

論文審査の結果の要旨

氏名 林 勇一郎

本論文は4章からなり、第1章は序論、第2章は方法を記している。第3章（結果）と第4章（考察）は共に前半と後半からなり、それぞれERKとp38が概日時計において果たす役割について述べられている。

まず第1章では、概日時計は生物の概日リズムを生み出す体内時計であり、約24時間周期で自律的に発振する性質を持つこと、概日時計の位相は外界の光情報に回答してシフトすることが述べられている。また、ニワトリ松果体細胞は、単一細胞内に時計発振機能と光受容能を併せ持つことから、光位相シフト機構の研究材料として好適であることが説明されている。さらに先行研究から、ニワトリ松果体の概日時計においてはMAPキナーゼが光位相シフトに関与する可能性が考えられ、これを検証することが本研究の目的であると述べている。

第3章前半ではまず、ニワトリ松果体においてチロシンリン酸化量が光刺激依存的に変動する蛋白質を探索した結果、MAPキナーゼファミリーに属する分子ERK2のチロシンリン酸化量が光刺激依存的に減少することを示している。加えて、ニワトリ松果体ERK2のリン酸化量は恒暗条件下において日周変動することを示している。続いて時刻依存的にERK2をリン酸化するメカニズムを調べ、Ras-MAPK経路を構成するRas、Raf-1、MEKの活性化型分子の量が全てERK2のリン酸化量と同位相の日周変動を示したことから、Ras-Raf-1-MEK-ERK2という経路により時刻情報が伝達されると結論している。MEK阻害剤を培養松果体に投与すると概日リズムの位相が変化することから、ERK2は時計発振系に情報を入力する分子と考えられている。これを考え併せると、時計発振系から出力される時刻情報がRas-MAPK経路を介してERK2に入力し、再び時計発振系に入力するフィードバックループが存在すると述べている。一方、光刺激によってMEK活性は変化せず、ERK2に対するフォスファターゼ活性が光刺激により上昇した。このことから、ERK2の光刺激による脱リン酸化はフォスファターゼの活性化によると考えられた。光刺激によるフォスファターゼ活性の上昇はオカダ酸では阻害されず、バナジン酸により阻害されたことから、光刺激に

より活性化されるフォスファターゼはチロシンフォスファターゼであるか、あるいはdual-specificityフォスファターゼであると考えられた。

第3章後半では、細胞ストレスに応答して活性化するMAPキナーゼであるp38の活性変動を調べ、p38は光刺激により一過的に活性化することを示した。次に、p38の光活性化が光位相シフトに關与する可能性を調べるため、松果体細胞にp38阻害剤SB203580（以下SBと略）を投与して概日リズムに対する効果を調べた。まず、光刺激を行わずにSBをCT10からCT22まで投与してメラトニン分泌量の概日リズムを調べたところ、30 μ MのSB投与は概日リズムの位相を後退させた。SBの投与のみで概日リズムの位相が変化したことから、恒暗条件におけるp38活性の変動を調べたが、時刻依存的な変化は見られなかった。そこで、恒暗条件における一定レベルのp38活性が果たす役割を調べるため、SBを連続投与した。その結果、SBの投与濃度依存的に概日リズムの周期の延長が観察された。さらに、SBを様々な時刻にパルス投与したところ、主観的昼に投与した場合に概日リズムの位相が約2時間後退した。一方、主観的夜に投与した場合には有意な位相変化は認められなかった。これらのことから、p38は時計発振系において主観的昼に重要な役割を果たすと考えられた。

第4章の前半ではまず、Ras-MAPK経路の役割として概日時計の振動周期の調節やリズム振幅の増幅、あるいは時計細胞間の位相同調が考えられると述べている。さらに、Ras-MAPK経路を介して伝達される時刻情報と、フォスファターゼから入力する光情報はERK2において統合されており、ERK2は光情報の時計発振系への入力点としての役割を持つことが述べられている。一方、後半では、p38活性は概日時計の振動周期を決定する重要因子であると結論すると共に、SBの投与時刻依存的な位相シフト効果から考え、時計発振系を構成する分子の一つPERがp38の基質である可能性について議論している。

以上、本論文はMAPキナーゼファミリーに属するERK2とp38の2つの分子がニワトリ松果体の概日時計機構において重要な役割を果たすことを示したもので、概日時計の分子機構の解明に寄与したと考えられる。なお、本論文は真田佳門および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、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

従って、博士（理学）の学位を授与できると認める。