

(続紙 1)

京都大学	博士 (薬科学)	氏名	溝曾路祥孝
論文題目	視交叉上核における概日時計の時刻調節システムの研究		
(論文内容の要旨)			
序論			
<p>地球上の多くの生物は、自身の体内に約24時間の周期を刻む時計(概日時計)を持っている。この概日時計は、時計遺伝子<i>Per</i>を中心とした自律的な転写・翻訳のフィードバックループによって生み出されており、体温や血圧、ホルモン分泌など様々な生命機能に約24時間の周期を与えている。しかし、生物自身のもつ概日時計の周期は、地球の自転に伴う24時間の明暗周期と完全には一致していない。そのため、我々は日々、概日時計を外界の明暗周期に合わせる必要がある。これを概日時計の同調機能という。</p> <p>哺乳類では、外界の明暗周期情報は、網膜から概日時計の中枢である視床下部の視交叉上核(suprachiasmatic nucleus:SCN)に直接伝達される。これまでの研究から、この経路がグルタミン酸作動性であるとされていたが、その詳細な分子メカニズムは不明であった。そこで申請者は、グルタミン酸受容体であるAMPA受容体に着目し、SCNでの局在や概日時計の同調機能について検討した。(第1章)</p> <p>また、SCNのもう一つの特徴として、安定した概日リズムを維持できることが知られている。この内在性の概日時計は、普段は外界の明暗周期と完全に同調しているため、その存在はあまり自覚されない。しかし、ジェット機などで短時間に複数の時間帯をまたいで移動すると、体内時計の時刻と外界の明暗周期の時刻との間に時差が生じる。申請者たちは、SCNに発現する遺伝子群の網羅的解析から時差の分子研究を行った結果、arginine vasopressin (AVP)の受容体であるV1aとV1bをダブルノックアウトしたマウス(V1a^{-/-}V1b^{-/-})が、時差後の新しい明暗環境にすぐに同調できることを見出した。SCNのAVP発現ニューロンは、同時にV1a受容体も発現し、SCN内でAVP-V1aV1b局所神経回路を形成する。申請者は、SCNスライスを用いた細胞レベルの概日リズムの位相解析より、このSCN内神経回路の欠失がなぜ時差を消失させるかを検討した。(第2章)</p>			
第1章:SCNのAMPA受容体を介した概日リズム位相の調節			
<p>マウスは、恒暗環境下でも約24時間の周期で行動する。マウスは夜行性であるため、マウスが行動する時間を主観的夜と表現する。同調機能を検討するために主観的夜の初期に光を当てると、マウスの行動リズムの位相は後退する。この時、SCN内で<i>Per1</i>の発現が急激に誘導される。</p> <p>まず申請者は、AMPA受容体のSCNにおける発現局在を<i>in situ hybridization</i>法を用いて調べた。その結果、AMPA受容体のサブユニットである<i>GluR2</i>および<i>GluR4</i>のmRNAは、網膜-視床下部路の投射先であるSCNの中央から腹外側部にかけて強く発現していた。従って、<i>GluR2</i>および<i>GluR4</i>が同調機能に関与していると示唆される。</p>			

続いて、主観的夜の初期にマウスSCNへAMPAを局所投与したところ、光刺激と同様にマウスの概日行動リズムの位相が後退した。この位相後退は、AMPA受容体アンタゴニストの同時投与で抑制された。また、SCNへのAMPA投与は、*Per1*のmRNAの発現を誘導した。

次に、*Per1*のプロモーターでLuciferaseを発現する*Per1-luc*レポーターマウスから作成したSCNスライスを用いて、*Per1*の発現リズムに対するAMPA受容体の効果を検証したところ、AMPA投与によって時刻依存的に*Per1*リズムの位相が変動した。これは、光刺激による時刻依存的な行動リズムの位相の変動と一致した。

上記の結果から、概日時計の同調機能の分子メカニズムにおいて、SCNのAMPA受容体シグナルが重要な役割を果たしていると考えられる。

第2章:SCNのAVP-V1aV1b局所神経回路の概日時計における機能

*Per1-luc*レポーターマウスから作成したSCNスライスにおいて生物発光をリアルタイムでモニターすることにより、視交叉上核に存在する何百というニューロンの概日リズムを同時に測定することができる。この系を利用して、AVP-V1aV1b局所神経回路が概日リズムにどのように影響を及ぼすかについて検討した。

野生型マウス(WT)も*V1a*^{-/-}*V1b*^{-/-}もともに、SCNの背側の細胞が先に概日リズムのピークを迎え、それに遅れて腹側の細胞がピークを迎える、秩序だった概日リズムのパターンを示した。SCNスライスにタンパク質合成を阻害するcycloheximide (CHX)を投与すると、細胞の概日リズムは一旦完全に消失し、CHXを除去すると全てのSCN細胞が同時に概日リズムのピークを迎える。その後、WTのSCNスライスは、投与前の細胞間にあった位相の順序のとおり細胞個々の概日リズムが回復したが、*V1a*^{-/-}*V1b*^{-/-}のSCNスライスは、その順序は大きく変化した。同様に、*V1a*と*V1b*のアンタゴニストを投与した群でも、CHX投与後、順序は正常に回復しなかった。したがって、AVP-V1aV1b局所神経回路は、リズム攪乱因子の存在下でも、安定した概日リズムを維持することに貢献しており、このSCN振動の頑強性のため、WTでは時差後の新しい明暗環境にすぐには同調できないと考えられる。

以上の結果を元に、SCN内外の細胞リズム位相の数理モデルを作成した。この数理モデルは、確かに時差環境下の時計遺伝子の発現リズムを再現した。また、この数理モデルによると、*V1a*^{-/-}*V1b*^{-/-}のSCNでは、WTに比べて、各細胞間の概日リズム位相の差が小さいと予測された。そこで、実際にSCNスライスを用いて各細胞間の概日リズムの位相差を調べたところ、*V1a*^{-/-}*V1b*^{-/-}のSCNスライスでは、WTのよりも、有意に位相差が小さかった。また、WTのSCNスライスに、*V1a*と*V1b*のアンタゴニストを投与すると、各細胞間の位相差が小さくなった。これらの結果から、SCN内のAVP-V1aV1b局所神経回路は、SCN細胞間の概日リズム位相の差を形成することがわかった。したがって、SCNは様々な時間にピークを迎える細胞を持つことにより、外界からのリズム攪乱因子に対して概日時計の頑強性を獲得しているものと示唆される。

(論文審査の結果の要旨)

視神経を介する網膜からの網膜視床下部路は、24時間周期の概日リズムを外界の明暗周期に同調させる経路として重要である。これまでの研究から、この経路がグルタミン酸作動性であるとされていたが、その詳細な分子メカニズムは不明であった。申請者は、グルタミン酸受容体であるAMPA受容体に着目し、概日リズム中枢であるSCNの役割を解明した。その結果、AMPA受容体のサブユニットであるGluR2およびGluR4のmRNAが、網膜-視床下部路の投射先に強く発現した。さらに、自由行動下のマウスの主観的夜の初めでのSCNへAMPA投与にて、光刺激と同様にマウスの概日行動リズムの位相が後退し、この作用は、AMPA受容体アンタゴニストの同時投与で抑制された。さらに、*Per1-luc*レポーターマウスを用いたSCN スライスカルチャーにて、AMPA投与により、位相依存的に概日リズムが変位することを明らかにした。以上の研究は、AMPA受容体がSCNで位相変位に関与することを初めて明らかにしたものであり、同調機構の解明に、重要な研究成果と言える。

もう一つのSCNの重要な機能は、安定した24時間周期の概日リズムを発振・維持することであるが、その詳細は解明されていない。申請者は、この機能に、SCN内の神経回路が重要な役割をしていると想定し、そのうち最大のAVP-V1aV1b受容体系を、*Per1-luc* SCNスライスのリアルタイムイメージングにて、シングルセルレベルで検討した。SCNの構成細胞は概日リズムを刻むがその位相は一樣では無く、背側の細胞が先にピークを迎え、腹側の細胞は遅れる。この位置依存的位相較差は、野生型マウス(WT)のみならず *V1a^{-/-}V1b^{-/-}*マウスでも、共に認められた。しかし、タンパク質合成を阻害するcycloheximideを投与して細胞時計を完全に止めた後、これを除去すると、WTでは、投与前の細胞リズム位相の順序は回復したが、*V1a^{-/-}V1b^{-/-}*のSCNスライスでは、以前の細胞リズムの位相の秩序は消失していた。以上の結果を元に、SCN内外の細胞リズム位相の数理モデルを作成したところ、時差環境下の時計遺伝子の発現リズムを再現に成功したのみならず、AVP-V1aV1b受容体系阻害時に、SCNの各細胞間の位相格差の現象が予測された。そこで、実際にSCNスライスを用いて各細胞間の概日リズムの位相差を調べたところ、*V1a^{-/-}V1b^{-/-}*やアンタゴニスト投与下のSCNスライスでは、WTのよりも、有意に位相差が小さかった。これらの結果から、SCNのAVP-V1aV1b神経回路は、SCN細胞間の概日リズム位相の格差を形成することがわかった。このSCN内の構成細胞の位相格差は、外界からのリズム攪乱因子に対して概日時計の頑強性を獲得しているものと示唆される。

本研究は、概日中枢の2つの重要な機能である、明暗位相の同調におけるAMPA受容体の機能解明と、リズム本体の発振における細胞レベルのAVP-V1aV1b受容体の局所回路の機能を、初めて明らかにした研究である。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。また、平成26年2月22日、論文内容とそれに関連した事項について諮問を行った結果、合格と認めた。なお、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、(当分の間)当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。