

Thesis

# *mRev-Erb* $\beta$ プロモーター / エンハンサー領域の同定と その概日リズム性発現機構の解析

埼玉医科大学 生理学

徐 海源

---

## Transcription and regulation of the mouse *Rev-Erb* $\beta$ gene

Haiyuan Xu (Department of Physiology, Saitama Medical University, Moroyama, Iruma-gun, Saitama 350-0495, Japan)

略語：BMAL1 (Brain and Muscle Arnt-like 1)  
BMAL2 (Brain and Muscle Arnt-like 2)  
CLOCK (Circadian Locomotor Output Cycles Kaput)  
NPAS2 (Neuronal PAS Domain Protein 2)  
PER (Period)  
CRY (Cryptochrome)  
ROR (Retinoic acid receptor-related Orphan Receptor)  
E4BP4 (Adenovirus E4 promoter binding protein 4)  
DBP (D-site of Albumin Promoter Binding Protein)  
RORE (ROR/*Rev-Erb* Response Element)

**要旨：**時計遺伝子 *Bmal1* は暗期にピークのある概日リズム性の発現がある。このリズム性発現は *Bmal1* 遺伝子のプロモーター / エンハンサー領域にある2箇所のROREにROR/REV-ERBファミリー (ROR $\alpha$ , ROR $\beta$ , ROR $\gamma$ , REV-ERB $\alpha$ , REV-ERB $\beta$ ) に属する転写因子が作用し形成されていると考えられている。この中でREV-ERB $\beta$  は恒常的抑制作用を有するオーファン核内受容体として知られているが、その機能や発現制御機構に関する報告は少なく、特にプロモーター / エンハンサーに関する詳細な研究はなされていないことから、マウス *Rev-Erb*  $\beta$  プロモーター / エンハンサーをクローニングしその解析を試みた。

マウスゲノムデータベースでは *Rev-Erb*  $\beta$  転写開始点の下流にギャップが存在することから、このギャップを挟むようにPCRプライマーを設計し、プロモーター領域から第1エクソンおよびイントロン含む約2.1 kbの領域 (*mRev-Erb*  $\beta$ -F-L) をクローニングした。さらにNIH3T3の培養細胞系でルシフェラーゼアッセイとリアルタイムモニタリングを用いて、時計遺伝子による転写制御機構とリズム性発現に関する解析を行った。

*mRev-Erb*  $\beta$  遺伝子の第1エクソンを含む上流約1.3 kbの領域 (*mRev-Erb*  $\beta$ -promoter/enhancer (1.3 K)) には典型的な時計遺伝子結合配列はなかったが、第1イントロン領域 (*mRev-Erb*  $\beta$ -promoter/enhancer (del-673)) には3箇所のE-boxとD-boxが存在した。*mRev-Erb*  $\beta$ -F-Lは、*Bmal1*/CLOCK, BMAL2/NPAS2およびDBPによって転写が促進された。リアルタイムモニタリング法では *mRev-Erb*  $\beta$ -promoter/enhancer(1.3 K) にはリズム性の発現がなく、*mRev-Erb*  $\beta$ -F-Lおよび *mRev-Erb*  $\beta$ -promoter/enhancer(del-673) にはリズム性発現が見られ、しかも *mRev-Erb*  $\beta$ -F-Lの振幅が大きかったことから、第1エクソンを含む上流域はプロモーターとして、第1イントロンはリズム性発現を制御するエンハンサーとして働いていることが明らかとなった。

**Keywords:** Circadian rhythm, REV-ERB  $\beta$ , BMAL1/CLOCK, clock genes, transcriptional regulation

---

## 緒言

地球上の生物は、地球の自転によって生じる24時  
医学博士 甲第1051号 平成19年3月23日 (埼玉医科大学)

間のリズムを体内に概日リズムとして取り込むこと  
によって、外界への適応や、恒常性の維持を行っ  
ている。概日リズムは、時計遺伝子と呼ばれる遺伝子  
群によって発現しており、藍色細菌、アカパンカビ、

ショウジョウバエから哺乳類に至る幅広い生物種で保存されている。哺乳類では時計遺伝子として *Bmal1*<sup>1)</sup>, CLOCK<sup>2)</sup>, PER1-3, CRY1-2<sup>3)</sup>などが同定されており、何れも転写(調節)因子として機能している。BMAL1/CLOCKヘテロ二量体が *Per1* 遺伝子のプロモーター/エンハンサー領域にある E-box(CACGTG) に結合し、*Per1* 遺伝子の転写を活性化させ、産生された PER1 が BMAL1/CLOCK による転写に対して抑制的に働く<sup>4)</sup>。このような負のフィードバック機構が概日リズム発振の本体であると想定されている。最近、藍色細菌の細胞における概日リズムの発振機構の研究から、必ずしも転写、翻訳そして転写の抑制といった一連のフィードバックシステムがなくても、概日リズムが時計遺伝子の周期的なリン酸化変動として発現していることが報告されており<sup>5)</sup>、哺乳類においても同様の機構があるのか注目されているが、哺乳類においては、転写・翻訳・翻訳後修飾といった生体機構のダイナミックな組み合わせによって、概日リズムが機能していることは間違いないものと考えられる。

視床下部にある視交叉上核 (SCN; suprachiasmatic nuclei) には概日リズムの中核があることが知られており、Clockを除く時計遺伝子の発現には概日リズムのあることが報告されている。抑制性の因子である *Per1*, *Per2*, *Cry1* および *Cry2* は明期に発現のピークがあり<sup>6)</sup>、促進系の因子である *Bmal1* は暗期にピークがあることが明らかになっている<sup>7,8)</sup>。Honma らは *Bmal1* の解析の過程で、*Bmal1* の mRNA が視交叉上核で強く発現し、しかもその発現は視交叉上核で暗期にピークのある概日リズム性を示すこと、これは *Per1* などの抑制系時計遺伝子の発現と逆位相であることを見いだしている<sup>7)</sup>。この発現機構を解明するため、Yu らは *Bmal1* プロモーター/エンハンサー領域を含む BAC クローンをクローニングし、5'RACE 法によって転写開始点からプロモーター/エンハンサー領域を同定した<sup>9)</sup>。この *Bmal1* プロモーター/エンハンサー領域には少なくとも2箇所の ROR 結合配列 (RORE; ROR response element) があり<sup>10)</sup>、この配列を介してオフファン核内受容体の REV-ERB  $\alpha$  によって負に転写が制御されていること<sup>11)</sup>、また同じくオフファン核内受容体である ROR  $\alpha$  によって転写が促進されていることが明らかにされ<sup>12-14)</sup>、RORE が *Bmal1* のリズム発現制御に必須の配列であることが示された。*Rev-Erb  $\alpha$*  遺伝子の発現には明期にピークのある概日リズムがあり<sup>10,11,15)</sup>、プロモーター/エンハンサー領域には複数の E-box が存在し<sup>11,16)</sup>、リズム発現に関与していることが報告されている。

REV-ERB  $\beta$  は REV-ERB  $\alpha$  と同様にオフファン核内受容体ファミリーに属する転写因子で、RORE に結合し持続性の転写抑制を示すことが知られている<sup>17)</sup>。REV-ERB  $\alpha$  とは相同性が高く、*Rev-Erb  $\beta$*  遺伝子は視

交叉上核で *Rev-Erb  $\alpha$*  と同様に明期にピークのあるリズム発現を示すことが報告され<sup>10)</sup>、*Rev-Erb  $\alpha$*  と同様に *Bmal1* のリズム発現に転写のレベルで関与している可能性が高い。しかもそのピーク位相は *Rev-Erb  $\alpha$*  より2時間遅く、*Per2* より6時間早いことが肝臓などの末梢臓器で報告されており、ピーク位相の発現機構を解明するためにも興味深い<sup>18)</sup>。しかし、*Rev-Erb  $\beta$*  の発現を制御するプロモーター/エンハンサー領域の全長を解析した報告はないことから、本研究ではマウスゲノムから *Rev-Erb  $\beta$*  のプロモーター/エンハンサー領域を同定し、その発現制御機構を概日リズム性の発現機構を中心に解析した。

## 材料と方法

### マウス *Rev-Erb $\beta$* プロモーター/エンハンサー領域のクローニング

ゲノム *Rev-Erb  $\beta$*  プロモーター/エンハンサー領域は、鋳型にマウスゲノミック DNA (Novagen) を用いて PCR 法による増幅の後、pCR2.1 (Invitrogen) に TA クローニング法で導入、自動塩基配列解析装置 (ABI) によって塩基配列を解析した。pGL3-basic (Promega) にはプライマー配列に導入した制限酵素切断部位を用いて制限酵素消化によってサブクローニングした (pGL3-basic/m*Rev-Erb  $\beta$* -F-L)。欠失変異体は pGL3-basic/m*Rev-Erb  $\beta$* -F-L を鋳型にして欠失変異体用 PCR プライマーで PCR による増幅後、pTGRm (TOYOBO) に TA クローニング法で直接導入した。

### 時計遺伝子細胞発現用プラスミドの構築

時計遺伝子の発現コンストラクトは PCR 法による翻訳領域の増幅後、pcDNA3 (Invitrogen) には pCR2.1 に TA クローニング法で導入し、制限酵素消化によるサブクローニングで導入した。また pCR3.1 には TA クローニング法で導入した。

### ゲルシフトアッセイ

*Rev-Erb  $\beta$*  タンパクは TNT T7 coupled Reticulocyte Lysate System (Promega) によって mREV-ERB  $\beta$  / pCR3.1 を用いて合成した。*Bmal1* プロモーター/エンハンサー領域にある3箇所の RORE 周辺領域配列を合成後、二本鎖としプローブとした。二本鎖オリゴヌクレオチドは T4 ポリヌクレオチドキナーゼ (Takara) を用いて [  $\gamma$ -<sup>32</sup>P ] ATP (Amersham) によりラベルした後、REV-ERB  $\beta$  蛋白と x5 結合バッファー (5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5 mM EDTA, 2.5 mM DTT, 250 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.25  $\mu$ g/ $\mu$ l poly dIdC in 20% glycerol) 中で 4°C, 20 分間インキュベーションし、6% ポリアクリルアミドゲルで 130 V の条件で電気泳動した。泳動後ゲルはゲルドライヤーで乾燥し、BAS-5000 画像解析システム (Fuji Photo Film) を用いて解析した。ゲルシフトに用いたプローブの配列は以下の通りである。下線は RORE と変異導入位置を示している。

**Bmal1-RORE1**

ACGCTTGGAGGTCAGAGAAAA

**Bmal1-RORE1mut**

ACGCTTGGACATCAAGAGAAAA

**Bmal1-RORE2**

CGGAAAGTAGGTTAGTGGTGCG

**Bmal1-RORE2mut**

CGGAAAGTACATTAGTGGTGCG

**Bmal1-RORE3**

CAGAAAGTAGGTCAGGGACGGA

**Bmal1-ROR3Emut**

CAGAAAGTACATCAGGGACGGA

**ルシフェラーゼアッセイ**

レポーターコンストラクトおよび一過性細胞発現コンストラクトはLipofectamine (Invitrogen) によってNIH3T3細胞に導入した。NIH3T3細胞は24 wellプレートにトランスフェクションの前日に1 wellあたり5万個となるように播種した。培地は10%のウシ胎児血清、ペニシリン(25 U/ml)、ストレプトマイシン(25  $\mu$ g/ml)を加えたDMEM (Invitrogen)を用いた。発現効率の補正のため内部標準としてpHRG-TK(Promega)を共発現させた。典型的なアッセイでは1 wellあたり60 ngのレポーターベクター、50 ngの発現ベクター、6 ngのpHRG-TKベクターを混合し、さらに最終のDNA濃度を一定にするためpcDNA3を加えて合計260 ngとした。トランスフェクション後24時間経過した時点において、細胞はPBSで洗浄後、Passive Lysis buffer (Promega)を用いて溶解し、Dual Luciferase Assay kit (Promega)によってホタルおよびウミシイタケルシフェラーゼ活性を測定した。測定にはAscent FII ルミノメーター (Labsystems)を使用した。

**時計遺伝子プロモーター活性のリアルタイム計測**

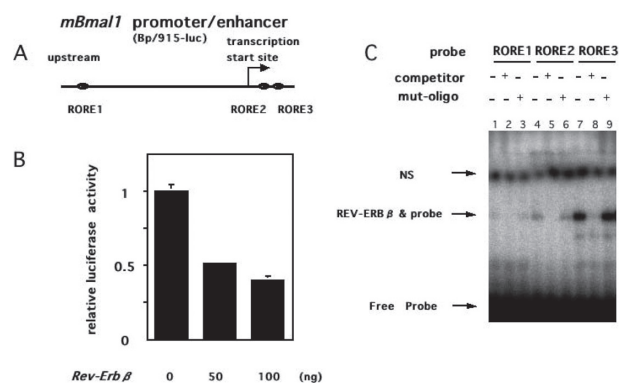
トランスフェクション前日にNIH3T3細胞を35 mmプレートに30万個になるように播種し、SuperFect (Qiagen)を用いてトランスフェクションした。24時間後、細胞は0.1  $\mu$ Mデキサメサゾン (Sigma)で2時間処理し、10%ウシ胎児血清、10 mM HEPES バッファー (pH 7.2)、0.2 mMルシフェリン (Dojindo)、25 U/mlペニシリン、25  $\mu$ g/mlストレプトマイシンを含むDMEMで置き換え、クロノス (Kronos; ATTO) によって10分間隔で発光量を測定した。

**結果****REV-ERB  $\beta$ はROREを介してBmal1プロモーターを抑制する。**

REV-ERB  $\beta$ のBmal1転写に対する影響を解析するためマウスBmal1プロモーター/エンハンサーレポーター (Bp/915-Luc)<sup>9</sup>を用いてルシフェラーゼアッ

セイを行った。REV-ERB  $\beta$ はトランスフェクションに用いたDNA量依存的に、Bmal1プロモーターの活性を抑制した (Fig.1B)。またBmal1プロモーター/エンハンサーのレポーター Bp/915-Luc にある3箇所のROREの配列 (Fig. 1A)をもとにプローブを作成しゲルシフトアッセイを行った。

3箇所のROREプローブに対し何れにもREV-ERB  $\beta$ はバンドを形成し、過剰量の非ラベルプローブではバンドが消失し、ROREに変異を加えた過剰量の非ラベルプローブではバンドが消失しなかったことから、特異的にROREにREV-ERB  $\beta$ は結合することが明らかになった (Fig.1C)。また3箇所のROREのうち、最下流のプローブ (Bmal1-RORE3)に一番強いシグナルが検出されたことから、少なくとも*in vitro*ではREV-ERB  $\beta$ は最下流のRORE (RORE3)に強く結合することが示唆された。



**Fig. 1.** REV-ERB  $\beta$ によるBmal1のプロモーターの制御。

- A) *mBmal1*のプロモーター/エンハンサー領域の構造。  
*mBmal1*のプロモーター/エンハンサー領域にはRORE (RORE1, RORE2, RORE3)が3箇所存在する。
- B) REV-ERB  $\beta$ による*mBmal1*の転写活性の抑制。NIH3T3培養細胞系で*mBmal1*プロモーター/エンハンサーレポーターとともにREV-ERB  $\beta$ 蛋白を一過性に発現させ、24時間後ホタルルシフェラーゼの活性を測定した。REV-ERB  $\beta$ 発現プラスミドのトランスフェクション量は左から0, 50, 100 ngをそれぞれ用いた。同時に遺伝子導入したウミシイタケルシフェラーゼ活性を測定し、測定値を補正した。
- C) REV-ERB  $\beta$ の*mBmal1*遺伝子プロモーターへの特異的結合のゲルシフトアッセイによる解析。*mBmal1*のプロモーター領域に存在するROREs配列に基づいて3種類の二本鎖オリゴヌクレオチドを合成しRORE1, RORE2, RORE3と命名した。(  $\gamma$ -<sup>32</sup>P)ATPを用いて5'側をリン酸化しプローブとした。Competitorはそれぞれ対応する非ラベルのオリゴヌクレオチドを100倍量導入しプローブと競合させた。mut-oligoはCompetitorオリゴヌクレオチドにあるROR結合部位に2塩基の変異を導入したもの。REV-ERB  $\beta$ はウサギ網状赤血球による*in vitro*転写/翻訳システムを用いて生成した。矢印で表示したNSは特異性のないバンドを示す。REV-ERB  $\beta$  & probeは蛋白とプローブが特異的に結合したバンド。Free Probeは結合していないプローブを示す。

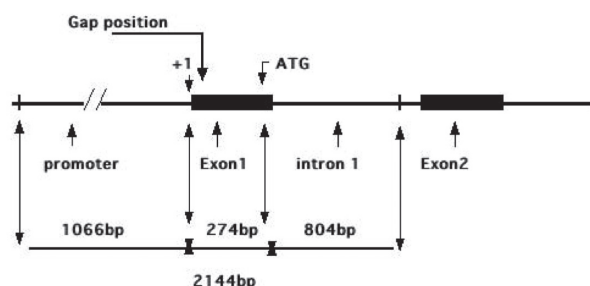
## マウス *Rev-Erb $\beta$* プロモーター/エンハンサー領域のクローニング

マウス *Rev-Erb $\beta$*  cDNAの配列情報から転写開始点を予測し、PCRクローニング用の上流プライマーの位置はその約1 kb 上流に設定し、下流プライマーの位置はエクソン2と想定される領域から上流近傍に設定した。このプライマーペアでPCRを行うと約2.1 kb(2144 bp)のPCR産物が得られた。DNA配列を決定したところ、転写開始点から上流約1 kbから第1エクソンを含み、更にデータベースではギャップとなっていた配列を含む領域がクローニングされていることが明らかになった (Fig. 2)。この配列から PromoterInspector (Genomatix) によってプロモーター/エンハンサー配列を解析すると、転写開始点から122 bp 上流から第1エクソンと第1イントロンのジャンクションより536 bp 下流の範囲にあることが予想された。また、MatInspector(Genomatix)によるDNA結合因子のコンセンサス配列の検索では、このジャンクションより下流約130 bp, 230 bp および280 bpの位置にE-boxが3箇所(上流よりE1, E2およびE3), また200 bp 付近にD-boxが1箇所あることが予想された (Fig.4)。

## ルシフェラーゼアッセイ

全長の *Rev-Erb $\beta$*  プロモーター/エンハンサー領域を pGL3-basic ベクターに導入し、ルシフェラーゼアッセイによって時計遺伝子による制御について解析した。基本活性に対し BMAL1/CLOCK は約1.4倍、BMAL2/NPAS2 は約2.3倍、DBP は約1.5倍の転写活性化を示した。これに対し CRY1 は単独で約57%の抑制を示した (Fig. 3A)。BMAL1/CLOCK および BMAL2/NPAS2 による転写活性化は CRY1 によって抑制された

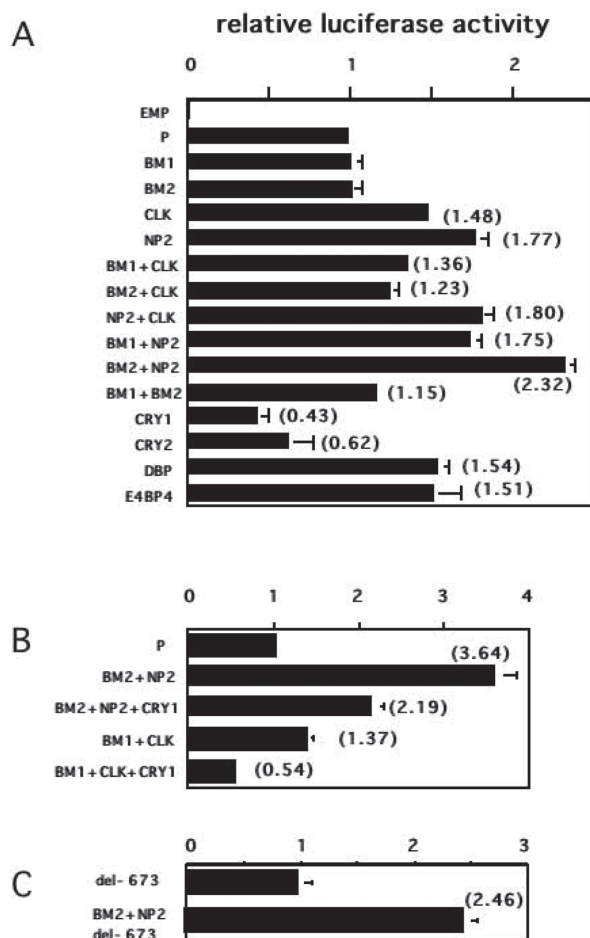
### mouse *Rev-Erb $\beta$* promoter/enhancer region (*Rev-Erb $\beta$* promoter/enhancer-F-L)



**Fig. 2.** *mRev-Erb $\beta$*  プロモーター/エンハンサー領域の構造。図はクローニングしたマウスの *Rev-Erb $\beta$*  プロモーターの約2.1 Kbp のゲノム構造を示している。マウスゲノムデータベースには Gap (配列未同定領域) が第1エクソン領域の5'寄りであった。黒塗り長方形部分は左よりそれぞれエクソン1, エクソン2を示し、エクソン1より左は5'上流のプロモーター/エンハンサー領域と、エクソン1, エクソン2の間はイントロン1を太線で示している。

(Fig. 3B)。これらの結果から、*Rev-Erb $\beta$*  遺伝子の転写制御は BMAL1/CLOCK および BMAL2/NPAS2 によって正に制御され、CRY1によって負に制御される負のフィードバック機構の存在することが示唆された。

第1イントロンのE-boxおよびD-boxを介する時計遺伝子による転写活性化能を検討するため第1エクソンおよびその上流域を欠失させたコンストラクトをレポーターに用いて解析したところ、BMAL2/NPAS2 は約2.5倍の活性化を起こした (Fig. 3C)。



**Fig. 3.** *mRev-Erb $\beta$*  プロモーター/エンハンサーに対する時計関連遺伝子の転写制御。

A, B) レポーターとして *mRev-Erb $\beta$ -F-L* を pGL3-basic に導入したコンストラクトを用いた。A の EMP で示したレーンは pGL3-basic ベクターの活性を表している。また、第2レーンは *mRev-Erb $\beta$ -F-L/pGL3-basic* を示す。発現コンストラクトはそれぞれの遺伝子の蛋白翻訳領域配列を pcDNA3 または pCR3.1 ベクターに導入したコンストラクトを一過性に発現させた。BM1, *Bmal1*; BM2, *mBmal2*; CLK, *Clock*; NP2, *Npas2*。

値は *mRev-Erb $\beta$ -F-L/pGL3-basic* の活性を1とし、時計関連遺伝子を共発現させたときの活性を表す。発現プラスミドは50 ng ずつ導入し、個々トランスフェクション総量は pcDNA3 ベクターで合わせた。C) レポーター *mRev-Erb $\beta$ -del-673/pGL3-basic* に対し BMAL2 と NPAS2 発現による影響を検討した。

**Rev-Erbβ プロモーター /エンハンサー領域の欠失変異体作成と転写活性**

クローニングした全長の *Rev-Erbβ* プロモーター /エンハンサー領域 (*Rev-Erbβ*-F-L) を鋳型に5'欠失変異体をPCRによって作成し、転写活性化能を解析した。第1エクソンより上流を欠失させるとプロモーター活性は全長の約36%に低下した。このことから第1エクソンより上流域に強いプロモーター活性があることが明らかになった。また、del-673, del-570およびdel-496の間で活性に大きな相違がないことから、第1イントロンの E-box, D-boxの欠失の有無はプロモーター活性に大きな影響がないことが分かった (Fig. 4)。

**リアルタイムモニタリング法によるRev-Erbβ プロモーター /エンハンサーの概日リズム性発現の解析**

*Rev-Erbβ* は視交叉上核を及び末梢臓器で明期にピークのある概日リズム発現をすることが報告されている。*Rev-Erbβ* プロモーター /エンハンサーが自律的な概日リズム振動を示すことを確認するため、NIH3T3細胞を用いてレポーター活性を経時的に測定した (Fig. 5)。全長の *Rev-Erbβ* プロモーター /エンハンサー (*Rev-Erbβ*-F-L) は4日間にわたって約24時間周期でリズム発現を示した。また、第1エクソンおよびその上流を欠失させたレポーター (*mRev-Erbβ*-promoter/enhancer (del-673)) も振幅は *Rev-Erbβ*-F-L と比べ低いものの、*Rev-Erbβ*-F-L と同位相の概日リズム発現を示した。これに対し第1イントロン領域を欠失させたレポーター (*Rev-Erbβ*-promoter/enhancer (1.3 k)) は全くリズム発現を示さなかった。以上より第1エクソンおよび上流配列は強力なプロモーターとして、また第1イントロンは概日リズム性発現のエン

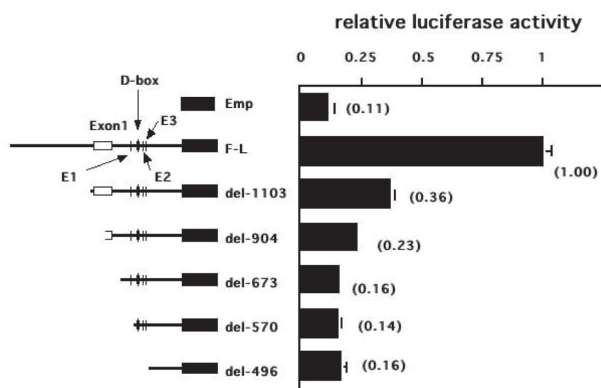
ハンサーとして機能しており、両領域が組み合わさることによって安定したリズム発現が維持されている可能性が示唆された。

**考察**

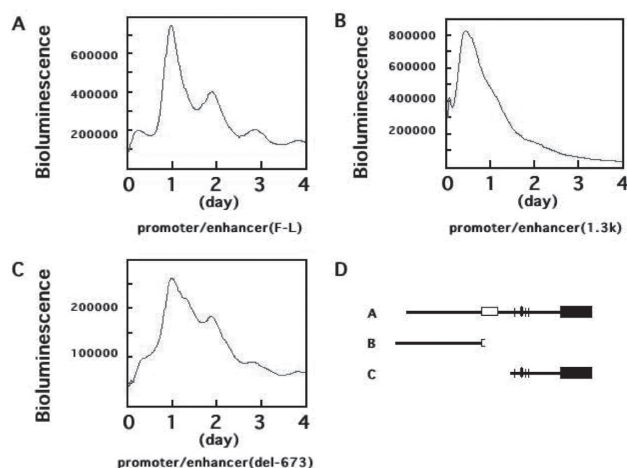
地球上の生物は地球の公転と自転の影響を受け進化の過程で固有の体内時計を持つようになっている。概日リズムは体内時計の一つであり、およそ24時間の周期で、生体内に新陳代謝のリズムなど、リズム性変動を生み出している。哺乳類の概日リズム中枢は視交叉上核に位置しており、神経連絡とホルモンの作用などを通して末梢臓器にある末梢時計を同調させている。また概日リズム中枢も太陽の光などによって24時間周期に同調されている<sup>8)</sup>。

遺伝子レベルで見ると、概日リズムを示す遺伝子にはグルココルチコイドのリズムによってリズム発現するものと<sup>19)</sup>、遺伝子のプロモーター /エンハンサー領域に存在する時計遺伝子結合部位を介してリズム発現するものと、大きく2つに分けられる。後者のプロモーター /エンハンサー領域にある時計遺伝子結合部位は現在3種類が知られており、それらは E-box<sup>4)</sup>、D-box<sup>20,21)</sup> およびRORE<sup>10,11)</sup> で、それぞれ対応する時計遺伝子及びその関連因子が結合し転写調整を行うことによってリズムが作り出されている<sup>22)</sup>。その中でも E-boxは最も重要な転写因子の結合部位と考えられ、*Per1*などの時計遺伝子をはじめ、明期に発現する多くの遺伝子のプロモーター /エンハンサー領域に存在することが知られている。

時計遺伝子 *BMAL1* は *CLOCK* とのヘテロダイマーを形成して E-box に結合し、時計の抑制系因子で



**Fig. 4.** 様々な長さの *mRev-Erbβ* プロモーター /エンハンサー領域の転写活性。  
 A) *mRev-Erbβ* のプロモーター /エンハンサー領域約2.1 Kbpの領域をpTGRmベクターに導入したコンストラクトをF-Lと命名した。第1エクソンの位置と3つのE-box, D-BOXをそれぞれ図に示した。  
 他のコンストラクトはF-Lコンストラクトを5'側から順次に削った構造である。EMPで記したのはpTGRmベクターのみの活性である。  
 B) A)のコンストラクトに対するルシフェラーゼアッセイの活性を示している。FLの活性を1とし、他をそれに比較して示した。



**Fig. 5.** *mRev-Erbβ* プロモーター /エンハンサーのリズム性発現。  
 A,B,C) は3種類の *mRev-Erbβ* プロモーター /エンハンサーの配列をpTGRmベクターに導入し、そのリズム性の発現をリアルタイムで計測した。細胞はNIH3T3を用い、測定期間は4日間である。転写活性は発光量としてY軸で示した。  
 D) は3種類のレポーターコンストラクトの構造をそれぞれ示している。

ある *Per1* や *Cry1* の転写を促進し、産生された産物が BMAL1/CLOCK による転写を抑制することによって概日リズム発振の駆動を中心的に行っている。それに加えて、BMAL1/CLOCK は概日リズムの出力因子 (clock-controlled genes) のリズム発現を直接駆動していると考えられる<sup>8)</sup>。

*Bmal1* の発現には概日リズムの中核である視交叉上核で暗期にピークのある概日リズム性の発現があり、肝臓などの末梢臓器においても同様にリズム発現がある。*Bmal1* のリズム発現機構については、*Bmal1* プロモーター/エンハンサー<sup>9)</sup> 領域がクローニングされ、その転写調節機構が解析されているが、そのリズム発現機構は *Bmal1* プロモーター/エンハンサー領域にある RORE に促進系因子として ROR $\alpha$  が、抑制系因子として REV-ERB $\alpha$  が結合してリズムが形成されると報告されている<sup>12,13)</sup>。しかし、*Bmal1* プロモーター/エンハンサー領域にある RORE に結合する可能性のある因子は他に REV-ERB $\beta$  などがあり、*Bmal1* のリズム発現機構を解明するためにはこれらの転写因子の発現動態や *Bmal1* プロモーター/エンハンサーへの影響について同時に明らかにしていく必要がある。

REV-ERB $\beta$  はオーファン核内受容体で<sup>23)</sup>、REV-ERB $\alpha$  と同性が極めて高く<sup>24,26)</sup>、REV-ERB $\alpha$  と同様にリガンド結合ドメイン (LBD) に AF-2 ドメインがない。AF2 ドメインはリガンド結合と関連するドメインであることから、REV-ERB $\beta$  がリガンド非依存的に持続的な転写抑制を行うことと関連するものと考えられている。また、cAMP 依存性のリン酸化酵素活性化を起こす 8-Br-cAMP によって抑制が解除されないことも報告されており<sup>17)</sup>、転写抑制能がリン酸化などを介するシグナル伝達によって変動しない可能性がある。REV-ERB $\beta$  はモノマーあるいはホモダイマーを形成してコンセンサス配列 (A/T)<sub>6</sub> RGGTCA に結合するが<sup>27)</sup>、AGGTCA 配列は結合に必須であり、モノマーで結合する場合は AGGTCA 配列の 5' 側には A/T の多い配列が必要である。REV-ERB $\beta$  には N-CoR や SMRT などのコレプレッサーが結合し転写抑制性に働く<sup>28)</sup>。*Rev-Erb $\beta$*  は神経系、骨格筋、脾臓などに発現しており<sup>29)</sup>、発達段階では脊索や神経管にも発現のあることが報告されている。また、REV-ERB $\beta$  は alpha-fetoprotein (AFP) 遺伝子の発現を抑制すること、骨格筋の脂質代謝に関与していること<sup>30)</sup> などが報告されているもののその標的や生体における機能についての詳細は明らかではない。*Rev-Erb $\alpha$*  が *Bmal1* のリズム制御因子の一つであることが報告されたことから、その関連因子である *Rev-Erb $\beta$*  についても解析が行われ<sup>10)</sup>、その発現は視交叉上核ばかりでなく末梢臓器においても概日リズム性発現のあることが報告された<sup>18)</sup>。

REV-ERB $\beta$  は DNA 結合領域を含め REV-ERB $\alpha$  と相

同性が高く、*Bmal1* プロモーター/エンハンサー領域の RORE に結合する可能性が高い。また mRNA の発現解析から転写レベルでリズム性発現する機構が備わっている可能性が高い。さらにリガンドやリン酸化状態によって影響を受けにくい性質が予想されること、発現量はその転写抑制能を主に決定している可能性が高いことなどから、*Bmal1* 遺伝子 のリズム発現に *Rev-Erb $\beta$*  の転写が直接関連するものと考え、*Rev-Erb $\beta$*  プロモーター/エンハンサー領域のクローニングをおこない、リズム発現機構について解析した。

*Rev-Erb $\beta$*  は *Bmal1* の転写を発現量依存性に抑制した。これはゲルシフトの実験から *Bmal1* プロモーター/エンハンサー領域の転写開始点近傍にある 2 つの RORE を介して行われていることが分かった。私は REV-ERB $\alpha$  についてもゲルシフトで REV-ERB $\beta$  と同様に RORE に特異的に結合していることを確認しており (未発表)、REV-ERB $\alpha$  と REV-ERB $\beta$  が *Bmal1* 転写の抑制因子として働いていると考えられる。

*Rev-Erb $\beta$*  プロモーター/エンハンサー領域は第 1 エクソンを挟んで、エクソン上流は主にプロモーターとして、第 1 イントロンは概日リズム性のエンハンサーとして機能していることが、今回の解析で明らかになった。*Rev-Erb $\beta$*  の時計遺伝子による制御に関しては、BMAL1/CLOCK で転写の活性化が見られた他、末梢リズム形成に主に働いていると考えられる BMAL2/NPAS2 によって BMAL1/CLOCK より強い活性化がみられ、末梢臓器での *Rev-Erb $\beta$*  の発現に関与している可能性が高い。第 1 イントロン領域には E-box が 3 箇所あり、この領域を用いたルシフェラーゼアッセイでも BMAL2/NPAS2 によって約 2.5 倍の転写活性化が見られたことから、これらの E-box を介する活性化である可能性が高い。Ueda らは *Rev-Erb $\beta$*  のプロモーター/エンハンサー領域に E-box を 2 箇所同定しているが<sup>22)</sup>、私は今回の全領域に亘るプロモーター/エンハンサー領域のクローニングによって、それに加えて更に 1 箇所 E-box があることを見いだしている。また DBP 結合部位が第 1 イントロンにあることを Ueda らは報告しているが、この D-box を含む *Rev-Erb $\beta$*  のプロモーター/エンハンサー領域が DBP によって転写活性化されることが、今回の解析で示された。

時計遺伝子の発現調節は E-box、RORE および D-box の 3 種類の DNA 結合配列によって主に行われていると考えられている<sup>22)</sup>。抑制系の時計遺伝子のプロモーター/エンハンサー領域には前述のように E-box が、また促進系時計遺伝子 *Bmal1* には RORE が存在し、また、*Per2* など E-box による転写制御によってリズム発現する時計遺伝子より発現のピークが前にある *Per3* には E-box が無い代わりに D-box が存在することから、これらの DNA 結合配列の組み合わせとその配列に結合する時計遺伝子が位相を決定している可能性が示唆

されている。E-boxなどのDNA結合配列を取り出してSV40などのプロモーターで駆動させたレポーターでリズム発現を確認する手法が採られているが、転写調節はDNA結合配列ばかりでなくその周辺の配列やその配列と関連した転写因子群の構成、リン酸化などの修飾によっても行われており、DNA結合配列の組み合わせのみで転写の位相を決定しているかどうか、さらなる解析が必要と思われる。本研究で解析したRev-Erb  $\beta$  のプロモーター / エンハンサー配列は、リズム位相の発現機構を解析する極めて有望なシステムの一つである。

## 謝辞

稿を終えるにあたり、ご指導を頂いた埼玉医科大学国際交流センター野村正彦教授、直接ご指導頂いた同生理学池田正明准教授に深謝します。学術的なご指導を頂いた片山茂裕教授、井上郁夫准教授をはじめ埼玉医科大学内分内分泌科・糖尿病内科の皆様にも深く感謝します。またご校閲頂いた埼玉医科大学生理学渡辺修一教授に感謝いたします。リアルタイムモニタリングの測定法などの技術指導を行って頂いた産業技術総合研究所関西センター中島芳浩先生に感謝いたします。この研究を進めるにあたり実験の補助をして頂いた埼玉医科大学生理学熊谷恵さん、楊芳さんに深く感謝します。本研究の著者は上原記念生命科学財団から来日研究生助成金を受けました。研究の大部分は埼玉医科大学ゲノム医学研究センタープロジェクト部門で行われており、場所と機器を提供して頂いたゲノム医学研究センターの皆様にも深く感謝します。

## 文献

- Ikeda M, Nomura M. cDNA cloning and tissue-specific expression of a novel basic helix-loop-helix/PAS protein (BMAL1) and identification of alternatively spliced variants with alternative translation initiation site usage. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;233:258-64.
- King DP, Zhao Y, Sangoram AM, Wilsbacher LD, Tanaka M, Antoch MP, et al. Positional Cloning of the Mouse Circadian Clock Gene. *Cell* 1997; 89:641-53.
- King DP, Takahashi JS. Molecular genetics of circadian rhythms in mammals. *Annu Rev Neurosci* 2000;23:713-42.
- Gekakis N, Staknis D, Nguyen HB, Davis FC, Wilsbacher LD, King DP, et al. Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science* 1998;280:1564-9.
- Nakajima M, Imai K, Ito H, Nishiwaki T, Murayama Y, Iwasaki H, et al. Reconstitution of circadian oscillation of cyanobacterial KaiC phosphorylation in vitro. *Science* 2005;308:414-5.
- Reppert SM, Weaver DR. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* 2002;418:935-41.
- Honma S, Ikeda M, Abe H, Tanahashi Y, Namihira M, Honma K, et al. Circadian oscillation of *BMAL1*, a partner of a mammalian clock gene *Clock*, in rat suprachiasmatic nucleus. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;250:83-7.
- Nishide SY, Honma S, Nakajima Y, Ikeda M, Baba K, Ohmiya Y, et al. New reporter system for *Per1* and *Bmal1* expressions revealed self-sustained circadian rhythms in peripheral tissues. *Genes to Cells* 2006; 11:1173-82.
- Yu W, Nomura M, Ikeda M. Interactivating feedback loops within the mammalian clock: *Bmal1* is negatively autoregulated and upregulated by CRY1, CRY2, and PER2. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;290:933-41.
- Ueda HR, Chen W, Adachi A, Wakamatsu H, Hayashi S, Takasugi T, et al. A transcription factor response element for gene expression during circadian night. *Nature* 2002;418:534-9.
- Preitner N, Damiola F, Lopez-Molina L, Zakany J, Duboule D, Albrecht U, et al. The orphan nuclear receptor Rev-Erb $\alpha$  controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell* 2002; 110:251-60.
- Nakajima Y, Ikeda M, Kimura T, Honma S, Ohmiya Y, Honma K. Bidirectional role of orphan nuclear receptor ROR $\alpha$  in clock gene transcriptions demonstrated by a novel reporter assay system. *FEBS Lett* 2004;565:122-6.
- Sato TK, Panda S, Miraglia LJ, Reyes TM, Rudic RD, McNamara P et al. A functional genomics strategy reveals *Rora* as a component of the mammalian circadian clock. *Neuron* 2004;43:527-37.
- Akashi M, Takumi T. The orphan nuclear receptor ROR $\alpha$  regulates circadian transcription of the mammalian core-clock *Bmal1*. *Nat Struct Mol Biol* 2005;12:441-8.
- Balsalobre A, Damiola F, Schibler U. A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *cell* 1998;93:929-37.
- Triqueneaux G, Thenot S, Kakizawa T, Antoch MP, Safi R, Takahashi JS, et al. The orphan receptor Rev-Erb  $\alpha$  gene is a target of the circadian clock pacemaker. *J Mol Endocrinol* 2004;33:585-608.
- Burke L, Downes M, Carozzi A, Giguere V,

- Muscat GE. Transcriptional repression by the orphan steroid receptor RVR/Rev-Erb beta is dependent on the signature motif and helix 5 in the E region: functional evidence for a biological role of RVR in myogenesis. *Nucleic Acids Res* 1996;24:3481-9.
- 18) Yamamoto T, Nakahata Y, Soma H, Akashi M, Mamime T, Takumi T. Transcriptional oscillation of canonical clock genes in mouse peripheral tissues. *BMC Mol Biol* 2004;9:5:18-24.
  - 19) Oishi K, Amagai N, Shirai H, Kadota K, Ohkura N, Ishida N. Genome-wide Expression Analysis Reveals 100 Adrenal Gland-dependent Circadian Genes in the Mouse Liver. *DNA Res* 2005;12:191-202.
  - 20) Wuarin J, Schibler U. Expression of the liver-enriched transcriptional activator protein DBP follows a stringent circadian rhythm. *Cell* 1990;63:1257-66.
  - 21) Mitsui S, Yamaguchi S, Matsuo T, Ishida Y, Okamura H. Antagonistic role of E4BP4 and PAR proteins in the circadian oscillatory mechanism. *Genes Dev* 2001;15:995-1006.
  - 22) Ueda HR, Hayashi S, Chen W, Sano M, Machida M, Shigeyoshi Y, et al. System-level identification of transcriptional circuits underlying mammalian circadian clocks. *Nat Genet* 2005;37:187-92.
  - 23) Nuclear Receptors Nomenclature Committee. A Unified Nomenclature System for the Nuclear Receptor Superfamily. *Cell* 1999;97:161-3.
  - 24) Enmark E, Kainu T, Pelto-Huikko M, Gustafsson JA. Identification of a Novel Member of the Nuclear Receptor Superfamily Which Is Closely Related to Rev-erbA. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;204:49-56.
  - 25) Dumas B, Harding HP, Choi H S, Lehmann KA, Chung M, Lazar MA, et al. A new orphan member of the nuclear hormone receptor superfamily closely related to Rev-Erb. *Mol Endocrinol* 1994;8:996-1005.
  - 26) Retnakaran R, Flock G, Giguere V. Identification of RVR, a novel orphan nuclear receptor that acts as a negative transcriptional regulator. *Mol Endocrinol* 1994;8:1234-44.
  - 27) Harding HP, Lazar MA. The orphan receptor Rev-Erb alpha activates transcription via a novel response element. *Mol Cell Biol* 1993;13:3113-21.
  - 28) Downes M, Burke LJ, Bailey PJ, Muscat GE. Two receptor interaction domains in the corepressor, N-CoR/RIP13, are required for an efficient interaction with Rev-ErbA alpha and RVR: physical association is dependent on the E region of the orphan receptors. *Nucleic Acids Res* 1996;24:4379-86.
  - 29) Ramakrishnan SN, Lau P, Burke LJ, Muscat GEO. Rev-Erb  $\beta$  Regulates the Expression of Genes Involved in Lipid Absorption in Skeletal Muscle Cells. *J Biol Chem* 2005;280:8651-9.
  - 30) Bois-Joyeux B, Chauvet C, Nacer-Cherif H, Bergeret W, Mazure N, Giguere V, et al. Modulation of the far-upstream enhancer of the rat alpha-fetoprotein gene by members of the ROR alpha, Rev-Erb alpha, and Rev-erb beta groups of monomeric orphan nuclear receptors. *DNA Cell Biol* 2000;19:589-99.