

# 論文審査の結果の要旨

氏名 佐々木桃子

本論文では、概日時計発振系における哺乳類 BMAL2 による転写制御について述べられている。

概日時計のリズムを生み出す分子メカニズムとして現在、「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 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。

論文提出者は、マウス、ヒトおよびラットの *Bmal2* 遺伝子の cDNA クローンを新規に単離した。BMAL2 の分子系統学的解析の結果、BMAL1 のアミノ酸配列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、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あることを明らかにした。したがって、進化の過程で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された。2 つの *Bmal* 遺伝子は概日時計の中核である視交叉上核において発現しているが、一方、*Bmal1* 欠損マウスにおいて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。そこで論文提出者は、BMAL2 の機能解析に焦点を絞り、研究を行った。

BMAL2 の時計発振系への寄与を調べるために、培養細胞の概日リズムモニター系を利用して *Bmal2* 特異的な siRNA の導入効果を調べた。そのために、mRNA の発現量が概日変動を示す *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細胞に移入し、レポーター活性を指標として細胞の時刻を可視化する系を構築した。このような細胞時計の測定系において、*Bmal2* の発現阻害により細胞時計の概日リズムが消失または減弱したことから、BMAL1 に加えて BMAL2 が時計発振に重要な役割を担う可能性が示された。転写アッセイの結果、

BMAL2 は CLOCK と共に機能的な転写因子として *mPer1* および *mPer2* 遺伝子の転写活性化に関わっていることが示された。さらに、BMAL:CLOCK による転写活性化に対する負の制御因子 CRY および PER2 の効果を評価した結果、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。したがって、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ることが示された。また、PER2 が BMAL1 よりも BMAL2 に対してより強く結合することが免疫沈降実験によって示された。

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。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が提唱された。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。これらの結果から、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。なお、本論文は岡野俊行氏、山本和幸氏、岡野恵子氏、広田毅氏、笠原和起氏、高中陽子氏、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およ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した。

したがって、博士(理学)の学位を授与できると認める。