

論文審査の結果の要旨

氏名 吉種 光

本論文では、哺乳類の概日時計において時計タンパク質 CLOCK のリン酸化が果たす役割について論じられている。

生物の重要な測時機構の一つである概日時計の振動には、時計遺伝子とその翻訳産物である時計タンパク質が中心的な役割を果たしている。bHLH-PAS 型の転写因子である CLOCK と BMAL1 は、互いに複合体を形成して E-box に結合することにより負の制御遺伝子の転写を促進する。翻訳された負の制御因子群は、CLOCK-BMAL と複合体を形成することにより E-box 依存的な転写促進活性を抑制する。この巨大な時計タンパク質複合体の形成が転写抑制を導く分子機構は、時計発振の骨格を担う重要な問題であるにもかかわらず、不明な点が多く残されている。論文提出者は、タンパク質レベルでこの時計タンパク質複合体を分子解剖することにより、概日時計の転写抑制メカニズムの一端を明らかにした。

論文提出者はまず、時計タンパク質複合体の解析を可能とする分子ツールとして、CLOCK および BMAL1 に対するモノクローナル抗体を作製した。この自作したモノクローナル抗体を用いて、マウス肝臓における CLOCK と BMAL1 の時刻依存的な量的・質的変動を解析した。その結果、CLOCK と BMAL1 が一日の中で互いに異なる時刻にリン酸化されることを見出した。すなわち、BMAL1 のリン酸化レベルが上昇するのは E-box 依存的な転写が活性化する時刻であるのに対し、CLOCK のリン酸化レベルが上昇するのは E-box 依存的な転写が抑制される時刻であることを明らかにした。この転写抑制の時刻にマウス肝臓から CLOCK-BMAL1 複合体を単離・精製して質量分析を行うことにより、CLOCK のリン酸化部位 Ser38、Ser42 および Ser427 を同定した。Ser38 と Ser42 の Asp 置換は相加的に CLOCK の核移行および DNA 結合能を減し、

その転写活性を抑制した。興味深いことに CLOCK のリン酸化は、負の制御因子である CIPC を NIH3T3 細胞に共発現することにより促進された。この結果は、負の制御因子が CLOCK のリン酸化レベルを制御することにより転写抑制を導く可能性を示唆している。この CIPC との結合ドメインを欠いた変異 CLOCK ($\Delta 19$) においては、リン酸化レベルが著しく減弱しており、細胞内蓄積量が野生型 CLOCK の 2 倍以上に増加していた。これに加え、NIH3T3 細胞を calyculin A で処理すると CLOCK のリン酸化レベルが上昇し、これに伴って過リン酸化された CLOCK はプロテアソームを介した分解へと導かれた。以上の結果から、CLOCK のリン酸化は、自身の DNA 結合活性と安定性を減弱することにより、転写抑制機構において重要なシグナルとして働くと考えられた。この CLOCK の時刻依存的なリン酸化は、負の制御因子により巧妙に制御され、分子時計の発振に重要な役割を果たす可能性が示唆されており、当該研究分野に新しい視点をもたらしたと言える。

なお、本論文は、高尾敏文氏、里見佳典氏、ズゴクヒエン氏、岡野俊行氏、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研究計画を考案し、分析および検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分と判断する。

審査時点での本論文は、実験条件や専門用語に関する説明が充分ではなかったため、審査委員会では論文の改変を要求した。これを受けて論文申請者は、イントロダクションおよび図のレジェンドに十分な説明を付け足した。さらに、細胞への過剰発現実験からの解釈について過度な言及が認められたため本文の改変を要求した。改変後の論文では正確な表現がなされており、審査委員は全員一致で合格と判断した。

したがって審査委員会は、論文提出者に博士（理学）の学位を授与できると認める。