

# 博士論文審査結果の要旨

学位申請者 稲 田 裕

主論文 1 編

Cell and tissue-autonomous development of the circadian clock in mouse embryos.  
FEBS letters (掲載予定)

## 審 査 結 果 の 要 旨

生体活動には約 24 時間周期の概日リズムが存在する。時計遺伝子と呼ばれる一群の遺伝子群はその転写活性において概日リズムを形成しており、生体リズム発振に深く関与している。哺乳類の発生過程において、このような時計遺伝子転写活性の概日リズムは初期胚ではみとめられず、胎生期に形成されることが知られているが、その詳細な出現時期及び形成プロセスについてはいまだ不明な点が多い。

申請者らは、様々な発生時期のマウス胎仔から得られた細胞および組織の培養、リズム観察を行い、母体や環境に由来する同調因子がない状況下での細胞、組織自律的な概日リズムの発生プロセスを明らかにすることを目的とした。

時計遺伝子の一つである *Per2* のプロモーターにルシフェラーゼ遺伝子をつないだレポーター (*mPER2::Luc*) をノックインした *mPer2Luc* マウスを使用した。

細胞レベルでの概日時計の形成時期を明らかにするため、まず E10.5 に採取した *mPER2Luc* マウス胎仔由来の細胞 (主に線維芽細胞) を一晚培養したところ、ディッシュ全体の発光にリズムはみとめられなかった。しかし、この細胞をさらに 6 日間培養したのちに同調刺激を加えたところ、E15.5 の胎仔由来の細胞培養で観察された生体リズムと類似した、明瞭なリズムが観察された。単一細胞レベルにおける培養でも同様の結果が確認された。したがってマウス胎仔の発生に伴う概日リズムの形成は、環境因子に依存しない細胞自律的なものであることが明らかになった。

次に、組織レベルでの発生過程におけるリズムの観察を行った。E13.5 から 17.5, P30 の各時点で採取した唾液腺組織片の器官培養、発光観察を行ったところ、E15.5 以降で概日リズムの出現を認めた。また、E13.5 で採取した組織を継続的に培養したところ、E13.5+6 日目よりリズムが観察された。以上の結果より、*in vitro* と *in vivo* との間でリズムの出現時期に違いは認められたものの、組織レベルにおいても分化に伴って自律的な概日リズムが形成されることが明らかになった。

次に E15.5 で採取した *mPer2Luc* マウス胎仔由来の線維芽細胞にリプログラミング因子を遺伝子導入し、発現誘導を行い、得られた 4 つの Cell line において多能性幹細胞マーカーである *Nanog* の発現を蛍光免疫染色で確認した。こうして得られたマウス胎仔由来の iPS 細胞株では、同調刺激を加えても明瞭なリズムは観察されなかった。しかし、分化誘導を行ったところ、分化誘導開始 14 日後には 4 つの cell line 全てにおいて概日リズムが観察された。

以上が本論文の要旨であるが、胎生初期中期 (E10.5) 頃までの胎仔細胞には概日時計の発振が認められないこと、しかし分化に伴い、細胞及び組織自律的に明瞭な振動が形成されることを明らかにした点に加え、ルシフェラーゼを用いた生体細胞ライブイメージング手法が、生きた細胞や組織の発生分化過程をリアルタイムに観察評価できる系として有用である可能性も示しており、医学上価値ある研究と認める。

平成 26 年 2 月 20 日

審査委員 教授 奥 田 司 ㊟

審査委員 教授 伊 藤 義 人 ㊟

審査委員 教授 加 藤 則 人 ㊟