのため全般に位相のずれが増大しているといえる。

一方各ケージの 2 匹の体温データについて PS50 をとり、重ね合わせたペア 5-8、つまり 3 時間ずれ 4 ケージ 8 匹分のデータは以下ようになった(図 2-2)。

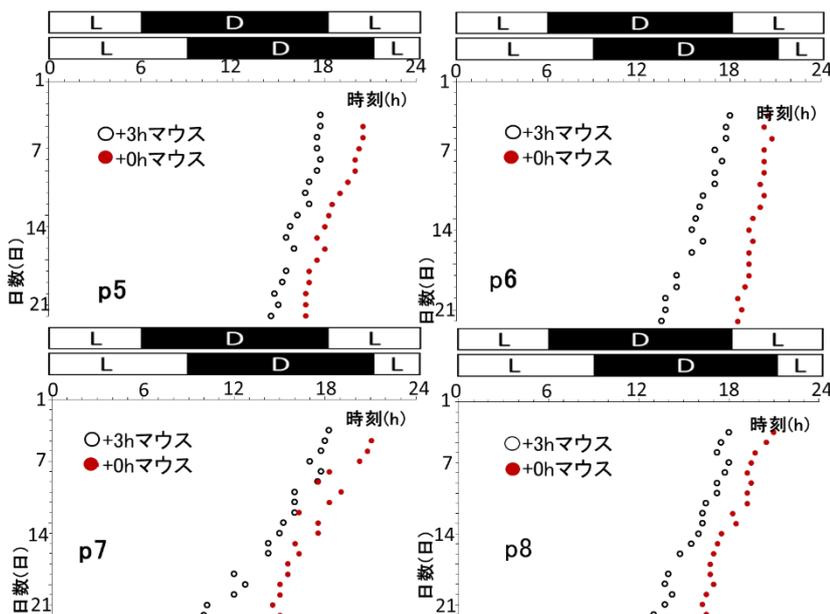


図 2-2 初期位相差 3 時間時間ずれの系の実験結果

これらのデータは、位相のずれが減少するものも増大するものも、あるいはほとんど変化しないものもあり、一般的な性質は見えなかった。

そのためこれら2つの実験結果から、げっ歯類においてリズムの位相差が3時間あるいは8時間と大きい時には、少なくとも社会性因子はリズム同調における正の同調因子としては働かないといえる。そしてさらには、1つめの実験により示された比較的近いリズム位相を持つマウス同士で社会性因子が概日リズム位相に対する正の同調因子として働くという可能性に対し、位相差が大きい場合には社会性因子が負の同調因子として働く可能性が考えられる。そこでこの可能性を調べるために、今セメスターに入ってさらなる実験を行った。

この実験ではまず、4匹のマウス a を明暗周期 α の下で2週間飼育して概日リズム位相をこれに同調させる一方、他の2匹のマウス b をこの明暗周期とは8時間前進した明暗周期 β の下で飼育してリズム位相をこちらに同調させた。その後これらのマウスを2つのグループ1と2に分けるが、グループ1は単純に明暗周期 α で飼育していたマウス a を明暗周期 β に移して更に2週間個別飼育したもので、グループ2は明暗周期 α で飼育していたマウス a を明暗周期 β で飼育していたマウス b と同居させて明暗周期 β の下で更に2週間飼育したものとなる。この過程によりマウス a は明暗周期 β にエントレインされるが、この間のグループ1とグループ2でのマウス a がどのように明暗周期 β に同調しているかを比較することで、マウス b の存在による影響を確かめることが出来る、つまり社会性因子の効果を見ることが出来る。勿論ここでも小型体温計の導入により体温の経時変化から各マウスの概日リズム位相を確認しているものの、先の実験までで用いていた iButton ではなく、nanotag というデバイスを用いており、これにより測定期間を2か月間に延長でき (iButton は最長3週間)、体温の測定間隔も5分に短縮されることに加え個体の活動データも同時に測定可能となった。ただし今回はあくまで今後のための試用であり、活動データについては考察に加えていない。

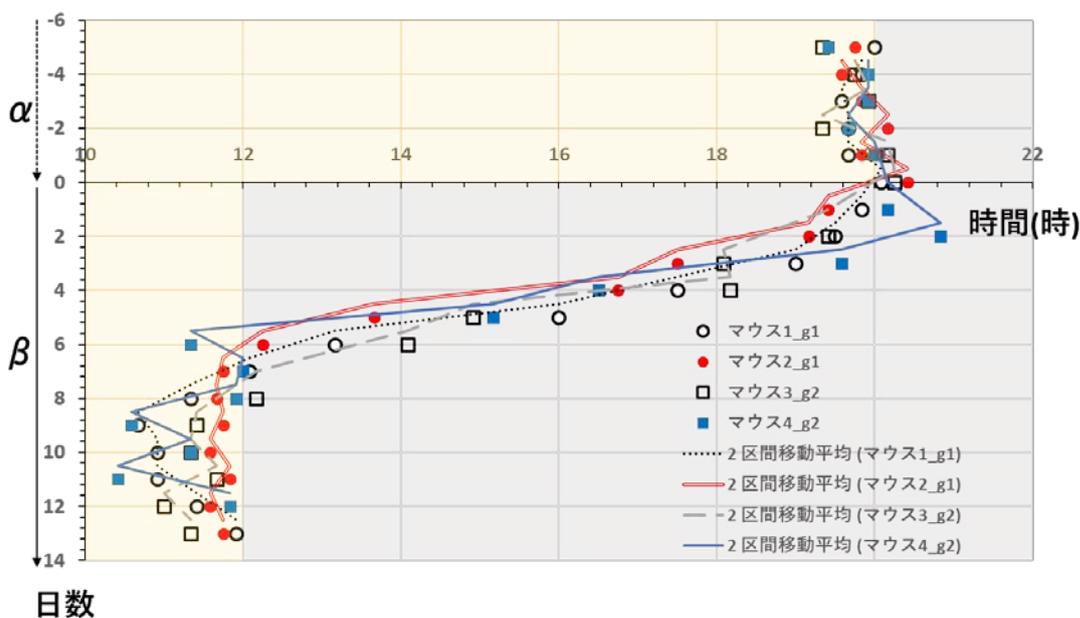


図3 各グループのマウス a における8時間分の光同調結果

そして全てのマウス a についてこれまでの実験同様に活動開始の時刻を PS50 の点として取った結果をプロットし、重ね合わせたものが図3となる。この図では縦軸の日数0が明暗周期を8時間前進させた日を表し、横軸は時刻を示しており、黒い網掛けをした部分が暗期、黄色の網掛けをした部分が明期を示している。この図の結果から、グループ1のマウス a とグループ2のマウス a では明暗周期を変化させたときに、新たな明暗周期に同調するまでにかかる日数やその過程にほとんど差が見られないことが分かる。

そのため、これはマウス b の同居の有無がマウス a の光同調に影響を及ぼさないということであり、8h の位相差がある場合、社会性因子は正の同調因子としても負の同調因子としても働いていないか、あるいは明暗への同調の力に比べはるかに弱い因子であると考えることが出来る。

全ての実験により得られた知見をまとめると、げっ歯類においては個体間の概日リズム位相差が1時間程度であれば、社会性因子は概日リズム位相差を減らすよう働くものの、位相差が比較的大きくなると社会性因子の働きはなくなるか明暗への同調の力に比べ極めて微弱であるということ、その社会性因子は、事実上個体間の概日リズム位相が比較的近い場合にのみ働く弱い正の因子であ

ると考えられる。

最後に今回の研究における課題としては、実験の客観性, 正確性が低いことが挙げられる。今回は費用や設備, 及び時間的な制限のために多数の実験動物を用いて研究を行うことが出来なかったが、行動実験では結果のばらつきが大きく、傾向を把握するためにはより多数の個体数を確保することが求められる。データ解析の段階についても、今回 PS50 という点を取って解析してはいるものの、最終的な判断は自身の目によるところが大きく、自己相関関数をとるなどして分布全体の客観的な評価を行うことが必要となる。