

## 論文内容要旨

A novel protein, CHRONO, functions as a core component of the mammalian circadian clock.

(哺乳類概日リズムにおける新規時計遺伝子  
CHRONO の機能解析)

PLOS Biology, 12(4): e1001839.

Doi:10.1371/journal.pbio1001839, 2014.

主指導教員：内匠 透教授  
(理化学研究所脳科学総合研究センター)

副指導教員：松原 昭郎教授  
(統合健康科学部門 腎泌尿器科学)

副指導教員：今泉 和則教授  
(基礎生命科学部門 分子細胞情報学)

郷力 昭宏

(医歯薬学総合研究科 創生医科学専攻)

地球上のほぼすべての生物には 24 時間周期で繰り返される概日リズムが存在し、この概日リズムによって睡眠や覚醒、ホルモンの分泌、血圧・体温調節などの生理活動が制御されていることが知られている。概日リズムに関する分子として、変異体でリズム周期などに変動がみられる時計遺伝子やそれ以外でも 24 時間の発現振動がみられる時計制御遺伝子が存在する。これまでの研究により体内時計の刻みを促進する因子（時計転写促進因子）として *Bmal1*、*Clock* の 2 つの遺伝子群が、また抑制する因子（時計抑制因子）として *Cry* と *Period* の 2 つの遺伝子群が概日リズムの転写翻訳フィードバックループ(TTFL)に基づく分子機構において重要な遺伝子であることが知られている。しかしながら、この概日リズムの分子機構における全容はまだ明らかではない。

我々はクロマチン免疫沈降法(ChIP)と次世代シーケンサーを組み合わせた「ChIP-seq 法」などを用いて、コアの時計転写因子「BMAL1」の標的遺伝子を網羅的に同定した。その中で、*Period* などの時計遺伝子と同様に昼夜の振幅の変動が大きな概日リズムを示す新規遺伝子として *Gm129* を同定し、これを *Chrono* (ChIP-derived repressor of network oscillator) と名付けた。データベースによる解析では、この遺伝子から作られる CHRONO タンパク質は機能的ドメインを持たず、また哺乳類のみで保存されている遺伝子であることが分かった。

我々はまず qRT-PCR を用いて、心臓、肺、胃、腎臓、精巣における *Chrono* RNA の発現を測定した。精巣以外の臓器において *Chrono* の RNA 発現は概日リズムを示し、*Bmal1* とは逆位相であった。この概日リズムは CHRONO タンパク質の発現においても同様に認められた。次にレポーターアッセイを用いて概日リズムの分子機構における役割を検討したところ、BMAL1/CLOCK 二量体による *Per2* プロモーターの活性化に対して *Chrono* は抑制的に働くことが判明した。これにより *Chrono* は TTFL におけるネガティブフィードバックの転写抑制因子として機能していることが示唆された。ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)によるヒストン修飾は転写制御機構の一つであるが、我々は *Chrono* と HDAC1 が相互作用していることを示し、HDAC 阻害剤であるトリコスタチン A (TSA) の存在下での *Per2* プロモーター活性を調べたところ、*Cry2* ではこれまでと同様に抑制がみられたが *Chrono* では抑制効果が見られなくなったことから、*Chrono* の転写抑制効果は HDAC に依存することを示した。その上 *Per2*、*Dbp* プロモーター上のヒストン H3 のアセチル化が *Chrono* 欠損マウスでは増強していることから、*Chrono* の抑制効果が DNA 配列に依存しないエピジェネティックな制御を介していることを示した。さらに、*Chrono* 欠損マウスと概日リズムの中枢である脳視交叉上核 Avp ニューロン特異的に *Chrono* を欠損させたマウスを作製し、自発行動量の変化とコアの時計遺伝子の発現を調べたところ、野生型マウスに比べて *Chrono* 欠損マウスでは行動リズムの周期が有意に延長し、肝臓及び視交叉上核における時計遺伝子の発現に変動がみられた。一方、シミュレーション解析の結果 *Per2* の転写活性における昼夜の振幅変動が *Cyy1/Cry2* 二重欠損では減少しているのに比べ、*Cry1/Cry2/Chrono* 三重欠損では完全に消失することが予測された。これらの結果は *Chrono* がコアの時計抑制因子として働いていることを示唆している。*Chrono* と同様に転写抑制的に働く時計遺伝子として *Cry2* がある。*Chrono* は *Cry2*

と相互作用を示し、*Cry2*欠損マウスは *Chrono*欠損マウスと同様に概日リズムの周期が延長することから、*Chrono*と *Cry2*は複合体を形成し、お互いの存在下で活性を示すという仮説を立て、*Cry2*欠損マウスの胎児線維芽細胞(MEF)や *Cry2*発現を shRNA によって抑制したマウス線維芽細胞でレポーターアッセイを行ったところ、*Cry2*非存在下でも *Chrono*の転写抑制効果は見られたことから、*Chrono*は *Cry2*とは独立した機構で転写抑制効果を示すことが分かった。

また、生理学的な面では *Chrono*とグルココルチコイドレセプターが相互作用することを示し、拘束ストレス下では *Chrono*欠損マウスは野生型マウスに比べコルチコステロン値が有意に上昇していることを示した。さらに視床下部における *Chrono*の mRNA 発現量は拘束ストレスにより上昇することから、*Chrono*がストレスなどの生理機構において重要な役割を果たすことが示唆された。