

学位論文題名

The multiple oscillator system in the suprachiasmatic nucleus;
circadian rhythm outputs and intercellular communication.

(視交叉上核における多振動体機構；
概日リズム出力と細胞間コミュニケーション)

学位論文内容の要旨

[背景と目的]

In mammals, the circadian pacemaker is located in the suprachiasmatic nucleus (SCN) and consists of multiple oscillating neurons, which are relatively diverse in the circadian period and phase. The molecular mechanism of the circadian oscillation is an auto-regulatory transcription and translation feedback loop which seems to be stabilized by other feedback loops coupled to it. Tetrodotoxin (TTX), a Na⁺ channel blocker, was reported to abolish the circadian rhythms in behaviors but not to affect the circadian oscillation in the SCN. A mathematical model predicts that changes in the integrity of constituent circadian oscillations alter the functions of circadian pacemaker such as the endogenous period and responsiveness to external perturbation. To examine these possibilities, the synaptic communication in the cultured SCN was interrupted by TTX and the responsiveness of the SCN circadian rhythms to perturbation was measured together with the parameters of circadian rhythm.

[方法]

Experiment 1: Adult mice of C57BL/6J background were used. The coronal brain sections of 300 μm thick were made and cultured. TTX of 200 μM was applied at the peak of *Per1* expression rhythms, and 12 hours later, the cultured SCN slices were subjected to *in situ* hybridization at 4 hour intervals up to 32 hours. The circadian rhythms in the gene expression were examined in 13 genes.

Experiment 2: *Per1*-luciferase (*Per1*-luc) and *Bmal1*-luciferase (*Bmal1*-luc) transgenic mice of C57/6J background were used. Bioluminescence from the cultured SCN was measured continuously with a luminometers. The TTX of 200 μM was applied to the SCN culture at various phases of either *Per1*-luc or *Bmal1*-luc rhythms. Five days after the TTX application, TTX was washed-out.

[結果]

Experiment 1: TTX treatment suppressed the electrophysiological activity of the cultured SCN until TTX wash-out. The circadian rhythms in the expression of clock genes, *Per1&2*, *Bmal1*, *Cry1*, and of clock associated genes, *Dec1, 2*, *Rev-erb α, β*, *DBP*, and *AVP* were not affected by TTX treatment. On the other hand, TTX completely abolished the circadian rhythm in the *BDNF* mRNA level and substantially damped the

circadian rhythm in the *PK2*.

Experiment 2: Both *Per1*-luc and *Bmal1*-luc expressions in the SCN slice culture showed circadian rhythms under the TTX treatment. The amplitude of *Per1*-luc was damped on the 4th day of TTX application, and the periods of circadian expression in both gene types were significantly shortened. TTX application did not affect the phases of circadian rhythms, but the TTX wash-out shifted the circadian rhythm phase dependently.

[考察]

Experiment 1: Electrophysiological activity is not necessary for the expression of the circadian rhythms of clock and clock associated genes, but necessary for full expression of the circadian rhythms of *BDNF* and *PK2* in the SCN. A TTX sensitive circuit is involved in the expression of *BDNF* and *PK2* circadian rhythms in the mouse SCN.

Experiment 2: The integrity of oscillating neurons in the SCN is important for the responsiveness of circadian pacemaker to perturbation. The obtained phase-response curve indicates that the intracellular input-pathways to the circadian oscillations in *Per1* and *Bmal1* expressions are separable, and predicts internal desynchronization when an external perturbation hits the proper phase.

[結論]

These results suggest that the neural network is not necessary for the circadian oscillation in the SCN but necessary for the stability of oscillation and for physiological functions as a master clock.

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 吉 岡 充 弘
副 査 教 授 本 間 研 一
副 査 教 授 岩 永 敏 彦
副 査 教 授 渡 辺 雅 彦
副 査 教 授 近江谷 克 裕

学位論文題名

The multiple oscillator system in the suprachiasmatic nucleus; circadian rhythm outputs and intercellular communication.

(視交叉上核における多振動体機構；

概日リズム出力と細胞間コミュニケーション)

ほ乳類の生物時計は視床下部視交叉上核に存在し、1側に約1万個あるとされている神経細胞には約24時間周期で振動する概日振動機構が含まれる。概日リズムは *Per*, *Cry*, *Bmal*, *Clock* の4個の遺伝子とその産物からなるオートフィードバックループにより発振されていると考えられており、さらにこのループに共役し、リズム発振の安定性に関与するとされている関連ループがあり、*Dec*, *RevErb α* , *ROR α* などの遺伝子が関与している。ここで発振された概日リズムは、転写因子 BMAL/CLOCK の概日リズムに変換され、細胞内の各種機能分子や膜電位などに概日リズムを伝達していると考えられる。さらに、視交叉上核の概日リズムは AVP, PK2, BDNF, TGF α などの機能分子を介して内分泌系や行動にリズムを発現させている。本研究は、視交叉上核における概日リズム発振やリズム信号の伝搬に細胞間コミュニケーション、特に Na⁺チャネルを介したシナプス連絡が果たす役割を明らかにする目的で、マウス培養視交叉上核に Na⁺チャネル阻害剤であるテトロドトキシン(TTX)を投与し、in situ hybridization法あるいは生物発光レポーター法を用いて概日リズムを解析した。その結果、Na⁺チャネルを介したシナプス連絡は中核ループや関連ループによる概日リズムの発振には関与していないが、出力系と考えられている PK2 や BDNF を介して行動リズムの発現に関与しており、また、外乱に対する視交叉上核概日リズムの安定性維持に重要な役割をもつことが明らかとなった。

学位論文の審査は、主査の吉岡教授、副査の本間教授、岩永教授、渡辺教授、近江谷教授の5名より、非公開審査として研究科教授室で行われた。主査から紹介があった後、申請者はスライドを用いて約30分間にわたり、学位論文の内容を発表した。その後、主査、副査と申請者による質疑応答が約30分間にわたって行われた。渡辺教授からは、TTX除去後も視交叉上核電気活動リズムがしばらく抑制された理由、TTX投与により *BDNF* 遺伝子発現が抑制された機序、培養液交換が刺激となる機序、視交叉上核における概日リズム発振におけるシナプス連絡の役割などについて質問があった。申

請者は、TTX 除去後にも電気活動抑制が持続した原因として、TTX 除去が不完であった可能性と TTX の毒性による神経細胞の活性低下の可能性をあげ、*BDNF* 遺伝子発現が抑制された機序に関しては、non-NMDA 受容体遮断薬を用いた先行研究を引用し、CREB のリン酸化を介した遺伝子発現が関与している可能性をあげ、また、培養液交換が刺激となる機序については不明であるが、含まれるグルコースが関与している可能性を指摘し、さらに、視交叉上核シナプス連絡の役割に関しては、行動リズムの発現に重要であることを回答した。近江谷教授からは、*TGF α* 遺伝子産物レベルにおける概日リズムの有無、視交叉上核以外における *BDNF* 遺伝子発現リズムの有無、また E ボックスの機能などについて質問があった。申請者は、*TGF α* 遺伝子産物レベルにおける概日リズムの有無に関しては質問の意味を正確に把握しなかった。また、視交叉上核以外における *BDNF* 遺伝子発現リズムに知り得た範囲内で報告はないと回答し、*BDNF* 遺伝子プロモータ上の E ボックスは今回の実験結果から機能していない可能性を示唆した。岩永教授からは、遺伝子改変動物の作成について、PK2 および *BDNF* 遺伝子と行動リズムとの関係について質問があった。申請者は、遺伝子改変動物作成にあたって、遺伝子導入ベクターは産業技術総合研究所の中島博士や三菱化学研究所の程博士から提供されたものを用い、遺伝子改変動物は外注にて作成し、動物維持は時間生理学分野でおこなっていること、また、PK2 および *BDNF* は視交叉上核から分泌されて、行動発現機構へリズム信号を伝達している可能性があること述べた。吉岡教授からは、膜電子リズムの消失と *BDNF* 遺伝子発現リズムの消失との関係に関連して Ca イオンの関与の可能性、また TTX 作用と Na チャネルの完成度に関する質問があった。申請者は、先行研究の例を挙げて、TTX 投与は電気活動リズムを抑制するが神経細胞内の Ca イオンリズムは存続することから、Ca イオンは関与していない可能性を回答し、また今回電気活動測定用いた視交叉上核は新生マウスから得たもので、成獣に比較し視交叉上核のシナプス連絡が未成熟であることが知られていると述べた。また、審査員から学位申請論文の記述上の誤りや説明不足など 3 カ所が指摘され、後日訂正した学位申請論文の提出を求められた。

本研究は、マウス視交叉上核概日リズム振動の発振と伝搬におけるシナプス連絡の役割を明らかにしたことで高く評価され、今後、ヒトのリズム障害や睡眠障害など概日振動体が関与する疾患の病態生理の解明や治療法の確立に導く基礎的研究として期待される。審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。