

中枢時計の時間を見る Visualize Time in the Brain Clock

瀬尾 和志, 岡村 均
Kazuyuki Seo and Hitoshi Okamura

京都大学大学院薬学研究科医薬創成情報科学講座システムバイオロジー分野

要旨 視交叉上核 (SCN) は概日リズムの中核であり, この神経核のニューロンは睡眠覚醒リズムを規定する. 我々は, マウス *Per1* 遺伝子のプロモーター下流にホタル発光遺伝子を結合した *Per1-luc* トランスジェニックマウスを作成し, これより作成した SCN スライスを高感度 CCD 顕微鏡にて連続観察できる系を開発し, SCN 細胞 1 つ 1 つの発光リズムを時空間解析することに成功した. この観察系を用いて, SCN で体内時計の朝に発現する抑制性 G タンパク質制御物質である RGS16 の機能を検索した結果, RGS16 欠損マウスでは, リズムの起点を形成する SCN の背内側部の先頭集団細胞の時間位相が遅れ, マウス個体の活動リズムも遅延することが明らかとなった. このようなリアルタイムイメージング技術は, SCN, ひいては神経ネットワークがいかんして個体の行動パターンを規定するのかという脳の仕組みを理解するうえで重要なツールとなるだろう.

キーワード: 視交叉上核, 時計遺伝子, RGS16, 概日リズム, リアルタイムイメージング

1. はじめに

生物時計システムは, 時計遺伝子の自律的で周期的な発現変動が個体の活動レベルまで反映する極めてユニークな系である. 時計遺伝子は全身の細胞概日リズムを産生しているが, それらのリズムを統括する中枢は視床下部の視交叉上核 (suprachiasmatic nucleus, SCN) と呼ばれる小神経核に存在している. SCN から発振される周期的なシグナルは, 神経伝達やホルモンを介して全身に伝達され, 睡眠覚醒やホルモン分泌ばかりでなく, 脂質代謝や細胞分裂などの多様な生理現象が 24 時間リズムとして調律されるのである. 本稿では, 中枢時計としての SCN の特性に着目し, SCN という組織の中でリズムが形成されるしくみを最新の研究とともに紹介したい.

2. 全身にある細胞時計

ほんの 10 年前には考えられなかったことであるが, 現在では, 全身のどの部位から取ってきた細胞 (たとえば, ヒト皮膚の分散培養) でさえ, サークadianリズム (概日リズム) は認められている^{1,2)}. 細胞がこのサーカディアンリズムを生み出す仕組みは中枢, 末梢を問わず, すべての細胞において時計遺伝子の転写, 翻訳を介したフィードバック機構

によるものであると考えられている. 具体的には, ポジティブ因子である BMAL1, CLOCK が, ネガティブ因子である Per, Cry 遺伝子のプロモーター部に結合し, 転写を促し, 産生された PER, CRY 蛋白質がポジティブ因子による転写を抑制する. このリズム発振の仕組みは, SCN でも末梢組織でも同じと考えられる.

3. 中枢時計である視交叉上核

概日リズムの中で最も代表的なものは睡眠覚醒リズムであり, これは, SCN の約 1 万のニューロンがほぼ独占的にその特質を決めている. では, SCN の時計と末梢の時計とでは何が異なるのであろうか. それは培養した細胞を観察すればすぐにみえてくる. 驚くべきことに, SCN は脳内から取り出して生体外で培養しても 1 年以上にわたって正確な時を刻み続けることができるのである. ところが, 末梢組織では, リズムが数日で消失する. これは, 個々の細胞のリズムは同期せず時間とともに乖離していくため, 全体としてのリズムは数周期で減衰してしまうと考えられる³⁾. すなわち, SCN にはリズムを生み出すだけでなく, そのリズムを維持する仕組みが存在するといえる.

4. 中枢時計の時間を見る

著者らは SCN の細胞間のリズム位相がどのような機構で決定されているのかに非常に興味を持った. そのため, SCN のシングルセルレベルでの細胞の時間位相を観察できるシステムを開発した. まず, 時間をどう可視化するかであるが, これには, 日内の転写レベルが数倍から数十倍に変動するリ

〒606-8501 京都市左京区吉田下阿達町 46-29
TEL: 075-753-9552; FAX: 075-753-9553
E-mail: kazuyuki-8@090016.mbox.media.kyoto-u.ac.jp, okamura@pharm.kyoto-u.ac.jp
2012 年 4 月 11 日受付

リズム発振の中心遺伝子である *Per1* に着目した。マウス *Per1* 遺伝子のプロモーター下流にホタル発光遺伝子 *luciferase* をつないで作製した人工レポーター遺伝子をマウスに導入して作りだした *Per1-luc* トランスジェニックマウスを作成し⁴⁾、この SCN を用いることにした。続く課題は、どのようにして *in vivo* の SCN の機能を保ちながら、生体外に取り出せるかであるが、これには、以前ラット SCN で確立したスライス培養系を用いることにした⁵⁾。すなわち、*Per1-luc* マウスから作成した SCN スライス培養細胞に *luciferase* の基質である luciferin を添加すると、*Per1* が発現する時刻に細胞が発光することを利用したものである。このイメージングに極微弱光用高感度 CCD 顕微鏡を用い、SCN 細胞 1 つ 1 つの発光リズムを時空間解析することに成功した¹⁾。すなわち、SCN の部位特異性を保ちながら、生体外で時計遺伝子の転写変動をリアルタイムイメージングにより検証できる SCN スライス培養系が完成したのである。

5. 中枢時計の時計細胞は相互連絡しあって時を刻む

この *Per1-luc* トランスジェニックマウスの SCN スライス培養系を用いた解析の結果、各時計細胞のリズムピークが SCN の空間的位置により異なることが明らかになった(図 1)。すなわち、SCN 内の *Per1* の発現はどれも一様というわけ

はなく、背内側部から始まり、腹外側部へと広がっていくような特異的な時空間パターンに従って同期しているのである。ところが、この特異的なリズムは Na^+ チャンネルブロッカーであるテトロドトキシン (TTX) を添加し、SCN ニューロンの活動電位の発生と伝播を抑制すると、瞬間に脱同調を起し、細胞ごとのリズムが乱れてしまい、SCN 全体としてのリズムは減弱消失する¹⁾。しかし、TTX を除去すると細胞が再び同期し、元の背内側部から順に広がるリズムを構築するのである。このことは、SCN 各細胞におけるリズム発振が単一の細胞だけで決まるのではなく、他の細胞のリズムが互いに影響を及ぼし合っていることを示している。

6. G タンパク質シグナリングがリズムを規定する

では、この SCN の細胞集団に特有の組織レベルの特性にはどのようなメカニズムがはたらいているのであろうか。SCN には G タンパク質受容体が多いことが知られており、興味深いことに、 Gi/o の特異的阻害剤である百日咳毒素を SCN に作用させると、TTX と同様に、リズムが減弱消失することが報告された⁶⁾。そこで我々は、 Gi/o タンパク質を介するシグナル伝達が SCN の細胞間同調にかかわるのではないかと考え、SCN の細胞間連絡の分子メカニズムに迫るべく、SCN に特異的に発現する G タンパク質関連因子を網羅

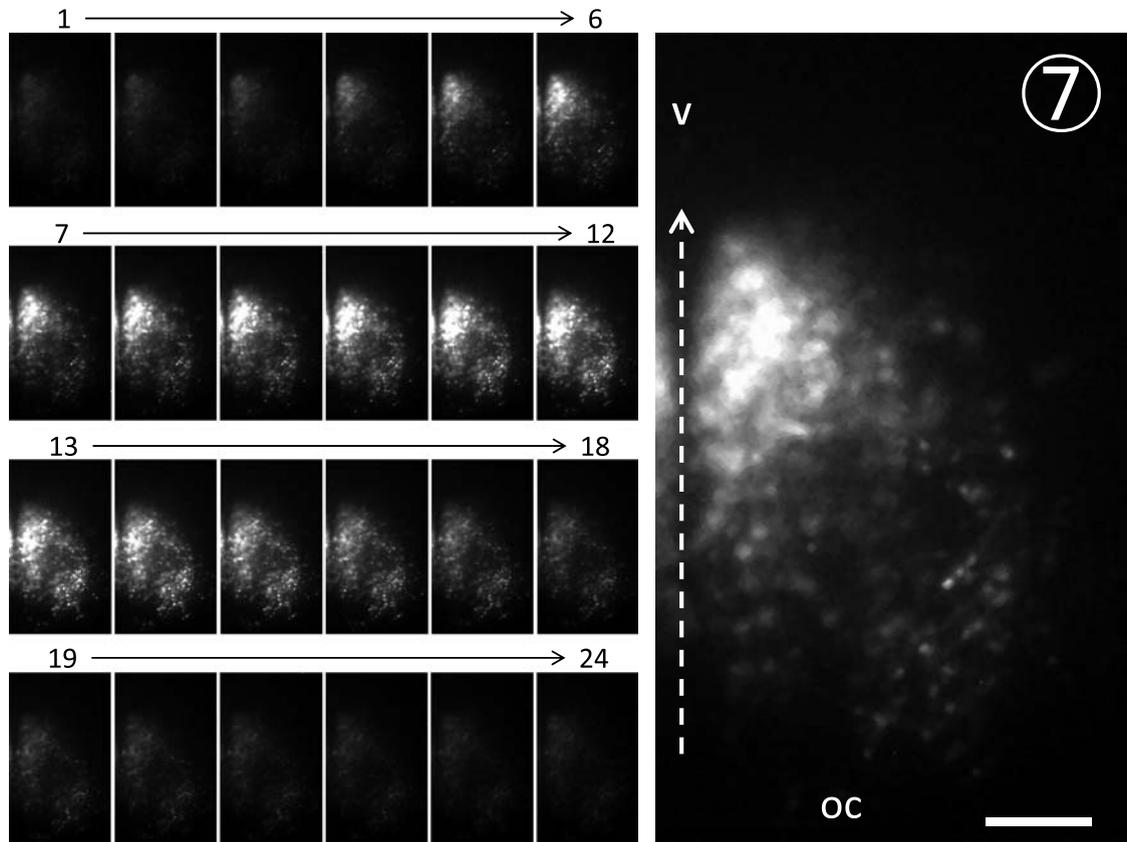


図 1 左半分は、視交叉上核スライスカルチャーにおける *Per1-luc* 発光の概日変動を 1 時間毎の CCD カメラ像で示す。7 時間の点での像の拡大図を右に示す。この拡大図中の点線は正中線であり、矢印の方向は背側を示す。生体内での元の第 3 脳室 (v)、視交叉 (oc) を示す。スケールバーは 100 μm を表す。

的に探索した⁷⁾。その過程で、SCNにおいてはRGS16 (regulator G-protein signaling 16) が非常に強く発現しており、さらに、朝に発現がピークとなるような強いリズムがみられることを見出した⁸⁾。RGS16は生化学的には3量体Gタンパク質のG α iに対して抑制的に働くGAP (GTP加水分解活性化タンパク質)として知られる分子である。興味深いことに、RGS16欠損マウスを作製しSCNを調べたところ、リズムの起点を形成する背内側部の先頭集団細胞の時間位相が遅れ、マウス個体の活動リズムも遅延することがわかった。

7. 視交叉上核の背内側にあるリズムリーダー

RGS16欠損マウスの背内側部で何が起きているのだろうか。正常マウスでは背内側部細胞に早朝RGS16が発現し、それに続いて細胞内cAMPが上昇し、その下流に位置するシグナル伝達が活性化される。*Per1*はそのプロモーター部位に活性のあるCREが存在し、転写の増大に伴う*Per1*の発現がどこよりも早く惹起されるのである。一方、早朝以外の時間帯にはRGS16の発現が低下するので、G α iの活性の抑制がなくなり細胞内にcAMPシグナルが流れなくなる。つまり、RGS16はSCN背内側の細胞では、時間特異的に起こるcAMPシグナル伝達により、特有の早いリズムを生み出しているのである⁸⁾。このSCN背内側のリズムが、SCN他の細胞に伝わり、SCN全体としてのリズムを早くする。

8. おわりに

上述の結果は、これまで長い間謎に包まれていたSCN細胞間コミュニケーションの分子機序に迫ろうとするものである。これら一連の研究において、個々のSCN細胞を時空間的に解析することができるSCNスライス培養系は非常に強力なツールとなった。今後もこのようなリアルタイムイメージング技術は、SCN、ひいては脳の神経ネットワークがいかにして個体の行動パターンを規定するのかという脳の仕組みを理解するうえで重要なツールとなるだろう。そして、さらなる研究の発展のためにより高性能な解析技術の登場が期待される。

文 献

- 1) Ymaguchi, S. *et al.*: *Science*, **302**, 1408–1412 (2003)
- 2) Brown, S.A. *et al.*: *PLoS Biol.*, **3**, e338 (2005)
- 3) Nagoshi, E. *et al.*: *Cell*, **119**, 693–705 (2004)
- 4) Yamaguchi, S. *et al.*: *Curr Biol.*, **10**, 873–876 (2000)
- 5) Tominaga, K. *et al.*: *Neuroscience*, **59**, 1025–1042 (1994)
- 6) Aton, S.J. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 19188–19193 (2006)
- 7) Okamura, H.: *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **72**, 551–556 (2007)
- 8) Doi, M. *et al.*: *Nat. Commun.*, **2**, 327 (2011)