

【課程外】

博士（人間科学）学位論文 概要書

**ハムスター体内時計の光同調機構および非光同調機構の
分子メカニズムとそれらの相互作用に関する研究**

**Molecular mechanism of photic and non-photoc entrainment in
hamster biological clock, and interaction between photic and
non-photoc entrainment**

2005 年 7 月

早稲田大学大学院 人間科学研究科

横 田 伸 一

Yokota, Shin-ichi

体内時計は生物が外部環境に適応するために獲得した基本的な生理機構と考えられる。体内時計の本体は視床下部の視交叉上核 (SCN) に存在し約 24 時間周期の自律変動を繰返して睡眠 覚醒、ホルモン分泌など様々な内因性リズムを調節している。哺乳動物においては、体内時計の発振周期は一連の時計遺伝子群、なかでも *Period* 遺伝子 (*Per1*, *Per2* および *Per3*) とその転写・翻訳産物である PER 蛋白質により形成される負のフィードバックループが中心となり、安定した概日リズムが発振されていると考えられている。ところで、体内時計は概日リズムを発振する一方で、外界からの時刻情報に瞬時に同調することが可能である。近年、リズム障害を症状とする様々な疾患の治療においても体内時計の発振や同調機構の異常の改善が重要であると指摘されている。時計の同調機構を解明することは、生物が保存してきた根源的な生理機構の解明に寄与するのみならず、創薬などの臨床応用にも役立つ知見を与えてくれると考えられる。私はこのような視点に立ち、哺乳動物であるハムスターを用いて体内時計の同調機構における分子メカニズムの解明を目指し以下の研究を遂行した。

SCN は網膜から直接グルタミン酸神経の投射を受けており、SCN に発現した NMDA 受容体を介して一過的な細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が起こることが知られている。細胞内への Ca^{2+} 流入を第一段階とし、最終的に *Period* など時計遺伝子の転写調節が誘導されることが光同調の完了であると考えられるが、その間のセカンドメッセンジャー系については未だ不明な点が多い。カルモジュリン依存的蛋白質燐酸化酵素 II (CaMKII) は海馬の神経可塑性発現への関与などでも知られる多機能性蛋白質であるが、光同調機構においても重要な役割を果たしている可能性が考えられる。光シグナルの入力経路として Ca^{2+} 流入 カルモジュリン活性化 CaMKII 燐酸化 CREB 燐酸化 時計遺伝子の発現、という経路が考えられるのである。そこでこの点を解明する目的で、CaMKII 阻害薬を用いた行動薬理学的実験、CaMKII の燐酸化抗体を用いた免疫組織化学の実験、および *in situ* hybridization 法により SCN 内の *Period* 遺伝子を定量する分子生物学的実験を行った。その結果、CaMKII 阻害薬が光照射により惹起される行動リズムの位相変化を用量依存的に抑制すること、光照射により SCN 内で迅速な CaMKII の燐酸化が引き起こされること、光照射による一過的な SCN での *Per1* および *Per2* の発現上昇が CaMKII 阻害薬により抑制されることが明らかとなり、光同調の分子機構の一端を明らかにすることができた。

非光同調とは光以外の刺激による体内時計の同調のことであり、明期にこの種の刺激を受けたときのみ行動リズムの位相前進が惹起される。ところで、光同調時には SCN 内で *Per1* および *Per2* の発現上昇が誘導され、それ以降の遺伝子および蛋白質の発現ピークがずれることで時計の同調が起こると考えられているが、非光同調時の時計遺伝子の発現については不明な点が多い。そこで非光同調刺激薬のひとつであるベンゾジアゼピンのプロチゾラム (BRZ) を用いて、非光同調時の SCN での *Period* 遺伝子の発現を調べるとともにベンゾジアゼピンの作用点と考えられる GABA 受容体の非光同調における関与について検討した。すなわち、BRZ 投与後の行動リズムおよび SCN での *Period* 遺伝子の発現量を定量し、さらにセロトニン 1A/7 受容体作動薬の 8-OH-DPAT と BRZ の同時投与の効果調べた。BRZ の投与により行動リズムの位相変化と SCN 内の *Per1* および *Per2* の発現減少が起こることが明らかとなり、非光同調機構において GABA 神経系が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。また BRZ と 8-OH DPAT の同時投与で相加的效果が生じなかったことから GABA 刺激薬の BRZ とセロトニン作動薬の 8-OH DPAT とでは一部で共通した細胞内情報伝達機構を介して非光同調を惹起している可能性が示唆された。

光同調と非光同調は互いに抑制し合うことが知られている。そこで BRZ の前投与が光照射による行動リズムおよび *Period* 遺伝子の発現上昇にどのような影響を与えるか検討した。その結果、光照射による行動リズムの位相前進と SCN 内での *Per1* および *Per2* の発現上昇がいずれも BRZ により拮抗されたことから、行動上に現れる光同調と非光同調の相互作用が SCN 内での *Period* の発現量の相殺によって説明できる可能性が明らかとなった。以上の研究を通して、光同調と非光同調の時計遺伝子発現に対する相違や相互作用の理解が進み、体内時計の異常と創薬の研究が進展するものと確信する。