



## Antagonistic role of E4BP4 and PAR proteins in the circadian oscillatory mechanism

三井, 茂

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2002-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2457

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002457>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

## 【93】

氏名・(本籍) 三井 茂 (山梨県)

博士の専攻分野の名称 博士 (医学)

学位記番号 博い第1415号

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

学位授与の日付 平成14年3月31日

### 【学位論文題目】

**Antagonistic role of E4BP4 and PAR proteins in the circadian oscillatory mechanism**

(概日振動体機構における E4BP4 と PAR タンパク質の拮抗性制御)

### 審査委員

主査 教授 岡村 均

教授 千原 和夫 教授 寺島 俊雄

## 背景

我々は、PAR (proline and acidic amino acid-rich)ロイシンジッパー蛋白に属する活性型の転写因子である DBP が、時計遺伝子 *mPer1* の発現機構に密接に関与していることを報告した。*mPer1* 遺伝子のプロモーター領域には DBP 結合配列が存在しており、DBP は *mPer1* の転写を促進することができる。その一方で、*dbp* 遺伝子はイントロン領域に時計遺伝子の結合配列 E-box を持つことで、概日リズムを呈した発現パターンを示す。したがって、時計遺伝子によって作り出された *dbp* 遺伝子の周期的な発現が、時計遺伝子の発振機構にフィードバックする形で影響を与えていたものと考えられる。

興味深いことに、ショウジョウバエにおいては、哺乳類の DBP やそのファミリーである HLF や TEF と非常に似通った構造を持ちながら、抑制性に働く転写因子 VRI が存在している。VRI はショウジョウバエの体内時計に深く関わっていることが示されており、このような構造を有する転写因子が、哺乳類の概日時計の発振機構に重要な役割を有している可能性が考えられた。

遺伝子のホモロジー検索の結果、我々は哺乳類の E4BP4 が、ショウジョウバエの VRI と最も相同性の高いことを見い出した。今回、我々は、E4BP4 と PAR タンパク質(DBP, HLF 及び TEF)の発現の経時的な変化と、*mPer1* 遺伝子に対する転写作用を調べることから、E4BP4 と PAR タンパク質が、哺乳類の概日振動機構に対して、互いに相補的に作用することを明らかにした。

## 結果

*in situ* ハイブリダイゼーションの結果、*e4bp4* mRNA は、哺乳類の概日リズムの中核である視交叉上核(SCN)において強い発現が認められた。恒暗(DD)条件下で飼育されたマウスの SCN では、CT12 (概日時間 circadian time (CT): 主観的中期の始まりを CT0、主観的暗期の始まりを CT12 という) で最大、CT4 で最小の明瞭な 1 日周期のリズムを呈した。それに対し *hlf*, *tef* 及び *dbp* mRNA の視交叉上核 (suprachiasmatic nucleus: SCN) における発現は、いずれも CT4 にて最大、CT16 から CT20 にかけて最小の明瞭なリズムを示した。したがって、*e4bp4* 及び PAR ファミリーの mRNA の発現は、いずれも SCN において、明瞭な 1 日周期のリズムを呈しているが、*e4bp4* と PAR ファミリーの mRNA の発現パターンは、ほぼ逆位相であった。抗 E4BP4 血清を用いた免疫組織染色によると、SCN における E4BP4 タンパク質の発現は、主観的暗期 (CT12, CT16 及び CT20) において大きく、主観的中期 (CT4) において小さかった。以前我々が報告したように、SCN における

DBP タンパク質の発現は、主観的中期に最大値を、主観的暗期に最小値を示すことから、mRNA の発現と同様に、タンパク質レベルでも、E4BP4 と DBP は、互いに反対の位相で振動していると結論される。

ノザンプロットティング及びウエスタンプロットティングの結果、SCN において認められた *e4bp4* と PAR ファミリーの発現の関係は肝臓においても成立している。概日リズムの消失した *mCry1/mCry2* 両遺伝子欠損マウスで検索すると、SCN 及び肝臓のいずれにおいても、*e4bp4*, *dbp* mRNA の発現は、それぞれ持続的低値、持続的高値を示し、野生型のマウスで認められる発現の振動は消失していた。このことから *e4bp4* 及び *dbp* 遺伝子の発現は、時計遺伝子群により、直接的ないしは間接的に制御されており、しかも逆位相を維持する巧妙なメカニズムが存在するものと考えられる。

我々は、すでに *mPer1* 遺伝子のプロモーター領域に DBP 結合配列が存在し、その配列を介して DBP が、*mPer1* 遺伝子の転写を促進することができることを証明している。E4BP4 の DNA 至適結合配列は PAR タンパク質の DNA 至適結合配列とほぼ同一であることが知られているので、今回、E4BP4, HLF 及び TEF の *mPer1* 遺伝子の転写に対する効果を、レポーター・アッセイ法を用いて調べた。DBP 結合配列を含んだ 1.3kbp 長の *mPer1* プロモーターにレポーター遺伝子をつないだコンストラクトを用いると、DBP, HLF 及び TEF は、用量依存的にレポーター遺伝子の転写を促進したのに対し、E4BP4 は、用量依存的に転写を抑制した。また、E4BP4 と個々の PAR タンパク質を同時に発現させた場合、E4BP4 は、PAR タンパク質により促進されたレポーター遺伝子の転写活性も有意に抑制した。これらの転写制御に、*mPer1* プロモーター領域の DBP 結合配列が、実際に関与していることを証明するために、レポーター遺伝子のプロモーターを、DBP 結合配列を 3 コピー導入した HSV-TK のプロモーターに変えて検索しても、同様の結果が得られた。一方、DBP 結合配列に変異を導入した場合には、PAR タンパク質 及び E4BP4 は、レポーター遺伝子の転写活性に影響を与えたなかった。以上より、E4BP4 と PAR タンパク質は、共通の結合配列を介して、転写活性を、それぞれ抑制及び促進することができ、さらに E4BP4 は、PAR タンパク質によって促進させられた転写活性も抑制することができると結論される。

EMSA (electrophoretic mobility shift assay ゲルシフトアッセイ)の結果、E4BP4, DBP, HLF および TEF タンパク質は、レポーター・アッセイで用いられた共通の結合配列に対してほぼ同一のアフィニティーを持つことが確認された。E4BP4 と PAR タンパク質は、共通の至適結合配列を互いに競合しあうが、PAR タンパク質と E4BP4 とのヘテロ二量体の形成は認められなかった。このことから E4BP4 は、PAR タンパク質による転写促進を競合阻害の形式で抑制し得るものと考えられる。

我々は、E4BP4 が PAR タンパク質による転写促進を、競合阻害の形式で抑制し得ることを示した。E4BP4 が抑制性ドメインを有した転写抑制因子(active repressor)であることは、既に示されている。転写促進因子と active repressor が互いに競合しあうことが、標的遺伝子の発現を on/off に切り替えるための必要十分条件であるとされていることから、E4BP4 と PAR ファミリー転写因子は、標的遺伝子の発現を巧妙に切り替えるシステムを形成しているものと考えられる。

*e4bp4* と PAR ファミリーは、mRNA のレベル及びタンパク質のレベルにおいて、互いに逆位相の概日リズムで発現している。概日リズムの消失した *mCrys* 遺伝子欠損マウスでは *e4bp4*, *dbp* mRNA の周期的発現は消失し、それぞれ持続的低値、持続的高値を示す。このことから *e4bp4* 及び *dbp* 遺伝子の発現は、時計遺伝子群により、直接ないしは間接的に制御されており、しかも逆位相を維持する巧妙なメカニズムが存在するものと考えられる。時計遺伝子が形成するネガティブフィードバック機構に関しても、この *e4bp4* 及び *dbp* 遺伝子が形成するシステムが、このコア・ループの振動を補助していることは間違いないと思われる。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲第 1429 号	氏名	三井 茂
論文題目	Antagonistic role of E4BP4 and PAR proteins in the circadian oscillatory mechanism 概日振動体機構における E4BP4 と PAR タンパク質の拮抗性制御		
審査委員	主査 <u>同上</u> 副査 <u>千原和夫</u> 副査 <u>三島俊雄</u>		
審査終了日	平成 14 年 2 月 22 日		

(要旨は 1,000 字～2,000 字程度)

我々は、PAR (proline and acidic amino acid-rich)ロイシンジッパー蛋白に属する活性型の転写因子である DBP が、時計遺伝子 mPer1 の発現機構に密接に関与していることを報告した。mPer1 遺伝子のプロモーター領域には DBP 結合配列が存在しており、DBP は mPer1 の転写を促進することができる。その一方で、dbp 遺伝子はイントロン領域に時計遺伝子の結合配列 E-box を持つことで、概日リズムを呈した発現パターンを示す。したがって、時計遺伝子によって作り出された dbp 遺伝子の周期的な発現が、時計遺伝子の発振機構にフィードバックする形で影響を与えていたものと考えられる。興味深いことに、ショウジョウバエにおいては、哺乳類の DBP やそのファミリーである HLF や TEF と非常に似通った構造を持ちながら、抑制性に働く転写因子 VRI が存在している。VRI はショウジョウバエの体内時計に深く関わっていることが示されており、このような構造を有する転写因子が、哺乳類の概日時計の発振機構に重要な役割を有している可能性が考えられた。遺伝子のホモロジー検索の結果、我々は哺乳類の E4BP4 が、ショウジョウバエの VRI と最も相同性の高いことを見い出した。今回、我々は、E4BP4 と PAR タンパク質(DBP, HLF 及び TEF)の発現の経時的变化と、mPer1 遺伝子に対する転写作用を調べることから、E4BP4 と PAR タンパク質が、哺乳類の概日振動機構に対して、互いに相補的に作用することを明らかにした。

in situ ハイブリダイゼーションの結果、e4bp4 mRNA は、哺乳類の概日リズムの中核である視交叉上核(SCN)において強い発現が認められた。恒暗(DD)条件下で飼育されたマウスの SCN では、CT12 (概日時間 circadian time (CT) : 主観的明期の始まりを CT0、主観的暗期の始まりを CT12 という) で最大、CT4 で最小の明瞭な 1 日周期のリズムを呈した。それに対し hlf, tef 及び dbp mRNA の視交叉上核 (suprachiasmatic nucleus: SCN) における発現は、いずれも CT4 にて最大、CT16 から CT20 にかけて最小の明瞭なリズムを示した。したがって、e4bp4 及び PAR ファミリーの mRNA の発現は、いずれも SCN において、明瞭な 1 日周期のリズムを呈しているが、e4bp4 と PAR ファミリーの mRNA の発現パターンは、ほぼ逆位相であった。抗 E4BP4 血清を用いた免疫組織染色によると、SCN における E4BP4 タンパク質の発現は、主観的暗期 (CT12, CT16 及び CT20) において大きく、主観的明期 (CT4) において小さかった。これは、タンパク質レベルでも、E4BP4 と DBP は、互いに反対の位相で振動すると言える。

ノザンプロッティング及びウエスタンプロッティングの結果、SCN において認められた e4bp4 と PAR ファミリーの発現の関係は肝臓においても成立している。概日リズムの消失した mCry1/mCry2 両遺伝子欠損マウスで検索すると、SCN 及び肝臓のいずれにおいても、e4bp4, dbp mRNA の発現は、それぞれ持続的低値、持続的高値を示し、野生型のマウスで認められる発現の振動は消失していた。

E4BP4 の DNA 至適結合配列は PAR タンパク質の DNA 至適結合配列とほぼ同一であることが知られているので、今回、E4BP4、HLF 及び TEF の mPer1 遺伝子の転写に対する効果を、レポーター・アッセイ法を用いて調べた。DBP 結合配列を含んだ 1.3kbp 長の mPer1 プロモーターにレポーター遺伝子をつないだコンストラクトを用いると、DBP, HLF 及び TEF は、用量依存的にレポーター遺伝子の転写を促進したのに対し、E4BP4 は、用量依存的に転写を抑制した。また、E4BP4 と個々の PAR タンパク質を同時に発現させた場合、E4BP4 は、PAR タンパク質により促進されたレポーター遺伝子の転写活性も有意に抑制した。これらの転写制御に、mPer1 プロモーター領域の DBP 結合配列が、実際に関与していることを証明するために、レポーター遺伝子のプロモーターを、DBP 結合配列を 3 コピー導入した HSV-TK のプロモーターに変えて検索しても、同様の結果が得られた。一方、DBP 結合配列に変異を導入した場合には、PAR タンパク質 及び E4BP4 は、レポーター遺伝子の転写活性に影響を与えるなかった。

EMSA (electrophoretic mobility shift assay ゲルシフトアッセイ)の結果、E4BP4, DBP, HLF および TEF タンパク質は、レポーター・アッセイで用いられた共通の結合配列に対してほぼ同一のアフィニティーを持つことが確認された。

以上我々は、E4BP4 が PAR タンパク質による転写促進を、競合阻害の形式で抑制し得ることを示した。E4BP4 が抑制性ドメインを有した転写抑制因子 (active repressor)であることは、既に示されている。転写促進因子と active repressor が互いに競合しあうことが、標的遺伝子の発現を on/off に切り替えるための必要十分条件であるとされていることから、E4BP4 と PAR ファミリー転写因子は、標的遺伝子の発現を巧妙に切り替えるシステムを形成しているものと考えられる。

本研究は、PAR タンパク質と E4BP4 の転写制御を詳細に検討したものであるが、従来ほとんど行われなかつた時計遺伝子が形成するコア・フィードバックループの出力機構を明らかにした、重要な価値ある業績であると認められる。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。