

(別紙様式博9)

平成27年 2月 20日

京都府立大学大学院
生命環境科学研究科長 様

審査委員 主査 佐上 郁子 印

副査 渡部 邦彦 印

副査 高野 和文 印

博士学位論文審査等の報告について

京都府立大学学位規程第12条の規定に基づき、下記の申請者に係る博士学位論文の審査結果等について、別添の博士学位論文審査等報告書のとおり報告します。

記

1 氏 名 芳井 克洋

2 学位論文題目

Studies on the regulation of the DNA-binding activity of NPAS2, a mammalian circadian transcription factor

(哺乳類時計転写因子 NPAS2 の DNA 結合活性の制御に関する研究)

博士学位論文審査等報告書

審査委員 主査 佐上 郁子 印

副査 渡部 邦彦 印

副査 高野 和文 印

1 氏 名： 芳井 克洋

2 学位の種類
博士（ 農学 ）

3 学位授与の要件
学位規程第3条第3項該当

4 学位論文題目
Studies on the regulation of the DNA-binding activity of NPAS2, a mammalian circadian transcription factor
(哺乳類時計転写因子 NPAS2 の DNA 結合活性の制御に関する研究)

5 学位論文の要旨および審査結果の要旨

【学位論文の要旨】

別紙に記載

【論文目録】

別紙に記載

【審査結果の要旨】

第1章では、体内時計の制御機構についてのこれまでの知見を概説し、本研究の背景と目的についてまとめている。体内時計の本体は、時計遺伝子の転写レベルの制御とその産物である時計タンパク質による翻訳後ネガティブフィードバックループ機構である。本研究の対象である NPAS2 (Neuronal PAS domain protein 2) は時計制御のコアループの正の因子として働く転写因子であり、転写因子 BMAL1 とヘテロダイマーを形成し、*Per* や *Cry* などの種々の時計遺伝子上流に結合し転写を促進する。本研究では、NADH や NADPH (NAD(P)H), pH などの細胞内シグナルによる NPAS2 の機能制御を解析することで、光以外のシグナルによる体内時計制御機構を理解することを目的としている。

第2章では、NPAS2 の各種欠損変異体を作成し、NPAS2/BMAL1 ヘテロダイマーの DNA 結合活性を解析することで NPAS2 と NAD(P)H との相互作用部位について検討をおこなっている。その結果、NPAS2 は N 端の 1-61 アミノ酸という短い断片で BMAL1 とヘテロダイマーを形成して DNA に結合でき、NAD(P)H はその DNA 結合活性を濃度依存的に促進することがわかった。これにより、NPAS2 と NAD(P)H との相互作用部位の範囲を絞り込むことができた。また、BMAL1 ホモダイマーの DNA 結合活性に対し NADPH が阻害的に働くことがわかり、活性型である NPAS2/BMAL1 ヘテロダイマーの形成を補助することが示唆された。一方で、NAD(P)⁺や、ニコチンアミドや 2', 5'-ADP などの NAD(P)H 類似化合物は、単独では NPAS2/BMAL1 ヘテロダイマーの DNA 結合活性に影響を与えず、さらにいずれの化合物も NAD(P)H の効果に対して競合しないことから、NPAS2 は NAD(P)H/NADP⁺濃度比を感知するのではなく、NAD(P)H を特異的に認識していることを示した。

第3章では、NPAS2 の機能に対する pH の効果について検討している。その結果、NPAS2/BMAL1 ヘテロダイマーの DNA 結合活性は pH 6.5 から 8.0 の範囲で低 pH 側で小さく、高 pH 側で大きいこと、この効果には NPAS2 の N 端の 1-61 アミノ酸部分で十分であることを示した。加えて、NADPH の効果と pH の効果は相加的であり、NPAS2/BMAL1 ヘテロダイマーの DNA 結合活性は高 NADPH, 高 pH で最大になることが明らかとなった。また、NPAS2/BMAL1 ヘテロダイマーへの DNA 結合の見かけの K_D 値を算定したところ、 K_D 値は nM オーダーで NADPH と pH の効果により約 14 倍親和性が増加した。さらに、NIH3T3 細胞を用いた解析から、NPAS2 依存的な転写活性は、培地の pH の影響を受け、 $\text{pH } 6.8 < \text{pH } 7.2 < \text{pH } 7.7$ と大きくなることを示した。実際の細胞内 pH は pH 6.8 ~ 7.2 付近に保たれていると考えられているが、この生理的な範囲の pH 変動でも NPAS2 の転写活性は充分制御され得ることがわかった。

第4章では、本研究の成果をまとめ、複雑な体内時計の制御機構研究におけるこの研究成果の位置づけとこれからの研究の展望について議論している。

本研究は、体内時計制御に関わる中心的な転写因子である NPAS2 が、代謝生成物の NAD(P)H や細胞の環境因子である pH によって機能制御されること、さらにこれらの効果が相加的であることを分子レベルで明らかにしている。これらの知見は、体内時計の新たな制御機構を提案するものであり、時計制御についての理解を深め、肥満や高血圧、がんなどに関与する体内時計変調の改善法を開発する上で貢献することが期待される。よって、以上の内容は本学の博士論文として価値のあるものと判断した。

6 最終試験の結果の要旨

平成 27 年 2 月 16 日（月）午後 1 時より第二講義室にて博士論文発表会を公開で実施した。口頭発表後、最終試験として質疑応答が行われた。質問内容は、生体内での補因子の濃度や細胞内のオルガネラ pH とその効果に対する妥当性、DNA 結合活性制御応答の時間スケールとそれを明らかにするための方法論、体内時計の可塑性と今回の制御機構の位置づけ、NPAS2 とそのホモログの CLOCK の相違と体内時計制御に置ける役割など、非常に多岐にわたったが、いずれの質問に対しても的確に回答がなされた。最終試験の結果、審査委員全員一致で合格とした。