

論文審査の結果の要旨

氏名 廣田 毅

概日時計は約 24 時間の周期で自律的に発振するのみならず、自らの位相を外界の環境変化に応じて調節することができる。哺乳類において、肝臓や心臓などに存在する末梢時計の位相は食餌の時間に強く影響されるが、その分子メカニズムに関する知見は非常に乏しい。論文提出者は、末梢時計の位相同調機構を解明する目的で、rat-1 細胞という末梢時計のモデル細胞系を用いて同調因子の探索を行った。本論文では、rat-1 細胞における新規の位相同調現象の発見、およびその分子機構の解析について述べられている。

論文提出者は定量的 RT-PCR 法を用いることにより、rat-1 細胞における位相同調因子の探索過程において、培地交換の操作が時計遺伝子 *Per2*・*Dbp*・*Bmal1* の発現リズムを誘導することを見出した。一方、主要な同調因子のひとつである光は、rat-1 細胞の時計遺伝子発現に対して影響を与えなかった。興味深いことに、培地交換によるリズム誘導は *Per1* および *Per2* 遺伝子のゆるやかな発現低下を伴っていた。Rat-1 細胞において概日リズムを誘導する因子は、血清を含めていくつか知られているが、これらはすべて *Per1/2* 遺伝子の一過的な発現上昇を伴う。このことから、培地交換によるリズム誘導は新規の経路を介する可能性が示唆された。そこで *Per1/2* 遺伝子の発現低下を導く原因が探索された結果、グルコースの添加がリズム誘導において重要な役割を果たすことが判明した。さらに、代謝可能な単糖は *Per1/2* 遺伝子の発現を低下させたのに対し、代謝されない単糖やピルビン酸は影響を与えなかったことから、糖代謝の初期過程の重要性が明らかになった。

続いて、タンパク質および RNA の合成阻害剤を用いた実験から、グルコースによる *Per1/2* 遺伝子の発現低下には遺伝子の転写・翻訳が必要であることが示された。そこで、DNA マイクロアレイを用いてグルコース応答遺

伝子が網羅的に探索された結果、グルコース投与の直後に発現量が急上昇する転写制御因子として、TIEG1・VDUP1・HES1が見出された。なかでも、*Tiegl* と *Vdup1* 遺伝子はグルコース代謝に依存した immediate early gene であることが判明し、この2つの因子がグルコースによる位相同調において重要な役割を果たす可能性が考えられた。

TIEG1 は Zn finger 型の転写抑制因子であり、その DNA 結合ドメインは Sp1 に類似している。*Per1* および *Bmall* 遺伝子の転写開始点付近には Sp1 結合配列が存在することから、これらの遺伝子のプロモーターに対する TIEG1 の作用が、ルシフェラーゼレポーターアッセイにより解析された。その結果、TIEG1 は両プロモーターからの転写を用量依存的に抑制することが判明した。*Bmall* プロモーターに対する TIEG1 の抑制効果は *Per1* プロモーターに対する効果よりも強く、また、この効果は Sp1 配列に依存していた。

Bmall 遺伝子の発現量は概日リズムを示すにも関わらず、その転写調節機構は未だに不明である。TIEG1 は *Bmall* プロモーターに対して抑制的に作用したことから、マウス肝臓における *Tiegl* および *Bmall* 遺伝子の発現リズムが解析された。*Tiegl* 遺伝子の発現量は *Bmall* リズムとは逆位相のリズムを示したことから、末梢時計の発振においては TIEG1 が *Bmall* 遺伝子の負の制御因子として働く可能性が示唆された。

以上のように、論文提出者は本研究において、食物の主成分のひとつであるグルコースが末梢時計を同調させることを見出しただけでなく、この新規の同調過程に関与する分子の候補を同定した。さらに、候補分子の中から TIEG1 の機能解析を行い、この転写因子がグルコース同調においてだけでなく、末梢時計の発振においても重要な役割を果たす可能性を示した。これらの発見は、末梢時計機構を理解する上で極めて重要な知見であり、今後の当該分野の研究発展に大きく寄与するものと期待できる。なお、本論文は岡野俊行氏・小亀浩市氏・池島裕子氏・宮田敏行氏・深田吉孝氏との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析およ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。

したがって、博士（理学）の学位を授与できると認める。