

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 小野 大輔

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)

哺乳類における概日時計の中樞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^{-/-}/Cry2^{-/-}*) 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^{-/-}/Cry2^{-/-}*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^{-/-}/Cry2^{-/-}*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 時間周期の対照群に比較して、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^{-/-}/Cry2^{-/-}* 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^{-/-}/Cry2^{-/-}*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^{-/-}/Cry2^{-/-}*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。