

氏 名	ひら やま じゅん 平 山 順
学位(専攻分野)	博士 (人間・環境学)
学位記番号	人 博 第 184 号
学位授与の日付	平成 15 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	人間・環境学研究科 人間・環境学専攻
学位論文題目	Functional and structural analysis of vertebrate cryptochromes (脊椎動物クリプトクロームの機能及び構造解析)
論文調査委員	(主 査) 教授 田口貞善 教授 津田謹輔 教授 三室 守 助教授 藤堂 剛

論 文 内 容 の 要 旨

脊椎動物において、cryptochrome (CRY) は概日リズムを制御する重要な蛋白である。概日リズムとは自由行動やホルモン分泌等の生物現象を約24時間周期に調節する生体内機構である。このリズムは転写／翻訳に依存したフィードバックループにより制御され、そのループは正の調節(転写活性化)と負の調節(転写抑制)を担う時計蛋白群により構成される。脊椎動物では前者はCLOCK及びBMALであり、これらは二量体を形成し核内で負の調節因子であるCryとPerの転写を活性化する。CRYとPERは二量体形成後、核に移行し、核内でCRYがCLOCK:BMAL二量体に直接結合し、その転写活性を抑制する。すなわちCRYは脊椎動物の概日リズムのフィードバックループにおいて転写抑制因子として機能している。本研究は、主にゼブラフィッシュのCRY(zCRY)を用いて、CRYの(1)機能及び(2)構造解析を行った。

(1)CLOCK及びBMAL蛋白の細胞内局在調節因子としてのzCRYの新機能

ゼブラフィッシュの概日リズムのフィードバックループに特徴的なのは、その構成因子、CLOCK、BMAL、及びCRYの遺伝子が他に比べて多いことであり、より複雑なループ制御機構の存在が示唆される。今回、培養細胞を用いた解析より、zCRYがzCLOCK、zBMAL、及びそれらの二量体の核内蓄積を促進し、一方でzPER2はzCLOCK:zBMAL二量体の細胞質分布を引き起こすことを示した。ここで明らかにしたCRY及びPER2のCLOCK及びBMAL蛋白の細胞内局在調節因子としての役割は、今まで知られていなかったのものであり、概日リズムの制御におけるこれらの2つの時計因子の機能分担を解析する上で興味深い発見である。

(2)転写抑制型CRYの機能領域の決定

CRYはその高次構造の維持に補酵素であるFADとの結合を必要とするフラボ蛋白質である。そのFAD結合領域はCRY蛋白の広範囲に存在するので、CRY蛋白のどの部位を欠失させてもその機能は失われる。このため、蛋白質の機能領域同定に一般的に用いられる「目的の蛋白質の一部を欠失させた変異蛋白質の機能解析」という方法を用いることができない。CRYの機能領域は全く決定されていない。今回この解析をzCRYを用いたキメラ蛋白の解析により試みた。転写抑制型CRYと非抑制型CRYの2種の存在が知られている。哺乳類は前者しか持たないが、ゼブラフィッシュは両方のタイプを持っている。zCRY1aは前者であり、zCRY3は後者に属する。zCRY3は転写抑制型CRYと高い相同性を示すにも関わらず、CRYの転写抑制に不可欠な核移行能及びCLOCK:BMAL二量体結合能を欠き、転写抑制活性を示さない。このzCRY3と転写抑制型CRYであるzCRY1aの2つのzCRYを用いて一連のキメラzCRYを作成する事により、CRYの核移行、核外移行、及びCLOCK:BMAL二量体結合能に必要な領域を各々同定した。また、核移行能とCLOCK:BMAL二量体結合能の両方をもつキメラCRYのみが転写抑制能をもつことを示し、この2つの課程の重要性を確認した。さらに、核移行領域に核移行シグナル(NLS)を同定した。このNLS配列は異種間の転写抑制型CRYでよく保存されており、このNLSに変異をいれた哺乳類のCRYは核移行が阻害されるために転写抑制活性が減少することを明らかにした。さらに興味深い事に、このNLSは他の時計蛋白であるPERとの結合にも重要な配列であることがわかった。以上の転写抑制型

CRY の機能領域の同定は本研究がはじめての報告であり、ゼブラフィッシュ CRY の特徴を活かしたユニークな解析であると考えている。

論文審査の結果の要旨

本論文は、クリプトクローム蛋白の機能を細胞生物学的・生化学的に解析しその転写抑制メカニズムを明らかにするとともに、この蛋白の高次構造と機能の関係をアミノ酸配列レベルで明らかにしたものである。

脊椎動物において、クリプトクローム蛋白 (CRY) は概日リズムを制御する重要な蛋白である。概日リズムとは約24時間を一周期とする生命活動の周期的な変動のことを指し、我々人間を含む地球上に生活する全ての真核生物とある種の原核生物に広く認められる現象である。生物が如何に地球環境に適応してきたのかを理解する上で興味深い研究対象である。様々な生物における研究から、概日リズムを作り出す生物時計の本体はリズムを持った遺伝子発現を作り出す自律的な転写制御機構であり、この遺伝子発現レベルの振動はネガティブフィードバックループといった共通の機構で作られており、このことが明らかになってきた。ネガティブフィードバックループは転写を活性化する正の因子と、逆に転写を抑制する負の因子から成っており、正の因子により発現が活性化された負の因子が自らの発現を抑えることによりリズムがつくりだされる。特に、魚類から哺乳類を含む脊椎動物においては、共通の因子によりこのループが構成されている事が分かってきた。正の因子としては CLOCK 及び BMAL と呼ばれる転写因子が、負の因子としては PER と呼ばれるタンパク及び CRY が働いている。本研究は、主にゼブラフィッシュの CRY (zCRY) を用い、CRY の機能及び構造解析を行っている。

第一部において、zCRY と他の時計蛋白である CLOCK, BMAL 及び PER との相互作用を、抗体を用いた免疫沈降法ならびにツーハイブリッド法で観察し、zCRY がいずれの時計蛋白とも相互作用することを見いだした。更に、これらの蛋白の細胞内局在を免疫染色により観察し、zCRY が zCLOCK, zBMAL, 及びそれらの二量体の核内蓄積を促進する事、一方で zPER2 は zCLOCK : zBMAL 二量体の細胞質分布を引き起こす事を示した。ここで明らかにした CRY 及び PER2 の CLOCK 及び BMAL 蛋白の細胞内局在調節因子としての役割は今まで知られていなかったのものであり、概日リズムの制御におけるこれらの2つの時計因子の機能分担を解析する上で興味深い発見である。

また第二部においては、ゼブラフィッシュの特長を活かし zCRY の高次構造と機能の関係を明らかにした。CRY はその高次構造の維持に補酵素である FAD との結合を必要とする。その FAD 結合領域は CRY 蛋白内の広い範囲に存在する為、CRY 蛋白のどの部位を欠失させてもその機能は失われる。このため、蛋白質の機能領域同定に一般的に用いられる「目的の蛋白質の一部を欠失させた変異蛋白質の機能解析」という方法を用いることができず、今まで CRY の機能領域は全く決定されていなかった。本論文においてこの解析を zCRY を用いたキメラ蛋白を作成しその機能解析を行うことにより試みている。ゼブラフィッシュには、ヒトやマウスでみられる転写抑制活性を示す CRY に加え、その機能を失っている非転写抑制型 CRY が存在している。これらの非転写抑制型 CRY は、一次構造は転写抑制活性を示す CRY と高い類似性を示すものの、他の時計遺伝子との相互作用、細胞内局在等全く異なる性質を持つ。これら二種類の CRY 間でキメラ蛋白を作成することにより、他の時計遺伝子との相互作用、細胞内局在並びに転写抑制に重要な機能ドメインを同定した。また、核移行能と CLOCK : BMAL 二量体結合能の両方をもつキメラ CRY のみが転写抑制能をもつことを示し、この2つの課程の重要性を確認した。さらに、核移行領域に核移行シグナル (NLS) を同定した。この NLS 配列は異種間の転写抑制型 CRY でよく保存されており、この NLS に変異をいれた哺乳類の CRY は核移行が阻害されるために転写抑制活性が減少することを明らかにした。さらに興味深い事に、この NLS は他の時計蛋白である PER との結合にも重要な配列であることを明らかにした。以上の転写抑制型 CRY の機能領域の同定は本研究がはじめての報告であり、ゼブラフィッシュ CRY の特徴を活かしたユニークな解析である。申請者は、本論文の内容に関して、既に第一部に関する論文が国際学術誌 (Nucleic Acids Research 誌) に受理されており、本論文の価値は当該分野の研究者にも高く評価されている。本論文は、人間と環境の問題を総合的に考察し、現在人類の直面している困難な諸問題の根本的解決に資する創造的研究を目指して創設された人間・環境学専攻、分子・生命環境論講座にふさわしい内容を備えたものと言える。

よって本論文は博士 (人間・環境学) の学位論文として価値あるものと認める。また、平成15年1月16日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。