

論文審査の結果の要旨

氏名 土居 雅夫

本論文では、bZIP 型の転写因子 E4BP4 を介した概日時計の位相制御メカニズムについて述べられている。

概日時計の位相は、夜の始まりに光刺激を受けると後退し、夜明け前に光刺激を受けると前進する。このような時刻依存的な光位相シフトは概日時計の重要な特性の一つであるが、その分子メカニズムは謎に包まれている。本論文では、位相シフトの中でも特に位相後退を誘導する光情報の入力経路が解析されている。

論文提出者はまず、位相シフトを誘導するシグナル分子の実体に迫るため、概日時計機能と光受容能を併せもつニワトリ松果体を実験材料に、位相の前進時あるいは後退時に特異的に発現誘導される遺伝子を探索した。ディファレンシャル ディスプレイ法を用いて約 6000 種の PCR バンドをスクリーニングした結果、位相後退時に特異的に発現誘導される *E4bp4* 遺伝子を同定した。bZIP 型の転写因子をコードする *E4bp4* 遺伝子は、ショウジョウバエの遺伝学的な解析から概日時計との関連が示唆されていたものの、時計システムにおける E4BP4 の作用メカニズムは不明であった。

E4BP4 は松果体細胞において何らかのターゲット遺伝子の転写を光依存的に調節している可能性が考えられる。論文提出者は、時計発振系を構成する遺伝子が E4BP4 のターゲットとなる可能性を検討した。この目的のために、ニワトリ松果体の時計遺伝子の一つである *cPer2* 遺伝子の上流配列を単離したところ、そのプロモータ配列上に E4BP4 の認識 DNA モチーフが存在することを見出した。さらに転写アッセイを行い、このモチーフを介して E4BP4 が *cPer2* の転写を抑制することを証明した。生物個体（ヒヨコ）を用いた実験においても、松果体の時計位相が後退するような光刺激を与えた場合には、松果体細胞において *E4bp4* の発現誘導がおこり、それに続いて *cPer2* の発現が抑制されることが分かった。これらのことから、生体内においても E4BP4 は転写抑制因子として *cPer2* 遺伝子に作用しており、この E4BP4 による *cPer2* 遺伝子の転写抑制が概日時計の位相後退に重要な役割を果たしていると考えられた。

次に論文提出者は、ニワトリ松果体において E4BP4 の蛋白質の動態を調べるため、特異的な抗体を作成してウェスタンブロット解析を行った。その結果、*cPer2* 遺伝子の発現が抑制される

時間帯に E4BP4 蛋白質が核内に蓄積していることが分かった。この結果は、生体内において E4BP4 が *cPer2* の転写抑制因子として働くことを支持する重要な証拠である。興味深いことに、この解析を進める過程で論文提出者は、E4BP4 蛋白質の易動度が一日の時刻に依存して変化していることを発見し、さらにこの易動度の変化がリン酸化修飾によって誘導されることを明らかにした。このリン酸化に伴う易動度の変化は、E4BP4 上に存在するカゼインキナーゼ 1 (CK1) のリン酸化モチーフに変異を導入した場合には消失したことから、E4BP4 のリン酸化には CK1 が関与する可能性が示された。

CK1 ファミリーに属する一群のキナーゼの中でも CK1 ϵ は、ハムスターの遺伝学的な解析から時計の発振に必要な分子であることが知られており、CK1 ϵ の基質蛋白質が時計機能に重要な役割を果たすことが予想されていた。論文提出者は、E4BP4 が CK1 ϵ によってリン酸化されているのではないかと推測し、その可能性を検証するため培養細胞において CK1 ϵ と E4BP4 を共発現させた。その結果、CK1 ϵ のキナーゼ活性に依存して E4BP4 の蛋白質レベルが減少し、それと同時に細胞内の E4BP4 の転写抑制活性が減弱することを見出した。これらの観察結果は、生体内における E4BP4 蛋白質の挙動と合致する。つまり、ヒヨコ松果体における E4BP4 もリン酸化された後に蛋白質量が低下することから、生体内においても CK1 ϵ は E4BP4 の蛋白質量を負に制御することによって細胞内の E4BP4 の活性を調節している可能性が考えられた。

以上のように、論文提出者は、独自の遺伝子スクリーニングにより同定した E4BP4 の機能を解析することにより、概日時計の位相後退の分子メカニズムに迫った。この成果は、時計細胞内の光入力系と時計発振系の間を結ぶシグナル分子の実体を世界で初めて示した例として高く評価できる。また E4BP4 蛋白質の性状解析から、E4BP4 の機能が CK1 ϵ によるリン酸化を介して調節されている可能性が示された。現在のところ、生体内において CK1 ϵ が E4BP4 をリン酸化しているかどうかは不明であるが、本論文の結果はこれまで謎の部分が多かった CK1 ϵ の作用メカニズムを理解するうえで非常に重要な知見といえる。

なお、本論文中の E4BP4 の同定と機能解析は、中島芳人氏 (東京大学大学院)、岡野俊行氏 (東京大学大学院)、及び深田吉孝氏 (東京大学大学院) との共同研究である。また E4BP4 蛋白質の性状解析は、岡野俊行氏、Paolo Sassone-Corsi 氏 (仏国 IGBMC) 及び深田吉孝氏との共同研究である。いずれの研究についても、論文提出者が主体となって分析及び検証を行ったもので、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。