

論文審査の結果の要旨

氏名 清水 史子

本論文は9章からなる。第1章および2章には、それぞれ要旨と略語が記されている。第3章は序論であり、概日時計の生物学的意義の説明からその分子機構に関する最新の知見まで、詳しくまとめられている。概日時計のリズム発生機構として現在、「時計遺伝子 *Period* の転写の活性化と抑制に基づく負のフィードバックループモデル」が提唱されているが、時計の位相制御を担う分子機構については未だ不明な点が多い。ニワトリ松果体は時計の3要素である時計発振系・光入力系・メラトニン出力系を併せ持つことから、概日時計研究の優れた実験材料である。論文提出者は、ニワトリの松果体における細胞内シグナル伝達機構を解析することにより、時計入力系の分子機構に迫ろうと試みた。第4章では本論文で用いた実験手法が記されている。第5章の実験結果は2部構成となっており、第1部には、ニワトリ松果体に存在するカルシウム (Ca^{2+}) 結合蛋白質を単離・同定した結果が記されている。このうえに立ち、第2部ではニワトリ松果体における CREB/ATF 転写因子の機能解析が行われ、時計機能に関与する新たな分子として ATF-2 を見出している。第6章では、第5章に記された結果に対する総合的な考察がなされている。第7章、8章および9章には、それぞれ謝辞、引用文献および発表論文の目録が記されている。

ニワトリ松果体を用いた先行研究により、細胞内 Ca^{2+} の動員が光位相制御に関与する可能性が示唆されている。そこで論文申請者はまず、ニワトリ松果体において Ca^{2+} シグナルの伝達を担う、 Ca^{2+} 結合蛋白質の分子実体を生化学的に解析しようと試みた。まず約 2,000 羽のヒヨコから松果体を摘出し、その抽出液から Ca^{2+} 依存的 phenyl-Sepharose クロマトグラフィーによって Ca^{2+} 結合蛋白質の網羅的な単離を試みた。そしてマイクロシーケンシングという手法により、単離された蛋白質は calmodulin, sorcin, neurocalcin, annexin II および annexin V と同定された。これら Ca^{2+} 結合蛋白質の抗体を作製し、松果体切片の抗体染色を行なったところ、calmodulin と sorcin は松果体においてメラトニン合成を行

う時計細胞に発現していた。以上から calmodulin と sorcin が、松果体細胞において Ca^{2+} 依存的な生理応答を担う分子である可能性が示された。

先行研究において calmodulin は、*Period* 遺伝子の転写誘導に関与することが哺乳類の時計細胞において示されている。この *Period* 遺伝子の上流には Ca^{2+} /cAMP-responsive element (CRE) 配列が動物種を超えて保存されている。CREB、ATF-1 および ATF-2 は、CRE 配列に結合する pZip 型転写因子群として見出され、細胞内 Ca^{2+} の上昇を引き起こす外来刺激を核へ伝える転写活性化因子として知られている。論文申請者は、これら転写因子がニワトリ松果体における光応答や概日リズムの形成に関与する可能性を、次に検証した。その結果、ATF-2 の活性を反映する Thr53 のリン酸化は概日時計の支配を受けていること、そして CREB と ATF-1 の活性をそれぞれ反映する Ser133 と Ser63 のリン酸化が光により負に制御されているという、新たな現象を見出した。さらに、培養した松果体に光を直接照射した場合においても CREB および ATF-1 のリン酸化レベルの低下が見られたことから、これらの因子のリン酸化制御は松果体に内在する光受容体の支配下に働くことを示した。一方、ATF-2 のリン酸化リズムは培養条件下では消失したことから、松果体における ATF-2 のリン酸化リズムは内因性のものではなく、他の時計器官からの入力に起因する可能性が示された。さらに、クロマチン免疫沈降法により、これらの転写因子がいずれも生体内において *chicken Period2 (cPer2)* プロモーターに結合していることを示した。ルシフェラーゼレポーターアッセイの結果、ATF-2 が *cPer2* プロモーターの CRE 配列を介して転写を活性化する可能性が示された。

以上の解析を通じて、ニワトリ松果体の概日時計システムの新たなコンポーネントとして、論文申請者は ATF-2 を見出した。松果体において ATF-2 のリン酸化は外因性の時計制御を受けることから、本研究の結果は時計組織間の同調についての新たな理解につながると考えられる。なお、本論文は真田佳門氏・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。