

## 時計遺伝子の転写のシス制御エレメントに点変異を入れると 体内時計はどうか

Nguyen Pham Khanh Tien, 土居 雅夫

### 1. はじめに

転写を中心とした遺伝子のフィードバックループは本当に体内時計の自律的な振動の形成に必要なのだろうか？今回我々は、体内時計遺伝子の5'上流のノンコーディング領域にあるシス制御エレメントに点変異を導入したマウスを世界で初めて作製し、本シスエレメントが細胞時計における遺伝子発現リズム、ならびに、個体レベルにおける活動および体温の日内リズムの正常な発現の維持に必要であることを示した<sup>1)</sup>。本研究の結果は、体内時計の成立の根幹に関わる重要な知見を提供するとともに、タンパク質をコードしないDNA配列の成体における役割を日々の動的な活動制御レベルにおいて明らかにした初めての成果だといえる。

### 2. 時計遺伝子5'上流シスエレメントに点変異を持つマウスを作製する意義

哺乳動物の行動や体温の日内リズムを生み出す概日時計は、時計遺伝子のプロモーター上のシスエレメントが仲介する転写レベルのフィードバックループによって成立していると考えられている（2017年ノーベル生理学・医学賞：体内時計を生み出す遺伝子機構の発見）。しかしながら、このモデルの論理的根拠は時計遺伝子のタンパク質コーディング領域を欠落させた遺伝学的見地に基づいており<sup>2)</sup>、実際にノンコーディング領域のシスエレメントを介したフィードバックループが生体のリズム形成に不可欠であるかどうかは未解明であった。シアノバクテリアにおいては転写が阻害された条件においても時計タンパク質のリ

ン酸化の概日変動が継続する<sup>3)</sup>。またヒトにおいても脱核し転写が行われない細胞である赤血球が酸化還元反応において概日リズムを示すことが報告され、従来のモデルに合わない分子時計機構の存在が議論され始めている<sup>4,5)</sup>。このような中、我々は今回、体内時計遺伝子の転写フィードバックループの要となるシス制御エレメントが概日時計の安定的な振動の維持に不可欠であることを示した。具体的には、哺乳類の体内時計の中核機能を担うとされる *Period2* 遺伝子（以下 *Per2*）の5'上流プロモーター領域に存在するシスエレメント E'-box に点変異を導入したマウスを *piggyBac* トランスポゾン法を用いて作製し（図1）、その表現型を詳細に解析した（図2, 図3）。本稿ではこの *Per2* E'-box 点変異マウス（以下、*Per2* E'<sup>mm</sup>マウスと呼ぶ）を用いた解析によって明らかになった *Per2* E'-box の個体・組織・細胞レベルの概日リズム形成における役割を過去の関連する文献とともに紹介する。

### 3. *Per2* E'-box は細胞自律的な概日振動の生成に必須である

最初に、末梢組織から採取した初代培養細胞を用いて時計遺伝子の発現リズムを mRNA およびタンパク質レベルにおいて追跡し、細胞自律的な概日リズム形成における *Per2* E'-box の役割を調べた（図2A）。具体的には、野生型マウスと *Per2* E'<sup>mm</sup>マウスの肺の線維芽細胞を培養し、デキサメサゾン投与による細胞時計のリセットを行った後、4時間ごとに80時間にわたって細胞を回収し、PER2の発現変化を自作の抗PER2抗体<sup>6)</sup>を用いてまずウエスタンブロットにより追跡した（図2A）。野生型では予想どおり4周期にわたってPER2のタンパク質発現量およびリン酸化量（電気泳動における易動度）に明瞭な概日変動が認められた<sup>6)</sup>。ところが、これとは対照的に、*Per2* E'<sup>mm</sup>細胞ではデキサメサゾン刺激後の一過性の発現サージは認められるものの、その後のPER2の発現には正常なサーカディアンリズムが認められなかった（図2A）。重要なことに、発現量のみならず易動度の変化もみえなくなることから、*Per2* E'-box を失うと翻訳後のリン酸化リズムも維持できなくなることが証明された。さらに、*Per2* およびその他のすべての時計遺伝子群（*Per1*, *Per3*, *Cry1*, *Cry2*, *Bmal1*, *Nr1d1*,

京都大学大学院薬学研究科医薬創成情報科学講座（〒606-8501 京都市左京区吉田下阿達町46-29）

Impact of the mutation of the *cis*-regulatory element of the core clock gene on the body clock

Nguyen Pham Khanh Tien and Masao Doi (Department of Systems Biology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, 46-29 Yoshida-Shimoadachi-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2020.920735

© 2020 公益社団法人日本生化学会

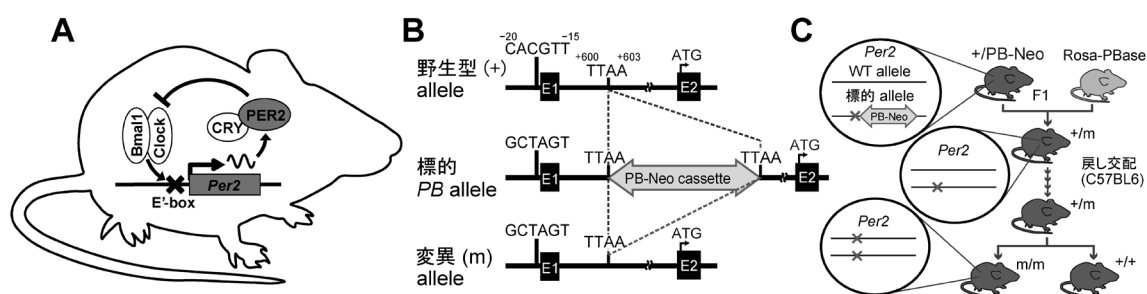


図1 *Per2* E'-box点変異マウスの作製

(A) 概日振動を生み出す時計遺伝子の転写翻訳フィードバックループ。振動子である *Per2* のフィードバック制御の要となるシスエレメント E'-box に点変異を導入した。(B) *piggyBac* 法を用いたゲノム改変スキーム。 *Per2* E'-box の CACGTT 配列を GCTAGT に改変した。数字は *Per2* の推定転写開始点 (+1) からの位置。E1: exon 1, E2: exon 2, PB-Neo cassette: 第一イントロン中の TTAA サイト (+600 から +603) に挿入されたネオマイシン耐性遺伝子 (Neo) をコードする *piggyBac* トランスポゾン。(C) 相同組換えにより得た F1 ヘテロマウス (+/PB-Neo) を ROSA26-PBase マウスと交配し、得られたマーカーカセットを持たない E'-box 変異マウス (+/m) を C57BL/6J へ戻し交配した。このマウスは、E'-box のみに点変異が入っており、PB-Neo cassette が元のゲノム配列を変化させることなくシームレスに消えていくことをシーケンズ解析により確認した<sup>1)</sup>。文献1より引用改変。

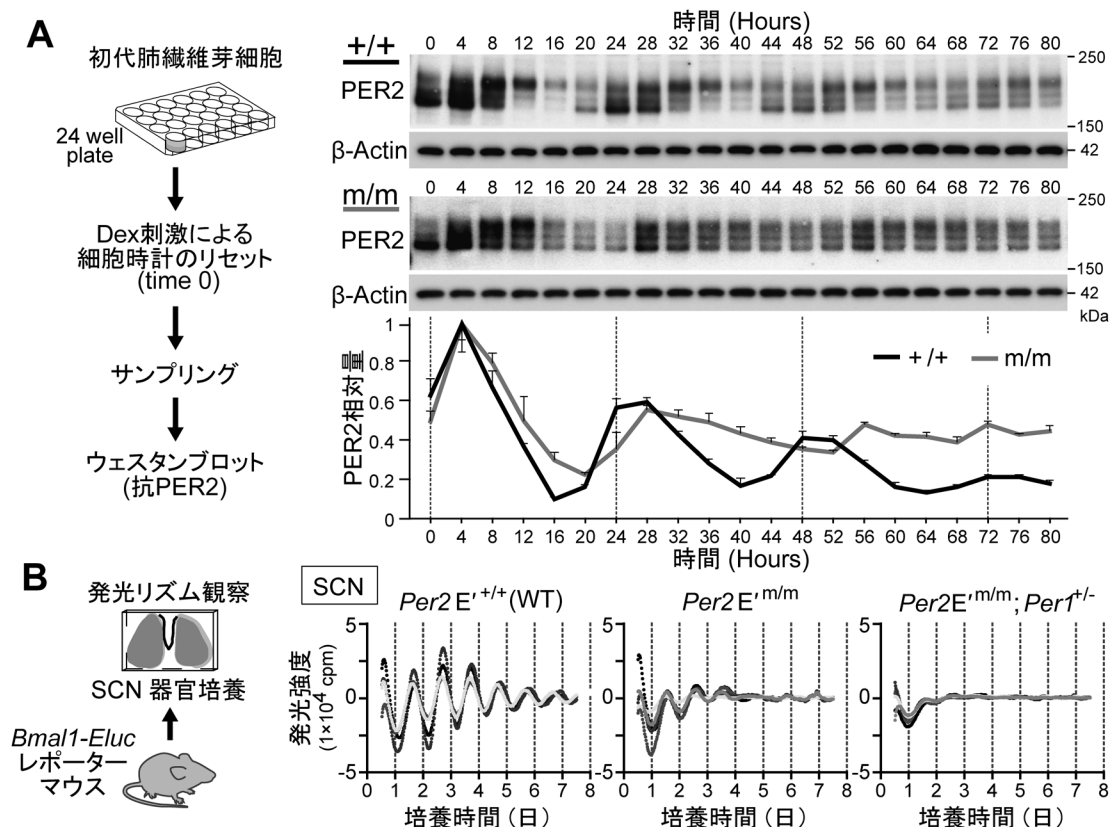


図2 細胞時計と中枢時計のリズム形成維持における *Per2* E'-box の必要性

(A) 細胞時計の振動形成における *Per2* E'-box の影響。 *Per2* E'<sup>+/+</sup> と *Per2* E'<sup>m/m</sup> のマウス肺線維芽細胞における PER2 タンパク質の発現プロファイル ( $n=3$ )。Dex: デキサメサゾン。(B) 中枢時計の振動形成における *Per2* E'-box の影響。 *Per2* E'<sup>+/+</sup> ( $n=5$ ), *Per2* E'<sup>m/m</sup> ( $n=5$ ), および *Per2* E'<sup>m/m</sup>; *Per1*<sup>+/-</sup> ( $n=5$ ) の SCN 切片培養における *Bmal1-Eluc* の生体発光。detrend したデータを示す。文献1より引用改変。

*Dbp*, *E4bp4*) の mRNA の発現パターンを定量的 RT-PCR により調べたところ、すべての遺伝子で野生型の細胞で見られる特徴的な発現リズムが *Per2* E'<sup>m/m</sup> 細胞では失われてし

まうことから、細胞自律的な振動の発生には *Per2* 遺伝子の E'-box が必須であることがわかった<sup>1)</sup>。

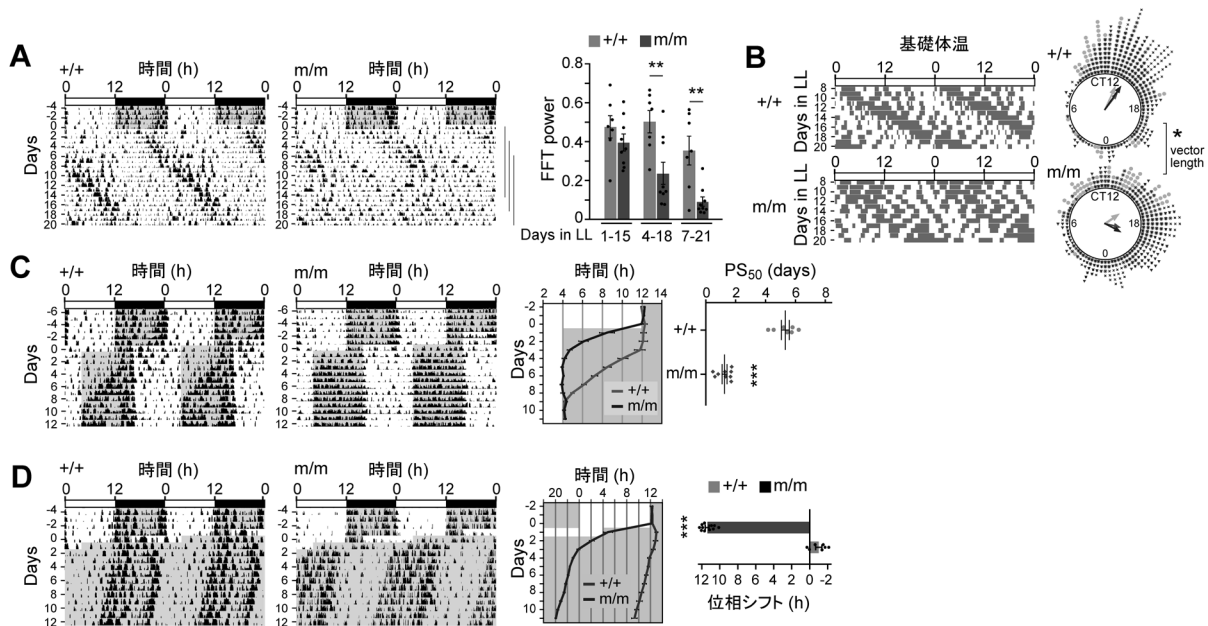


図3 生体の活動と体温の振動形成における *Per2* E'-box の影響

(A) 恒常明 (LL) 条件における *Per2* E'<sup>+/+</sup> と *Per2* E'<sup>m/m</sup> のアクトグラム (左). LL 条件下における一定期間ごとの概日性リズムの強さ (FFT power, 右) (\*\**P* < 0.01, *Per2* E'<sup>+/+</sup> : *n* = 7, *Per2* E'<sup>m/m</sup> : *n* = 9). (B) LL 条件下における体温. 体温が平均以上の時間をプロット (左). LL 条件にしてから7日目から21日目までに体温が上位20%の時間帯をプロット (右) (\**P* < 0.05, *Per2* E'<sup>+/+</sup> : *n* = 3, *Per2* E'<sup>m/m</sup> : *n* = 3). (C) 8時間位相前進させたときの *Per2* E'<sup>+/+</sup> と *Per2* E'<sup>m/m</sup> のアクトグラム (左). 8時間位相前進させたときの活動開始位相の推移 (中央). 再同調が半分回復するのに要した日数 (PS<sub>50</sub>, 右) (\*\**P* < 0.0001, *Per2* E'<sup>+/+</sup> : *n* = 7, *Per2* E'<sup>m/m</sup> : *n* = 9). (D) 1日のみ新明暗環境下 (8時間位相前進) で飼育し, その後恒暗条件下で飼育したときの *Per2* E'<sup>+/+</sup> と *Per2* E'<sup>m/m</sup> のアクトグラム (左), 活動開始点位相の推移 (中央), 位相前進した時間 (右) (\*\**P* < 0.0001, *Per2* E'<sup>+/+</sup> : *n* = 7, *Per2* E'<sup>m/m</sup> : *n* = 11). 文献1より引用改変.

#### 4. *Per2* E'-box は体内時計の中核器官である視交叉上核の概日振動に必須である

哺乳類の体内時計の最も重要な中枢は視交叉上核 (suprachiasmatic nucleus : SCN) と呼ばれる脳の微小な神経核にある. SCN は, 解剖学的には直径1mmにも満たない, 左右の視神経が脳底で合流する視交叉の直上にある小さな神経核だが, ここが体温や活動など, さまざまな全身の生理リズムを支配する時計のセンターとして機能する<sup>7)</sup>. 我々は, 体内時計の最高位中枢であるSCNの概日リズムの振動にE'-boxの欠損がどのような影響を及ぼすのかを次に調べた (図2B). 具体的には, 分子時計の振動を可視化するため, *Per2* 以外の振動性時計遺伝子である *Bmal1* のプロモーターの下流にルシフェラーゼをつないで作製されたトランスジェニックマウス (*Bmal1-Eluc*) を用いて *Per2* E'<sup>m/m</sup> マウスと掛け合わせ, そのマウスから生体外に単離したSCNの脳スライス培養から発される生物発光を継続的に観察した (図2B). その結果, 野生型マウスのSCNスライスからは1週間にわたって強靱な発光リズムが観察されたのに対し, *Per2* E'<sup>m/m</sup> マウスのSCNのリズムは2~3サイクルですぐに減衰してしまうことがわかった. この残された減衰リズムは *Per2* のパラログ遺伝子である *Per1* をヘテロ

に欠損した *Per2* E'<sup>m/m</sup>; *Per1*<sup>+/-</sup> マウスでは2サイクル以内に消えてしまうので, *Per1* に依存したリズムであることがわかった. また同様の *Per2* E'<sup>m/m</sup> および *Per1* に依存したリズムの減衰・消失は肺や副腎のスライスカルチャーにおいても観察された<sup>1)</sup>. つまり, *Per2* 遺伝子のE'-boxは, 中枢時計であるSCNと末梢臓器のどちらにおいても組織自律的な概日振動の維持に必要であることがわかった.

#### 5. *Per2* E'-box は成体の行動および体温の正常な日内リズムの形成に必要である

最後に我々は, *Per2* E'<sup>m/m</sup> マウスの行動量と体温の日内変動を計測し, *Per2* 遺伝子のE'-boxが成体レベルの安定的な概日リズム形成に不可欠であることを見いだした (図3). 具体的には, マウスの自発活動および基礎深部体温制御における *Per2* E'-box の役割を明らかにするため, *Per2* E'<sup>m/m</sup> マウスと野生型マウスの腹腔に温度センサーを埋め込み, そのマウスの活動量を赤外線センサーで測定することによって, 体温と活動量の同時測定を3週間以上にわたり行った. 明期12時間: 暗期12時間の外部環境変動を与える条件下ではどちらのマウスも見かけ上24時間周期のリズムを示すが, これらのマウスを恒常明条件下に移



して観察を続けると遺伝子型間に明瞭な差が現れた。すなわち、野生型マウスは体温・行動ともに明瞭な概日リズムを刻み続けるのに対し、*Per2* E'<sup>tm</sup>マウスでは徐々に概日リズムが減衰し、3週間以内にはそのリズムが消えてしまうことがわかった（図3A, B）。

またこのE'-box変異マウスをジェットラグを模倣した時差環境に置くと、より顕著な表現型が見いだされる（図3C）。明暗サイクルを8時間早めて時差を起こすと、ヒトと同様、野生型マウスでは新しいサイクルに同調するまでに10日間程度要するが、*Per2* E'<sup>tm</sup>マウスでは日をまたず、即座に再同調する。驚くことに、変異マウスにみられる急激な位相シフトは、この動物をたった1回の8時間先行の光環境に曝露しただけでも生じる（図3D）。このような非常に大きく急激な位相シフトが生まれるメカニズムはいまのところ不明であるが、過去のlimit cycleモデルを基盤とした数理解析では振幅の小さく脆弱な振動体に摂動を与える場合に同様の大きな位相変位が生じると予想されている<sup>8)</sup>。いずれにしても、以上の観察結果から、*Per2* 遺伝子のシスエレメントE'-boxをなくすと、行動や体温の正常な日内リズムが維持されず、時差環境や恒常明環境では体内時計の時間がくるってしまうことがわかった。

## 6. *Per2* 転写ループのインパクトの範囲

一方で、驚くことに、図3Dの結果から、個体レベルでは*Per2* E'-boxがなくても恒暗条件下においては約24時間の活動リズムが維持されることがわかった。つまり、生体外に取り出した細胞での自律的な振動には*Per2* E'-boxはなくてはならない必須のエレメントであるが（図2）、個体レベルではその欠損を代償しうる未知の機構が存在するといえる。

実際、細胞・組織・個体に表出するリズムは実に多種多様なレベルのフィードバックループ（FBL）やフィードフォワードループ（FFL）などの相互作用によって形成・維持されると考えられる。時計遺伝子の転写・翻訳後修飾を介した細胞内のFBL/FFL相互作用のみならず、細胞間結合による組織内の相互作用、複数の臓器をまたいだ円環による相互作用、さらには外部環境との相互作用を間に挟んだ他個体との相互作用も生物個体のリズム維持に重要である。しかし、これらの多種多様な相互作用は生体内・生体間で相互にリンクしているため自律性と他律性の分界についての検討はいまだ十分になされていない。今後の課題といえる。

*Per2* 以外の転写ループによる補償も十分考えられる。*Per2* のE'-boxを中心としたフィードバックループには複数のサブグループが連結しており、リズム発振の強度や安定性をアシストする<sup>9)</sup>。その一つにD-boxがあり、本配

列に結合する転写因子であるDBPとE4BP4がそれぞれ転写を促進および抑制する<sup>9)</sup>。さらに、*RORα*とREV-ERBαは、RRE配列を介して*Bmal1*や*Cry1*の転写を制御することにより、両遺伝子の時刻依存的な発現パターンを生み出し<sup>9)</sup>、それによって間接的に*Per2*の発現を調節している。最近、*Cry1*の第一イントロンにあるRRE配列を含むゲノム領域が欠落したマウスの行動が解析され、概日周期の15分の短縮という表現型が報告された<sup>10)</sup>。非常に軽度な表現型であるが、*Cry1*のRREが仲介する転写ループも概日時計へ寄与すると考えられる。

## 7. おわりに

遺伝情報のほとんどは最終的にタンパク質へと変換されて発揮されるため、これまでに行われた多くの研究ではタンパク質をコードするコーディング領域の配列に着目した研究がなされてきた。これは体内時計の分野でも例外ではない。24時間周期のリズム発生機構においてノンコーディング領域の役割はこれまで実験的に確かめられずにいた。データの繰り返しとなるが、ウェスタンブロットの結果からも認められるようにシスエレメント変異マウスでは時計タンパク質自体は正常に残された状態なのにリズムが消えてしまう（図2）。この結果は、タンパク質発現の源となる遺伝子の転写の制御が少なくとも細胞レベルでの概日時計の形成に不可欠であることを示している。

シス制御エレメントなどのノンコーディング領域の重要性は、これまで進化発生生物学的な見地から、細胞の運命決定や形態形成、個体発生、系統発生を対象とした研究において詳細に解明されてきた<sup>11-13)</sup>。しかし、タンパク質をコードしないDNA配列が発生の段階を過ぎた成体において日常の動的な生理制御にどの程度の寄与を有するのかについては不明であった。この課題に対し、体内時計を題材に独自の点変異マウスを用いて時計遺伝子上流エレメントがマウス成体の活動・体温リズムに必須であることを示した本研究は、これまでの進化発生生物学的な枠組みを超えたノンコーディング領域の生理的重要性を裏づける重要な結果を提供したといえる。

最近の大規模ヒトコホート試験におけるゲノムワイド相関解析において、朝型・夜型に相関する一塩基多型（SNP）が見いだされ、その多くがヒトのゲノム上のノンコーディング領域に位置することが示されている<sup>14, 15)</sup>。我々の今回の解析結果は、体内時計をコントロールするノンコーディング配列の役割を理解する上で最初の一步になるかもしれない。

## 謝辞

本研究は多くの共同研究により得られたものである。京

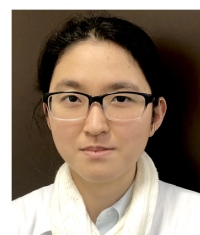
都大学名誉教授岡村均先生ならびに同薬学研究科システムバイオロジー分野の関係者各位をはじめ、*Per2* E'-box 点変異マウスの作製にご協力いただいた新潟大学の阿部学先生、崎村建司先生、理化学研究所の清成寛先生、*Bmal1-Eluc* マウスを提供いただいた産業技術総合研究所の中島芳浩先生、ChIP assay のご指導をいただいた京都府立医科大学の小池宜也先生と八木田和弘先生に深謝いたします。

## 文 献

- Doi, M., Shimatani, H., Atobe, Y., Murai, I., Hayashi, H., Takahashi, Y., Fustin, J.M., Yamaguchi, Y., Kiyonari, H., Koike, N., et al. (2019) Non-coding *cis*-element of *Period2* is essential for maintaining organismal circadian behaviour and body temperature rhythmicity. *Nat. Commun.*, **10**, 2563.
- Takahashi, J.S. (2017) Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock. *Nat. Rev. Genet.*, **18**, 164–179.
- Tomita, J., Nakajima, M., Kondo, T., & Iwasaki, H. (2005) No transcription-translation feedback in circadian rhythm of KaiC phosphorylation. *Science*, **307**, 251–254.
- Edgar, R.S., Green, E.W., Zhao, Y., van Ooijen, G., Olmedo, M., Qin, X., Xu, Y., Pan, M., Valekunja, U.K., Feeney, K.A., et al. (2012) Peroxiredoxins are conserved markers of circadian rhythms. *Nature*, **485**, 459–464.
- O'Neill, J.S. & Reddy, A.B. (2011) Circadian clocks in human red blood cells. *Nature*, **469**, 498–503.
- Tainaka, M., Doi, M., Inoue, Y., Murai, I., & Okamura, H. (2018) Circadian PER2 protein oscillations do not persist in cycloheximide-treated mouse embryonic fibroblasts in culture. *Chronobiol. Int.*, **35**, 132–136.
- Herzog, E.D., Hermansteyne, T., Smyllie, N.J., & Hastings, M.H. (2017) Regulating the Suprachiasmatic Nucleus (SCN) Circadian Clockwork: Interplay between Cell-Autonomous and Circuit-Level Mechanisms. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **9**, a027706.
- Vitaterna, M.H., Ko, C.H., Chang, A.M., Buhr, E.D., Fruechte, E.M., Schook, A., Antoch, M.P., Turek, F.W., & Takahashi, J.S. (2006) The mouse Clock mutation reduces circadian pacemaker amplitude and enhances efficacy of resetting stimuli and phase-response curve amplitude. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 9327–9332.
- Ueda, H.R., Hayashi, S., Chen, W., Sano, M., Machida, M., Shigeyoshi, Y., Iino, M., & Hashimoto, S. (2005) System-level identification of transcriptional circuits underlying mammalian circadian clocks. *Nat. Genet.*, **37**, 187–192.
- Mermet, J., Yeung, J., Hurni, C., Mauvoisin, D., Gustafson, K., Jouffe, C., Nicolas, D., Emmenegger, Y., Gobet, C., Franken, P., et al. (2018) Clock-dependent chromatin topology modulates circadian transcription and behavior. *Genes Dev.*, **32**, 347–358.
- Indjeian, V.B., Kingman, G.A., Jones, F.C., Guenther, C.A., Grimwood, J., Schmutz, J., Myers, R.M., & Kingsley, D.M. (2016) Evolving New Skeletal Traits by *cis*-Regulatory Changes in Bone Morphogenetic Proteins. *Cell*, **164**, 45–56.
- Kvon, E.Z., Kamneva, O.K., Melo, U.S., Barozzi, I., Osterwalder, M., Mannion, B.J., Tissieres, V., Pickle, C.S., Plajzer-Frick, I., Lee, E.A., et al. (2016) Progressive Loss of Function in a Limb Enhancer during Snake Evolution. *Cell*, **167**, 633–642. e11.
- Whyte, W.A., Orlando, D.A., Hnisz, D., Abraham, B.J., Lin, C.Y., Kagey, M.H., Rahl, P.B., Lee, T.I., & Young, R.A. (2013) Master transcription factors and mediator establish super-enhancers at key cell identity genes. *Cell*, **153**, 307–319.
- Hu, Y., Shmygelska, A., Tran, D., Eriksson, N., Tung, J.Y., & Hinds, D.A. (2016) GWAS of 89,283 individuals identifies genetic variants associated with self-reporting of being a morning person. *Nat. Commun.*, **7**, 10448.
- Jones, S.E., Lane, J.M., Wood, A.R., van Hees, V.T., Tyrrell, J., Beaumont, R.N., Jeffries, A.R., Dashti, H.S., Hillsdon, M., Ruth, K.S., et al. (2019) Genome-wide association analyses of chronotype in 697,828 individuals provides insights into circadian rhythms. *Nat. Commun.*, **10**, 343.

## 著者寸描

### ● Nguyen Pham Khanh Tien (グエン ファム カン ティエン)



京都大学大学院薬学研究科医薬創成情報科学講座修士課程。

■略歴 1995年ベトナムに生る。2020年京都大学薬学部卒業。同年より現所属。

■研究テーマと抱負 加齢性臓器機能障害における体内時計機構の役割を現在研究しています。体内時計が関わる老化機構を明らかにして、健康維持に役立てたいと考えています。

■趣味 バドミントン。

### ●土居 雅夫 (どい まさお)



京都大学大学院薬学研究科医薬創成情報科学専攻教授。理学博士。

■略歴 1998年東京大学理学部生物化学科卒業。2003年同大学院博士課程修了。02年JSPS特別研究員・海外特別研究員。06年神戸大学大学院医学系研究科助教。07年京都大学大学院薬学研究科講師。11年同准教授。18年より現職。

■研究テーマと抱負 睡眠障害や加齢に対する「時間治療薬」の開発を目指した基礎研究・臨床応用研究を行っています。興味のある方はお声がけください。

■ウェブサイト <http://systems-biology.pharm.kyoto-u.ac.jp/>