

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06338

研究課題名(和文)概日時計-生理機能連関におけるREV-ERB / の細胞内制御機構

研究課題名(英文)Function of REV-ERBa/b in regulation of cellular circadian physiology

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：核内受容体 REV-ERB とREV-ERB は概日時計の制御や代謝など様々な生理機能に関わる転写因子であるが、REV-ERB / の二重欠損の影響は詳しく調べられていなかった。本研究ではREV-ERB / の二重欠損マウス胚性幹細胞を作製し、REV-ERB / による遺伝子発現リズムの制御について解析した。REV-ERB欠損は時計遺伝子Per2の発現リズムには影響しなかったが、網羅的遺伝子発現解析の結果、REV-ERB欠損によって概日性の発現リズムを示す遺伝子セットが大きく変化することが明らかとなった。このことは、REV-ERBが概日時計の出力機構に重要な役割を果たしていることを示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、代謝や免疫、神経機能などの広範な生理機能を担う遺伝子群の発現制御に関わるREV-ERB / がこれらの生理機能と概日時計を結ぶハブとしての役割を果たしていることを示した。本研究で樹立したREV-ERB / 欠損ES細胞を神経細胞や筋細胞など特定の細胞種に分化させることで、概日リズム出力機構におけるREV-ERB / の役割を細胞レベルで解析することが可能である。REV-ERBの活性調節は概日リズム関連疾患の治療標的としても有望であると考えられ、本研究の発展はREV-ERBが関与する生理機能リズム制御機構の解明および代謝や免疫など様々な生理機能疾患の治療応用に繋がると期待される。

研究成果の概要(英文)：The nuclear receptors REV-ERB and REV-ERB are involved in the cell-autonomous circadian transcriptional/translational feedback loops as well as in regulation of metabolic, neuronal, and inflammatory functions. Given the multifunctional role of REV-ERBs, it is important to elucidate the mechanism through which REV-ERBs exert their functions. To this end, we established a Rev-erb /Rev-erb double-knockout mouse embryonic stem (ES) cell model and analyzed the circadian gene expressions. A comprehensive mRNA-seq analysis revealed that the double knockout does not abrogate expression rhythms of E-box-regulated core clock genes but drastically changes a diverse set of other rhythmically-expressed output genes. Of note, REV-ERB / deficiency does not compromise circadian expression rhythms of PER2, while REV-ERB target genes, Bmal1 and Npas2, are significantly upregulated. This study highlights the relevance of REV-ERBs as pivotal output mediators of the mammalian circadian clock.

研究分野：概日リズム

キーワード：概日リズム 核内受容体 転写フィードバックループ

1. 研究開始当初の背景

核内受容体 REV-ERB α および REV-ERB β は肝臓における胆汁酸産生や筋のエネルギー代謝、褐色脂肪細胞における熱産生やマクロファージなどの免疫機能、神経におけるドーパミン産生など、様々な生理機能を制御していると言われている (Everett & Lazar, *Trends Endocrinol Metab* 2014)。また、その発現には明瞭な概日リズムが認められ、REV-ERB によって制御される生理機能の概日リズム性調節に寄与していると考えられる。さらに、REV-ERB α 欠損マウスを用いた解析などから、REV-ERB が概日リズム形成機構である転写翻訳フィードバックループにおいて、サブループの形成に重要な働きをしていることが示されている (Preitner et al. *Cell* 2002)。この REV-ERB α 欠損マウスでは行動リズムの異常は軽微で、概日リズムは維持されていたことから、REV-ERB は概日時計形成において必須因子ではないと考えられたが、REV-ERB には α と β の2つのサブタイプが存在するため、 β によって α の欠損が補償されている可能性も考えられた。そして、2012年に REV-ERB β 欠損および REV-ERB α/β 二重欠損マウスが報告され、全身性の REV-ERB α/β 二重欠損マウスは出生時に死亡するが、肝臓特異的な二重欠損マウスでは肝臓における概日時計の形成が異常となっており、また、成体マウスでの薬剤誘導性の時期特異的な二重欠損では行動リズムが顕著に減弱することが報告され、概日時計発振機構における REV-ERB の重要性が示唆された (Cho et al. *Nature* 2012)。しかしながら、組織特異的なノックアウトによる個体レベルでの観察では概日リズム中枢である視交叉上核やその他の組織からの影響、神経機能などの概日時計以外の影響を排除することができず、1細胞レベルの概日時計発振分子機構における REV-ERB の重要性は依然として明らかではない。したがって、概日時計発振機構における REV-ERB の役割と、様々な生理機能を概日性に制御するという概日時計出力系因子としての REV-ERB の役割を明確にし、REV-ERB の概日リズム制御における機能の全容を解明することは、代謝、免疫機能、神経機能などの生理機能と概日リズムとの機能連関を知るうえで非常に重要である。

2. 研究の目的

本研究課題では、REV-ERB の細胞内での概日時計発振機構における役割と、標的遺伝子の発現制御という概日時計出力系としての役割を明らかにし、概日時計システムにおける REV-ERB の機能を解明することを目的とした。具体的には、REV-ERB α/β 二重欠損 ES 細胞株を樹立し、分化に伴う概日時計の形成を調べて REV-ERB の概日時計形成における役割を明らかにすること、および、REV-ERB α/β の二重欠損により発現が変化する遺伝子群を同定し、REV-ERB の制御する遺伝子ネットワークを網羅的に解析することを目的とした (図1)。

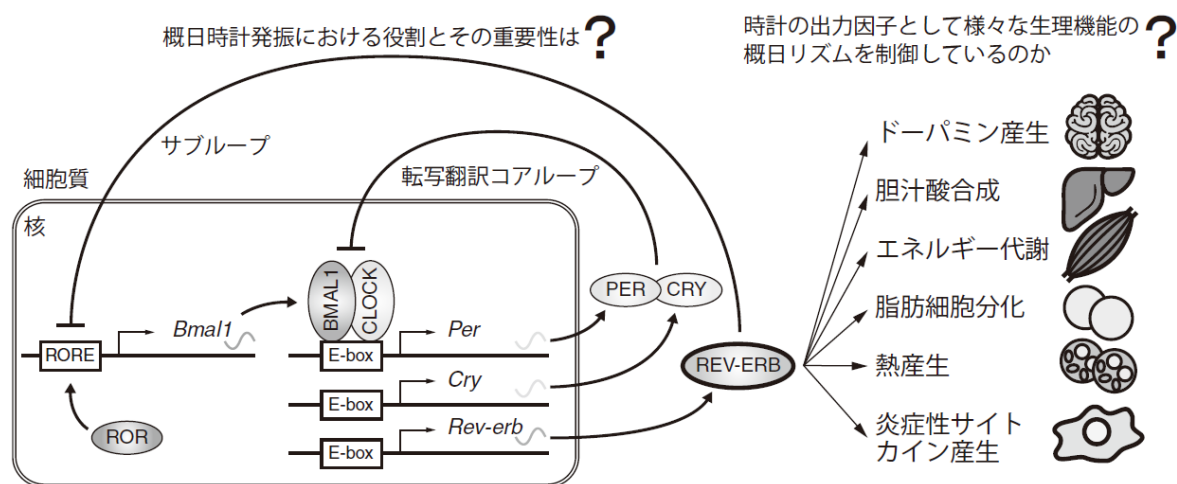


図1. REV-ERB α/β の機能に関して解明すべき「問い」

3. 研究の方法

細胞培養

Per2::Luciferase 融合遺伝子 (Per2::Luc) 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°C, 5% CO₂ 条件下で ES cell medium (G-MEM

(Wako), 15% FBS (Hyclone), 0.1 mM 非必須アミノ酸 (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。Per2::Luc ノックインマウス由来胚性線維芽細胞 (MEF) は 37°C, 5% CO₂ 条件下で MEF medium (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 非必須アミノ酸, 2 mM GlutaMAX I (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) 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 gRNA 発現ベクター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。
Rev-erba-1: 5'-CCCAGACGTAGTTGATAGAGTT-3'
Rev-erba-2: 5'-TGCAAGGTGAGGCGGGTTAGGG-3'
Rev-erbβ-1: 5'-CTACTGATAGATACCAGTAAGG-3'
Rev-erbβ-2: 5'-GGGTTTAACTCACTATGGTTGG-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 非必須アミノ酸, 2 mM GlutaMAX I (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。

RNA 発現量の測定

分化誘導後 28 日目に、100 nM デキサメタゾンを含む培地に交換し、培地交換の 12 時間後から 60 時間後まで 4 時間おきに計 12 点で細胞を凍結し、RNeasy Mini kit (Qiagen) を用いて RNA を抽出した。M-MLV 逆転写酵素 (Invitrogen) を用いて cDNA への逆転写反応を行い、合成した cDNA を鋳型としたリアルタイム定量 RT-PCR により各遺伝子の相対発現量を測定した。各サンプルにおける遺伝子発現量は 18S rRNA の発現量で補正した。

RNAseq 解析

PolyA RNA セレクションおよび TruSeq RNA Sample Prep Kit v2 を用いたライブラリー構築、Illumina 社 NovaSeq6000 によるシークエンシング (101-bp ペアードエンド) は委託先のマクロジェン・ジャパンで行われた。リードは STAR を用いてマウスゲノム (GRCm38/mm10) にマッピングし、University of California, Santa Cruz (UCSC) の既知遺伝子セット (32,989 遺伝子) に対して、Homer を用いてリード数をカウントした。12 サンプルの平均が 0.5RPM 以上の遺伝子を発現遺伝子として解析した。概日リズム性の判定には Metacycle を用いた。転写因子結合モチーフの解析には Homer を用いた。

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

4. 研究成果

Rev-erba, Rev-erbβ ノックアウト ES 細胞の作製

Per2::Luciferase レポーターのノックインマウス ES 細胞において、時計遺伝子 Rev-erba の第 3 エキソンおよび Rev-erbβ の第 4 エキソンを標的とした CRISPR によるエキソン欠失を導入し、Rev-erba/β の二重欠損細胞を作製した。(図 2)。作製した Rev-erba/β のダブルノックアウト (KO) ES 細胞において、標的エキソンを含む mRNA の発現が検出できないことを確認した。

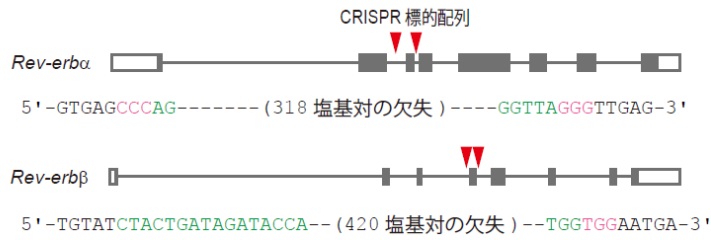


図 2. CRISPR/Cas9 による *Rev-erba/β* 遺伝子のノックアウト

Rev-erba, Rev-erbβ ノックアウトによる遺伝子発現リズムへの影響

Rev-erb ノックアウトによる概日性遺伝子発現の変化を調べるため、野生型(WT)および *Rev-erb* ノックアウト(KO)ES 細胞を胚様体形成法により分化させ、分化誘導 28 日目にデキサメタゾンによる概日リズム同調を行った。各群において発現遺伝子を比較したところ、発現している遺伝子セットに大きな変化はなく (図 3A)、主要時計遺伝子である *Per1,2,3,Cry1,2* の発現量も同等であった (図 3B)。しかしながら、REV-ERB の直接の標的遺伝子であることが知られている *Bmal1* および *Npas2* は発現量が上昇しており、REV-ERB の欠損による影響が見て取れた。(図 3B)。

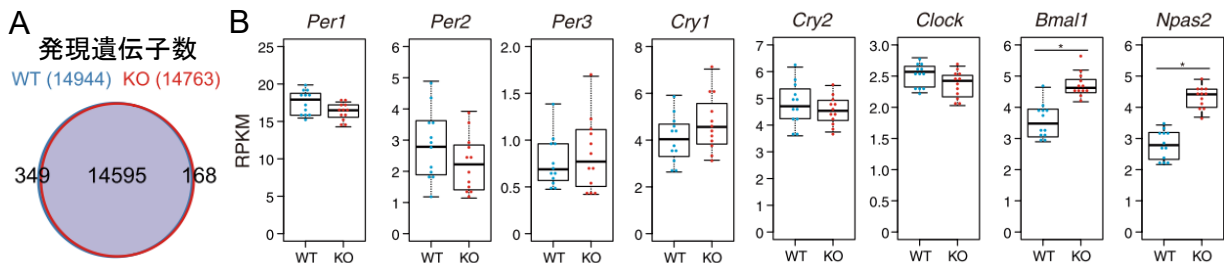


図 3. *Rev-erba/β* ノックアウトによる遺伝子発現の変化

Rev-erba, Rev-erbβ ノックアウト細胞における網羅的遺伝子発現リズム解析

次に、RNAseq 解析で得られた 4 時間おきの発現データから概日性に発現振動している遺伝子群を同定した。その結果、WT・KO 共に振動していたのはわずか 15 遺伝子で多くが主要時計遺伝子であった (図 4A)。また、KO では WT で振動していた多くの遺伝子の振動が見られなかった一方で、WT では振動が見られなかった遺伝子群の発現リズムが観察された (図 4A,B)。時計遺伝子のうち *Per2* や *Cry1* など E-box 配列を介した発現調節を受ける遺伝子の発現リズムは REV-ERB 欠損の影響をあまり受けていなかったが、REV-ERB が RRE 配列を介して直接転写抑制していることが知られている *Bmal1, Npas2* については、WT では発現リズムが見られたが、KO では発現が恒常的に亢進していた (図 4C)。これらの結果は、REV-ERB が E-box を介した時計遺伝子発現リズムにはあまり影響していないが、RRE を介した転写リズムや概日時計の出力先である多くの遺伝子の発現リズムを制御している可能性を示唆しており、REV-ERB の欠損により細胞の分化状態を含めた概日遺伝子ネットワークが大きく変化していると考えられた。

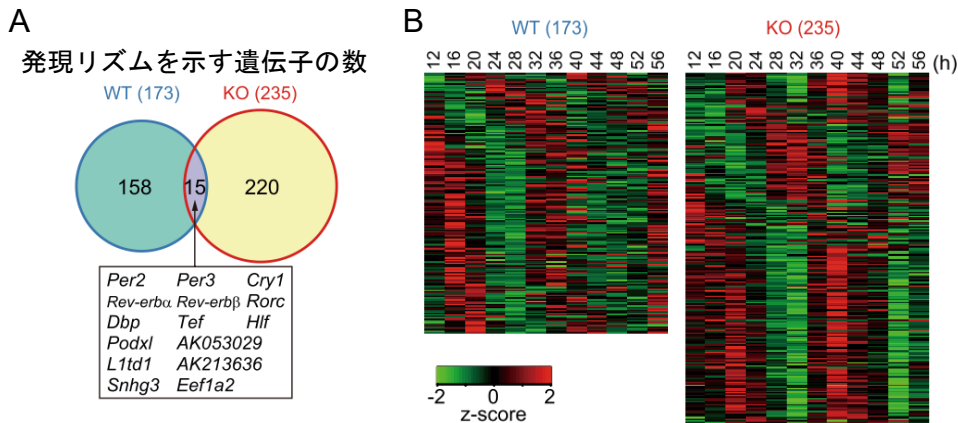


図 4. *Rev-erba/β* ノックアウトによる遺伝子発現リズムの変化

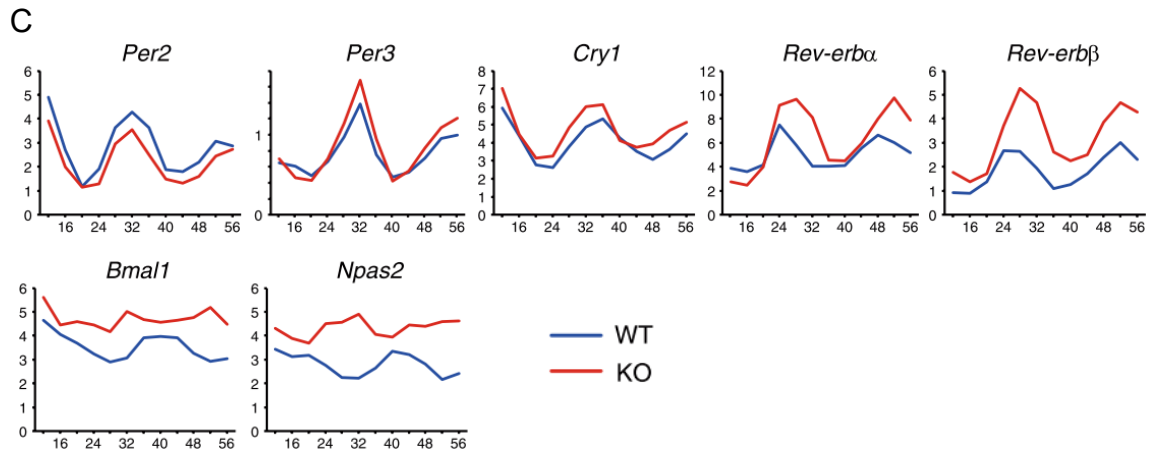


図 4. Rev-erb α/β ノックアウトによる遺伝子発現リズムの変化

Rev-erb α , Rev-erb β ノックアウト細胞では PER2::LUC 発光リズムは維持される

また、REV-ERB 欠損細胞の PER2::LUC レポーターの発光リズムをリアルタイム測定した結果、野生型と同等の発光リズムが観察された (図 5A)。リズムの周期及び振幅にも差は見られなかったことから、REV-ERB α/β は PER2 発現リズムの形成には必須ではないことが明らかになった (図 5B)。

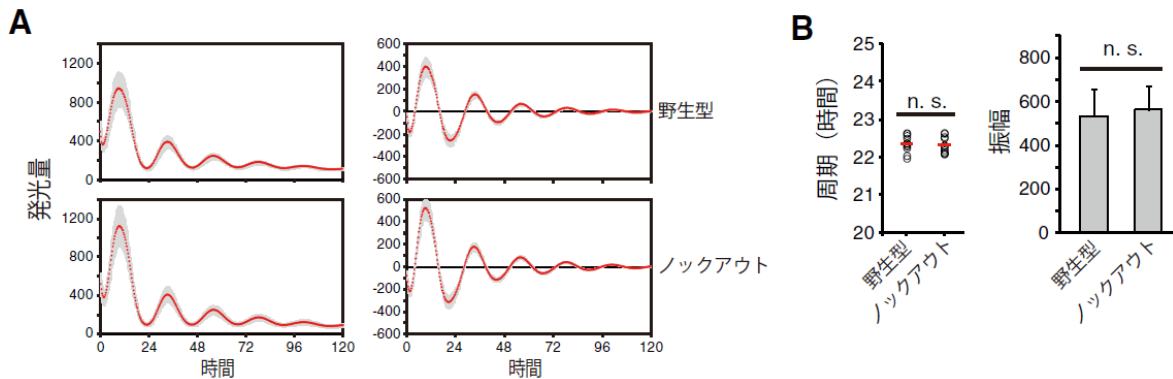


図 5. Rev-erb α/β ノックアウトの PER2::LUC 発現リズムへの影響

以上の結果から、REV-ERB α/β は概日時計の生み出したリズムを多くの下流遺伝子の発現リズムへと伝える出力系因子として重要な働きをしていることが示唆された。REV-ERB α/β はその発現に明瞭な概日リズムがあることが知られている。REV-ERB が代謝や免疫、神経機能などの広範な生理機能を担う遺伝子群の発現制御に関わっていることを考えると、REV-ERB には概日時計とこれらの生理機能を結ぶハブとしての役割があると考えられる。組織・細胞種により REV-ERB の制御する遺伝子群が異なっていることを考えると、生体内の各組織における REV-ERB の機能については今後詳細に調べていく必要がある。本研究で樹立した REV-ERB α/β 欠損 ES 細胞を神経細胞や筋細胞など特定の細胞種に分化させることで、概日リズムの出力機構における REV-ERB α/β の働きを細胞レベルで解析することが可能である。REV-ERB の活性調節は概日リズム関連疾患の治療標的としても有望であると考えられ、本研究の発展は REV-ERB が関与する生理機能リズム制御機構の解明および代謝や免疫など様々な生理機能疾患の治療応用に繋がると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ikeda Ryosuke, Tsuchiya Yoshiki, Koike Nobuya, Umemura Yasuhiro, Inokawa Hitoshi, Ono Ryutaro, Inoue Maho, Sasawaki Yuh, Grieten Tess, Okubo Naoki, Ikoma Kazuya, Fujiwara Hiroyoshi, Kubo Toshikazu, Yagita Kazuhiro	4. 巻 9
2. 論文標題 REV-ERB and REV-ERB function as key factors regulating Mammalian Circadian Output	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10171
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-46656-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Umemura Y, Maki I, Tsuchiya Y, Koike N, Yagita K.	4. 巻 34
2. 論文標題 Human Circadian Molecular Oscillation Development Using Induced Pluripotent Stem Cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biological Rhythms	6. 最初と最後の頁 525-532
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0748730419865436	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Oshima T, Niwa Y, Kuwata K, Srivastava A, Hyoda T, Tsuchiya Y, Kumagai M, Tsuyuguchi M, Tamaru T, Sugiyama A, Ono N, Zolboot N, Aikawa Y, Oishi S, Nonami A, Arai F, Hagihara S, Yamaguchi J, Tama F, Kunisaki Y, Yagita K, Ikeda M, Kinoshita T, Kay SA, Itami K, Hirota T.	4. 巻 23
2. 論文標題 Cell-based screen identifies a new potent and highly selective CK2 inhibitor for modulation of circadian rhythms and cancer cell growth.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Science Advance	6. 最初と最後の頁 eaau9060
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.aau9060	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ono R, Koike N, Inokawa H, Tsuchiya Y, Umemura Y, Yamamoto T, Kanamura N, Yagita K.	4. 巻 52
2. 論文標題 Incremental Growth Lines in Mouse Molar Dentin Represent 8-hr Ultradian Rhythm.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Acta Histochem Cytochem.	6. 最初と最後の頁 93-99
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1267/ahc.19017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Inokawa H, Umemura Y, Shimba A, Kawakami E, Koike N, Tsuchiya Y, Ohashi M, Minami Y, Cui G, Asahi T, Ono R, Sasawaki Y, Konishi E, Yoo SH, Chen Z, Teramukai S, Ikuta K, Yagita K.	4. 巻 10
2. 論文標題 Chronic circadian misalignment accelerates immune senescence and abbreviates lifespan in mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2569
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-59541-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tsuchiya Yoshiki, Umemura Yasuhiro, Yagita Kazuhiro.	4. 巻 27
2. 論文標題 Circadian clock and cancer: From a viewpoint of cellular differentiation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Urology	6. 最初と最後の頁 518-524
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/iju.14231	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Yoshiki Tsuchiya
2. 発表標題 The Role of REV-ERBs as Key Factors of Circadian Output.
3. 学会等名 International Symposium on Biological Rhythms ~20 years since Discovery of Mammalian Clock Genes~ (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 土谷佳樹, 八木田和弘	4. 発行年 2020年
2. 出版社 日本臨牀社	5. 総ページ数 770
3. 書名 最新臨床睡眠学 (第2版) 睡眠障害の基礎と臨床 (II. 総説(基礎研究) 体内時計の分子機構)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	八木田 和弘 (Yagita Kazuhiro) (90324920)	京都府立医科大学・大学院医学研究科統合生理学部門・教授 (24303)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関