

令和 5 年 5 月 18 日現在

機関番号：15401
研究種目：若手研究
研究期間：2020～2022
課題番号：20K15792
研究課題名（和文）時計遺伝子による新細胞間コミュニケーションの制御メカニズムと生理機能の解明

研究課題名（英文）The role of clock genes in cell communication

研究代表者
中里 亮太（Nakazato, Ryota）
広島大学・医系科学研究科（医）・助教

研究者番号：30761803
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）：一次繊毛は細胞外へ突出したオルガネラ様構造体であり、細胞外シグナルを受信するアンテナとしての機能が知られている。また、近年では一次繊毛の先端から細胞外小胞が放出されることが報告されている。本研究では体内時計システムにおける新たなコミュニケーション方法として一次繊毛・一次繊毛由来小胞の提唱を目指した。培養細胞を用いた実験から、時計遺伝子が中心体周辺タンパク質の集積を介して一次繊毛・一次繊毛由来小胞を制御することを明らかにした。また、概日変化する一次繊毛・一次繊毛由来小胞は細胞移動と細胞外シグナルの感受性に概日リズムを生み出すことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は時計遺伝子が一次繊毛・一次繊毛由来小胞を制御することを世界に先駆けて明らかにしたことから、時間生物学研究および一次繊毛研究の発展に大きく貢献するものと考えられる。夜中でも光にあふれる24時間社会となった現代では、体内時計と環境時間のズレが様々な健康問題に寄与すると考えられ大きな社会問題となりつつある。本研究成果により明らかとなった体内時計システムにおける新たなコミュニケーション方法がこれらの社会問題の解決に大きく貢献するものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Primary cilia, a small organelle protruding from the cell surface, functions as a sensory antenna for cells to detect extracellular signals. Recently, it has been reported that extracellular vesicles are released from the tips of primary cilia (pcEV). In this study, we aimed to propose primary cilia and pcEV as a new communication tools in the circadian clock system. We revealed that clock genes regulate primary cilia and pcEV through the accumulation of pericentrosomal proteins. We also showed that circadian changes in primary cilia and pcEV generate circadian rhythms in cell migration and sensitivity to extracellular signals.

研究分野：細胞生物学

キーワード：時計遺伝子 一次繊毛 体内時計

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

一次繊毛は細胞外へ突出した1本の毛の様な構造物である。一次繊毛の膜上には様々な受容体やチャネルが集積しており、細胞外シグナルを受容するアンテナとしての機能が一般的に知られている。また、近年、その一次繊毛の先端から細胞外へ細胞外小胞が放出される現象が我々を含む複数の研究グループから報告されている (Cell, 168:264-279, 2017 など)。一次繊毛は非常に不安定な構造であり、細胞の状態に依存して伸縮や消失・再形成をすることが知られている。一次繊毛由来小胞の放出時には一次繊毛の収縮・消失が観察され、一次繊毛の形態と一次繊毛由来小胞の放出は連動することが報告されている。一次繊毛の機能や形態以上は繊毛病と呼ばれる様々な疾患を引き起こすことが知られている。その発症メカニズムには一次繊毛のアンテナとしての機能異常に加え、一次繊毛由来小胞の異常も大きく影響すると考えられる。以上のことから一次繊毛および一次繊毛由来小胞は細胞間コミュニケーションにおいて重要な機能的役割を担うと考えられる。

一方、睡眠・覚醒やホルモン分泌など、多くの生命現象は約24時間周期の概日リズムを示し、概日リズムは体内時計により形成される。この体内時計を構成するのが時計遺伝子 (Bmal1, Clock, Per, Cry など) と呼ばれる転写因子群であり、時計遺伝子の転写・翻訳が約24時間周期のフィードバックループにより概日リズムが形成されると考えられている。

研究代表者は本研究開始以前より時計遺伝子に着目し研究を行っており、ミクログリアや血液脳関門における時計遺伝子の新たな機能や役割について報告を行ってきた (Glia., 2017; J Neurosci., 2017 など)。そんな中、マウス線維芽細胞 NIH/3T3 を用いた *in vitro* の実験系において、時計遺伝子発現の概日振動と同様に、一次繊毛陽性細胞数と培養液中に放出された一次繊毛由来小胞の量が約24時間周期で変動することを見出した。すなわち、時計遺伝子が一次繊毛の形態と一次繊毛由来小胞の放出を制御している可能性を示唆する知見を得た。

2. 研究の目的

本研究では体内時計システムにおける一次繊毛および一次繊毛由来小胞を介した新たな細胞間コミュニケーション方法の提唱を目指す。具体的には体内時計システムを構成する時計遺伝子による一次繊毛および一次繊毛由来小胞の制御メカニズムとその生理学的意義の解明を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 時計遺伝子による一次繊毛・一次繊毛由来小胞の制御メカニズムの解析

NIH/3T3 を用いた *in vitro* 実験により、時計遺伝子による一次繊毛・一次繊毛由来小胞の制御メカニズムを検討した。NIH/3T3 に時計遺伝子の阻害剤である SR9011 を曝露した。また、時計遺伝子の1つである Bmal1 を欠損した NIH/3T3 を CRISPR/Cas9 システムにより作製した。それぞれの条件下における一次繊毛の形態、一次繊毛由来小胞の放出量、および細胞内タンパク質の局在変化を検討した。また、C57BL/6 マウスを用いた *in vivo* 実験により、*in vitro* で観察された一次繊毛の概日変化が実際の生体内でも認められるかを検討した。

(2) 時計遺伝子により制御される一次繊毛・一次繊毛由来小胞の生理学的意義

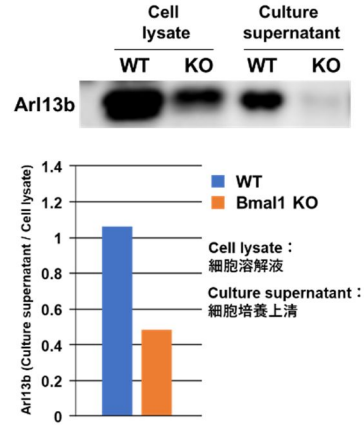
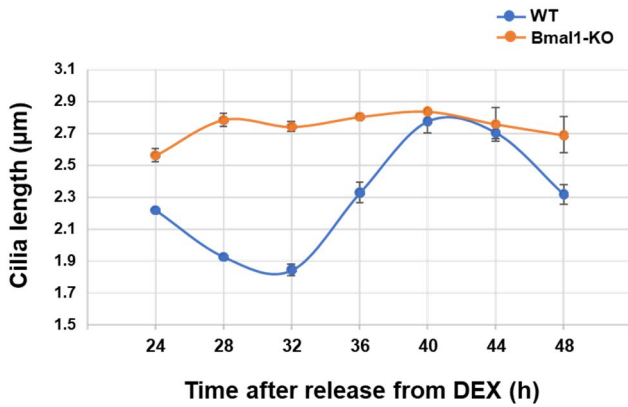
NIH/3T3 を用いた *in vitro* 実験により、概日変化する一次繊毛・一次繊毛由来小胞の生理学的意義の検討を行った。Wound-healing assay による細胞の移動能が概日変化する一次繊毛・一次繊毛由来小胞によりどのように変化するかを検討した。また、一次繊毛の膜上に存在する Smoothed (SMO) のアゴニスト (SAG) に対する感受性の変化についてもヘッジホッグシグナル経路を解析することにより検討を行った。

4. 研究成果

(1) 時計遺伝子による一次繊毛・一次繊毛由来小胞の制御メカニズムの解析

時計遺伝子 Bmal1 欠損 NIH/3T3 を用いた解析

CRISPR/Cas9 により作製した Bmal1 欠損 NIH/3T3 および野生型 NIH/3T3 において抗 Arl13b 抗体を用いた免疫染色により一次繊毛を標識し、一次繊毛の長さを計測した。その結果、野生型 NIH/3T3 では一次繊毛の長さが約24時間周期で変化したのに対し、Bmal1 欠損 NIH/3T3 では認められなかった (次頁左図)。また、培養上清中に放出された細胞外小胞を超遠心機により回収し、抗 Arl13b 抗体を用いた Western blotting により一次繊毛由来小胞の検出を行った。その結果、野生型に比べ Bmal1 欠損 NIH/3T3 では一次繊毛由来小胞の放出量が著明に低下した (次頁右図)。



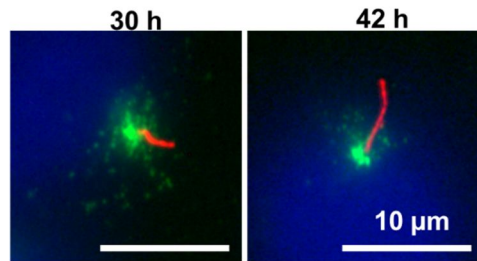
SR9011 を用いた解析

NIH/3T3 に SR9011 を曝露し、免疫染色により標識した一次繊毛の長さを測定したところ、コントロール群で認められた一次繊毛長の概日変化が消失した。

中心体周辺タンパク質の細胞局在変化の解析

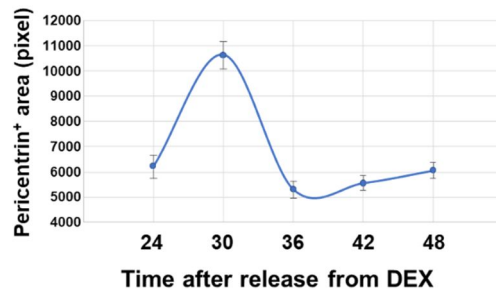
中心体周辺タンパク質である Pericentrin (PCNT) が 24 時間周期の中で一過的に一次繊毛の根元へ集積する様子が観察され、SR9011 を曝露した細胞では認められなかった(右図)。また、微小管の重合を阻害し、PCNT の集積を阻害すると一次繊毛長の概日変化は消失した。

Arl13b (primary cilia)
Pericentrin (centrosome and PCM)
DAPI (DNA)



マウス脳内における一次繊毛の解析

C57BL/6 マウスを 6 時間ごとに灌流固定し脳を摘出後、免疫染色により標識した一次繊毛の長さを測定した。その結果、体内時計の中心とされる視交叉上核の一次繊毛長は培養細胞と同様に概日変化を示した。

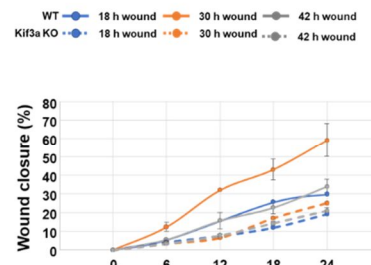
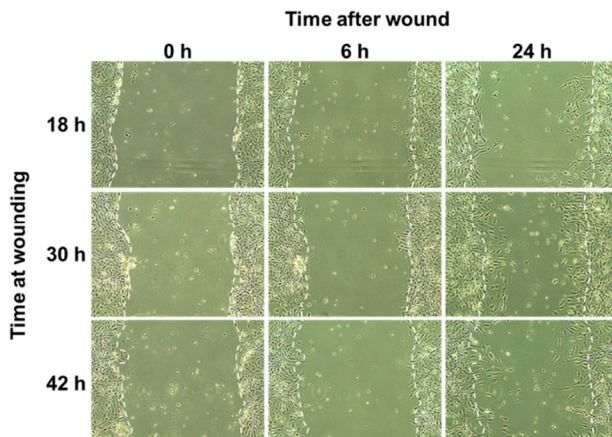


以上の結果から、培養細胞における一次繊毛・一次繊毛由来小胞は時計遺伝子により制御され概日変化を示すことが明らかになった。また、時計遺伝子は中心体周辺タンパク質である PCNT の細胞内局在制御を介し一次繊毛・一次繊毛由来小胞を制御する可能性が示唆された。これらの現象は培養細胞のみだけでなく、実際の生体内でも起こりうると思われる。

(2) 時計遺伝子により制御される一次繊毛・一次繊毛由来小胞の生理学的意義の解析

Wound-healing assay による細胞移動能の解析

NIH/3T3 の細胞層に一次繊毛の長さが極小時 (30 h) と極大時 (18 or 42 h) に創傷を作製し、創傷部位へ移動した細胞の面積を測定したところ、極小時は極大時に比べ創傷部位へ侵入した細胞の面積が著明に増大した。一方、一次繊毛を欠損した Kif3a 欠損 NIH/3T3 ではこの差は認められなかった(下図)。



SAG に対する感受性の解析

一次繊毛の長さが極小時間および極大時間の NIH/3T3 に SAG を曝露し、RNA を回収後 real-time PCR により Gli1 および Ptch1 の mRNA 発現量を測定した。その結果、極小時間では極大時間に比べ Gli1 および Ptch1 の発現量が著明に増加した。

以上の結果から、概日変化する一次繊毛・一次繊毛由来小胞は創傷治癒時における線維芽細胞の細胞移動に寄与するとともに、細胞外シグナルに対する感受性の概日変化を制御する可能性が示唆された。

本研究成果は体内時計システムにおける新たなコミュニケーション方法として一次繊毛・一次繊毛由来小胞が存在することを示すものであり、時間生物学研究・一次繊毛研究の発展に大きく貢献するものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ijaz Faryal, Nakazato Ryota, Setou Mitsutoshi, Ikegami Koji	4. 巻 12
2. 論文標題 A pair of primers facing at the double-strand break site enables to detect NHEJ-mediated indel mutations at a 1-bp resolution	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11681
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-15776-5	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 Nakazato Ryota, Otani Hiroshi, Ijaz Faryal, Ikegami Koji	4. 巻 175
2. 論文標題 Time-lapse imaging of primary cilium behavior with physiological expression of fluorescent ciliary proteins	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Methods in Cell Biology	6. 最初と最後の頁 45 ~ 68
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/bs.mcb.2022.10.003	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中里亮太、松田悠生、池上浩司
2. 発表標題 時計遺伝子による一次線毛の形態制御
3. 学会等名 日本解剖学会第75回中国四国地方会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中里亮太、松田悠生、池上浩司
2. 発表標題 概日リズムにおける一次線毛の解析
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中里亮太、木曾遼太郎、松田悠生、池上浩司
2. 発表標題 概日リズムにおける脳内一次線毛の形態解析
3. 学会等名 日本解剖学会第76回中国四国地区学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中里亮太、松田悠生、木曾遼太郎、池上浩司
2. 発表標題 概日リズムを示す一次繊毛の生理学的意義
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2023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
---------	---------