



Title	Kid-1 participates in regulating ERK phosphorylation as a part of the circadian clock output in rat kidney
Author(s)	倭, 正也
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/54153
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

【3】

氏名	倭正也
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第23273号
学位授与年月日	平成21年5月15日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科情報伝達医学専攻
学位論文名	Kid-1 participates in regulating ERK phosphorylation as a part of the circadian clock output in rat kidney (Kid-1はラット腎臓において概日時計出力系の一部としてERKのリン酸化の制御に関与する)
論文審査委員	(主査) 教授 楽木 宏実 (副査) 教授 下村伊一郎 教授 奥山 明彦

論文内容の要旨

〔目的〕

哺乳類では行動や生理的な機能を司る約24時間の概日リズムを形成する中枢時計は視交叉上核(SCN)に存在し、時計遺伝子(*Per1*, *Per2*など)により制御されている。近年、腎臓や肝臓などの末梢組織にも時計機構が存在することが明らかになった。この末梢組織における時計(末梢時計)は通常はSCNに存在する中枢時計に従属されているが、昼間のみの摂食時間の制限(制限給餌)を行うことにより、明暗サイクルやSCNから独立した位相で制御されること、さらに末梢時計は細胞周期をも制御することが報告されているが詳細な制御機構は十分に解明されていない。そこで本研究ではラット腎臓においてこれらの制御機構について検討した。

〔方法ならびに成績〕

8時 light on (Zeitgeber time: ZT0) / 20時 light off (ZT12)、自由摂食の飼育条件下で、7日齢のSprague-Dawley (SD) ラットを2群に分け、連日ZT0あるいはZT12の決まった時刻に5-bromo-2'-deoxy-uridine (BrdU) の腹腔内注射を4週間行った。皮質の尿細管上皮細胞におけるBrdU陽性細胞(細胞周期のS期に取り込まれる)の数はZT0ラベル群がZT12ラベル群に比し著明に多かった。糸球体内の細胞に関してはBrdU陽性細胞は両者に差がなく認められた。次に、3週齢のSDラットを自由摂食群あるいは制限給餌 (ZT5-ZT9) 群の2群に分け、前処置として11日間飼育した後に、同様の給餌条件下でZT0, ZT6, ZT12, ZT18の6時間刻みの4群に分け(計8群)、BrdUの腹腔内注射を各々の固定した時刻に3週間連日投与した。自由摂食群ではBrdU陽性細胞は皮質から皮膚境界部に存在し、その数にはZT0ラベル群で最大、ZT12ラベル群で最小となる日内リズムが認められた。一方、制限給餌群ではBrdU陽性細胞数はZT12ラベル群で最大となるも、明らかな日内リズムは認められなかった。また、いずれの群においても糸球体内にはBrdU陽性細胞数は認められなかった。この日内リズムの同調因子を検索するため、自由摂食下における3週令および6週齢のラット腎臓全体および単離糸球体における時計遺伝子*Per1*, *Per2*の4時間毎のmRNA発現量変化をNorthern blot法にて解析したところ、意外にも同位相のリズム形成が認められ、糸球体には認められず尿細管にのみ認められた細胞増殖リズムの同調因子として古典的な時計遺伝子以外の因子の存在が示唆された。一方、制限給餌 (ZT5-ZT9) 下では*Per1*, *Per2*のmRNA発現量の日内リズムの位相は既存の報告のように自由摂食条件下からのシフトが確認された。しかし、単離糸球体における時計遺伝子*Per1*, *Per2*のmRNA発現量の日内リズムは自由摂食条件下では腎臓全体と同位相であったが、制限給餌下での位相のシフトは、単離糸球体では腎臓全体に比して明らかではなかった。この結果より尿細管と糸球体では末梢時計の同調制御に違いがあることが示唆された。そこで、腎臓における細胞周期のS期のリズム形成および末梢時計の同調制御因子に関与する候補となりうる周期的に発現変動するラット腎臓内遺伝子を探索したところ、KRAB-Zinc-finger型の転写因子であるKid-1と時計遺伝子*Per1*のmRNA発現リズムが自由摂食条件下での1日齢および6週齢のラット腎臓全体において同位相であることが見いだされた。またさらにKid-1は制限給餌 (ZT5-ZT9) 条件下では時計遺伝子*Per1*, *Per2*と同様にmRNAの位相シフトが認められることから何らかの機序により概日時計により制御されていることが推察される一方、シフトの程度は*Per1*, *Per2*に比して明らかではなかった。次に、1日齢および6週齢の腎臓におけるKid-1の発現部位を *in situ* hybridization法にて解析したところ1日齢のラットでは成長過程にあるネフロン内では認められず、髓質内の尿細管上皮細胞にのみ認められることが、また6週齢のラットではBrdU陽性細胞の分布と同様に皮質から皮膚境界部の尿細管上皮細胞に存在し、またそれにおいても糸球体内の細胞ではほとんど発現が認められないことが判明した。

さて、ERK1/2は細胞周期のG1-S期の移行を制御することが知られている。また、時計遺伝子*Per1*, *Per2*のmRNA発現変動の位相のリセットにも作用することが近年報告されている。そこで6週齢のラット腎臓におけるERK1/2の4時間毎のリン酸化の変動をWestern blot法にて調べたところ自由摂食下の腎臓全体ではZT12-16において最大となる日内リズムが観察されたが、制限給餌 (ZT5-ZT9) 条件下では明らかな日内変動は観察されなかった。また単離糸球体ではいずれの摂食条件下においても日内変動は観察されなかった。次に、Kid-1の抗体を作製し、同様にタンパク発現量を調べたところ日内変動が認められ、Kid-1の発現量が増加するとERK1/2のリン酸化が減少する位相が観察された。さらにKid-1をNRK52E細胞(ラット腎尿細管

上皮由来細胞)においてRNAiにより発現低下させたところERK1/2のリン酸化が昂進し、さらに強制発現させるとリン酸化が減少することが確認された。これらの結果よりKid-1の発現変化がERK1/2のリン酸化の日内変動に影響することが示唆された。

[総 括]

ネフロンの成長、維持過程において尿細管上皮細胞の特定部位が、概日リズムに従って同期して細胞増殖していることが明らかになった。Kid-1は概日時計出力系の一部としてラット腎臓において、末梢時計の発現同調および細胞周期のG1-S期移行に関与するERK1/2のリン酸化の制御に関与することが示唆された。

論文審査の結果の要旨

哺乳類では約24時間の概日リズムを形成する中枢時計は視交叉上核に存在し、時計遺伝子(*Per1*, *Per2*など)により制御されている。近年、腎臓や肝臓などの末梢組織における時計機構(末梢時計)の存在および末梢時計と細胞周期との関連性が報告されているがその制御機構は十分に解明されていない。そこで申請者は本研究においてラット腎臓における末梢時計の発現制御および細胞周期との関連について検討した。申請者はネフロンの成長および維持過程のラット腎皮質および皮髓境界部の尿細管上皮細胞の細胞増殖に概日リズムが存在することおよび腎糸球体内の細胞に関しては同様のリズム形成は認められないことを明らかにした。さらに腎臓全体と糸球体とで末梢時計の制御機構に違いがあることを明らかにした。そこでこれらの制御因子を探査したところ、尿細管において強く発現するも糸球体での発現量が極めて弱い転写因子Kid-1が腎臓全体において時計遺伝子*Per1*, *Per2*と同調したmRNAおよびタンパク発現量のリズムを形成することを明らかにした。このKid-1の発現をNRK52E細胞(ラット腎尿細管上皮由来細胞)においてsiRNAにより低下させること、さらに強制発現させることにより、Kid-1がERK1/2のリン酸化の制御を介して細胞周期のG1-S期の移行および末梢時計の発現同調に関与することを明らかにした。本研究は腎臓におけるKid-1を介した末梢時計の制御機構および細胞周期制御について新規で重要な知見を示したことより学位に値するものと認める。