

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670111

研究課題名(和文) 標的既知化合物ライブラリーを用いた脊椎動物概日リズム形成機構の解明

研究課題名(英文) Identification of molecular mechanism for the establishment of circadian clock during development.

研究代表者

平山 順 (Hirayama, Jun)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授

研究者番号：90510363

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：概日リズムとは、生物の行動といった多様な生理機能に観察される約24時間の周期変動であり、ヒトを含む地球上の多くの生物に存在する。この生体リズムは、初期胚には存在せず、生物の発生期に形成されていくことが知られているが、このリズム形成の分子メカニズムは解明されていない。本研究の目的は、哺乳動物と共通の概日リズム制御機構を有するゼブラフィッシュを用いて独自に構築した化合物スクリーニング系により、生物の発生期の概日リズム形成に関わる分子を網羅的に探索した。この結果、生物の発生期の概日リズム形成に関わるERK経路等の細胞内シグナル経路とその下流で制御される転写因子を複数同定することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Circadian clocks constitute ubiquitous processes that regulate various biochemical and physiological events occurring with a 24 hour periodicity. Zebrafish eggs are fertilized externally and embryos develop rapidly from fertilized eggs to larvae that swim, making them an excellent model for studies of vertebrate circadian clocks' establish. Previous studies have reported that circadian rhythms in clock-controlled genes' expression and locomotor activity in zebrafish larvae are not observed when zebrafish are raised in constant conditions. These rhythms emerge only if embryos are exposed to environmental signals such as light. However the molecular mechanisms underlying how these circadian rhythms are set in motion during development remains unclear. This study used chemical library and have identified the signaling pathways and transcription factors, which are involved in establishment of circadian clock during development.

研究分野：分子生物学

キーワード：概日リズム

1. 研究開始当初の背景

概日リズムは、生物に内在する細胞時計により形成されるが、脊椎動物の分子時計は CLOCK、BMAL、CRY、PER の時計蛋白質により構成される。CLOCK は BMAL と二量体を形成し *Cry* と *Per* 遺伝子の転写を活性化し CRY と PER は CLOCK:BMAL 二量体の転写を抑制する。体細胞において、この転写の活性化と抑制は約 24 時間の周期で自律的に振動するため、細胞時計の標的遺伝子の発現ならびに標的遺伝子の制御する行動、代謝、または体温などの成体の生命現象に日周リズムが観察される。

興味深いことに、細胞時計は生物の初期胚には存在せず、個体発生に伴い組織・器官を構成する個々の細胞内に形成されていく。細胞時計が、組織・器官内で互いに同調すると、行動等の生命現象に概日リズムが形成される。個体発生に伴う細胞時計 および概日リズムの形成についての理解は進んでおらずその分子機構の解明は生体リズム研究領域の重要な課題となっている。

脊椎動物の概日リズム研究にモデル生物として広く用いられているマウス等の哺乳動物では母体内で胚が発生するため、その進行に伴う細胞時計の形成過程を生きた状態で解析することは困難である。また、出生直後の仔マウスは歩行ができないため、行動リズムの解析を行うことができない。これらの事実が、発生期の概日リズム形成の理解の障害になっている。一方で、ゼブラフィッシュの透明度は高いため、生きた状態で胚発生に伴う細胞時計の動態を観察することが可能である。また、ゼブラフィッシュ胚は母体外で発生が進むため化合物処理といった実験操作が容易である。さらに、ゼブラフィッシュでは、孵化後すぐに開始される稚魚の遊泳行動を指標とした行動リズムの解析が可能である。本研究は、これらゼブラフィッシュの特性を利用することにより、これまで解析が困難であった個体発生に伴う細胞時計および概日リズムの形成機構の解明ができるという着想に至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、哺乳動物と共通の概日リズム制御機構を有するゼブラフィッシュ稚魚の行動に観察される概日リズムを指標として機能既知化合物ライブラリーの中から、個体発生期の概日リズム形成に影響を与える化合物を選定することにより、発生期の概日リズム形成の分子メカニズムを解明することである。

3. 研究の方法

(1) ゼブラフィッシュの発生期の行動リズム形成を担う分子の網羅的探索

本解析では、ゼブラフィッシュ稚魚の行動リズムを指標にして、独自に準備した化合物ライブラリーから行動リズム形成に影響を与える化合物を選定した。本解析で重要となる点を以下に要約する。

i) 行動リズム解析システム：行動解析は DanioVision を用いて行った。この装置の下部は温度と光条件を一定に保つためのインキュベーターになっており、この部位で稚魚を飼育する。稚魚の単位時間 (10 分間) あたりの移動距離を機器の上部に設置された赤外線カメラにより経時的に追跡し計測する。DanioVision により計測した単位時間あたりの行動距離の値より、行動解析ソフトである ActgramJ (Schmid B et al. J Biol Rhythms 2011) を用いてアクトグラムを作成し、行動リズムの周期、位相、および振幅 (活動期と休止期のメリハリ) を算出した。

ii) 機能既知化合物ライブラリー：本研究で使用した化合物ライブラリーは 1600 種類の機能既知の臨床薬により構成されているので概日リズム形成に影響を与える化合物が選定できればその標的とする分子やシグナル経路を容易に同定することが可能である。

(2) 同定した行動リズム形成の候補因子のゲノム編集技術を用いた機能阻害

上記のスクリーニングにより発生期のリズム形成因子として同定した分子やシグナル経路、又はそれらの下流で機能する分子を機能阻害した個体を CRISPR システムにより作出した。作出した遺伝子改変ゼブラフィッシュの稚魚の行動リズム形成能を前項に記載した行動解析と同様に行った。

ゼブラフィッシュ胚や稚魚において、細胞時計標的遺伝子の発現レベルの経時的に定量することで、細胞時計の周期性、位相、および振幅を評価すること可能である。本解析ではスクリーニングにより選定した化合物またはゲノム編集技術により概日リズム形成候補因子を機能阻害したゼブラフィッシュの時計標的遺伝子の発現パターンを解析することにより、候補因子の個体発生期の概日リズム形成における役割を分子レベルで検討した。

(3) スクリーニングから得られた候補分子のカテゴリー化

上記のスクリーニングから得られた候補分子をパスウェイ解析およびインタラクトーム解析によりカテゴリー化し、発生期の概日リズム形成に関わる細胞内シグナル経路の候補を同定した。

4. 研究成果

(1) ゼブラフィッシュの発生期の行動リズム形成を担う分子の網羅的探索の成果

本スクリーニングにより、ゼブラフィッシュの発生期の行動リズム形成に関わる候補因子として ERK シグナル経路の構成因子（リン酸化酵素等）や細胞内酸化還元状態の制御因子などの複数の因子を選定した。また、これらのシグナル経路の下流で機能制御される転写因子を同定した。

(2) 同定した行動リズム形成の候補因子を機能阻害した遺伝子改変ゼブラフィッシュの作出と解析

上記のスクリーニングにより、選定した発生期の行動リズム形成に関わる 3 つの候補因子の Knockout (KO) 個体をゲノム編集技術を用いて作出した。特に、これらの 3 因子のうち 2 因子を機能阻害した個体 [Double KO (DKO)] 又は全てを機能阻害した個体 [Triple KO (TKO)] において、発生期の行動リズム形成能の低下が観察されることを見出した。また、細胞時計標的遺伝子の発現に観察される日周変動を指標として、概日リズムの形成を評価した結果、上記の DKO 又は TKO 個体において、発生期の遺伝子発現の日周変動の形成が阻害されることを見出した。

(3) スクリーニングから得られた候補分子のカテゴリー化による成果

本スクリーニングにより選定した化合物の標的分子のカテゴリー化の結果、発生期の概日リズム形成に関わるシグナル経路として、細胞のストレス応答に関わる経路、レドックスシグナル経路、又は MAPK シグナル経路などの複数の候補細胞内シグナル経路を同定した。また、同定したシグナル経路について、それぞれの主要構成因子を機能阻害した遺伝子改変個体を作出した。今後、作出した遺伝子改変個体の発生期の行動リズムと遺伝子発現の日周変動の形成能を解析していく予定である。

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)

[雑誌論文] (計 2 件)

(1) Shimomura T, Miyamura N, Hata S, Miura R, Hirayama J#, and Nishina H#.

The PDZ-binding motif of Yes-associated protein is required for its co-activation of TEAD-mediated *CTGF* transcription and oncogenic cell transforming activity

Biochem. Biophys. Res. Commun., 376, 206-210. 2014. (#Corresponding authors)

〔学会発表〕(計2件)

(1) Hirayama J, Molecular mechanism for the light-dependent establishment of circadian clock during development in zebrafish [7th Asia and Oceania Conference for Photobiology / November 2015, Taipei, Taiwan]

(2) Hirayama J, Molecular mechanism for the light-dependent establishment of circadian clock during zebrafish development.
[Seminar in National Health Research Institutes / November 2015, Zhunan, Taiwan]

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/mri/dbio/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平山 順 (Hirayama Jun)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・
准教授

研究者番号: 90510363