

## 小動物サーカディアンリズム 自動計測システム「AutoCircaS」

国際科学振興財団 時間生物学研究所  
特任研究員 鈴木 孝洋

### はじめに

私達の研究室では体内時計の研究をしているが、その研究には1週間や1ヵ月単位でモデル動物の行動を計測し続けることが多々ある。体内時計の研究で最も進んでいるのは約1日周期のリズムであるが、それ以外にも約1ヵ月や約1年周期のリズム等様々な周期の体内時計が研究されている。そういった体内時計の周期等を計測する方法は大きく分けて2通りある。1つはモデル動物の行動を計測し続け、周期的な行動を見出しその周期を計測する方法である。もう一つは遺伝子の発現リズムを計測する方法である。小動物サーカディアンリズム自動計測システム「AutoCircaS」は、前者のモデル動物の行動を数週間連続で計測し続けるための装置として産業技術総合研究所 バイオメディカル研究部門 石田時間生物特別研究チーム(当時)と株式会社タイセイ (<http://www.e-taisei.co.jp/>) とで共同開発された。私は当時産業技術総合研究所 バイオメディカル研究部門 石田時間生物特別研究チームの立場でAutoCircaSの開発に携わらせて頂いた。私は学部と修士は情報工学を学ばせて頂いており、プログラミングが得意である。博士で農学の分野に来て初めて動物実験をさせて頂いたが、それ以降実験のためのシ

ステムを独自で開発することもあった。そのシステムの1つを製品版として株式会社タイセイと共同開発させて頂くことになり、ソフトウェアの開発は私が担当させて頂いた。ここではその小動物サーカディアンリズム自動計測システム「AutoCircaS」を紹介させて頂く。

### 体内時計研究での行動自動計測システム

生物はその内部に時計を持っている、最初にこの報告をしたのはフランスの科学者Jean-Jacques d'Ortous de Mairanで、1729年のことであった。彼は植物のオジギソウの葉が約1日のリズムで特定のパターンで動くことを見出し、それが外部からの刺激をシャットアウトした状態でも再現される、つまり、内部に時計を持っていることを報告した。この時Jean-Jacques d'Ortous de Mairanがこの約1日のリズムをサーカディアンリズムと名付けた。サーカディアンリズム circadian rhythm はラテン語の「約」を意味する circa と「日」を意味する dies から作られた。この時の実験は人の目による観察で行われた様である。それから時は経ち、1971年、Dr. Seymour Benzer と Dr. Ronald J. Konopka によって、元々行動周期がサーカディアンリズムのショ

ウジョウバエの3種類の変異体が報告された<sup>(1)</sup>。1つは完全にリズムが無くなってしまいう変異体、もう一つは周期長が短くなる変異体、そして、周期長が長くなる変異体である。当時、遺伝子の実態解明が進み、生物は様々なことが遺伝子によって規定されていることが分かっていたが、まさか行動まで遺伝子に規定されているとは考えられていなかった時に、行動も遺伝子に、それもたった一つの遺伝子によって変えられてしまうことを示唆した見事な研究だった。この時のサーカディアンリズムの計測は、機械によって自動で行われた。ショウジョウバエの2種類のサーカディアンリズム、行動リズムと羽化リズムに着目し、それぞれを自動で計測できる装置を用意した。そうすることによって大量のショウジョウバエの中から周期に異常のある変異体を見つけ出す事が可能となったのだ。羽化リズムは Dr. Colin Pittendrigh によって、行動リズムは堀田凱樹博士によってそれぞれ開発された機械が使用された。特に、堀田凱樹博士が開発した赤外線を利用して、赤外線の前を横切った回数をカウントするショウジョウバエ自動行動計測方法はその後ショウジョウバエ行動計測のスタンダードとなった。ショウジョウバエの

この研究の成功を機に、ショウジョウバエ以外の様々な動物でも様々な計測機器が開発され、サーカディアンリズムが計測されてそのメカニズムの解明に貢献してきた。例えばマウスでは回転かごを回した時間を記録する機器がよく利用されている。様々な動物のサーカディアンリズムを計測することが可能となってきたが、今までの機器では不得意なことがあった。それは、同一空間に複数の動物がいる場合の行動計測である。今まではほとんどの計測機器が一つの計測系に1匹の動物が存在することが前提で、複数匹存在していることを想定していない。1匹だけでの行動リズムを計測するだけでも体内時計の分子機構の研究は大いに進んできたが、私達の研究室では複数匹同時に存在する場合に発生する社会性のリズム、雄が雌に求愛する求愛活動リズムに着目していたため、新しい計測システムを開発する必要があった。そこで、複数匹を同時に計測出来る様に画像認識による行動自動計測システムの開発が行われた。それを株式会社タイセーと共に製品用に共同開発させて頂いたものが「AutoCircaS」である。

### AutoCircaS の性能

AutoCircaSは温度を一定に保つインキュベータ、昼夜を再現するライト、暗闇でも撮影可能とするための赤外線ライト、撮影するための赤外線カメラ、画像の保存・解析を行うためのコンピュータでハードウェアは構成されている。インキュベータの中に計測したい小動物を入れ、それをカメ

ラによって24時間体制で撮影する。動画としてコンピュータに保存しているわけではなく、1秒に1回、もしくは10秒に1回撮影して画像として保存しているので1日分でも数百メガバイト程度の容量で済み、数か月の連続撮影も可能である。また、ライトを点灯させる時間帯、消灯させる時間帯も設定出来るので、昼夜の再現も出来る。AutoCircaSは撮影だけでなく、撮影した画像を解析する機能も搭載している。解析の基本は撮影された画像の中から対象とす

る小動物の位置を特定し、その座標を求めることである。

1匹で計測した場合、時間毎の移動距離を算出し、グラフ表示することが出来る。また、一度に一つのカメラで1匹しか計測出来ない訳ではなく、画像を複数区間に区切り、その区間内にいる小動物をそれぞれ別で解析することが出来るため、例えば縦4分割、横6分割に区切り、その位置に小動物をセットすれば24匹同時に1匹での行動を計測することが出来る。また、ショウジョウバエの場合、一定時間

AutoCircaS

Automated Circadian System  
小動物サーカディアンリズム自動計測システム

**慶応研** 石田時間生物研究チーム共同開発



**適用分野**

- 時計遺伝子等の基礎研究
- 農業分野 害虫の研究
- 薬学・医学の応用研究
- 新薬の開発



ショウジョウバエ求愛活動リズム

**基本機能：**

- ・小動物のサーカディアンリズムや睡眠リズムを自動計測
- ・小動物の♂♀の近接状態（求愛行動リズム）を自動計測

**特徴：**

- ・LED光による昼夜制御、IRカメラによる鮮明画像取得
- ・画像処理を用いた高精度自動位置検出システム

製造・販売

**株式会社 タイセー**

〒273-0104 千葉県鎌ヶ谷市東鎌ヶ谷3丁目23番地54号  
 TEL: 047-446-2221 FAX: 047-446-2131  
 URL: <http://www.e-taisei.co.jp/> E-mail: [taisei@green.ocn.ne.jp](mailto:taisei@green.ocn.ne.jp)  
 担当: 岩城

図1 AutoCircaSパンフレット

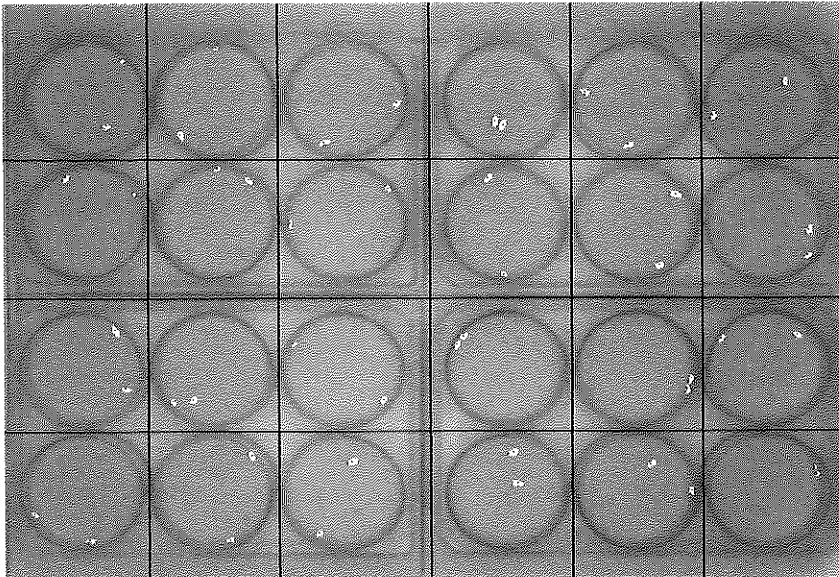


図2 AutoCircaSを用いたショウジョウバエ自動行動計測解析中画像一例

以上不動であったならばそれは睡眠中とみなすことが出来る<sup>(2,3)</sup>ので、ショウジョウバエの睡眠時間を求めることも出来る。

私達の研究では求愛活動リズムを計測するために、1つの区間に雄雌それぞれ1匹ずつ、計2匹入れる。そして、それぞれの座標を特定し、2匹の距離が設定された距離よりも近ければ求愛活動中、離れていれば求愛活動中ではないとみなし定義して解析する<sup>(4)</sup>。時間毎の求愛活動時間割合を算出し、グラフ表示することも出来る。

体内時計研究では良く使用されるカイ二乗検定を用いた周期長解析も行うことも出来る。これによって、撮影した小動物の行動周期が何時間であったかを解析することが出来る。

### 行動計測の活用

私達は動物と会話することが出来ない。よって、その動物の状態を知りたい場合、その動物の血液検査等生化学的な手法か、もしくは行動を計測する行動学的な手法によってその動物の状態を

推測する。両手法ともとてもよく使用される大事な手法である。

私達の研究室では医学的な目的でも実験動物を用いている。それは、病気のメカニズムを解明し、その病気の治療を可能とする方法を見つけ出すことである。同目的で実験動物を用いて研究を行っている研究グループは多々ある。そして、行動解析もよく行われている。例えばパーキンソン病の場合、症状が不随運動障害なので、それは歩行速度の低下となって現れる。また、睡眠障害もよく報告される症状の一つだが、これらの症状が再現されるパーキンソン病モデルショウジョウバエが2000年にDr. Mel Feanyらによって報告された<sup>(5)</sup>。報告された当時は行動障害としてショウジョウバエの這い上がり行動に異常が見られることが報告されたが、その後の研究によって、初期症状としてショウジョウバエ歩行速度の低下が報告された<sup>(6)</sup>。私達の研究室が行った実験ではそういった行動障害が見られる更に前の段階で睡眠障害が見ら

れた(伊藤薫平ら、投稿準備中)。これらは非常に興味深い結果で、なぜならばそれは $\alpha$ シヌクレインの毒性を示唆するものだからである。パーキンソン病の原因として脳内に $\alpha$ シヌクレインが異常蓄積してしまうことが挙げられている。これは解剖学的見地から明らかになってきたことだ。同様にアルツハイマー病ではアミロイド $\beta$ や $\tau$ 、筋萎縮性側索硬化症ではTDP43といった様に神経変性疾患ではその疾患と異常たんぱく質の蓄積がよく関連付けられる。しかし、ここには昔からの大きな問題提起があり、それは、その異常たんぱく質の蓄積はその疾患の原因なのか、結果なのかということである。原因であるならば、その異常たんぱく質を取り除くことが出来れば治療につながる可能性が高いが、結果であるならば異常たんぱく質を取り除いても治療につながる可能性は低い。パーキンソン病における $\alpha$ シヌクレインは原因である可能性が高いことを示した報告がDr. Mel Feanyらの報告だ。彼女らはショウジョウバエにヒトの $\alpha$ シヌクレイン遺伝子を導入した。元々ショウジョウバエには $\alpha$ シヌクレイン相同遺伝子はなく、従ってパーキンソン病も発症しないと考えられていたが、ヒトの $\alpha$ シヌクレインを導入したショウジョウバエではパーキンソン病と同様の運動障害を起こす事を報告した。つまり、 $\alpha$ シヌクレインが原因となってパーキンソン病を発症している可能性が高く、パーキンソン病治療の方向性の一つとして $\alpha$ シヌクレインに着目することが有望となった。

## おわりに

今まで治療することが出来なかった疾患を治療するためによく新薬の開発が行われるが、そこでは動物実験が大変貴重なデータを提供してくれる。可能な限りヒトに近い動物を用いる程その結果はヒトでも効果が期待出来るが、上記の様に一見ヒトとはかけ離れている様に見えるショウジョウバエでも貴重なデータを提供してくれる。実際私達の研究室でもショウジョウバエを用いたパーキンソン病やゴーシェ病の創薬のためのスクリーニングに取り掛かっている<sup>(7,8)</sup>。その場合も、やはり指標としては行動に着目する。近年ゼブラフィッシュ創薬研究会も開催され、小動物を

うまく活用した創薬への期待が高まっている。AutoCircaSもゼブラフィッシュやメダカの自動行動計測に利用されている。小動物の行動を計測する系を新たに導入したいと考えている方は、是非お問い合わせ頂けると幸いです (taise@green.ocn.ne.jp)。

最後に、本稿を執筆させて頂く機会を頂いたふくしま医療機器産業推進機構の大和田一雄先生に心より御礼申し上げたい。

## 引用文献

1. Konopka RJ, Benzer S. Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1971 Sep;68 (9): 2112-6.
2. Hendricks JC, Finn SM, Panckeri KA, Chavkin J, Williams JA, Sehgal A, Pack AI. Rest in *Drosophila* is a sleep-like state. *Neuron*. 2000 Jan;25 (1): 129-38.
3. Shaw PJ, Cirelli C, Greenspan RJ, Tononi G. Correlates of sleep and waking in *Drosophila melanogaster*. *Science*. 2000 Mar 10;287 (5459): 1834-7.
4. Hamasaka Y, Suzuki T, Hanai S, Ishida N. Evening circadian oscillator as the primary determinant of rhythmic motivation for *Drosophila* courtship behavior. *Genes Cells*. 2010 Dec;15 (12): 1240-8.
5. Feany MB, Bender WW. A *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Nature*. 2000 Mar 23;404 (6776): 394-8.
6. Chen AY, Wilburn P, Hao X, Tully T. Walking deficits and centrophobism in an  $\alpha$ -synuclein fly model of Parkinson's disease. *Genes Brain Behav*. 2014 Nov;13 (8): 812-20.
7. Suzuki T, Shimoda M, Ito K, Hanai S, Aizawa H, Kato T, Kawasaki K, Yamaguchi T, Ryoo HD, Goto-Inoue N, Setou M, Tsuji S, Ishida N. Expression of human Gaucher disease gene GBA generates neurodevelopmental defects and ER stress in *Drosophila* eye. *PLoS One*. 2013 Aug 28 (8): e69147.
8. 石田直理雄、川崎陽久、伊藤薫平 睡眠や認知症機能のツールとしてのショウジョウバエ 研究最前線 LABIO 21, JAN 12-15, 2014