

2002年12月25日

人間科学研究科委員長 殿

浅井 良氏 博士学位申請論文審査報告書

浅井 良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うけ審査をしてきましたが、2002年12月25日に審査を終了しましたので、ここにその結果をご報告します。

記

1. 申請者氏名 浅井 良
2. 論文題名 *Per 1*¹⁻¹¹の遺伝子発現動態を指標とした体内時計の位相変化と老化の研究
3. 本論文の主旨、概要、評価 別紙記載

4. 浅井 良氏 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	薬学博士 (九州大)	柴田 重信
査審査員	早稲田大学教授	医学博士 (九州大)	小室 輝昌
審査委員	早稲田大学教授	理学博士 (北海道大)	山元 大輔

以上

1. 本論文の主旨

本論文は *Per1* 遺伝子の発現誘導を指標として、インビトロの系で視交叉上核の体内時計の同調機構を詳細に検討した研究と、老化による体内時計の機能低下を世界に先駆けて調べた研究からなる。光による行動の位相変化の起きる時刻に光を照射することによって、視交叉上核における *mPer1*, *mPer2* mRNA の発現量が一過性に増加することから、光による概日リズムの位相変化には視交叉上核における *mPer1* の一過性の発現が重要であると考えられている。本論文では *mPer1* のプロモーター領域を持つルシフェラーゼの遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウスを用いて、インビトロで長期にわたるリアルタイムでの観測が可能な実験系を確立し、光の神経伝達にかかわるグルタミン酸受容体刺激薬を投与した際の生物発光のリズムの変化を観察することで、概日リズムの位相変化における *mPer1* 遺伝子の発現の詳細を検討した。その結果、本実験系により、視交叉上核における光同調は2-3時間以内に完了するというまったく新しい知見が得られた。このように本実験系が、光同調に影響を及ぼす薬物の探索などに有用な方法になることが示唆された。ところで、概日リズムにも他の生理現象と同様に、ある時期から老化による障害が現れる。老化によるリズム障害については、行動レベルから細胞レベルまでの研究はなされてきたが、体内時計遺伝子の発現レベルで調べた研究はいまだなされていなかった。そこで老齢動物を用い、老化によるリズム障害は体内時計の発振機構や光の同調の分子機構の障害で起きているのではないかという仮説のもと、体内時計遺伝子の発現に対する老化の影響を検討した。その結果、老化は体内時計の発振にはほとんど影響を及ぼすことなく、光同調に障害を及ぼすことから、これを改善する方法を見出すことが老化による体内時計機構の失調を改善できることを示唆した。

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のリズムで、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。哺乳類においては、体内時計は脳の視床下部領域にある視交叉上核と呼ばれる左右一対の神経核であることが知られている。1997年、概日リズムの形成に関連している遺伝子 *Clock* がマウスで発見され、それ以降 *BMAL1* や既にショウジョウバエにおいて見つかった *Period* (*Per*)、*Timeless* (*Tim*)、*cryptochrome* (*Cry*) のホモログなどの体内時計遺伝子が次々とクローニングされ、現在に至っている。哺乳類におけるこれらの体内時計遺伝子がどのように機能することで概日リズムが形成されているかは、いまだ断定されていないが、現在 *Per* を中心としたフィードバックモデルが概日リズムの発振周期形成モデルとして提唱されている。視交叉上核は概日リズムの発振を形成するだけでなく、外界の明暗周期に

概日リズムを同調させる機構も備えている。中でも重要なのは光による概日リズムの位相変化（光同調）である。目から入った外界の光は網膜によって受容され、網膜から視交叉上核へ投射しているグルタミン酸神経の経路、網膜視床下部路を介して視交叉上核へと伝えられ、概日リズムの位相を変化させる。光同調においては、光を当てた時の体内時計の時刻によって位相の変化量や、位相が前進するか後退するかなどが変わることが知られている。光による概日リズムの同調においてもリズム発振と同様に遺伝子レベルでの研究が進められている。光による行動の位相変化の起きる時刻に光を照射することによって、視交叉上核における *mPer1*, *mPer2* mRNA の発現量が一過性に増加したという報告があるものの、連続的に測定することが不可能であることから、同調時の *mPer1* の変化の詳細については不明なままである。

第一章では、*mPer1* のプロモーター領域を持つルシフェラーゼの遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウスを用いて、インビトロで長期にわたるリアルタイムでの観測が可能な実験系を確立し、光の神経伝達にかかわるグルタミン酸受容体刺激薬の NMDA を投与した際の生物発光のリズムの変化を連続的に観察することで、概日リズムの位相変化における *mPer1* 遺伝子の発現の詳細を検討した。今回の実験系は、視交叉上核以外の部分からの発光が視交叉上核からの発光よりも弱いため、視交叉上核における *mPer1* 遺伝子の転写活性を評価するのに適していると言えた。培養した視交叉上核からの発光は強い概日性の振動を示し（最高値/最低値=6.39±0.35, n=26）、その振幅はインビボでの *mPer1* mRNA の振幅に匹敵するものだった。レポータージーンが遺伝子発現の変化に素早く反応するにはその半減期が短い必要がある。そこで、今回の実験系におけるルシフェラーゼ蛋白質の半減期を調べるため、培養液にサイクロヘキサマイド（10 μg/ml）を加え、蛋白質の合成を阻害した。その結果、発光の半減期は 1.4 時間であり、概日リズムを調べるには十分な速さの半減期であった。視交叉上核培養における概日リズムが位相変化する時、*mPer1* 遺伝子の転写活性がどのように変化するかをより詳細に検討するため、NMDA を投与して位相変化がおきている周期の生物発光と、その前の周期の通常状態での生物発光の波形を比較した。ピークから 6 時間後に NMDA を投与した時、生物発光の波形は NMDA 投与後 2 時間以内に、2-3 時間遅く現れた。ピークから 12 時間後に NMDA を投与した時、生物発光の波形は NMDA 投与後 2-3 時間以内に、約 1 時間早く現れた。

第二章では老化による概日リズムの振幅の低下や、位相のずれなどが視交叉上核の体内時計遺伝子レベルで起こっている可能性を、老齢ラットの *rPer1*, *rPer2*, *rCry1* mRNA の概日リズムを、*in situ* ハイブリダイゼーション法と RT-PCR 法を用いて解析した。また、視交叉上核からの出力として、室傍核と松果体における *rPer1* mRNA の日内発現リズムに対する老化の影響についても調べた。これらの部位の時計遺伝子発現に老化の影響は見られなか

った。一方、光照射による視交叉上核の Per 遺伝子発現は老化により減弱した。すなわち、老化によるリズム障害には、主に光同調障害を改善する方法の開発が重要であることが示唆された。

3. 本論文の評価

本研究は、視交叉上核の体内時計発振機構を遺伝子の発現レベルで連続的に観察できる系を世界に先駆けて確立したことである。従来は視交叉上核からの活動電位の放電頻度を連続的に観察する方法が主流である。Na イオンチャンネルの阻害薬で神経放電が停止するなど、放電頻度リズムは遺伝子発現の下流である出力系をより反映したリズムである。一方、本研究方法の確立により、視交叉上核の体内時計機構が遺伝子レベルの制御下に、連続的にかつ直接的に観察可能となった。実際、本研究方法を開発したことが、光同調が 2-3 時間以内に完了するという画期的発見にも結びついた。従来動物行動の光による同調は、行動リズムが日の単位で測定する実験系であるため、実際どのような時間経過で同調が完了するのかが不明であった。本研究から、予想より早い時間経過で終了することから、同調に影響を及ぼす薬物の開発などに大いに役立つ情報を提供するのみならず、この研究方法で、そのような薬物の発見がより可能であろう。

また、体内時計発振、同調への老化の影響を調べた本研究は、予想と異なった研究成果を生み出した。すなわち、視交叉上核、室傍核、松果体という体内時計の発振・出力系にかかわる場所での時計遺伝子発現は老化の影響をまったく受けなかった。すなわち、老化による睡眠リズム障害などは時計遺伝子の下流の障害であることを示唆した。一方、光同調は老化により顕著に障害を受け、このことが老化による夜間徘徊、時差ぼけの重症化に関与する可能性を示唆した。本研究は世界で最初に発表された研究で、その後類似した結果が 2 つの論文に発表された。このように、本論文は体内時計の研究分野にあっては非常に重要な発見となっているが、まだ、未解決部分も残っている。例えば、光以外の同調でも短時間で終了するのか、あるいは老化動物の光同調低下の分子機構、といった問題は不明なままである。したがって、この問題解決は体内時計研究の応用的研究にも、また、分子機構解明にも大事であろう。

本論文はこのように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。

2002年12月25日

審査員（主査）	早稲田大学教授	薬学博士	（九州大学）	柴田重信
	早稲田大学教授	医学博士	（九州大学）	小室輝昌
	早稲田大学教授	理学博士	（北海道大学）	山元大輔

