

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14749

研究課題名(和文)概日リズム温度補償性の新規制御因子の解析

研究課題名(英文)The mechanism of temperature compensation in circadian clocks

研究代表者

伊藤 太一(Itoh, Taichi)

九州大学・基幹教育院・助教

研究者番号：20769765

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文): システムレベルにおける概日リズムの温度補償性の制御機構を解明することを目指し、ショウジョウバエを用いて時計遺伝子のperiodの翻訳制御に着目した解析を実施した。その結果、periodの翻訳制御因子であるTYFはperのmRNAとの結合力には温度補償性が備わっているものの、翻訳制御においては温度依存性であるという特殊性が存在していることを突き止めた。また、perのコドンを最適化したショウジョウバエ系統においても概日リズムの温度補償性が異常となることから、perの翻訳にはシステムレベルにおいても温度補償性を生み出す重要な分子機構が内在している可能性を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトを含めた多くの生物は生理・代謝・行動において約24時間の周期性を示す。これを概日リズムと呼ぶ。概日リズムに異常が生じると様々な病のリスクが上昇することが知られている。本研究は、種間共通の概日リズム基本原理の一つ、周期の温度補償性の分子機構を解明することを目的とした研究である。本成果では、温度補償性の分子機構の完全解明には至らなかったものの、今後重点的に研究すべき重要な分子機構を発見することができた。本成果を足がかりとして概日リズムの基本原理を完全に解明することができれば、概日リズム異常から誘導される様々な病を副作用なしに治療する手段や創薬等に貢献することが可能となるはずである。

研究成果の概要(英文): To elucidate the control mechanism underlying temperature compensation in circadian rhythms at the system level, I focused on the translational control of one of the clock genes, period (per), using *Drosophila*. I found that TYF, which is a translational regulator of per gene, has a temperature compensating property for binding to per mRNA, but has a temperature dependent in translational control. In addition, since the temperature compensation of circadian rhythms was abnormal even in the *Drosophila* strain with optimized codons of per gene, I concluded that the translation of per gene has an important molecular mechanism that produces temperature compensation even at the system level.

研究分野：時間生物学

キーワード：ショウジョウバエ 体内時計 概日リズム 温度補償性 ヒドラ

1. 研究開始当初の背景

真核生物における概日リズムの発振原理は基本的に共通であり、複数の時計遺伝子産物による転写制御のフィードバックループであらわされる。概日リズムの周期の安定性に関しては、環境温度に関わらず非常に安定であるという特筆すべき性質を備えている。これを温度補償性と呼ぶ。原核生物のシアノバクテリアでは、時計タンパク質 KaiC のリン酸化状態が 24 時間で周期的に変化することが、概日リズムの発振原理であることがわかっている (Tomita et al., 2005)。KaiC は物理化学的性質としてリン酸化速度に温度補償性が備わっているために、概日リズムにも温度補償性が生じると説明されている (Rosbash 2009)。一方、シアノバクテリアと同様に、これまでに真核生物においても特定の時計タンパク質のリン酸化速度に温度補償性が見出されている (Nakajima et al., 2005, Mehra et al., 2009, Isojima et al., 2009, Shinohara et al., 2017)。しかし複数の生化学的反応の集合体として概日振動体が成立している真核生物においてこの反応はその要素の一つにすぎず、システムとしてどのように温度補償性を制御するのかは未だ明らかとされていない。ただ、真核生物の温度補償性に影響するとされる突然変異も存在はしている (Matsumoto et al., 1999, Mehra et al., 2009, Shinohara et al., 2017)。しかし、いずれも時計遺伝子産物のミスセンス変異により生じており、それらを温度補償性の原因遺伝子と見なせるのか、あるいは、温度感受性の変異が概日周期を制御するシステムに影響を与えた結果、一見は温度補償異常に見えるのか、明確な切り分けができない。

このように温度補償性の解明に向けての手がかりはあるものの、真核生物におけるシステムとしての温度補償性成立原理の解明は、未だに残された課題のままとなっている。私はこの状況を打開すべく、ショウジョウバエを用いてシステムとしての温度補償性を変化させる遺伝子欠損系統の分離に取り組んだ。その結果、時計遺伝子のひとつである PER の翻訳調節因子である TYF の欠損系統にその手がかりを得た。TYF の欠損系統の歩行活動リズムは無周期である。しかし、その欠損系統に TYF のターゲットである PER を、プロモーターを含むゲノム全長 (13.2kb) ごと遺伝子導入して得られたレスキュー系統 (tyf^o;per13.2 系統) では、歩行活動リズムが回復するものの、この歩行活動リズムが温度依存的に変化することを発見した。これは、TYF の機能に温度補償性を生み出す原因が内在しているか、PER の翻訳異常自体に原因が内在しているか、どちらかの原因が推測される。そこで本研究では、この翻訳制御因子 TYF と PER の翻訳に着目することで、これまで解明されていなかったシステムレベルでの温度補償性の成立原理の解明を目指すこととした。

2. 研究の目的

本研究では、翻訳制御因子 TYF、および、period 遺伝子の翻訳に着目し、概日リズム制御システムにおける温度補償性成立原理を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、温度補償性成立原理を翻訳制御因子の機能の側面と period 遺伝子の翻訳の 2 つの側面からアプローチすべく、以下の実験を実施した。

(1) 温度補償性異常系統における時計細胞内の PER の挙動

温度補償性異常系統 (tyf^o;per13.2 系統) とコントロール系統を用いて、異なる温度 (18°C、28°C) での PER の発現量を調べる。具体的には、脳内に存在している時計細胞での時計タンパク質の発現量を、PER 特異的な抗体を用いた免疫組織染色で定量する。各実験は 4 時間ごとにサンプリングした系統を使用することで、発現量の周期性も確認する。

(2) 温度変化時における TYF と per の mRNA の結合力の変化

TYF と per の mRNA の結合が温度変化によりどのような変化を示すのかを調べるため、18°C、28°C において RNA 免疫沈降を行う。具体的には、培養細胞を利用し、TYF と per の mRNA を各温度で一定量発現させ、TYF に結合している per の mRNA 量を定量 PCR で調べる。

(3) PER の翻訳制御と温度補償性の関連

TYF 以外の PER の翻訳制御因子欠損系統での温度補償性を調べる。また、PER の翻訳が温度補償性に関与している可能性を検証するために、PER のコドンを変化させたトランスジェニック系統 (per^{opt}) を用い、異なる温度で歩行活動リズムを測定する。この系統において、(1) と同様に、脳内に存在している時計細胞での時計タンパク質の発現量を免疫組織染色で定量する。

(4) 他の動物における PER の翻訳と温度補償性の関係性

PER のホモログが存在していない動物を選別し、その動物における概日リズムの温度補償性を調

べる。PERに温度補償性を司る分子機構が種間で共通して内在しているのかを検証する。

4. 研究成果

(1) 温度補償性異常系統における時計細胞内のPERの挙動

tyf^(e);per13.2系統では図1のように18℃と28℃で周期が約6時間異なっている。一方で、PERのプロモーターを含むゲノム全長(13.2kb)を遺伝子導入した系統(per13.2)では、野生型(iso31系統)と同様に、温度変化によらず周期がほぼ一定である。つまり、温度補償性が備わっている。そこでtyf^(e);per13.2系統とper13.2系統を用いて18℃と28℃でのPERタンパク質の発現量を各時計細胞で調べたところ、PER発現量のみならず発現位相に明確な差が見られた。PERタンパク質は時刻により細胞質の中にある場合と核の中にある場合があり、この変化が時刻情報を生み出す要因の一つと考えられている。そのため、細胞質と核の中に存在するPERタンパク質の割合を各時刻で調べたところ、tyf^(e);per13.2系統を28℃においた時のみPERは細胞質に長く止まっていることが明らかとなった。18℃の時はtyf^(e);per13.2系統とper13.2系統に明確な差が見られなかったことから、18℃と28℃では質的に異なるPERの制御メカニズムが内在している可能性が示唆される。

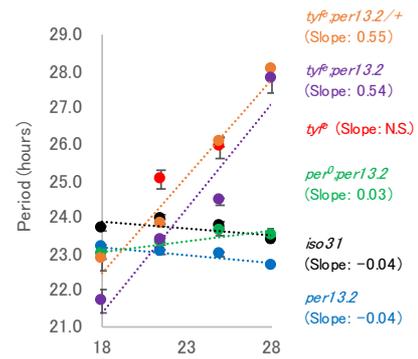


図1:各温度における活動周期

(2) 温度変化時におけるTYFとperのmRNAの結合力の変化

次に、この環境温度変化に対応したPERの翻訳調節機構の分子機構を解明すべく、温度変化によるTYFとperのmRNAの結合力に着目し、培養細胞においてRNA結合タンパク質免疫沈降法を18℃と28℃の2条件で実施した。まず、TYFとperのmRNAの発現量を各温度で同じにする必要があるため、培養細胞に発現ベクターを導入後、各時間におけるTYFとperのmRNAの発現量をウェスタンブロットと定量PCRでそれぞれ調べた。その結果、18℃では発現ベクターを導入後6時間後、28℃では発現ベクターを導入後3時間が結合力の比較に最もふさわしい条件である可能性が得られた。続いて、RNA結合タンパク質免疫沈降法を時系列で実施した結果、18℃では発現ベクターを導入後6時間後、28℃では発現ベクターを導入後3時間の条件下でTYFとperのmRNAの結合力には有意な差が生じていないことが判明した。つまり、TYFとperのmRNAの結合力には温度補償性が存在している可能性が高いと考えられる。通常の化学結合から考えた場合、温度変化によって結合力に差が生じると予測できる。そのため、この結果は、perのmRNAとTYFの結合力の温度補償性が概日リズムの温度補償性を生み出す原因の一つとなっている可能性を示している。また、温度変化によるTYFとPERの翻訳効率との関係性調べるため、培養細胞を用いたアッセイ系で実施した。様々なバリエーションで断片化したTYFタンパク質を培養細胞に強制発現させ、18℃と28℃の条件下においてPERタンパク質の発現量がどの様に变化するのかを調べた。その結果、TYFの特定領域のみがPERタンパク質の翻訳において温度依存的な機能変化を生じる可能性を突き止めることができた。本結果は、概日リズム温度補償性にはTYFを介したPERの翻訳が深く関与していることを裏付けるものとなった。

(3) PERの翻訳制御と温度補償性の関連

タンパク質の翻訳が温度補償性を制御する要因であるかどうかの証明のため、PERタンパク質を構成するアミノ酸は同じであるが、塩基配列のみを変化させた遺伝子組み換え系統(per-opt)を用い、18℃と28℃での概日リズムの測定をおこなった。系統間にやや差は見られるものの、PERコドンを変化させた系統では温度補償性に異常が見受けられた。これらの結果は実際にPERが温度補償性と何からの関係性があることを明確に示唆するものとなった。また、本系統を用いて脳内時計細胞におけるPERタンパク質の量的変化を抗体染色により調べた結果、PERタンパク質の量的変化が生じており、これは行動実験の結果と一致していた。つまり、温度補償性を生み出す機構の一つに、環境温度変化に対応したPERの翻訳速度調節機構が深く関与していることを強く示唆している。次に、TYFのPER翻訳制御が温度補償性を司る原因なのかを検証すべく、他のPER翻訳制御であるLSM12の欠損系統の温度補償性を調べた。その結果、先のtyf^(e);per13.2系統ほどではないものの、perのレスキューなしに温度補償性が破綻している結果が得られた(図2)。これはper13.2を用いたレスキュー系統では見られなくなったことから、TYFとPERの関係性において温度補償性が生み出されていると考えることができる。

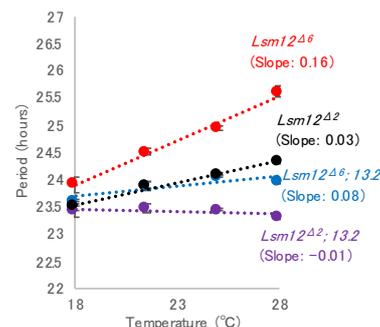


図2: LSM12の欠損系統の活動周期

(4)他の動物における温度補償性と PER の関係性の確認

温度補償性を生み出す機構が環境温度変化に対応した PER の翻訳調節機構によるものなのかを検証するべく、あえて PER 遺伝子を保有していない動物に着目した。そこで選定した動物がヒドドラである。ヒドドラのゲノムには時計遺伝子である Cryptochrome (Cry) などが存在しているが、PER は存在していないことが報告されていた (Chapman et al., 2010)。ヒドドラの行動解析システムを構築し、活動リズムの計測を実施した。しかし、ヒドドラの活動には明確な内因性の概日リズムを示さず、むしろウルトラディアンリズムが観察された。このウルトラディアンリズムには温度補償性が存在している可能性を示唆する結果も得られたが、概日リズムの温度補償性の検証を目的とした実験では、ヒドドラは不適當であるとの結論に至った。

このように、少なくともショウジョウバエにおいては per の mRNA の配列と per の翻訳因子 TYF の間に存在する特殊性が温度補償性を司ることまでは突き止めることができたが、なぜ per の mRNA と TYF の結合に温度補償性が備わっているか、なぜ TYF の特定領域のみが PER タンパク質の温度依存的な翻訳制御が可能となるのか、また、それがシステムレベルにおいてどのように温度補償性を生み出すのかなどの詳細な分子機構を解明することができなかった。しかし、本研究から、TYF と per の翻訳に着目することでシステムレベルの温度補償性制御機構を解明できる可能性は高いと判断するには十分な証拠を得られたと考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Miyokawa Ryo, Kanaya Hiroyuki J., Itoh Taichi Q., Kobayakawa Yoshitaka, Kusumi Junko	4. 巻 11
2. 論文標題 Immature symbiotic system between horizontally transmitted green algae and brown hydra	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-82489-6	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 Kanaya Hiroyuki J., Park Sungeon, Kim Ji-hyung, Kusumi Junko, Krenenou Sofian, Sawatari Etsuko, Sato Aya, Lee Jongbin, Bang Hyunwoo, Kobayakawa Yoshitaka, Lim Chunghun, Itoh Taichi Q.	4. 巻 6
2. 論文標題 A sleep-like state in Hydra unravels conserved sleep mechanisms during the evolutionary development of the central nervous system	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eabb9415
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.abb9415	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 該当する
1. 著者名 Kanaya Hiroyuki J., Kobayakawa Yoshitaka, Itoh Taichi Q.	4. 巻 5
2. 論文標題 Hydra vulgaris exhibits day-night variation in behavior and gene expression levels	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Zoological Letters	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s40851-019-0127-1	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 Lee Jongbo, Kim Minjong, Itoh Taichi Q., Lim Chunghun	4. 巻 9
2. 論文標題 Ataxin-2: A versatile posttranscriptional regulator and its implication in neural function	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA	6. 最初と最後の頁 e1488
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/wrna.1488	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 該当する

1. 著者名 Alphen Bart van, Stewart Samuel, Iwanaszko Marta, Xu Fangke, Bang Eugenie, Rozenfeld Sydney, Ramakrishnan Anujaianthi, Itoh Taichi Q., Braun Rosemary I., Allada Ravi	4. 巻 -
2. 論文標題 Glial immune-related pathways as mediators of closed head TBI effects on behavior in Drosophila	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/422535	査読の有無 無
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 該当する

[学会発表] 計6件(うち招待講演 2件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Itoh Taichi Q.
2. 発表標題 Circadian and sleep behavior in clockless and brainless animal Hydra.
3. 学会等名 The 2nd Korean Biological Rhythm Society Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金谷啓之, Sungeon Park, Ji-hyung Kim, 楠見淳子, Sofian Krenenou, 猿渡悦子, 佐藤文, Jongbin Lee, Hyunwoo Bang, 小早川義尚, Chunghun Lim, 伊藤太一
2. 発表標題 刺胞動物ヒドラの時計と睡眠
3. 学会等名 第27回 日本時間生物学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Itoh Taichi Q., Kanaya Hiroyuki J., Sawatari Etsuko, Sato Aya, Kobayakawa Yoshitaka.
2. 発表標題 Discovery of a sleep-like state in Hydra vulgaris
3. 学会等名 第90回日本動物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kanaya Hiroyuki J., Sawatari Etsuko, Sato Aya, Kobayakawa Yoshitaka, Itoh Taichi Q.
2. 発表標題 Molecular mechanisms of sleep in the basal metazoan Hydra
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Itoh Taichi Q.
2. 発表標題 Hydra vulgaris exhibits a sleep-like state induced by melatonin.
3. 学会等名 Symposium on insect chronobiology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kanaya Hiroyuki J., Kobayakawa Yoshitaka, Itoh Taichi Q.
2. 発表標題 Analysis of primitive sleep-wake cycle in hydra
3. 学会等名 第25回日本時間生物学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔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

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			
フランス	AgroParisTech			
韓国	UNIST			