



Title	Identification and functional analysis of the novel protein, B10, associated with rat Per 1, which was related with the mammalian circadian rhythms
Author(s)	松木, 亨
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41936
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について ご参照ください 。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	まつ 木 とおる 亨
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	第 1 5 1 8 5 号
学 位 授 与 年 月 日	平成12年 3 月 24 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 理学研究科生物科学専攻
学 位 論 文 名	Identification and functional analysis of the novel protein, B10, associated with rat Per 1, which was related with the mammalian circadian rhythms (哺乳類 circadian rhythm 関連蛋白質、Per 1 に結合する新規蛋白質、B10、の同定と機能解析)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 永井 克也 (副査) 教 授 吉川 和明 教 授 畠中 寛 助教授 岡田 雅人

論 文 内 容 の 要 旨

はじめに

地球上に生息するほとんどすべての生物は、その生命現象に約24時間周期の自己発信性のリズム（概日リズム：circadian rhythm）を示し、このリズムは、明暗などの外界の環境周期に同調されて24時間周期のリズムを示す。このような概日リズムの時刻発信中枢は、哺乳動物では視床下部視交叉上核（suprachiasmatic nucleus：SCN）に存在する。現在、哺乳類における概日リズムの発信機構は、Per、Tim、Clock、BMAL、CRY が関与する feed back 機構が想定されているが、その機構の詳細は明らかではない。本研究は、SCN による時刻発信の分子機構を解明するために、概日時計関連分子の一つである rat Per 1 に注目して、Yeast Two-Hybrid System を用いて Per 1 と相互作用する新規蛋白質の検索を行った。

方法及び結果

まずはじめに、Per 1 の蛋白質間相互作用に関係する PAS ドメインを含む420アミノ酸残基を bait として結合蛋白質の検索を行った結果、3種類の結合蛋白質を得た。それぞれの部分塩基配列を解析したところ、その内の一つは当研究室において既にクローニングされている分子であった。また、残りの二つの分子はそれぞれ、WFWA LFED の繰返し配列を持つ蛋白質であった。これらの遺伝子のクローニングを試み、WFWA 配列をもつ分子のクローニングに成功した。この遺伝子は、全長が4040bp であり、この分子の cDNA 配列より推定されるアミノ酸配列から、この分子が分子量151kD の新規蛋白質であることが明らかとなった。さらに Northern blot による解析から、ラットでは主に脳と心臓に特異的に発現することが認められた。抗B10抗体を用いた Western blot 及び免疫組織化学的染色の結果から、B10は脳内の他の部位に比べて SCN における発現が著明であった。また、ニューロン内では細胞質にその多くが存在していることが明らかになった。

次に、B10及び Per 1 の一次構造上における結合領域を GST-fusion protein を用いた pull-down assay を行って検討した結果、B10の結合領域は二カ所に分かれて存在しており、Per 1 との結合はどちらか一方だけでも起こることが明らかとなった。一方、Per 1 の結合領域については、bait に用いた領域より小さな部分では結合能力が低下していた。さらに免疫沈降実験の結果からも、細胞内において両者が結合することが確認できた。

以上の結果は、このB10が概日リズム発信機構に関与することを示唆する。そこで、SCN 内での発現リズム及び光

による同調機構への関与の有無を Western blot 及び免疫組織化学染色法を用いて検討した。その結果、B10の発現には24時間周期のリズムが認められず、リズム同調機構には関与する可能性が低いことを示す結果が得られた。

さらに、B10と Per 1 の相互作用による細胞内における局在の変化を調べるために、COS-7 細胞をもちいた一過性発現実験を行った。COS-7 細胞においてそれぞれ単独で発現させた場合、両者は共に細胞質に局在しているが、共発現させた場合、一部の細胞において両者が共に核に凝集して局在していることが認められた。

最後に、Per 1 の核移行にそのリン酸化が関係する可能性を検討するため、当研究室において同定された Per 1 をリン酸化する蛋白質、Casein kinase 1 epsilon (CK 1 ϵ) を用いて in vitro における kinase assay を行った。その結果、CK 1 ϵ による Per 1 のリン酸化には B10は影響しないことが明らかとなった。

考察

以上、本研究によって得られた結果は、ラット Per 1 に結合する蛋白質、B10、が SCN neuron において Per 1 と結合する事により概日リズム発信に関与することを示唆する。また、これまでに、1) Per 1 は Per 3 や Tim と相互作用する、2) Per 1 と同様、PAS ドメインを持つ Ahr (Arylhydrocarbon receptor) は Arnt (Ahr nuclear translocator) と結合することによりリガンドへの特異性が増加する、などが報告されている。これらの知見と、本研究の知見を総合すると、Per 1 の核移行が行われる際に、B10が Per 1 と結合することによって CK 1 ϵ 、あるいは Per 3 の様な Per 1 との結合が示唆されている他の時計関連蛋白質への親和性を高める機能を持つ可能性が考えられる。

以上、本研究で私は哺乳類の概日リズムの体内時計関連蛋白質である Per 1 と結合する新規の蛋白質、B10を発見、同定した。また、B10は Per 1 と結合して、時刻発信に関与すると想定されている Per 1 の核への移行を引き起こす因子である可能性も示した。

論文審査の結果の要旨

松木君は酵母の two-hybrid 法を用いて、Drosophila の時計関連蛋白質 Per の哺乳類ホモログである Per 1 と結合する新規蛋白質をラット脳にて発見、同定し、そのアミノ酸配列を決定し、この蛋白質は SCN にて発現していて、細胞内で Per 1 と結合して後者を核へ輸送する機能を持つことを明らかにした。この研究成果は哺乳類の体内時計機構を明らかにする上で価値のあるものであり、博士(理学)の学位論文として十分価値があるものと認める。