

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 山 宿 大 介

生物の活動にはさまざまな周期の振動現象があるが、約 24 時間周期の概日リズムは、地球の自転による環境変動に生物が適応するため進化したと考えられている。哺乳類においては、睡眠・行動ばかりでなく、薬物の代謝や効果にも概日リズムがあり、医療の面からもその理解の深化が望まれている。申請者は、概日リズムを司る時計遺伝子の転写制御機構を詳細に調べ、肝臓など末梢臓器のリズム制御に関わる因子を探索した。本論文は、その研究成果をまとめたものである。

第 1 章では、高感度の遺伝子発現計測系を開発し、時計遺伝子の転写制御に関わるプロモーター上流配列を詳しく調べた。哺乳類の時計遺伝子は、その産物が複雑に絡み合う転写制御ネットワークを構成し、遺伝子上流の転写因子結合サイトとして E-box, RRE, D-box が提唱されていた。申請者は、中心的因子 Per1, Per2 のプロモーターで易分解性ルシフェラーゼを発現させ、それにより生じる蛍光で短期間の発現量測定を可能にした。Dibutyryl-cAMP をリズム惹起剤とすることで、1 時間の位相差が検出できる精度とした。Per1 には 5 つの E-box と 1 つの D-box があるが、数が多い E-box がピーク時刻を決定すること、Per2 にはピーク時刻を遅らせる新規配列 E' -box があること、従来は機能的でないと考えられた D-box が振幅増大に寄与することを明らかにした。

第 2 章では、D-box とその制御因子の機能を、高感度遺伝子発現計測系により更に検討した。D-box には、転写促進因子 DBP と転写抑制因子 E4BP4 が結合する。DBP を SiRNA により抑制すると周期は短くなり、逆に過剰発現させると周期が長くなった。E4BP4 を同様に制御すると、DBP とは反対の周期変動を引起した。これにより、D-box 制御因子による D-box を介したシグナルが、周期の長さの決定に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

第 3 章では、概日時計の中枢を担う視床下部の視交叉上核から遠く離れた肝臓などでの末梢時計がどう制御されているか検討を行った。肝細胞をシャーレ上で三次元培養することで、肝細胞の概日時計が長時間維持される系を開発し、時計の同調因子を特定することを検討した。時計遺伝子プロモーターによりルシフェラーゼを発現する遺伝子をもつ肝細胞を用い、バイオイメージング技術により発現の位相を観察した。睡眠障害を治療する場合、強い光を朝に当てると時計は早まるが、夜に当てると時計は遅れる。同じ刺激でも時間によって逆の効果があるわけで、これを位相反応曲線を示すといい、光が同調因子であることの証明となる。上記の三次元培養系で調べたところ、インスリンが肝細胞の末梢概日時計の同調因子であることが分った。インスリンの欠乏による糖尿病ラットを用いても、イ

インスリン投与は位相反応曲線を示したことから、個体レベルでもインスリンが肝臓の時計の同調因子と考えられる。このような糖尿病では、肝臓時計異常を伴うため代謝異常が増強されているのであろう。

第4章では、肝臓のような末梢臓器の概日時計に如何なる生理的意義があるか検討した。食餌が肝臓の概日時計の強力な同調因子であることが知られていたため、摂食のリズムを壊すことにより時計を変調させ、その影響を調べた。ラットで、1日のエネルギー摂取量は変えず、食餌を6時間間隔で与えた。すると、高コレステロール血症・高脂血症が悪化し、胆汁酸排泄量の低下や、肝臓のコレステロール代謝律速酵素 CYP7A1 の遺伝子発現ピークと時計遺伝子のリズムの変動が認められた。健康には規則正しい食生活が必要といわれてきたが、食事の量や質だけではなく、「いつ食べるか」が重要であることが概日リズムの維持に必要なことが確認されたのである。

以上、本研究では、概日リズムを制御する時計遺伝子のプロモーター領域にある転写因子結合配列の新たな役割を明らかにし、また肝臓における末梢概日時計の生理的な役割と同調因子の同定に成功した。これらの研究成果は、学術上応用上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。