

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：13301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24810009

研究課題名(和文) 時計遺伝子 *Period* の転写制御に関する新たなフィードバック機構の解析研究課題名(英文) Functional analysis of a transcriptional feedback loop related to a mammalian clock gene, *Period*

研究代表者

高畑 佳史 (Takahata, Yoshifumi)

金沢大学・自然システム学系・助教

研究者番号：60635845

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：時計遺伝子 *Period* の転写制御に関する新たなフィードバック機構について探索を行った。その結果、*Period2* と相互作用する新規転写因子を発見し、この新規転写因子は E-box を介した *Bmal1/Clock* による転写活性化を抑制することを明らかにした。さらに、この新規転写因子は *Period2* タンパク質の核内移行を促進させることや、Casein kinase 1 により導かれる分解を抑制する事を明らかにした。これらの結果から、今回同定した新規転写因子は *Per2* との結合を介して新たな転写制御機構に関与する事が推察される。

研究成果の概要(英文)：We investigated a novel function of transcriptional feedback loop relevant to a mammalian clock gene, *Period*. Here, we report that a new transcription factor was identified as physically binding with *Per2*, and the transcription factor inhibited E-box regulated transcriptional activity by *Bmal1/Clock*. Further, we found that the transcription factor accelerated nuclear translocation of *Per2*, in addition inhibited *Per2* degradation induced by casein kinase 1. Accordingly, the transcription factor could play a role as a novel function of transcriptional regulation through the direct interaction with *Per2*.

研究分野：総合生物

科研費の分科・細目：ゲノム生物学

キーワード：時計遺伝子 *Period* サーカディアンリズム

1. 研究開始当初の背景

地球上の多くの生物には、睡眠覚醒や体温、血圧、ホルモン合成や免疫機能など様々な生理現象を支配する約 24 時間周期の概日リズムが見出される。これは、遺伝的に決定された生物種固有のリズムを刻む内因性の体内時計が存在するためである。体内時計は、生物に環境変化に対する予期行動を可能にし、生体内の活動を環境変化に予め合わせていく環境適応の仕組みとして備わっていると考えられる。

体内時計は以下の特性を持つ。(1)恒常条件下で約 24 時間のリズムを継続する自律性 (2)明暗条件などの外部環境に対してリズムを同調させる同調性 (3)環境の温度変化によって周期に影響を受けない温度補償性すなわち体内時計は、恒常条件においても自律的に時を刻み、光などの環境の入力の周期的変化に対して位相(時計の針)を合わせることができる。そして、一般的に生化学的な反応は温度と反応速度に正の相関が見られるのに対して、生化学反応で組み立てられたネットワークを基盤としているはずの体内時計の速度は温度変化に依存せず時計の進行速度を安定に維持する仕組みが備わっている。視床下部に存在する視交叉上核(SCN)を破壊した動物では活動・生理学的リズムが消失した (Moore et al., 1972) 事から、SCN が概日時計中枢組織として機能する事が明らかとされた。

哺乳類の概日リズム形成には、SCN において複数の時計遺伝子が位相の異なる 24 時間周期の発現リズムが機能する。明期性発現遺伝子の転写誘導には、プロモーター上に存在する転写因子結合配列である E box に、CLOCK/BMAL1 複合体が結合する事が必要であり、その後の転

写抑制には、CLOCK/BMAL1 によって誘導される PERIOD (Per) / CRYPTOCHROME (Cry) 複合体が転写抑制因子として機能する。すなわち、概日リズム発振にはこの二つの制御機構の連続サイクルからなる転写・翻訳の負のフィードバック機構が必須である。

しかし、実際に我々の予備実験によると、時計遺伝子 PERIOD1 (Per1)のプロモーターにルシフェラーゼを連結させたレポーター遺伝子 (*Per1::luc*)を用いてレポーターアッセイを行い、CLOCK/BMAL1 によって誘導されたルシフェラーゼ活性は Cry1 だけの導入で十分に抑制された。Per 遺伝子の変異体は確かに顕著な行動リズム異常を示し、従来までは Cry と相互作用する事のみ機能が注目されてきたが、Per の機能はそれ以外にも存在する事が考えられる。

一方で、暗期性の振動を示す BMAL1 遺伝子プロモーター上には高い頻度で RORE と新規配列が存在している事実を我々は見出した。そこで本研究では、BMAL1 プロモーター上の新規配列に結合する転写因子を同定し、Per 遺伝子の転写制御に対する役割や新たな転写ネットワークの存在を見出す事を目的とする。

2. 研究の目的

本研究では、時計遺伝子 Period の転写制御に関する新たなフィードバック機構の可能性を検討し、この研究成果を通じて、概日リズム発振機構と細胞間同調機構の解明を追求することである。哺乳類の体内時計の振動の自律性は、時計遺伝子群の機能に依存した複数の転写のネガティブフィードバック機構を基盤として見出す事が明らかとされているが、現在

知られている転写フィードバック機構の解析だけでは概日リズム発振の分子機構を過不足なく説明する事はできない。本研究では時計遺伝子 Period をターゲットとして、新たな転写制御機構を発見し、生物の行動を支配するシステムを明らかにする。

3. 研究の方法

【A: Per1::lucを用いた各種時計遺伝子の転写制御機構】時計遺伝子 PERIOD1(PER1)のプロモーターにルシフェラーゼを連結させたレポーター遺伝子 (Per1::luc)を HEK293T細胞に遺伝子導入を行い、さらに各種時計遺伝子 Per2, Cry1, CK1 ϵ および BMAL1 プロモーター上に結合する新規転写因子も同時に遺伝子導入することで、Bmal1/Clock 複合体による Per1::luc 誘導活性に与える影響をレポーターアッセイを用いて検討する。

【B: 時計遺伝子間の分子間相互作用の検討】各種時計遺伝子 Per2, Cry1, CK1 ϵ および新規転写因子の分子間相互作用を検討するため、免疫沈降法により解析を行う。

【C: CK1 ϵ による PER の翻訳後修飾】CK1 ϵ は Casein Kinase 1 ファミリーの一種であり、セリン・スレオニンをリン酸化し、シグナル伝達において重要な役割を担う事が知られている。新規転写因子を含め Per2, Cry1 が CK1 ϵ によってリン酸化を受けるのかどうかを Western blotting 法を用いて検討し、さらにリン酸化を受ける時計タンパク質の細胞内安定性について検討するため半減期の測定を行う。

【D: SiRNA を用いた解析】新規転写因

子が Per1 発現振動に与える影響をさらに解析するため、Per1::luc を安定的に発現させた SCN 由来細胞株に新規転写因子をターゲットにした SiRNA を導入し、リアルタイムルシフェラーゼアッセイを行い、Per1 発現の位相変化を Control 群と比較する。

4. 研究成果

まず、暗期性の振動を示す BMAL1 遺伝子のプロモーター上には高い頻度で RORE と新規配列が存在している事実を我々は見出し、この新規配列に結合する転写因子に着目した。時計遺伝子 Per1 などの E-box を介した Bmal1/Clock による転写誘導能はこの新規転写因子と Per2 を共発現させることにより抑制されることが明らかとなった。また免疫沈降法を用いて、この新規転写因子が各種時計遺伝子と相互作用するかどうかを評価した結果、Per2 と相互作用する事が明らかとなった。一方でこの新規転写因子は Bmal1, Clock, Cry などの時計タンパク質との相互作用は検出できなかった。

また、この新規転写因子と Per2 の相互作用による細胞内タンパク質の局在変化について検討したところ核画分における Per2 の発現が劇的に増加する事が明らかとなった。

さらに、タンパク質の半減期を測定する事で、CK1 ϵ による Per2 のリン酸化を伴う分解促進は新規転写因子により抑制されることが明らかとなった。

これらの結果から、新規転写因子が Per2 との相互作用を介して、転写制御に関する新たなフィードバック機構を担う分子であることが示唆される。本研究の遂行は、現在まで認められていた PER と

CRYの相互作用によりBMAL1の転写を抑制するといった既成概念から脱却し、時計遺伝子Periodの新規機能を提唱している観点から、他に類を見ない斬新性を有し、現在原著論文に投稿するべく準備している最中である。本研究課題遂行により明らかとなった知見の生理学的役割を解明する事で、新たな体内時計調節機構を理解するのみならず、時差ぼけ、リズム障害による睡眠障害などの診断や対象薬の開発、治療戦略、予防対策発見の糸口につながる可能性もあり、臨床的な面においても大きな寄与が期待できる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計1件)

第36回分子生物学会年会

2013年12月3日—6日

Functional analysis of transcriptional regulation of a mammalian clock gene, *Bmal1*.

Yuki Ohba, Ken Matsumoto, Yoshifumi Takahata, Yoshiaki Fujii-Kuriyama and Hajime Tei.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

高畑 佳史 (TAKAHATA Yoshifumi)

金沢大学・自然システム学系・助教

研究者番号：60635845

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし