

審査の結果の要旨

氏 名 田中 大祐

メラトニンは哺乳類において松果体から周期的に分泌され、生体リズム調節作用を示すことが知られており、合成経路から受容体、周期的な遺伝子発現制御に至るまでその生理機構について多くの研究がなされている。しかし、メラトニンは明確な概日リズムが存在しない様々な無脊椎動物から植物や菌類に至るまで生物界全般に広く分布しており、ただ単にリズム調節を司るのみとは考えにくい。また近年、ラット海馬におけるシナプス可塑性の抑制といったリズム調節以外の機能の例も報告されている。これらの報告から、メラトニンは神経活動の直接的制御等、様々な生体機能に根源的かつ重要な役割を果たしている可能性が高い。海外ではメラトニンは睡眠障害時に使用されているが、リズム調節以外の機能に関する研究はこれまでに殆ど行われていない。本研究は、メラトニンの持つ新たな生理的・薬理的な作用基序の解明と、その生物学的・進化的な役割の解明を通して、生体内におけるメラトニンシグナル伝達の解明を目的とした。そのために、セロトニンやドパミンといったアミン類の作用機構の解析例も豊富で、また遺伝因子の同定が容易なモデル生物線虫 (*C. elegans*) を使用した。

まず、メラトニンが線虫に及ぼす作用を明らかにするため、外来的なメラトニン処理が線虫の発生・行動等に及ぼす変化を詳細に観察した。その結果、アッセイ系として利用可能な2つのパラメーターを明らかにした。第一に、メラトニン処理により線虫体壁筋の収縮頻度 (body bend 回数) が一過的に減少することを明らかにした。作用発現時間の経過から、メラトニンは遺伝子発現を介さずに直接神経の活動を抑制すると推測された。また、体壁筋の収縮頻度以外の様々な筋収縮や行動には影響が見られなかったことから、メラトニンの非特異的な作用ではないことを確認した。次に、線虫の体壁筋収縮の制御に関与するメラトニン受容体を解析した。MT2、MT3 特異的アンタゴニストはメラトニンの作用を抑制せず、MT1/2 受容体アンタゴニストのみがメラトニンの作用を抑制した。従って、線虫には MT1 様受容体が存在し、メラトニンはこの受容体を介して体壁筋の収縮頻度を調節することが示唆された。

第二のパラメーターとして、MT3 受容体アンタゴニストに線虫を長期間暴露することで、体長の増加抑制、腸内顆粒の減少等の影響が顕れることを見出した。他のアンタゴニストの作用ではこの現象は観察されない。従って、線虫には MT3 様受容体も存在し、内在性のメラトニンが MT3 様受容体を介して様々な生命現象に恒常的に関わっていることが示唆された。

メラトニン処理等により様々な表現型異常が観察されたことから、線虫体内のメラトニンの有

無について検討を行った。HPLC 及び LC/MS/MS を用いて線虫抽出物を分析したところ、両者においてメラトニンに対応するピークが得られたことから、線虫体内にはメラトニンが存在することが分かった。メラトニンが合成される細胞群を明らかにするため、その合成酵素の発現パターン解析を試みた。ゲノム情報から Y74C9A.3 遺伝子が線虫におけるメラトニン合成酵素 HIOMT に相当すると考えられたため、この遺伝子の発現解析を行った。その結果、この遺伝子は PVT 神経と子宮に発現していた。従って、少なくともこれらの細胞においてはメラトニンが合成され、観察された行動や恒常性に関与する細胞群に作用すると推測された。

哺乳類の MT1 受容体は、G タンパク質共役受容体に属している。そのため、線虫の筋収縮を制御するメラトニンシグナルも G タンパク質と共役した受容体を介していると推測した。そこで様々な G タンパク質突然変異体を用いて MT1 経路を介したメラトニンの感受性を検討した。その結果、Gq α をコードする *egl-30* の機能亢進及び *gpa-7* の機能欠損変異体がメラトニンに対する感受性異常を示したため、線虫の MT1 様受容体は EGL-30 及び GPA-7 を介したシグナル伝達により制御されていると推測された。

さらに、受容体の実体やメラトニンシグナルで機能する他の因子を同定するために、メラトニン感受性異常を示す突然変異体の単離を試みた。およそ 100,000 ゲノムのスクリーニングを行った結果、5 系統の新規突然変異体の単離に成功した。原因遺伝子解析の結果、そのうち 2 系統の原因遺伝子を *rep-1* (Rab エスコート蛋白をコード) と *eat-2* (ニコチン性アセチルコリン受容体をコード) と同定した。このことは、メラトニンがシナプス伝達に関与することを示すとともに、本研究により確立したアッセイ系が効果的に機能し、メラトニンシグナルに関わる新規分子の解明に有効であることを示唆する。

低分子量 G タンパク質の 1 つである Rab タンパク質群は、細胞内でのシナプス小胞を含む様々な小胞輸送において重要な役割を果たしている。細胞内の個々の Rab タンパク質が特異的な膜画分へ局在し、特異的な小胞輸送に関わるためには、その C 末端にガラニルガラニル基を付加する翻訳後修飾が必須である。その修飾には Rab タンパク質と脂質転移酵素である RabGGTase 及び補助因子として REP の 3 つのタンパク質が三量体を形成する必要があると考えられてきた。しかしながら、そのメカニズムや遺伝的階層性、生体内における各分子の役割については不明な点が多い。本研究では、上記スクリーニングにより単離された線虫 *rep-1* 変異体の解析を通して、REP-1 を介した Rab タンパク質の機能制御メカニズムについて新たな知見を得ることに成功した。

単離された突然変異体の 1 つ、*ta208* 変異体の原因遺伝子の探索を行い、Y67D2.1 遺伝子と同定した。Y67D2.1 遺伝子は REP 及び GDI (Rab GTP/GDP dissociation inhibitor) の両者に類似性の高いタンパク質をコードしていたが、GDI に特異的なアミノ酸は保存されておらず、逆に REP に特異的なアミノ酸は保存されていた。また RNAi によりこの遺伝子機能を低下させたところ、非修飾型の Rab タンパク質の量が増加した。これらの結果から、この遺伝子は GDI ではなく REP をコードしていることが明らかとなった。

遺伝子クローニングと REP-1 の機能解析の過程において、*rep-1* 変異体の表現型が RabGGTase

の機能阻害による表現型異常より明らかに弱かった。そこで線虫 REP タンパク質の生体内機能をより詳細に理解するために、*rep-1* 変異体における Rab 経路に関与する表現型異常の観察や、様々な Rab タンパク質の局在異常の解析を行った。その結果、シナプス小胞の放出に関与する2つの Rab のうち、RAB-27 の機能とシナプスへの局在には REP-1 が必要であるが、RAB-3 の機能と局在には REP-1 は必須ではないことを明らかにした。

さらに、エンドサイトシスに関与する他の Rab の局在に対する REP-1 の影響を調べたところ、その局在が REP-1 の機能に強く依存する Rab と殆ど依存しない Rab が存在することが明らかになった。また、Yeast two-hybrid 法を使用したタンパク質間の相互作用解析においても、REP-1 と結合する Rab としない Rab が存在することが分かった。

これらの結果から、線虫生体内において REP-1 は特異的な Rab に対して、またその Rab が発現している細胞や組織に依存してその局在と機能制御に関与することが示唆された。すなわち、生体内の Rab にはその修飾に REP を必ずしも必要としないものも存在し、三量体の形成は必須ではないと推測された。

本研究は、モデル生物線虫におけるメラトニンの存在とその生理的役割について、初めて明らかにした。本研究により構築された新規アッセイ系を分子遺伝学的解析の容易な線虫に用いることで、メラトニンの新規作用メカニズムの理解に大きく寄与し、哺乳類を含めたメラトニンの根源的な生体機能を明らかにするための強力なツールとなりうる。さらに、本研究では線虫の *rep-1* 遺伝子を同定し、生体内における REP-1 の意義について新たな知見をもたらした。このことは REP の機能のみならず、Rab の局在化機構や機能制御の解明にも新たな一面を与えている。また、脈絡膜欠落症のような REP の機能異常疾患の原因とその治療法、特に新規医薬品の開発に向けた重要な知見となりうると期待される。以上のように、本研究はメラトニンの生理学的作用や生物学的意義について、また Rab や REP の機能解明に重要な貢献をするものであり、博士(薬学)の授与に値すると判断した。