

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 27 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592756

研究課題名(和文)唾液を用いた生体時刻測定法確立のための唾液腺特異的遺伝子の同定

研究課題名(英文) Isolation of the candidate gene for the marker of the body time determinant in human saliva.

研究代表者

大西 芳秋 (Onishi, Yoshiaki)

独立行政法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・研究グループ長

研究者番号：60233219

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：今回、概日リズム転写を示す遺伝子のうち、ヒト唾液腺細胞において発現しておりかつ唾液中にその遺伝子産物(タンパク)が検出できる遺伝子の同定に成功した。唾液タンパク検出による臨床検査の重要性が指摘されており、新たに見出した生体時刻測定マーカータンパクを唾液中において計測できるようにする意義は大きい。さらに既存の概日変動物質、メラトニンやグルココルチコイド等との違いを明らかにできれば、新規概日リズムマーカーとしての有用性が証明されると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We have identified 22 genes which are controlled directly by clock genes and show circadian transcription by the combination of ChIP on Chip and microarray experiments using human salivary gland cell line HSG. Rev-erb alpha was included in the 22 genes as a positive control. Then, 9 genes including Rev-erb alpha were selected as genes expressing in the normal human salivary gland by RT-PCR. In these 9 genes we found that 3 genes except Rev-erb alpha showed clear circadian transcription. Finally we have succeeded to identify the gene whose product is detected in saliva by western blot analysis. These results suggest that the selected gene is the good candidate for the marker of the body time determinant in human saliva.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：口腔生化学

1. 研究開始当初の背景

睡眠、覚醒といった生物行動や内的生理現象(体温、ホルモン分泌、神経活動)は、概日リズムといわれる約24時間周期性を示す。この生体リズムは疾患と密接に関連しており、生体リズムの障害として睡眠相後退症候群、睡眠相前進症候群、非24時間睡眠症候群、躁うつ病などを発症し、また小児自閉症、精神分裂病、老年性痴呆症は生体リズムの異常を一症状としている。また最近になり患者の管理や治療に生体リズムの概念を応用する事(クロノセラピー; 時間治療)により、予後に改善が見られる等の報告がなされており、歯科医療現場においても非常に重要なテーマであると考えられる。この24時間リズムを支配するマスター時計は、脳内視床下部の視交叉上核(SCN)に存在しており、末梢組織は、このマスター時計の支配下のもと組織固有の24時間リズムを刻んでいる(末梢時計)。これまでのところ中枢時計、末梢時計に係わらず基本的な分子メカニズムは、BMAL-CLOCK複合体によるPerならびにCry遺伝子の転写活性化、さらにその転写産物PERおよびCRYによるPer、Cry遺伝子の転写抑制を中心とするフィードバックループにより調節される事が報告されている(System-level identification of transcriptional circuits underlying mammalian circadian clocks. (2005) Nat. Genet., 37, 187-192, H.R. Ueda, et al.)。生体試料による生体時刻決定法は血液を用いた方法(Measurement of internal body time by blood metabolomics. (2009) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 106, 9890-9895, Y. Minami, et al.) や毛髪を用いた方法(Noninvasive method for assessing the human circadian clock using hair follicle cells. (2010) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 107, 15643-15648, M. Akashi, et al.)が報告されている。血液を用いる方法は非侵襲的に測定試料採取することができず、また毛髪を用いる方法は1日のうち最低異なる3時刻で試料採取する必要がある、いずれの方法も普遍的な生体時刻測定法とはなっていない。唾液は生体より非侵襲的に採取でき、血液中で24時間周期の変動が観察されるナトリウム、カリウム、リン酸塩といった電解質やコルチコステロイド等が、唾液中においても同様に観察される事が知られている。これは唾液が生物時計をモニターする上で有用な試料となりうる事を示唆している。事実、クッシング症候群の診断を唾液中コルチゾルのリズム変動を用いて行うことも試みられている(Late-night salivary cortisol measurement in the diagnosis of Cushing's syndrome. (2008) Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab., 4, 344-350, T. Carroll et al.)。また、唾液腺細胞は増殖因子やサイトカイン産生をしているが、増殖因子やサイトカインの発現は、他の末梢組織において概

日リズムをもって調節されている事が既に報告されており、唾液腺細胞においても同様に末梢時計によりこれらの因子の発現調節が行われていると推察される。上記の事実より、唾液を生体試料として用いる生体時刻測定法の可能性は示唆されているが、唾液には以下に示す問題点を考慮する必要がある。唾液はその分泌腺が単一でなく、分泌される唾液の組成も異なっており、しかも、食事等、様々な刺激により唾液組成は変化することが知られている。さらに、口腔内に混在する細菌によっても影響を受けると考えられる。唾液の分泌は原則として、唾液腺細胞における合成による腺腔内への放出、血清由来の水分、電解質等の管腔内への輸送により起きる。時計遺伝子により制御される概日リズムは、原核生物からヒトにいたる高等動物まで普遍的に備わっている非常に強固なシステムであることより、唾液腺細胞で時計遺伝子により発現調節されている遺伝子は環境変化に影響されることなく生体時刻に依存して合成されると考えられる。よってこの遺伝子発現により制御されている産物を唾液中で測定することにより、環境変化に影響されることなく生体時刻を知ることができると考えられる。

これまで唾液腺における末梢時計については、マウス唾液腺に末梢時計機構が存在している事が報告されているものの(Clock gene expression in the submandibular glands. (2005) J. Dental Res., 84, 1193-1197, M. Furukawa et al.)、その詳細な転写調節機構は明らかにされていなかった。申請者はこれまで、唾液腺細胞株 HSG細胞が細胞生物学的に唾液腺細胞のモデルとして利用可能であること見出し、HSG細胞を用いて末梢時計機能について検討してきた。唾液腺細胞においては、時計遺伝子の中で最も中心となる Bmal1 遺伝子プロモーター領域は低メチル化状態の CpG アイランド中に存在しており、視交叉上核(SCN)や肝臓と異なり Bmal1 遺伝子の概日リズム転写調節に重要な正の転写調節因子 ROR α が発現しておらず、主に負の転写調節因子 Rev-erb α を中心に概日リズム転写調節が行われていることを見出した(HSG cells, a model in the submandibular clock. (2010) Bioscience Report., 31, 57-62, Y. Onishi)。これは唾液腺特異的概日リズム調節機構の存在を示唆しており、この概日リズム調節機構により調節されている遺伝子を利用することにより唾液を用いた生体時刻決定が可能になるのではないかと推察されるに至った。

2. 研究の目的

これまで唾液腺特異的概日リズム調節機構の解析を行ってきた HSG細胞を用いたモデル系により、時計遺伝子の概日リズム機構により直接転写制御されている遺伝子を同定する。さらに同定された遺伝子のうち、

HSG 細胞を用いたモデル系において転写が概日リズムを示す遺伝子を選択する。これら概日リズム転写を示す遺伝子のうち、遺伝子の転写変動が唾液中に含まれる物質を測定することによりモニターできると考えられる遺伝子の一つ以上決定することを目標とする。これにより、唾液を用いた生体時刻測定についての可能性が科学的に裏付けられる。

3. 研究の方法

これまでの研究より、唾液腺細胞株 HSG は細胞生物学的に末梢唾液腺細胞に類似しており、グルココルチコイド刺激することにより時計遺伝子(Per1, Per2, Per3, Cry1, Cry2, Clock, Bmal1)によるフィードバックループにより構成されている末梢時計機構が機能していることが判明した。さらに概日リズム活動に必要な不可欠な時計遺伝子 Bmal1 の概日リズム転写は、低メチル化状態の CpG アイランド中に存在するプロモーター領域の 2 つの RORE 配列 (ROR および REV-ERB 結合配列) により調節されていることが判明した。一般的には、RORE を介して正の転写調節因子 RORalpha ならびに負の転写調節因子 REV-ERBalpha が協調的に機能することにより概日転写調節をしていると考えられているが、HSG 細胞においては ROR α が発現しておらず、これまで想定されている末梢時計の転写調節機能とは異なる唾液腺特異的転写調節機構の存在が示唆された (Bioscience Report, 31, 57-62, 2010)。

(1) 概日リズム機構により直接転写制御されうる遺伝子の同定

もっとも普遍的な概日リズム転写調節機構は、BMAL1-CLOCK ヘテロダイマーによる E-box (CACGTG) を介する調節であり、HSG 細胞においても Bmal1 が概日リズム発現をしていることから、多くの遺伝子が本メカニズムにより転写調節されていると推察される。さらに Bmal1 の概日リズム転写は HSG 細胞においては上述のごとく Rev-erb α により調節されていることから、Rev-erb α による RORE 配列 ([A/T]A[A/T]NT[A/G]GGTCA) を介して概日リズム調節されている遺伝子も多く存在しているのではないかと予想される。また、申請者はこれまで概日リズム転写調節において、クロマチン構造変化による調節機構も関与していることを見出しており (Mol. Cell. Biol., (2008) 28, 3477-3488)、概日リズム機構により直接転写制御されうる遺伝子を同定するためにはクロマチンレベルで検討する必要があると考えられる。そこで HSG 細胞を dexamethasone 刺激による同調後、HSG 細胞内において BMAL1-CLOCK 複合体や Rev-erbalpha により転写調節されるようなクロマチン構造変化を起こしている遺伝子を ChIP on chip 法により同定する。Bmal1 と Rev-erbalpha の発現リズムは反対

位相であることより、Bmal1 を標的とする場合は dexamethasone 刺激 36 時間後、また Rev-erbalpha を標的とする場合は dexamethasone 刺激 24 時間後のクロマチンを用いて解析する。今回の実験の目的は概日リズム機構により直接転写制御されうる遺伝子の同定であり、また Bmal1 や Rev-erbalpha の HSG 細胞における発現量もあまり多くないことより、Myc もしくは Flag タグを付加した Bmal1 や Rev-erbalpha の発現プラスミドを dexamethasone 刺激の 1 日前に HSG 細胞に導入しておき、Bmal1 や Rev-erb α を強制発現させた上で ChIP を行うことにより、効率よく遺伝子が同定できるものと考えられる。

(2) HSG 細胞において概日リズム転写される遺伝子の検索

これまでの実験結果より、HSG 細胞を dexamethasone 刺激することにより概日リズムがリセットされ、リアルタイムレポーター遺伝子解析によりリズム同調することが判明している。さらにこの時、時計遺伝子 Bmal1 や Rev-erbalpha がそれぞれ固有の位相、リズムを持って転写され、概日リズム調節機構が機能し始めることを報告した (Bioscience Report, 31, 57-62, 2010)。よって、この概日リズム調節機構により転写調節されている多くの遺伝子が、固有のリズムで転写されると考えられる。そこで HSG 細胞を dexamethasone 刺激し、転写抑制能を持つ Rev-erbalpha の発現量が最大となる 24 時間後および転写活性化機能を持つ Bmal1 の発現量が最大となる 36 時間後に RNA を調製し、ヒト遺伝子マイクロアレイ解析のプロトコルとする。この試料調整調製のタイミングは、ChIP on chip 解析に対応しているのみならず調整時間が丁度 12 時間差となっているため、位相によっては概日リズム発現における遺伝子発現レベルの差が最も大きくなることも期待される。またこの時、必要に応じて RT-PCR により発現量の確認を行う。

(3) 唾液を用いた生体時刻決定のための標的遺伝子の決定

概日リズム発現をしている遺伝子の中においても、その amplitude (リズム発現における山と谷の発現量差) は個々の遺伝子により異なっており、生体時刻決定の標的遺伝子としては発現変動の大きな遺伝子が適していると考えられる。そこで HSG 細胞を dexamethasone 刺激した後、4 時間おきに RNA を調整しリアルタイム RT-PCR にて選択された遺伝子の発現プロファイルならびに amplitude を検討する。さらに、今回選択すべき生体時刻決定の標的遺伝子としては、遺伝子の転写変動が唾液中に含まれる物質を測定することによりモニターできる必要がある。よって、唾液におけるモニターの可能性及び概日リズムの amplitude を指標に生体時刻測定のための標的候補遺伝子の一つ以上決定する。

4. 研究成果

(1) ヒト唾液腺細胞 HSG に Myc-Rev-erbalpha および Flag-Bmal1 を発現させた後、100 nM Dexamethasone で 2 時間処理することにより当該細胞の概日時計をリセットした。次いで、12 時間後に抗 Flag 抗体 (Sigma 社製) を用いて、24 時間後に抗 Myc 抗体 (Roche Diagnostics 社製) を用いて、ChIP (Chromatin immunoprecipitation) を行い、Rev-erbalpha および Bmal1 により転写調節されている遺伝子領域を回収、精製した。回収された DNA は Whole genome amplification (New England Biolabs) により増幅し、ChIP に供した HSG 細胞の遺伝子 DNA と上記 ChIP により回収された DNA をそれぞれ Cy3、Cy5 でラベルし、プロモーター DNA アレイ (NimbleGen 社製) を用いて競合ハイブリダイゼーションすることにより Rev-erb ならびに Bmal1 により転写調節される遺伝子の同定を試みた。

その結果、Bmal1 により転写調節される遺伝子が 797、Rev-erbalpha により転写調節される遺伝子が 2076 あり、そのうち両方に調節されている遺伝子は 500 であった。これら遺伝子群は、唾液腺固有の時計システムで制御される遺伝子群である。なお、この 500 遺伝子中にポジティブコントロールである Rev-erbalpha は含まれていた。

(2) 唾液腺固有の時計システムで制御される遺伝子群のうち、マーカーとして用いるためには、発現変動 (RNA 転写量変動) の大きいものを用いるほうが利点大きい。そこで Rev-erbalpha と同様な RNA 転写量の変動を示す遺伝子を選択する為に、HSG 細胞を 100 nM Dexamethasone で 2 時間処理して時計遺伝子をリセットし、24 時間後ならびに 36 時間後の RNA を用いて Agilent 社製マイクロアレイ解析を行った。両時刻において変動が 0.5 (底が 2 の対数) 以上の遺伝子を選択したところ 1368 遺伝子が選択され、このうち先の ChIP on Chip 解析と重複する遺伝子は 22 となった。なお、この 22 遺伝子中に Rev-erbalpha は含まれていた。

前述の解析実験より選択された 22 遺伝子のうち、DNA マイクロアレイにおいて遺伝子発現が非常に弱い、シグナル強度が 50 以下の遺伝子を除いた 16 遺伝子について、ヒト正常唾液腺細胞においての遺伝子発現の有無を市販のヒト正常唾液腺 RNA (TAKARA) を用いて RT-PCR にて検討した。その結果、ヒト正常唾液腺細胞において NR1D1 (Rev-erb) と匹敵する発現量を示す遺伝子として 8 遺伝子を同定した。

(3) 上記で選択された 8 遺伝子及び NR1D1 (Rev-erb) における概日リズムについて、100 nM Dexamethasone 2 時間処理によりリセットした HSG 細胞を用いて、RT-PCR により検討した。その結果、NR1D1 (Rev-erb) と同様の転写量の周期性が観察された遺伝子は、3 遺伝子に絞られ、これらの 3 遺伝子を、唾

液中での概日リズム検出用マーカー候補とした。

上記で得られた 3 遺伝子は、いずれも RNA 転写量も十分に高く、かつその転写量が NR1D1 (Rev-erbalpha) と同様の概日リズムを刻むことから、いずれも遺伝子レベルでは優れた概日リズム検出用マーカーとして用いることができる。しかし、これら遺伝子のうちで、唾液細胞内でタンパク質発現がなされ、かつ発現されるタンパク質量も NR1D1 (Rev-erbalpha) の概日リズムと同期する遺伝子であれば、唾液に対して簡便な免疫学的検出法を適用することで、簡単に概日リズム変化を測定することができる。そこで、マーカー候補それぞれの抗体を用いて、1ml を採取したヒト唾液のうち 3 μ l を用いてタンパク質検出を試みた。その結果、タンパク質の検出ができたのは、1 遺伝子のみであった。さらに正常の昼型活動を行っている被験者 (就寝時間午後 9 時) からの自然発生したヒト唾液を約 1ml 遠沈管で 3 時間おきに採取し、そのうちの 3 μ l を遠心して細胞等の夾雑物を除き唾液試料とした。それぞれの試料についてのウェスタンブロット解析を行った。その結果、概日リズム発現が観察された。

今回、概日リズム転写を示す遺伝子のうち、ヒト唾液腺細胞において発現しておりかつ唾液中にその遺伝子産物 (タンパク) が検出できる遺伝子の同定に成功した。唾液タンパク検出による臨床検査の重要性が指摘されており (Saliva proteomics as an emerging, non-invasive tool to study livestock physiology, nutrition and diseases. (2012) J Proteomics, 75, 4251-4258, E. Lamy and M. Mau)、新たに見出した生体時刻測定マーカータンパクを唾液中において計測できるようにする意義は大きい。さらに既存の概日変動物質、メラトニンやグルココルチコイド等との違いを明らかにできれば、新規概日リズムマーカーとしての有用性が証明されると考えられる。

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)

[雑誌論文] (計 5 件)

Shikonin shortens the circadian period: possible involvement of Top2 inhibition. Ogawa Y, Kawano Y, Yamazaki Y, Onishi Y., Biochem Biophys Res Commun. 2014; 443: 339-343, doi: 10.1016/j.bbrc.2013.11.116. 査読有
DNA methylation of the BMAL1 promoter. Satou R, Sugihara N, Ishizuka Y, Matsukubo T, Onishi Y., Biochem Biophys Res Commun. 2013; 440: 449-453, doi: 10.1016/j.bbrc.2013.09.124. 査読有
Rhythmic binding of Topoisomerase I

impacts on the transcription of Bmal1 and circadian period. Onishi Y, Kawano Y., Nucleic Acids Res. 2012; 40: 9482-9492., doi: 10.1093/nar/gks779. 査読有

Lycorine, a candidate for the control of period length in mammalian cells. Onishi Y, Kawano Y, Yamazaki Y., Cell Physiol Biochem. 2012; 29: 407-416., doi: 10.1159/000338495. 査読有

The harmala alkaloid harmine is a modulator of circadian Bmal1 transcription. Onishi Y, Oishi K, Kawano Y, Yamazaki Y., Biosci Rep. 2012; 32: 45-52., doi: 10.1042/BSR20110002. 査読有

〔学会発表〕(計 7件)

DNA methylation of the BMAL1 promoter. 佐藤涼一、杉原直樹、石塚洋一、松久保隆、大西芳秋、第36回日本分子生物学会年会、神戸、2013/12/04

時計遺伝子 BMAL1 プロモーター領域の DNA メチル化. 佐藤涼一、杉原直樹、石塚洋一、松久保隆、大西芳秋、第296回東京歯科大学学会、東京、2013/10/19

Rhythmic binding of Topoisomerase I impacts on the transcription of Bmal1 and circadian period. 大西芳秋、河野泰広、日本組織培養学会第86回大会、つくば、2013/05/30

Regulation of adipocytokines by natural product in cultured 3T3-L1 and RAW264 cells. 河野泰広、大西芳秋、山崎幸苗、日本組織培養学会第86回大会、つくば、2013/05/30

Rhythmic binding of Topoisomerase I impacts on the transcription of Bmal1 and circadian period. 大西芳秋、河野泰広、第35回日本分子生物学会年会、福岡、2012/12/14

Epigenetic regulation of clock genes during the differentiation of embryonic stem (ES) cells. 大西芳秋、奥田晶彦、西本正純、第34回日本分子生物学会年会、横浜、2011/12/13

Lycorine, a modulator of circadian Bmal1 transcription. 大西芳秋、河野泰広、山崎幸苗、第84回日本生化学会大会、京都、2011/09/22

〔産業財産権〕

出願状況(計 2件)

名称：生体リズムマーカー

発明者：大西芳秋

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2013-095888

出願年月日：25年4月30日

国内外の別：国内

名称：生体リズムの制御剤

発明者：大西芳秋、大石勝隆

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2013-029057

出願年月日：25年2月18日

国内外の別：国内

取得状況(計 1件)

名称：生体リズムの制御剤

発明者：大西芳秋、山崎幸苗、河野泰広、丸

山進、大石勝隆

権利者：同上

種類：特許

番号：特 5273731

取得年月日：24年5月24日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大西 芳秋 (ONISHI, Yoshiaki)

産業技術総合研究所・バイオメディカル研

究部門・研究グループ長

研究者番号：60233219