

論文の内容の要旨

論文題目 Resetting Mechanism of Circadian Clock (概日時計のリセット機構)

氏名 金 尚宏

哺乳類のほぼ全ての細胞には概日時計が存在し、様々な生理現象を制御している。この時計の重要な特性のひとつとして、細胞外シグナルを利用して時計の時刻をリセットする入力系を持つことがあげられる。視床下部の視交叉上核の中核時計においては、光による位相（時刻）シフトに*Per*遺伝子の急性な転写活性化が重要であることが知られている。一方で、各末梢組織に存在する末梢時計においては、*Per*非依存型の時計リセット機構が存在することが示唆されていたが、その分子機構は不明であった。この課題にアプローチするため、私は分子時計の研究モデルであるRat-1繊維芽細胞に着目した。

Rat-1細胞における概日時計をリアルタイムで時刻可視化するシステム（図1）を構築している過程で私は、培養培地のpHの微弱なアルカリ化によって、細胞時計の時刻がリセットすることを見いだした。この時計リセットの分子機構を明らかにするため、アルカリ化直後の時計関連遺伝子の発現変化を網羅的に解析した。その結果、アルカリ化による時計リセットの直後には*Per*遺伝子の発現変化が観察されないことから、この時計リセットが新規の分子機構によって媒介されていることが示唆された。興味深いことに、培地pHのアルカリ化はbHLH型転写因子をコードする*Dec1*遺伝子の急性発現を誘導することがわかった。

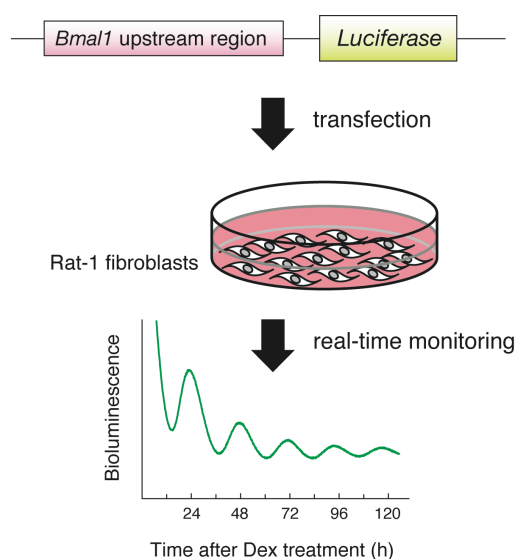


図1 細胞時計の時刻可視化システム

DEC1は細胞レベルでの過剰発現実験から時計制御因子として報告されていたが、その欠損マウスはほぼ正常な時計発振機能を示すことから、時計システムにおける生理的な役割は不明であった。私は、DEC1は時計リセットに関与する因子なのではないかと考え、RNAi法による*Dec1*のノックダウン実験を行った。その結果、*Dec1*の誘導阻害によって、アルカリ化による時計リセットが大きく減弱することがわかった。すなわち、上記の*Per*誘導非依存型の時計リセットにおいて*Dec1*が必須であることが明らかとなった。

アルカリ化による*Dec1*依存型の時計リセットを媒介する細胞内シグナル伝達系を明らかにするため、様々なキナーゼ阻害剤を用いて薬理的な解析を行った。その結果、多くの阻害剤が効果を示さなかったのに対し、Activin receptor-like kinase (ALK) 5の阻害剤であるSB431542とD4476がアルカリ化による時計リセットおよび*Dec1*誘導を阻害することが分かった。ALK5は膜貫通型のセリン/スレオニンキナーゼであり、Transforming Growth Factor (TGF)- β 受容体として機能する。そこで、ALK5の活性化状態の指標として転写因子SMAD2/3のリン酸化状態を解析したところ、培地pHのアルカリ化によって、SMAD2/3のリン酸化レベルが大きく上昇することがわかった。さらに、培地中の活性型TGF- β レベルを定量したところ、培地のアルカリ化によってそのレベルが増加することがわかった。すなわち、培地のpHのアルカリ化は、TGF- β シグナリングを活性化して*Dec1*依存型の時計リセットを引き起こすことがわかった。

次に、TGF- β スーパーファミリーに属するアゴニストであるTGF- β 、アクチビン、Bone Morphogenetic Protein (BMP)-2が細胞時計に及ぼす影響を解析した。ALK5のアゴニストであるTGF- β あるいはALK4/7のアゴニストであるアクチビンABのRat-1細胞への投与は、アルカリ刺激と同様に*Per*の転写活性化を伴わずに*Dec1*の誘導を引き起こすことがわかった。一方、ALK1/2/3/6のアゴニストであるBMP-2の投与は*Dec1*を誘導しなかった。すなわち、特異的なALKサブタイプ(ALK4/5/7)が*Dec1*の誘導に重要であることがわかった。また、TGF- β あるいはアクチビンのRat-1細胞への投与は、細胞時計を時刻依存的にリセットすることが分かった。TGF- β による*Dec1*誘導と時計リセットに必要な分子を探索するため、受容体制御型SMADであるSMAD2とSMAD3、そして共通SMADであるSMAD4に対してRNAi法によるノックダウン実験を行った。その結果、TGF- β による*Dec1*の誘導および時計リセットにはSMAD3とSMAD4が必須であることがわかった。加えて、クロマチン免疫沈降法により、TGF- β 依存的に

SMAD2/3が*Dec1*プロモーター領域に結合することが明らかとなった。すなわち、TGF- β -ALK5-SMAD3/4という細胞内シグナリングは、*Dec1*の転写を活性化して細胞時計の位相を制御すると結論された（図2）。

TGF- β による時計入力系が生きた動物個体においても機能するかどうかを調べるため、マウス腹腔内へのTGF- β 投与実験を行った。その結果、TGF- β は腎臓などの組織において*Dec1*を誘導し、末梢時計の位相シフトを引き起こすことがわかった（図3）。一方、*Dec1*欠損マウスにおいてはこの位相シフトが認められないことから（図3）、生体においてTGF- β -*Dec1*入力系は末梢時計の時刻制御シグナリングとして重要な役割を果たすことがわかった。

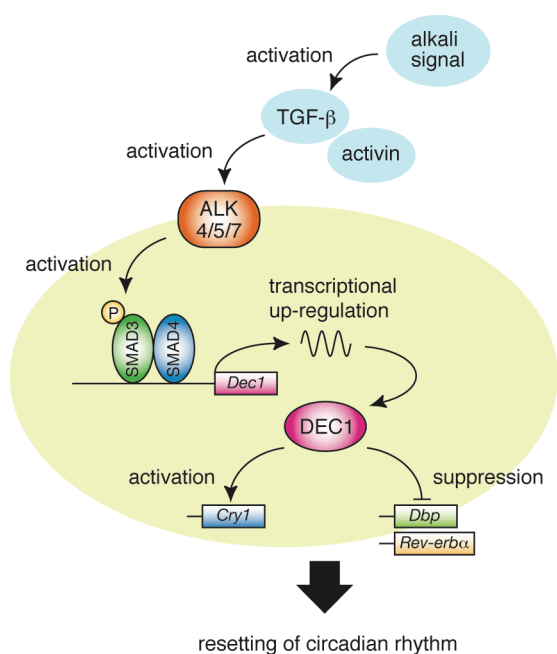


図2 細胞時計の新規時計入力経路

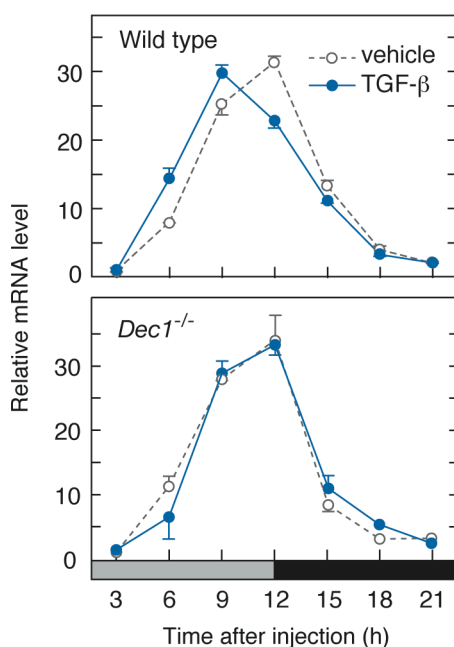


図3 TGF- β による末梢時計の位相シフト