

論文内容の要旨

ラット SCN 由来細胞株を用いた哺乳類概日リズム転写ネットワークの解析

Analysis of transcriptional network in mammalian circadian rhythms using a cell line
derived from rat SCN

川口 荘史

多くの生物には、行動や生理学的活動を支配する約24時間周期の概日リズムが見出される。これは、内因性の体内時計が存在するためである。体内時計は、遺伝的に決定された生物種固有のリズムを刻み、環境の周期的変化(特に光サイクル)に対して同調することができる。哺乳類では脳視床下部の視交叉上核(SCN)が概日時計中枢組織として機能している。SCNは網膜からの直接投射を受け、SCN破壊動物はその全ての概日リズムを消失し、移植によって回復する。短い周期の概日リズムを示すハムスター変異体のSCNを、SCNを破壊した野生型ハムスターに移植すると、移植されたハムスターはドナー依存的な短い周期での活動の概日リズムを示した実験によってSCNの中枢組織としての機能が証明された。

一方、概日時計機能そのものは一細胞レベル内に存在している。例えば、時計遺伝子

*Period1 (Per1)*は、SCN及び肝臓などの末梢組織でともに発現概日リズムを刻むことが知られている。しかし、この振動はSCNでは1ヶ月以上継続するのに対し、末梢組織では数日間で減衰する。両組織に見られるこれらの顕著な違いは、細胞間同調機構に依存していると考えられる。相次ぐ時計遺伝子の同定と時計遺伝子間の発現制御の解析によって、時計遺伝子群の多重な転写フィードバックループが、リズム形成の分子基盤であることが明らかになりつつある。その結果、概日リズム研究は、それを構成する個々の分子の機能と制御の解析から、分子レベル及び細胞間で働くネットワーク構造を明らかにしてシステムとしての発振原理の理解を目指す段階に入っている。今回、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リポーター遺伝子(*Per1::luc*)のトランスジェニックラットの胎仔SCNから、*Per1::luc*の発光を指標にして安定した*Per1*発現概日リズムを示す細胞株を樹立した。この細胞株はForskolinやDopamine添加によって、光パルス型の時刻依存的位相変位応答を示した。この細胞株を用いて、トランスクリプトーム解析を行い転写概日リズムを示す遺伝子を抽出した。具体的には、時刻依存的なForskolinを添加により、この細胞のForskolin添加前、主観的明期にあたる刺激でリズム位相が変化しない、主観的暗期の刺激によってリズム位相の後退の三つの条件下でのトランスクリプトーム解析を行い2種類の指標を用いて2つの振動遺伝子のグループを抽出した。最初にロバストな振動を指標に抽出した振動遺伝子は48個で、これらはその時系列転写プロファイルの違いにより、4個のクラスターに分類された。次に、時刻依存的な位相変位(主観的明期の刺激で位相変位しない、主観的暗期前半の刺激で位相後退)を指標にして、48個の振動遺伝子を抽出した。これらは時系列転写プロファイルの違いによってやはり4個のクラスターに分類された。得られた2種の遺伝子セットを明期に振動ピーク位相をもつPer2クラスター、Cry1クラスター、暗期に振動ピーク位相をもつ、Bmal1クラスターを含む3クラスター、合計5クラスターについてプロモーターの比較構造解析を行った。その結果、既に知られているシスエレメントである明期型のE-box、D-box、CRE、暗期型のRORE、そして、新規暗期型シスエレメントとしてXREを同定した。よって、暗期型転

写ネットワークにはRORをエレメントとするループ以外に、XREをシスエレメントとし、bHLH型転写因子であるAHR、またはAHRRによるそれぞれ正または負の制御による新規フィードバックループが存在することが推定された。さらに、位相変位を起こすForskolin、Dopamineの刺激によって刺激後1時間後、2時間後、4時間後で誘導や抑制を受ける遺伝子群を抽出した結果、時刻に依存せずに、共通して誘導または抑制された分子は301個あった。それらの誘導または抑制パターンは4つのクラスターに分けられた。位相前進には94個の誘導または抑制を受ける遺伝子が同定された。位相後退に誘導または抑制される遺伝子は58個であった。さらにプロモーター構造解析の結果は、位相後退特異的に機能しうる転写因子の存在を示唆した。本研究では、SCN由来細胞株をモデルシステムとして、振動遺伝子、及び位相変位時に発現変動を示す遺伝子の網羅的解析を実施した。その結果、多数の概日時計制御下にある遺伝子群(ccgs)のネットワーク構造の全貌を明らかにすることで、暗期型転写フィードバックループを構成する新たな転写因子結合配列を推定できた。そして、自律的な24時間周期の振動形成と、特に同調機構に機能する分子を予測した。