

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 吳 涛

哺乳類の各組織や細胞に存在する概日時計は、視交叉上核 (SCN) に局在するマスタ時計と SCN 以外の脳領域・心臓・肝臓などの末梢組織に局在する末梢時計に分けられる。SCN の時計は主に外部明暗周期によって同調され、哺乳類の行動リズムや生理機能を制御しているが、末梢の時計は主に食餌刺激によってセットされ、局部組織の概日リズムを維持する。しかし、光や食餌刺激による末梢時計のリセットのメカニズムは未だに十分には解明されていない。従って、末梢時計リセットの過程が光や食餌刺激によってどのように制御されているかを調べるために、本論文ではラット松果体、肝臓、心臓および腎臓の末梢組織における概日時計遺伝子の発現同調や行動リズムの応答に対して、光と食餌刺激が単独であるいは共同的にどのように影響を及ぼすかを検討した。

まず序論では、生物時計の概要、時計遺伝子とその調節、光や食餌刺激による概日リズムの調整についての既知の知見を述べた。

第1章ではラット松果体における概日時計への光と食餌刺激の共同作用について検討した。まず、一個の松果体から多数の時計遺伝子 (*Bmal1*, *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Cry1*, *Dec1* と *Dec2*) 及びメラトニン合成の律速酵素である arylalkylamine *N*-acetyltransferase (AANAT) 遺伝子の発現レベルを測定する方法を確立した。7 日間の食餌周期のみの逆転による松果体の時計遺伝子発現リズムに対する影響は弱く、一方同じ期間の光周期のみの逆転にはより強い効果があったが完全な反転はみられなかった。しかし、両者を同時に逆転させた場合には、松果体の時計遺伝子発現リズムは7日間で完全にリセットされた。これらの結果は松果体サーカディアンリズムの同調において食餌関連刺激より光の調節が支配的なシグナルであり、食餌シグナルが光による同調に補佐的な役割を果たしていることを示唆した。

第2章では、明暗周期の反転を明期からスタートさせるか暗期からスタートさせるかの違いによるラット松果体の時計遺伝子位相のリセット過程の差異を解析した。ラット松果体において四つの時計遺伝子 (*Bmal1*, *Cry1*, *Per1* と *Dec1*) と AANAT 発現のリセット過程に対する 24 時間の明期または暗期によって開始される明暗周期の転換の影響を調べた。暗期による明暗周期の転換に比べ、明期による明暗周期の反転の方が時計遺伝子の同調過程を顕著に延長させた。また、四つの時計遺伝子の中で *Per1* は最も速く同調されたのに対して、*Cry1* の同調は最も遅れて達成された。

第3章では食餌が支配するラット末梢時計の同調に対する光刺激の影響が、より支配的な食餌の影響によってマスクされるかどうかを検討した。7 日間の明暗周期単独反転は通常の摂食時間に制限されたラットの肝臓と心臓において主な時計遺伝子 (*Bmal1*, *Cry1*, *Per1* と *Dec1*) のサーカディアンパターンに明確な影響を与えなかったが、光周期と同時に食餌

周期を反転させたところ、同調が著しく促進された。また、明暗周期単独反転は肝臓と心臓の *Cry1*、*Per1* と *Dec1* 遺伝子発現レベルを逆向きに調節した。リセット過程において肝臓と心臓では位相シフト方向が逆になっていたこと等、時計遺伝子同調を調節するメカニズムが肝臓と心臓において異なっていることが示唆された。

第4章は、光と食餌刺激によるラット腎臓の時計遺伝子の発現調節を調べたものである。食餌と光刺激により各時計遺伝子ごとに異なった変化を示し、7日間の明暗周期単独の逆転は *Per1* の位相を4時間後退させたが、*Bmal1*、*Clock* と *Cry1* の位相にはほとんど影響を与えなかった。また、食餌刺激は腎臓の概日時計の同調因子としては非常に弱いことが示唆された。一方、食餌と光を同時に反転させた場合、*Per1* と *Clock* は三日間で完全にシフトされた。

第5章では、給餌による肝臓概日時計の速やかな同調機構について、DNA マイクロアレイ等により詳細に解析した。給餌による肝臓の時計の同調は一日のどの時間帯においても速やかに達成され、光による SCN 時計の同調に比べて高い順応性があることが示された。30分間の給餌刺激は1時間以内に *Per2* および *Dec1* の発現を顕著に誘導した。また、30分間の給餌刺激は、時間の経過に伴い肝臓における他の時計遺伝子の転写レベルと位相も変化させた。給餌による肝臓概日時計の同調は *Per2* と *Dec1* の迅速な誘導が関わっていることが示唆された。

以上、本研究は、食餌刺激を中心とした外部刺激による末梢の生体リズムの制御機構を詳細に解析したもので、時差ぼけや深夜勤務、睡眠障害といった現代人の抱える問題に対応するための基礎的知見を与えるものであって、学術的、応用的に貢献するところは少ない。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。