

論文概要

○論文題目 Glucocorticoid receptor による Clock 複合体を介した
Rev-erb α (Nr1d1) の抑制性転写制御メカニズム

○指導教員

人間総合科学研究科 疾患制御医学専攻 島野 仁 教授

(所 属) 筑波大学人間総合科学研究科 疾患制御医学専攻

(氏 名) 村山 友樹

目的：

Glucocorticoids (GCs) は臨床上非常に重要な薬剤であり、広く使用されているが、同時に副作用の大きい薬剤であり、その副作用の軽減は重要な課題となっている。そのレセプターである Glucocorticoid receptor (GR) は様々な転写活性を持つ転写因子であり、薬理作用の多くはこの転写活性によって生じていることがわかっている。GR の新しい転写制御メカニズムを明らかにすることで、有効な効果の増強や副作用の軽減につながることを期待されるため、本研究では代謝および時計遺伝子と関連の深い Nr1d1 に着目して GR による新規転写制御メカニズムの解析を行った。

対象と方法：

副腎切除マウスにおける、GR リガンド作動薬であるデキサメタゾン (DEX) 投与による遺伝子発現の変化を示したマイクロアレイの既報データを参照し、発現変動がある遺伝子の網羅的検索を行った。変動が大きく、再現性の高い遺伝子に限定し、そのプロモーター領域における GR-ChIP の既報データを参照して、GR が直接ゲノムに作用するであろう新規の GR 転写制御メカニズムを有する可能性のある遺伝子を選定した。さらに機能についての既報を参照し、マウスの肝臓における Rev-erb α (Nr1d1) の遺伝子発現の抑制効果を対象にプロモーター解析を行った。解析の手法は培養細胞におけるルシフェラーゼアッセイの他に In Vivo Ad-luc 法を用いて生体でのプロモーター解析も行った。抑制性の制御は古典的な GR の結合配列 (GRE) による遺伝子発現調整ではないと考えられたことから、特に GR と複合体を形成する蛋白に注目してメカニズムの解析を進めた。

結果：マウスに副腎切除術を施行し、DEX 投与することで肝臓における Nr1d1 の発現抑制を確認した。In vivo Ad-luc 法において、生体のマウス肝臓におけるプロモーター解析を行ったところ、DEX 投与により Nr1d1 のプロモーター活性の抑制が確認された。細胞においても Bmal/Clock の発現下において GR および DEX 依存性の Nr1d1 のプロモーター抑制が認められ、それは複数の細胞株において同様であった。さらに、Nr1d1 プロモーター上の Ebox 領域のみに限定しても同様の抑制が認められ、GR は Ebox 上で Nr1d1 を抑制することが示唆された。また、GR とすでに関連の報告されている抑制性の時計遺伝子である Per1 をノックダウンして影響を排しても同様の抑制が残存した。免疫沈降実験において Clock-GR 複合体の形成を細胞株およびマウス肝臓の核内で検証したところ、特に核内ではリガンド依存性に複合体を形成していることが明らかになった。最後に ChIP アッセイでマウスの肝臓の核内において Ebox への GR の結合を確認したところ、リガンド依存性の結合が確認され、Clock の Ebox への結合は阻害しない結果を得た。これらの結果より、GR はマウスの肝臓においてリガンド依存性に核内移行し、Clock と蛋白-蛋白結合することによって Ebox 上に結合し、Nr1d1 の転写抑制をすることが明らかになった。

考察：

GR の転写制御メカニズムはこれまでに多種報告されているが、本研究において明らかになった GR の転写抑制メカニズムは「テザリング」として知られる、他の転写因子との蛋白-蛋白結合による特異的配列に対する抑制効果と考えられた。これまでに AP-1 や NF- κ B などの遺伝子がこの様式で報告されているが、今回の Clock/Bmal1 複合体も新たにこのリストに入ると考えられた。ほかの遺伝子の Ebox 上でも同様の転写制御メカニズムが想起されるが、本研究ではそこまでの検証に至らず、今後の課題と考えられた。

時計遺伝子はそれぞれの因子が複雑なフィードバックシステムを形成しているが、通常の GR (GCs) の発現変動と Nr1d1 の発現変動は逆位相を取っており、互いに抑制効果により日内ループを形成しているとも考えられる。しかし、ストレス時などの末梢臓器における日内リズムも変動の必要があるときに関しては、GCs の分泌によって時計周期を調整する生体的意味があると推定された。また、第三の臓器特異的因子によるさらなる抑制メカニズムの違いもあるかもしれない。時計中枢に関しては、肝臓と異なり SCN ニューロンにおいて GR が発現していないことが、中枢の時計遺伝子においてストレスなどの影響の少ない規則正しい日内リズムを形成することができる理由の一つと考えられた。

同時に Nr1d1 は代謝にも関与する遺伝子であり、発現が減少すると中性脂肪の増加や肥満などといった影響があることが報告され、そのリガンド作動薬は代謝疾患の治療薬として期待されている。本研究の結果から、GCs の代謝への副作用の一部は Ebox 上での Clock 複合体を介した Nr1d1 の抑制によるとも考えられ、今後の副作用軽減につながることを期待する。

結論：

GCs 依存性に GR が Clock と核内で複合体を形成し、分子的な結合で直接 Ebox 上に結合することにより、Rev-erb α の発現を抑制するという新しい GR の転写制御メカニズムが明らかになった。