

論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)	氏名	郷力 昭宏
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項 2 項該当		
論 文 題 目			
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)			
論文審査担当者			
主 査 教 授 橋本 浩一			
審査委員 教 授 青山 裕彦			
審査委員 教 授 田代 聡			
〔論文審査の要旨〕			
<p>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、代謝、摂食などの生理活動が制御されている。概日リズムに関する分子としてリズム周期などに変動がみられる時計遺伝子があり、コアな時計遺伝子として <i>Bmal1</i>、<i>Clock</i>、<i>Cry</i>、<i>Per</i> 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。</p> <p>本論文で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、<i>Per</i> などの時計遺伝子と同様に概日リズムを示す新規遺伝子として <i>Gm129</i> を同定し、これを <i>Chrono</i> (ChIP-derived repressor of network oscillator) と名付けた。データベースによる解析では、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ことが分かった。</p> <p>まず qRT-PCR を用いて、心臓、肺、胃、腎臓、精巣における <i>Chrono</i> RNA の発現を測定した。精巣以外の臓器において <i>Chrono</i> mRNA 発現は概日リズムを示し、<i>Bmal1</i> 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、BMAL1/CLOCK 二</p>			

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。

次に、*Chrono* とヒストン修飾による転写制御機構を担う 1 型ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC1) の関連について解析したところ、両者が細胞内で相互作用しうることが分かった。HDAC 阻害剤であるトリコスタチン A の存在下での *Per2* プロモーター活性を調べたところ、*Cry2* では抑制がみられたが *Chrono* では抑制効果が見られなかった。これらの結果より、*Chrono* の転写抑制効果は HDAC に依存することが分かった。さらに *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たことから、*Chrono* の抑制効果がエピジェネティックな制御を介していることが明らかとなった。

さらに、*Chrono* 欠損マウスと概日リズムの中核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、行動リズムの変化とコアの時計遺伝子の発現を調べた。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 *Cry1/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た。この検証のために *Cry2* 欠損マウスの胎児線維芽細胞や *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。この結果より、*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。

最後に、*Chrono* の生理学的な意義について解析を行った。*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 *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* mRNA 発現量は拘束ストレスにより上昇することから、*Chrono* がストレス応答において重要な役割を果たすことを示した。

以上の結果から、本論文は時計転写因子 BMAL1 の標的遺伝子として新規時計遺伝子 *Chrono* を同定し、*Chrono* がヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) に依存して転写抑制的に働くこと、*Chrono* 欠損マウスでは行動リズムの周期が延長すること、*Chrono* がストレス応答に関与していることを明らかにし、新たなコアの時計遺伝子である可能性を示したものとして高く評価される。よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士(医学)の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。