

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 PADLOM Apirada
 論文題目 Re-evaluation of the circadian clock model in mammals
 (哺乳類の概日時計モデルの再検討に関する研究)

論文審査担当者

主査	名古屋大学准教授	大川	妙子
委員	名古屋大学教授	大蔵	聡
委員	名古屋大学教授	山本	直之
委員	名古屋大学教授	吉村	崇
委員	名古屋大学助教	塚田	光

論文審査の結果の要旨

PADLOM Apirada は、概日時計のリズムの発振機構の解明を目的として、概日時計遺伝子の発現誘導細胞株を樹立し、概日時計遺伝子のプロモーター活性、転写および翻訳産物量の測定を行った。また得られた結果をもとに数値解析を実施した。その結果、上記の細胞株における概日時計のリズム発振機構は、現在最も有力な発振機構モデルである、「概日時計遺伝子の転写・翻訳のネガティブフィードバックループモデル」では説明が困難であることを見出し、あらたな発振モデルにつながる手がかりを得た。以下にその要旨を記載する。

概日リズムは様々な生理活性が示す約 24 時間周期の振動であり、細胞内に存在する内因性の振動体、「概日時計」によって制御されている。生物は概日時計を用いて昼夜の訪れを予測しそれに備えることによって効率的に生命活動を営んでいる。また四季の環境変化に対する生物の適応機構として、日長の変化に応じて生理活性を調節する「光周性」が知られているが、概日時計はこの日長の測定にも関わっている。

現在、概日時計のリズム発振機構に関する最も有力なモデルは、「概日時計遺伝子の転写・翻訳のネガティブフィードバックループモデル」である。このモデルでは、概日時計遺伝子の翻訳産物が自身をコードする遺伝子の転写を負に制御するフィードバックループが、約 24 時間で一周することにより概日リズムが発振すると考える。このモデルが正しければ、概日時計遺伝子の mRNA 量、概日時計遺伝子の翻訳産物量（概日時計タンパク質量）、および概日時計タンパク質による転写の抑制は、いずれも概日リズムを示すと考えられる。また、概日時計遺伝子を恒常発現させた場合には、概日リズムの消失など大きな影響が生じると予想される。

哺乳類の概日時計の発振機構は、コアループと ROR/REV/*Bmal1* ループの 2 つのネガティブフィードバックループが共役したものとして理解されている。発振に必須とされるコアループでは、概日時計遺伝子 *Per* および *Cry* の転写が概日時計タンパク質 BMAL1-CLOCK 複合体によって促進されると、*Per* および *Cry* の mRNA、続いて PER および CRY タンパク質が合成される。PER および CRY は複合体を形成し、BMAL1-CLOCK 複合体の活性を阻害することによって、自身をコードする遺伝子の転写を抑制する。また ROR/REV/*Bmal1* ループは、BMAL1-CLOCK 複合体が、*Bmal1* 遺伝子の転写をそれぞれ正および負に制御する因子をコードする *ROR*、*REV-ERB* の転写を促進する。*Bmal1* の転写リズムは、ROR および REV-ERB タンパク質が *Bmal1* の転写調節領域に存在する RORE 配列を競合することによって生じると考えられている。2 つのループは BMAL1 を介して連結されており、単一のネガティブフィードバックループよりも安定なリズムを発振できるとされている。

一方でこれまでに、概日時計遺伝子を恒常発現させた例がいくつか報告されている。これらの先行研究においては、*Per* 遺伝子や *Bmal1* 遺伝子を恒常的に発現させた場合も、予想に反して概日時計遺伝子の転写リズムは消失することなく安定に継続するこ

とが確認されている。これらの結果は現在のモデルに対する反例の 1 つであるとも考えられるが、得られた結果に基づいたモデルの本格的な再検討には至っていない。そこで本研究では、定量的な実験と数値解析により転写・翻訳のネガティブフィードバックループモデルの検証に取り組んだ。

本研究では、主に *Bmal1* 遺伝子および ROR/REV/*Bmal1* ループに着目して研究を進めることとした。まず *Bmal1* を非リズム性のプロモーターから薬剤の濃度依存的に発現誘導できる細胞株を樹立した。ヒト U2OS 細胞において、CRISPR-Cas9 によりゲノム上の *Bmal1* 遺伝子を破壊し、ドキシサイクリン (DOX) 誘導性のプロモーター P_{TRE3Gs} より BMAL1 タンパク質をコードする遺伝子を発現する DNA コンストラクトを安定導入した。また *Bmal1* プロモーター (P_{Bmal1}) にホタルルシフェラーゼ遺伝子 (*Fluc*) を連結したレポーターを導入した。

この細胞株に 0~10 $\mu\text{g/mL}$ の DOX を投与し、発光を指標に P_{Bmal1} 活性を測定した。その結果、(1) P_{Bmal1} 活性レベルは DOX 濃度依存的に低下し、(2) DOX 濃度がある一定の範囲内 (0.05~1 $\mu\text{g/mL}$) で P_{Bmal1} 活性は明瞭な概日リズムを示した。また (3) DOX 濃度は概日リズムの周期には影響せず、周期は常に約 25 時間であった。(1)より、BMAL1 タンパク質は P_{Bmal1} 活性を負に制御すること、(2)より、過去の先行研究と同様、恒常発現した BMAL1 は概日時計遺伝子の転写リズムを回復しうること、(3)より BMAL1 タンパク質量は周期の決定には無関係であることが示唆された。

次に、*Per2* プロモーター (P_{Per2}) 活性に対する DOX 濃度の影響を調査した。上記の細胞株に、 P_{Per2} の下流に Emerald Luc をコードする遺伝子 (*Eluc*) を連結したレポーターを一過的に導入し、600 nm のロングパスフィルターを用いた二波長測定により P_{Per2} および P_{Bmal1} 活性を同時計測することとした。その結果、 P_{Per2} 活性リズムは P_{Bmal1} 活性と同様の DOX 濃度域で回復した。さらに野生型細胞で見られる P_{Per2} 活性リズムと P_{Bmal1} 活性リズムの逆位相の関係も再現された。

これらのリズムの発振機構に関する手がかりを得るため、まず *Bmal1* mRNA 量と BMAL1 タンパク質量の定量を行った。一般に mRNA やタンパク質の蓄積量は、合成および分解の過程によって制御されると考えられるため、 P_{TRE3Gs} が非リズム性のプロモーターであっても、mRNA およびタンパク質の分解にリズムがあれば、蓄積量はリズムを示す可能性がある。まず DOX 濃度が 0、0.01、0.1、および 1 $\mu\text{g/mL}$ の条件下で誘導された mRNA とタンパク質の量を比較した。その結果 mRNA およびタンパク質の発現レベルは DOX 濃度依存的に上昇し、特にリズムの形状が大きく変化する 0.01 $\mu\text{g/mL}$ と 0.1 $\mu\text{g/mL}$ の間で大きく変化した。次に P_{Bmal1} 活性および P_{Per2} 活性が明瞭なリズムを示す 0.1 $\mu\text{g/mL}$ と 1 $\mu\text{g/mL}$ の条件下で mRNA およびタンパク質の時

系列変化を確認したところ、いずれも有意な概日リズムを示さなかった。さらに ROR/REV/*Bmal1* ループの構成因子である REV-ERB α および CLOCK タンパク質の

蓄積量についても同様の実験を実施したが、明瞭なリズムは検出されなかった。したがって P_{Bmal1} および P_{Per2} 活性の概日リズムが、細胞内の概日時計タンパク質量の振動によって駆動されているとは考えにくい。

そこで、リズム発振機構についてさらなる手がかりを得るため、 P_{Bmal1} 活性リズムに対して過渡応答解析を行った。過渡応答解析は入力に対する出力の時間応答を解析する手法であり、入出力の関係を表す伝達関数を求めることで系の振る舞いを理解する。1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の DOX 存在下において P_{Bmal1} 活性リズムは 2 次の伝達関数によってよく近似できた。この伝達関数は、マス-ばね-ダンパ系や LC 直列回路の減衰振動を表すものと同型であった。また、0.1 および 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の DOX 存在下においては、振る舞いは 3 次の伝達関数によって近似できたが、この伝達関数は上記の 2 次の伝達関数と 1 次の伝達関数の積として記述できた。この 1 次の伝達関数は、発光値が時間とともに上昇し一定の値に漸近する挙動を表している。得られた伝達関数を比較したところ、DOX の濃度によって、 P_{Bmal1} 活性の振動に関わる部分は大きく影響を受けず、固有角振動数および減衰係数の値にほとんど変化はなかった。一方で P_{Bmal1} 活性のベースラインの挙動は、DOX の濃度によって大きく変化した。これらの結果は、BMAL1 は P_{Bmal1} 活性のベースラインを制御しているが、 P_{Bmal1} 活性リズム発振の過程にはほとんど関与していないことが示している。以上の結果より、少なくとも本研究で用いた *Bmal1* 発現誘導株においては、転写・翻訳のネガティブフィードバックループモデルで P_{Bmal1} 活性リズムの発振機構を説明するのは困難であり、*Bmal1* 非依存的な振動体の存在が示唆された。

ヒトの睡眠覚醒、代謝、ホルモン分泌などの様々な生理機能は概日時計によって制御されている。現代社会では、人類は自身の概日時計に逆らって、長時間労働や交代制勤務を余儀なくされている。近年、様々な精神疾患、代謝性疾患、がんなどの増加の一因として、概日時計の乱れが挙げられている。概日時計は、これらの疾患に関連する新たな薬剤開発の標的として期待されているが、そのためには概日時計の発振機構を正確に理解することが不可欠である。また、動物の繁殖や植物の花芽形成は光周性による制御を受けていることが知られているが、概日時計の発振機構が解明されれば、光周性における日長測定機構が明らかとなり、動物や植物の生産性の向上に資することが期待される。

このように本研究は、農学における重要な課題である、人類の健康の維持増進、作物および畜産物の生産性の向上のために必要な基礎研究であると考えられる。したがって、本委員会は本論文が博士（農学）の学位論文として十分な価値を有すると認め、論文審査に合格と判定した。