

( 続紙 1 )

京都大学	博士 (薬科学)	氏名	田井中 元美
論文題目	時計遺伝子PER2の概日時計機能に関する研究		
(論文内容の要旨)			
<p>地球上の多くの生物は内因性の概日時計を持ち、行動やホルモン分泌などの様々な生理現象が24時間のリズムに調律されている。この概日時計の振動は、全身の個々の細胞において時計遺伝子Period (Per) を中心とした転写・翻訳のフィードバックループにより生み出される。哺乳類のPer遺伝子には3種類のサブタイプ (Per1、Per2、Per3) が知られているが、中でもPer2が最も重要な役割を担うと考えられている。そこで申請者は、Per2遺伝子とその翻訳産物である時計タンパク質PER2に着目し実験を行った。まず、翻訳阻害条件下におけるPER2の概日時計機構への寄与を検証するため、マウス胚性線維芽細胞を用いて、タンパク質合成阻害剤シクロヘキシミド(CHX)存在下でPER2の発現を追跡した(第一章)。また、生体内においてPER2の組織ごとの役割を解明するため、Per2コンディショナルノックアウト(CKO)マウスを作製した(第二章)。</p>			
<b>第一章: マウス胚性線維芽細胞内PER2タンパク質動態の解析</b>			
<p>概日時計を持つことが知られるシアノバクテリア細胞においては、タンパク質の翻訳を阻害した場合でも、中心的な時計タンパク質であるKaiCがリン酸化の概日振動を維持することが示された。しかし一方で、哺乳類においても同様の現象が観察されるか、すなわち哺乳類細胞内でも翻訳に依存しない時計タンパク質修飾リズムが継続するのかは、これまで検証されてこなかった。そこで申請者は、翻訳阻害下でのPER2の時間変動プロファイルを追跡した。哺乳類のPER2は、シアノバクテリアKaiCと同様に、発現量だけでなくリン酸化にも顕著な概日リズムがある。申請者は、PER2に対する新規抗体を作製し、マウス胚性線維芽細胞内の内在性PER2を数日にわたって継続的に観察した。その結果、CHX処理により新規タンパク質合成を阻害した場合には、PER2の概日振動が維持されないことを見出した。またプロテアソーム阻害剤MG-132をCHXと同時に処理し、PER2の分解を減弱させた場合においても、PER2の概日リズムは観測することができなかった。これらの結果から、ともに振動子として共通の特徴をもつ中心的な時計タンパク質であるマウスのPER2とシアノバクテリアのKaiC</p>			

は、翻訳阻害条件下では本質的に異なる挙動を示すことがわかった。

## 第二章:組織特異的Per2欠損マウスの作製によるPER2生理機能の解明

Per2などの時計遺伝子を全身欠損したマウスは、行動リズムだけでなく、種々の代謝異常を引き起こし、ひいては疾病に至ることが報告されている。しかし、概日時計は全身の細胞に存在するため、この病態がどの組織の時計の異常により引き起こされるかは不明なままである。そこで申請者は、組織ごとのPER2の役割を評価するため、概日時計の中枢である脳の視交叉上核(SCN)および代謝機能に密接に関わる脂肪組織(AT)特異的なPer2 CKOマウス(以下それぞれ、SCN-CKOマウスおよびAT-CKOマウス)を作製した。

まず概日行動リズムを計測したところ、全身-ノックアウト(KO)マウスは、野生型マウスに比べて恒暗条件下での概日行動周期長が有意に短かった。これは、これまでの報告と合致するものである。また、SCN-CKOマウスの概日行動周期長は対照群と比較して有意に短かったが、AT-CKOマウスは対照群と同等の概日行動周期長を示した。これらの結果は、概日時計の中枢であるSCNのPER2が恒暗条件下でのマウスの概日行動周期長の決定に深く関与していることを示している。

続いて、代表的な代謝異常である肥満におけるPER2の役割を検討するため、全身-KOマウスと野生型マウスに対し高脂肪食を与え、その体重変動を測定した。高脂肪食負荷により野生型マウスが顕著な肥満を示すのに対して、全身-KOマウスでは有意な体重増加は観察されなかった。この結果から、PER2が肥満に寄与することが明らかとなった。

以上より、哺乳類細胞内において時計タンパク質PER2の概日振動維持にはその翻訳が必要であること、およびPer2 全身-KOマウスにおける概日行動周期長の短縮はSCNのPer2欠損によることが明らかになった。さらに、PER2は肥満とも関わる重要な分子であることが明らかとなった。本研究の成果より、PER2タンパク質の創薬標的としての研究の進展が期待されるが、今回作製したPER2抗体やPer2 CKOマウスが、PER2タンパク質の詳細な機能解析を加速させる重要な手段となるであろう。

(続紙 2 )

(論文審査の結果の要旨)

我々の体や病気に日内変動があることは古くより知られている。しかし、これが体内にある概日時計(生物時計、体内時計、**Biological clock**ともいう)によって主体的に生み出される概日リズムであるということが認められたのは、ほんの数十年前のことである。Per2遺伝子のリズム発振機構を、タンパク質のは哺乳類概日リズムの本体を司る時計遺伝子として知られるが、その遺伝子の概日時計の役割はごく一部しか未だ解明されていない。今回、申請者は、Per2とそれを裏打ちする分子機構を初めて明らかにした。具体的には、哺乳類細胞内において時計タンパク質PER2の概日振動維持にはその翻訳が必要であること、およびPer2遺伝子の全身欠損マウスにおける概日行動周期長の短縮は、概日リズム中枢であるSCNのPer2欠損によることが明らかになった。さらに、概日時計の異常は細胞代謝と密接な関連があり、各種疾患を惹起することが知られているが、Per2欠損マウスの解析からPER2は肥満とも関わる重要な分子であることが明らかとなった。これらの結果は、Per2が概日時計の重要な遺伝子であり、近年急増するリズム異常が誘因となる生活習慣病の病因としても注目されており、今後の展開が大いに期待される。よって、本論文は博士(薬科学)の学位論文として価値あるものと認める。また、平成27年2月23日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当分の間当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

要旨公表可能日： 2017年6月22日以降