

氏名(本籍)	おののともや (千葉県)		
学位の種類	博士(農学)		
学位記番号	博甲第4339号		
学位授与年月日	平成19年3月23日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	Transcriptional Negative Regulation of Circadian Clock Gene mPeriod2 by E4BP4 (負の転写因子 E4BP4 による時計遺伝子 Period2 の転写調節)		
主査	筑波大学教授	医学博士	石田直理雄
副査	筑波大学教授	農学博士	深水昭吉
副査	筑波大学教授	農学博士	内山裕夫
副査	筑波大学教授	農学博士	宮崎均

論文の内容の要旨

哺乳類の体内時計は、時計遺伝子が約24時間周期で発現を繰り返すことによって時を刻んでおり、個体の行動リズムや生体内における代謝リズムなど様々な生体リズムが体内時計によって制御されている。これまでの研究から、この体内時計は時計遺伝子によって構成された転写・翻訳レベルでのネットワークによって構成されており、*Period2* (*Per2*) が重要な構成因子の1つであることが明らかとなっている。そして、*Per2* mRNA の約24時間の発現変動が体内時計機構の維持には必須であることが知られている。近年、E-box 配列 (5'-CACGTG-3') に類似した E2 enhancer (5'-CACGTT-3') と呼ばれるシスエレメントが *Per2* 遺伝子の転写調節領域に存在し、*Per2* mRNA の日周発現に重要な役割を担っていることが報告された。しかしながら、未だ *Per2* の日周発現機構の全貌は明らかにされていない。本研究では、bZIP domain をもつ転写因子 Adenovirus E4 promoter-binding protein (E4BP4) による *Per2* の転写および日周発現への関与について詳細に解析を行った。

E4BP4 は、ショウジョウバエの体内時計機構における負の調節因子として重要な役割を担っている VRILLE (VRI) と DNA 結合ドメインに高い類似性が見られる。しかし、哺乳類体内時計機構における E4BP4 の機能は明らかにされていない。そこで、時計遺伝子 *Per2* の転写に対する E4BP4 の関与について検討するため、マウス線維芽細胞株 NIH3T3 細胞へ E4BP4 特異的な siRNA を導入し、*Per2* mRNA の発現に対する内在性 E4BP4 のノックダウンによる影響を調べた。その結果、siRNA を用いた E4BP4 特異的ノックダウンは *Per2* 転写活性を増加させ、内在性 E4BP4 は *Per2* の転写活性を抑制的に調節していた。次に、E4BP4 による *Per2* 転写リズムへの関与を調べるため、NIH3T3 細胞を用いたリアルタイムレポーター遺伝子アッセイ系を確立した。E4BP4 特異的 siRNA (Loss of Function) および E4BP4 発現ベクター (Gain of Function) を細胞へ導入したところ、E4BP4 は *Per2* 転写リズムに対して負の調節因子として働いていることが確認された。次に、E4BP4 による *Per2* の転写抑制機構を調べるため、マウス *Per2* 遺伝子において E4BP4 結合配列を検索したところ、転写開始点付近の領域にヒト、ラット、ウシ、イヌなどの生物間で保存されている2つの配列 (A-site および B-site) を新たに発見した。この遺伝子領域を用いたレポーター

ジーンアッセイから、E4BP4による*Per2*の転写抑制にはB-siteが重要であることが示唆された。E4BP4のA-siteおよびB-siteに対する結合能をゲルシフトアッセイおよびクロマチン免疫沈降法により解析した結果、E4BP4はB-siteへ直接結合し、*Per2* mRNAの発現が低い時間帯でE4BP4の結合量は多く、*Per2*のリズム発現におけるB-siteを介したE4BP4による転写抑制の重要性が示唆された。さらに、リアルタイムレポータージーンアッセイ系による詳細な解析の結果、*Per2* mRNAの日周リズムには、E2 enhancerだけでなく、B-siteを介したE4BP4による転写抑制機構が必要であることが明らかとなった。以上の結果から、E4BP4は*Per2*の転写抑制を介して哺乳類における体内時計機構に大きく関与していることが示された。

審 査 の 結 果 の 要 旨

哺乳類体内時計分子機構を説明する為に時計遺伝子*Period2* mRNAの日周振動発現機構の解明は時宜を得た重要かつ困難な課題である。この難しい課題を大野朋哉君は3年という短期間で集中的にトライ・アンドエラーを繰り返し見事に克服した。すなわち、*Per2* 遺伝子の転写に負の転写因子 E4BP4 が転写抑制的に働く事を E4BP4 siRNA と過剰発現法を用いる事で示した。さらに、NIH3T3細胞を用いたリアルタイム日周変動測定系を用いて、*Per2* 遺伝子の転写に与える影響を評価し、既知の A-site でなく同君の見出した B-site の重要性を試験管内ばかりでなく、生体内でも示すことに成功した。(Nucleic Acids Res. 印刷中) さらに、E4BP4 が PERIOD2 蛋白と結合し、時計分子フィードバックループにおいて抑制的に働く事も示した (BBRC. 印刷中)

よって、著者は博士(農学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。