

プロジェクト名：miRNAを用いた概日リズム制御因子の機能解析

プロジェクト代表者：足立明人（理工学研究科・准教授）

研究の目的

概日リズムは一日の環境サイクルに対する適応で、生物の生活リズムの根底をなす機構である。原核生物からヒトに至るあらゆる生物に見られるだけでなく、細胞周期、代謝、摂食、生殖など生物が生きていく上で必須の基礎的な生命現象を制御している。

哺乳類概日リズムを制御する生物時計の分子メカニズムは **Per**、**Cry** の負の制御因子と **Bmal1**、**Clock** の正の制御因子を中心とするネガティブ・ポジティブフィードバックループにより制御され、この分子制御機構は哺乳類の中枢振動体である視交叉上核、肝臓等の末梢振動体、さらには脊椎動物やショウジョウバエを含む昆虫まで共通のメカニズムと考えられる(Young MW et al, Nat Rev Genet. 2: 702-715 (2001))。しかしながら、概日リズムの重要な特徴である温度補償性や概日リズムの関与する様々な生命現象の制御のメカニズムは不明な点が多く、その解明が待たれる。

我々は解明に至らない原因は未知の遺伝子が関与していると考え、哺乳類の中枢振動体の視交叉上核と抹消振動体の肝臓から周期的に発現する遺伝子群をそれぞれ抽出した。その結果、視交叉上核と肝臓では約 100 と 400 の遺伝子がそれぞれ周期的に発現し、21 遺伝子が二つの組織で振動していた。そのため、この 21 遺伝子は概日リズムの制御に非常に重要な因子であると考え、機能解析を行った。

研究の進め方

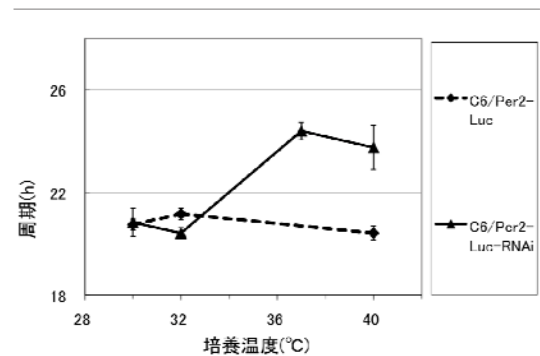
まず、概日リズム制御に関与する遺伝子をスクリーニングするために、Per2 プロモーターとルシフェラーゼが結合したレポーター (Per2::luc) を安定導入したラット・グリアオーマ (C6 細胞) を用いた。全ての細胞は時計遺伝子の周期的な発現により概日リズム制御機構をもつため、時計遺伝子プロモーターの制御下にあるルシフェラーゼも 24 時間周期で発現する。しかしながら、C6 細胞では個々の細胞がばらばらに時を刻むため、細胞全体の発光は平均化され周期性は示さない。そのため、デキサメタゾンの投与により各細胞の概日リズムは同期し、細胞全体からルシフェラーゼによる周期的な発光を測定することが可能となる。本実験では C6-Per2::luc を概日分子制御機構に関与する遺伝子のスクリーニングに用いた。つぎに、検討する遺伝子の遺伝子発現抑制には miRNA を利用した RNA 干渉法 (miRNAi) を用いた。miRNA 発現コンストラクトはレンチウイルスを用いて C6-Per2::luc 安定発現株を作製し、解析に用いた。

研究の成果

我々は上述の方法を用いて、概日リズム制御、もしくは概日リズム関連現象への関与が示唆される遺伝子を複数検出することに成功した。

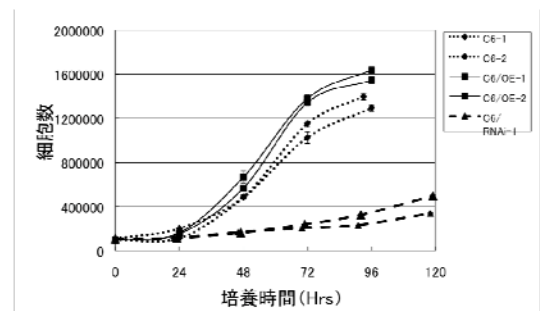
温度補償性関連する遺伝子

一般的に化学反応は温度に依存し、反応速度は10℃上昇により2～3倍速くなる。しかし、概日リズムの制御は化学変化に基づいているにも関わらず、温度に耐性を持ち、10℃上昇してもその周期はほとんど変化しない。概日リズムの周期が季節や昼夜で変化せず、安定して振動するために、温度補償性は重要な性質である。しかしながら、そのメカニズムは不明である。今回、21遺伝子の一つのA遺伝子抑制を行ったところ、高温時に概日リズムの周期が有意に長くなり、高温への耐性が消失した。さらに、温度刺激による同調に関しても、A遺伝子抑制株はコントロールと比較して有意な遅延が見られたが、低温刺激では影響がなかった。これらのことからA遺伝子は高温刺激による温度補償に強く関与することが明らかとなった。現在、低温時の温度補償を担う遺伝子の検出を試みている。



細胞周期制御遺伝子

細胞の分裂は紫外線からの突然変異を防ぐため、夜間に集中し、概日リズムの制御下にあると考えられている。21遺伝子の一つB遺伝子の機能抑制を行った結果、細胞増殖速度が極端に遅延することが明らかとなった。その反対に同遺伝子を過剰発現したところ、増加速度が有意に速まった。このことから本遺伝子は細胞増殖に重要な働きがあると考えて、次に *in vivo* における働きを検討した。肝臓は再生能を持つ唯一の臓器であることが知られ、肝切除後の細胞増殖期における同遺伝子の発現を検討した。その結果、同遺伝子の発現はコントロールと比較して、肝切除後の再生時に発現が増加したことが明らかとなった。更に興味深いことに、再生中の肝臓において特定の時間で未成熟なRNAが増加していることが明らかとなった。そのため、再生時における遺伝子は転写調節、及びスプライシングの転写後調節の両方が関与していることが考えられた。



概日リズム周期を制御する遺伝子

これまでに周期に影響を与える遺伝子を2つ検出した。C遺伝子に関しては周期への影響以外の解析は行っていないが、D遺伝子はヒストン脱アセチル化酵素(Hdac)との関与を検討した。Hdac抑制剤を用いて、周期への影響を検討した結果、D遺伝子抑制株と同様の形質を示した。また、D遺伝子抑制株では一部の時計遺伝子の発現が有意に上昇することが明らかとなった。これらのことから、現在、D遺伝子と直接作用するHdac遺伝子の検出を試みている。