

## 125. 視交叉上核非依存性体内時計に關与する microRNA

木下 千智

帝京大学 医学部 薬理学講座

Key words : microRNA マイクロアレイ, 概日リズム, 体内時計

### 緒 言

多くの生物は地球の自転周期-明暗 24 時間サイクルの行動リズムを示すが、自律性の体内時計を持つため光非存在下においても約 24 時間の概日リズムを有する。24 時間の日内リズムに同調させる環境因子で最も強力なのが光であり、網膜からの光の信号が視神経を介し時計中枢である視交叉上核に入力することで毎日体内時計をリセットしている。視交叉上核は末梢の組織や細胞に存在する体内時計を同調させる働きがあり、様々な生理現象リズムを支配している。しかしながらヒトでは光非存在下においては体温リズム及び血中メラトニンリズムが次第に睡眠覚醒リズムと乖離し内的脱同調を引き起こすことから、視交叉上核以外にも概日リズムを支配する組織が存在する可能性が示唆されている。我々は、この本態が microRNA と呼ばれる 20 数塩基程度の短い 1 本鎖ノンコーディング RNA 分子にあると考えた。その裏付けとして、概日リズム機構は主に転写翻訳によるフィードバックループにより構成されるが、生理現象リズムの中には microRNA によるエピジェネティック制御により創り出されているものが存在することを我々がすでに明らかにしている。そこで我々は、microRNA マイクロアレイにより網羅的に microRNA リズムを測定し、視交叉上核非依存性体内時計を制御すると考えられる microRNA の解析を行った。

### 方法および結果

8~10 週齢の ddY 雄性マウスを明暗 12 時間ずつの条件で少なくとも 1 週間飼育し、光環境に同調させた。点灯時を ZT0、消灯時を ZT12 として ZT2、8、14、20 の各時間において炭酸ガス吸入下においてリン酸緩衝液を心臓から灌流し中脳を摘出した。中脳の懸濁液から RNA を抽出し、各時間における 5 サンプルをプールし microRNA マイクロアレイ解析を行った。75 パーセントイルにてチップ間補正を行い、各時間帯における microRNA 発現量 (ZT2 vs ZT8、ZT2 vs ZT14、ZT2 vs ZT20、ZT8 vs ZT14、ZT8 vs ZT20、ZT14 vs ZT20) において 1.5 倍以上あるいは 0.67 倍以下変動した microRNA を日内リズムを有する候補として抽出した。

解析の結果、条件に該当する microRNA を 116 個得た (図 1)。このことから、マイクロアレイ解析に用いた microRNA 総計 1,055 個のうち約 10 %が 1.5 倍以上の振幅を持って日内変動することが明らかになった。このうち、miR-200b の振幅は約 6.4 倍と最も大きく、miR-3472 や miR-375 がそれぞれ約 4.5 倍、4.3 倍と次いだ。

また、3 倍以上の振幅を持つ microRNA の 6 割が ZT14 に最大値を持つ日内リズムを持った (図 2)。さらにこのような顕著な振幅を持つ microRNA のうち 6 割が ZT20 に最小値を持ち ZT14 に最小値を持つものは存在しなかった。2.5 倍以上 3 倍未満の中程度の振幅を持つ microRNA では、ZT8 に最大値を持つものが 5 割と最も多かった。ZT20 に最大値を持つ microRNA は振幅が小さくなるほど増加し、ZT20 に最小値を持つものは振幅が小さくなるほど減少した。

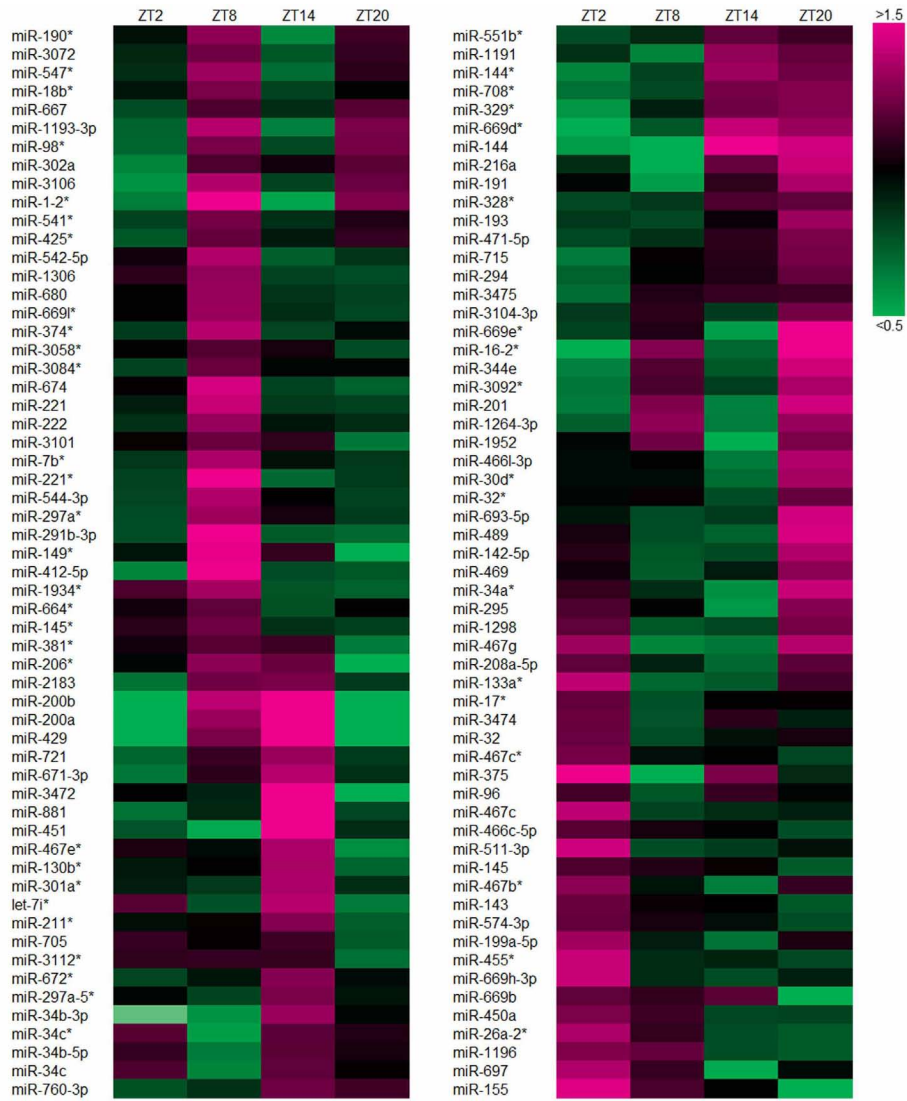


図1. 日内リズムを有する microRNA 候補

microRNA マイクロアレイにより microRNA の日内リズムパターンを解析した結果、顕著な発現変動を持つ microRNA を同定した。microRNA 発現量の可視化グラフを示す。スケールは右パネルに示した。

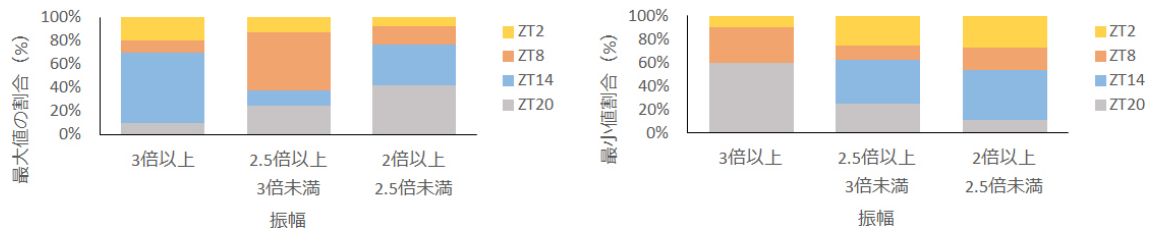


図2. 日内リズムを刻む microRNA 発現量が最大及び最小になる時間帯の割合

日内変動する microRNA の発現量が最大値及び最小値を記録する時間帯の割合をグラフにした。それぞれ、ZT2 (黄色)、ZT8 (橙)、ZT14 (青)、ZT20 (灰) で示す。

## 考 察

視交叉上核非依存性体内時計の存在については長らく議論されてきたが、その正体は未だ不明である<sup>1)</sup>。我々は、その本体が microRNA により作り出される概日リズムではないかと考え、microRNA の日内リズムのマイクロアレイ解析を行った。その結果、顕著な日内リズムを持つ microRNA を 116 個得た。これらの microRNA の日内リズムは、振幅の大きさにより最大値や最小値を示す時間帯が異なることが明らかになった。これは制御する生理現象リズムにより、microRNA を使い分けていることを示唆するのではないかと考えられる。

しかしながら視交叉上核非依存性体内時計の正体を突き止めるには、さらに視交叉上核依存性体内時計の影響を取り除く必要がある。動物に飲水でメタンフェタミン投与を行うと行動リズムが視交叉上核の支配を無視し視交叉上核非依存性の概日リズムを作り出すことが知られている<sup>1)</sup>。これはヒトにおける光非存在下の内的脱同調によく特徴が似ている。メタンフェタミン依存性リズムはその作用からドパミン投射経路に深く関与することが予想され、事実、メタンフェタミン飲水ラットにおいては黒質や線条体、大脳皮質、嗅球等のドパミン投射経路に関与する脳組織において時計遺伝子発現の位相変化が見られる。これらのことから、メタンフェタミン飲水投与により発現リズムに変化が見られる、あるいは振幅が変化する microRNA を同定することにより、視交叉上核依存性体内時計の本体に迫ることができると予想している。

最後に本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

## 文 献

- 1) Honma K, Honma S. The SCN-independent clocks, methamphetamine and food restriction. *Eur J Neurosci.* 2009 Nov;30(9):1707-17. doi: 10.1111/j.1460-9568.2009.06976.x. PMID: 19878275