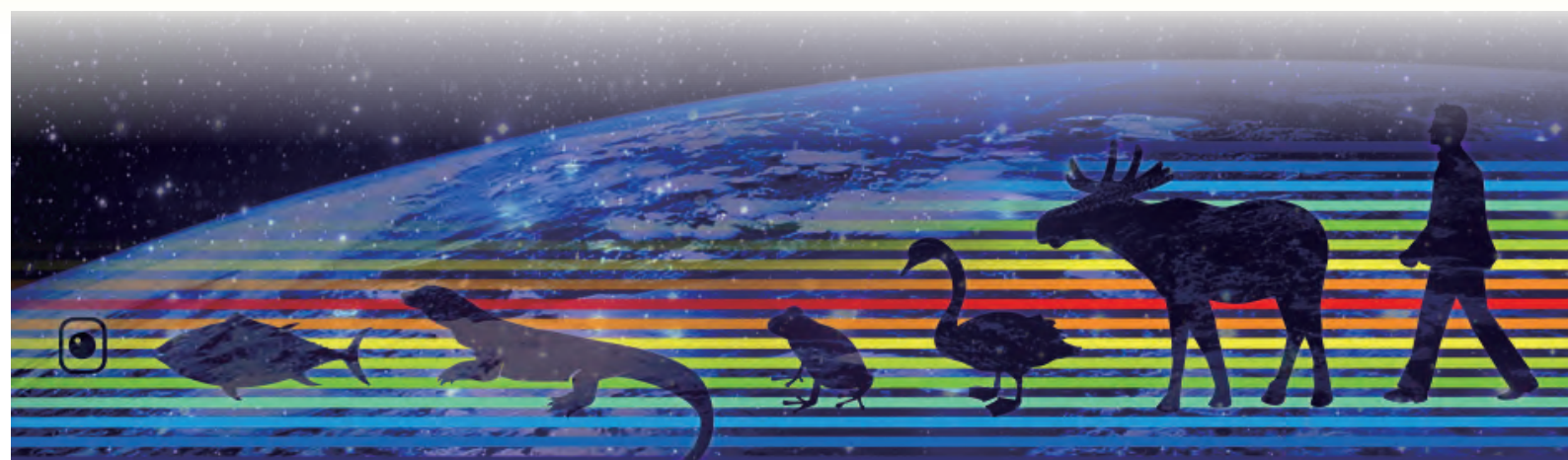


文部科学省科学研究費補助金「新学術領域研究（研究領域提案型）」

温度を基軸とした生命現象の統合的理解（温度生物学）

Thermal Biology Newsletter No.7



行動・基礎体温の日内リズムの維持に必要な時計遺伝子の転写調節シスエレメント

京都大学大学院 薬学研究科 医薬創成情報科学講座 教授
土居 雅夫



はじめに

生物の設計図であるゲノムには蛋白質をコードする領域とコードしない領域があり、後者をノンコーディング領域と呼びます。ノンコーディング領域のDNA配列は生物の発生や進化の過程で重要であることは示されていましたが、発生の段階を過ぎた成体において個体レベルの動的制御にどの程度の寄与を有するのかわかりませんでした。このような中、我々は、時計遺伝子の5'上流ノンコーディング領域のシスエレメントが動物個体の概日リズムの維持に必須であることを示しました

(1)。具体的には、体内時計の振動形成の中核機能を担うと考えられる*Period2*遺伝子(以下*Per2*)の5'上流プロモーター領域に存在するシスエレメントE'-boxに点変異を導入したマウスを*PiggyBac*トランスポゾン法を用いて作製し、当該エレメントがマウス成体において正常な行動と基礎体温の概日リズムの維持に不可欠であることを明らかにしました。蛋白質をコードしないDNA配列の成体における役割を日々の活動レベルで明らかにした初めての成果だといえます。

時計遺伝子5'上流ノンコーディング配列に点変異をもつマウスを作成する意義

人類を含む地球上のほぼ全ての生物は体内時計をもち、地球の自転にともなう環境の変化に応じて活動量や体温などの生理機能を24時間周期でリズムに変化させます。このリズムは、時計遺伝子の5'上流ノンコーディング領域のシスエレメントが仲介する転写レベルのフィードバックループによって成立すると考えられています

(2017年ノーベル生理学・医学賞：体内時計を生み出す遺伝子機構の発見)。しかしながら、このモデルの論理的根拠は時計遺伝子の蛋白質コーディング領域を欠落させた遺伝学的見地に基づいており(2)、実際にノンコーディング領域のシスエレメントを介したフィードバックループが生体のリズム形成に不可欠であるかどうかは当該分野の大きな謎でした。シアノバクテリアにおいては転写を阻害しても時計蛋白質のリン酸化が概日変動を示すことや(3)、ヒトにおいても脱核転写が行われない細胞である赤血球が酸化還元反応において概日リズムを示すことが報告され、従来のモデルに合わない分子時計機構の存在が議論され始めていたからです(4、5)。

このような中、我々は今回、時計遺伝子のフィードバック制御の要となるシス制御エレメントがマウス個体の自発活動および

基礎体温の安定的な日内変動の維持に必須であることを明らかにしました(1)。具体的には、哺乳類の体内時計の振動形成の中核機能を担うと考えられている*Per2*遺伝子の5'上流プロモーター領域に存在するシスエレメントE'-boxに点変異を導入したマウスを*piggyBac*トランスポゾンを用いた特殊なDNA改変技術を駆使して作出しました(図1)。本稿ではこの*Per2* E'-box点変異マウス(以下、*Per2* E'^{m/m}マウスとよぶ)を用いた研究の成果を紹介します。

Per2 E'-boxは細胞自律的な概日振動の生成に必須である

最初に、末梢組織から採取した初代培養細胞を用いて時計遺伝子の発現リズムをmRNAおよび蛋白質レベルにおいて追跡し、細胞自律的な概日リズム形成における*Per2* E'-boxの役割を調べました(図2)。具体的には、野生型マウスと変異マウスの肺の線維芽細胞を培養し、デキサメサゾン投与による細胞時計のリセットを行った後、4時間ごとに80時間にわたって細胞を回収し、PER2の発現変化をまずウエスタンブロットによって追跡しました(図2)。野生型では予想通り4周期にわたってPER2の蛋白質発現量およびリン酸化量(電気泳動における易動度)に明瞭な概日リズムが認められました(6)。ところが、*Per2* E'^{m/m}細胞ではデキサメサゾン刺激後の一過性の発現サージは認められるものの、その後のPER2の発現には正常なサーカディアンリズムが認められませんでした(図2)。重要なことに、発現量のみなら

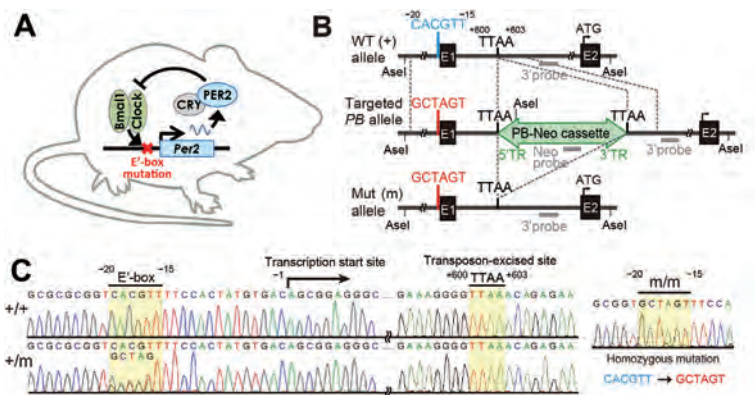


図1. *Per2* E'-box点変異マウスの作成

(A)概日振動を生み出す時計遺伝子の転写翻訳フィードバックループ。振動子である*Per2*のフィードバック制御の要となるシスエレメントに点変異を導入した。(B)*piggyBac*法を用いたゲノム改変。*Per2* E'-boxのCACGTT配列をGCTAGTに改変した。E1: exon 1, E2: exon 2。青: 野生型E'-box。赤: 変異型E'-box。緑: ゲノムのTTAAサイト(+600から+603)に挿入されたネオマイシン耐性遺伝子を有した*piggyBac*トランスポゾン(PB-Neo cassette)。灰色の線: サザンブロットプローブ。数字は*Per2*の転写開始点(+1)からの位置を示す。(C)野生型マウス(+/+)と*Per2* E'-box変異マウス(+/mとm/m)のゲノムDNA配列。E'-boxのみに変異が入っており、PB-Neo cassetteが元のゲノム配列を変異させることなく欠失していることがわかる。

ず易動度の変化も見えなくなることから、*Per2* E'-boxを失うと翻訳後のリン酸化リズムも維持できなくなることが分かります。また、*Per2*およびその他の全ての時計遺伝子群(*Per1*, *Per3*, *Cry1*, *Cry2*, *Bmal1*, *Nr1d1*, *Dbp*, *E4bp4*)のmRNAの発現パターンを定量的RT-PCRにより調べたところ、すべての遺伝子で野生型の細胞で見られる特徴的な発現リズムが*Per2* E'^{m/m}細胞では失われてしまっていることが分かりました。つまり、細胞自律的な振動の発生には*Per2*遺伝子のE'-boxが必須であることが分かったのです。

Per2 E'-boxは体内時計の中核器官である視交叉上核の概日振動に必須である

哺乳類の体内時計の最も重要な中枢は視交叉上核 (Suprachiasmatic nucleus: SCN) とよばれる脳の微小な神経核にあります。SCNは、解剖学的には直径1mmにも満たない、左右の視神経が脳底で合流する視交叉の直上にある小さな神経核ですが、ここが体温や活動など、さまざまな全身の生理リズムを支配する時計のセンターとして機能するのです。我々は、体内時計の最高位中枢であるSCNの振動に*Per2* E'-boxの欠損がどのような影響を及ぼすのかを次に調べました (図3)。具体的には、分子振動を可視化する為に*Per2*以外の振動性時計遺伝子である*Bmal1*のプロモーターの下流にルシフェラーゼをつないで作製されたトランスジェニックマウス (*Bmal1-Eluc*) を用いて*Per2* E'^{m/m}マウスと掛け合わせ、そのマウスから生体外に単離したSCNの脳スライス培養から発せられる生物発光を継続的に観察しました (図3)。その結果、野生型マウスのSCNスライスからは1週間にわたって強靱な発光リズムが観察されたのに対し、*Per2* E'^{m/m}マウスのSCNのリズムは2-3サイクルですぐに減衰してしまうことが分かりました。この残された減衰リズムは*Per2*のパラログ遺伝子である*Per1*をヘテロに欠損した*Per2* E'^{m/m}; *Per1*^{+/-}マウスでは2サイクル以内に消えてしまうので、*Per1*に依存したリズムであることが分かります。また同様の*Per2* E'^{m/m}および*Per1*に依存したリズムの減衰・消失は肺や副腎のスライスカルチャーにおいても観察されました (1)。つまり、*Per2*遺伝子のE'-boxは、中枢時計であるSCNと末梢臓器のどちらにおいても組織自律的な概日振動の維持に必要であることが分かったのです。

Per2 E'-boxは成体の行動および体温の正常な日内リズムの形成に必要である

最後に我々は、*Per2* E'^{m/m}マウスの行動量と体温の日内変動を計測し、*Per2*遺伝子のE'-boxが成体レベルの安定的な概日リズムの維持に不可欠であることを明らかにしました (図4)。具体的には、マウスの自発活動及び基礎深部体温制御における*Per2* E'-boxの役割を明らかにするため、*Per2* E'^{m/m}マウスと野生型マウスの腹腔に温度センサーを埋め込み、そのマウスの活動量を赤外線センサーで測定することによって、体温と行動量の同時測定を数日間に渡り行いました。明期12時間：暗期12時間の外部環境変動を与えた条件下ではどちらのマウスも見かけ上24時間周期の活動リズムを示しますが、これらのマウスを恒常条件下に移して長期

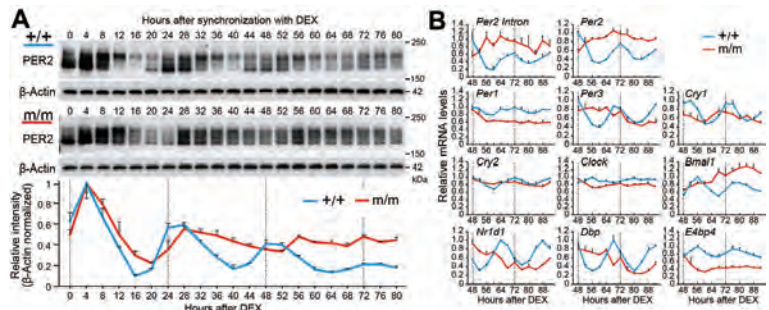


図2. 細胞時計の振動形成における*Per2* E'-boxの影響 (A) *Per2* E'^{+/+}と*Per2* E'^{m/m}のマウス肺線維芽細胞におけるPER2蛋白質の発現プロファイル (n=3)。 (B) *Per2* E'^{+/+}と*Per2* E'^{m/m}のマウス肺線維芽細胞における時計遺伝子mRNA発現プロファイル (n=2)。 *Per2*においてはintronとexonの両方を解析した。なお、線維芽細胞は時計機能を有する究極の末梢細胞として細胞時計の機能検定に最もよく使われる細胞である。

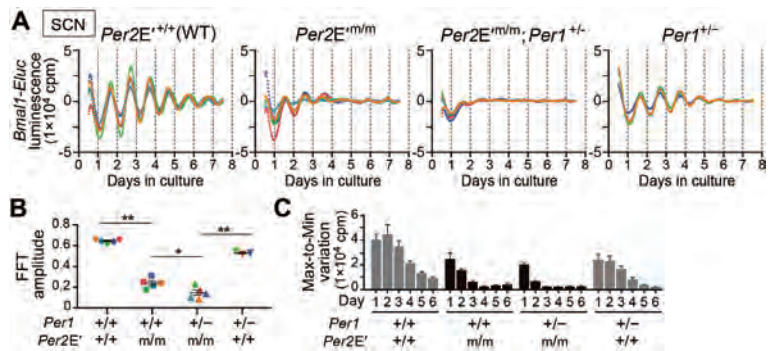


図3. 中枢時計の振動形成における*Per2* E'-boxの影響 (A) *Per2* E'^{+/+} (n=5)、*Per2* E'^{m/m} (n=5)、*Per2* E'^{m/m}; *Per1*^{+/-} (n=5)、および*Per1*^{+/-} (n=3) のSCN 切片培養における*Bmal1-Eluc*の生物発光。detrrendしたデータを示す。(B) (A)のrhythmicityの強さ (FFT amplitude, *P<0.05, **P<0.001)。(C) (A)の各日にちにおける最大値と最小値の差。

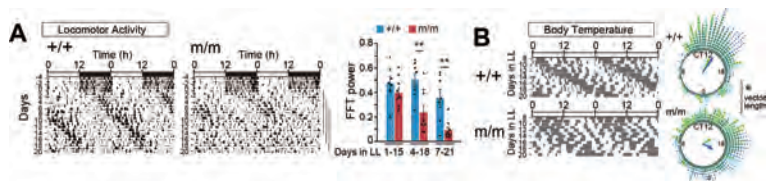


図4. 生体の活動と体温の振動形成における*Per2* E'-boxの影響 (A) 恒常条件下における *Per2* E'^{+/+} と *Per2* E'^{m/m} のアクトグラム (左) とrhythmicityの強さ (FFT power, 右) (**P<0.01, *Per2* E'^{+/+}, n=7; *Per2* E'^{m/m}, n=9)。(B) 恒常条件下における体温の変動プロファイル (左) (体温が平均以上の時間をプロットした) と恒常条件下にしてから7日目から21日目までにおいて体温が上位20%の時間帯の分布を示したレイヤープロット (右) (*P<0.05, *Per2* E'^{+/+}, n=3; *Per2* E'^{m/m}, n=3; 異なる色は異なるマウスを示す)。

間飼育するとgenotypeによる差が現れました。すなわち、野生型マウスでは明瞭な概日リズムを刻み続けるのに対し、*Per2* E^{tm/m}マウスでは徐々に概日リズムが減衰することが分かったのです(図4)。つまり、*Per2*遺伝子のプロモーターのE'-box部位の配列が変わると、行動や体温の正常な日内リズムが維持されず、体内時計の時間がくるってしまうことが分かったのです。

おわりに

遺伝情報のほとんどは最終的に蛋白質へと変換されて発揮されるため、これまでに行われた多くの研究では蛋白質をコードするコーディング領域の配列に着目した研究がなされてきました。これは体内時計の分野でも同じです。24時間周期のリズム発生機構においてノンコーディング領域のDNA配列の役割はこれまで実験的に確かめられたことがありませんでした。したがって今回の我々の研究の結果は、体内時計の成立の根幹にかかわる重要な知見を提供するとともに、蛋白質をコードしないDNA配列の役割を日々の活動制御のレベルで明らかにした初めての成果だといえることができます。

シス制御エレメントなどのノンコーディング領域にあるDNA配列の重要性は、これまで進化発生生物学的な見地から、細胞の運命決定や形態形成、個体発生、系統発生を対象とした研究において詳細に解明されてきました。しかし、蛋白質をコードしないDNA配列が発生の段階を過ぎた成体において日常の動的な生理制御にどの程度の寄与を有するのかについてはこれまで確たる証拠に欠けていました。本研究は、この課題に対し、独自に開発した点変異マウスを用いることにより、時計遺伝子の5'上流シスエレメントを介したダイナミックな制御がマウス成体において活動と体温の日内リズムを生み出すことを実験的に初めて示しました。従来の進化発生生物学的な枠組みを超えたノンコーディング領域の生理的重要性を裏付ける重要な知見を提供することができたといえます。

繰り返しになりますが、蛋白質をコードしないノンコーディング領域のDNA配列を特異的に改変したという点が、従来の研究にはない本研究の独自性といえます。ウェスタンブロットの結果からも確認できるように、このマウスでは時計蛋白質自体は正常に残された状態なのにリズムが消失してしまいます(図2)。蛋白質をコードしない配列が体内時計の発振には不可欠であることがはっきりと示されたのです。

最近の大規模臨床試験によるゲノムワイド関連解析において、朝型・夜型に相関する一塩基多型(SNP)が見出され、その多くがヒトのゲノム上のノンコーディング領域に位置することが示されています(7, 8)。我々の今回の解析結果は、体内時計をコントロールするノンコーディング配列の役割を理解する上で最初の重要な一歩になるかもしれません。

謝辞

ROSA26-PBaseマウスを提供していただいたWellcome Trust Sanger InstituteのAllan Bradley先生、*Bmal1-Eluc*マウスを提供していただいた産業技術総合研究所の中島芳浩先生、ChIP assayの実験のご指導をいただいたFlorida State UniversityのChoogon Lee先生および京都府立医科大学の小池宜也先生と八木田和弘先生に深く感謝申し上げます。特に、本新学術領域における国際共同研究加速基金のサポートを受けましてChoogon Lee先生との今回の共同研究が進みましたことをここに深くお礼申し上げます。

文献

1. Doi M et al. Non-coding cis-element of Period2 is essential for maintaining organismal circadian behaviour and body temperature rhythmicity. *Nat. Commun.* 10: 2563 (2019).
2. Takahashi JS. Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock. *Nat. Rev. Genet.* 18: 164-179 (2017).
3. Tomita J et al. No transcription-translation feedback in circadian rhythm of KaiC phosphorylation. *Science* 307: 251-254 (2005).
4. O'Neill JS & Reddy AB. Circadian clocks in human red blood cells. *Nature* 469: 498-503 (2011).
5. Edgar RS et al. Peroxiredoxins are conserved markers of circadian rhythms. *Nature* 485: 459-464 (2012).
6. Tainaka M et al. Circadian PER2 protein oscillations do not persist in cycloheximide-treated mouse embryonic fibroblasts in culture. *Chronobiol. Int.* 35: 132-136 (2018).
7. Hu Y et al. GWAS of 89,283 individuals identifies genetic variants associated with self-reporting of being a morning person. *Nat. Commun.* 7: 10448 (2016).
8. Jones SE et al. Genome-wide association analyses of chronotype in 697,828 individuals provides insights into circadian rhythms. *Nat. Commun.* 10: 343 (2019).