

## 学位論文題名

Roles of CRYPTOCHROME in the circadian organization  
of the central clock in the suprachiasmatic nucleus(視交叉上核概日リズム発振における時計遺伝子 *Cryptochrome* の役割)

## 学位論文内容の要旨

哺乳類における概日時計の中核は視床下部視交叉上核 (SCN) に存在する。SCN には片側約 1 万の神経細胞が存在し、個々の神経細胞の遺伝子発現、神経発火、ペプチド合成などに約 24 時間のリズムが見られる。細胞内概日リズム発振は、複数の時計遺伝子の転写・翻訳とタンパク産物による転写抑制のネガティブフィードバックループによると考えられる。時計遺伝子 *Cryptochrome* (*Cry*) は、ループ内の抑制因子としてリズム発振に必須であり、*Cry1*、*Cry2* の両方を欠損したマウス(*Cry1<sup>-/-</sup>/Cry2<sup>-/-</sup>*) は恒常暗条件では行動リズムが直ちに消失するため、無周期変異であると考えられてきた。しかし、*Cry1<sup>-/-</sup>/Cry2<sup>-/-</sup>* マウスの明暗下の自発行動リズムは光によるマスキングでは説明不能であり、周期的制限給餌への同調やメタンフェタミン投与下の行動リズム出現も概日周期の振動体の存在を示唆している。そこで本研究では、(1) 個々の SCN の細胞に概日リズムが存在する、(2) 個々の SCN の細胞リズムは恒常条件下で脱同調する、(3) 個々の SCN の細胞は外界の明暗サイクルの同調する、という三つの仮説を立て検証した。

実験には時計遺伝子 *Per1* プロモータ支配下にルシフェラーゼを発現する *Per1-luc* マウス、*PER2* とルシフェラーゼの融合タンパクを発現する *PER2::LUC* ノックインマウスを用い、個々の SCN 細胞における発光リズムと多電極ディッシュ法による神経活動リズムを計測した。明暗サイクル下の成獣 *Cry1<sup>-/-</sup>/Cry2<sup>-/-</sup>* マウスから SCN スライスを作成し、CCD カメラにて細胞レベルの発光リズムを測定したところ、概日周期の細胞リズムが *Per1-luc* で 93 %、*PER2::LUC* で 95% に認められた。しかし、培養 1 日目のリズム位相は 24 時間に広く分散していた。周期は約 24 時間周期の対照群と比較して、14~36 時間と有意に広い分布を示し、細胞リズムの脱同調が確認できた。一方、新生児マウスのスライス SCN からの個々の神経活動にはスライス内で同調したリズムが認められたが周期の急激な変化も確認された。

*Per1-luc*、*PER2::LUC* リズムと神経活動リズムの相違はマウスの年齢に依存する可能性が示唆されるため、生後 1、7、14、21 日と 8 週以上で *Per1-luc*、*PER2::LUC* の SCN スライスを作成し、組織レベルでのリズムを光電子倍增管により計測した。その結果、*Cry1<sup>-/-</sup>/Cry2<sup>-/-</sup>* マウスでは *Per1-luc* は生後 1、7 日ではわずかなリズム変動を認めたが 14 日以降リズムは消失した。一方 *PER2::LUC* では生後 1、7 日で野生型と同程度のリズムが認められたが、14 日では徐々に消失し、21 日以降消失した。これらの事実は、SCN における概日時計システムは離乳までの間に大きく変化し、*CRY* が成獣型概日時計形成に必須の分子であることを示す。

さらに新生児マウス SCN から神経発火リズムと *Per1-luc*、または *PER2::LUC* の同時測定を行い両者の違いを直接比較したところ、対照群でもリズム位相の分散は、*Per1-luc* リズムで最も広く、*PER2::LUC* リズム位相は最もよく同期し、神経活動がその中間にあることが分かった。この結果

は、*Per1-luc*、*PER2::LUC*、神経活動リズムには異なる細胞間ネットワークが存在する事を示唆する。次に、SCN 細胞を分散培養し、細胞間コミュニケーションが非常に弱い条件下での個々の SCN にリズムを測定した。その結果、*Per1-luc*、*PER2::LUC*、神経発火ともに個々の細胞にリズムが認められた。対照群ではスライス培養に比較して周期の分散が有意に拡大し、異なるリズム周期をもつ細胞が組織内で同期していることを確認したが、*Cry1<sup>-/-</sup>/Cry2<sup>-/-</sup>*の周期分散は、成獣スライス培養での細胞周期分散とほぼ同様であり、SCN 組織内にあっても分散細胞と同程度にリズムが脱同調していることが示された。また、*Cry1<sup>-/-</sup>/Cry2<sup>-/-</sup>*マウスを出生直後から離乳 24 日まで恒常明の下で飼育した後に恒常暗に移すと、自発行動に概日リズムが認められ、環境の恒常明が CRY タンパク欠損を代償する機能をもつことが明らかとなった。

本研究では CRY1/CRY2 は概日リズム振動には必要でない事、しかし成獣における細胞間リズム同期に必須である事、そして新生児におけるリズム同期には CRY に依存しないメカニズムが存在するが、発達期の環境照明が CRY1/CRY2 の役割を代償する機能をもつ事が明らかとなった。

# 学位論文審査の要旨

主査	教授	渡邊	雅彦
副査	教授	本間	さと
副査	教授	吉岡	充弘
副査	教授	三輪	聡一

学位論文題名

## Roles of CRYPTOCHROME in the circadian organization of the central clock in the suprachiasmatic nucleus

(視交叉上核概日リズム発振における時計遺伝子 *Cryptochrome* の役割)

本研究は、ルシフェラーゼレポーターを導入した *Cry1<sup>-/-</sup>/Cry2<sup>-/-</sup>* マウスの培養視交叉上核を用い、時計遺伝子 *Per1* 発現、PER2 タンパクの変動を発光イメージングにて、また自発発火を多電極ディッシュ法にて測定することにより、これまでリズム発振に必須であると考えられてきた CRY1/CRY2 が細胞、組織、個体における概日リズム発振のどの段階で、どの時期に作用しているかを検討した。その結果、*Cry1<sup>-/-</sup>/Cry2<sup>-/-</sup>* 成獣マウスの視交叉上核スライスでは、個々の細胞の時計遺伝子発現に概日リズムが存在するが脱同調しており、その周期も対照群に比較して広く分布すること、新生児の PER2 および神経発火リズムには同期した明瞭なリズムが存在し、生後3週頃に同調が消失することが分かった。さらに、出生初期の恒常照明が CRY の機能を代償することも明らかにした。本研究の結果、細胞内リズム発振に CRY は不要であるが細胞間リズム同期に必須であること、新生児期には CRY に依存しないリズム同期メカニズムが存在し、CRY は視交叉上核中枢時計の生後発達に伴う時計機構の形成に必須の因子であることを明らかにし、従来のフィードバックループ仮説によらないリズム発振を示しただけでなく、環境因子による遺伝子欠損機能の代償の存在も明らかにした。

審査会においては、副査の三輪教授よりルシフェラーゼレポーターが内因性細胞機能を正しく反映していると言えるかどうかについての質問があり、申請者は合成速度および半減期の差は得られる発光の波形に影響するが周期には影響しないと回答をした。また、PER1, PER2, CRY はどのような種類のタンパクであるか、その下流のメカニズムは何かとの質問があり、申請者は、いずれも転写調節因子であり、現在は転写・翻訳のフィードバックループの下流のメカニズムは、未だ不明の点が多いが、E-box を上流にもつ遺伝子の転写に概日リズムを生じること、また、細胞

質内カルシウムイオン濃度や cAMP 濃度が概日リズムを示すことから、このような細胞質内の変化が神経発火リズムのような出力に関わる可能性がある」と回答した。さらに、論文の Discussion で述べられたドパミンや VIP の発生、成長における役割についての質問に対し、申請者は視交叉上核におけるこれらの発現が出生初期と成獣とでは異なる事、また VIP は細胞間カップリングに重要な因子であることから、本研究で得られた *Cry1<sup>-/-</sup>/Cry2<sup>-/-</sup>* マウスの視交叉上核の生後発達にこれらの因子が関係している可能性がある」と回答した。次に、副査の吉岡教授より、なぜ *Per1* と *Per2* をモニターしたかとの質問があり、申請者は現在レポーターとして広く使用されており、入手可能な動物の 1 つであると答えた。さらに発光活性リズムと最終的なアウトプットである神経発火リズムの相関について、測定したデータが同一細胞かどうかとの質問があり、申請者は、今回の方法では同一細胞を特定する事は不可能であり、今後検討したい課題と回答した。また、神経発火は、外からの入力を絶った状態で測定していなければ、カルシウムなどの内因性信号よりもシナプスを介した外からの入力信号をより反映しているのではないかと、との質問があった。これに対し、申請者は、今回の測定では外からの神経入力に遮断していないこと、このため、内因性リズム信号と外因性の信号の双方が膜電位に反映される可能性があること、また、視交叉上核神経細胞間の液性因子による同期も報告されていると回答した。副査の本間教授からは成長過程で CRY が必要となってくるメカニズムとしてどのようなこと考えるか、またその解明のために、どのような実験方法が考えられるかについて質問があり、申請者は、生後発達に伴う視交叉上核の細胞間カップリングの変化が、細胞間カップリング促進因子の減少か、カップリング阻害因子の増加かの二つの可能性を述べた。また現在明らかになっているカップリング因子には AVP, VIP, GRP があり、これらの因子の発達段階での変化および CRY の欠損の影響を調べることをまず検討したいと回答した。それでも原因が明らかにならない場合、gene chip などの手法を用い網羅的に新たな因子を模索する方法もありうると回答した。最後に、主査の渡邊教授より、学位論文として研究の構成が分かりにくく、図や実験方法・解析方法の説明が不十分であるので、修正を行うようにとの指摘があった。

本研究の成果は、発達過程で概日リズム発振の中核機構が質的に大きく変化し、従来の時計遺伝子転写翻訳フィードバックループ仮説によらない視交叉上核内リズム発振メカニズムが存在することを、細胞、組織、個体の各レベルの検討により明らかにした点で意義がある。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。