

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 水澤寛太

メラトニンは脊椎動物の松果体や網膜などで合成される *N*-アセチル-5-メトキシトリプタミンの構造を持ったインドール化合物であり、その合成・分泌量が日中に低く夜間に高い日周リズムを示すことから体内に時刻情報を伝達するホルモンであると考えられている。多くの動物において、メラトニン分泌は光によって強く抑制され、また恒暗条件下においては約 24 時間周期のリズム（概日リズム）を示すことから、メラトニンリズムの調節には光と生物時計が深く関与していると考えられている。しかし数種のサケ科魚類では松果体におけるメラトニンリズムが恒暗条件下で消失することから生物時計による調節を欠いていることが知られている。そこで本研究では、松果体のメラトニンリズムが生物時計による調節を欠くニジマスと、生物時計により調節を受けるアユを対象として、メラトニンリズムの調節機構を生理学的、分子生物学的手法を用いて比較解析することを目的とした。その大要は以下のとおりである。

1. アユとニジマスの松果体と網膜におけるメラトニンリズムの検討

アユとニジマスの松果体と網膜にメラトニンリズムが存在するか否か、また、それらが光と生物時計によって調節されているか否かを調べた。松果体については灌流培養を行い、培養液中に放出されるメラトニン含量を、網膜については眼球内メラトニン含量をラジオイムノアッセイ (RIA) を用いて測定した。血中メラトニン濃度についても同様に解析した。その結果、アユのメラトニンリズムは光と生物時計の両者によって調節されるが、ニジマスのメラトニンリズムについては生物時計による調節を欠き、光のみによって制御されることが判明した。

2. アユとニジマスのアシルアルキルアミン *N*-アセチルトランスフェラーゼ (AANAT: EC 2.3.1.87) の cDNA クローニング

メラトニンの合成量は、メラトニン合成酵素の 1 つである AANAT 活性の変動に従うと考えられている。そこでアユ松果体、アユ網膜、およびニジマス網膜から AANAT cDNA をクローニングし塩基配列を決定した。配列解析の結果、アユとニジマスの網膜から得られた AANAT は魚類以外の脊椎動物の AANAT と同じサブファミリー (AANAT1) に属し、アユ松果体から得られた AANAT は魚類に特異的に存在する AANAT サブファミリー (AANAT2) に属することが判明した。

発現解析の結果、魚類には2種類の異なる AANAT 遺伝子が存在し、AANAT1 は網膜、AANAT2 は松果体に組織特異的に発現していることが明らかになった。

3. アユとニジマスの松果体と網膜における AANAT mRNA の動態

アユ AANAT1、AANAT2、ニジマス AANAT1 の発現が光と生物時計による制御を受けているか否かを明らかにするため、定量的 PCR 法によって mRNA の動態を解析した。その結果、AANAT の転写調節機構は、生物時計によって調節されているアユ網膜・松果体の AANAT1・AANAT2 タイプ、光によって調節されているニジマス網膜の AANAT1 タイプ、および光と生物時計のどちらにも調節されていないニジマス松果体の AANAT2 タイプの合計 3 タイプが存在することが判明した。

4. アユ・ニジマス松果体のメラトニン分泌日リズムの調節における転写・翻訳の役割

メラトニンリズムの調節に転写と翻訳が関与しているか否かを明らかにするために、RNA 合成阻害剤 (actinomycin D; Act D) とタンパク合成阻害剤 (cycloheximide; CHX) がアユおよびニジマス培養松果体のメラトニン分泌リズムに与える影響を比較検討した。その結果、メラトニンリズムが生物時計による制御を受けているアユ松果体においてはメラトニン分泌リズムの維持に新規の転写およびタンパク合成が関与しているのに対し、生物時計による制御を受けていないニジマス松果体では主にタンパク合成が関与することが明らかになった。

5. アユ松果体のメラトニン分泌概日リズムの生物時計による調節における転写と翻訳の役割

アユ松果体のメラトニン分泌概日リズムを調節する生物時計の発振系において遺伝子の転写と翻訳はどのように関わっているのかを、mRNA 合成阻害剤 5,6-dichloro-1- β -D-ribofuranosylbenzimidazole (DRB)、およびタンパク質合成阻害剤 CHX がアユ松果体のメラトニン分泌概日リズムに与える影響を調べた。その結果、DRB、CHX のパルス処理に対して位相変位の感受性が高い時間帯が複数存在したことから、生物時計の駆動には複数の遺伝子の周期的な発現が必要であることが示唆された。

以上、本研究は、魚類の松果体と網膜におけるメラトニンリズムの光と生物時計による調節機構について明らかにしたもので、今後、生物時計の発振機構および時刻情報伝達機構の解明にとって重要な基礎知見となると考えられる。よって審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。