

論文の内容の要旨

論文題目 Analysis of protein complexes involved in regulation of *Per1* expression

和訳 *Per1* 発現制御に関わるタンパク質複合体の解析

指導教官 榊 佳之 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 10 年 4 月入学

医学博士課程

分子細胞生物学専攻

小池 宣也

生物には概日リズムとよばれる行動や代謝活動を支配する周期約 24 時間のリズムが見出される。概日リズムは生体内の内因性の時計(体内時計)によって自律的に支配されている。現在までに、概日リズムを支配している遺伝子がいくつか同定されてきており、哺乳類とショウジョウバエでは、時計細胞の構造と機能には著しい違いが観察されるにも関わらず、両者共通の時計遺伝子が機能していることが明らかになってきた。ショウジョウバエでは *timeless (tim)* 遺伝子と *period (per)* 遺伝子が概日リズムを支配することが知られている。*per* 及び *tim* 遺伝子の発現には日周変動が観察され、その維持には dCLOCK 及び dBMAL1 が転写の誘導に、PER 及び TIM が抑制に機能している。Cryptochrome (CRY) は光依存的に TIM と結合し、光による TIM の分解に関与してい

る。また、Casein kinase Iε (CKIε) のホモログである Double-time (DBT) は PER をリン酸化することで、PER の分解を促進している。哺乳類においても、*Per1*、*Per2*、*Per3* 遺伝子の発現には、時計細胞の存在する脳視床下部の視交叉上核において、日周変動が観察される。*Per* 遺伝子群の発現日周振動は、*Clock*、*Bmal1*、*cry1*、*cry2*、*tau* などの現在得られているすべてのリズム変異体において、著しく影響を受ける。また、*Per1* 遺伝子破壊マウスや *Per2* 遺伝子変異マウスが行動の概日リズムに異常を示すことから、*Per* 遺伝子群の発現日周リズムが哺乳類の概日リズム形成に必須であると考えられている。*Per1* 遺伝子の発現には、CLOCK 及び BMAL1 が正の転写因子として機能している。CLOCK 及び BMAL1 はヘテロダイマーを形成し、*Per1* プロモーター上に存在する E-Box(CACGTG)配列に結合して、*Per1* の転写を促進している。一方、転写抑制には、*cry1* 及び *cry2* が機能していることが、*cry1* 及び *cry2* 遺伝子破壊マウスによる遺伝学的解析や、*Per1* 発現レポーターを用いた生化学的解析によって知られている。それにもかかわらず、PER1、PER2、PER3、TIM を含めた、転写抑制の詳細な分子機構までは明らかにされていない。

本論文では、まず、*Per* 遺伝子の転写抑制因子として期待される、ショウジョウバエ *tim* 遺伝子のヒト及びマウスホモログを単離決定した(それぞれ *hTIM1*、*mTim1*)。 *hTIM1* 及び *mTim1* は、それぞれ、1208 アミノ酸、1197 アミノ酸の ORF を支配していた。*hTIM1* 及び *mTIM1* とショウジョウバエの TIM とのアミノ酸配列を比較したところ、PER との結合領域を含む5つの領域で良く保存されていた。*hTIM1* と *mTIM1* のアミノ酸配列は約 84%一致していた。FISH の結果、それぞれは、染色体上 12q13、10D3 にマップされ、両生物間のシンテニーであることが明らかになった。これらの結果から *hTIM1* と *mTim1* はショウジョウバエ *tim* の構造ホモログであると結論された。ノーザン解析の結果では、ヒト及びマウスの多くの組織において、単離された cDNA の全長にほぼ一致した長さを有する poly(A)⁺RNA のバンドが確認された。マウスの脳での *Tim1* の発現レベ

ルは、SCNにおいて高かった。しかしながら、その発現量にはショウジョウバエ *tim*に見られるような、明暗及び恒暗条件下で日周変動が観察されなかった。また、TIM1 と、現在まで知られている哺乳類時計分子 PER1、PER2、PER3、CLOCK、BMAL1、CRY1、CRY2、CKIεのいずれとの相互作用も検出することはできなかった。さらに、哺乳類培養細胞における *Per1* 発現リポーター解析では、TIM1 は CLOCK、BMAL1 による *Per1* 転写誘導にも、CRY1 や CRY2 による転写抑制にも影響を与えなかった。これらのことから、哺乳類 TIM1 は、一次構造の類似性にも関わらず、時計分子としての機能を維持しておらず、哺乳類では、他のタンパク質が TIM の代わりに *Per1* の転写制御を担っていることが示唆された。

そこで、*Per1* の転写制御分子機構を解明するため、*Per1* の正負の転写制御に関わる時計分子間の相互作用を解析した。哺乳類培養細胞を用いた two-hybrid 解析では、PER1、PER2、PER3 のいずれも、CLOCK と BMAL1 の相互作用に影響を与えなかったが、CRY1 又は CRY2 によって、この相互作用はほぼ完全に阻害された。このことから、*Per1* の転写は、正の転写因子である CLOCK と BMAL1 の相互作用を CRY が阻害することで抑制されると考えられた。一方、CRY1 及び CRY2 を bait にして two-hybrid 解析を行なった結果、これらは PER1、PER2 それぞれと相互作用するものの、CLOCK、BMAL1 又は CLOCK-BMAL1 複合体との相互作用を検出することはできなかった。さらに、ウサギ網状赤血球抽出液の *in vitro* 翻訳系で合成した CRY1、CRY2、CLOCK、BMAL1 を用いた免疫沈降法による解析では、CRY1 及び CRY2 だけでは CLOCK-BMAL1 複合体形成に影響を与えなかった。これらの結果は、CLOCK-BMAL1 複合体による *Per1* の転写を抑制する為には、CRY1 と CRY2 以外にも必要な分子が介在していることを示唆している。そこで、CLOCK、BMAL1、CRY を過剰発現させた哺乳類培養細胞を使って、免疫沈降法によって、BMAL1 及び CRY と相互作用している分子をスクリーニングした。その結果、約 27kDa のタンパク質が、

CLOCK-BMAL1-CRY 複合体に含まれ、このタンパク質が、それぞれ、BMAL1、CRY と相互作用していることを見出した。これらのことから、CRY はこの 27kDa のタンパク質を介して CLOCK、BMAL1 複合体と結合することで、CLOCK-BMAL1 複合体による *Per1* の転写に対する抑制能を発現していると考えられた。

以上の結果、哺乳類 TIM は、その一次構造上でのショウジョウバエ TIM との類似性にも関わらず、哺乳類の他の時計分子との相互作用を検出できなかった。また、*Per1* の転写制御においてもその関与が認められなかった。哺乳類 *Per1* 発現誘導にはショウジョウバエと同様に CLOCK-BMAL1 ヘテロダイマーが機能しているものの、転写抑制には、ショウジョウバエとは異なり、TIM ではなく CRY が関わっていた。本研究では、CRY が CLOCK、BMAL1 と直接相互作用するのではなく、27kDa の未知のタンパク質を介して相互作用していることを見出した。即ち、この 27kDa のタンパク質を介した、CLOCK、BMAL1、CRY からなる複合体形成が、*Per1* の転写抑制機構を構成していると考えられる。