

氏名	関口 学		
授与した学位	博 士		
専攻分野の名称	理 学		
学位授与番号	博甲第	7 1 2 7	号
学位授与の日付	2 0 2 4 年 9 月 2 5 日		
学位授与の要件	自然科学研究科 地球生命物質科学専攻 (学位規則第 4 条第 1 項該当)		
学位論文の題目	キイロショウジョウバエ概日時計を制御する時計神経回路の網羅的機能解析		
論文審査委員	教授 吉井 大志	教授 中越 英樹	教授 坂本 浩隆
学位論文内容の要旨			
動物では、遺伝子発現、生理、内分泌、代謝、行動などの様々な現象に約 24 時間の概日リズムが観察される。このリズムを生み出す概日時計の分子メカニズムの中心は、時計遺伝子の周期的な発現変動で説明される。このメカニズムは、シアノバクテリアからヒトまでの広範な生物種で観察されるため、概日時計は進化的によく保存された重要な機能であると考えられている。 キイロショウジョウバエ <i>Drosophila melanogaster</i> (以下、ショウジョウバエ) の脳内には、概日時計を制御する約 150 個の神経細胞 (時計細胞) がある。ショウジョウバエが 1 日の中で示す朝方の活動ピークは small ventrolateral neuron が制御し、夕方の活動ピークは 5th ventrolateral neuron および Cryptochrome 陽性の dorsolateral neuron (LN_d) が制御していると報告されている。さらに、近年の研究により posterior dorsal neuron 1 (DN1p)が朝方・夕方の活動ピークの制御に関与していることが明らかとなっている。また、これらの時計細胞は十数種類の神経伝達物質を用いて複雑な時計神経ネットワークを構築していることも分かってきた。しかし、依然として時計細胞と神経伝達物質の機能は完全には理解されていない。そこで、本研究では、所属研究室が同定した「時計細胞に対して遺伝子操作を可能にする Gal4 系統」を利用し、1) 時計細胞の網羅的機能解析、2) 時計細胞で発現する神経ペプチド Trissin とその受容体 (TrissinR) が形成するシグナル伝達経路の機能解析、を実施した。時計細胞の網羅的機能解析では、概日時計を失った <i>period</i> 突然変異体バックグラウンドの Gal4 系統と <i>UAS-period</i>¹⁶ を組み合わせて、特定の時計細胞でのみ時計機能を回復させた 59 系統を用いて行動解析を行った。その結果、4~6 個の Cryptochrome 陽性 DN1p 細胞が、明暗条件下で朝方と夕方の活動ピークを形成し、恒暗条件下では複雑な自由継続リズムを生み出すことを明らかにした。Trissin/TrissinR シグナル伝達経路の研究では、新規に作製した Trissin 前駆体に対する抗体を用い、LN_d における Trissin の発現量には概日リズムがあることを明らかにした。さらに、行動解析では、<i>Trissin</i> または <i>TrissinR</i> をノックアウト、あるいはノックダウンした場合、恒暗条件下の夕方の活動オフセットのタイミングが遅れることが明らかになった。これは、LN_d 時計細胞で発現する <i>Ion transport peptide (ITP)</i>の追加ノックダウンにより回復することが示された。従って、Trissin は時計神経ネットワーク内で ITP 神経ペプチドと協調して、夕方の活動オフセットのタイミングを調整することが示唆された。 本研究により、4~6 個の DN1p 時計細胞の新たな機能を示すことができた。さらに、これまで機能が未知であった Trissin/TrissinR シグナル伝達経路が、ITP と協調して夕方の活動オフセットの調節に関与することを初めて明らかにした。			

論文審査結果の要旨

動物の概日時計の中枢は、脳に存在する複数の神経細胞によって構成されていることが明らかになっている。この神経細胞は「時計細胞」とよばれているが、時計細胞が正確に同定されている動物種は少なく、その神経回路の理解はほとんど進んでいない。小型の昆虫であるキイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) は、時計細胞を研究するモデル生物としてよく用いられてきた。先行研究により、脳内には約150個の時計細胞があり、10数種類の神経伝達物質が関与している可能性が示唆されている。しかし、個々の時計細胞の機能や、概日時計に関わる神経伝達物質の役割には、まだ不明な点が多い。

時計細胞の機能解析では、細胞特異的遺伝子発現制御法であるGAL4-UASシステムがよく用いられてきた。GAL4系統は、遺伝子操作を行う細胞を決定するトランスジェニックショウジョウバエである。しかし、概日時計の研究においては10数系統程度しか用いられておらず、すべての時計細胞を標的とした研究は行われていない。本論文では、59種類のGAL4系統を用いてほぼすべての時計細胞群に対して、時計遺伝子*period*のレスキュー実験を行った。その結果、同じ細胞群を標的にしたGAL4系統間でも、活動リズムの結果が異なることを明らかにした。つまり、複数のGAL4系統を用いることの重要性を示している。時計細胞の中で、脳片側で約15個あるDN1p時計細胞群は朝方と夕方の活動に関与していることが先行研究で示唆されていたが、本研究で、Cryptochrome遺伝子を発現する4~6個のDN1p時計細胞があれば、朝方と夕方の活動を制御できることを新たに発見した。また、そのDN1p時計細胞群は、恒暗条件下で複雑な自由継続リズムを生み出すことも明らかにした。

本論文ではさらに、LNd時計細胞群で発現する機能未知の神経ペプチドTrissinとその受容体であるTrissinRの機能解析を行った。解析の結果、TrissinとTrissinRは、夕方の活動終了のタイミングに関与することが明らかになった。さらに、LNd時計細胞群の別の神経ペプチドであるIon transport peptideも夕方活動に関与することが分かった。従って、LNd時計細胞群の神経ペプチドTrissinとIon transport peptideの機能を明らかにすることができた。

本論文は、キイロショウジョウバエの時計神経回路の理解を大きく進展させるものであり、博士論文に相応しいと認められた。また、発表および質疑応答の状況からも、申請者は博士の学位に値するものと判断された。