

# 私が名付けた遺伝子 *Bmal1* : 発表10年を振り返って

池田正明<sup>✉</sup>

埼玉医科大学 医学部 生理学

埼玉医科大学 ゲノム医学研究センター 分子時計プロジェクト

遺伝子プロフィール

読み方：ビーマルワン

同定生物種：*Homo sapiens*

発表論文：Ikeda M and 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* 233(1), 258-264 (1997)

名前の由来：新規のbHLH-PAS型転写因子で、ノーザンブロットから脳と骨格筋を中心に発現しているArnt (Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator) に相同性のある因子としてBrain and Muscle Arnt-like 1の頭文字をとってBMAL1と名付けた。

働き・特徴：哺乳類の時計遺伝子。CLOCKとヘテロダイマーを形成し *Per1* などの時計遺伝子や時計の出力に関連する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、一般に転写を活性化させる。PER1/CRY1など時計の抑制系因子と転写複合体を形成し、転写・翻訳からなる時計発振のフィードバック機構において主要な因子として働く。ノックアウトマウスでは概日性行動リズムが消失する。

Key Word：BMAL1、概日リズム、時計遺伝子、遺伝子名

## 1. はじめに

BMAL1 クローニングの報告をして今年(2007年)の4月で10年になることから、クローニングと命名の経緯、その裏にある今だからいえる諸々の話を思いつくまま「実験医学(羊土社刊) 私が名付けた遺伝子」風にまとめてみることにした。

## 2. 研究の背景

1984年にショウジョウバエの概日時計突然変異の原因遺伝子として *per* がクローニングされていた<sup>2,11)</sup>。その機能については構造がプロテオグリカンに似ていることから、細胞間のコミュニケーションに関連するとする報告<sup>11)</sup> などが提出されたが、概日リズムと直接関連するような機能の報告はなく、1990年のPual Hardin博士らによる *per* mRNAに24時間周期のオシレーションがあるとする報告<sup>6)</sup> まで待たな

ければならなかった。さらに同時期 *per* 産物のアミノ酸配列解析から、ダイオキシンの結合因子とともに核に移動する因子として同定されたArnt (Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator) とショウジョウバエの神経系の発達に関連する因子SIM (*single-minded*) との間に相同性領域があることが見つかり、PER、ARNT、SIMの頭文字をとってPASドメインと命名され<sup>13)</sup>、これが構造上の手がかりばかりでなく機能のヒントを与えてくれることになった。

私は1991年から国立神経精神センターの高橋清久部長(現同センター名誉総長、藍野大学学長、前日本時間生物学会会長)のもとで精神神経疾患の研究を始める機会を得ていた。ある時、高橋部長が日本時間生物学会の学会だよりに掲載される井上慎一博士(現山口大学理学部教授、当時三菱化成生命科学

✉mikeda@saitama-med.ac.jp (〒350-1241 埼玉県日高市山根1397-1))

研究所)の学会報告記を渡してくれた。そこには「時計遺伝子」を見つけ出そうと動き出しているアメリカを中心とする研究グループの動向が詳細に報告されていた。

当時、私が所属していた研究室は精神疾患の原因と治療法を研究すること目的に統合失調症、気分障害(うつ病、躁うつ病)、睡眠・概日リズム障害の3研究室に分かれてそれぞれの疾病の研究を行っていた。私は気分障害の研究室に属し、主に神経伝達物質とそのレセプターの分子生物学的研究から気分障害の病態を解明していこうとする研究に取り組んでいた。じつはこの時、高橋部長がこの報告記を気分障害の研究をしていた私に渡してくれたのには理由があった。

私は大学院へ入学するとすぐに精神神経科の臨床研修を始めていた。また同時に、バーゼル大学のAnna Wirtz-Justice博士、Kurt Krauchi博士らとの共同研究<sup>18)</sup>を終えて帰国し、概日リズム研究を立ち上げたばかりの盛政忠臣博士(脳神経センター大田記念病院福山睡眠医学研究所所長、元岡山大学医学部神経内科助教授)に、研究の指導を受けることになった。重要なレセプター遺伝子を次々に発見していた沼正作博士(故人、京都大学医化学教授)のような研究に従事したいと密かにあこがれを持って眺めていた当時の私には、概日リズム研究は、行動量の測定とホルモンや脳内神経伝達物質の解析が中心で、分子生物学的研究から一番遠い分野のように思えた。そのため私は大学院を終えるとすぐにアリゾナ大学医学部薬理学教室のHenry I. Yamamura教授の研究室にレセプターの分子生物学的研究をするため留学することにした。ここで遺伝子解析技術を取得する機会を得、帰国後、高橋部長の研究室の一員となり、この報告記事をきっかけに、現時点で得られる情報やアプローチ法から概日リズムの分子機構について、初めから勉強し直してみようと思った。その当時考えたのは、第一に*per* 遺伝子のことである。*per* 産物のPASドメインはArnt、SIMと共通であるが、ArntとSIMに特徴的であるDNA結合と二量体形成に必要なbHLHドメインがない。仮に*per* 産物が転写因子とするとDNAに結合できないタイプになる。PASドメインはどうだろうか。当時はPASドメインの機能についての報告はなかったが、FOS:JUN二量体形成に関与するロイシンジッパーと同じようにPASドメイン同士が結合する<sup>19)</sup>とすれば、転写因子としての機能を説明し易い。私が時計遺伝子のクローニングを開始した当時は、牧 佳男

博士(現金光病院泌尿器科部長、筆者の大学時代に一緒に弓を練習したサークルの先輩でもある)が、南カリフォルニア大学のPeter K. Vogt博士(現Scripps Research Institute)の研究室でトリ肉腫ウイルス17(ju-nana)に含まれるトランスフォーメーション活性のある遺伝子*v-jun*を発見<sup>20)</sup>し、それに端を発して、*c-jun*の発見、さらにはJUNがロイシンジッパーを介してFOSとヘテロ二量体になってAP-1を構成することが発見され、FOS、JUNなどのbHLH型転写因子の機能についての研究に一気に火がついていた。*per* 産物にbHLHドメインがないことは、他のbHLH-PAS因子とPASドメインを介して二量体を形成した場合、DNAに結合できない転写複合体が形成されることを意味し、これが*per* 転写を抑制するとすれば、*per* 転写調節に*per* 産物によるネガティブフィードバック機構があるとするHardin博士の実験結果<sup>6)</sup>をうまく説明できる。つまり*per*と結合するようなbHLH-PAS因子を見つけることができれば時計遺伝子が獲れるのではないかと考えた。しかしこのプロジェクトを始めるためにはあまりにも仮説が脆弱のような気がして、なかなかその一歩が踏み出せないでいた。しかも高橋部長が、次年度から国立神経・精神センターの運営管理部門へ異動することがこの時既に決まっており、リスクのある研究を手がける状況ではなくなっていた。その一歩を踏み出させてくれたのはJose A. Campos-Ortega博士(故人、当時University of Cologne教授)の講演だった。当時の神経研究所には鍋島陽一博士(現京都大学医学研究科教授、当時遺伝子工学部長)ら著名な分子生物学者がおられ、毎週のように第一線で活躍している研究者のセミナーが開かれていた。Campos-Ortega博士はショウジョウバエ発生における側方抑制の分子機構について<sup>31)</sup>この時話されたが、その機構は抑制性と促進性の転写因子で成り立っているというものであった。この機構自体は既に論文で読んで知っていたものだったが、講演を聴いて今まで胸につかえていたものが一気に落ちていったような気がした。この講演の後すぐに高橋部長のお部屋に伺い、時計遺伝子のプロジェクトを始めることの許可をいただき、PASドメインを手がかりに時計遺伝子をクローニングするため理化学研究所筑波研究所(当時ライフサイエンス研究所)石井俊輔博士の研究室でWest-Western法の手ほどきを受けることになった。年も明けた1993年1月のことである。

### 3. 遺伝子のクローニング：暗黒時代から黎明期

West-Western 法で既知のPASドメインから新規のPAS因子をクローニングすることを計画したわけであるが、肝心の既知のPAS因子の配列でさえすぐに獲ることはできなかった。また、高橋部長が研究所から転出されることを機に、私も研究の場所を埼玉医科大学に移すことになった。移籍してすぐに、AhR cDNAを藤井義明博士（現筑波大学TARAセンター、当時東北大学理学部教授）からいただき、これをもとに他の因子をクローニングすることにとりかかった。しかし獲れてくる因子はPAS因子と関連しないものばかりで、途中でWest-Western法に代わる新たな手法としてTwo-Hybrid法を導入してみたものの結果は同じだった。もうこの方法でクローニングすることはあきらめようと思い始めていた1995年秋に、John Craig Venter博士（当時The Institute for Genomic Research所長）がヒトcDNA配列のEST<sup>1)</sup>をデータベース（TIGR database）上に公開したという話を聞いた。Venter博士は、アリゾナ大学留学時代に私に分子生物学実験の手ほどきしてくれたJosephine Lai博士（現アリゾナ大学医学部薬理学教授）がNINDS(National Institute of Neurological Disorders and Stroke)でポストドクをしていたときのボスである。実験を習いながらVenter博士とその奥さんFraser博士の事、とりわけVenter博士は新しいことはすぐ導入するような研究スタイルで研究を進めていることなど聞いていたので、彼の動向には知らないうちに興味を持っていたのかもしれない。Venter博士の自動DNAシーケンサーの導入は早かったようで、初めてシーケンスのチャートを見せてもらったのは、彼のラボの研究者からで、1987年夏のことである。早速、ESTデータベースをperやArntの配列をキーに検索してみると、少なくとも3種類の新規のPAS因子と思われるESTがTIGRのデータベースに含まれていることが分かった。3種類のうちどれから先に全長をクローニングするか決めることにしたが、迷わずR59448というアクセシオン番号の付いたESTを含む遺伝子群を選ぶことにした。なぜかというとそのETS群の殆どが胎児脳ライブラリー由来だったからである。というのは概日リズムの中樞は中枢神経系にあることから、当時、私は時計遺伝子も脳を中心に発現していると思いついていたためである。しかしこの思い込みは後で誤りであることが分かった。今思うとこの思い込みで*Bmal1*のクローニングに集中できたことは幸運であった。

### 4. 遺伝子の同定から論文発表まで

cDNAの全長はプライスバリエーションには悩まされたがRACE法で比較的順調にクローニングできた。しかしどのようにしてこれが時計遺伝子であることを証明するかという難題が残っていた。ESTの配列を使って遺伝子の解析をする場合、1年半から2年で第一報を殆どの分子生物学者は出せるはずである。ましてビッグラボがそれに取り組んでいたら、あっという間に論文を出して来るに違いない。そう考えてクローニングを開始して1年半が経過した1997年春に、新規bHLH-PAS因子のクローニングとして*BMAL1*の最初の論文をBBRCに投稿しアクセプトされた<sup>10)</sup>。しかしこれが時計遺伝子を見つけるためのプロジェクトであることは伏せることにした。また浜松で同時期に開催された日本生理学会において、本間研一博士（現北海道大学医学研究科生理学教授および医学研究科長、現日本時間生物学会会長）がオーガナイズされた概日リズムのシンポジウムで、発表する機会をいただくことができた。幸いこのシンポジウムがきっかけで*Bmal1*の発現に関する共同研究を本間博士のグループと開始することができた。

1997年の11月のことだっただろうが、本間さんと博士（北海道大学医学研究科生理学准教授）との実験についての連絡は普段はメールで行っていたのだが、この日は珍しく電話がかかってくる。フィルムを現像してみると*Bmal1*が視交叉上核できれいにリズム発現しているというのである。そうあって欲しいと期待していたが、まさかそんなに都合良くはいかないだろうと揺れていた気持ちが、今度は次の実験はどうしようという思いで一気に頭がいっぱいになってしまったことを覚えている。視交叉上核で*Bmal1*が発現し、しかも暗期にピークを示すリズム性発現のあることを、1998年5月にフロリダ州アメリカアイランドで開催されたSRBR (Society for Research on Biological Rhythm)の最初のセッションの最後に2枚のスライドとして発表することができた<sup>11)</sup>。実はこれは本間さんと博士が座長のJay C. Dunlap博士（Dartmouth Medical School）に事前に依頼して、スライド2枚という条件付きでの発表の機会を作って頂いていたのである。今でもDunlap博士が、急遽OHPシートに手書きで演者の名前を書き加えてセッション前に映し出したのを覚えている。このセッションではJoseph S. Takahashi博士（Northwestern University）らのグループがCLOCKのヘテロダイマーの相手が*BMAL1*であること、*BMAL1*:CLOCKが*Per1*プロモーターのE-boxに結合して転

写を活性化し、その産物がそれを抑制すること<sup>5)</sup>、Michael Rosbash (Brandeis University)、Takahashi 両博士のグループからショウジョウバエにも *Bmal1* 相同遺伝子 (*cycle*、*dBmal1*) のあること<sup>11,15)</sup> が同時に報告され、概日時計の分子機構解明への1ページ目を飾る記念すべきセッションになった。

## 5. BMAL1 と命名

BMAL1はBrain and Muscle Arnt-like 1の頭文字をとった名前である。最初のSRBRの学会では「ビーエムエーエルワン」と呼ばれていたが、すぐに多くの研究者が「ビーマルワン」と呼んでくれるようになった。これはArntに似ているという構造上の特徴が明らかだったのでArnt-likeとすることは前から決めていた。しかし論文発表当時、機能については時計遺伝子であって欲しいと思ってはいたが、まだ決定打がなかった。なにか*Bmal1*の性質を名前に盛り込めないかと考えて、思いついたのが発現パターンの特徴を入れることだった。ノーザンブロットをしてみると脳と骨格筋、それに心臓(これも筋?)に強く発現していた<sup>11)</sup>。それでBrain and Muscleと前に付けたのである。ところがこの発現パターンを前に付けたことが、後で思わぬ方向に「BMAL1」という名前の問題を進めてしまうことになった。皆さんはお気づきのことと思いますが、ゲノムデータベースなどで*Bmal1*を検索すると*Bmal1*は*Arntl*とその表記が統一されています。なぜこうなっているかという、*Bmal1*の論文が掲載されて半年くらいたったある日、HUGOから一通のメールが届き、発現臓器名を遺伝子の前に付けるようなBMAL1の命名法は、HUGOが規定する命名法に合致していないので*Arntl*にするということです。異議あるいは名前を見直すのであれば申し立てるような内容だったと思います。しかしまだこのころは*Bmal1*の機能が分からなかったため、それが明らかになってから異議の申し立てをしようと考えていました。それがそのまま*Arntl*となっているわけです。

また、なぜ1としたのかと*Bmal2*の報告前によく聞かれることがありました。これは最初から*Bmal2*の存在が分かっていたわけではなく、*Arntl*と*Arnt2*があるから、遺伝子重複を考えるとおそらく相同遺伝子は奇数ではなく偶数だろうと予測したからです。

## 6. 幻のTimecriptin (TIC)

読者はいきなりこのTimecriptinという名前を耳にして、新しい時計遺伝子が発見されたと思われるかもしれません。それも無理ありません。これはラットの*Bmal1*が視交叉上核でリズム発現をすることを見いだしたとき、HUGOから名前を見直すように言われていたこともあり、前述の1998年に開催されたSRBRでの発表では、Timecriptinとして行うことにしました。これは時間timeと転写のtranscriptionからの合成語で略語をTICとしました。もう一つの時計遺伝子をTACとすれば、TIC-TACとなるはず?でした。この名前の痕跡はWEB検索すると学会アブストラクトとして残っています。不思議なことに略称のTICという名前はラットの*Bmal1*のクローニングを報告したCD.Wolting博士 (University of Toronto)の論文<sup>19)</sup>に使用されています。これは偶然一致したのか私たちの学会発表と関連しているのかまだ確かめられていません。論文中に名前の由来についても記述がなく、私たちのSRBRの発表より彼らの論文は後で出版されているので、関連がひょっとしたらあるのかもしれませんが。

## 7. *Bmal1* 以外の呼称

*Bmal1*には他にMOP3、Arnt3、JAP3、TIC、*Arntl*の5種類の呼称がある。MOP3はChristopher A. Bradfield博士 (University of Wisconsin)の研究グループのJohn B. Hogenesch博士 (Scripps Research Institute, Jupiter, Florida)が、Northwestern Universityに在籍していた時にクローニングし命名した呼称で、Members of the PAS superfamilyの頭文字をとっている<sup>7)</sup>。以前、Joseph Takahashi博士に、CLOCKのパートナーがBMAL1だと分かったとき、MOP3とBMAL1という2つの名前が既にあるとあって、MOP3の方が僅か10日ではあるが出版されたのも早いのに、なぜBMAL1としたのか伺ったことがある。それはTakahashi博士らがクローニングしたハムスターの*Bmal1*配列が、私たちが報告していたヒト*Bmal1b*に一致したからだったと言う。Hogenesch博士が最初に報告した配列(U51627)は翻訳開始点周辺が*Bmal1b*や*Bmal1a*と異なっていたが、*Bmal1*にはスプライスバリエントが多数見つかったため、バリエントの一つだろうと私自身は当時あまり気に留めていなかった記憶がある。ヒトのゲノム配列が分かっている現時点で最初に発表されたMOP3の構造を検討してみると、私たちがマウス*Bmal1*ゲノム構

造の解析<sup>20)</sup>でエクソン4としたエクソンより下流は全く*Bmal1*と同じ構造なのだが、エクソン4より上流は、エクソン4の直上のイントロンが連続してエクソンとして使われる構造となっており、そこに翻訳開始コドンが存在している。この領域がコードしているアミノ酸配列(57残基)を検索してみると、チンパンジー(Pan troglodytes)の*Bmal1*のアイソフォームとして遺伝子登録があり、またヒトのESTデータベースにもATG周辺の配列を含むデータの登録があり、クローニングの際に生じたキメラではなく、スプライスバリエーションであることは間違いないと思う。発現に組織特異性が高いか発現量の少ないバリエーションなのかもしれない。ひょっとすると霊長類にあって齧歯類にはないバリエーションなのかもしれない。次に*Arnt3*であるが、これは藤井義明博士のグループがマウスからクローニングし命名した。藤井博士のグループは*Arnt1*や*Arnt2*のクローニングを手がけており、マウスからクローニングした新規の*Arnt*に相同性のある因子を*Arnt3*と命名した<sup>16)</sup>。JAP3<sup>17)</sup>はUniversity of TexasのMcKnight博士らのグループがGenBankに登録したヒトの配列である。私たちと同時期にクローニングして登録しているが、どういうわけか論文にはなっていない。そのため名前の由来も不明である。PubMedを検索すると遺伝子登録のところにしているファーストオーサーのTian氏には、その頃EPAS1関連の論文があり、どうもEPAS1の研究に集中していた可能性が高い。そのためJAP3は論文にしなかったのかもしれない。その当時、概日時計が末梢にもあると信じていたら、私もEPAS1を選んでいたかもしれない。ともあれ日本人にとってはJAP(ジャップ)3とならなくて良かったような気がする。TICについては前述したとおりである。機会があればTICの名前の由来については問い合わせたいと思っている。*Arnt1*も前述したとおりである。*Arnt1*でPubMedを検索してもなにも論文がないと返してくる。じつは*Arnt1*ではヒットし、これが今のところ正しいHUGOの表記ではあるが、番号がないので*Arnt12*(*Bmal2*)との関係に混乱が生じやすい。何れにしても*Arnt1*は遺伝子の登録番号に近い存在になっている。ある研究室でBOB3という呼称が一時期使われていたという話を聞いた。これはMOP3とBMAL1の合成語と思われるが、どんな遺伝子をやっているか周りから眩ますためにかわいいニックネームを付けてあげるのも時にはいいかもしれない。

#### 参考文献・資料

- 1) Adams MD, Soares MB, Kerlavage AR, Fields C, Venter JC: Rapid cDNA sequencing (expressed sequence tags) from a directionally cloned human infant brain cDNA library. *Nat Genet* 4:373-803(1993)
- 2) Bargiello TA, Jackson FR, Young MW: Restoration of circadian behavioural rhythms by gene transfer in *Drosophila*. *Nature* 312:752-754(1984)
- 3) Campos-Ortega JA: Genetic mechanisms of early neurogenesis in *Drosophila melanogaster*. *J Physiol Paris* 88:111-22.(1994)
- 4) Darlington TK, Wager-Smith K, Ceriani MF, Staknis D, Gekakis N, Steeves TD, Weitz CJ, Takahashi JS, Kay SA: Closing the circadian loop: CLOCK-induced transcription of its own inhibitors *per* and *tim*. *Science* 280:1599-1603 (1998)
- 5) Gekakis N, Staknis D, Nguyen HB, Davis FC, Wilsbacher LD, King DP, Takahashi JS, Weitz CJ: Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science* 280:1564-1569 (1998)
- 6) Hardin PE, Hall JC, Rosbash M: Feedback of the *Drosophila* period gene product on circadian cycling of its messenger RNA levels. *Nature* 343:536-540(1990)
- 7) Hogenesch JB, Chan WK, Jackiw VH, Brown RC, Gu YZ, Pray-Grant M, Perdew GH, Bradfield CA: Characterization of a subset of the basic-helix-loop-helix-PAS superfamily that interacts with components of the dioxin signaling pathway. *J Biol Chem* Mar 28: 272:8581-8593(1997)
- 8) Honma S, Ikeda M, Abe H, Tanahashi Y, Namihira M, Honma K, Nomura M: Circadian oscillation of BMAL1, a partner of a mammalian clock gene Clock, in rat suprachiasmatic nucleus. *Biochem Biophys Res Commun* 250(1):83-87(1998)
- 9) Huang ZJ, Edery I, Rosbash M: PAS is a dimerization domain common to *Drosophila* period and several transcription factors. *Nature* 364:259-262(1993)
- 10) 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* Apr 7 :233:258-264(1997)
- 11) Jackson FR, Bargiello TA, Yun SH, Young MW: Product of per locus of *Drosophila* shares homology with proteoglycans. *Nature* 320:185-818(1986)
  - 12) Maki Y, Bos TJ, Davis C, Starbuck M, Vogt PK: Avian sarcoma virus 17 carries the jun oncogene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:2848-2852(1987)
  - 13) Nambu JR, Franks RG, Hu S, Crews ST: The single-minded gene of *Drosophila* is required for the expression of genes important for the development of CNS midline cells. *Cell* 63:63-75 (1990)
  - 14) Reddy P, Zehring WA, Wheeler DA, Pirrotta V, Hadfield C, Hall JC, Rosbash M: Molecular analysis of the period locus in *Drosophila melanogaster* and identification of a transcript involved in biological rhythms. *Cell* 38:701-710 (1984)
  - 15) Rutila JE, Suri V, Le M, So WV, Rosbash M, Hall JC: CYCLE is a second bHLH-PAS clock protein essential for circadian rhythmicity and transcription of *Drosophila* period and timeless. *Cell* 93:805-814(1998)
  - 16) Takahata S, Sogawa K, Kobayashi A, Ema M, Mimura J, Ozaki N, Fujii-Kuriyama Y: Transcriptionally active heterodimer formation of an Arnt-like PAS protein, Arnt3, with HIF-1 $\alpha$ , HLF, and clock. *Biochem Biophys Res Commun* 248:789-794(1998)
  - 17) Tian H, Russell DW, and McKnight SL: JAP 3: A Novel ARNT-like bHLH-PAS Protein  
ACCESSION:U60415
  - 18) Wirz-Justice A, Krauchi K, Morimasa T, Willener R, Feer H: Circadian rhythm of [<sup>3</sup>H]mipramine binding in the rat suprachiasmatic nuclei. *Eur J Pharmacol* 87:331-333(1983)
  - 19) Wolting CD, and McGlade CJ: Cloning and chromosomal localization of a new member of the bHLH/PAS transcription factor family. *J Mamm. Genome* 9 :463-468(1998)
  - 20) Yu W, Ikeda M, Abe H, Honma S, Ebisawa T, Yamauchi T, Honma K, Nomura M: Characterization of three splice variants and genomic organization of the mouse BMAL1 gene. *Biochem Biophys Res Commun* 260:760-767(1999)