

審査の結果の要旨

氏名 沼野 利佳

本研究の目的は、2点である。まず、*Per1* 遺伝子発現の日周リズムを失調させた *Per1* 強制発現トランスジェニック動物を作製し、*Period1(Per1)* 発現日周振動が概日リズム形成において果たす機能を解析した。次に、*Per1* プロモーターとルシフェラーゼとの融合遺伝子を用いたトランスジェニック動物を作製し、*Per1::luc* 発現日周振動を指標に光サイクルの位相変化に対する各組織の光同調能の違いを明らかにした。これらにより、以下の結果を得ている。

1. 組織特異性のない *EF1a(Elongation factor 1 a)* Promoter と、神経特異的に発現する *NSE (Neuron specific enolase)* Promoter を mouse *Per1(mPer1)* に連結させたトランスジェニックラットを作製した。その結果、輪回し行動リズム、活動量リズム、体温リズムの周期が野生型に比べて約 1 時間長くなる、または無リズムになる計 3 系統が得られた。さらに、活動量リズム、体温リズムは明暗条件下で相対的協調を示すことから、これらのトランスジェニック動物の概日時計は、光同調機能が欠如していることが判明した。以上の結果から、哺乳類の概日リズムの形成には *Per1* の約 24 時間周期の自律的な発現振動が重要であること、概日リズムの光同調には *Per1* の視交叉上核(SCN)における一過的な発現誘導が機能することが示された。
2. 作製した *Per1* 強制発現トランスジェニック動物では、概日リズムの中枢である SCN と眼球において *Per1* 遺伝子の転写量が常時、高レベル(野生型の転写量ピークの2倍から7倍)に維持されていることを確認した。また、内在性 *Per1* や *Per2* の転写レベルが SCN と眼球、双方で野生型に比べて振幅が減少し、且つ常時抑制されていた。これらの結果から、*Per1* は直接または間接的に *Per1* と *Per2* の発現を負に制御していることが示された。
3. *mPer1* のエクソン 2 までの約 6.7kb プロモーター領域に、ルシフェラーゼレポーターを連結させた融合遺伝子 *Per1::luc* を導入したトランスジェニックマウスとラットを作製した。作製したトランスジェニック動物の SCN や末梢組織の *mPer1* の発現を測定することで SCN と末梢組織のリズムを同一手法で測れる *in vitro* 実験系を構築した。
4. 構築した *Per1::luc* トランスジェニックラットの SCN スライス培養では、約 24 時間周期のルシフェラーゼ発現振動が約 32 日間維持された。一方、培養した肝臓、肺、骨格筋でも *in vivo* と同様、SCN に比べ約 7 時間から 11 時間遅れた約

24 時間周期のルシフェラーゼ発現振動を示した。しかし、この発現日周振動は SCN と違い 2 から 6 サイクルで減衰した。即ち、培養 SCN では自律的な *Per1::luc* 発現日周リズムは安定に維持されること、また、生体では、未知の因子が末梢組織の *Per1::luc* 発現日周リズムの維持に必要であることが示唆された。

5. *Per1::luc* トランスジェニックラットの飼育光サイクル（明:暗=12 時間:12 時間）を 6 時間位相前進または位相後退させ、移行期の長さ（新たな光サイクルに同調するまでに要する期間）を行動リズム及び各組織の *Per1::luc* 発現日周リズムを指標に測定した。SCN では位相前進と位相後退両方において光環境の変化後 1 日で位相修正ができるのに対して、行動リズムの位相同調は前進では約 6 日、後退では約 2 日要する。また、末梢組織の *Per1* 発現日周リズムは位相修正に 2 日から 6 日間を要することが判明した。この結果から、SCN は光環境変化に即座に反応する概日リズムオシレーターを有し、末梢組織と行動リズムは、新たな概日リズムへ移行するのに SCN よりも時間を要することが示された。即ち、光環境が大きく変化したときに生じる、いわゆる時差ボケにおいて、SCN とその他の組織の概日リズムが脱同調していることが明らかになった。

以上、本論文は、哺乳類概日リズム形成では *Per 1* の日周発現や光による転写誘導が必要であることを示した。さらに、SCN は光環境変化に即座に反応する自律的な概日リズムオシレーターを有し、末梢組織は SCN の制御を受けて概日リズムを維持すること、この SCN とその他の組織の概日リズムの脱同調が時差ボケをひきおこす原因であることを解明した。本研究はこれまで不明な哺乳類サーカディアン制御機構の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値すると考えられる。