

## 論文の内容の要旨

論文題目 概日時計発振系における哺乳類 BMAL2 による転写制御

(Mammalian BMAL2-mediated transcriptional regulation

in the circadian clock oscillation)

佐々木 桃子

バクテリアからヒトに至るまで、地球上の多くの生物は、およそ1日周期で自律的に発振する概日時計を持つ。哺乳類では間脳視床下部の視交叉上核 (suprachiasmatic nucleus, SCN) に概日時計の中枢が存在し、個体の生理リズムおよび行動リズムを司っている。近年ショウジョウバエやマウスを用いた遺伝学的解析より、哺乳類の時計発振を生み出す分子メカニズムとして、「時計遺伝子 *Per* の転写を自らの翻訳産物 PER が抑制する」という負のフィードバックループが同定されている。このループの中で bHLH-PAS (PER-ARNT-SIM) 型の転写因子である BMAL1 と CLOCK の複合体は、E-box 配列を介して *Per1* 遺伝子の転写を正に制御している。申請者が所属する研究室においてはニワトリ松果体に発現する新規時計遺伝子 *Bmal2* が単離され、ニワトリ BMAL2 は時計発振系において重要な機能を担っていることがわかった。

もし、BMAL2 が概日時計システムにおいて重要な機能を担うならば、他の動物種にも広く存在するはずであり、動物種間の BMAL2 の機能の比較は概日時計の自律発振ループを構成する分子メカニズムの理解に役立つに違いない。そこで、概日時計の解析が進んでいる哺乳類を実験材料に用い、BMAL2 の機能解析を中心として時計発振のメカニズム解明に迫ろうと考えた。

まず、ニワトリ BMAL2 の塩基配列情報をもとに、ヒト腎臓由来の 293EBNA 細胞 (HEK293 細胞) の全 RNA に対して RT-PCR および 5'-RACE を行い、ヒト *Bmal2* の全長 cDNA を単離した。その結果、ヒト *Bmal2* は、DNA 結合に関わる bHLH ドメインと二量体形成に関わる PAS ドメインを有する bHLH-PAS 型転写因子をコードすると推定された。ここで BMAL 分子間のアミノ酸配列を比較すると、既知の分子 BMAL1 は動物種間で高く保存されているのに対し、ヒト BMAL2 とニワトリ BMAL2 間の保存性は低い。したがって、これらの *Bmal2* 遺伝子は *Bmal1* とは異なる遺伝子サブフ

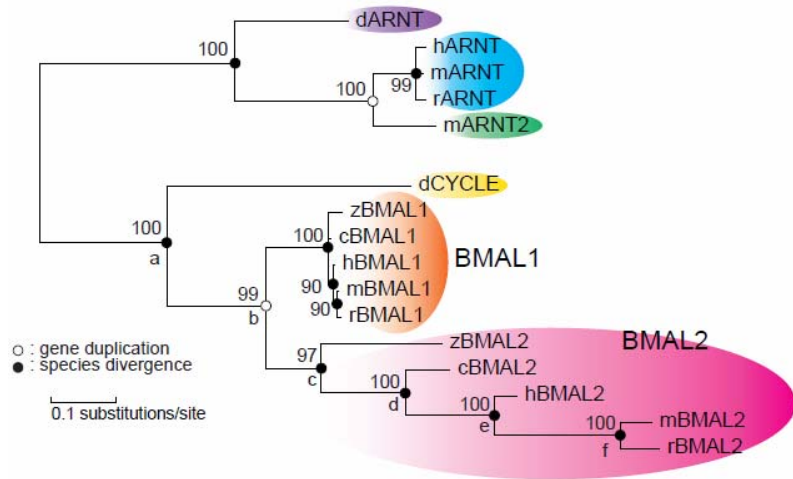
ファミリーに属する可能性が考えられた。そこで、BMAL2の進化的系統関係を明らかにすると共に、生体内での発現様式を調べるために、RT-PCR および RACE 法を用い、マウス間脳およびラット胎児繊維芽細胞 rat-1 より *Bmal2* の cDNA クローンを単離した。

これらの配列情報をもとに、最尤法を用いて BMAL ファミリーと、ARNT ファミリーの分子群の系統関係を解析した(図1)。その結果、*Bmal1* および *Bmal2* 遺伝子は、脊椎動物の *Bmal* 祖先遺伝子から重複して生じたと考えられ、*Bmal2* 遺伝子は脊椎動物に広く存在することが示唆された。また、BMAL1 の構造が動物間で高く保存されているのに対し、BMAL2 のアミノ酸配列は互いに大きく異なり、分子進化の過程でアミノ酸レベルでの進化速度には約 20 倍もの大きな違いが認められた。したがって、*Bmal1* と *Bmal2* が遺伝子重複によって生じた後、それぞれの遺伝子に異なる

自然選択圧が働き、BMAL1 および BMAL2 の間に機能の違いが生じたと推測できる。

概日時計の中核である SCN において時計遺伝子 *Per2* や *Bmal1* の mRNA 量は日周変動を示すことが知られている。そこで、*Bmal2* が SCN において機能しうるか否か、またその発現様式を調べた。まず、明暗周期下で飼育した BALB/c マウスから、SCN を含む小さな組織片 (φ 0.9 mm x 厚さ 0.7 mm) を一日のさまざまな時刻に摘出した。次に、これらの組織片から調製した全 RNA をテンプレートに、定量的 RT-PCR 法によって各時計遺伝子の mRNA 量を定量した。マウス *Bmal2* の 2 種類のスプライスバリエントの共通部位を検出したところ、*Bmal2* は時計遺伝子 *Clock* と同様、その mRNA 量はほとんど一定に保たれていた。2 つの *Bmal* 遺伝子は SCN において転写されているが、一方、*Bmal1* 欠損マウスにおける行動の概日リズムは完全に消失することが報告されている。これらの知見は、*Bmal2* 遺伝子が *Bmal1* 遺伝子の概日時計における機能を補完しないことを示している。しかしながら、概日時計における役割が詳しく解析されている BMAL1 に対して、BMAL2 については、概日時計のリズム生成にどのように寄与しているかほとんど評価されていない。

そこで、BMAL2 の時計発振系における生理的役割を調べるために、NIH3T3 細胞の概日リズムをリアルタイムで検出する生物発光モニター系を利用した。すなわち、mRNA の発現量が概日変動



【図1】 BMAL-ARNT ファミリータンパク質の系統樹。

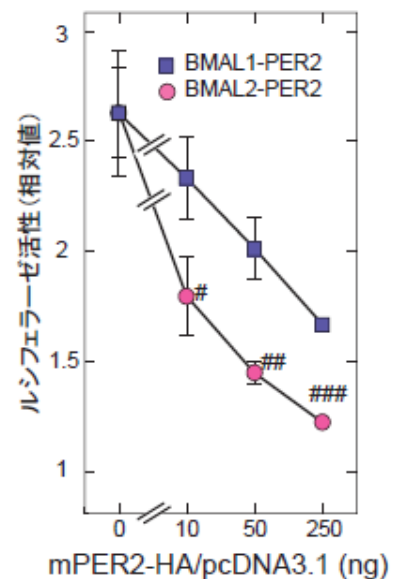
アミノ酸の N 末端および C 末端領域 (それぞれ mBMAL2a の 1-59 番目および 413-579 番目のアミノ酸に相当) は多様化しており適切にアラインできないため、配列の比較および系統樹の作成から省いた。ARNT ファミリーをアウトグループとしてこの系統樹を作成した。70%以上のブートストラップ確立を示す分岐点について、ブートストラップ確立を分岐点の近くに示した。黒丸 (●) で示した分岐点は種の分岐を示し、白丸 (○) は遺伝子重複を示す。また、横方向の枝の長さはアミノ酸の置換速度を示す。動物種の省略は以下の通りである:m、マウス;r、ラット;h、ヒト;c、ニワトリ;z、ゼブラフィッシュ;d、シロジョウバエ

を示す *Bmal1* 遺伝子のプロモーター領域をルシフェラーゼレポーター遺伝子につないだコンストラクトを NIH3T3 細胞に形質導入し、レポーター活性を指標として NIH3T3 細胞の時刻を可視化する系を用い、RNAi を介した BMAL2 の機能阻害が細胞の概日リズム与える影響を検討した。まず、*Bmal1* または *Bmal2* に対する siRNA を設計し、HEK293 細胞に強制発現させた BMAL1/2 タンパク質の発現レベルを指標として、これらの siRNA の特異性を確認した。また、NIH3T3 細胞には内在性の *Bmal1* および *Bmal2* mRNA が発現していることを確認した。NIH3T3 細胞の概日リズムモニター系において *Bmal1* または *Bmal2* 特異的な siRNA を導入したところ、BMAL1 の機能阻害によって *mBmal1* プロモーターを介した遺伝子発現の概日リズムが消失した。これは *Bmal1* 欠損マウスにおいて輪回し行動の概日リズムが完全に消失するという知見から予測される結果であった。同様に *Bmal2* に特異的な siRNA を導入した場合には、*mBmal1* プロモーターを介した遺伝子発現の概日リズムが、例外があるにせよ消失したことから、BMAL1 に加えて、BMAL2 が時計発振に重要な役割を担っていると考えられた。さらに、興味深いことに、BMAL1 機能阻害に比べ、BMAL2 機能阻害によって *Bmal1* の遺伝子発現が増強されることが分かった。したがって、概日時計制御において BMAL1 と BMAL2 とは互いに異なる役割を持つことが示唆された。

BMAL1 と BMAL2 の転写因子としての潜在的な機能の違いを比較するために、転写アッセイにおいて (i) BMAL1 および BMAL2 タンパク質の発現量を同程度に揃えた条件および (ii) BMAL1:CLOCK および BMAL2:CLOCK による転写活性化量を揃えた条件を選定した。これらの条件において概日時計の転写フィードバックループの負の制御因子である CRY1 および CRY2 の影響を調べたところ、CRY1 および CRY2 はそれぞれ用量依存的に BMAL2:CLOCK による転写活性化を抑制した。興味深いことに、CRY1 および CRY2 は、BMAL2:CLOCK による転写活性化よりも BMAL1:CLOCK による転写活性化に対し、より強い抑制効果を示し、その効果は特に CRY2 で顕著であった。負の制御因子 PER2 の転写抑制効果を調べたところ、CRY の作用とは対照的に、BMAL1:CLOCK による転写活性化よりも BMAL2:CLOCK による転写活性化に対してより強い抑制効果を示すことがわかった (図 2)。

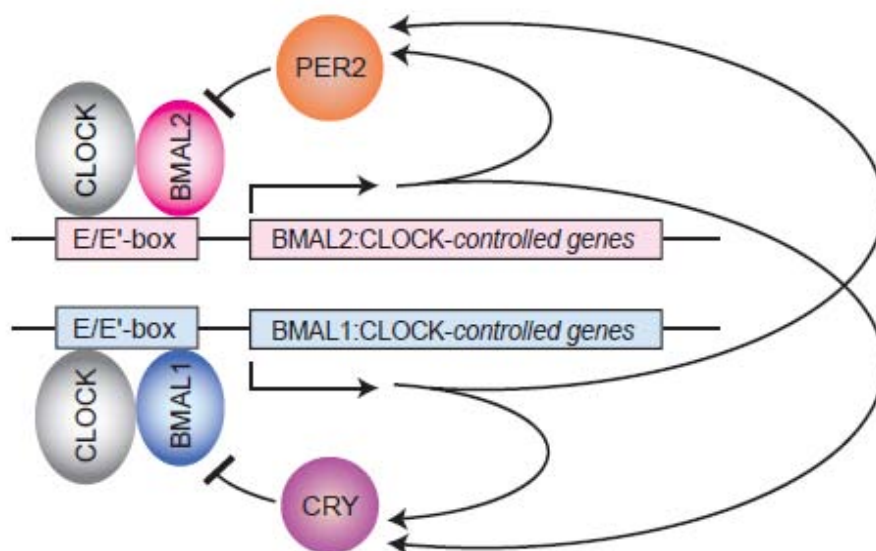
【図 2】 BMAL2:CLOCK および BMAL1:CLOCK による転写活性化に対する PER2 の効果。

一定量の BMAL1、BMAL2 および CLOCK 発現プラスミド (それぞれ 4 ng、25 ng および 250 ng) およびさまざまな量の PER2 発現プラスミド (0, 10, 50, 250 ng) の組み合わせを HEK293 細胞に同時に形質導入した。相対的なルシフェラーゼ活性値は、*mPer1:luc* レポータープラスミドと pcDNA3.1/V5-His コントロールベクターを導入したコントロールサンプルの値を基準として示し、PER2 発現プラスミド量に対してプロットした。3つの独立した実験よりそれぞれの平均値 ± 標準誤差を求めてグラフに表した。*p* 値は *t* 検定 (#, ## および ### は、それぞれ  $p < 0.01$ ,  $p < 0.01$  および  $p < 0.001$  を意味する) および二次元分散分析 ( $p < 0.05$ ) より算出した。



この PER2 による抑制効果の違いが分子間の相互作用に起因するか否かを調べるために、HEK293 細胞での強制発現系を用いて共免疫沈降実験を行った。BMAL1 および BMAL2 タンパク質の発現量を揃えた条件で PER2 との共免疫沈降効率を比較した結果、BMAL2 の共免疫沈降効率は BMAL1 の 3 倍以上であった。このことから、PER2 との親和性は BMAL1 よりも BMAL2 の方が強いと考えられた。

これらの結果より、BMAL1 および BMAL2 の分子機能は、部分的に重なっているが、BMAL1 および BMAL2 が共に概日時計発振系において非重複的な機能を有することが示唆された。また、負の制御因子 CRY および PER2 による転写抑制効果には、それぞれ BMAL1 および BMAL2 に対して優位性があり、PER2 が BMAL1 よりも BMAL2 に対して強い抑制因子として機能する一方、CRY2 が BMAL2 よりも BMAL1 に対して強い抑制因子として機能することが明らかとなった。これらの知見から、BMAL2:CLOCK および PER2 によって制御される遺伝子発現制御 (PER2-BMAL2 ループ) と、BMAL1:CLOCK および CRY によって制御される遺伝子発現制御 (CRY-BMAL1 ループ) とが存在し、E-box 依存的な時計発振系の転写を制御しているというモデルを提唱する。このモデルによれば、今回の研究で明らかとなった2つの BMAL の非重複的な機能について、合理的に説明できる。これまでの知見から、PER は CRY よりも E-box 依存的な転写活性化に対する抑制効果が弱いと考えられている。しかしながら今回の研究から、BMAL2:CLOCK を介した転写活性化に対しては、むしろ逆に PER が CRY よりも強い抑制効果を示すことが判明した。したがって、BMAL2 および PER2 は機能的に相互作用し、それぞれ正の制御因子および負の制御因子として概日時計発振系の転写を制御している可能性が強調された。



【図 3】 CRY-BMAL1 および PER2-BMAL2 のネガティブフィードバックループモデル。

*Per* 遺伝子および *Cry* 遺伝子を含む E/E'-box 配列を介した時計制御遺伝子の転写制御には BMAL1:CLOCK および BMAL2:CLOCK が関わっている。このモデルでは、CRY および PER2 は、主にそれぞれ BMAL1:CLOCK および BMAL2:CLOCK による転写活性化を抑制する。