

審査の結果の要旨

氏名 小池 宣也

本研究では、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* 遺伝子の発現制御機構を明らかにするため、まず、この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 (*hTIM1* 及び *mTim1*) を単離決定した。さらに *Per1* 発現制御に関わるタンパク質複合体を two-hybrid 法及び免疫沈降法で解析した。これらの研究により、下記の結果を得ている。

1. ショウジョウバエ TIM のアミノ酸配列と類似した2つのヒト EST 及び1つのマウス EST 配列をもとに、RT-PCR、cDNA Library のスクリーニング、5'-RACE、3'-RACE を行い、約 4.3kb の *hTIM1* 及び、約 4.4kb の *mTim1* cDNA を単離しその一次配列を決定した。*hTIM1* 及び *mTIM1* とショウジョウバエの TIM とのアミノ酸配列は、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。また、*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。
2. *hTIM1* と *mTim1* の発現をノーザンブロットで解析したところ、ヒト及びマウスの調べた限りのすべての組織において発現が観察された。また、マウスの脳での *Tim1* の発現レベルを *in situ hybridization* 法で解析したところ、哺乳類の時計細胞である SCN を含む脳全体で強く発現していたが、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。
3. Two-hybrid 解析では 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、CKIe 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。

4. 哺乳類培養細胞を用いた two-hybrid 解析では、CLOCK と BMAL1 の相互作用が、CRY1 又は CRY2 によって、ほぼ完全に阻害されることを見出した。一方、CRY1 及び CRY2 を bait にした two-hybrid 解析では、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た。

5. CLOCK、BMAL1、CRY1 を過剰発現させた哺乳類培養細胞を用いた免疫沈降によって、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ところ、約 27kDa のタンパク質が、CLOCK-BMAL1-CRY 複合体に含まれており、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 複合体と結合し、CLOCK-BMAL1-CRY-27kDa タンパク質複合体が、*Per1* の転写抑制に機能していると考えられた。

以上、本論文では哺乳類 TIM1 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、哺乳類概日リズムへの関与は見出されなかった。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た。本研究は未だ明確にされていない哺乳類 *Per1* 発現制御分子機構の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値すると考えられる。