京都大学	博士（薬科学）	氏名	瀬尾　和志
論文題目	電位依存性カルシウムチャネル制御ユニットα2δ3の 生体リズム調節機構に関する研究		

（論文内容の要旨）

多くの生物に備わる約24時間周期の生体リズムは、細胞内に存在する時計遺伝子と呼ばれる一連の転写因子群が織りなす、転写・翻訳のネガティブフィードバックループを基盤としている。哺乳類では、生体リズムの中枢が脳内の視交叉上核（suprachiasmatic nucleus: SCN）にあり、全身の細胞時計を階層的に統制している。SCNでは約1万個の細胞時計相互が同期して、強力で安定なリズムが形成され、この時間シグナルを全身に発している。

電位依存性カルシウムチャネル（voltage dependent Ca^{2+}channel: VDCC）はCa^{2+}が透過するポアを形成するα1と補助サブユニットであるβ、γ、α2δから構成されている。ポア形成α1のみならず、補助サブユニットの各々も複数のサブタイプが存在しており、それらの組み合わせにより電位依存性・電流透過性が大きく異なるだけでなく、その神経伝達物質放出や遺伝子発現などの細胞機能に及ぼす影響も大きく異なる。これまでSCNにおいてはVDCCが光によるリズム位相の変動に関与するということはわかっているが、そのサブユニットの役割は全く解明されていない。そこで申請者は、神経伝達に重要な機能を有しているとされるα2δサブユニットに注目し、このSCNにおける機能を究明することを目的として以下の研究を行った。

第一章　SCNにおけるα2δサブタイプの発現プロファイル

最初に、SCN内においてα2δサブタイプが発現しているかどうかを調べた。12時間明12時間暗の明暗条件下で飼育したマウスの脳をZT4とZT16（Zeitgeber Time：同調因子のある環境下での時間で、明期の開始をZT0として24時間周期で表したもので、ZT4は明期開始後4時間目にあたる）に採取し、α2δの各サブタイプ（α2δ1、α2δ2、α2δ3、α2δ4）のSCN における発現パターンを解析した。これらの中ではα2δ3はSCNにおいて強い発現を示したが、他のものは少量発現しているのみであった。このことから、SCN内のα2δ補助ユニットは、α2δ3が主体となっていると考えられる。次に、SCNにおけるα2δ3のmRNA量の日内変動を詳細に、定量的*in situ* hybridization法で追跡したところ、明暗条件下、恒常暗条件下とも、朝方に発現量が最大となるサーカディアンリズムが認められた。

第二章　SCNにおけるα2δ3の機能解析

SCNのVDCCのα2δ3の機能解析を行うため、α2δ3をコードする遺伝子*Cacna2d3*のノックアウトマウス（*Cacna2d3*$^{-/-}$マウス）の行動パターンを野生型と比較した。恒常暗条件下での行動リズム周期や光に対する位相反応性は、野生型と全く同じであった。これは、代表的な時計遺伝子である*Per1*、*Per2*のSCNにおけるmRNAの発現パターンに違いは認められなかったことと一致する。

しかし、明暗条件下、及び恒常暗条件下ともに、*Cacna2d3*$^{-/-}$マウスでは野生型と比較して日中の行動量が低く、約24時間周期のリズム成分も低下していた。この所見は、通常の明暗環境下では明瞭ではないが、リズム産生の異常が潜んでいる所以かもしれないと考え、さらに検索を進めた。そのため行ったのは、SCNへの光刺激が常時ある恒常明条件下での行動リズム検索である。この条件下では、野生型マウスは24時間よりも長周期になるもののリズム性は保たれるが、*Cacna2d3*$^{-/-}$マウスでは、大半の個体で行動リズムが減弱、消失した。また、恒常明条件下における*Per1*の発現を検索したところ、野生型マウスで認められた日内変動は、*Cacna2d3*$^{-/-}$マウスでは失われていた。これは、*Cacna2d3*$^{-/-}$マウスでは、持続的な光刺激で容易にSCNの時計遺伝子の発現が変動し、その結果、行動のリズムが消失するためと考えられる。

この細胞機構を探るため、SCNの細胞レベルのリズム発振機構を時計遺伝子*Per1*の下流にルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウスのSCNスライス培養系を用いて検証した。その結果、*Cacna2d3*$^{-/-}$マウスでは、野生型マウスのSCNに見られた整然とした細胞間のリズムの伝播パターンが消失し、細胞同士のリズムの同調性は減弱していることが明らかとなった。これらの結果は、SCN細胞間のリズムの同調不全により、SCN全体としてのリズム発振能力が低下することで、恒常明条件下における*Cacna2d3*$^{-/-}$マウスの行動のリズム性が低下する可能性を示唆している。

以上の研究結果より、VDCCの補助サブユニットであるα2δ3は、SCNを構成する細胞同士のリズムの同調機構に関与していることが明らかとなった。 これによりα2δ3を標的とするような創薬が睡眠覚醒障害の治療に役立つ可能性があると考えられる。また、今後の研究により、リズム発振や同調機構におけるSCN細胞内でのVDCCの役割の全貌が明らかになることが期待される。

（続紙　２　）

（論文審査の結果の要旨）

カルシウムは重要な細胞内メッセンジャーであり、興奮膜を持つ細胞では細胞活動時にに開閉する電位依存性カルシウムチャネル（voltage dependent Ca^{2+}channel: VDCC）は、細胞機能の制御にきわめて重要な働きをする。例えばこのチャネルからのCa^{2+}の透過はさまざまな遺伝子発現を引き起こす。電位依存性カルシウムチャネルは、イオンを透過させるポアを形成するα1とともに、補助サブユニットであるβ、γ、α2δから構成されており、補助ユニットはポアからの流入を修飾すると考えられている。しかしこれらの補助サブユニットの分子機構は多くは不明のままである。本研究は、神経伝達に重要な機能を有しているとされるα2δサブユニットに注目し、これが正常な生体リズム形成に必須の因子であることを、遺伝子改変マウスを用いて初めて明らかにした。

まずα2δのうち、どのサブユニットが発現しているか検索したところ、α2δ3が行動リズムの中枢である視交叉上核に強く発現していた。α2δ3のmRNA量の日内変動を定量的*in situ*hybridization法で追跡したところ、リズムを示し、α2δ3はリズムによって制御される遺伝子であることを明らかにした。続いて、α2δ3の機能解析を行うため、α2δ3サブユニットをコードする*Cacna2d3*遺伝子のノックアウトマウス（*Cacna2d3*$^{-/-}$マウス）の行動パターンを野生型と比較したところ、明暗条件下、及び恒常暗条件下ともに、*Cacna2d3*$^{-/-}$マウスでは野生型と比較して約24時間周期のリズム成分も低下していた。さらに、視交叉上核への刺激が常にある恒常明条件下での行動リズムを検索したところ、多くの*Cacna2d3*$^{-/-}$マウスでは、行動リズムが減弱、消失した。これは、*Cacna2d3*$^{-/-}$マウスでは、持続的な光刺激で容易に視交叉上核の時計遺伝子の発現が変動し、その結果、行動のリズムが消失するためと考えられる。さらに、視交叉上核スライス培養系を用いて時計遺伝子のリアルタイムモニター検索にて、*Cacna2d3*$^{-/-}$マウスの細胞同士でのリズムの同調性の減弱を発見した。

本研究は、神経細胞の働きにとって重要である電位依存性カルシウムチャネルの補助サブユニットα2δ3の生体リズムへの機能を検索し、視交叉上核のリズム発振細胞間リズムの調整に関与し、強力なリズム生成に寄与することをはじめて明らかにしたものである。よって本論文は博士（薬科学）の学位論文として価値あるものと認める。

さらに、平成２５年２月２２日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日：　平成　　年　　月　　日以降