

# 論文審査の結果の要旨

氏名 河村 玄気

本論文は、光を用いた摂動系により生体内の恒常性機能を担う遺伝子発現動態を解析した内容が纏められている。論文中では光摂動系の有益性を示すために、時間的な転写制御が重要となる概日時計系、および、複雑なシグナル伝達系を有するインスリンシグナル系、特にキナーゼ Akt の制御する転写を含めたシグナル伝達経路に関する応用検討を行っている。

本論文は全4章からなる。第1章では、遺伝子発現に関わる転写制御の重要性が述べられている。今までに転写制御機構を解明するために使用されてきた技術として、特定の遺伝子に着目しリアルタイムでの経時変化の測定を可能にするレポーター検出系、また特定の遺伝子には着目せず細胞内に存在する転写物の量を網羅的に解析するマイクロアレイ法および RNA-seq 法が説明されている。加えて転写制御の解明においては生体システムに摂動を加える手法が主流であるが、既存の摂動法（薬剤、遺伝学的手法）では時間分解能や分子に対する特異性が低いという問題が述べられている。これら問題点は光遺伝学を含んだ光摂動系の有する高時間分解能を利用することで解決される可能性があることを指摘し、光摂動系の転写制御機構研究への応用可能性を検討することが研究の目的であることを説明している。

第2章では、転写制御の中でも時間に依存した制御が重要である概日時計系を対象として光摂動系の有益性を示している。光摂動系としては紫外光を使用し、測定系としては遺伝子発現動態が概日時計に重要な役割をもつ時計遺伝子 *Per2* を対象としたレポーター系を採用している。これらによって概日時計に加わる時間的な転写制御の測定および解析を行っている。結果として *Per2* の転写制御には二つの転写因子 HSF1 および p53 が不可欠であることを見出し、これらの転写因子が紫外光照射後に相互作用しながら *Per2* の転写制御をすることを実証している。また、紫外光の高い時間分解能を利用して概日時刻に依存した *Per2* 発現振動の位相シフトが起きることを明らかにしている。加えて HSF1 および p53 の概日時刻依存的な活性変化を検証することによって、概日時刻に依存した *Per2* 発現振動の位相シフトは HSF1 および p53 の時刻依存的な活性化が原因であると結論付けている。また紫外光照射時のマイクロアレイ法による測定結果から、HSF1 および p53 が活性化することにより細胞防御系が賦活化していることを発見し、概日時計依存的な HSF1 および p53 の活性化は紫外光に対する細胞防御系の効率的な活性化のためであるという見解を示している。これら結果は、光摂動系が時間依存的な転写活性機構を解明するために十分寄与していることを示している。

第3章では、転写制御のもう一つの課題である転写制御因子の同定に対する光摂

動系の応用可能性を、インスリンシグナル伝達系を対象として検証している。インスリンシグナル伝達系においてその重要性が認知されている Akt が制御するシグナル伝達経路を同定することを目標として、光遺伝学プローブとしては Akt を特異的に活性化する PA-Akt 系を採用している。まず PA-Akt 系の制御能を細胞種毎に検証したのち、インスリンシグナル伝達系と比較可能な摂動条件を探索している。その後、見出した条件下で RNA-seq 法による転写物大規模解析を含めて、ウェスタンブロット法によるリン酸化タンパク質量、質量分析法による代謝物量、と 3 つの異なる分子種の存在量を測定している。それぞれの分子種において PA-Akt 系により変動する分子の同定に成功し、Akt 依存的なシグナル伝達経路の特定を達成している。また、転写物解析により Akt 単体の活性化での転写制御はインスリンと比較して限定的であることを明らかにしている。そこで Akt 特異刺激とインスリン刺激を比較し、特に顕著な差があった経路として解糖系、および核酸代謝系を対象とした原因となる分子機構の推定を行っている。解糖系に関しては糖取り込みを制御する AS160, および解糖系代謝酵素の転写制御を担う転写因子 FoxO の活性化が Akt 選択的な刺激では起きないことが原因であると結論付けている。また核酸代謝系に関しては、ピリミジン代謝に対するインスリンの作用に対して Akt 単体の活性化は部分的にその役割を担うことを明らかにしている。その原因としてはピリミジン代謝経路の主要代謝酵素である CAD の翻訳後修飾による活性化が非 Akt 経路によって行われているためと結論している。以上の結果は、光遺伝学プローブを摂動系として初めて明らかになったことであり、光摂動系がシグナル伝達経路解明に有益であると主張している。

第 4 章は、第 2 章、第 3 章で明らかになった光摂動系の有益性を総括するとともに既存の薬剤刺激や遺伝学的な摂動と比較した際の光摂動系の優位性を論じている。また光摂動系の中でも光遺伝学の分子特異性、時間分解能という特性に着目し、シグナル伝達系の構成要素として予測されているフィードバック構造などのシグナルネットワーク解明への将来的な貢献可能性について述べている。

なお本論文は、田丸 輝也氏、服部 満氏、高松 研氏、塚田 晃代氏、二宮 康晴氏、Paolo Sassone-Corsi 氏、Ivor Benjamin 氏、小澤岳昌氏との共同研究の成果をまとめたものであるが、論文提出者が主体的に実験やデータ解析を行ったものである。そのため論文提出者の寄与が十分であると判断した。

したがって、博士（理学）の学位を授与できると認める。