

論文審査の結果の要旨

氏名 川口 荘史

本論文は2章からなる。第1章は概日リズム中枢組織である視交叉上核(SCN)由来細胞株の樹立、第2章は樹立したSCN由来細胞株を用いたトランスクリプトーム解析による、概日リズム形成の転写フィードバックループで機能する新規シスエレメントの推定について述べられている。

多くの生物の活動や代謝活性に約24時間の概日リズムが見出され、これは内因性の体内時計によって刻まれる。この体内時計の発振機構は、中枢組織であるSCNのみならず、末梢組織においても存在する。しかしSCNでは時計遺伝子 *Per1* の発現概日リズムは、末梢組織の減衰性振動に対し安定に持続するという特徴をもつ。第1章で論文提出者は、まず哺乳類の概日リズム中枢組織であるSCNで、時計遺伝子 *Per1* が安定な発現振動を持続するという性質に注目した。そしてSCN特異的な振動維持機構、位相変位機構の解析のために、*Per1::luc* 導入ラットよりSCN由来細胞株RS182の樹立を行った。既に哺乳類のSCN由来細胞株は2報報告がなされている。しかし、本細胞株は、*Per1::luc* 発現の安定な振動性を指標に樹立され、その振動安定性に基づき各種化合物による位相変位を細胞レベルで解析する系を構築したという点において、これらの細胞株と画期的な違いがある。さらに、siRNAを用いた遺伝子機能解析が可能な点など、RS182細胞は概日リズム研究において多くの利点を有すると考えられる。一方、SCN特異的なニューロペプチドの発現や、神経突起形成などは見出されず、この細胞がSCNの特徴をどの程度満足するか、という点についての解析がまだまだ不十分である。

転写や翻訳などの発現に概日リズム支配を受ける遺伝子群が多数存在し、ccgs (Clock controlled genes)と呼ばれている。特に近年、マイクロアレイを用いた解析によって、転写レベルでccgsは多数同定されてきた。しかし、いまだ多様な振動位相を示すこれらのccgsの振動の分子基盤は明らかではない。第2章では、論文提出者は発現振動性のみ注目していた従来の概日リズムトランスクリプトーム解析に、位相シフトをccgsの抽出の指標に加えるために、それが可能なRS182細胞を用いた。そして、すでに証明されている時計遺伝子と共通の発現リズム制御支配下にあるccgsの同定を試みた。つまり、RS182細胞の位相変位前後の時系列RNA標品を用いて、ロバストな振動を維持した遺伝子群、時刻依存的な位相変位を示す振動遺伝子群という2群を見出した。それらの遺伝子群を階層的クラスタリングに供し、それぞれの振動位相特異的なクラスターに含まれる遺伝子のプロモーター解析を行った。その結果、明期型クラスターに含まれる遺伝子のシスエレメントにはCREとE-boxが共存し、暗期型クラスターに含まれる遺伝子のシスエレメントには既知のROREに加えて、XREが存在する頻度が高いことを明らかにした。さらに、XREの転写抑制因子である*Ahrr* mRNAの明期型振動を見出し、*Ahrr*の明期

型の振動が XRE を介した暗期型の振動形成に機能していることが示唆された。そして、RS182 細胞の *Per1::luc* 発現概日リズムの振幅が、*Ahrr*、*Ahr* siRNA 投与により顕著に減少することを見出した。これらの結果から、既に知られている概日リズム形成の転写ネットワークに加えて、制御因子 *Ahr*、*Ahrr*、*Arnt* による XRE を介した転写フィードバックループが機能することを推定した。暗期性の転写振動形成における XRE 及びその制御因子 *Ahr*、*Ahrr*、*Arnt* の機能の推定は、全く新しい知見であり、その解明に大きく貢献するものである。ただし、この新たなフィードバックループの証明、及びその機能の詳細の解析は今後の課題である。次に、これまで不可能であった同調性について分子レベルで解析するために、RS182 細胞を用いて時刻依存的な位相シフトで特異的に発現が変動する遺伝子群を同定した。しかし、これらの位相シフトに与える機能、及びそれらの発現制御機構の解析はいまだ不十分であると考えられる。

上記いくつかの課題は残されているものの、本論文は概日リズムの解明について新規なツールを構築し、さらに新規シスエレメントや制御因子の推定により、概日リズムの分野における発展に貢献するものである。また本論文第1章は、篠崎敦基、西郷薫、榊佳之、程肇ら諸博士との共同研究であるが、論文提出者が主体となって解析を実施したもので、論文提出者の寄与が十分であるとする。したがって、博士(理学)の学位を授与できると認める。