

博士（人間科学）学位論文 概要書

トランスクリプトーム解析に基づくマウス体内
時計出力機構の解明

Identification of circadian clock output
mechanism based on transcriptome analysis
in mouse

2005年1月

早稲田大学大学院 人間科学研究科

南 陽一

Minami, Yoichi

研究指導教員： 柴田 重信 教授

序論

外界からの時刻情報がなくても生じる内在性の日周リズムを概日リズム、概日リズムを駆動する機構を体内時計という。体内時計を構成する時計遺伝子は、転写制御に基づく動的で複雑なネットワーク構造を成す。他にも概日振動する遺伝子には、時計型 E-box や REV-ERB / ROR 応答領域 (RRE) DBP 応答領域 (D-box) など時計遺伝子の結合領域をもつ遺伝子があり、時計制御遺伝子と呼ぶ。本稿では、末梢組織における時計制御遺伝子の解明を試みた 2 つの研究を展開する。前半では、循環器疾患に関係する線溶系の概日リズムを扱う。体内時計が線溶系を制御する機構に関して検討した。後半では、白色脂肪組織での振動遺伝子の包括的取得の試みを行った。振動が見出された遺伝子が真に時計制御遺伝子かどうかについて、ゲノムワイドな時計遺伝子結合領域の探索と検証を行った。

第一章 出力遺伝子としての *Pai-1*

(序) 循環器系疾患には発症しやすい時刻があり、原因として線溶系活性の変化等がいわれている。線溶系は血管を閉塞し血栓症に導くフィブリンを分解する機構である。フィブリンを分解するのはプラスミンであり、プラスミンを活性化するのが組織型プラスミノゲンアクチベータ (tPA) である。プラスミノゲンアクチベータインヒビター 1 (*PAI-1*) は、tPA を不活化することで活性を抑制する。発現解析及びプロモータ解析から、*Pai-1* が時計制御遺伝子だとする報告がされた。そこで生体内で *Pai-1* が時計制御下に振動するか確認した。*Pai-1* が時計制御遺伝子ならば時計遺伝子が振動しない場合に *Pai-1* の振動も消失すると考え、時計遺伝子発現が平坦化する *Clock* マウスでの *Pai-1* 発現を検討した。また *Pai-1* が時計制御遺伝子ならば、時計遺伝子発現パターンの変化に依存して発現位相を変化させると考え、末梢組織の時計の位相を変位させる制限給餌法によって *Pai-1* 発現が変わるか検討した。

(結果と考察) 野生型マウスの心臓で *Pai-1* 遺伝子発現に周期性が見られた。*Clock* マウスでは時計遺伝子の発現振動が減弱・消失し、*Pai-1* 遺伝子の発現振動も消失した。野生型心臓では給餌時刻に依存して時計遺伝子発現の位相が変化したが、*Pai-1* 遺伝子発現も同様に位相変化した。以上の結果は *Pai-1* が時計制御遺伝子である可能性を支持した。また、*Clock* マウスでも制限給餌性リズムが形成された。これは制限給餌性リズム形成に *Clock* 遺伝子が関与しないことを示した初の知見であった。CLOCK がいない場合に概日振動を生み出す機構については、NPAS2 による代償作用が考えられる。NPAS2 は時計中枢である SCN では発現が殆ど認められないが、他の部位では振動して発現し、制限給餌性リズムのような SCN 非依存性リズム形成に関与する可能性がある。事実 *Npas2* 遺伝子欠損マウスでは、制限給餌性リズム形成が遅いことが報告されている。

第二章 白色脂肪組織における出力遺伝子の包括的探索

(序) 体内時計は、転写調節を基本とし一定状態を繰り返す系であり、転写単位でおきる

現象を全て捉えるトランスクリプトーム解析に好適である。これまでに様々な組織で試みられており、一部の遺伝子を除き多くの振動遺伝子は臓器ごとに異なることがわかってきた。今回、白色脂肪組織における時計機構の役割を検討した。トランスクリプトーム解析を行い、振動遺伝子を同定した。さらに公開されているマウスゲノム配列を利用して、DNAチップで同定された振動遺伝子が、機能する時計遺伝子結合領域をもつ時計制御遺伝子が検討した。

(結果と考察) まず *Per2* プロモータを改変型ホタルルシフェラーゼにつないだ遺伝子を導入したラットを用い、発光リズムの観察から白色脂肪組織に時計機構が内在することを確認した。次いで明暗、恒常暗条件下で採取した白色脂肪組織を用いたトランスクリプトーム解析で、主要 5 クラスターからなる 202 振動遺伝子 (206 プローブ) を見出した。この試みで、白色脂肪組織が動的な組織であることを再提示したとともに、従来の定点のみの遺伝子発現プロファイルを補完するデータを供した。振動遺伝子の時計遺伝子結合領域の探索により、95 遺伝子に E-box 該当配列が、27 遺伝子に D-box 該当配列が、33 遺伝子に RRE 該当配列が見つかった。細胞外マトリクス (ECM) リモデリングに関与するような因子 (ECM を構成する *Col4a1*、ECM 分解酵素の MMP を抑制する *Timp3*)、細胞周期に関与する因子 (細胞周期の調節を担う *p21Cip1*、*Wee1*) に時計に直接支配されて生じる概日振動が見られたことが確認できたが、これらは末梢組織の体内時計が、転写制御を介し特定の生理機構を調節している例だと思われた。