

154. がん抑制遺伝子による概日リズム新規制御機構の解明

三木 貴雄

Key words : 概日リズム, がん抑制遺伝子, pRb

京都大学 大学院医学研究科
分子腫瘍学

緒言

近年の製薬業界では、新規の薬物ターゲット候補の不足という問題に直面している。この問題を打開するためには、新規のがん制御メカニズムの解明が不可欠である。我々は、新しいアプローチとして、がんと概日リズムの解析を分子レベルで行うことにより、新規がん制御メカニズムを解明することを目的としている。

概日リズムは、日々の睡眠サイクルを含む、生体の一日約 24 時間のリズムを制御している生物の基本的な機構である。看護師や飛行機のパイロット等、シフトワークに従事する人々を対象とした大規模疫学研究において、長期的なリズムの欠失は、がん、糖尿病等の疾患と関連することが報告されている。一方、がん患者では、睡眠リズム障害が見られることや、糖尿病患者では、インスリン代謝リズム障害等が見られ、がんの罹患率も高いことが報告されている。上記の知見は、がんと概日リズムには、緊密な関連性があることを示唆している。しかし、その分子機構は未だ不明である。我々は、この問題に、がん抑制遺伝子 pRb による概日リズムの制御という新規の視点から分子メカニズムを解明することによりアプローチする。

最近の研究で、概日リズムと細胞周期、DNA 損傷応答に密接な関連があることが明らかとなっている。現在までに、以下のような報告がなされている。

- 1) 概日リズムの形成に必須のコア分子である PERIOD2 (PER2) の欠損マウスはがん化しやすい。
- 2) PER2 をはじめとした種々の時計遺伝子の発現は、臨床がんにおいてその悪性度と負の相関が見られる。
- 3) *Neurospora* の Period4 は哺乳類のがん抑制遺伝子 Checkpoint2 のオーソログである。
- 4) マウスへの放射線照射により概日リズムが変化する。

これらの証拠から、がんと概日リズムには緊密な関わりがあり、PER2 をはじめとした概日リズムの重要な構成遺伝子は、同時にごん抑制遺伝子でもあることが示唆される。我々は、これらの知見を逆にとり、がん抑制遺伝子の中には、概日リズムの構成因子であるものが存在するという仮説の検証を試みている。

我々はこれまでに、がん抑制遺伝子である p53 が、概日リズムの直接の制御因子であることを報告した¹⁾。p53 は、Per2 プロモーターの進化的に保存された領域かつ、BMAL1/CLOCK という Per2 の正の転写因子の結合部位である E-box を含む配列に結合し、BMAL1/CLOCK の E-box 領域への結合を競合的に阻害することにより転写を抑制することを明らかとした。実際、p53 欠損マウスでは、Per2 の発現が上昇し、概日リズムが短周期であることを見出した。さらに我々は、がん抑制遺伝子 Promyelocytic leukemia (PML) が PER2 の核内移行を制御し、概日リズムを制御することを報告した²⁾。PML は、急性前骨髄球性白血病 (APL) の 95% 以上で、PML/RAR α の融合遺伝子が形成されることから、APL の病因と考えられている重要ながん抑制遺伝子である。また、Pml/Per1, Pml/Per2 二重欠損マウスは、Per1, Per2, Pml 単欠損マウスと比較し、概日リズムにさらなる異常が見られることから、Pml は概日リズムの重要な制御因子であることを報告した³⁾。これらの研究は、がん抑制遺伝子による概日リズムの直接の分子制御機構を初めて明らかとしたものである。

上述の研究をさらに発展させるために、我々は、PML や p53 が概日リズムの制御因子であるならば、それらと相互作用するがん抑制遺伝子も概日リズムの制御因子となり得るのではないかという仮説を以下の 2 点をもとに立案した。

- (1) PML は p53 等の標的蛋白質を PML nuclear body と呼ばれる微小環境に集積させ、その活性を制御する。

(2) PML と結合する遺伝子の中には, SIRT1, CBP, HP1 のように, これまでに概日リズムの制御因子として報告されたものが多数存在する.

これらのことから, PML や p53 と複合体を形成する代表的ながん抑制遺伝子である pRb の概日リズムの制御における役割を解析することを目的とした. pRb は, p53 と並び, 最もがんで変異が見られるがん抑制遺伝子で, 細胞周期や, DNA 損傷応答に重要な遺伝子である. しかし, pRb と概日リズムの直接の関連を示唆する研究は未だ報告されていない. 本研究では, がん抑制遺伝子 pRb が, 概日リズムを直接制御し, がんの制御を行うという新たな経路が存在する可能性の検討を行う.

方 法

- 1) 最近, 視交叉上核に比較的特異的なプロモーターとして Vesicular GABA Transporter (Vgat) が概日リズムの解析に使用されている. 我々は, Vgat-cre マウス (Jackson laboratory #016962) と pRb^{flox/flox} マウス (NCI #01XC1) を用い, 視交叉上核特異的 pRb 欠損マウスを作製し, 概日リズム行動解析を行おうと試みた.
- 2) Pml 欠損 MEF 細胞と種々の遺伝子発現ベクターを用いて Per2 プロモーターのルシフェラーゼレポーターアッセイを行い, Pml の pRb 制御における関わりを検討した.
- 3) pRb は E2F 等の転写因子と結合し, その活性を制御する. そのため, pRb が Per2 の主な転写因子である BMAL1/CLOCK のヘテロダイマーの転写活性に影響を与える可能性を, E2F を過剰発現させた場合に Per2 プロモーターのルシフェラーゼレポーターアッセイを行うことにより検討した.
- 4) 期待された結果が上記 1~3) のアプローチでは得られなかったため, 異なるアプローチとして, 他の概日リズム制御因子への pRb の影響を検討するために, pRb 欠損マウス MEF 細胞に, pRb を強制発現させ, 24 時間後に細胞を回収し, 概日リズム関連遺伝子 (Per1, Per2, Bmal1, Cry1) の発現量を qPCR 法を用いて定量した.

結果および考察

- 1) まず Vgat-Cre マウス (Jackson Laboratory) と Rb^{flox/flox} マウスを掛け合わせ, Vgat-cre;Rb^{flox/+} マウスを得た. さらに得られた Vgat-Cre;Rb^{flox/+} マウスと Rb^{flox/flox} マウスを掛け合わせ, Vgat-Cre;Rb^{flox/flox} マウスを作製しようと試みた. 掛け合わせの結果, Vgat-Cre;Rb^{flox/flox} マウスをメンデルの法則に従い得た. しかし, 生後まもなく致死となり, 成体になるマウスは得られなかった.
- 2) Pml 欠損 MEF 細胞に種々の遺伝子発現ベクターをトランスフェクションし, Per2 プロモータールシフェラーゼアッセイを行った結果, 野生型と比べて, pRb による Per2 プロモーター活性化程度に違いは見られなかった.
- 3) 野生型 MEF 細胞に, BMAL1/CLOCK と E2F1, E2F4, E2F6 を発現させ, Per2 プロモーター活性の変化を観察しようとした. しかし, E2F は pRb による転写促進効果には影響を与えなかった.
- 4) pRb 強制発現に伴い, Per2 の微小な発現上昇を確認した. さらに, 転写抑制因子である Cry1 の発現が有意に減少していた (図 1).

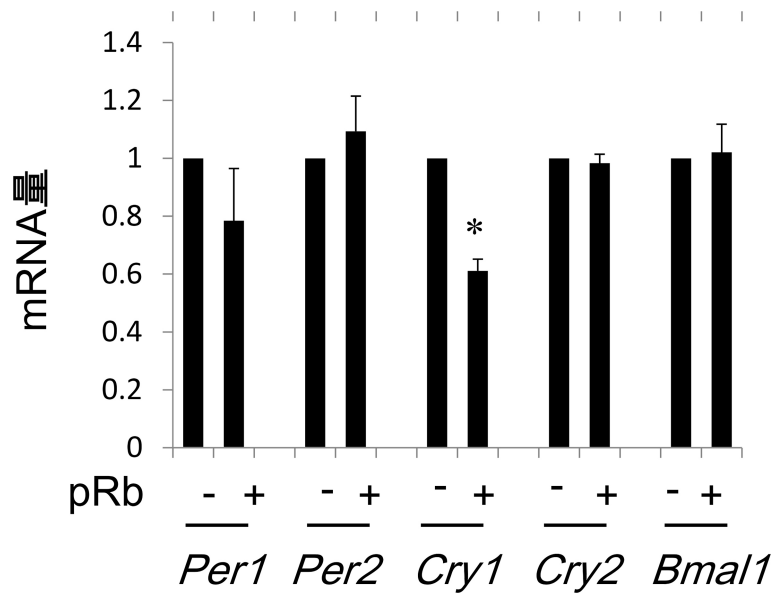


図1. pRb 過剰発現による概日リズム遺伝子の発現変化.

pRb 欠損 MEF 細胞に pRb を発現させ、24 時間後に mRNA を回収し、概日リズム関連遺伝子の発現量を qPCR 法により定量した。Cry1 の発現が pRb を発現させることにより減少していた。p < 0.05.

以上の結果から、pRb による Per2 の転写活性化機構は、抑制因子である Cry1 の減少により起こる可能性を示唆している。

共同研究者

本研究の共同研究者は、金沢大学がん進展制御研究所腫瘍分子生物学研究分野の高橋智聡教授である。

文 献

- 1) Miki, T., Tomoko, M., Zhao, Z. & Lee, C. C. : p53 regulates Period2 expression and the circadian clock. *Nat. Commun.*, 4 : 2444, 2013.
- 2) Miki, T., Xu, Z., Chen-Goodspeed, M., Liu, M., Van Oort-Jansen, A., Rea, M., Zhao, Z., Lee, C. C. & Chang, K. : PML regulates PER2 nuclear localization and circadian function. *EMBO J.*, 31 : 1427-1439, 2012.
- 3) Miki, T., Chen-Goodspeed, M., Zhao, Z. & Lee C. C. : Circadian behavior of mice deficient in PER1/PML or PER2/PML. *J. Circadian Rhythms*, 11 : 9, 2013.