

論文内容の要旨

申請者氏名 芦森 温茂

多くの生物において、約 24 時間の周期性を有する概日時計機構は、糖代謝や脂質代謝など様々な代謝を概日的に制御することから、生体機能を維持する上で概日時計による律動的な代謝の制御が重要だと考えられている。このように概日時計機構による代謝制御は広く研究されている一方で、代謝因子が時計機構の制御に関与していることも報告され始めている。例えば、基質として NAD^+ を利用する脱アセチル化酵素 SIRT1 やポリ ADP リボシル化酵素 PARP1 は、時計タンパク質 PER2、BAML1 を脱アセチル化することや、CLOCK をポリ ADP リボシル化することが報告されている。これらは NAD^+ 代謝が概日時計を制御する可能性を示しているがこれまで十分に検証されてこなかった。本研究では、細胞内 NAD^+ 量を与える概日時計機構への影響を明らかにすることを目的とした。

まず申請者は、 NAD^+ 生合成の主要経路である NAD^+ 再利用経路の律速酵素 NAMPT の活性阻害剤を用いて NAD^+ 減少による時計遺伝子発現への影響を検証し、NAMPT 活性阻害剤の添加量依存的な時計遺伝子発現の周期延長および振幅の減少を見出した。これらの現象が NAD^+ 減少に起因するか確認するために、 NAD^+ 前駆体 NMN を NAMPT 活性阻害剤と同時添加することによる NAD^+ 回復実験を試みた。その結果、 NAD^+ 量の回復に伴い、周期延長と振幅低下が消失した。このことは NAMPT 活性阻害剤による周期延長と振幅低下が NAD^+ 減少に起因することを示している。一方で申請者は、 NAD^+ 量が 2 倍程度増加しても概日時計機構には影響を与えないことも明らかにした。

次に申請者は、CRISPR/Cas9 システムなどの遺伝学的手法や薬理学手法を駆使し、ポリ ADP リボシル化酵素 PARP1 が NAD^+ 減少による周期延長に関与することを明らかにした。さらに、*Parp1* 欠損細胞株を用いた検証から、 NAD^+ -PARP1 経路を介さない NAD^+ 量依存的な周期延長機構の存在も明らかにした。

一方で申請者は、 NAD^+ 減少細胞において時計タンパク質 PER2 が細胞質局在化すること、PER2 の細胞質局在化が E-box 制御下遺伝子 *Rev-erba* の発現抑制の減弱を引き起こし、増加した REV-ERB α による *Bmal1* 発現抑制の増強が振幅を低下させる可能性を示した。

今回の研究により、細胞内 NAD^+ 量の減少は周期長延長と振幅減少を引き起こすこと、さらに周期長制御は NAD^+ 依存性酵素 PARP1 の活性制御に関与すること、振幅制御は PER2 の細胞内局在制御に関与する可能性、の 3 点が示された。

☐ やむを得ない事由[図書出版、学術雑誌等への掲載、特許・実用新案出願、個人情報等の保護、その他 ()]により本要旨を非公表とする。

【※該当する事由に○印をすること】

論文審査結果の要旨

申請者氏名 芦森 温茂

約 24 時間周期のリズムを作り出す概日時計機構の分子メカニズムの解析は、その構成分子が転写因子であるため、遺伝子発現制御メカニズムの解析が主であった。しかしプロモーター解析等だけではどのようにして 24 時間周期が作り出されているのは明らかにできなかった。一方、時間依存的なリン酸化をはじめとする翻訳後修飾の関与が明らかとなってきた。時間依存的な翻訳後修飾には、アセチル化やポリ ADP リボシル化なども報告されており、これらに関わる酵素として SIRT1/6 や PARP1 が報告されている。これら酵素は NAD⁺を基質とすることが知られているが、細胞内 NAD⁺量の変化がどのように概日時計機構に影響を及ぼすかについてはほとんど不明のままであった。さらに、細胞レベルで加齢にともない NAD⁺量が減少すること、また、細胞老化にともない概日時計周期が延長することを申請者の研究室で報告している。そこで申請者は NAD⁺量、特に NAD⁺量減少、による概日時計機構への影響解明を目的に遺伝子改変が行いやすく、最もシンプルに NAD⁺量に対する概日時計機構への影響を研究できる培養細胞を用いて研究を行なった。

まず申請者は、概日時計機構は 2 倍程度の NAD⁺量増加では影響が出ず、NAD⁺量を 1/2 以下に減少させた時にのみ、概日時計の周期延長および振幅低下を呈することを明らかにした。次に申請者は、shRNA や CRISPR/Cas9 による NAD⁺依存性酵素遺伝子を減少、欠損した細胞を作成し、NAD⁺量減少による周期延長にポリ ADP リボシル化酵素 PARP1 が関与することを突き止めた。PARP1 標的分子として既知の CLOCK を含めた時計タンパク質のポリ ADP リボシル化の同定には至っていない。しかしこの結果は、新規ポリ ADP リボシル化タンパク質が時計機構の制御に関与することを示唆している。さらに、NAD⁺-PARP1 経路は、NAD⁺量減少による周期延長の主要経路であることのみならず、PARP1 非依存性経路が存在することも見いだした。

一方で NAD⁺量減少により、時計タンパク質 PER2 の細胞質局在が増加すること、PER2 の細胞質局在増加は PARP1 非依存性であることを見出した。転写抑制因子 PER2 の細胞質局在が転写抑制因子 *Rev-erb* の転写を促進させることで *bmal1* の転写抑制を引き起こすことが振幅減少の分子機序である可能性を示した。さらに、PER2 の細胞質局在は概日時計周期を延長させることが複数報告されており、NAD⁺-PER2 経路が NAD⁺-PARP1 非依存性経路の可能性を示唆している。

以上のように、本論文は細胞内 NAD⁺量による概日時計制御という基礎生物学的に重要な知見を示したのみならず、加齢による概日時計の変調を理解するうえでも意義のある知見であり、学術上、応用上貢献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（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。

☐ やむを得ない事由[図書出版、学術雑誌等への掲載、特許・実用新案出願、個人情報等の保護、その他 ()]により本要旨を非公表とする。

【※該当する事由に○印をすること】