

|              |  |
|--------------|--|
| Title        | Establishment of TSH $\beta$ real-time monitoring system in mammalian photoperiodism |
| Author(s)    | 辻野, 薫里   |
| Citation     |  |
| Issue Date   |  |
| Text Version | ETD  |
| URL          | <a href="https://doi.org/10.18910/52289">https://doi.org/10.18910/52289</a>          |
| DOI          | 10.18910/52289   |
| rights       |  |
| Note         |  |

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

## 論文内容の要旨

辻野 薫里 (つじの かおり)

## 論文題名

Establishment of *TSH $\beta$*  real-time monitoring system in mammalian photoperiodism  
哺乳類光周性における*TSH $\beta$* リアルタイムモニタリング系の構築

## 論文内容の要旨

## 背景と目的

生物が季節変化に伴う環境変化に適応するために日長に反応して生理機能を変化させる現象を光周性と呼ぶ。生物は体内時計を基盤として外界の光の有無を感知することにより日長を測定していると考えられている。哺乳類では光受容器である網膜で光を感知したのち、光情報が体内時計中枢である視交叉上核、続いて松果体へと伝達される。松果体から分泌されるメラトニンは、その分泌パターンが夜の長さを反映することから、外界の光情報を伝達する物質の一つと考えられている。下垂体隆起葉(pars tuberalis; PT)ではメラトニン受容体が特異的に発現しており、さらに体内時計を構成する概日時計遺伝子が発現していることからPTで光情報と体内時刻情報を統合し日長測定していると考えられている。ウズラやヒツジ、マウスなどの飼育環境を短日条件から長日条件へ変化させると(長日刺激)、PTにおいて甲状腺刺激ホルモンベータサブユニット(*TSH $\beta$* )が上昇し、その産物である甲状腺刺激ホルモンはウズラの光周性反応である生殖腺発達を引き起こすことが明らかになった。メラトニン投与により*TSH $\beta$* が抑制されるという報告やメラトニン受容体と*TSH $\beta$* が同一細胞内で発現しているという知見からメラトニン受容体を介したメラトニン-*TSH $\beta$* 間のシグナル伝達が日長測定の主要経路の一つと考えられるが日長測定の分子メカニズムはほとんどわかっていない。そこで本研究では日長測定に関与する物質を簡便にスクリーニングすることが可能となる実験系の構築を目的とし、*TSH $\beta$* をマーカーとしてPTにおける*TSH $\beta$* 発現量の変動を簡便にモニターできる系(*TSH $\beta$* リアルタイムモニタリング系)を構築した。

## 結果と考察

*TSH $\beta$* 発現量の変動を定量的に評価できる実験系を構築するため、ホタルルシフェラーゼ(*Luc*)を*TSH $\beta$* 遺伝子座に挿入した*TSH $\beta$ <sup>Luc</sup>*マウスを作製した。*TSH $\beta$ <sup>Luc</sup>*マウスでは*TSH $\beta$* のATG直下の翻訳領域の一部を*Luc*に置換したため*TSH $\beta$* 遺伝子自体は破壊されている。ホモ接合型マウスでは成長遅延や不妊の表現型が観察されたが、ヘテロ接合型マウスと野生型マウスとの差は見られなかった。まず日長への反応性が*TSH $\beta$ <sup>Luc</sup>*マウスで見られるか調べるため、野生型マウスとヘテロ接合型マウスに長日刺激を与えたところ、野生型マウス、ヘテロ接合型マウスともに長日刺激によってPTにおいて*TSH $\beta$* が誘導された。さらに野生型マウスでは*Luc*が検出されなかった一方で、ヘテロ接合型マウスでは*Luc*も*TSH $\beta$* と同様に長日刺激によって誘導された。次に、作製した*TSH $\beta$ <sup>Luc</sup>*マウスのPTにおける発光が設計どおり観察可能であることを確認するため、ヘテロ接合型マウスのPT領域を含む脳スライス培養系(PTスライス)を作製し顕微鏡で観察したところ、成体マウス由来、新生仔マウス由来PTスライスともにPT領域で発光が検出された。続いて、PTスライスの長期間の定量的なモニタリングが可能か検討するために、微弱発光計測装置を用いて成体マウス由来PTスライスにおける*Luc*活性を経時的に測定したところ、4日間以上の持続した発光を検出することができた。PTスライスが*in vivo*と同様の光周性制御メカニズムを保持しているかどうか検証するため、PTの*TSH $\beta$* 発現を抑制する作用が報告されているメラトニンをPTスライスに添加したところ、*Luc*活性の減少が検出された。これらの結果はPTスライスがメラトニンに対する反応性を保持していることを示しており、PTスライスは外部刺激に対する*TSH $\beta$* の反応をモニターするのに有用であると考えられた。新生仔マウス由来PTスライスでも成体マウス由来PTスライスと同様に4日間の持続した*Luc*活性やメラトニンに対する反応性が確認できたことから、実験準備期間が短いなどの利点がある新生仔マウス由来PTスライスが*TSH $\beta$* 上流候補物質のスクリーニングに利用可能であることが示唆された。また、グルタミン酸がラットPTで*TSH $\beta$* を誘導することが報告されているため、グルタミン酸を新生仔マウス由来PTスライスへ添加したところ、一過的な*Luc*活性の上昇が観察された。この結果もPTスライスが*TSH $\beta$* 上流候補物質のスクリーニングに利用可能であることを支持している。

構築した系を用いて*TSH $\beta$* 上流候補物質のプレリミナリーなスクリーニングを実施した。細胞内cAMP濃度を上昇さ

せるフォルスコリンなど細胞内シグナル伝達に摂動を与える薬剤や、外界からの光情報をPTへ伝達する可能性が考えられたPT細胞外に存在する候補物質をPTスライスへ添加したが、残念ながらグルタミン酸以外にLuc活性を上昇させる物質を本研究では見出せなかった。以上の結果やラットPTでの報告からグルタミン酸はTSH $\beta$ 上流候補物質の一つであると考えられる。しかしグルタミン酸によるLuc活性上昇効果は弱く一過的であったため、*in vivo*で観察されるような十分なTSH $\beta$ 誘導にはグルタミン酸以外の物質も必要であると考えられる。本研究で構築したTSH $\beta$ リアルタイムモニタリング系はPT細胞分散培養や個体への脳室内投与後に遺伝子発現量を測定するといった既存の方法に比べて簡便に*in vivo*に近い環境でTSH $\beta$ 上流候補物質を選別できる強力なツールとなり、光周性分子メカニズムの解明に貢献するものと期待される。

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

| 氏 名 ( 辻野 薫里 )   |     |     |       |
|---|-----|-----|-------|
|   | (職) | 氏 名 |       |
| 論文審査担当者   | 主 査 | 教授  | 滝澤 温彦 |
|   | 副 査 | 教授  | 関口 清俊 |
|   | 副 査 | 教授  | 上田 泰己 |
|   | 副 査 | 教授  | 吉村 崇  |
| <b>論文審査の結果の要旨</b>   |     |     |       |
| <p>生物は体内時計を基盤として外界の光の有無を感知することにより日長を測定している。哺乳類では、光受容器である網膜で光を感知したのち、光情報が体内時計中枢である視交叉上核、続いて松果体へと伝達される。松果体から分泌されるメラトニンは、外界の光情報を伝達する物質の一つであり、下垂体隆起葉(pars tuberalis; PT)ではメラトニン受容体が特異的に発現しており、さらに体内時計を構成する概日時計遺伝子が発現していることからPTで光情報と体内時刻情報を統合し日長測定していると考えられている。ウズラやヒツジ、マウスでは、メラトニン受容体を介したメラトニン-甲状腺刺激ホルモンベータサブユニット (<math>TSH\beta</math>) 間のシグナル伝達が日長測定の主要経路の一つと考えられているが、日長測定の分子メカニズムはほとんどわかっていない。辻野さんは、日長測定に関与する物質を簡便にスクリーニングすることが可能となる実験系の構築を目的とし、<math>TSH\beta</math> をマーカーとしてPTにおける <math>TSH\beta</math> 発現量の変動を簡便にモニターできる系 (<math>TSH\beta</math> リアルタイムモニタリング系) を構築した。また構築した系を用いて <math>TSH\beta</math> 上流候補物質のスクリーニングを実施した。その結果、ラットでの報告と一致して、グルタミン酸が <math>TSH\beta</math> 上流候補物質の一つであることを見いだした。しかしグルタミン酸の効果は弱く一過的である事から、<i>in vivo</i> で観察されるような十分な <math>TSH\beta</math> 誘導にはグルタミン酸以外の物質も必要であると結論した。これらの成果は、新規に構築した <math>TSH\beta</math> リアルタイムモニタリング系が <i>in vivo</i> に近い環境で <math>TSH\beta</math> 上流候補物質を選別できる強力なツールであり、光周性分子メカニズムの解明に貢献するものと期待される。よって、本論文は、博士(理学)の学位論文として十分価値のあるものと認める。</p> |     |     |       |