

令和元年6月28日現在

機関番号：24302

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K01917

研究課題名(和文)動物細胞の時計リズムのNO、COシグナルによる制御機構の解析

研究課題名(英文)Analysis of circadian rhythm regulated by nitric oxide (NO) or Carbon monoxide (CO)

研究代表者

佐上 郁子 (SAGAMI, IKUKO)

京都府立大学・生命環境科学研究科・研究員

研究者番号：10143033

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：動物細胞を用いて内在性の時計遺伝子の発現リズムに対するCO、NOの影響をリアルタイムで解析した。その結果、細胞同調後24時間後にCO処理すると、Per2遺伝子の発現リズムの位相は処理直後から顕著に前方にシフトし、Bmal1の位相は時間経過とともに前方にシフトした。Per2遺伝子へのNPAS2転写因子の結合は、CO処理によって阻害され、CO効果はNPAS2の機能阻害によることがわかった。一方で、同様のNO処理ではPer2、Bmal1の発現リズムの位相は、それぞれ後方、前方に動いたことから、CO、NOシグナルによる体内時計の制御は異なることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

体内時計は高血圧や糖尿病、肥満などの生活習慣病発症や季節的な精神活動の低下と関連する。したがって、本研究によるガス小分子による時計制御分子機構の解明は、新たな体内時計の制御システム構築の可能性を含み、体内時計の変調が原因となる疾患やその治療法や健康問題の解決に大きく貢献する事が期待出来る。さらに、時計制御因子にCOやNOと同様の構造変化/機能制御を誘起しうる小分子治療薬の開発に役立てることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the effects of CO or NO on expression rhythms of endogenous clock genes using real-time circadian gene reporter studies. We found that the CO treatment of the cells at 24 h after the synchronization resulted in the forward phase-shifts of the Per2 and Bmal1 expression rhythms with different modes. The Chip analysis revealed that the CO significantly inhibited the binding of NPAS2 to the E-boxes of Per2 gene, indicating the regulation of circadian rhythms by CO via NPAS2. Interestingly, the NO treatment resulted in the reverse effects on the Per2 and Bmal1 expression rhythms, suggesting that mammalian clock was differently regulated by CO and/or NO signaling system.

研究分野：生物化学

キーワード：体内時計 時計遺伝子 CO NO 転写因子 ヘムタンパク質

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

哺乳類の体内時計は、コア時計転写因子 CLOCK あるいは NPAS2 と BMAL1 とのヘテロダイマーによる Per や Cry などの標的時計遺伝子の転写活性化と、翻訳産物の PER や CRY タンパク質による転写のフィードバック阻害によってリズムが形成される。CLOCK、NPAS2、BMAL1 は、さらに核受容体 ROR や REV-ERB の遺伝子発現を制御し、逆にこれらのコア時計転写因子の発現は ROR や REV-ERB によっても制御されている。近年、これらの因子のなかで、CLOCK、NPAS2、PER2、ROR や REV-ERB などはヘムタンパク質であることが明らかになり、ヘム合成系とヘムを介した CO シグナルや NO シグナルによる体内時計の制御が注目されている。

これまで申請者は、NPAS2 の構造と機能制御機構について研究してきた。NPAS2 はそのヘムへの CO 結合によって DNA 結合活性が阻害されるが、ヘム軸配位子のとなりの Cys170 がヘムによる CO センシングに重要な残基であるということを示した。一方、NO は CO と同様に NPAS2 の還元型ヘムに結合するが、NO 添加によって野生型の DNA 結合活性はむしろやや増加することがわかった。以上の結果は、NPAS2 の機能は CO シグナルと NO シグナルを介してそれぞれ異なる制御を受けることを示唆している。さらに、NPAS2 のホモログの CLOCK についても、培養細胞系および *in vitro* での解析をおこなった結果、CLOCK は NPAS2 と同様にヘムを結合するが同じ濃度の CO や NO によってはその機能が制御されないことを明らかにした。つまり、NPAS2 と CLOCK は、それぞれ CO シグナルおよび NO シグナルによる制御機構が異なることを示唆している。一方、REV-ERB は、ヘム結合によって活性化型、そのヘムへの NO 結合によって不活性化型となることから、その標的の Bmal1 や Npas2 の遺伝子発現も NO で制御される事が示唆される。

### 2. 研究の目的

本研究では、ヘムを介した CO シグナルや NO シグナル伝達系による体内時計の制御機構を明らかにすることを目的として、動物細胞 NIH3T3 を用いて、内在性の時計遺伝子 Per2 や Bmal1 遺伝子の発現リズムの位相や振幅に対する CO や NO、加えてヘムやヘム合成系阻害の影響をリアルタイムで解析する。さらに、最近 Per2 遺伝子発現は転写因子 NPAS2 に、また Npas2 遺伝子発現は ROR/REV-ERB で制御される事が報告されたので、E-box あるいは RORE 領域へ結合状態を経時的に解析し、時計リズムに対する CO や NO の効果が実際に NPAS2 あるいは REV-ERB を介した遺伝子発現制御によるかどうかを明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) Per2 遺伝子と Bmal1 遺伝子の発現リズムの位相は、リアルタイム RT-PCR 法により約 12 時間ずれることが報告されている。そこで、Per2、Bmal1 の遺伝子のエンハンサー/プロモーター領域をルシフェラーゼ遺伝子上流に組み入れたレポーター遺伝子を安定的に発現する NIH3T3 細胞を作成し、それぞれの遺伝子の発現リズムを、ルシフェリン発光のリアルタイムモニタリングによって解析する。CO および NO の効果を調べるために、培地に CO あるいは NO の発生試薬を添加し、時計リズムの振幅、位相に対する影響を調べる。CO あるいは NO を添加する条件 (リズムの山、谷での処理、処理濃度、処理時間等) を変動させて、その効果を調べる。

(2) CO あるいは NO によって時計遺伝子発現のリズムの変化が見られた系について、NPAS2 や BMAL1、REV-ERB の抗体を用いた ChIP アッセイによって、遺伝子のエンハンサー/プロモーター領域の E-box あるいは RORE 領域への NPAS2 や BMAL1、REV-ERB の結合状態を解析する。

### 4. 研究成果

(1) マウス Per2 あるいは Bmal1 遺伝子のプロモーター/エンハンサー領域 (それぞれ NPAS2(CLOCK) /BMAL1 の結合する E-box、REV-ERB 結合する RORE を含む) をルシフェラーゼ遺伝子上流に組み入れたレポーター遺伝子を NIH3T3 細胞に導入し、安定に発現する細胞株を単離した。この細胞集団をデキサメサゾン Dex 処理することで時計リズムを同調し、同調後 24 時間目に培地中に CO 発生試薬 CORM2 [Ru(CO)<sub>3</sub>Cl<sub>2</sub>]<sub>2</sub> を投与することで、リズムに対する CO の効果をリアルタイムで観測した。その結果、CO 投与後 Per2 レポーターの発現の振幅が CO 濃度依存的に減少し、位相が前方にシフトした。また、生体内では CO はヘムオキシゲナーゼ HO による遊離ヘムの分解によって生産されることから、その HO の基質となる hemin やヘム合成阻害剤の亜鉛プロトポルフィリン (ZnPP) 処理による効果の解析も同様に行った。Dex 同調から 24 時間後 hemin 処理すると CORM2 を添加したときと同じく Per2 の発現リズム位相が前方にシフトし、反対に ZnPP 処理によって Per2 発現の位相が後方シフトした。また、Per2 レポーターとは逆の位相を示す Bmal1 レポーターの発現の振幅は予想に反して CO 投与によって減少し、CO 投与後の位相全体が時間経過とともにやや前方にシフトした。一方で、細胞同調後 36 時間後に CO を投与すると Per2 発現リズムの位相が後方に動いたことから、添加時間によって時計リズムに対する CO 効果は異なることが示唆された。これらの結果は、時計リズムのコア制御因子である Per2、Bmal1 遺伝子の発現はヘムや分解物である CO によって制御されるが、リズムのどのタイミングで CO シグナルが入るかで効果が異なることを示している。

(2) ChIP アッセイを用いて NPAS2、BMAL1 と Per2 遺伝子上の E-box との結合量を調べたところ、CO 処理によって NPAS2、BMAL1 の E-box DNA 結合量は減少した。さらに、CO の投与後の経過時間に従って細胞クロマチンを調整し、NPAS2 抗体、REV-ERB 抗体を用いて ChIP アッセイをおこなった。その結果、同調後 24 時間後に CO を投与したとき、数時間にわたり Per2 E-box への NPAS2 の結合が阻害された。また、REV-ERB  $\alpha$  の Bmal1 RORE への結合は CO を投与によってあまり変化しないことがわかった。このことから、細胞同調後 24 時間後 CO 投与による Per2 発現リズム位相の前方シフトは、CO による NPAS2 の機能阻害が主な要因であることが示唆された。これに対して同調後 36 時間後に CO を投与したとき 元々の Per2 の発現が低く明確な CO による影響はみられなかった。

(3) さらに NO の発生試薬である NOC12 を培地に投与したところ、NO は Per2 の発現振幅にはほとんど影響しないが、Bmal1 の発現の振幅を減少させた。また、同調後 24 時間目での Per2、Bmal1 の発現リズムの位相は、それぞれ一過性でやや後方、やや前方に動くが、経過時間とともに効果が小さくなった。これらの結果から、それぞれの遺伝子発現に関与する転写因子の機能に対する NO 効果が CO 効果と異なることが示唆された。

以上、細胞内でヘムや CO、NO シグナルが時計リズムの位相や振幅に影響を与えることを示した。さらにシグナルの入るタイミングによって時計リズムの位相が前方、後方どちらにも変動しうることから、CO、NO シグナルの効果の多様性が明らかになった。今後、ヘムや CO、NO シグナルを時計制御に応用するには、これらの効果の詳細な分子レベルの機構を明らかにする必要がある。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Mikasa T, Kugo M, Nishimura S, Taketani S, Ishijima S, Sagami I\*. “Thermodynamic Characterization of the Ca<sup>2+</sup>-Dependent Interaction Between SOUL and ALG-2.” *Int J Mol Sci*. **19**, 査読あり, 2018, E3802. doi: 10.3390/ijms19123802.
- ② Minegishi S, Sagami I, Negi S, Kano K, Kitagishi H.\* “Circadian clock disruption by selective removal of endogenous carbon monoxide” *Sci Rep*. **8**, 査読あり, 2018, 11996, doi: 10.1038/s41598-018-30425-6.
- ③ Adachi Y, Umeda M, Kawazoe A, Sato T, Ohkawa Y, Kitajima S, Izawa S, Sagami I, Taketani S.\* “The novel heme-dependent inducible protein, SRRD regulates heme biosynthesis and circadian rhythms” *Arch Biochem Biophys*, **631**, 査読あり, 2017, 19-29, doi: 10.1016/j.abb.2017.08.006.

[学会発表] (計 4 件)

- ① 明田瑞加、芳井克洋、石寫純男、佐上郁子  
体内時計転写因子 NPAS2 の補因子や pH 感知ドメインの解析  
第 89 回日本生化学会大会, 2016
- ② 竹多景子、小野美姫、石寫純男、佐上郁子  
動物細胞における Per2 遺伝子発現リズムの CO による制御  
第 89 回日本生化学会大会, 2016
- ③ 竹多景子、小野美姫、石寫純男、佐上郁子  
動物細胞における時計遺伝子発現リズムの一酸化炭素・一酸化窒素による制御  
生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017), 2017
- ④ 三笠太輔、西村星吾、久郷将見、石寫純男、佐上郁子  
SOUL と ALG-2 の相互作用とその熱力学的解析  
生命科学系学会合同年次大会(ConBio2017), 2017

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。