

審査の結果の要旨

氏名 田宮 寛之

本研究は概日振動に必須の遺伝子であり、光依存的な発現誘導が同調機構において重要な役割を果たしているPer1とPer2の協調機構を明らかにするため、新たな実験系の構築とそれに基づく解析を行ったものであり、下記の結果を得ている。

1. 視交叉上核での光刺激による概日リズムの位相応答においては cAMP (cyclic adenosine monophosphate) 経路が重要である。NIH3T3 線維芽細胞において cAMP 経路を刺激すると、Per1 mRNA 発現量は刺激直後に上昇し、すぐにベースラインへと戻るのに対し、Per2 mRNA 発現量は緩徐に上昇し、上昇が持続するというように、遺伝子発現パターンが異なっていることを示した。
2. 野生型(WT), Per1(+/-), Per1(-/-), Per2(+/-), Per2(-/-)各々の雄マウスを各6-10匹恒常明条件下で2週間飼育したところ、Per1(-/-)の周期長が27.9時間、Per1(+/-)が26.6時間、WTが25.4時間、Per2(+/-)が24.9時間、Per2(-/-)が22.8時間であった。即ち恒常明条件下での周期長はPer1とPer2の量比に依存しており、Per1には短周期親和性が、Per2には長周期親和性があることを示した。
2. WT, Per1(-/-), Per2(-/-)の雄マウスを12匹ずつ4週間恒常明条件下で飼育し、多くのマウスで無周期化が起こるとされる2週間後から4週間後の行動リズムの周期性を定量したところ、WTのマウスでは周期性がほぼ消失していたのに対し、Per1(-/-), Per2(-/-)の各々のマウスでは、周期性が残存していた。即ち、恒常明条件下での周期性消失はPer1, Per2の片方が完全にないと起こりにくい事を示した。
3. 個々の遺伝子型のマウスの緩徐な光変化に対する応答性を確認する為、12灯用LED光照度制御装置を開発し、1分間隔の時間解像度で256段階の任意のパターンの光をマウスに照射した際の概日リズム応答を、赤外線センサーを用いて検出可能な系を構築した。この装置を用いてWT, Per1(-/-), Per2(-/-)の各6匹の雄マウスに対し、22時間から27時間周期の1時間間隔の緩徐に変化する光を各々2週間ずつ照射したところ、WTと比較してPer1(-/-)は長周期側に、Per2(-/-)は短周期側に同調可能な周期の幅が広がった。また、最も同調出来る周期長の範囲が24時間周囲に限定されているのがWTであり、Per1とPer2は協調して働いている事が示された。
4. ES細胞は概日リズムを持っていないがレチノイン酸を用いて分化誘導をすると概日振動が発現することが報告されている事に着目し、この実験プロトコールの様々なパラメータを幅広く条件検討した。その結果、ES細胞から最大10周期分の明瞭な発光の概日振動を検出し、小さな誤差で周期を測定可能な実験プロトコールを確立した。
5. Per2 ノックアウト ES細胞の第6染色体 Rosa 26 に Per2 遺伝子のターゲッティングベクター

を用いて挿入し、これらのES細胞を分化誘導することで、約24時間周期の振動を検出する事に成功した。更に、Per2が原因遺伝子である睡眠相前進症候群(familial advanced sleep phase syndrome: FASPS)の変異体(S659G)を導入すると、独立した2つのES細胞クローンで約20時間周期の概日振動が検出され、個体同様に周期短縮が見られることを確認し、FASPS変異体の周期短縮を細胞レベルで再現することに成功した。

6. 上述の実験系において既知の2つの変異体(mut6変異体: S662A/ S665A/ S668A/S670A/S671A/T672A, β -transducin repeats-containing proteins (β -TrCP)結合部位変異体: S477A/G479A)を確認したところ、 β TRCP変異体では大きな周期変化が見られないのに対し、mut6変異体ではFASPSとほぼ同程度の周期短縮が観察され、この実験系はFASPS以外の変異体の評価にも使用可能な汎用性の高い実験系である事も示された。

7. 上述の実験系においてPer2の翻訳領域を導入しない対照では、振動が弱く周期長も短い為、Per2とPer1の協調性は細胞レベルでも重要である事が示唆された。次に、Per2プロモーター下にPer1とLuciferaseの融合遺伝子をコードする翻訳領域を導入したところ、振動はするものの1時間以上の周期短縮が見られ、Per1の短周期親和性、Per2の長周期親和性は蛋白レベルの違いによるものである事が示唆された。

8. NIH3T3にPER2蛋白の野生型とPER2蛋白のFASPS変異体にLuciferaseを融合したプラスミドをトランスフェクションし、翻訳阻害剤であるシクロヘキシミドを添加して半減期を測定したところ、PER2のWTは半減期が200分程度であったのに対し、PER2のFASPS変異体は半減期が160分程度であり、半減期の短縮が見られた。一方、この実験系においてPER1は予想に反し、半減期が260分程度と長かった。PER1の短周期親和性のメカニズムとFASPSの周期短縮のメカニズムは独立のメカニズムによるものである事が示唆された。

9. 視交叉上核で発現の高いSox9をNIH3T3線維芽細胞でノックダウンすると、内因性のPer1の発現量に影響なくPer2の発現量を減少させることができることを示した。

以上、本論文は短周期親和性のPER1蛋白と長周期親和性のPER2蛋白は協調し、非生理的な環境条件下において概日周期長を24時間に限定する役割を持っている反面、低柔軟性のため病的破綻(外環境への追従不能や無周期化)しうる事を示した。また、任意のパターンの光を照射した際の個体レベルの概日リズムが測定可能な12灯用LED光照度制御装置、細胞レベルで正確に周期長を測定可能なES分化誘導系、FASPS変異体の周期短縮を初めて細胞レベルで再現可能なPer2ノックアウトレスキュー系の3つの新しい実験系を構築することにより、Per1とPer2の協調性の重要性を個体レベルと細胞レベルで証明する事が可能となった。本研究はこれまで未解明な点の多かったPer1とPer2の協調機構を明らかにし、更に汎用性の高い新規実験系の構築にも成功しており、学位の授与に値するものと考えられる。