

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：34310

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H02208

研究課題名(和文) 体内時計調節システムにおける内在性一酸化炭素の機能解明

研究課題名(英文) Study on the role of endogenous CO in the circadian clock system

研究代表者

北岸 宏亮(Hiroaki, Kitagishi)

同志社大学・理工学部・教授

研究者番号：60448090

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：生体内一酸化炭素を選択的に除去する超分子化合物hemoCDを用いて、細胞および動物体内に存在する内在性COを捕捉し、その際に起こる時計遺伝子群の発現量変化を追跡することで、概日リズム制御システムにおける内在性COの役割解明を試みた。内在性COの欠乏により時計遺伝子PerおよびCryの発現に大きな乱れが観測され、体内時計の制御には内在性COが役割を果たしていることが示された。さらにそのメカニズムについて検討した結果、CO応答性転写因子であるNPAS2およびCLOCKの活性変化に加えて、CO除去により誘発される炎症反応が時計システムに影響を与えていることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

有毒ガスとして知られる一酸化炭素が体内時計の調節に不可欠な存在であるという直接的な実験的証拠が得られた。学術的にガスバイオロジーの研究成果として意義深いとともに、体内時計の乱れは様々な疾病を引き起こすことが知られているが、そのメカニズム解明の一端を明らかにした研究成果である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the effect of endogenous CO depletion on the circadian clock system using highly selective CO scavenging molecule, hemoCD. Upon injection of hemoCD to mice, the expression levels of clock genes such as Per and Cry were significantly disrupted as a result of CO-depletion. The mechanistic study revealed the activity changes of CO-responsive transcriptional factors, CLOCK and NPAS2. In addition, CO-removal-induced inflammatory responses also caused the disruption of the clock genes. Our study clearly demonstrates, for the first time, that the depletion of endogenous CO induces disruption of circadian clock system. The further mechanistic study is ongoing in our laboratory.

研究分野：合成化学，生物化学

キーワード：一酸化炭素 体内時計 概日リズム ヘム 炎症 時計遺伝子

1. 研究開始当初の背景

2002年 Dioum らは、概日リズム調節に関与する転写因子 NPAS2 が、生体内ガスである一酸化炭素(CO)と結合し、それによって転写活性が変化することを報告した。しかしそれ以降、生体内 CO が体内時計システムに実際に必要な分子なのかどうかについては、全く検討されてこなかった。なぜなら CO は、*in vivo* での除去が困難なガス分子であり、ノックダウン研究がほとんど不可能であったからである。本研究では、生体内から CO を選択的に除去する超分子錯体”hemoCD”を用いて、CO を一時的に欠乏させた生物検体を作成し、それらを用いて体内時計システムにおける内在性 CO の機能と役割について、詳細を明らかにする。

2. 研究の目的

本研究では、体内時計システムにおける内在性 CO の生理機能の包括的理解をめざし、生体内において内在性一酸化炭素を選択的に捕捉する超分子錯体 hemoCD (Fig. 1)を用いた *in vivo* および *in vitro* 両方の実験系を確立する。

- 1) マウス体内[*in vivo*]における内在性 CO 欠乏が及ぼす体内リズムへの影響調査
 - a. マウス体内への hemoCD 投与時における時計遺伝子発現リズムの継続的観測。
 - b. 転写因子や炎症マーカー等の関連事項追跡による、リズム変動メカニズムの考察。
 - c. 動物行動測定による CO 除去時の動物活動リズムの継続的観察。
- 2) 培養細胞[*in vitro*]における CO 濃度変化時の時計遺伝子発現リズムの観測
 - a. NPAS2 レポーター遺伝子を組み込んだ細胞による hemoCD 添加効果の *in vitro* におけるリアルタイム観測系の確立。
 - b. 細胞膜透過能を持つ新規 hemoCD (R8-hemoCD)の開発、細胞内 CO の直接的除去による細胞内リズム発現に対する影響の観測。

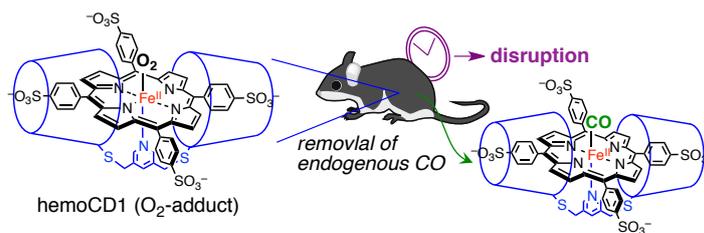


図 1. hemoCD による内在性 CO の除去とそれによる時計システムの攪乱

3. 研究の方法

- 1) *in vivo* の実験については、マウスの腹腔に CO 除去試薬である hemoCD の PBS 溶液(1 mM, 0.15 mL)を腹腔から投与し、投与後の時計遺伝子 Per および Cry の脳および肝臓内における発現量を real-time PCR により定量した。また関連遺伝子である HO-1 および TNF- α についても同様に定量した。hemoCD 投与による CO 除去時におけるマウスの運動量変化について、wheel running activity の経時観測を行った。さらに転写因子 NPAS2 および CLOCK の転写活性については、ChIP アッセイにより評価した。
- 2) *in vitro* の実験について、NPAS2 プロモーター下流にルシフェラーゼレポーター遺伝子を組み込んだ NIH 細胞を用い、クロノスにより発光量リズム測定を行った。R8-hemoCD の添加効果や、CO 除去物質 CORM による CO 添加効果などについて、検討を行った。

4. 研究成果

1) *in vivo* study

緩衝液(PBS)のみおよび鉄イオンを持たない Fb-hemoCD を投与したコントロール群と比較して、hemoCD を投与したマウス肝臓内の時計遺伝子の発現リズムは、大きな乱れを示した(Fig. 2)。このリズム変動をおおまかに4つのフェーズに分割し、それぞれの段階でどのようなことが起こっているのかを以下のように考察した(Fig. 3)。

1つ目のフェーズでは、生体内 CO が一時的に低減することによって、NPAS と CLOCK の E-box への結合が促進されることが、肝臓内 CO 定量および ChIP アッセイにより判明した(Fig. 4)。一方、2つ目のフェーズでは、CO 除去によりフィードバックがかかり、CO 産生酵素である HO-

1 の発現が亢進し、生体内 CO 濃度が一時的に上昇することが分かった。そのため、NPAS と CLOCK の転写活性が上がり、1 つ目のフェーズとは逆の遺伝子発現傾向が見られたと考えられる。3 つ目のフェーズでは、主に CO 除去によって炎症が誘発されたことが原因で、時計遺伝子の発現乱れが観測されたものと考えられる。CO の一時的な低減が、約 22 時間に渡って体内リズムを大きく乱すことが判明し、このことから生体内で産生される CO には体内リズムを調節する役割があることが明確に示された。

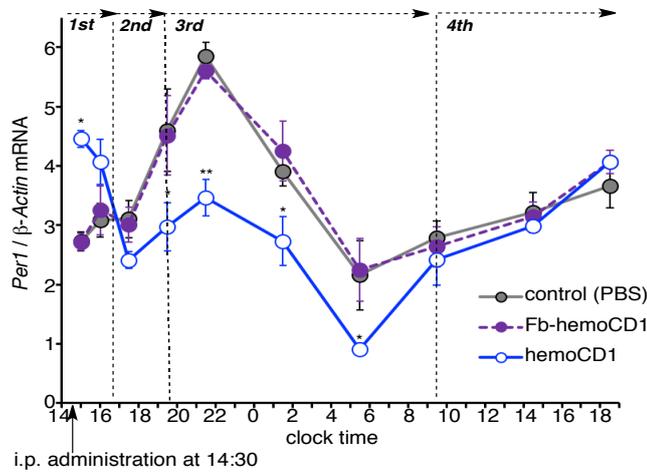


Fig. 2. The disruption of clock gene (*Per1*) expression in murine liver upon removal of endogenous CO by i.p. injection of hemoCD.

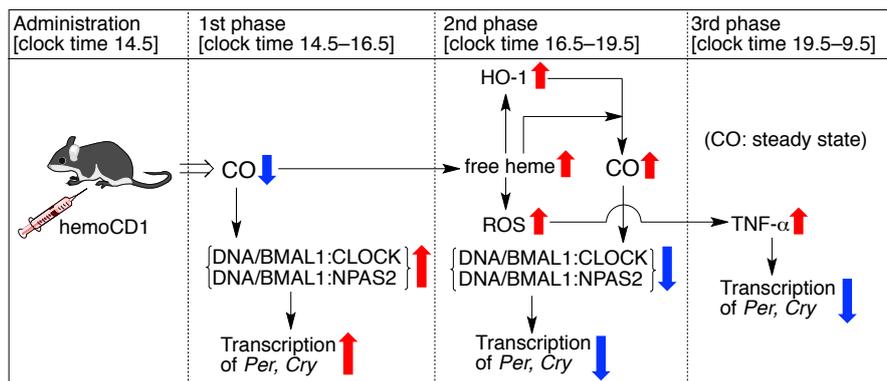


Fig. 3. A plausible mechanism for the circadian clock disruption induced by selective removal of CO in mice.

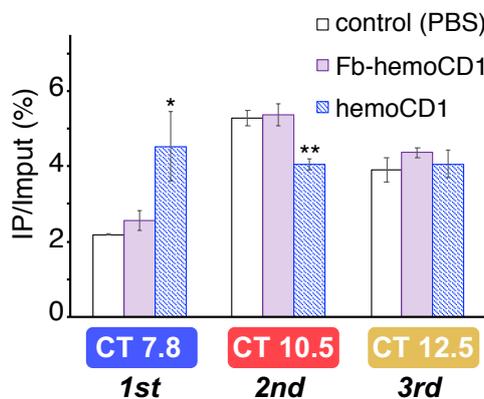


Fig. 4. The disruption of clock gene (*Per1*) expression in murine liver upon removal of endogenous CO by i.p. injection of

2) *in vitro* study

hemoCD は CO を捕捉すると CO 錯体となり、特徴的な鋭い吸収帯を示す。これを利用すると細胞内に存在する微量 CO を定量することが可能であった(hemoCD アッセイ, 図 5)。リズム非同調の NIH 細胞を用いた場合には細胞内からほぼ一定量の CO が検出された($CO = 250 \pm 50 \text{ pmol}/10^6 \text{ cells}$)。一方, リズム同調試薬(dexamethasone)を添加した場合, 細胞内 CO 量は計測時刻によってリズムのある変化を示した(図 5)。すなわち, 我々の分子ツール hemoCD を用いた実験によって, 内因性 CO の産生には概日リズムが存在することが示唆された。

またレポーター遺伝子を組み込んだ NIH 細胞を用いて, 細胞内リズムのリアルタイム観測を行った。その結果, CO 除放分子である CORM401-E 投与後の細胞内リズムが後方シフトした(図 6)。膜透過性を付与した CO 除去試薬 R8-hemoCD を加えると, CO 増加時とは反対にリズムの前方シフトが見られた。これらの実験結果より, CO 濃度の増減が細胞内リズムをコントロールする因子であることが示された。

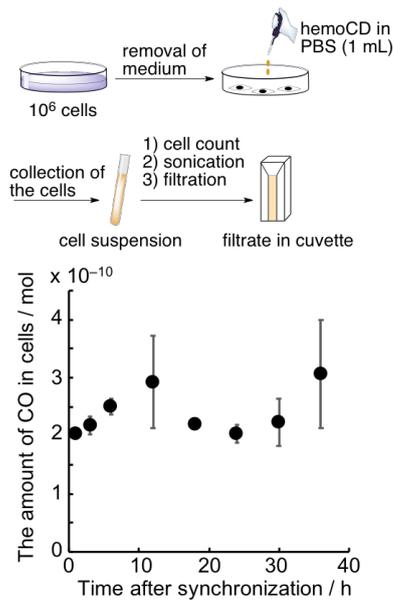


図5. リズム同調NIH-3T3細胞内COのhemoCDアッセイによる定量結果. 細胞内COには概日リズムが存在する.

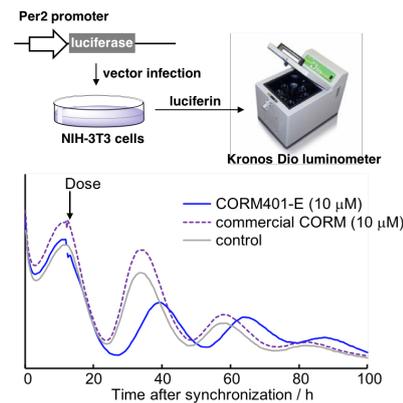


図6. CORM401-Eを加えた細胞内リズム観測. CO送達によりリズムが後方シフトする.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Minegishi Saika, Sagami Ikuko, Negi Shigeru, Kano Koji, Kitagishi Hiroaki	4. 巻 8
2. 論文標題 Circadian clock disruption by selective removal of endogenous carbon monoxide	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11996
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-30425-6	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 Mao Qiyue, Kitagishi Hiroaki	4. 巻 93
2. 論文標題 Optimized synthesis of a per-O-methylated α -cyclodextrin dimer linked at the secondary face by a pyridine ligand	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry	6. 最初と最後の頁 67～76
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10847-018-0839-4	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 -
1. 著者名 Kawaguchi Akira T., Salybekov Amankeldi A., Yamano Mariko, Kitagishi Hiroaki, Sekine Kaori, Tamaki Tetsuro	4. 巻 42
2. 論文標題 PEGylated carboxyhemoglobin bovine (SANGUINATE) ameliorates myocardial infarction in a rat model	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Artificial Organs	6. 最初と最後の頁 1174～1184
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/aor.13384	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 -
1. 著者名 Braud Laura, Pini Maria, Muchova Lucie, Manin Sylvie, Kitagishi Hiroaki, Sawaki Daigo, Czibik Gabor, Ternacle Julien, Derumeaux Genevieve, Foresti Roberta, Motterlini Roberto	4. 巻 3
2. 論文標題 Carbon monoxide-induced metabolic switch in adipocytes improves insulin resistance in obese mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 e123485
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1172/jci.insight.123485	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 該当する

1. 著者名 Minegishi Saika, Sagami Ikuko, Negi Shigeru, Kano Koji, Kitagishi Hiroaki	4. 巻 8
2. 論文標題 Circadian clock disruption by selective removal of endogenous carbon monoxide	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11996
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-30425-6	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 Mao Qiyue, Kitagishi Hiroaki	4. 巻 93
2. 論文標題 Optimized synthesis of a per-O-methylated α -cyclodextrin dimer linked at the secondary face by a pyridine ligand	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry	6. 最初と最後の頁 67 ~ 76
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10847-018-0839-4	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 -

1. 著者名 Kawaguchi Akira T., Salybekov Amankeldi A., Yamano Mariko, Kitagishi Hiroaki, Sekine Kaori, Tamaki Tetsuro	4. 巻 42
2. 論文標題 PEGylated carboxyhemoglobin bovine (SANGUINATE) ameliorates myocardial infarction in a rat model	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Artificial Organs	6. 最初と最後の頁 1174 ~ 1184
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/aor.13384	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 -

1. 著者名 Braud Laura, Pini Maria, Muchova Lucie, Manin Sylvie, Kitagishi Hiroaki, Sawaki Daigo, Czibik Gabor, Ternacle Julien, Derumeaux Geneviève, Foresti Roberta, Motterlini Roberto	4. 巻 3
2. 論文標題 Carbon monoxide-induced metabolic switch in adipocytes improves insulin resistance in obese mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 e123485
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/jci.insight.123485	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 該当する

〔学会発表〕 計16件（うち招待講演 10件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Hiroaki Kitagishi
2. 発表標題 Supramolecular porphyrin-cyclodextrin complexes as the versatile biomimetic chemical compounds
3. 学会等名 Supramolecular Chemistry of Nitrogen Ligands (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 北岸 宏亮
2. 発表標題 生体内一酸化炭素の擬ノックダウン法による機能解明
3. 学会等名 第6回バイオ関連シンポジウム若手フォーラム (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 北岸 宏亮, 峯岸 彩夏, 佐上 郁子, 根木 滋, 加納 航治
2. 発表標題 生体内COの除去による体内時計の変化
3. 学会等名 第12回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 北岸 宏亮, 峯岸 彩夏, 佐上 郁子, 根木 滋, 加納 航治
2. 発表標題 生体内一酸化炭素の選択的除去が及ぼす体内時計システムへの影響
3. 学会等名 第25回日本血液代替物学会年次大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroaki Kitagishi
2. 発表標題 Detection and removal of endogenous CO in vitro and in vivo by an aqueous hemoprotein model complex
3. 学会等名 10th International Conference on Heme Oxygenase 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 北岸 宏亮
2. 発表標題 生体で機能するヘムタンパク質モデルとしてのメチル化シクロデキストリン/鉄ポルフィリン包接錯体
3. 学会等名 第12回多糖の未来フォーラム(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 北岸 宏亮
2. 発表標題 高親和性分子間相互作用がもたらす“擬ノックダウン法”の提案
3. 学会等名 第3回先端ケミカルバイオロジー研究会(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 北岸 宏亮
2. 発表標題 生命研究に役立つヘムタンパク質ミメティック錯体
3. 学会等名 第31回生物無機化学夏季セミナー(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroaki Kitagishi
2. 発表標題 Supramolecular porphyrin-cyclodextrin complexes as the versatile biomimetic chemical compounds
3. 学会等名 Supramolecular Chemistry of Nitrogen Ligands (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 北岸 宏亮
2. 発表標題 生体内一酸化炭素の擬ノックダウン法による機能解明
3. 学会等名 第6回バイオ関連シンポジウム若手フォーラム (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 北岸 宏亮, 峯岸 彩夏, 佐上 郁子, 根木 滋, 加納 航治
2. 発表標題 生体内COの除去による体内時計の変化
3. 学会等名 第6回バイオ関連シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 北岸 宏亮, 峯岸 彩夏, 佐上 郁子, 根木 滋, 加納 航治
2. 発表標題 生体内一酸化炭素の選択的除去が及ぼす体内時計システムへの影響
3. 学会等名 第25回日本血液代替物学会年次大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroaki Kitagishi
2. 発表標題 Detection and removal of endogenous CO in vitro and in vivo by an aqueous hemoprotein model complex
3. 学会等名 10th International Conference on Heme Oxygenase 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 北岸 宏亮
2. 発表標題 生体で機能するヘムタンパク質モデルとしてのメチル化シクロデキストリン/鉄ポルフィリン包接錯体
3. 学会等名 第12回多糖の未来フォーラム (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 北岸 宏亮
2. 発表標題 高親和性分子間相互作用がもたらす“擬ロックダウン法”の提案
3. 学会等名 第3回先端ケミカルバイオロジー研究会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 北岸 宏亮
2. 発表標題 生命研究に役立つヘムタンパク質ミメティック錯体
3. 学会等名 第31回生物無機化学夏季セミナー (招待講演)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 新規化合物、炎症性疾患の予防及び/又は治療のための薬剤、又は、一酸化炭素送達物質	発明者 同志社大学	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2019-0339	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 新規化合物、炎症性疾患の予防及び/又は治療のための薬剤、又は、一酸化炭素送達物質	発明者 同志社大学	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2019-0339	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
研究分担者	佐上 郁子 (Sagami Ikuko) (10143033)	京都府立大学・生命環境科学研究科・研究員 (24302)	
研究分担者	根木 滋 (Negi Shigeru) (50378866)	同志社女子大学・薬学部・准教授 (34311)	