

体内リズムの発現に必要なDNAのスイッチを発見

—蛋白質をコードしないノンコーディング領域のDNA配列が活躍—

概要

京都大学大学院薬学研究科 土居雅夫 教授、嶋谷寛之 同博士課程学生、跡部祐太 同博士課程修了生、岡村均 同特任教授（京都大学名誉教授）のグループは、体内リズムの発現のスイッチとなる DNA 配列を発見しました。この部位の配列が変わると、行動や体温の正常な日内リズムが維持されず、体内時計の時間がくるってしまうのです。

生物の設計図であるゲノムには蛋白質をコードする領域とコードしない領域があり、後者をノンコーディング領域と呼びます。ノンコーディング領域の DNA 配列は生物の発生や進化の過程で重要であることは示されていましたが、発生の段階を過ぎた成体において日常的な活動や生理機能の制御における役割は明らかにされていませんでした。

ノンコーディング領域の DNA 配列に着目した今回の研究は、体内時計の形成原理の根幹にかかわる重要な知見を提供するとともに、蛋白質をコードしない DNA 配列の成体における役割を日々の活動制御のレベルで明らかにした初めての成果といえます。

本研究成果は、2019年6月12日に国際科学誌「Nature Communications」のオンライン版に掲載されました。

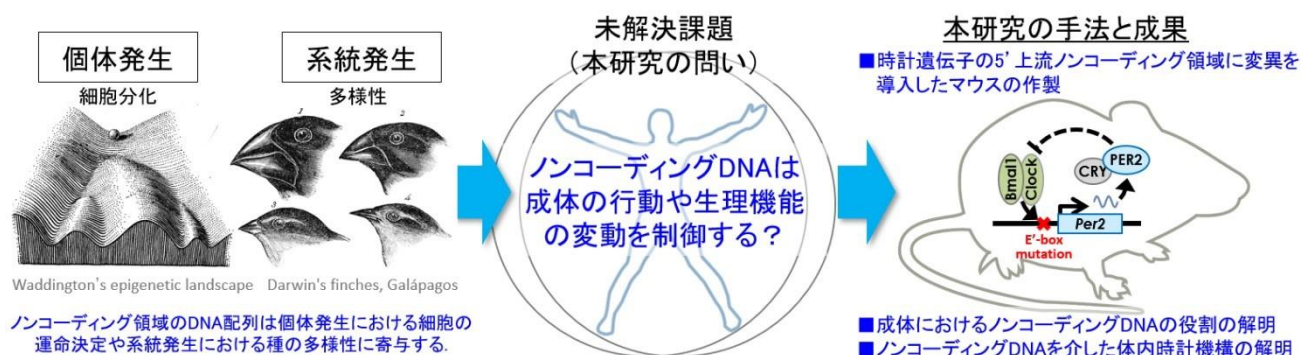


図 1. 本研究の概要図

研究のポイント

これまで遺伝子と呼ばれておもに解析が行われていたのは実はゲノム配列のたった2%であり、残りは蛋白質をコードしないノンコーディング領域と呼ばれる DNA です。その働きは、発生や進化を決める上で重要ですが、それが、我々の実際の活動や生理レベルの調節にどの程度の役割をもつかは全く不明でした。我々はノンコーディング DNA のなかに、今回、体内リズムの発現のスイッチとなる DNA 配列を発見しました。この部位の配列が変わると、行動や体温の正常な日内リズムが維持されず、体内時計の時間がくるってしまうことが分かったのです。

1. 背景

生物の設計図であるゲノムには蛋白質をコードする領域とコードしない領域があり、後者をノンコーディング領域と呼びます。ノンコーディング領域の DNA 配列は生物の発生や進化の過程で重要であることは示されていましたが、発生の段階を過ぎた成体において日常的な活動や生理機能の制御における役割は明らかにされていませんでした (図 1)。そのような中、本研究グループは、ノンコーディング領域の DNA 配列がもつ生理学的役割を哺乳類の体内時計機構において調べました。

遺伝情報のほとんどは最終的に蛋白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蛋白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ました。これは体内時計の分野でも同じです。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 DNA 配列の役割はこれまで実験的に確かめられたことがありませんでした。

ノンコーディング領域の DNA 配列に着目して行った今回の研究成果は、体内時計の成立の根幹にかかわる重要な知見を提供するとともに、蛋白質をコードしない DNA 配列の成体における役割を日々の活動制御のレベルで明らかにした初めての成果だといえます。

2. 研究手法・成果

人類を含む地球上のほぼ全ての生物は体内時計をもち、地球の自転にともなう環境の変化に応じて活動量や体温などの生理機能を 24 時間周期でリズムに変化させます。このリズムは、時計遺伝子の 5' 上流ノンコーディング領域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すると考えられています (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蛋白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、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当該分野の大きな謎でした。シアノバクテリアにおいては転写を阻害しても時計蛋白質のリン酸化が概日変動を示すことや (Science, 307, 251, 2005)、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たからです (Nature, 469, 498, 2011; Nature, 485, 459, 2012; Nature, 532, 375, 2016)。

このような中、私共は今回、時計遺伝子の発現を制御するノンコーディング領域の DNA 配列がマウス個体の活動および体温の日内リズムの維持に必要なことを見出しました。具体的には、体内時計の振動形成の中核機能を担う *Period2* 遺伝子の 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* トランスポゾンを用いた特殊な DNA 改変技術を駆使して作出し (図 1)、体内時計機構に関する次の研究成果を得ました。

- (1) E'-box 点変異マウス (m/m) の行動量と体温の日内変動を計測し、時計遺伝子のプロモーター領域のシスエレメントが成体の安定的な概日リズム形成に不可欠であることを明

らかにした（次ページ 図 2）。

- (2) 体内時計の最高位中枢器官である視交叉上核のスライスカルチャーおよび末梢臓器のスライスカルチャーにおける概日時計遺伝子発現リズムを計測し、組織自律的な概日リズム形成に時計遺伝子プロモーター領域のシスエレメントが不可欠であることを示した。
- (3) 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 および蛋白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時計遺伝子プロモーター領域のシスエレメントが必須であることを明らかにした（次ページ 図 3）。

蛋白質をコードしないノンコーディング領域の DNA 配列を特異的に改変したという点が、従来の研究にはない本研究の独自性といえます。(3) の結果からも確認できるように、このマウスでは時計蛋白質自体は正常に残された状態なのにリズムが消失してしまいます (図 3)。シスエレメントを介した転写制御が体内時計の発振にはなくてはならないことがはっきりと示されたのです。

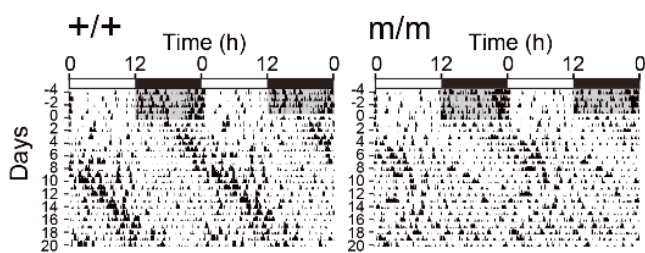


図 2. E'-box 変異による行動リズムの消失

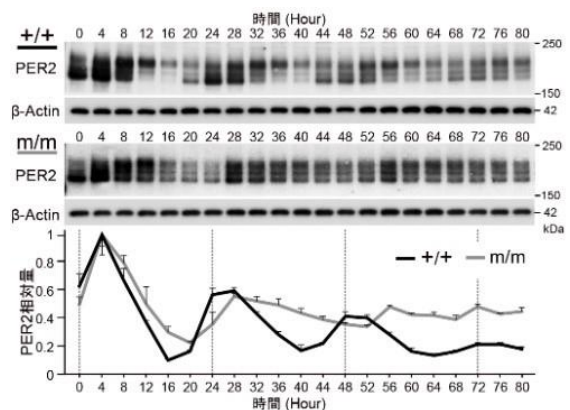


図 3. E'-box 変異による PER2 蛋白質発現リズムの消失

3. 波及効果、今後の予定

今回我々はノンコーディング DNA が動物個体の適切な活動/体温の日内変動の維持に必須であることを示しました。ノンコーディング DNA 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ました。しかし、ノンコーディング DNA が発生の段階を過ぎた成体において個体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これまで確たる実験的証拠に欠けていました。本研究は、この問題に対し、独自に開発したノンコーディング DNA 点変異マウスを用いることにより、ノンコーディング DNA を介したダイナミックな制御がマウス成体において活動/体温の日内リズムを生み出すことを実験的に初めて証明しました。従来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付ける重要な知見を提供することができたといえます。

最近の大規模臨床試験によるゲノムワイド関連解析において、朝型・夜型に相関する一塩基多型(SNP)が見出され、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ます。我々の今回の点変異マウスを用いた解析は、体内時計を制御するノンコーディング領域の役割を理解する上で最初の重要な一歩になるかもしれません。

4. 研究プロジェクトについて

今回の発見は、下記機関より資金的援助を受けて実施されました。

- JST 戦略的創造研究推進事業 CREST 生命動態の理解と制御のための基盤技術の創出 JPMJCR14W3
- 文部科学省・科学研究費補助金【新学術領域研究】温度生物学 15H05933
- 国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED) JP18gm5010002
- 日本学術振興会(JSPS)・文部科学省科学研究費補助金基盤研究 17H01524, 18H04015

<論文タイトルと著者>

タイトル：Non-coding cis-element of Period2 is essential for maintaining organismal circadian behaviour and body temperature rhythmicity. (Period2 のノンコーディングシスエレメントは成体の活動と体温の概日リズムの維持に必須である.)

著者：土居雅夫^{1*#}, 嶋谷寛之^{1*}, 跡部裕太^{1*}, 村井伊織¹, 林熙達¹, 高橋ゆかり¹, Fustin Jean-Michel¹, 山口賀章¹, 清成寛², 小池宜也³, 八木田和弘³, Lee Choogon⁴, 阿部学⁵, 崎村建司⁵, 岡村均^{1#}
¹京都大学大学院薬学研究科, ²理化学研究所, ³京都府立医科大学, ⁴フロリダ州立大学, ⁵新潟大学
*同等貢献著者, #責任著者

掲載誌：Nature Communications DOI：10.1038/s41467-019-10532-2