

論文内容の要旨

時計遺伝子の転写制御機構とその生理的意義に関する研究

山宿大介

概日リズムは生物の進化の中で獲得されてきた生理機能の一つであり、重要な意味を持つと推測される。哺乳類においても、睡眠、行動リズムなど様々な生体现象に約 24 時間のリズムが存在することが知られている。また、薬物代謝、薬物効果にも概日リズムがあり、医療の面からも大きな注目を集めている。本研究は、哺乳類における時計遺伝子の転写制御機構を解析することで、概日リズムの生理的意義の解明を目指した。

哺乳類における概日時計の中核は、視床下部の視交叉上核 (suprachiasmatic nucleus; SCN) に存在している。SCN の破壊によって睡眠覚醒や活動といった行動リズムが完全に消失することから中枢時計と呼ばれる。哺乳類では長年この SCN のみが概日時計を発振することができる唯一無二の器官であると考えられてきた。しかし、時計遺伝子の発見以降、分子レベルでの研究が進むにつれ、実際にはほとんどの臓器や組織に概日時計振動体が備わっており、それぞれの組織において時刻を刻んでいることが分かってきた。

概日時計の振動を生み出すメカニズムの中核は時計遺伝子と呼ばれる一連の遺伝子群の転写と翻訳を介したフィードバックループであると考えられている。哺乳類では bHLH 型転写因子である CLOCK と BMAL1 がヘテロ二量体を形成し、Per や Cry などネガティブ因子と呼ばれる遺伝子のプロモーター領域にある E-box に結合することで Per や Cry などの遺伝子発現を正に調節する。PER/CRY 複合体が CLOCK/BMAL1 による転写の活性化を解除し、自分自身の転写を抑制する。この繰り返しが約 24 時間の周期を作り出す。

このフィードバックループに加えて、時計遺伝子の応答配列、RRE と D-box を介した副次的ループも機能している。これらの配列が、個々の遺伝子の発現ピーク時刻を決定していると提唱された。Per1 と Per2 遺伝子プロモーターには、E-box(“朝”配列)と D-box(“昼”配列)がある。一方、Per3 遺伝子プロモーターには E-box(“朝”配列)はなく、D-box(“昼”配列)のみが存在し、これまでの設計原理においては、Per 遺伝子の中では、Per3 のピーク時刻が最も遅れるとされていた。筆者は、マウス個体の中枢および末梢組織における時計遺伝子の発現解析を実施し、Per 遺伝子の中では、Per2 のピーク時刻が最も遅いことを確認した。このことは、Per2 遺伝子プロモーターには、これまで明らかにされてこなかった位相を後退させる配列が存在する可能性を示唆していた。従来は、ゲノム情報から探索した時計応答配列を取り出し 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用されていた。本研究では、Per1、Per2 遺伝子の転写開始点上流の約-5,000bp まで含めてプロモーター解析を実施した。株化された培養細胞は、高濃度血清等で、概日リズムを惹起できることが知られている。それゆえ時計遺伝子のプロモーターにレポーター遺伝子を連結し、細胞に導入後、適切な刺激をすることで、時計遺伝子の動的な変動をリアルタイムで観察できる。レポーター遺伝子に易分解性の改変型ホタルルシフェラーゼを採用し、細胞と概日リズムを惹起する刺激薬剤の組み合わせを検討することで、僅か 1 時間程の位相差を検出できるまで実験精度を向上させた。Per2 遺伝子プロモーター解析においては、ピーク時刻の遅れに関与する新規配列 E'-box を同定した。従来は機能的でないと報告されていた D-box が振幅の増大に寄与していることも示した。このように、様々な時計応答配列の組み合わせによって、遺伝子発現の正確な時間的調節がなされていることを実験的に証明した(Fig.1)。

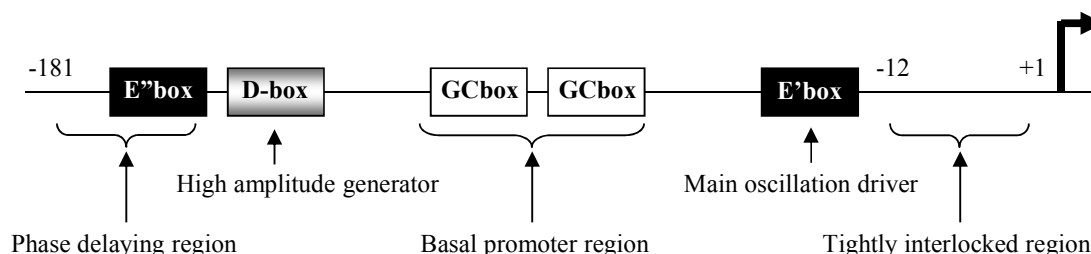


Fig1. 時計遺伝子 Per2 の発現を制御するシスエレメントの略図

時計の分子機構の中心となるのが、E-box を介した転写調節である。一方、細胞自律的な概日時計振動体における D-box 制御因子の役割は検証されていなかった。DBP に代表される PAR 型転写因子は D-box に結合して転写を促進する。同じ配列を介して抑制的に制御する転写因子が E4BP4 である。リアルタイムモニタリングシステムにおいて、DBP を siRNA によりノックダウンすると、周期が短くなった。DBP の過剰発現では、周期が長くなった。E4BP4 の制御は、DBP とは正反対の周期変動を引き起こした。以上の結果より、D-box 制御因子による D-box を介したシグナルの大きさが、周期の長さの決定に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

哺乳類の体内時計における次なる大きな課題は、如何にして肝臓などの末梢時計が制御されているのかということと、末梢時計の生理的意義や疾患との関連性を明らかにすることである。これらの課題を解決するために、代謝の中枢を担う肝臓の時計に着目した。食事のタイミングが肝臓時計を制御することは知られていたが、その同調因子は不明であった。今回の研究では、肝細胞の時計が、3次元培養することによりシャーレ上で長く維持されることも見出している。加えて、バイオイメージング技術を用いて、リアルタイムに肝細胞時計を観察することで、インスリンが同調因子として働いていることを証明した。実際には、時計遺伝子に易分解性の改変型ホタルルシフェラーゼレポーターをつないだ遺伝子を導入したラットから肝細胞を調製し、肝細胞を3次元培養させ、その光をリアルタイムで観察することにより、インスリンの同調作用を証明した。具体的には、「位相反応曲線」を示したため、同調因子であることが証明された。生物が持つ約24時間周期の概日時計の同調因子には二面性があり、例えば睡眠障害を強い光で治療する場合に、“朝”に強い光に当たると時計は早まるが、“夜”に強い光に当たると時計は遅れてしまう。つまり、同じ刺激でも時間帯によって逆の効果が出ることになる。このことを位相反応曲線が示されたという。これがあると同調因子であることがわかる。更に、動物個体においても、インスリンを欠乏させた糖尿病ラットを用いてインスリンの効果を検討したところ、やはり位相反応曲線が示され、動物個体でもインスリンが肝臓時計の同調因子であることが確認された(Fig.2)。

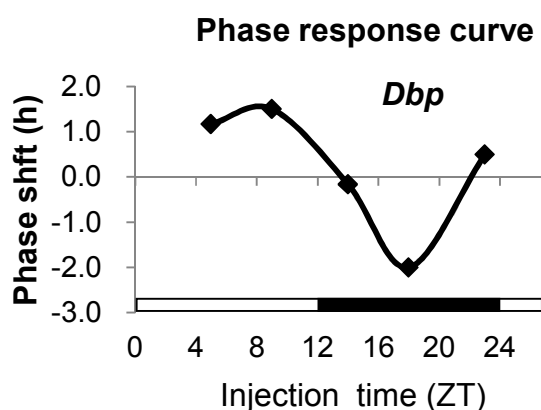


Fig.2 インスリンの投与時間による DBP 遺伝子発現の位相反応曲線

インスリンが肝臓の時計の強力な同調因子であることを考えると、摂食のリズムを壊すことにより、肝臓の時計が変調して、健康に対して何らかの影響が現れてくるのではないかと考えた。ラットの1日のエネルギー摂取量は変化させず、摂食リズムを壊して常に一定量ずつ摂食する条件下で、高コレステロール食を与えたところ、血中コレステロール濃度が増加することが明らかとなった。肝臓において、コレステロール異化代謝の律速段階の酵素、*CYP7A1*の遺伝子発現ピークが変動し、時計遺伝子についても異常なリズムを形成するようになった。摂食リズムが崩壊すると、食事のタイミングと肝臓時計のズレが生じて、代謝異常が引き起こされることが明らかとなった。(Fig.3)。

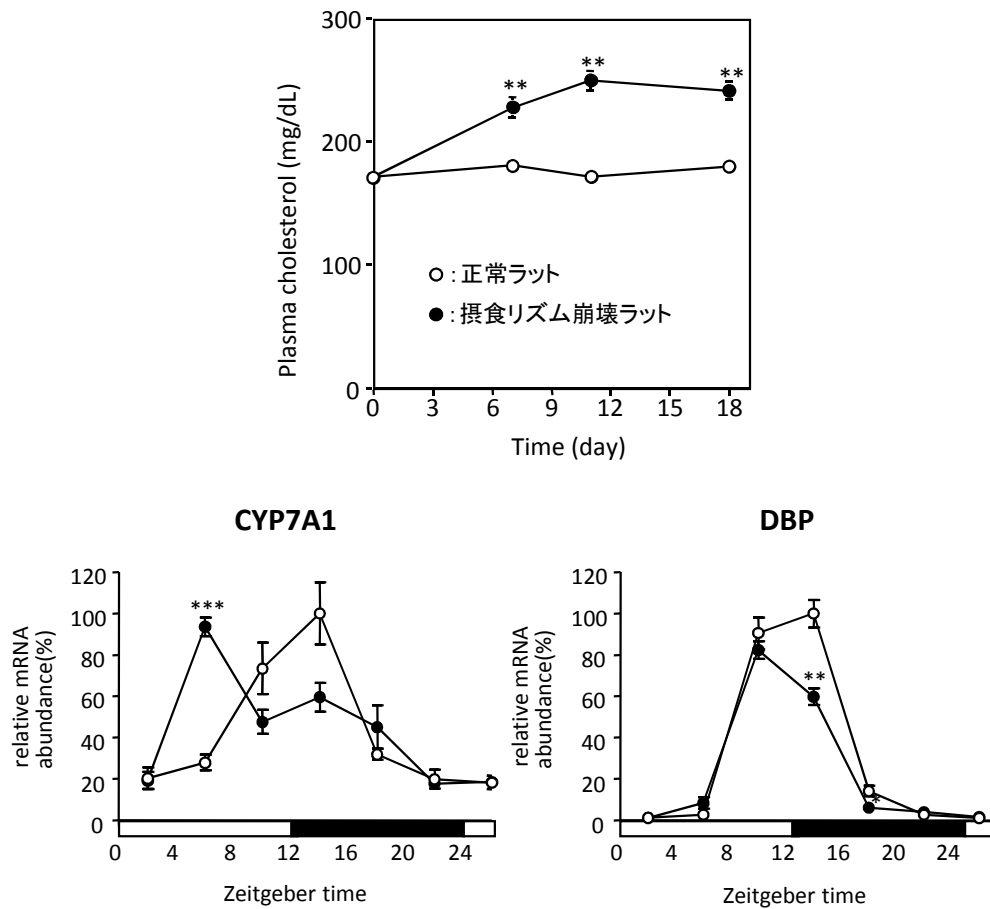


Fig. 3 摂食リズムの崩壊によって、血中コレステロール濃度が上昇し(上)、肝臓の時計遺伝子の発現が変調する(下)。

本稿の前半では、時計遺伝子の動的な発現変動を正確にリアルタイムで観察できる実験系を確立し、これまで提唱されてきた時計遺伝子転写制御ネットワークに修正を加えるべき発見をした。具体的には、位相の遅れに關与する新規配列や24時間の周期を制御する転写因子の同定である。後半では、リアルタイムモニタリングシステムと肝細胞の3次元培養を組み合わせて、世界で初めて、インスリンが肝細胞の同調因子として働いていることを証明した。このことは、食事がどのようにして末梢時計を制御しているかの問いに答えるものであった。更に、ラットの摂食リズムを壊すことにより、肝臓時計が変調し、代謝異常を引き起こすことも明らかにした。昔から、健康のためには規則正しい食生活が重要だといわれてきた。時間栄養学的アプローチは、その経験則を栄養学的に解明する糸口は示してくれた。「何を食べるか」と同時に「いつ食べるか」を考えることで、ライフスタイルと健康を分子レベルで解明することにつながると期待される。