

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 1 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2011

課題番号：20310119

研究課題名（和文） メタボローム法を基盤とした概日計中枢由来細胞の位相シフトと細胞間同調機構の解析

研究課題名（英文） Metabolomics Analysis of Phase Shift and Intercellular Entrainment of Central Circadian Pacemaker Cells

研究代表者

程 肇 (TEI HAJIME)

金沢大学・自然システム学系・教授

研究者番号：00242115

研究成果の概要（和文）：

本研究では概日リズム位相シフト及び細胞間同調機構に着目する。そこで、細胞の位相シフトに及び細胞間同調機構を司る分子を明らかにするために、主にメタボローム解析にプロテオーム解析を組み合わせた包括的データベースを構築した。その結果、細胞の位相シフトには、細胞のエネルギー状態、脂質代謝系、アミノ酸合成系に含まれる分子が、さらに、細胞間同調には薬物代謝系酵素群による代謝物中間体、核酸合成代謝物が関与している可能性を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

This study is focused on the phase shift and inter-cellular entrainment of the cellular circadian rhythms. To clarify the molecule(s) these phenomena, I have constructed a database assembling the results of metabolomic and proteomic analyses. Metabolites involved in the determination of cellular energy states, lipid metabolism, and amino acid biosynthesis worked for the cellular phase shift; and those involved in xenobiotics and nucleic acid metabolism functioned for cellular entrainment,

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
2009年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：ゲノム時間生物学

科研費の分科・細目：ゲノム科学・ゲノム生物学

キーワード：概日リズム、視交叉上核、時計遺伝子、メタボローム、データベース、CE-MS

## 1. 研究開始当初の背景

哺乳類の概日リズムは、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、さらには生命システムの巧妙な機能原理の工学的応用等様々な観点から見て、重要な研究課題である。本研究に先立つ先行研究では、概日時計中枢由来細胞で存在量が変動する化合物を抽出した。

## 2. 研究の目的

本研究では振動に着目した成果をふまえた上で、次の段階として概日リズム位相シフト及び細胞間同調機構に着目する。すなわち先行研究で観察された細胞内エネルギー状態の振動リズム形成に必要な分子機構、位相シフトに与える影響、そして細胞間同調機構を司る分子を明らかにするために、メタボローム、プロテオーム、トランスクリプトーム解析を組み合わせた包括的データベースを構築する。得られた成果は、各種リズム障害疾患などの診断や対症薬の開発、そして、概日時計発振システムの分子的理解に大きく貢献すると考えられる。

## 3. 研究の方法

### (1) *Per1::luc* 導入 SCN 由来細胞の位相同調に伴い細胞内レベルが変化を示す代謝物質のメタボローム解析

本研究では、位相を前進または後退させた *Per1::luc* 導入 SCN 由来細胞の細胞内レベルが変化する代謝物質を網羅的にメタボローム解析により検索する。即ち、概日振動を示す SCN 由来細胞来細胞へ、時刻依存的に各種試薬を投与し、その振動位相を前進または後退させ、経時的にそれぞれ細胞内外に存在する低分子代謝物質を分離抽出する。抽出標品内

に含まれる質量数 1000 以下の各代謝物質の濃度を、キャピラリー電気泳動-質量分析装置 (CE-MS) 法により、網羅的に測定する。特に、この細胞のエネルギー状態が概日リズムを示すことから、解糖系、ペントースリン酸回路、電子伝達系に含まれる分子の細胞内レベルの変化と位相シフトの方向（前進または後退）との関係に着目する。また、細胞間同調に働くと考えられるモノアミン系神経伝達物質合成経路の分子の動態についても変動を詳細に調べる。SCN 由来細胞の振動位相が前進または後退する時には、概日リズム同調に機能する分子の細胞内外レベルは、上昇したり減少したりすることが予測できるため、同様な振る舞いを示す分子を集積しデータベース化する。

### (2) *Per1::luc* 導入 SCN 由来細胞の位相同調に伴い細胞内外レベルが変化を示す代謝物質のプロテオーム解析

1. と同様に概日振動を示す *Per1::luc* 導入 SCN 由来細胞来細胞へ、時刻依存的に各種試薬を投与し、その振動位相を前進、または後退させ、経時的に細胞からタンパク質を抽出する。抽出標品内に含まれるタンパク質の解析には SILAC (Stable Isotopic Labeling using Amino Acids in Cell Culture) 法を用いる。すでに、SCN 由来細胞を材料にした SILAC 法により、約 1000 種類のタンパク質を同定できた。この中には、エネルギー代謝に関する解糖系、ペントースリン酸回路、電子伝達系を構成する酵素が多数含まれていた。特に、この細胞のエネルギー状態が概日リズムを示すことから、これらの酵素の細胞内レベルの変化と位相シフトの方向（前進または後退）との関係に着目する。

#### 4. 研究成果

哺乳類の遺伝的に決定された内在性の概日時計の本体（細胞）は、脳視交叉上核（Suprachiasmatic nucleus; SCN）にある。概日リズムの形成には、多様な分子の複雑な相互作用によるネットワークが機能していると考えられる。よってこのネットワークの基本構造を理解するには、概日時計細胞内や細胞外の各種代謝物質の濃度を経時的かつ網羅的に定量した統合データベースの構築と、さらには最先端の情報科学分野の解析技術に基づく**モデル化**が必要である。このためには、中枢と末梢組織のリズム位相を**細胞レベル**で特定する方法、及び代謝産物の効率的な網羅的解析法の開発が必要である。本研究では、この *Period1::luciferase* 導入 SCN 由来細胞及び末梢性細胞について最新の方法によるメタボローム解析を行い、それぞれの細胞内で概日振動を示す低分子を探索しデータベース化する。さらに、SCN 由来細胞同士のリズム同調分子、並びに SCN 由来細胞が末梢性細胞の概日リズムの同調をおこなう際に作用する分子の検索を進める。本年度は、*Per1::luc* 導入 SCN 由来細胞を用いて、検出できる約 800 種の代謝物質のメタボローム解析を行った。そして、胞内レベルが概日振動を示す代謝物質のデータベース化を実施した。さらに、位相同調時（前進や後退）に細胞内レベルが特異的に変動する分子の検索を進めたところ、位相同調時に細胞のエネルギー状態、脂質代謝系、アミノ酸生合成系が時刻特異的に大きな変化を示すことがわかった。さらに、細胞間同調には薬物代謝系酵素群による代謝物中間体、核酸生合成代謝物が関与している可能性を明らかにした。

#### 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 6 件）

① Ogawa, Y., Koike, N., Kurosawa, G., Soga, T., Tomita, M., Tei, H. Positive Autoregulation Delays the Expression Phase of Mammalian Clock Gene *Per2*. (査読有)

(2011) PLoS One. 6, e18663.

② Akiyama, S., Ohta, H., Watanabe, S., Moriya, T., Hariu, A., Nakahata, N., Chisaka, H., Matsuda, T., Kimura, Y., Tsuchiya, S., Tei, H., Okamura, K., Yaegashi, N.

The uterus sustains stable biological clock during pregnancy. (査読有)

(2010) Tohoku J. Exp. Med. 221, 287-298.

③ Morioka, R., Arita, M., Sakamoto, K., Kawaguchi, S., Tei, H., Horimoto, K. Period-phase map: two-dimensional selection of circadian rhythm-related genes. (査読有)

(2009) IET Syst Biol. 3, 487-495.

④ Watanabe, T., Suzuki, T., Ishikawa, A., Yokota, Y., Ueda, H. R., Yamada, R. G., Tei, H., Imai, S., Tomida, S., Kobayashi, J., Naito, E., Yasuo, S., Nakao, N., Namikawa, T., Yoshimura, T., Ebihara, S.

Genetic and Molecular Analysis of Wild-Derived Arrhythmic Mice. (査読有)

(2009) PLoS ONE. 4, e4301.

⑤ Yamazaki, S., Yoshikawa, T., Biscoe, E. W., Numano, R., Gallaspy, L. M., Soulsby, S., Papadimas, E., Pezuk, P., Doyle, S. E., **Tei, H.**, Sakaki, Y., Block, G. D., Menaker, M.

Ontogeny of circadian organization in the rat. (査読有)

(2009) J Biol Rhythms. 24, 55-63.

⑥ Ohta, H., Xu, S., Moriya, T., Iigo, M., Watanabe, T., Nakahata, N., Chisaka, H., Hanita, T., Matsuda, T., Ohura, T., Kimura, Y., Yaegashi, N., Tsuchiya, S., **Tei, H.**, Okamura, K.

Maternal feeding controls fetal biological clock. (査読有)

(2008) PLoS ONE. 3, e2601.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

程 肇 (TEI HAJIME)

金沢大学・自然システム学系・教授

研究者番号：00242115