

論文審査の結果の要旨

氏名 倉林 伸博

本論文では、時計タンパク質 **CRY2** の段階的リン酸化とそれに依存した分解制御が、哺乳類の概日時計発振において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分子発振は、時計遺伝子の転写活性化が適切な時刻にオンとオフの制御を受けることによって24時間の周期を正確に維持している。この分子発振において、時計タンパク質 **CRY2** は時計遺伝子の転写活性化を強力に抑制する。そのため、**CRY2** が適切な時刻に発現して時計遺伝子の転写を抑制し、適切な時刻に分解して転写の抑制が解除されるプロセスは、概日時計の周期決定に極めて重要である。論文提出者は、**CRY2** の分解の時空間制御メカニズムを解析することにより、概日時計の周期決定機構の一端を明らかにした。

マウス **CRY2** の **Ser557** と **Ser553** が段階的にリン酸化されると、**CRY2** はプロテアソームにより分解される。そこで論文提出者はまず、この分解の引き金を引く **CRY2 Ser557** のリン酸化が、個体の行動リズムを支配する視交叉上核において認められるか否かを検証した。その結果、マウス視交叉上核において **CRY2 Ser557** リン酸化レベルが日内変動を示すことを見出した。そのため、**CRY2** の **Ser557** リン酸化に依存した分解は、行動リズム周期の制御に寄与する重要な機構であると考えられた。そこで次に、この分解制御機構を理解すべく、**CRY2 Ser557** をリン酸化するタンパク質キナーゼの同定に着手した。キナーゼの探索のため、マウス肝臓における **Ser557** リン酸化活性を定量的に解析できる *in vitro* キナーゼアッセイ系を構築した。次に、マウス肝臓の懸濁液を DEAE カラムによって分画し、各画分の **Ser557** リン酸化活性を測定した。こうして得られた一つの活性ピークに着目し、その画分に対する多くのキナーゼ阻害剤の効果を精査した。その結果、**DYRK1A** が **CRY2 Ser557** をリン酸化するキナーゼの候補として浮上した。NIH3T3 細胞に内在する *Dyrk1a* をノックダウンする

と、CRY2 の Ser557 リン酸化レベルが減弱すると共に CRY2 の安定性が上昇した。この結果は、DYRK1A が Ser557 をリン酸化し、CRY2 の分解を促進するキナーゼであることを強く示唆している。さらに DYRK1A の CRY2 Ser557 リン酸化活性が、マウス肝臓において日周変動を示すことを明らかにした。

DYRK1A 活性の変動プロファイルは CRY2 タンパク質量の日周変動の位相より約 4 時間先行していた。そのため DYRK1A は、CRY2 タンパク質量が増加する時間帯において CRY2 の Ser557 リン酸化に強く寄与すると考えられた。重要なことに、*Dyrk1a* を培養細胞においてノックダウンすると、約 0.5 時間の時計周期の短縮が認められた。*Dyrk1a* ノックダウン細胞における CRY2 タンパク質量の日周変動を核と細胞質にわけて調べたところ、細胞質においては CRY2 タンパク質量の増加が認められた。一方、核内の CRY2 レベルは殆ど変化しなかったが、CRY2 の早い蓄積が観察された。以上の結果から、DYRK1A は主に細胞質において CRY2 の分解を促進し、CRY2 の核移行タイミングを遅延させる重要な因子であると考えられた。つまり CRY2 の Ser557 リン酸化による分解制御は、時計遺伝子の転写抑制時刻の遅延メカニズムとして時計の周期を調節すると考えられた。本論文は、概日時計発振における中枢因子 CRY2 の分解機構を時空間的制御という観点から明らかにしており、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、広田毅氏、坂井美穂子氏、眞田（旧姓：原田）裕子氏、眞田佳門氏、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、論文の構成が部分的に不適切であったため、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、Discussion の一部の内容を Result で論じる構成に修正した。改変後の論文の構成は適切なものであり、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。