

7.5 学位論文要旨 (別紙様式博 5)

学位論文要旨

学位授与申請者

氏名 芳井 克洋 ⑩

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)

本研究は、哺乳類の体内時計の制御に関わる主要な転写因子である NPAS2 の DNA 結合活性に与える NADH や NADPH (NAD(P)H) や pH の効果を詳細に解析することで、光シグナル以外のシグナルによる体内時計制御機構について研究・考察したものである。

Chapter 1: General introduction (序論)

体内時計の本体は、時計遺伝子の転写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機構であることが知られており、現在では時計の中心を形成するコアグループと、それを補助するグループに関連する 20 種類以上の時計遺伝子が同定されている。その中で、NPAS2 (Neuronal PAS domain protein 2) は時計制御のコアグループの正の因子として働く転写因子であり、NPAS2 欠損マウスでは睡眠リズム異常、食事制限への適応障害、一部の記憶の形成障害などが起こることが報告されている。NPAS2 は DNA 結合に関与する bHLH ドメイン、複合体形成に関与しヘムを結合する 2 つの PAS ドメイン、転写活性化ドメインからなるタンパク質で、転写因子 BMAL1 とヘテロダイマーを形成し、*Per* や *Cry* などの時計遺伝子の上流に結合し転写を促進する。これまでに、NPAS2/BMAL1 ヘテロダイマーの DNA への結合は NADH/NAD⁺濃度比、NADPH/NADP⁺濃度比、および NPAS2 のヘムへの CO の結合により制御されることが報告されているが、その分子機構の詳細は不明な点が多い。一方で、動物培養細胞の培地の pH 変化が時計遺伝子の発現リズムに影響することが報告された。そこで本研究では、NAD(P)H 濃度や pH などの細胞内シグナルによる NPAS2 機能の制御機構を解析することで、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た。

Chapter 2: Effects of NAD(P)H on the DNA-binding activity of NPAS2

(NPAS2 の DNA 結合活性への NAD(P)H の効果)

NPAS2/BMAL1 ヘテロダイマーの DNA 結合活性は、NAD(P)H により促進され、NAD(P)⁺により阻害されることが報告されていた。そこで、NPAS2 と NAD(P)H との相互作用部位について検討するため、各種欠損変異体の大腸菌発現系を作製した。

各タンパク質を精製し、別途精製した BMAL1 タンパク質とともに、ゲルシフト法により DNA 結合活性を調べた。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、種々の NAD(P)H 類似化合物を用いた実験から、ニコチンアミドや 2',5'-ADP などの類似化合物に加え、これまで阻害的に働くと考えられてきた NAD(P)⁺についても、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なかった。さらに、NAD(P)⁺を含むいずれの化合物も 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が示唆された。細胞内の NAD⁺濃度が周期的に変動し、NAD⁺依存的なヒストン脱アセチル化酵素 SIRT1 を介して体内時計制御に関与することが近年報告されている。これに対し本研究の NAD(P)H による効果は直接的な制御であり、一過性の急激な NAD(P)H 濃度の変化に素早く応答するための制御機構であると考えられる。

Chapter 3: pH and NADPH additively regulate the DNA-binding activity of NPAS2

(pH と NADPH は相加的に NPAS2 の DNA 結合活性を制御する)

本章では、精製タンパク質を用いたゲルシフト法により、反応時の pH を変化させ、NPAS2 の DNA 結合活性に対する pH の効果について検討した。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がわかった。またこのとき、BMAL1 ホモダイマーの DNA 結合活性は pH に影響されなかったことから、pH を感知するのは NPAS2 の bHLH ドメインであることが示唆された。加えて、第 2 章で述べた NADPH の効果と、pH の効果の関連について検討したところ、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 値は NADPH の効果と pH の効果により 9~125 nM の範囲で変化した。この値は他グループにより報告された CLOCK/BMAL1 ヘテロダイマーの見かけの K_D 値と同程度であったことから、NPAS2 は CLOCK と同様の DNA 結合親和性を有することが示唆された。さらに、NIH3T3 細胞を用いたレポーターアッセイにより、NPAS2 に依存的な転写活性が培地の pH により変化するかを調べた。その結果、NPAS2 依存的な転写活性は、培地の pH の影響を受け、 $\text{pH } 6.8 < \text{pH } 7.2 < \text{pH } 7.7$ となった。こ

のことより、細胞外 pH の変化による時計遺伝子発現リズムの変動に、NPAS2 が関与する可能性が示唆された。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、この範囲の pH 変動でも NPAS2 の DNA 結合活性は充分制御され得ることがわかった。例えばガン細胞では、解糖系の亢進により細胞内 pH が酸性化すると、イオンチャネルなどの発現が誘導され、プロトンが細胞外へ放出されることで細胞外の pH も低下するなど、ダイナミックな変化が起こっており、そのような環境下の体内時計にこの pH 効果が関与する可能性が示唆された。

Chapter 4: Summary and conclusion (総括と結論)

本研究では、哺乳類の体内時計制御に関わる転写因子であり、ヘムや CO、NO などのガス分子、NAD(P)H といった種々の環境シグナルを感知するといわれる NPAS2 に着目し、その DNA 結合活性の詳細な制御機構について明らかにすることを目的とした。第 2 章では、NAD(P)H の効果について検討し、NPAS2 の N 端の 1-61 アミノ酸部分がシグナルの感知に重要な部位であること、NAD(P)⁺を含む類似化合物は NPAS2 の DNA 結合活性に影響しないことを示した。第 3 章では、NPAS2/BMAL1 ヘテロダイマーの DNA 結合活性は pH で制御されること、この効果には NPAS2 の bHLH ドメインが重要であること、pH による DNA 結合活性の促進は、NADPH 添加により更に促進されることを明らかにした。また NIH3T3 細胞を用いて、NPAS2 依存的な転写活性が細胞外の生理的な範囲での pH 変化に影響されることを示した。

本研究により、NPAS2 の DNA 結合活性の制御機構の 1 つとして、代謝生成物である NAD(P)H の効果について、また細胞の環境因子である pH の効果について分子レベルでの新たな知見を得た。さらに、これらの効果が相加的であることを示した。以上のことから、体内時計は、細胞内で同時多発的に起こる多くの環境変化に応じて影響を受けるが、相互に関連し調和のとれた制御機構をもつことが示唆される。したがって、体内時計制御の実態を明らかにするには、ひとつひとつの制御機構を詳細に解析すると同時に、それぞれの効果を統合的に解釈することが必要である。