

平成30年6月15日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08212

研究課題名(和文) 哺乳類概日時計における温度補償モジュールの同定

研究課題名(英文) Identification of temperature compensation mechanisms in the mammalian circadian clock

研究代表者

土谷 佳樹 (Tsuchiya, Yoshiki)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：30456777

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、哺乳類概日リズムの温度補償性を規定する分子モジュールを明らかにするため、周期変化をもたらす遺伝子欠損をマウスES細胞に導入し、分化後に形成される概日リズムを測定した。概日リズムはCry2やCK1 γ 、CK1 δ の欠損により長周期を示し、さらに、CK1 δ :CK1 γ :Cry2の三重欠損では30時間を超える長周期が観察された。異なる温度条件下で概日リズムを測定したところ、どの細胞株においても温度補償性が大きく損なわれることはなかったが、CK1 δ / γ の欠損株では温度補償性の若干の減弱が見られた。このことから、CK1 δ / γ が概日リズムの温度補償性の成立に関与している可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to reveal mechanisms underlying temperature compensation of the mammalian circadian clock. We established a series of mouse embryonic stem cell (ESC) lines with single or multiplex clock gene ablations. ESC-based in vitro circadian clock formation assay reveals that complexed mutations, such as the CK1 δ :CK1 γ :Cry2 mutant, exhibit an additively lengthened circadian period. By using these mutant cells, we also investigated the relation between period-length alteration and temperature compensation. Although CK1 δ deficient cells slightly affected the temperature-insensitivity of period-length, we demonstrated that the temperature compensation property is largely maintained in all mutants. These results show that the ESC-based assay system could offer a more systematic and comprehensive approach to the genotype-chronotype analysis of the intracellular circadian clockwork in mammals.

研究分野：分子生物学

キーワード：概日リズム 温度補償性

1. 研究開始当初の背景

内因性の自律リズムである概日リズムは、光や温度といった外部環境の影響を受け、環境の24時間サイクルに同調・適応している。外界の温度変化が光とならび概日時計の同調因子として働く一方、概日リズムの周期長は環境温によらずほぼ一定であるという性質をもつ。この性質を概日リズムの温度補償性と呼ぶ。一般に、生化学反応はその反応速度が温度依存性であるため、環境温の影響を免れることはできない。したがって、温度に依存しない性質を示す概日リズムの周期長には、特殊な調節機構が備わっていると考えられる。しかしながら、概日リズムの温度補償性は、その発見から50年以上が経過した現在でも、依然としてその成立メカニズムがほとんど分かっていない。特に、哺乳類概日リズムの分子基盤である時計遺伝子群による転写フィードバックループに関しては、温度の影響をどのように補償しているかについての実験データの蓄積が極めて少ないのが現状である。概日リズムの温度補償性を説明する有力な仮説の1つに、バランス説がある。これは、概日リズム形成において、周期を長くする反応モジュール(順反応)と短くする反応モジュール(逆反応)があり、どちらも温度依存的に反応速度が上昇するために、結果として周期長が一定に保たれるという考え方である。他にも、周期長を決める反応モジュールそのものが温度に依存しない反応であるとする説もある。いずれの説にせよ、周期の長さに影響を与える個々のモジュールを破壊あるいは操作することで、温度補償性を破綻させることができると考えられる。実際に、シアノバクテリアやアカパンカビ、ショウジョウバエの時計遺伝子の変異体で周期長が変化するものの中には、温度補償性に影響する変異も見つかっている。例えば、アカパンカビで長周期を示す *prd-3* 変異体は温度補償性の異常が報告されており、ショウジョウバエでも主要時計遺伝子 *per*, *tim* の二重変異体に温度補償性異常が見つかっている。哺乳類概日時計においても温度補償性が変化するような遺伝子変異が存在する可能性は高いと考えられるが、これまでのところそのような遺伝子変異は報告されていない。その理由として、温度補償性が冗長性の高いシステムであり、単一の遺伝子欠損では影響が見られない可能性や、温度補償性を規定する分子モジュールが概日時計の振動体そのものと密接にリンクしているため、温度補償性のみを破綻させた概日リズムの作製・観察が困難である可能性などが考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、哺乳類概日時計の温度補償性を規定する分子モジュールを同定するため、CRISPR/Cas9 システムを用いて複数の遺伝子

欠損および遺伝子変異 ES 細胞を樹立し、マウス ES 細胞の概日時計発生系を利用した概日リズムの温度補償性解析を行う。

3. 研究の方法

マウス ES 細胞の培養

Per2::Luciferase 融合遺伝子ノックインマウス由来 ES 細胞は Dr. Joseph Takahashi に分与いただいた (Yoo et al. 2004)。ES 細胞は 37℃, 5% CO₂ 条件下で ES cell medium (G-MEM (Wako), 15% FBS (Hyclone), 0.1 mM 日必須アミノ酸 (ナカライ), 0.1 mM 2-メルカプトエタノール (Sigma), 1,000 U/mL LIF (Wako), 100 u/mL ペニシリン・ストレプトマイシン (ナカライ)) を用いて培養した。

CRISPR/Cas9 によるゲノム編集

Cas9 発現ベクター (Addgene #41815) およびガイド RNA (gRNA) 発現ベクター (Addgene #41817) を用いて標的遺伝子に対するターゲティングを行った。各遺伝子の標的配列は以下の通りである。下線部は PAM を示す。
 Cry1: 5'-TCCTCGACCCCTGGTTCGCCGG-3'
 Cry2: 5'-CGGCGCTCCTCGGTGCACTGG-3'
 Csnk1d: 5'-TGGGCCGCAAGATCGGCAGCGG-3'
 Csnk1e: 5'-GGGAAATAAGTATCGCCTGGG-3'
 Per2::Luc ノックイン ES 細胞に FuGENE HD (Promega) を用いて Cas9 発現ベクターと gRNA 発現ベクターをトランスフェクションし、コロニーピッキングによって変異細胞株を樹立した。

ES 細胞の分化誘導

0.25%トリプシンで ES 細胞を処理した後、ゼラチンコートディッシュ上に播種して 20 分静置し、フィーダー細胞を除去した。その後、96-well の低接着性丸底プレートに 2,000 細胞/well で播種し、分化用培地 (DMEM 高グルコース (ナカライ), 10% FBS, 1 mM ピルビン酸ナトリウム (ナカライ), 0.1 mM 日必須アミノ酸, 2 mM GlutaMAX 1 (Invitrogen), 0.1 mM 2-メルカプトエタノール, 100 u/mL ペニシリン・ストレプトマイシン) で培養した。2 日後、胚様体 (EB) をゼラチンコートした 24-well プレートに移して培養を続け、2 日おきに培地を交換した。

リアルタイム発光測定

分化誘導後 28 日目に、100 nM デキサメタゾンおよび 0.2 mM ルシフェリンを含む培地に交換し、光電子増倍管 (PMT) を用いて発光を継続測定 (1 分間測定, 20 分間隔) した。

リズムの周期解析

得られた発光リズムのデータに下記のサインカーブによるフィッティングを行い、リズムの周期長を算出した。

$$y(t) = Ae^{-kt} \sin\left(\frac{2\pi(t-\phi)}{\tau}\right)$$

A: 振幅, k: 減衰定数, t: 時間, τ : 周期長, ϕ : 位相

温度補償性の解析

発光測定時の環境温を 33.5 および 36.0 に設定してリズム測定を行った。温度係数 Q_{10} を以下の式により算出した。

$$Q_{10} = \left(\frac{\tau_1}{\tau_2}\right)^{\frac{10}{T_2-T_1}}$$

- τ_1 : 温度 T_1 の時の周期長
- τ_2 : 温度 T_2 の時の周期長

4. 研究成果

時計遺伝子ノックアウト ES 細胞の分化に伴い形成される概日リズムの周期長は、ノックアウトマウスの表現型と一致した変化を示す

CRISPR/Cas9 システムを用いて時計遺伝子 *Cry1* および *Cry2* のノックアウト ES 細胞を作成し、分化に伴い形成される概日リズムを測定した。その結果、CRY1 欠損細胞では短周期、CRY2 欠損細胞では長周期を示し、CRY1/CRY2 の二重欠損細胞ではリズムが顕著に減弱した (図 1)。これらの概日リズムの変化は、報告されている CRY1, CRY2 欠損マウスの表現型とよく一致しており、本実験系が概日リズムの遺伝的性質の解析に有用な実験系であることを示す結果が得られた。

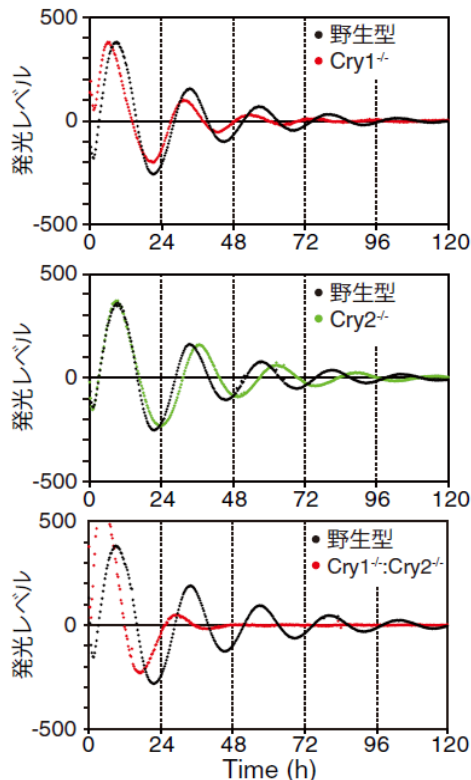


図 1. CRY1, CRY2 欠損細胞の概日リズム

CKI δ およびCKI ϵ の欠損細胞は長周期を示す

概日リズムの周期長に大きな影響を及ぼす因子としてタンパク質キナーゼ CKI δ と CKI ϵ が知られている。ES 細胞において CRISPR/Cas9 システムによってこれら 2 つの遺伝子をターゲティングし、分化誘導後の概日リズムを観察した。その結果、CKI δ の欠損細胞では周期が延長したが、CKI ϵ の欠損では周期延長が見られなかった (図 2)。このとき、CKI δ 欠損細胞において CKI ϵ を片アリル欠損させると、より顕著な周期延長が見られた (図 2)。これらの結果から、CKI δ と CKI ϵ は共に概日リズムの周期制御に関わっており、CKI δ の非存在下では CKI ϵ が周期決定に重要な働きを果たすことが明らかとなった。

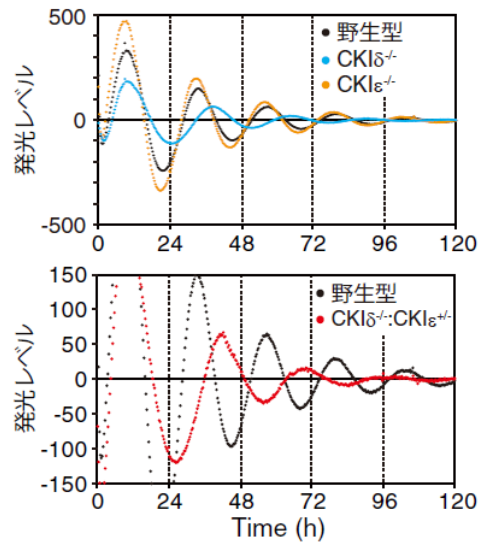


図 2. CKI δ , CKI ϵ 欠損細胞の概日リズム

CKI δ , CKI ϵ , CRY2 の三重欠損細胞は 30 時間以上の超長周期リズムを示す

周期長と温度補償性の関係を詳細に調べるため、CKI δ :CKI ϵ の二重欠損細胞にさらに CRY2 を欠損させるゲノム編集を行った。作出した CKI δ :CKI ϵ :CRY2 の三重欠損細胞を分化させ、形成される概日リズムを測定した。その結果、この細胞は約 31 時間の超長周期を示した (図 3)。

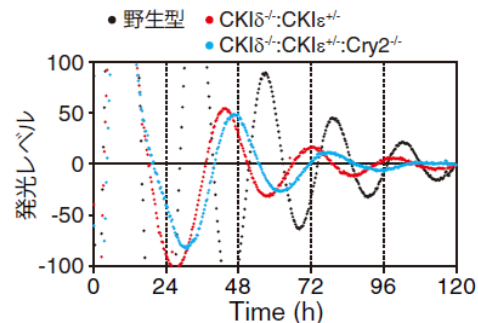


図 3. CKI δ :CKI ϵ :CRY2 三重欠損細胞のリズム

長周期変異体における概日リズムの温度補償性

周期長と温度補償性の関係を解析するた

め、作出した周期異常を示す時計遺伝子欠損細胞の概日リズムを、周囲の環境温を変えて測定した。すると、興味深いことに、長周期を示す変異体でも、温度効率を示す Q_{10} 値は 1 前後に収まっていた (図 4)。このことは、遺伝的に規定された周期長には、22 時間から 31 時間にわたり温度補償性が保たれていることを示している。また、 $CK1\delta$, $CK1\epsilon$ の欠損細胞ではわずかに Q_{10} 値が高くなっていることから、 $CK1\delta$, $CK1\epsilon$ の機能が温度補償性の成立に参与している可能性が示唆された。

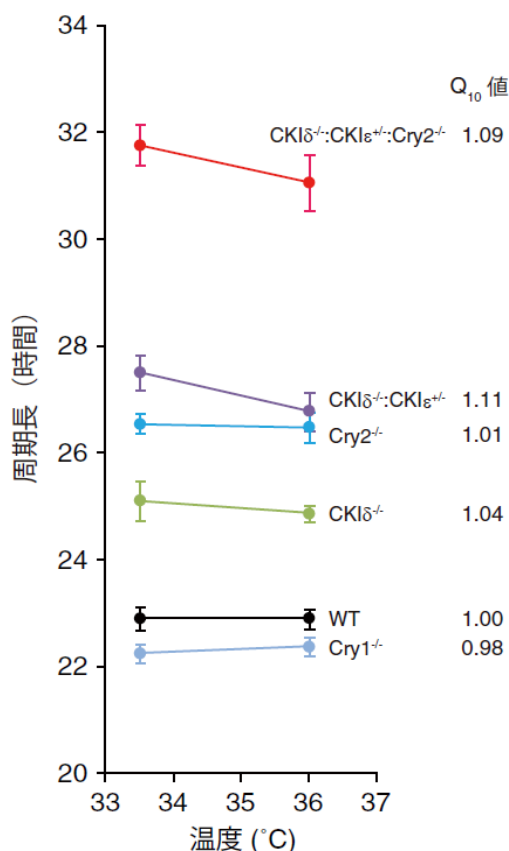


図 4 . リズム周期変異体の温度補償性

以上の結果から、周期異常を示す概日リズム変異体においても温度補償性が保たれていることが明らかとなった。このことは、周期長の温度補償性の成立に、周期制御因子すべてが参与しているわけではないことを示唆している。さらに、 $CK1\delta$, $CK1\epsilon$ が温度補償性に参与していることを示す結果を得た。 $CK1\delta$ ノックアウトマウスは胚性致死であることから、マウス個体レベルでの解析が難しい。したがって、本研究によって確立した ES 細胞を用いた遺伝子ノックアウトおよび分化誘導による概日リズム測定系は、概日時計の分子メカニズムを解析する有用な系となることが期待される。また、 $CK1\delta$, $CK1\epsilon$ の二重ホモ欠損細胞は作出できなかったことから、 $CK1\delta$, $CK1\epsilon$ が細胞の生存や増殖に必須であることが推察される。そのため、今後は $CK1\delta$, $CK1\epsilon$ の概日時計形成における基質に注

目し、遺伝子ノックアウトおよび野生型あるいは変異体による遺伝子レスキューを行うことで、遺伝子変異の温度補償性への影響を検証していけると考えている。本研究により、概日リズムの温度補償性の強固さが示され、そのメカニズム解明に繋がる知見が得られた。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Tsuchiya Y, Umemura Y, Minami Y, Koike N, Hosokawa T, Hara M, Ito H, Inokawa H, Yagita K.

Effect of Multiple Clock Gene Ablations on the Circadian Period Length and Temperature Compensation in Mammalian Cells.

J Biol Rhythms. 31:48-56. (2016)

doi: 10.1177/0748730415613888.

[学会発表](計 1 件)

土谷佳樹. The CRISPR/Cas9-mediated disruption of clock genes in mouse ES cells. 第 22 回日本時間生物学会学術大会 (2015)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

土谷 佳樹 (TSUCHIYA, Yoshiki)

京都府立医科大学大学院医学研究科・講師

研究者番号 : 3 0 4 5 6 7 7 7

(3) 連携研究者

八木田 和弘 (YAGITA, Kazuhiro)

京都府立医科大学大学院医学研究科・教授

研究者番号 : 9 0 3 2 4 9 2 0