

# 論文審査の結果の要旨

氏名 笠原 和起

多くの生物は、約 24 時間周期で自律的に発振する概日時計を体内に持っており、その重要な特性のひとつに、外界からの光刺激による時刻(位相)の調節がある。本論文は、ニワトリの松果体細胞に発現している光受容分子ピノプシンに着目し、ピノプシンと共役する G タンパク質の同定を通じて概日リズムに関わる光情報伝達経路を解明しようとしている。

1980 年代に行われた実験により、光刺激は互いに異なる光情報伝達経路を介して 2 種類の効果をニワトリ松果体細胞に与えることが示唆されていた。本論文ではまず、松果体細胞の培養法や分泌されるメラトニンの検出系を改良し、その追試を行っている。その結果、2 つの光効果のうち、メラトニン合成を急性に抑制する効果は百日咳毒素 (PTX) によって阻害されるが、概日時計の位相をシフトする効果は PTX の影響を受けないことを確認した。このことから、PTX に対して感受性の異なる 2 種類の G タンパク質が 2 つの光効果をそれぞれ伝達していると推測し、以降の解析を行っている。

はじめに、ニワトリ松果体に発現している G タンパク質  $\alpha$  サブユニット ( $G\alpha$ ) を遺伝子クローニングによって検索し、 $G\alpha$  をコードする 5 種類の cDNA を単離している。そのうちのひとつは、哺乳類の桿体視細胞においてロドプシンと共役しているトランスデューシン ( $Gt_1\alpha$ ) に高い相同性を示していた。ニワトリ網膜から桿体型および錐体型トランスデューシン ( $Gt_1\alpha$  と  $Gt_2\alpha$ ) をコードする cDNA をそれぞれ単離し、松果体に発現しているトランスデューシンが  $Gt_1\alpha$  と同一の分子であることを明らかにした。また、ここで得られた 5 種類の  $G\alpha$  は、そのアミノ酸配列から、いずれも PTX 感受性の  $G\alpha$  であろうと推定している。さらに論文提出者は、文献の中からいくつかの重要な知見を見出し、イノシトールリン脂質代謝ならびにカルシウム動員を介する情報伝達経路に着目した。この経路が松果体細胞や視細胞において光情報の伝達を担っているならば、PTX 非感

受性の Gqファミリー ( $G_{q\alpha}$  や  $G_{11\alpha}$ ) がオプシンと共役しているのではないかと推測した。そこで、RT-PCR・ノザンブロットおよびウエスタンブロット解析により、ニワトリ松果体や網膜に  $G_{11\alpha}$  が発現していることを明らかにした。さらに、cDNA の配列をもとに、ニワトリ  $G_{11\alpha}$  は PTX の基質とならないことが確認されている。

次に、ニワトリ松果体を用いた免疫組織化学的解析を行い、これまでに cDNA を単離した 6 種類の  $G\alpha$  のうち、 $G_{t1\alpha}$  (PTX 感受性) と  $G_{11\alpha}$  (PTX 非感受性) の 2 種類がピノプシンと共存している可能性を示した。また、ニワトリ網膜視細胞においても、ロドプシンや色覚オプシンが局在している外節に抗  $G_{11\alpha}$  抗体に対する陽性像を見出し、松果体細胞だけでなく視細胞における  $G_{11\alpha}$  とオプシンの共役についても論じている。 $G_{t1\alpha}$  が松果体の光情報伝達を担っていることを示すため、トリプシンプロテクションアッセイ法を応用して調べている。 $GTP\gamma S$  を加えた場合のみ、光刺激依存的に活性型  $G_{t1\alpha}$  に由来するトリプシン消化断片が検出され、松果体  $G_{t1\alpha}$  が松果体に存在する光受容タンパク質 (おそらくはピノプシン) によって活性化されたと議論している。また  $G_{11\alpha}$  は、これまで脊椎動物のオプシンとの共役が全く知られていなかったため、免疫沈降法を用いてロドプシンとの相互作用を解析している。その結果、 $G_{11\alpha}$  は光刺激依存的・GTP 依存的にロドプシンと解離・会合することを明らかにした。これと同様の現象は、ロドプシンとの共役がよく知られた  $G_{t1\alpha}$  の場合にも観察されたことから、オプシン型光受容タンパク質はトランスデューシンだけでなく  $G_{11\alpha}$  とも共役している可能性が強く示唆された。

最後に、 $G_{11\alpha}$  を介する細胞内情報伝達経路が時計発振系に入力しているかどうかを検討している。 $G_{11\alpha}$  を特異的に活性化するために、ムスカリン性アセチルコリン受容体 m1 サブタイプをニワトリ松果体細胞に発現させ、カルバコールで刺激するという実験系を構築した。その結果、光を照射した場合と同様にメラトニン分泌リズムの位相がシフトすることを見出し、 $G_{11\alpha}$  を介した伝達経路は概日時計の発振系に入力して位相のシフトを引き起こすことを示した。

以上の一連の解析を通じ、本論文は、2種類の  $G\alpha$  ( $G_{t_1}\alpha$ と  $G_{11}\alpha$ ) がピノプシンから光情報をそれぞれ受け取っている可能性を主張している。そのうち、 $G_{t_1}\alpha$ は光によるメラニン分泌の急性抑制に関わっていると考察されている。また本論文の結果は、「オプシン- $G_{11}\alpha$ 」という新規の光情報伝達経路が概日時計の光入力系として働いていることを強く示唆しており、概日時計の光位相調節を解明する上で重要な端緒になると評価できる。

なお、本論文は、岡野俊行、山崎一恭、深田吉孝との共同研究であるが、論文提出者が主体となって研究を行ったものであり、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士(理学)の学位を授与できると認める。