

論文の内容の要旨

論文題目 時計遺伝子 Per1 と Per2 の協調による体内時計制御機構とその病的破綻

氏名 田宮 寛之

【背景】

概日時計 (Circadian clock) とは, ラテン語の Circa (約) と dian (1 日) という語源からきており, 約 1 日のリズムという意味である. 喘息発作は明け方に多く, 心筋梗塞は午前中に発症しやすいように, 様々な生理現象や疾患の症状には日内変動があり, これらは概日リズムの支配を受けている. 哺乳類概日リズムの本体は転写のネットワークであり, 約 20 の遺伝子群が互いに順序良く活性化, 抑制し合うようなネットワークである. これら 20 個の遺伝子のうち, 機能しなくなると概日リズムがなくなったり, 周期が変わったりする大事な遺伝子のことを時計遺伝子という. この中でも, 時計遺伝子 Per1 (Period homolog 1) と Per2 (Period homolog 2) は概日振動に必須の遺伝子であり, 光依存的な発現誘導が同調機構において重要な役割を果たしていると考えられているが, Per1 と Per2 の協調機構に関しては未解明な点が多い. 本研究では新たな実験系の構築とそれに基づく解析を行った.

【方法と結果】

まず, 視交叉上核での光刺激による概日リズムの位相応答においては cAMP (cyclic adenosine monophosphate) 経路が重要である. NIH3T3 線維芽細胞において cAMP 経路を刺激すると, Per1 mRNA 発現量は刺激直後に上昇し, すぐにベースラインへと戻るのに対し, Per2 mRNA 発現量は緩徐に上昇し, 上昇が持続するというように, 遺伝子発現パターンが異なっていた. このことに着目し, 非生理的な光条件下における Per1 と Per2 の役割を確かめるための実験を行った.

Per1/2 ダブルノックアウトマウスと野生型のマウスを交配し, Per1(+/-)Per2(+/-)マウスを用意した. 次にこれらのマウス同士を掛け合わせ 211 匹のマウスを得た. 全てのマウスの Per1, Per2 各々の遺伝子型を確認する事で, Per1 と Per2 の各々のシングルホモ, ヘテロノックアウトマウスを用意し, 非生理的な条件下での飼育を行った. 野生型 (WT), Per1(+/-), Per1(-/-), Per2(+/-), Per2(-/-) 各々の雄マウスを各 6-10 匹恒常明条件下で 2 週間飼育したところ, Per1(-/-) の周期長が 27.9 時間, Per1(+/-) が 26.6 時間, WT が 25.4 時間, Per2(+/-) が 24.9 時間, Per2(-/-) が 22.8 時間であった. 即ち恒常明条件下での周期長は Per1 と Per2 の量比に依存しており, Per1 には短周期親和性 (遺伝子数が増加すると周期が短くなる), Per2 には長周期親和性 (遺伝子数が増加すると周期が長くなる) があつた. また, 長期間の恒常明条件下では無周期化が起こることが知られているが, WT, Per1(-/-), Per2(-/-) の雄マウスを 12 匹ずつ 4 週間恒常明条件下で飼育し, 多くのマウスで無周期化が起こるとされる 2 週間後から 4 週間後の行動リズムの周期性を定量したところ, WT のマウスでは周期性がほぼ消失していたの

に対し、Per1 (-/-), Per2(-/-)の各々のマウスでは、周期性が残存していた。即ち、恒常明条件下での周期性消失は Per1, Per2 の片方が完全にないと起こりにくい事が示された。次に、個々の遺伝子型のマウスの緩徐な光変化に対する応答性を確認する為、12 灯用 LED 光照度制御装置を開発し、1 分間隔の時間解像度で 256 段階の任意のパターンの光をマウスに照射した際の概日リズム応答を、赤外線センサーを用いて検出可能な系を構築した。この装置を用いて WT, Per1(-/-), Per2(-/-)の各 6 匹の雄マウスに対し、22 時間から 27 時間周期の 1 時間間隔の緩徐に変化する光を各々 2 週間ずつ照射したところ、23, 24, 25 時間周期の光には WT, Per1(-/-), Per2(-/-)のすべてのマウスが同調できたのに対し、22 時間周期では Per2 (-/-)のみが同調可能であり、26, 27 時間周期では Per1(-/-)のみが同調可能であった。即ち、WT と比較して Per1(-/-)は長周期側に、Per2(-/-)は短周期側に同調可能な周期の幅が広がった。また、最も同調出来る周期長の範囲が 24 時間周囲に限定されているのが WT であり、Per1 と Per2 は協調して働いている事が示された。総じて、短周期親和性の Per1 と長周期親和性の Per2 は協調し、強固な 24 時間のリズムを刻むのに役立っており、非生理的な環境条件下において概日周期長を 24 時間に限定する役割を持っている反面、Per1 と Per2 の協調した状態では外環境への適応の柔軟性が低く、非生理的条件下では病的破綻(外環境への追従不能や無周期化)しうると考えられた。

次に Per1 と Per2 の協調性を細胞レベルで検出し、より詳細なメカニズムを解明するため、細胞レベルの Per2 ノックアウトレスキュー系の構築を行った。まず、ES 細胞は概日リズムを持っていないがレチノイン酸を用いて分化誘導をすると概日振動が発現することが報告されている事に着目し、この実験プロトコールの様々なパラメータを幅広く条件検討した。その結果、ES 細胞から最大 10 周期分の明瞭な発光の概日振動を検出し、小さな誤差で周期を測定可能な実験プロトコールを確立した。次に、Per2 ノックアウト ES 細胞の第 6 染色体 Rosa 26 に Per2 遺伝子のターゲティングベクターを用いて挿入した。具体的には Rosa 26 の long arm 4 kb (kilobase), short arm 4 kb の間に、Per2 プロモーター 3.5 kb の下流に Per2 と Luciferase の融合蛋白をコードする翻訳領域の入ったベクターを、Rosa 26 を切断可能な TAL effector nuclease (TALEN) のベクターと共にリポフェクションすることによって導入し、薬剤選択を行い、顕微鏡下でマイクロピペットを用い単離することで、ES 細胞のクローンを複数得た。その ES 細胞のゲノムに対し、Rosa26 の Targeted arm, WT arm 各々の 5' 側, 3' 側の計 4 か所の PCR と薬剤耐性遺伝子の定量的 PCR を行うことで、1 コピーが Rosa26 の片方の遺伝子座に正確に導入された ES 細胞クローンを複数得る事に成功した。これらの ES 細胞を分化誘導することで、独立した 2 つの ES 細胞クローンで約 24 時間周期の振動を検出する事に成功した。更に、Per2 が原因遺伝子である睡眠相前進症候群(familial advanced sleep phase syndrome: FASPS)の変異体 (S659G) を導入すると、独立した 2 つの ES 細胞クローンで約 20 時間周期の概日振動が検出され、個体同様に周期短縮が見られることを確認し、FASPS 変異体の周期短縮を細胞レベルで再現することに成功した。更に、この実験系で既知の 2 つの変異体 (mut6 変異体: S662A/S665A/S668A/S670A/S671A/T672A, β -transducin repeats-containing proteins (β -TrCP) 結合部位変異体: S477A/G479A)を確認したところ、 β TRCP 変異体では大きな周期変化が見られな

いのに対し、mut6 変異体では FASPS とほぼ同程度の周期短縮が観察され、この実験系は FASPS 以外の変異体の評価にも使用可能な汎用性の高い実験系である事が分かった。この実験系において Per2 の翻訳領域を導入しない対照では、振動が弱く周期長も短い為、Per2 と Per1 の協調性は細胞レベルでも重要である事が示唆された。次に、Per2 プロモーター下に Per1 と Luciferase の融合遺伝子をコードする翻訳領域を導入したところ、振動はするものの 1 時間以上の周期短縮が見られ、Per1 の短周期親和性、Per2 の長周期親和性は蛋白レベルの違いによるものである事が示唆された。

従来 PER1 と PER2 の蛋白は振動に対する役割は同じであると考えられており、翻訳領域の違いはあまり注目されていない。従ってこれらの PER1 蛋白と PER2 蛋白の翻訳領域の違い、ひいては短周期、長周期親和性の違いがどのようなメカニズムによるものかを確認する為に、NIH3T3 線維芽細胞を用い、細胞内での半減期を測定する実験を行った。FASPS 変異体は PER2 の野生型と比較して半減期が短い事が複数のグループより報告されており、半減期は周期長を反映するものと考えられている。実際、NIH3T3 に PER2 蛋白の野生型と PER2 蛋白の FASPS 変異体に Luciferase を融合したプラスミドをトランスフェクションし、翻訳阻害剤であるシクロヘキシミドを添加して半減期を測定したところ、PER2 の WT は半減期が 200 分程度であったのに対し、PER2 の FASPS 変異体は半減期が 160 分程度であり、半減期の短縮が見られた。一方、この実験系において PER1 は予想に反し、半減期が 260 分程度と長かった。これは PER1 の短周期親和性のメカニズムと FASPS の周期短縮のメカニズムは独立のメカニズムによるものである事が示唆される。更に予備的な実験ではあるが、N 末 Per1、C 末 Per2 のキメラ蛋白を用いた実験により、この上記の違いは PER1 と PER2 の N 末 50 アミノ酸の領域に由来する可能性が示唆された。現在、N 末 Per2、C 末 Per1 の半減期の評価などを行い、PER1 蛋白と PER2 蛋白の機能の違いのメカニズムを詳細に解析中である。

また、視交叉上核で発現の高い Sox9 を NIH3T3 線維芽細胞でノックダウンすると、内因性の Per1 の発現量に影響なく Per2 の発現量を減少させることができることを示した。

【結論と考察】

短周期親和性の PER1 蛋白と長周期親和性の PER2 蛋白は協調し、非生理的な環境条件下において概日周期長を 24 時間に限定する役割を持っている反面、低柔軟性のため病的破綻(外環境への追従不能や無周期化)しうる事を示した。また、実験系の開発の観点からは、任意のパターンの光を照射した際の個体レベルの概日リズムが測定可能な 12 灯用 LED 光照度制御装置、細胞レベルで正確に周期長を測定可能な ES 分化誘導系、FASPS 変異体の周期短縮を初めて細胞レベルで再現可能な Per2 ノックアウトレスキュー系の 3 つの新しい実験系を構築することにより、Per1 と Per2 の協調性の重要性を個体レベルと細胞レベルで証明する事が可能となった。

かつて哺乳類は地球上の定点で暮らし、人工的な光も存在しない生活をしてきており、24 時間の外環境の周期にのみ同調できれば問題はなかった。従って、PER1 と PER2 が協調して強固なリズムを刻み、刺激に対して頑健なシステムがあった方が、昼夜の環境変化を予測でき、

生存に有利であるため、このような形のシステムに進化してきたのだと考えられる。しかし、現代社会においては、街には一日中光が灯り続け、また飛行機などの高速交通手段やシフトワーカーなどの勤務形態の出現により、この低柔軟性が仇となり病的破綻しうるようになってきていると考えられる。従って、現代社会においては、PER1 と PER2 を独立に制御し量比をコントロールする事で、シフトワーカーや時差ぼけ、夜間せん妄における概日リズム破綻の治療になりうるのではないかと考えられる。Sox9 は Per2 の発現を独立に制御可能であり、こういった遺伝子が治療薬のターゲットとなると期待される。

尚、本研究の新規性としては、1) Per1 の短周期親和性、Per2 の長周期親和性という概念、2) PER1 蛋白と PER2 蛋白の周期長親和性の違い（PER1 が増えると周期が短くなり、PER2 が増えると周期が長くなる）を示した点、3) 短周期親和性のものと長周期親和性のものが協調して24時間に”限定”するという概念の3点があげられる。