

2005年6月25日

人間科学研究科長 殿

横田伸一氏 博士学位申請論文審査報告書

横田伸一氏の学位申請論文を下記の審査委員会は、人間科学研究科の委嘱を受け審査をしてきましたが、2005年6月25日に審査をしましたので、ここにその結果をご報告します。

記

1. 申請者氏名 横田伸一
2. 論文題名 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
3. 本論文の主旨、概要、評価 別紙記載

4. 横田伸一 氏 博士学位申請論文審査委員会

主審査委員	早稲田大学教授	医学博士（順天堂大学）	山内 兄人
審査委員	早稲田大学教授	薬学博士（九州大）	柴田 重信
審査委員	早稲田大学教授	理学博士（東京大）	木村 一郎
審査委員	早稲田大学教授	医学博士（九州大）	小室 輝昌

以上

1. 本論文の主旨

ハムスターの体内時計は、光刺激にリセットされるが、GABA/ベンゾジアゼピン系化合物やセロトニン受容体刺激薬でもリセットされることが知られている。前者は光同調と呼ばれ、後者は非光同調とも呼ばれている。光同調が夜の始まりに位相後退と夜の終わりに位相前進を起こすのに対して、非光同調は昼間に作用し位相前進を起こすなど、この2つの同調は作用する時間帯が異なることがわかっている。また光刺激では時計遺伝子である *Per1* と *Per2* の視交差上核での発現は急速に増大するが、非光同調時には逆に発現が急速に低下するなど、遺伝子発現に対する効果が逆向きであることが知られている。しかしながら、これらの遺伝子発現に関わる、細胞内シグナル伝達機構については全く不明であった。そこで第1章では光刺激によるハムスター輪回し行動リズムの位相変化と、それに伴う時計遺伝子 *Per1*, *Per2* の視交叉上核での発現上昇が、カルモジュリン依存的蛋白質リン酸化酵素 II (CaMKII) を介する細胞内シグナル伝達で制御されることを、行動解析、免疫組織化学、ウエスタンブロッティング、in situ hybridization 法など、種々の実験手法を駆使して明らかにした。さらに、第2章では光刺激と薬物投与による位相変化作用が、同時処置により、どのように変容するかについて、輪回し行動と時計遺伝子 *Per1*, *Per2* の発現を指標として調べ、この2種類の体内時計リセットの相互作用メカニズムを明らかにした。このように本論文は、光刺激による体内時計同調に CaMKII というリン酸化酵素の働きが重要であることを世界に先駆けて明らかにした。また、本論文は光同調と非光同調の相互作用を遺伝子発現レベルで明らかにした。

2. 本論文の概要

ほとんどの生物が持つ機能の一つとして、概日リズムと呼ばれる約24時間を1周期とするリズム変動がある。概日リズムは生物の体内にある時計(体内時計)によって刻まれる内因性リズムで、睡眠や体温などのさまざまな生理現象で観察することができる。体内時計の発振機構は時計遺伝子を中心とした分子機構により動いていることが分かってきた。体内時計の本体は視床下部の視交差上核(SCN)に存在する。哺乳類においては、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

つ知見を与えるものと考えられる。このような視点に立ち、哺乳類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。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 磷酸化 CREB 磷酸化 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 の磷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 の磷酸化が引き起こされ、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。

3 . 本論文の評価

本研究は、体内時計の光同調機構について、光入力から *Per1* および *Per2* の遺伝子発現にいたるまでの細胞内シグナル伝達機構に着目した研究で、Ca²⁺流入 カルモジュリン活性化 CaMKII 磷酸化 CREB 磷酸化 時計遺伝子の発現増大という、一連のシグナルカスケードを明らかにした。本研究の英文論文は現在のところ被引用数が 26 回であるなど、非常に注目されている研究内容である。また、光同調と、非光同調の相互作用を、分子レベルで明らかにする研究を行ない、*Per1* および *Per2* の遺伝子発現レベル及び行動レベルでの相互作用すなわち、光同調効果が、非光同調刺激を前処置することにより、減弱されることを明らかにしたことは、注目に値する。しかしながら、減弱の分子メカニズムは明らかにされていないなど、未だ解決されていない問題点も残るものの、体内時計研究に新しい視点を提供している。

本論文はこのような未解決問題を残してはいるものの、先に述べてきたように、生命科学分野の研究発展に貢献することから、博士（人間科学）の学位を授与する事に十分値すると判断される。

2005年6月25日

主審査委員 早稲田大学教授 医学博士（順天堂大学）山内 兄人

審査委員 早稲田大学教授 薬学博士（九州大） 柴田 重信

審査委員 早稲田大学教授 理学博士（東京大） 木村 一郎

審査委員 早稲田大学教授 医学博士（九州大） 小室 輝昌