

論文審査の結果の要旨

氏名 原田 裕子

本論文では、概日時計発振系におけるマウス Cryptochrome のリン酸化とその機能制御機構について述べられている。

概日時計発振系は、転写・翻訳を介した負のフィードバックループによって構成される。具体的には、転写促進因子である CLOCK/BMAL1 ヘテロ二量体がマウス *Period* (*mPer1*, *mPer2*, *mPer3*) およびマウス *Cryptochrome* (*mCry1*, *mCry2*) の転写を促進し、産生された mPER 蛋白質および mCRY 蛋白質が自らの転写を抑制する。発振系が 24 時間という周期で安定に振動するためには、転写・翻訳レベルでの制御に加えて、時計蛋白質の活性・局在・安定性などが翻訳後修飾によって巧妙に調節される必要があるが、その詳細な機構については未知の部分が多い。本研究においては時計蛋白質の翻訳後修飾に着目し、蛋白質リン酸化を介した発振系の調節機構について解析している。

論文提出者は最初に、ウシガエル網膜 MAP キナーゼのリン酸化量が恒暗条件下において日周変動することを見出した。MAP キナーゼのリン酸化リズムは培養したウシガエル網膜においても継続し、免疫組織化学的解析の結果、MAP キナーゼは一日を通して常に網膜のほぼ全ての細胞層に存在するのに対し、リン酸化型 MAP キナーゼは一部のアマクリン細胞にのみ存在して日周変動をすることを明らかにした。さらに培養網膜に PD98059 (MAP キナーゼの上流因子である MAP キナーゼキナーゼに対する特異的阻害剤) を投与して MAP キナーゼの活性を一時的に阻害した結果、概日時計の位相が後退することを見出した。これらの結果は、MAP キナーゼのリン酸化リズムが網膜に内在する概日時計発振系によって制御されていると同時に、MAP キナーゼが概日リズムの形成において極めて重要な役割を果たしていることを示している。

以上の結果を踏まえて論文提出者は、次に発振系ループにおける MAP キナーゼの作用点を検討した。その結果、哺乳類培養細胞内において MAP キナーゼが mCRY1 および mCRY2 と結合することを見出した。さらに、*in vitro* において MAP キナーゼ

は mCRY1 の Ser247 および mCRY2 の Ser267・Ser557 をリン酸化することが示された。mCRY1 の Ser247 および mCRY2 の Ser265 近傍のアミノ酸配列は完全に一致しており、両者を認識するリン酸化特異的抗体を作製した。この抗体を用いてイムノブロットを行った結果、mCRY1 Ser247 および mCRY2 Ser265 は哺乳類培養細胞内においても MAP キナーゼによってリン酸化されることが示された。さらに、各リン酸化部位の Asp 置換体（リン酸化状態を模倣する変異体）を用いたルシフェラーゼアッセイの結果から、mCRY1 Ser247 および mCRY2 Ser265 のリン酸化に伴って mCRY1 および mCRY2 の転写抑制能が低下することが示唆された。

次に、mCRY2 の Ser557 に対するリン酸化特異的抗体を作製し、マウス肝臓における Ser557 のリン酸化の変動を調べた結果、mCRY2 Ser557 のリン酸化量は主観的夜の後半から主観的昼の前半にかけて上昇するという顕著な概日リズムを示した。一方、MAP キナーゼ活性は主観的昼の後半に高く、mCRY2 のリン酸化リズムとは位相が一致しなかった。また、COS7 細胞に mCRY2 を発現させた場合、MAP キナーゼの活性化または不活性化にかかわらず、mCRY2 Ser557 のリン酸化レベルが変化しないことから、生体内においては MAP キナーゼが mCRY2 Ser557 のリン酸化に関与しないことが示唆された。さらに、Ser557 近傍のアミノ酸配列は glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) のリン酸化コンセンサス配列と一致し、mCRY2 Ser557 のリン酸化依存的に *in vitro* において GSK-3 β が mCRY2 をリン酸化することを見出した。また、哺乳類培養細胞内においては GSK-3 β によってリン酸化された mCRY2 は、プロテアソーム系によって分解されることが示された。

以上のように論文提出者は、mCRY が MAP キナーゼ、GSK-3 β などの複数のキナーゼによってリン酸化されることによって、機能や安定性が精密に調節されていることを解明した。本研究によって得られた結果は新しい知見を多く含み、概日時計の研究に寄与するところが多いと考えられる。

本論文のうち、ウシガエル網膜を用いた MAP キナーゼの役割についての解析は、真田佳門氏、深田吉孝氏との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析及び検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

従って、博士（理学）の学位を授与できると認める。