

論文審査の結果の要旨

氏名 金 尚宏

本論文は四章から構成されている。第一章は、イントロダクションであり、ほ乳類の概日時計システムの背景知識として、(1) 概日時計の発振を担う転写・翻訳を介したフィードバックモデル、(2) 中枢時計と末梢時計、(3) 概日時計の位相(時刻)リセット機構について概説している。加えて、当該分野において『*Period* 遺伝子の転写誘導に依存しない時計リセットの分子機構』が重要な研究課題として残されていることが記述されている。

第二章は、実験手順であり、(1) 時計遺伝子 *Bmal1* のプロモーター配列を用いた細胞時計の時刻可視化システム、(2) 定量的 RT-PCR 法、(3) ELISA 法による Transforming Growth Factor (TGF)- β の定量解析法、(4) RNA 干渉による遺伝子のノックダウン法、(5) イムノブロット法、(6) クロマチン免疫沈降法、(7) マウスを用いた薬理実験に関して記述されている。

第三章は、時計リセットを誘導する新規の細胞内シグナリングを同定した結果が記述されている。論文提出者は、細胞時計の時刻をリアルタイムで可視化する実験系を構築し、その過程で培地の pH の変化が細胞時計の時刻をリセットすることを見いだした。pH シグナルに応答する時計関連遺伝子を網羅的に解析した結果、様々な時計リセットの際に転写誘導が観察される *Period* 遺伝子の転写活性化は観察されない一方、アルカリ刺激によって *Dec1* 遺伝子が急性に転写活性化されることを見いだした。*Dec1* は、細胞レベルでの過剰発現実験から時計制御因子である可能性が示された因子であった [Honma *et al.*, *Nature* **419**, 841-844 (2002)]。しかしながら、その後 *Dec1* 欠損マウスが作成されたが、そのマウスはほぼ正常な行動リズムを示すことから [Grechez-Cassiau *et al.*, *J Biol Chem.* **279**, 1141-1150 (2004); Nakashima *et al.*, *Mol Cell Biol.* **28**, 4080-4092 (2008)]、*Dec1* がこういった局面で時計制御因子として機能するのには謎に包まれていた。本論文では、RNA 干渉法による *Dec1* の転写誘導の阻害によって、アルカリ刺激による時計の時刻リセットが大きく減弱したことが記述されている。この結果は、*Dec1* が時計の時刻リセットにおいて機能する因子であることを見いだした点に加え、*Period* 遺伝子の誘導を伴わない時計リセットの分子機構を初めて解き明かした点で非常に斬新である。本章ではさらに、アルカリ刺激による *Dec1*

依存型の時計リセットを誘導する細胞内シグナル伝達経路を探索している。その結果、培地 pH のアルカリ化による TGF- β シグナリングの活性化が時計リセットを担うことが見いだされている。さらに、TGF- β やアクチビンといったタンパク質因子の投与によって *Dec1* が転写誘導され、時刻依存的に細胞時計がリセットされることや、その細胞内シグナリングには転写因子 SMAD3 と SMAD4 が重要であることが記述されている。また、野生型マウス個体への TGF- β の腹腔内投与は肝臓や副腎などの末梢組織の時計の位相シフトを引き起こす一方、*Dec1* 欠損マウスにおいてはこの位相シフトが観察されないことから、生体内においても TGF- β -*Dec1* 入力経路が時計制御に重要であることが証明されている。TGF- β が概日時計の制御を担うという知見は全く新規のものであり、当該研究分野に新しい視点をもたらしたと言える。

第四章はディスカッションであり、本研究結果から同定した TGF- β やアクチビンによる時計入力シグナルが、どういった生理的局面で機能しているのかに関して、先行知見に基づいて考えが述べられている。また、臨床医科学への応用として、慢性疲労症候群とリズム異常に関する議論も議論されている。最後に、*Dec1* がさまざまな環境因子によって転写誘導されるという知見から、今後の研究課題を提示している。

なお、本論文の第2章は、広田 毅、河本 健、加藤 幸夫、坪田 匡史、深田 吉孝との共同研究であるが、論文提出者が主体となって研究計画を考案し、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と判断する。

審査時点での本論文は、当該研究分野の背景知識についての説明が乏しい点や実験結果の掲載を省略していた点があったため、審査委員会は論文の改編を要求した。それを受けて論文申請者は、イントロダクションに十分な説明を付け足し、要求された実験結果を論文中に掲載した。改編後の論文は十分な内容が補足されており、審査委員は全員一致で合格と判断した。したがって審査委員会は、論文提出者に博士（理学）の学位を授与できると認める。