

研究種目： 基盤研究 (C)  
 研究期間： 2007～2008  
 課題番号： 19510207  
 研究課題名 (和文) 哺乳類概日時計の位相調節関連タンパク質のプロテオーム解析による検索  
 研究課題名 (英文) Proteomic screening of proteins related to phase resetting mechanisms in mammalian circadian system.  
 研究代表者 坂本 克彦 (SAKAMOTO KATSUHIKO)  
 株式会社三菱化学生命科学研究所・研究部門・時間ゲノム学研究グループ・特別研究員  
 研究者番号： 40416673

研究成果の概要：本研究では、哺乳類の脳内時計中枢である視交叉上核由来の細胞株を用いて、体内時計の時刻同調（時計の針の時刻合わせ）機構に関与するタンパク質の検索を試みた。時計の針を動かす薬剤刺激を与えたときに発現量が変化するタンパク質を検索し、得られたタンパク質の機能阻害実験をおこなったところ、時刻同調機構に関与する可能性があるタンパク質を複数種類得ることができた。体内時計の入力系メカニズムの解明に結びつく発見となった。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・応用ゲノム科学

キーワード：プロテオーム構造機能解析、概日時計

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 原核単細胞のバクテリアから動植物、ヒトにいたるまでの、ほとんどすべての生物は1日周期の行動や生理活性の変動を示す。こうした日内周期現象の中には、時刻情報の無い恒常環境下においても1日に近い周期で振動パターンを維持し続けるものがあり、概日リズムとよばれ、内因的な時計（概日時計）により制御されている。最近の分子レベルでの研究から、複数の時計遺伝子の周期的な発現制御をともなったネガティブフィードバックループが、概日時計（体内時計）の振動

子を構成していることが示されている。哺乳類では近年、*Per*、*Cry*、*Clock*、*BMAL1*などの時計遺伝子がクローニングされ、現在のところ、こうした時計遺伝子の機能解析が精力的におこなわれている。しかし、これまでに明らかになっている時計遺伝子発現制御のフィードバックループ機構だけでは、細胞、組織、個体レベルでの概日リズムの同調、振動形成、および出力についての分子機構を十分に説明することはできない。そのため、さらなる時計遺伝子の同定、これらの機能の解析、及び遺伝子や遺伝子産物間の

相互作用についての研究が必要である。概日リズムの研究は、睡眠覚醒リズムに異常をきたす遺伝病の発見、シフト勤務や大陸間移動による時差ぼけ等の概日リズム障害患者の増加と共に、医学的にも社会的にもその重要性を増している。

(2) 組織限定的な破壊実験や移植実験を用いたこれまでの研究から、哺乳類では、体温や睡眠覚醒などの概日リズムを制御する時計中枢は、脳視床下部の視交叉上核 (SCN: Suprachiasmatic nucleus) に存在することが確認されている。ところが、時計遺伝子に関する最近の研究から、心臓や肝臓などの末梢組織にも、脳内時計中枢のSCNに存在するものと同様な、時計遺伝子発現制御のフィードバックループ機構が存在することが明らかになった。しかし、SCN中枢時計と末梢時計との関連性を調べた研究から、個体 (*in vivo*) においては、末梢組織の概日リズムを正常に維持していくためには、時計中枢 (SCN) が不可欠であることが明らかにされた (Sakamoto K. *et al.*, *J Biol Chem*, 1998)。哺乳類の場合、末梢組織の時計が外界の昼夜の明暗サイクルに同期するためには、主時計であるSCNからの時刻情報の入力が必要とする。つまり、哺乳類の体内時計機構は、SCNの中核時計を頂点としたヒエラルキー (階層構造) を構築しており、末梢時計はSCN主時計の制御支配下にある、と現在では考えられている。SCN時計と末梢時計は、時計遺伝子発現制御のフィードバックループ機構を振動子として用いているという点においては類似しているが、振動子への時刻情報の入力系や、振動子からの効果器への出力経路については、大きな違いがあると推測されている。それ故、哺乳類の体内時計機構を総括的に理解するためには、末梢組織の時計機構の解析だけでは不十分で、主時計としてのSCNに存在する時計機構の解明が不可欠である。

(3) 一方、時計機構のもつ本質的に重要な機能のひとつとして、時刻刺激に対する位相同調 (時計の針の時刻合わせ) が挙げられる。しかし、概日時計の発振機構が分子レベルでかなり明らかにされているのに対し、位相調節機構に関しては解明が進んでいない。

(4) 最近の報告によれば、マウスの肝臓で日周期的発現変動リズムを示すタンパク質のうち、約半数は転写 (mRNA) レベルで概日リズムを示さない (Reddy A. *et al.*, *Curr Biol*, 2006)。また、時計遺伝子タンパク質

の翻訳後修飾は、概日時計の振動形成において本質的に重要な働きをしていると考えられている。それ故、プロテオーム及びトランスクリプトーム解析の結果を比較することで、概日時計の機能解析を極めて有効に実施できると考えられる。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究では、「哺乳類の脳内時計中枢であるSCN由来の細胞株を用いて、プロテオーム解析によって概日時計の位相調節機構関連タンパク質を包括的に検索し、概日時計の未知の入力系を発見すること」を目標とする。

(2) これまでの研究から、細胞内アデニル酸シクラーゼを活性化する *Forskolin* という薬剤をSCN由来細胞に投与すると、投与時刻依存的に、細胞の概日時計の位相が前進もしくは後退することが確認されている。この現象は、新たな遺伝子の転写及び翻訳が必要であると考えられている、個体 (*in vivo*) での光刺激に対するSCN概日時計の位相応答と極めて類似している。そこで本研究では、プロテオーム解析により、*Forskolin* 刺激によって発現量が変化するタンパク質をSCN由来細胞から同定することにより、位相変位応答関連タンパク質候補を探索する。実際には、*Forskolin* 刺激によって概日時計の位相変位が誘導される時刻と誘導されない時刻とで、タンパク質の発現変動を比較し、位相変位を誘導する時刻に特異的な発現変化を示すタンパク質だけを絞り込む。プロテオーム解析で得られた位相変位応答関連タンパク質候補について、培養細胞を用いてRNAi法や強制発現プロモーター導入法による遺伝学的解析をおこない、概日時計の振動形成や位相同調における機能を同定する。

(3) SCN (視交叉上核) は、例えばラットの場合、約10000個の神経細胞からなる直径1ミリ以下の、小さな神経核である。これまでのSCN (主時計) の *in vitro* での研究では、主に初代培養系やスライスカルチャーが用いられてきた。しかし、これらの実験系では、不均一な細胞から構成される組織をサンプリングしていることや、サンプリング時の個体間の誤差などが無視できないため、実験結果にばらつきがあり再現性が取りにくいという欠点があった。ゆえに、SCN由来細胞株の利用は、SCN細胞の自律的振動形成、時刻情報入力系、出力系、及びSCN細胞間の相互作用に機能する分子群を同定するために、

非常に有用な研究手段であると考えられる。

(4)本研究で用いる SCN 由来細胞株は、時計遺伝子 *Period1(Per1)* のプロモーターにルシフェラーゼを連結させたリポーター遺伝子 (*Per1::luc*) を導入したラットの組織から樹立されている。時計遺伝子 *Per1* は、その変異体の解析結果から概日リズムの形成やリズムの時刻同調機構に必須であると考えられている。また、*Per1* 遺伝子は、時計中枢 SCN 及び末梢組織において概日発現リズムを示す。そのため、リポーター遺伝子 (*Per1::luc*) の発現 (ルシフェラーゼの発光量) を指標として、細胞内での時計遺伝子の概日発現リズムを継時的に連続モニタリングすることができる。

(5) よって、この SCN 由来細胞株を用いたプロテオーム解析による、本研究が目的とする哺乳類概日時計の入力系の解明は、直接行動・睡眠等の脳神経システムの理解、体内時計の機能異常が原因となる種々の精神疾患の発症機構の解明やその診断・治療への展開を可能とするものである。

### 3. 研究の方法

(1) *Forskolin* 刺激によって SCN 由来細胞株の概日時計の位相変位応答を引き起こし、それにとまなう細胞内タンパク質発現のダイナミクスをプロテオーム解析によって検索する。それにより、哺乳類の概日時計機構における位相変位応答関連タンパク質の同定を目指す。

①浜松ホトニクス株式会社と共同開発した専用の微量発光測定器を使用して、シャーレで培養した SCN 由来細胞からリポーター遺伝子 (*Per1::luc*) 由来の発光を継時的に連続測定し、時計遺伝子 (*Per1*) の概日発現リズムをモニタリングする。サンプリングは適切な位相、つまり「位相前進、位相後退、位相変化なし」の3つの時刻において、*Forskolin* を30分間作用させ、15分後、1時間後、2時間後、4時間後に、細胞からタンパク質サンプルを精製し、プロテオーム解析用のサンプルとする。実験対照群としては、溶媒の DMSO のみを投与したグループを用いる。

②タンパク質サンプルは、GE ヘルスケア社の *Ettan DIGE (2D Fluorescence Difference Gel Electrophoresis)* : 蛍光標識二次元ディフュレンスゲル電気泳動システムを用い、高解像度のプロテオーム解析をおこなう。タンパク質サンプルを蛍光標識して二次元電気泳動をおこない、泳動後のゲルをスキャナーで

直接観察することによって、各タンパク質スポットの定量をおこなう。このシステムでは、実験群と対照群のタンパク質サンプルを異なる波長の蛍光色素で標識し同一ゲル中で泳動し観測するため、発現量の少ないタンパク質スポットに対しても正確な比較定量をおこなうことができる。具体的には、一次元目の等電点電気泳動を2つの pH レンジ (pH4-7 と pH4.5-5.5) でおこない、そして、二次元目を濃度の異なる2つのゲル (7.5%と12.5%) を用いて泳動する。つまり、ひとつのサンプルを4枚のゲルを使って泳動分離することにより、各タンパク質スポット間の間隔を拡げ、解析の高い解像度及び大きな定量のダイナミックレンジを確保する。予備的な実験から、複数ゲルの使用によって、一回の解析で3000個以上のスポットが観察可能であることが確認されている。上記のプロテオーム解析により、*Forskolin* 刺激によって発現量が影響を受けるタンパク質を同定する。そして、概日リズムの位相変位が誘導される時刻と誘導されない時刻とで、タンパク質の発現変動を比較し、位相変位特異的に発現変動を示すタンパク質だけを次の解析に使用する。

③プロテオーム解析で得られた位相変異特異的に発現変動を示すタンパク質スポットを、二次元電気泳動のゲルから切り出し質量分析計にかけ同定する。同定されたタンパク質の情報をもとに、哺乳類概日時計の時刻同調機構に関連した遺伝子候補を検索する。

(2) プロテオーム解析により探索された概日時計の時刻同調機構関連タンパク質候補の機能を、RNAi 法や強制発現プロモーター導入法を用いて遺伝学的に解析する。

①標的遺伝子に対応する siRNA を SCN 由来細胞株に導入し、*Per1::luc* の概日発現リズムの振幅や周期、位相変位応答に与える影響を観察する。

### 4. 研究成果

(1) 30分間の *Forskolin* 刺激を、CT6(位相変位なし)、CT16(位相後退を誘導)または CT22(位相前進を誘導)に与え、それぞれの時刻につき刺激開始から15分後、1時間後、2時間後、4時間後に細胞からタンパク質サンプルを精製し、プロテオーム解析をおこなった。その結果、観察した約4400個のタンパク質スポットのうち、227個のスポットが *Forskolin* 刺激により発現量の変化 (1.3倍 < or > -1.3倍, n=2) を示した。発現変動を示すタンパク質スポットから質量分析法により同定できたタンパク質は55種類であった(以下の table を参照): 細胞骨格系(18種類)、情報伝達系(9種類)、転写・翻訳系(6種類)、代謝系酵素(4種類)、タンパク

質分解系(4種類)、抗酸化系(3種類)、その他(11種類)。

プロテオーム解析で同定されたタンパク質

Identified proteins in 2D-DIGE analysis		
#	Symbol	Gene Name
1	Appl1	DIP13 alpha (Appl1 protein)
2	Arcn1	archain (coatomer delta subunit)
3	Arpc1b	actin related protein 2/3 complex, subunit 1B
4	Asns	asparagine synthetase
5	Cbx3	modifier 2 (chromobox homolog 3)
6	Ccs	copper chaperone for superoxide dismutase
7	Cfl1	cofilin 1
8	Cfl2	cofilin 2, muscle
9	Cnn3	calponin 3, acidic
10	Coro1b	coronin, actin binding protein 1B
11	Crk	v-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog
12	Ctsb	cathepsin B
13	Cttn	cortactin isoform
14	Dstn	destrin
15	Dync1i2	cytoplasmic dynein intermediate chain 2
16	Eef2	eukaryotic translation elongation factor 2
17	Ftl1	ferritin light chain
18	Gaa	acid alpha-glucosidase
19	Gnaq	guanine nucleotide binding protein alpha q subunit
20	Gphn	gephyrin
21	Gspt1	G1 to S phase transition 1
22	Hddc2	HD domain containing 2
23	Hnrnpc	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C
24	Hnrpk	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K
25	Hspb1	heat shock 27kDa protein 1

26	Hspcb	Heat shock 90kDa protein 1, beta
27	Klc4	kinesin light chain 4
28	Mrlcb	myosin:SUBUNIT=regulatory light chain
29	Myh9	Myh9 protein
30	MyI9	Myosin regulatory light chain 2, smooth muscle isoform (Myosin RLC)
31	Nefm	neurofilament 3, medium
32	Nsf1c	NSFL1 (p97) cofactor (p47)
33	Nucb2	NEFA precursor
34	Oat	ornithine aminotransferase
35	Pak2	p21-activated kinase 2
36	Palld	palladin
37	Pea15a	phosphoprotein enriched in astrocytes 15 (isoform 2)
38	Pgm3	phosphoglucomutase 3
39	Ppm1f	protein phosphatase 1F (PP2C domain containing)
40	Prkar1a	protein kinase, cAMP dependent regulatory, type I, alpha
41	Psap	prosaposin
42	Psmb9	proteasome(prosome, macropain) subunit, beta type, 9
43	Rpsa	laminin receptor 1 (40S ribosomal protein SA)
44	Sec23b	SEC23B
45	Sfrs1	splicing factor, arginine/serine-rich 1
46	Sgta	small glutamine-rich tetratricopeptide repeat (TPR)-containing, alpha
47	Spna2	spectrin alpha chain, brain
48	Stmn1	stathmin 1
49	Sugt1	SGT1, suppressor of G2 allele of SKP1
50	Tubb2c	tubulin, beta 2c
51	Txndc5	thioredoxin domain containing 5
52	Uba1	ubiquitin-activating enzyme E1
53	Vim	vimentin
54	Zadh1	zinc binding alcohol dehydrogenase,

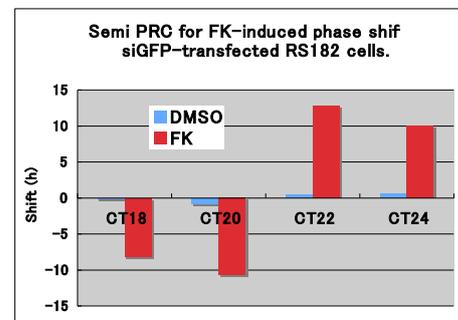
		domain containing 1
55	Zyx	zyxin

(2) 次に、プロテオーム解析で同定されたタンパク質のうち、情報伝達系やタンパク質分解系など、位相調節機構に関与する可能性があるとして推測される 21 種類のもの(以下の table を参照)に対して、対応遺伝子の siRNA をデザインし、機能ノックダウン実験をおこなった。

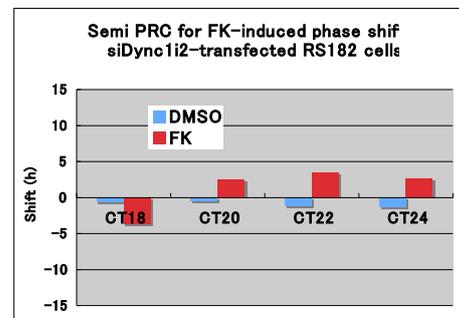
siRNA をデザインした遺伝子		
#	Symbol	
1	Appl1	DIP13 alpha (Appl1 protein)
2	Arcn1	archain (coatomer delta subunit)
3	Cbx3	modifier 2 (chromobox homolog 3)
4	Ccs	copper chaperone for superoxide dismutase
5	Crk	v-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog
6	Dync1i2	cytoplasmic dynein intermediate chain 2
7	Gnaq	guanine nucleotide binding protein alpha q subunit
8	Hddc2	HD domain containing 2
9	Pak2	p21-activated kinase 2
10	Pea15a	phosphoprotein enriched in astrocytes 15 (isoform 2)
11	Ppm1f	protein phosphatase 1F (PP2C domain containing)
12	Prkar1a	protein kinase, cAMP dependent regulatory, type I, alpha
13	Psap	prosaposin
14	Psmb9	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 9
15	Sec23b	SEC23B
16	Sgta	small glutamine-rich tetratricopeptide repeat (TPR)-containing, alpha

17	Sugt1	SGT1, suppressor of G2 allele of SKP1
18	Txndc5	thioredoxin domain containing 5: rCG43947
19	Uba1	ubiquitin-activating enzyme E1
20	Zadh1	zinc binding alcohol dehydrogenase, domain containing 1
21	Zyx	zyxin

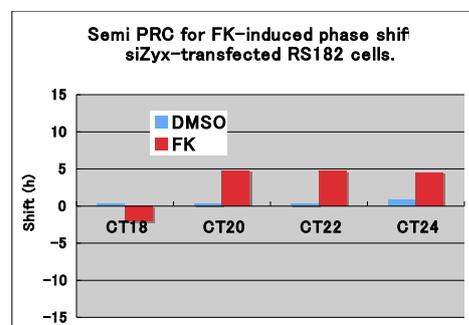
(3) 対応遺伝子の siRNA を transfect した SCN 由来の細胞株に、CT18, CT20, CT22, CT24 で Forskolin 刺激を与え、位相変位応答を観察した。その結果、Dync1i2, Uba1, Zyx の siRNA では、コントロールの siGFP に比べ位相変位応答が大きく減衰し type1 型の位相反応曲線を示した。しかし、それ以外の対応遺伝子の siRNA では、siGFP と同様の type0 型の大き

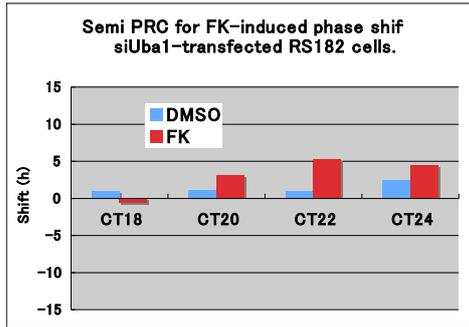


な位相変位応答が観察された。尚、Prkar1a の



siRNA では、リズムの振動が減衰してしまい、位相変位実験がおこなえなかった。





(4) 以上の結果から、Dync1i2、Uba1、Zyxが、哺乳類概日時計の位相調節機構において、重要な機能を有することが示唆された。

①Dync1i2は、細胞内輸送に関与するモータータンパク質 Dynein のサブユニットである。Dync1i2を含む輸送系が、位相変位誘導情報の伝達に関与している可能性がある。

②Uba1は、Ubiquitin-proteasome 系の Ubiquitin activating enzyme で、タンパク質分解系を司る重要な酵素である。

Ubiquitin-proteasome 系は、時計遺伝子産物タンパク質 PERIOD の安定化に関与し、概日リズムの振動形成において、重要な働きを持つことが知られている。Uba1の関与するタンパク質分解系が、位相調節機構においても重要な働きをしている可能性がある。

③Zyxは細胞骨格のダイナミクスに関与すると同時に、細胞内シグナリングにも関わっていると考えられている。しかし、これまでのところ、その機能には未知な部分が多く、概日振動子への関与は報告されていない。

(5) 今後は、上記の位相調節機構関連タンパク質が概日時計の制御機構においてどのように機能しているのかを、分子レベルさらに解析していくのと同時に、個体 (*in vivo*) での機能を解析していく必要がある。それにより、哺乳類概日時計の入力系のメカニズムの解明が進み、臨床応用への道が開ける可能性がある。

## 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)

[学会発表] (計 3件)

- 1) 坂本克彦、加藤めぐみ、程肇 (2008) 哺乳類概日時計の位相調節関連タンパク質のプロテオーム解析による網羅的検索. 第31回日本分子生物学会.

- 2) 坂本克彦、加藤めぐみ、程肇 (2007) 哺乳類概日時計の位相調節関連タンパク質のプロテオーム解析による網羅的検索. 第30回日本分子生物学会.

- 3) 坂本克彦、川口荘史、加藤めぐみ、程肇 (2006) 哺乳類概日時計の位相調節関連タンパク質のプロテオーム解析による網羅的検索. 日本分子生物学会2006フォーラム

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

坂本 克彦 (SAKAMOTO KATSUHIKO)  
株式会社三菱化学生命科学研究所・研究部門・時間ゲノム学研究グループ・特別研究員  
研究者番号: 40416673

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

該当なし