

Title	PACAPによる光同調調節機構の分子薬理的解析
Author(s)	川口, ちひろ
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/47228">https://hdl.handle.net/11094/47228</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	川口 ちひろ
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学位記番号	第 21100 号
学位授与年月日	平成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 薬学研究科応用医療薬科学専攻
学位論文名	PACAP による光同調調節機構の分子薬理的解析
論文審査委員	(主査) 教授 馬場 明道 (副査) 教授 中川 晋作 教授 松田 敏夫 教授 土井 健史

#### 論文内容の要旨

【背景】1 日のうちで光の照度が数万倍も変化する過酷な地球上の明暗環境において、体内恒常性を維持しながら生き延びるために哺乳類は 2 億年以上にもわたって 2 つの適応反応を発達させてきた。1 つは体内時計が発振する約 24 時間周期のリズム(概日リズム)の位相を、地球の 24 時間明暗周期に同調させる **entrainment** 機能である。もう 1 つは体内時計には影響を与えずに瞬時に環境中の明暗変化に対応して活動量や睡眠・覚醒、ホルモン分泌などの種々の生命現象を最適化する **masking** 機能である。様々な環境同調因子が存在する中、光が最も強力な同調因子として機能することから、光によるこうした適応機能を光同調機能と呼ぶ。19 世紀に導入された電気とそれによる人工的な光環境の形成は、地球の明暗環境に束縛されない自由な生活様式を我々にもたらしたと同時に、今でかつて人類が経験してこなかったほどの不眠生活へと導くことになった。日本では人口の 20% もの人がなんらかの不眠症状で苦しみ、不眠およびそれに付随した問題による経済的損失はアメリカだけで年間 1500 億ドルと測りしれない。よって、明暗環境への適応における光の生理的な役割を理解し、生理機能に悪影響を与えないような **lighting conditions** の設定や、病態との関連性を分子レベルで解明することは急務である。

1989 年に羊視床下部より単離された **pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)** は、VIP/セクレチン/グルカゴンファミリーに属し、ショウジョウバエからヒトに至るまで高度に保存された神経ペプチドである。哺乳類では中枢、末梢のどちらにも分布しており、神経伝達物質・神経栄養因子・神経調節因子などの多彩な機能を有する。網膜ではごくわずかな神経節細胞に発現し、網膜から哺乳類の体内時計中枢である視交叉上核(SCN)へ投射する神経回路にて共発現するグルタミン酸(主要な光情報伝達物質)と協調して光情報を伝達することが示唆されている。これまでの薬理的解析より、PACAP がグルタミン酸による概日リズム調節を濃度及び時刻依存的に調節することなどが示唆されてきたが、内因性 PACAP の役割については不明であった。

【目的】光同調調節機構における生理的な PACAP の機能ならびに光同調機能破綻とその病態的意義を解明する。そのために、当研究室で作成した PACAP 遺伝子欠損(*Adcyap1<sup>-/-</sup>*)マウスを用いて行動解析ならびに分子生物学的・組織学的解析を行った。

【結果・考察】**entrainment** 機能を評価するために、マウスに種々の光照射を行い、その後誘導される行動リズムの

位相変化（位相後退/前進）を定量した。暗期後半において *Adcyap1*<sup>-/-</sup> マウスは高照度光による行動リズムの位相後退および位相後退幅を反映するとされる SCN 内 extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK) のリン酸化レベルが顕著に低下していた。一方暗期後半での行動リズムの位相前進においては、照度に関係なく比較的長期間の照射による位相前進が障害されていた。これらの結果より、生理的な PACAP は位相後退時には光シグナルの増強に働き、位相前進時には比較的後半の反応を調節することが示唆された。このように PACAP の作用は光条件（照射時刻、照度、期間）に強く依存したことから、単に位相後退/前進の誘導因子（ノンパラメトリックな効果）というよりは、環境中で起こる光変化の伝達因子（パラメトリックな効果）として機能することで、位相後退と位相前進を切り替え（gating）に関与すると示唆される。

次に Masking 機能を評価するために照射による一過的な活動量の抑制反応を解析したところ、*Adcyap1*<sup>-/-</sup> マウスでは照度上昇に伴い活動量の抑制反応が若干増大する傾向を示したものの、その抑制反応は用いたどの照度においても *Adcyap1*<sup>+/+</sup> マウスより有意に低下していた。予想外なことに一部の *Adcyap1*<sup>-/-</sup> マウスでは上述の照度光により逆説的な活動量の上昇が起こり、特に一番低い照度で最も頻発した。これらの異常は照射前に PACAP を脳室内投与することで完全に回復した。以上の結果は、*Adcyap1*<sup>-/-</sup> マウスでは照度変化を感知はしているものの *Adcyap1* 欠損により照度が実際よりも低く感知されており、そのため masking の機能低下が起こったことを示唆している。本知見より PACAP が masking 機能を主導的に調節していること、また entrainment だけでなく masking においても PACAP は環境中の照度情報を伝達するパラメトリックな効果を担っていると考えられる。

一方、*Adcyap1*<sup>-/-</sup> マウスの対光反射機能、網膜層構造や網膜神経節細胞の脳内への神経投射、眼における PACAP 関連遺伝子の発現には異常が認められなかったことから、上述の行動異常は網膜での光入力によるものでなく、網膜以降の脳領域での PACAP 欠損によると示唆される。

明暗環境への行動適応は entrainment と masking が協調的に機能することで表出される。そこで次に、*Adcyap1*<sup>-/-</sup> マウスで認められた entrainment と masking の機能異常が行動の環境適応にどのような影響を与えるかについて検討した。*Adcyap1*<sup>-/-</sup> マウスは夜行性動物特有の行動リズムを示したが、時期（活動期）開始の約 4 時間前から活動を開始する異常行動を示した。この原因として entrainment 機能異常により概日時計の位相が前進した可能性が考えられたが、本マウスの時計（関連）遺伝子の SCN での概日変動は正常であったことから、その可能性は考え難いものであった。ごく最近、明期から暗期あるいは暗期から明期への移行期において過活動を示す遺伝子改変マウスが相次いで報告されている。このようなマウスには共通して masking 異常が認められ、特筆すべき点としてこれら変異遺伝子はほぼ全て網膜で光伝達に関与する。このように網膜に発現する遺伝子が異常行動の神経基盤を成す可能性が示されつつあり、今後更なる検討が期待される。

Entrainment において、*Adcyap1*<sup>-/-</sup> マウスは特定の光条件では位相前進が特異的に低下したが、既知の遺伝子発現変化ではその分子機構は説明できなかった。そこでこの稀有な表現型を利用し新規な位相前進調節シグナルの同定を目指して、SCN 特異的なマイクロアレイ解析を試みた。その結果、*Adcyap1*<sup>-/-</sup> マウスの位相前進特異的な障害を説明し得る遺伝子を同定するに至った。

【結論】(1)PACAP は光情報伝達においてパラメトリックな効果を担う。(2)Masking 機能障害により活動開始が早まる可能性が高い。(3)位相前進を特異的に調節する新規シグナル候補を同定した。本研究成果が lighting conditions の最適化、不眠やリズム障害の治療法確立、更には長年の謎であった位相変化の gating 機構の更なる解明に貢献することを期待する。

## 論文審査の結果の要旨

哺乳類は光同調と呼ぶ 2 つの適応反応を保持している。1 つは entrainment と呼ばれるもので、哺乳類の体内時計中枢である視交叉上核が自律的に発振する概日リズムの位相を、地球の 24 時間明暗周期に同調させる機能である。もう 1 つは masking と呼ばれるもので、環境変化に対応して行動する時間帯とその時の運動量を、時計機能とは独立

して最適化する機能である。

本論文は、光同調機構における内因性 PACAP の役割を解明することを目的に、PACAP 遺伝子欠損マウスを用いて行動解析ならびに分子生物学的・組織学的解析を行った。その結果、PACAP は **entrainment**、**masking** の両方において環境中の照度情報を伝達するパラメトリック作用を担うことを見出した。また **masking** 異常によって、活動期よりも数時間前から活動を開始する行動（異常な早起き）が誘発される可能性を示した。さらに、**entrainment** において欠損マウスが示した位相前進特異的な障害という特筆すべき表現型を利用して、位相前進を特異的に調節する新規シグナルとして PACAP-プロスタグランジン合成酵素-PGD<sub>2</sub> を同定した。本研究は、光同調の分子基盤に新たな知見を加えたものであり、博士（薬学）の学位授与に充分値するものである。