

令和 4 年 5 月 11 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06769

研究課題名(和文)哺乳類の概日リズムにおける時計遺伝子転写振動の役割に関する研究

研究課題名(英文)The role of cell-autonomous circadian oscillation of clock gene transcription in circadian rhythm generation

研究代表者

明石 真 (Akashi, Makoto)

山口大学・時間学研究所・教授

研究者番号：30398119

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：CryとPerの両遺伝子における細胞自律的な転写リズムが概日時計の振動中枢だと考えられてきたが、この転写リズムが概日時計の機能発現に不可欠か否か不明なままだった。今回、Cry遺伝子の細胞自律的な転写リズムを停止させて概日時計への影響を調べた。その結果、Cry遺伝子の細胞自律的な転写リズムが失われても、個体や組織の概日時計は堅牢に機能していた。さらに、細胞自律的なレベルではCry遺伝子の転写リズムの停止によってPer遺伝子の転写リズムも停止するにもかかわらず、Per2タンパク質において量的な概日リズムが保たれており、これは同タンパク質の半減期における概日リズムによって生じていることを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CryやPer遺伝子の転写リズムは概日リズム発現に必須か、という概日時計分子モデルにおける根本的な問いを解決する研究報告は存在していなかった。したがって、今回の研究成果は哺乳類の概日時計分子メカニズムの理解に大きく貢献するものである。想定通り、この転写リズムの停止によって概日リズムが明確に失われた場合、従来の概日時計分子モデルの信頼性は強く支持される。しかし、今回の結果では、これらの転写リズムの停止によって細胞や個体の概日リズムが失われなかったため、従来の分子モデルは不完全なものであることが強く示唆された。したがって、概日時計分子メカニズム研究において、重要な方向転換をもたらす成果だと言える。

研究成果の概要(英文)：The current model for the mammalian circadian clock describes cell-autonomous and negative feedback-driven circadian oscillation of Cry and Per transcription as the core circadian rhythm generator. However, the actual contribution of this oscillation to circadian rhythm generation remains undefined. Here, we perform targeted disruption of cis-elements indispensable for cell-autonomous Cry transcriptional oscillation. Mice lacking overt cell-autonomous Cry transcriptional oscillation show robust circadian rhythms in locomotor activity. In addition, tissue-autonomous circadian rhythms are robust without overt Cry transcriptional oscillation. Unexpectedly, while the absence of overt Cry oscillation leads to severe attenuation of Per oscillation at the cell-autonomous level, circadian rhythms in Per2 protein accumulation remain robust. As a mechanism to explain this, Per2 protein half-life shows cell-autonomous circadian rhythms independently of Cry and Per transcriptional oscillation.

研究分野：環境生理学

キーワード：概日時計 概日リズム 時計遺伝子

1. 研究開始当初の背景

ほとんど全ての生物は行動生理機能において概日リズムを有しており、この自律的なリズムは概日時計(約24時間周期の体内時計)によって制御されている。概日時計のリズム発信機構には「時計遺伝子」が関与することがよく知られている。

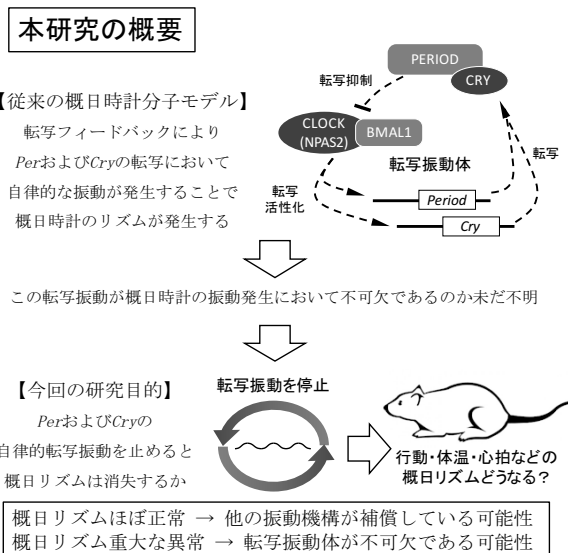
哺乳類における概日時計分子メカニズムの研究は、1997年に時計遺伝子 *Period1* および *Clock* がクローニングされてから急速に進み、1999年には分子モデルが提唱された。すなわち、時計転写因子(BMAL1とCLOCK)が時計転写抑制因子(PeriodとCryptochrome)の発現を活性化して、これにより発現した時計転写抑制因子が時計転写因子を阻害する、という転写の負のフィードバックモデルである(右下図を参照)。すなわち、このモデルは、「時計転写抑制因子をコードする遺伝子群(以下、抑制型時計遺伝子群と呼ぶ)の自律的転写リズムこそが概日時計の振動発生源である」ということを意味する。さらに過去へ遡ると、このモデルはショウジョウバエの遺伝学的研究によって1984年に発表された仮説に基づいたものである(この成果は2017年にノーベル医学生理学賞の受賞理由となっている)。

しかしながら、これまでの膨大な研究成果によって「抑制型時計遺伝子群の転写リズムが発生するメカニズム」について詳細に解明されてきたが、「この転写リズムが概日リズムの発生において不可欠である」という証明は為されていない。したがって、転写リズムは概日リズムの堅牢性に貢献している、概日リズムの発生において不可欠ではない可能性が残されている。例えば、転写とは独立して、転写後制御によって概日振動が形成されている可能性がある。このような可能性が残されている限り、従来分子モデルが正しいと結論づけることはできない。

2. 研究の目的

概日リズムの発生において時計遺伝子の自律的転写リズムは不可欠であるのか否か、という問いは概日時計分子モデルの根幹に関わる解決すべき問題である。そこで、本課題では、抑制型時計遺伝子群の自律的転写リズムを制御するシス配列を破壊することで、同遺伝子群の転写リズムの概日リズムにおける必須性を、細胞および個体レベルで検証することにした。

これまでこの問題に着目した報告はわずかである。従来モデルがほぼ完成されたものとして、研究対象になっていないことが理由かもしれない。しかし、哺乳類の時計遺伝子が発見されて以降、研究代表者は概日時計分子メカニズムの研究を継続してきたが、従来モデルが十分な検証によって完成されたとは考えていない。実際矛盾点も多く見つかっており、とりわけ抑制型時計遺伝子群の自律的転写リズムの不可欠性は誰も示していない。今回の研究はこの不可欠性を明確にすることを目的として実施された。ただし、この検証には、基本転写量を損なわずに転写リズムのみを停止させる必要がある。例えば、遺伝子ノックアウトでは発現そのものが消失するため、自律的転写リズムの必要性を論じることはできない。そこで、上述したように、本研究では、ゲノム編集を利用して概日転写調節配列(シス配列)のみを破壊することで目的を達成することにした。



3. 研究の方法

今回の研究では概日時計に必要な抑制型時計遺伝子「*Cryptochrome (Cry)*」を標的とした。この遺伝子産物は主要な時計転写抑制因子であり、従来モデルが正しいならば、*Cry*の転写リズムの停止は転写フィードバックシステムによる概日リズム発生に重大な問題を起こすはずである。そこで、まず、*Cry*遺伝子の転写リズムに必須の概日転写調節配列を同定することにした。そして、この配列をゲノム編集によって特異的に破壊した細胞株を作成することで、細胞自律的な概日リズムに及ぼす影響を検討した。さらに、個体レベルにおいても、この破壊がもたらす概日リズムへの影響を検討した。具体的には、細胞実験同様に *Cry* 遺伝子の概日転写調節配列が破壊されたマウスを作成し、自発行動量などにおいて概日リズム解析を実施した。抑制型時計遺伝子群の転写リズムが失われても個体の概日リズムが検出されるならば、*Cry* 遺伝子の転写リズムは概日時計の中心的な振動発生源ではないと結論づけることができる。

4. 研究成果

哺乳類では、負のフィードバック機構によって生み出される「*Cryptochrome (Cry)* と *Period*

(*Per*)の両遺伝子における細胞自律的な転写の概日リズム」が、概日時計の振動中枢メカニズムだと考えられてきた。しかしながら、両遺伝子が概日時計の機能発現に不可欠であることは遺伝子ノックアウトの研究により明確であったが、これらの細胞自律的な転写リズムが本当に概日時計の機能発現に必要なか否かは不明なままだった。

そこで、今回の研究では、*Cry* 遺伝子の細胞自律的な転写の概日リズムに不可欠なゲノム領域を特定して、これを破壊することにより同リズムが概日時計の機能発現に不可欠か否かを検証した。その結果、*Cry* 遺伝子の細胞自律的な転写リズムが失われても、個体や組織の概日リズムの周期は長くなるものの、概日時計は堅牢に機能していることが確認された(図1および2)。

重要なことに、細胞自律的なレベル(分散培養下の細胞)では、*Cry* 遺伝子の転写リズムの停止によって *Per* 遺伝子の転写リズムも停止しているにもかかわらず、*Per2* タンパク質において量的な概日リズムが保たれていることがわかった。そして、私たちは、この転写に依存しない *Per2* タンパク質の概日リズムは、*Per2* タンパク質の半減期制御における細胞自律的な概日リズムによって生じていることを発見した(図3)。

以上から、本研究成果によって、*Cry* と *Per* の両遺伝子における細胞自律的な転写リズムは概日時計の機能発現において不可欠ではなく、これらの転写リズムの消失に対して *Per* タンパク質の細胞自律的な概日リズムが補償的に作用することで概日時計の機能が維持されることが明らかになった。

<成果のイメージ(右下の図)>

Cry E-box 変異型とは、*Cry* 遺伝子の転写開始点上流に位置する転写調節シスエレメントである E-box がゲノム編集によって破壊された細胞やマウスのことを意味する。この E-box が破壊されると、*Cry* 遺伝子のみならず *Per* 遺伝子の発現においても細胞自律的な概日リズムが失われる。しかし、*Per* タンパク質の半減期制御において概日リズムは維持されており、結果として、*Per* タンパク質の存在量においても概日リズムが維持されることから、行動生理機能に関連する遺伝子群における発現の概日リズムも少なくとも部分的には維持される。その結果、*Cry* と *Per* 遺伝子の細胞自律的な転写リズムが失われていても、周期は長くなるものの、細胞から個体のレベルに至るまで概日リズムは維持される。

...

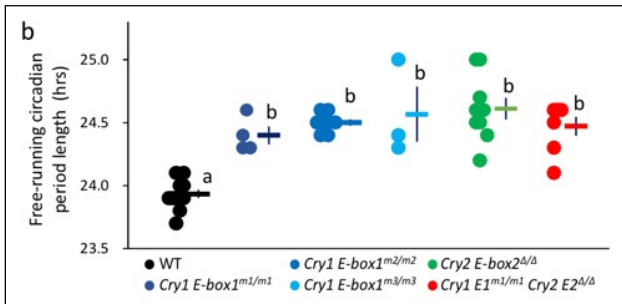


図1 *Cry* E-box 変異マウスの自発行動量の概日リズム周期解析
細胞自律的な *Cry1* や *Cry2* の転写リズムが失われていても、マウス個体の概日リズムは堅牢に維持されている。自発行動量の概日リズム周期解析を実施すると、どの変異体マウスにおいても約0.5時間の概日リズム周期の延長が検出された。

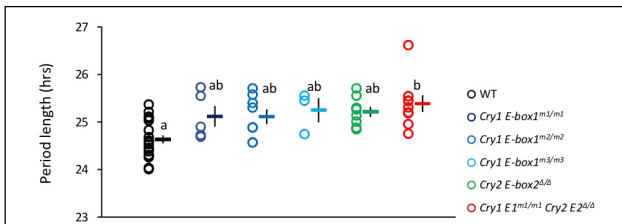


図2 *Cry* E-box 変異マウスの視交叉上核の概日リズム周期解析
細胞自律的な *Cry1* や *Cry2* の転写リズムが失われていても、培養下の視交叉上核において概日リズムは堅牢に維持されている。*Per2* 遺伝子座に *Luciferase* をノックインしたマウスを用いて発光の概日リズム周期解析を実施したところ、どの変異体マウスにおいても約0.5時間の周期延長が検出された。

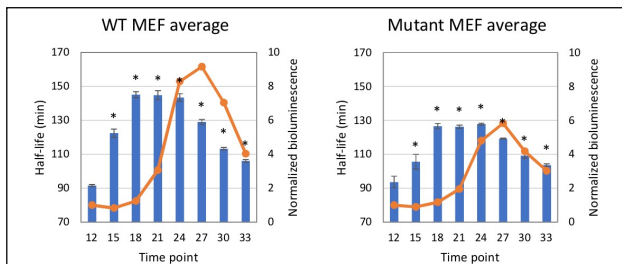
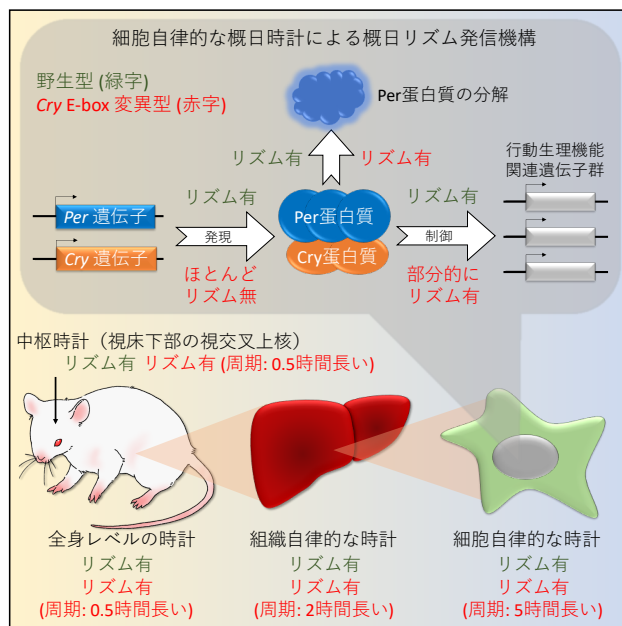


図3 *Cry* E-box 変異マウスの胚性繊維芽細胞 (MEF) を用いた、*Per2* タンパク質における半減期の概日リズム
細胞自律的な *Cry* や *Per* の転写リズムが失われていても、培養下の MEF において *Per2* タンパク質における半減期の概日リズムは堅牢に維持されている(棒グラフ)。MEF は *Per2* 遺伝子座に *Luciferase* をノックインしたマウスを用いて作成されており、シクロヘキシミド投与後の発光の減衰をリアルタイム測定することで *Per2* の半減期を決定することができる。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|--|-------------------------------|
| 1. 著者名 Matsumura Ritsuko, Yoshimi Kazuto, Sawai Yuka, Yasumune Nanami, Kajihara Kohhei, Maejima Tatsuya, Koide Tsuyoshi, Node Koichi, Akashi Makoto | 4. 巻 39 |
| 2. 論文標題 The role of cell-autonomous circadian oscillation of Cry transcription in circadian rhythm generation | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Cell Reports | 6. 最初と最後の頁 110703 ~ 110703 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2022.110703 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計1件

| | |
|--------------------------------------|-----------------|
| 1. 著者名 山口大学時間学研究所、時間学の構築編集委員会、明石真 | 4. 発行年 2019年 |
| 2. 出版社 恒星社厚生閣 | 5. 総ページ数 196 |
| 3. 書名 ヒトの概日時計と時間 | |

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|