

機関番号：10101

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790195

研究課題名 (和文) 生物発光イメージングを用いた軟骨分化における生物時計の機能の解明

研究課題名 (英文) Study on functions of biological clock during chondrogenesis using bioluminescence imaging

研究代表者

権 赫準 (KWON HYUCKJOON)

北海道大学・大学院医学研究科・特任助教

研究者番号：90447045

研究成果の概要 (和文) : 複数の遺伝子の発現を一細胞レベルでモニタリングできるシステムを構築し、時計遺伝子 Bmal1 と Per2 の発現を同時にモニタリングすることに成功した。そのシステムを用いて軟骨分化における ATP と酸素の変化をリアルタイムでモニタリングすることにより、ATP と酸素がカップリングしながら振動する代謝リズムが発見された。その代謝リズムの機能を調べた結果、代謝リズムは軟骨細胞への分化には関係なく、細胞の凝集に重要であることが分かった。

研究成果の概要 (英文) : We have constructed bioluminescence imaging system for monitoring dual reporter expression at the single-cell level. Using this system, we succeeded in observing that bmal1 gene expression oscillates in anti-phase with per2 gene expression. In addition, bioluminescence imaging has showed that metabolic oscillations to exhibit coupled oscillations of ATP and oxygen are induced during chondrogenesis. We found that the metabolic oscillations are involved in prechondrogenic condensation, not in chondrogenic differentiation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：細胞分化

科研費の分科・細目：医歯薬学

キーワード：軟骨分化、発光イメージング、生物時計、代謝リズム

1. 研究開始当初の背景

時計遺伝子が骨量の調節に重要な役割を果たしていること、軟骨マーカーが時計遺伝子 *Bmal1* によって誘導されること、生物時計のコンポーネントである *Dec1, 2* が軟骨分化を促進すること等が報告され、軟骨分化に大きく影響を与えると考えられるが生物時計の機能が明確に解明されていない。また、軟骨形成の調節は骨格パターンにおいて重要な過程であるがまだ軟骨パターン形成を調節する分子時計は発見されていない。それで、生物時計が軟骨パターンの形成に重要な役割をするか或いは別の分子時計が存在するのかをリアルタイムイメージングを用いて調べた。

2. 研究の目的

(1) 軟骨細胞の遺伝子発現やエネルギー代謝変化がリアルタイムでモニタリングできるように発光イメージングシステムを構築する。

(2) 軟骨分化における時計遺伝子の発現変化をモニタリングすることにより生物時計の特異的機能を解明する。

(3) 軟骨分化における ATP と酸素の変化をモニタリングすることにより軟骨形成がエネルギー代謝によってどのように調節されるかを調べる。

3. 研究の方法

(1) 時計遺伝子や軟骨マーカー遺伝子、常時的発現するアクチン遺伝子のプロモーターに多色発光プローブを融合し、リアルタイムで遺伝子発現や代謝変化がモニタリングできるレポーターを作製する。

(2) レトロウィルスを用いて発光レポーター

遺伝子を軟骨モデル細胞に導入する。

(3) 発光測定装置と発光イメージング装置を用いて発光レポーターからの発光量をリアルタイムで定量的に測定する。

4. 研究成果

(1) 時計遺伝子 *Bmal1* と *Per2* と軟骨分化のマーカー *Col12a* と *Sox9* のプロモーター領域をマウスのゲノム遺伝子からクローニングし、それぞれのプロモーターの下流に緑色、赤色のルシフェラーゼの遺伝子を融合させることにより、時計遺伝子と軟骨マーカー遺伝子の発現がモニタリングできる発光レポーターの構築に成功した。

(2) 発光レポーターをレトロウィルスベクターに導入することにより効率良く複数の遺伝子を導入するシステムを構築した。

(3) 赤と緑2色の発光プローブからの光をそれぞれ別の光路を通過して一つの CCD 内の別の領域で検出するようにして二つの遺伝子の発現が同時にモニタリングできるシステムを構築した。

(4) 構築した発光イメージングを用いて赤で光る *Bmal1* レポーターと赤で光る *Per2* レポーターを導入した NIH3T3 細胞をイメージングし、一細胞レベルで *Bmal1* と *Per2* の遺伝子発現の同時モニタリングに成功した。

(5) 軟骨分化中における時計遺伝子と軟骨マーカー遺伝子の複数遺伝子の発現をリアルタイムでモニタリングした結果、軟骨分化開始の 2-3 日後から検討したすべての遺伝子で 6-8 時間周期のウルトラディアンリズムが観察され、ピック位相まで揃っていることが分かった。この結果からウルトラディアンリズムは遺伝子発現を反映するのではなく発光反応の振動を反映している可能

性が推測され、安定に発現するはずの Actin プロモーター領域を赤色のルシフェラーゼの遺伝子の下流に融合させたレポーター遺伝子を細胞に導入し、軟骨分化における Actin レポーター遺伝子の発光をモニタリングした結果、他の遺伝子と同じく 6-8 時間周期のウルトラディアンリズムが観察され、ウルトラディアンリズムは発光反応の振動を反映していることが明らかになった。

(6) 常時発現の Actin プロモーターにそれぞれ ATP と酸素両方に依存して発光する鉄道虫ルシフェラーゼ遺伝子 (PxRe) と酸素のみに依存するウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子 (ReB1) を融合した二つのレポーターを軟骨分化モデル細胞に同時に導入し、リアルタイムで生物発光イメージングを行った結果、ATP が 6-8 時間周期で、また酸素が 3-4 時間周期で振動することが分かった。

(7) 代謝物質を網羅的に分析した結果、解糖過程と酸化的リン酸化とに關与している代謝物質が ATP 振動のピックとトローフの間で有意に差があることが分かった。さらに解糖過程と酸化的リン酸化をそれぞれ阻害すると両方ともウルトラディアンリズムが抑制されることが分かった。これらの結果から軟骨分化中に代謝レベルで分子時計が存在し、それが重要な役割をすることが分かった。

(8) 個々の細胞レベルで Actin-PxRe の発光強度をリアルタイムで計測した結果、軟骨分化誘導後には ATP のウルトラディアンリズムが誘導されないが三日後から急に個々の細胞が同調しながら ATP のウルトラディアンリズムを誘導することが観察された。さらに、低倍率でリアルタイムイメージングした結果、ATP のウルトラディアンリズムが細胞間のリレーで長距離離れた細胞まで伝わり、ATP wave が誘導されることが明らかになった。この結果から、ATP のウルトラディ

アンリズムの誘導には細胞間のコミュニケーションが重要な役割をすることが分かった。

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. Takahashi K, Onodera S, Tohyama H, Kwon, HJ, Honma K, Yasuda K. In vivo imaging of particle-induced inflammation and osteolysis in the calvariae of NFκB/Luciferase transgenic mice. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2011, 727063 (2011) 査読有
2. Kwon HJ, Enomoto T, Shimogawara M, Yasuda K, Nakajima Y, Ohmiya Y. Bioluminescence imaging of dual gene expression at the single-cell level. *Biotechniques* 48, 460-462 (2010) 査読有
3. Kwon H J, Yasuda K, Ohmiya Y, Honma K, Chen YM, Gong JP. In vitro differentiation of chondrogenic ATDC5 cells is enhanced by culturing on synthetic hydrogels with various charge densities. *Acta Biomaterialia*, 6, 494-501 (2010) 査読有
4. Misu M, Furukawa H, Kwon H J, Shikinaka K, Kakugo A, Sato T, Osada Y, Gong, J P. Photoinduced in situ formation of various F-actin assemblies with photoresponsive polycation. *Journal of Biomedical Materials Research: Part A*, 89, 424-431 (2009) 査読有
5. Akimoto H, Kwon HJ, Ozaki M, Yasuda K, Honma K, Ohmiya, Y. In vivo

bioluminescence imaging of bone marrow-derived cells in brain inflammation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 380, 844-849 (2009) 査読有

6. Yasuda K, Kitamura N, Gong JP, Arakaki K, Kwon HJ, Onodera S, Chen YM, Kurokawa T, Kanaya F, Ohmiya Y, Osada Y. A Novel Double-network hydrogel induces spontaneous articular cartilage regeneration in vivo in a large osteochondral defect. *Macromolecular Bioscience* 9, 307-316 (2009) 査読有

[学会発表] (計3件)

- ① Kwon HJ, Enomoto T, Shimogawara M, Yasuda K, Nakajima Y, Ohmiya Y. Bioluminescence imaging of dual gene expression at the single-cell level. The 32nd annual meeting of the molecular biology society of Japan. Kobe Port Island, Kobe, Japan. 2010. 12.7-10
- ② Kwon HJ, Enomoto T, Shimogawara M, Yasuda K, Nakajima Y, Ohmiya Y. Bioluminescence imaging of dual gene expression at the single-cell level. The 8th International Symposium for Future Drug Discovery and Medical Care [Molecular Imaging for Treatment Monitoring] Sapporo, Japan. 2010. 9. 1-2
- ③ Kwon HJ, Yasuda K, Ohmiya Y, Honma K, Chen YM, Gong JP. In vitro differentiation of chondrogenic ATDC5 cells is enhanced by culturing on synthetic hydrogels with various charge densities. The 32nd annual meeting of the molecular biology society of Japan. Pacific Yokohama,

Yokohama, Japan. 2009. 12.9-12

[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◇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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

権 赫準 (KWON HYUCKJOON)

北海道大学・大学院医学研究科・特任助教

研究者番号: 90447045

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし