

| | | | |
|------|---|---|---|
| 報告番号 | ※ | 第 | 号 |
|------|---|---|---|

主論文の要旨

論文題目 哺乳類の時間的ニッチの制御機構

氏名 太田 航

論文内容の要旨

生物にとって、周辺環境の変化に適応できるかどうかは死活問題である。夜行性動物にとっての「夜」、昼行性動物にとっての「昼」のように、活動に際して自らの生存や種の繁栄に最も適した時期や時間帯を「時間的ニッチ (temporal niche)」と呼ぶ。時間的ニッチは「概日リズムの同調」と「マスキング反応」という、生物の活動のタイミングを規定する2つの適応現象の相互作用によって決定されると考えられているが、その制御機構については未解明な点が多く残されている。本論文では、哺乳類における時間的ニッチの制御機構の解明を目的とし、自然界において生命活動に大きく影響する環境因子である「光」と「温度」の観点から、それぞれ「概日リズムの同調」と「マスキング反応」に着目した研究を展開した(第2章、第3章に記載)。

概日リズムとは、ほぼすべての生物に保存されている約24時間周期の内在性のリズム現象のことを指す。概日リズムの中核は、視床下部の視交叉上核 (suprachiasmatic nucleus; SCN) に局在しており、そのリズム周期を環境変化の周期と一致させることにより、様々な生理現象や行動のタイミングを調節する仕組みが「概日リズムの同調」である。ほとんどの場合において、光(明暗サイクル)が主な同調因子であることから、概日リズムの光同調とも呼ばれる。光同調に必要なSCNへの光入力は、基本的に網膜の神経節細胞層からの直接的な神経接続を介して行われており、神経節細胞層に発現するメラノプシン(オプシン4)、及び視細胞層に存在する桿体・錐体光受容体によってすべての概日光応答が担われているとされている。第2章では、哺乳類における新規光受容タンパク質「オプシン5」の生理機能解析を通じて、マウスのオプシン5が紫外光に対する概日リズムの光同調に間接的に関与している可能性を見出した。オプシン5は鳥類の季節繁殖を制御する紫外光感受性の脳内光受容分子として知られていたが、哺乳類におけるその生理機能は未知であった。発現解析の結果、オプシン5遺伝子(*Opn5*)はマウスの脳では視床下部の内側視索前野、網膜では神経節細

胞層を中心に局在していた。前述の通り、網膜神経節細胞層ではメラノプシンと呼ばれる別の光受容タンパク質が概日リズムの光同調を司っていることが知られていたため、オプシン 5 も同様の機能を有するのではないかと推測された。そこで、様々な光強度の紫外光光源下における回転輪活動リズムについて、野生型マウスとオプシン 5 ノックアウトマウスとを比較した結果、オプシン 5 を欠損する個体 (*Opn5*^{-/-}) では「光条件の変更から再同調に至るまでに要した日数」、光強度が弱まるにつれての「同調割合」、「位相差 (明暗サイクルと同調時の位相のズレ)」など、紫外光に対する光同調能が低下していることが明らかになった。また、マウスの網膜にはオプシン 5 の他にも紫外光感受性の UV 錐体オプシンが存在することから、網膜の視細胞が退化・消失する *rd1* 突然変異マウス (CBA/J 系統) との交配により作製したダブルミュータントマウス (*Opn5*^{-/-}; *rd1/rd1*) (オプシン 5 に加えて UV 錐体細胞を含む視細胞を欠損) についても同様に解析した結果、紫外光に対する光同調能は相加的に低下した。更に、紫外光パルスによる概日リズムの位相変位量や、リズム中枢である SCN の活性化度合い (神経活動マーカーである *Fos* 遺伝子の発現誘導) といった光応答にも有意な低下が認められた。以上の結果から、哺乳類におけるオプシン 5 は紫外光に対する概日リズムの光同調に関与した機能をもつ可能性が示唆された。ただし、既知の概日光受容体の機能をすべて欠損するトリプルノックアウトマウス (*Opn4*^{-/-}; *Gnat1*^{-/-}; *Gnat2*^{-/-}) では、網膜にオプシン 5 が残っているにもかかわらず明暗サイクル (白色光・紫外光の両方) への同調が完全に失われたことから、オプシン 5 は概日光受容体そのものではない可能性が高い。哺乳類の網膜はそれ自体に概日リズム (網膜時計) を有しており、概日ペースメーカーである SCN とは独立して光同調が可能であることが知られている。そして最近の研究により、この網膜時計の光同調はメラノプシンや桿体・錐体光受容体ではなく、オプシン 5 によって制御されていることが報告されている。網膜機能の多くが網膜時計の制御を受けていることも加味すると、本研究で観察されたオプシン 5 ノックアウトマウスにおける光同調能の低下は、オプシン 5 の欠損により生じた網膜機能の乱れに起因したものであると考えられる (第 2 章)。

概日リズムの同調が、環境の周期的な変化を予測する形での適応であることに対し、マスキング反応は概日リズムの振動体への影響を介さずに、外的な要因に直接反応して生じる適応現象とされている。例えば夜行性動物であるマウスの場合、彼らの活動期間中である夜間に強い光を照射することによって、その活動は直ちに抑制されることが知られており、光によるネガティブマスキング反応と表される。概日リズムの光同調に関する神経中枢や光入力系の大枠が既に確立している一方で、マスキング反応に関しては、その分子機構や神経回路に関する理解が遅れているのが現状であった。第 3 章では、哺乳類の網膜外光受容能の有無に関する検討過程 (第 2 章の関連研究) において偶然観察された、環境温度の上昇に伴う活動の抑制現象 (環境温度依存的ネガティブマスキング反応) について、この現象に関与する 2 種類の温度受容体を発見した。また、環境温度依存的マスキング反応の制御に関わる神経回路についても仮説を提唱した。多くの生物において温度受容体として機能しているのは、TRP チャンネル

(transient receptor potential channel) と呼ばれるイオンチャネルである。哺乳類では 10 種類の TRP チャネル (TRPA1, TRPM2, TRPM3, TRPM4, TRPM5, TRPM8, TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4) が温度感受性を有しており、低温領域から高温領域まで、それぞれが独自の活性化温度閾値を示すことが知られている。環境温度依存的ネガティブマスキング反応を制御する温度受容体の特定を目的とし、入手可能なすべての TRP チャネルノックアウトマウス (*Trpv1/3/4* 及び *Trpm2/8*) について行動解析を行った結果、*Trpm2* 及び *Trpm8* ノックアウトマウスにおいてマスキング反応の有意な低下が確認された。また、これら 2 つのダブルノックアウトマウスでは更なる低下傾向が認められた。このことから、TRPM2 及び TRPM8 の 2 つの TRP チャネルが、環境温度依存的ネガティブマスキング反応の制御に関与していることが示唆された。ただし、*Trpm2/Trpm8* ダブルノックアウトマウスにおいてもマスキング反応の低下は 15–20% 程度にとどまったことから、これら 2 つ以外の温度受容体も関与しているものと考えられる。続いて、この反応の制御に関与する神経回路を明らかにするため、マスキング反応を引き起こす急激な温度刺激時 (34°C) における脳内活性化部位 (*Fos* 遺伝子発現) を検討した。結果、体温調節中枢として知られる視床下部の視索前野 (preoptic area; POA) や概日リズム中枢である視交叉上核 (SCN) において活性化が確認された。加えて、側坐核 (nucleus accumbens; NAc)、視床室傍核 (paraventricular nucleus of the thalamus; PVT)、視床下部背内側核 (dorsomedial nucleus of the hypothalamus; DMH) などの神経核でも *Fos* 遺伝子発現の上昇が認められた。これらの神経核間における神経接続状況は、過去の知見により詳細に報告されている。中でも、PVT は (i) POA からの投射、(ii) SCN との相互接続、(iii) 回転輪活動を含む様々な行動の制御への関与が知られている NAc への密な投射、という 3 点において興味深い神経核であった。そして、イボテン酸 (神経毒) の直接投与により PVT を局所破壊した結果、環境温度依存的ネガティブマスキング反応が有意に低下したことから、PVT はマスキング反応の仲介地点 (インターフェイス) としての役割を担っている可能性が示唆された。マスキング反応に関するこれまでの知見としては、光によるものがほとんどであったが、本研究では新たに環境温度が変化する条件下において、高温時にネガティブマスキング反応が生じることを定量的に明らかにした。すなわち、夜行性動物であるマウスでは、「光の存在時」と「高温時」に活動が抑制されると換言できる。これらはいずれも「日中 (昼)」の特性を反映した環境条件であるという意味では、一貫した表現型である。昼行性動物に対して、本研究で用いた環境温度刺激を与えた場合にどのような活動パターンが観察されるかは、今後の重要な検討課題である (第 3 章)。

近年の研究により、生物の行動は実験室環境下 (一定時刻になると瞬時に明暗が切り替わる光サイクル、及び常時温かく保たれた環境温度) と自然環境下 (徐々に移り変わる光強度及び環境温度) では顕著に異なったパターン (時間的分布) を示すことが分かりつつある。本論文の第 2 章と第 3 章に記した発見は、お互いが直接結びつくものではないが、それぞれ光と温度の観点から夜行性・昼行性の切り替え、ひいては時間的ニッチの制御機構解明の手掛かりとなることが期待されるものである。