

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04349

研究課題名(和文) 概日時計遺伝子非依存的に自律振動する新規概日時計反応の探索

研究課題名(英文) Investigation for novel circadian clock reactions independent of the transcription-translation feedback loop of clock genes

研究代表者

大川 妙子(西脇妙子)(Take, Ohkawa)

名古屋大学・生命農学研究科・准教授

研究者番号：30432230

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：概日時計は時計遺伝子による転写・翻訳のネガティブフィードバックループとして理解されているが、周期や位相の決定機構など未解明な点も多い。一方転写・翻訳に不依存な蛋白質翻訳後修飾のリズムも報告されているが、その普遍性と概日時計システムにおける意義は不明である。本研究では概日時計の周期や位相を調節する薬剤の探索、および蛋白質翻訳後修飾の解析を通じてこの問題に取り組んだ。その結果周期を短縮する化合物と位相変位を誘導する化合物について、それらの標的蛋白質の候補が得られた。またリン酸化をはじめとする蛋白質翻訳後修飾についても解析を進めており、両者の関連性を追求することで問題解明の糸口を探っている。

研究成果の概要(英文)：The widely accepted models for circadian clocks are based on transcriptional-translational negative feedback loops composed of circadian clock genes. However, some important aspects, such as how the periods are adjusted around 24 h and how the phase of the rhythms are determined, are not fully incorporated into these models. On the other hand, there are several examples of protein posttranscriptional modification rhythms independent of the feedback loops, though their exact roles in the circadian clock systems are still unknown. In this study we tried to elucidate these points by proteomic and chemical biology approach. We obtained compounds that affect period and phase and the potential candidates of their target proteins. We also set up the system to study posttranslational modification rhythms including phosphorylation. By these bidirectional approaches, we are now trying to understand the whole circadian clock systems.

研究分野：時間生物学

キーワード：概日時計 ケミカルバイオロジー 翻訳後修飾

1. 研究開始当初の背景

様々な生理活性は、細胞内に存在する自律振動体である概日時計による制御を受け、約 24 時間周期の概日リズムを示す。現在真核生物の概日時計は、概日時計遺伝子によって構成される「転写・翻訳のネガティブフィードバックループ」として理解されている。これは、概日時計遺伝子産物が自身をコードする mRNA の発現を抑制し、このループが約 24 時間で 1 周することで概日時計が発振するというモデルである (Hurley et al. 2016, *Trends. Biochem. Sci.* 41, 834)。このモデルはすべての生物の概日時計を説明できると考えられているが、まだ不十分な点も残されている。例えば、周期が 24 時間となるためには、ループ内に適切な時間遅れが存在する必要がある (Novác and Tyson 2008, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 9, 981)。これまでに、時計蛋白質の安定性の制御や、細胞内局在の制御など様々な要因が時間遅れをもたらす候補として挙げられてきたが、明確な結論には至っていない。

さらに、この機構によらない発振機構の存在も明らかになっている。シアノバクテリアにおいては、精製した概日時計蛋白質 KaiA、KaiB、KaiC を ATP とともに試験管内で混合することで、KaiC のリン酸化リズムが再構成できる (Nakajima et al. 2005, *Science* 308, 414)。また、核を持たない赤血球細胞においても、抗酸化蛋白質である Peroxiredoxin の酸化状態が約 24 時間周期で変化することが報告されている (O'Neil et al. 2011, *Nature* 469, 498)。しかしながら、これらは例外的なものと捉えられており、概日時計システムにおける位置と重要性は明らかになっていない。

2. 研究の目的

上記のように転写・翻訳のネガティブフィードバックループモデルは、最も基本的な概日時計の発振機構とされているが、まだ不十分な点も多い。一方、転写・翻訳に依存しない発振機構の重要性については評価が定まっておらず、細胞内における転写・翻訳ループとの関係性についてもほとんど明らかになっていない。そこで本研究では、転写・翻訳に依存しない発振機構の普遍性を追求するとともに、その概日時計システム全体における役割を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究においては、生物材料として U2OS *pBmal1::dLuc* レポーター株を主に用いた。この細胞株は概日時計遺伝子 *Bmal1* プロモーターの下流にホタル由来の発光遺伝子 *dLuc* を連結したレポーターコンストラクトをヒト U2OS 細胞に導入し得られたものである。翻訳後修飾の解析、および化合物の標的蛋白質の同定は、U2OS *pBmal1::dLuc* レポーター株から M-PER mammalian protein extraction

reagent (ThermoFisher) を用いて全蛋白質抽出液を調製し、nanoLC-MS/MS 装置を用いたショットガン法により行った。

pBmal1::dLuc レポーター株の発光リズムの測定は、CL384 (中立電機) を用いた。細胞を 384 ウェルホワイトプレートに播種し、コンフルエントの状態まで培養した後、dexamethasone を加えて個々の細胞のリズムを同調させ、発光基質として D-luciferin を加え測定に供した。本装置を用いることにより、一度に 384 ウェルプレートを最大 16 枚測定することが可能である。

4. 研究成果

蛋白質翻訳後修飾リズムの解析

①-1 プロテオミクスの手法による翻訳後修飾解析の基盤整備

本研究においては、プロテオミクスの手法により翻訳後修飾が 24 時間周期で振動している蛋白質を同定することを目指し、翻訳後修飾の解析のため、質量分析装置にゲルフリーショットガンプロテオミクスシステム、リン酸化ペプチド高効率検出システム、ノイズ軽減システムを導入し、プロテオミクスに最適なシステムを構築した。また試料の前処理用にリン酸化ペプチド濃縮の完全自動化システムを稼働させた。予備実験においては、細胞内の存在量があまり大きくないことが知られている時計蛋白質のリン酸化型も検出することができた。また、分析の過程で生じる誤差を排除するため、培養細胞に対して安定同位体標識アミノ酸を用いた代謝ラベル法である SILAC 法の適用を検討し、97% の蛋白質を ¹³C で標識できる条件を確立できた。¹³C 標識サンプルを内部標準として各時系列サンプルと共に質量分析を行うことで、データの信頼性が大きく向上することが期待される。

また上記のショットガンプロテオミクスの手法に加え、二次元電気泳動を用いた手法についても検討を行い、全自動二次元電気泳動装置 (SHARP) を用いて 2D-DIGE により解析を行っている。

①-2 時計蛋白質のリン酸化の解析

シアノバクテリア KaiC には全部で 2 ヶ所のリン酸化部位が存在するが、これらは概日時計発振において、互いに拮抗する役割を担っていることが明らかとなっており (Nishiwaki et al 2007, *EMBO J.* 26, 4029)、これを手がかりとして、転写・翻訳に依存しない概日時計発振機構の解明が進んだ。哺乳類の多くの時計蛋白質もリン酸化修飾を受けることが知られているが、すべてのリン酸化部位を網羅的に解析し、個々の部位のリン酸化状態の変動と概日時計発振における役割を明らかにした例はまだ報告されていない。そこで本研究では、哺乳類の時計蛋白質についてこの点の解明をめざした。

U2OS *pBmal1::dLuc* レポーター株に対し、

Crispr/Cas9法を用いて内因性の時計遺伝子をノックアウトした後、時計蛋白質をアフィニティタグとの融合タンパク質として発現させるコンストラクトを導入した。適切な誘導条件により、*pBmall::dLuc* レポーター由来の発光リズムが復活することが確認できた。現在は経時的に調製した細胞抽出液からタグを用いて時計蛋白質を精製し、概日時計発振における時計蛋白質のリン酸化の機能を解明している。

また上記の細胞レベルの系を用いて、ネガティブフィードバックモデル(Mohawk et al. 2006, *Annu. Rev. Neurosci.* 35, 445) の再検討にも取り組んでいる。

ケミカルバイオロジーによる概日時計の周期および位相決定機構の解明

現在、概日時計の周期決定機構の全貌は明らかになっていないが、リン酸化などの翻訳後修飾が関与している可能性が挙げられている(Zheng and Sehgal. 2012, *Trends. Neurosci.* 35, 574)。また概日時計の位相は細胞内の酸化還元状態によって制御されるという報告もある(Putker et al. 2018, *Antioxid. Redox Signal.* 28, 507)。したがって、周期および位相を調節する化合物が得られその標的が明らかになれば、蛋白質翻訳後修飾と概日時計の関係について理解が深まることが期待される。

本研究は、名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所 (ITbM) の大井グループ、ケミカルライブラリーセンター、および分子構造センターと共同で実施した。当初は、概日時計中枢である視交叉上核由来の細胞株 SCN2.2 を用いて研究を進める予定であったが、分化処理を行っても神経細胞マーカーが発現しないなど、神経細胞の性質を保持していない可能性があったため、U2OS *pBmall::dLuc* レポーター株を用いて研究を進めた。

-1 低分子化合物ライブラリーのスクリーニング

U2OS *pBmall::dLuc* レポーター株を用いて、ケミカルライブラリーセンター所有の約20,000種類の低分子有機化合物を含む化合物ライブラリー (ITbM ライブラリー) のスクリーニングを行った。CL384 (中立電機) を用いて約1週間発光リズムを測定後、付属の解析ソフトでデータを解析した。スクリーニングの結果、全体の約1.5%の化合物が、周期、位相、振幅など、リズムに対して何らかの影響を示した。特に顕著な周期延長効果を示した化合物3種類、周期短縮効果を示した1種類について、それぞれの標的蛋白質をアフィニティ精製法により同定するため、アフィニティビーズの作成を行っている。また周期延長化合物の1つ(化合物A)については、ゼブラフィッシュの飼育水中に加えて行動リズムに関する影響を確かめたところ、U2OS細胞と同様に周期延長効果が確認された。こ

のことから、化合物Aは中枢神経系にも作用することが期待できる。

-2 リズムを短周期化する化合物の標的の同定

picrotoxinin は、セスキテルペンに属する痙攣薬で、GABA_A 受容体の阻害薬として知られている。近年 picrotoxinin が概日リズムの周期を大幅に短縮することが見出され、この効果は GABA_A 受容体を介していないことが示唆された(Freeman et al. 2013, *J. Neurophysiol.* 110, 103)。そこで本研究では、アフィニティ精製法による picrotoxinin の周期短縮効果に関する標的蛋白質の同定を試みた。

まず picrotoxinin をアガロースビーズに共有結合するため、リンカー部分を有した picrotoxinin の誘導体を多数合成し、これらの中から周期短縮効果を保持しているものをスクリーニングによって選択した。これをアガロースビーズに共有結合しアフィニティビーズを作成した。

アフィニティ精製においては、アフィニティビーズへの非特異的吸着や、質量分析における測定ごとの誤差が問題となってきた。これらの問題に対処するため、本項目においても、SILAC法を導入することとした。¹³C-Lys、¹³C-Arg 存在下で培養した U2OS 細胞の抽出液、および通常の ¹²C-Lys、¹²C-Arg 存在下で培養した U2OS 細胞の抽出液を調製し、一方にアフィニティビーズを、他方に化合物を結合していないコントロールビーズを加え、それぞれのビーズに結合した蛋白質を溶出した後、混合し質量分析に供し、結果を比較した。さらに、アフィニティビーズに遊離の化合物を添加したものと添加していないものについても同様に分析を行い、結果を比較した。その結果、picrotoxinin のターゲット候補の1つとして、薬物代謝に関わる蛋白質Aが得られた。この蛋白質が真のターゲットであるか否かを確かめるため、Crispr/Cas9法により蛋白質Aおよび近縁の蛋白質をコードする遺伝子をノックダウンし、概日リズムに対する影響を確認している。

-3 位相変化を誘導する化合物

抗酸化蛋白質である Peroxiredoxin の酸化状態が、多くの生物において普遍的に概日リズムを示すことが報告されていたため (Edgar et al. 2011, *Nature* 489, 501)、本研究では、レドックス関連化合物を含むライブラリーのスクリーニングを行った。その結果、複数の周期延長化合物と、位相変位を誘導する化合物が得られた。合計のヒット率は約14%と高いことから、細胞内の酸化還元反応は概日時計の制御に重要な役割を果たしていることが示唆された。これらの化合物の中から、天然のポリフェノール類である化合物Bについてさらに解析を進めた。

化合物Bを *pBmall::dLuc* レポーター、あるいは *pPer2::dLuc* レポーターを導入した U2OS

株に投与したところ、20 μ M で約 2 時間の周期延長効果を示すとともに、濃度および時刻依存的に概日リズムの位相変位を誘導することが明らかとなった。

in vitro の kinase assay により、周期延長効果については、既知のプロテインキナーゼが標的である可能性が高いが、位相変位効果の標的は種々の状況証拠から、細胞内のレドックス制御等に関わる蛋白質 B であることが示唆された。また、スクリーニングで得られた他の数種の位相変位誘導化合物についても、蛋白質 B およびその近縁の酵素に対して作用するという報告があることから、この結果を手がかりに細胞内酸化還元反応と概日リズムの位相調節の関係について、プロテオミクス解析などを組み合わせて包括的な解析を進め、概日リズムの位相変位をもたらず経路を明らかにしたい。

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 8 件)

1. Tamai KT, Nakane Y, Ota W, Kobayashi A, Ishiguro M, Kadofusa N, Ikegami K, Yagita K, Shigeyoshi Y, Sudo M, Nishiwaki-Ohkawa T, Sato A, Yoshimura T (2018) Identification of circadian clock modulators from existing drugs. *EMBO Mol.Med.*, in press, 10.15252/emmm.201708724, 査読有
2. Nishiwaki-Ohkawa T, Yoshimura Y (2016) Molecular basis for regulating seasonal reproduction in vertebrate. *J Endocrinol.* 2290, R117-127, 10.1530/JOE-16-0666, 査読有
3. Nambo M, Kurihara D, Yamada T, Nishiwaki-Ohkawa T, Kadofusa N, Kimata Y, Kuwata K, Umeda M, Ueda M (2016) Combination of synthetic chemistry and live-cell imaging identified a rapid cell division inhibitor in Tobacco and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 57, 2255-2268, 10.1093/pcp/pcw140, 査読有
4. Sugiyama T, Kuwata K, Imamura Y, Demizu Y, Kurihara M, Takano M, Kittaka, A (2016) Peptide nucleic acid with a lysine side chain at the β -position: synthesis and application for DNA cleavage. *Chem. Pharm. Bull (Tokyo)* 64, 817-823, 10.1248/cpb.c16-00191, 査読有
5. Yasueda Y, Tamura T., Fujisawa A, Kuwata K, Tsukiji S, Kiyonaka S, Hamachi I (2016) A set of organelle

-localizable reactive molecules for mitochondrial chemical proteomics in living cells and brain tissues. *J. Am. Chem. Soc.* 138, 7592-7602, 10.1021/jacs.6b02254, 査読有

6. Ueda H, Yokota E, Kuwata K, Kutsuna N, Mano S, Shimada T, Tamura K, Stefano G, Fukao Y, Brandizzi F, Shimmen T, Nishimura M, Hara-Nishimura I (2016) Phosphorylation of the C terminus of RHD3 has a critical role in homotypic ER membrane fusion in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 170, 867-880, 10.1104/pp.15.01172, 査読有
7. Nishio K, Pornpitra T, Izawa S, Nishiwaki-Ohkawa T, Kato S, Hashimoto K, Nakanishi S (2015) Electrochemical detection of circadian redox rhythm in cyanobacterial cells via extracellular electron transfer. *Plant Cell Physiol.* 56, 1053-1058, 10.1093/pcp/pcv066, 査読有
8. Oshima T, Yamanaka I, Kumar A, Yamaguchi J, Nishiwaki-Ohkawa T, Muto K, Kawamura R, Hirota T, Yagita K, Irle S, Kay SA, Yoshimura T, Itami K (2015) C-H activation generates period-shortening molecules that target cryptochrome in the mammalian circadian clock. *Angew. Chem. Int. Ed.* 54, 7193-7197, 10.1022/anie.201502942, 査読有

[学会発表](計 9 件)

1. 桑田啓子、伊藤佳世子、大村孝幸、小谷政弘、内藤康秀 (2017) 新規イオン化法 DIUTHAME による MALDI-TOFMS 測定 日本質量分析学会第 65 回質量分析総合討論会
2. 伊藤佳世子、伊藤佳世子、大村孝幸、小谷政弘、内藤康秀、桑田啓子 (2017) 新規イオン化法 DIUTHAME を用いたインイメージング質量分析手法の開発 第 35 回メディシナルケミストリーシンポジウム
3. 大川妙子、加藤優季、伊藤有花、Muhammad Yar、Zachary Arika、Annupriya Kumar、Jacky Yim、佐藤綾人、Stephan Irle、Cathleen Crudden、吉村崇 (2016) 甲状腺ホルモンアナログの開発 第 23 回日本時間生物学会学術大会
4. 小林茜、Katherine Tamai、上園悠真、佐藤綾人、大松亨介、大川妙子、大井貴史、吉村崇 (2016) 哺乳類の概日リズムの周期を延長する化合物の探索 第 23 回日本時間生物学会学術大会
5. 石黒将照、小林茜、上園悠真、角房直哉、佐藤綾人、大松亨介、大川妙子、大井貴

- 史、吉村崇 (2016) ITbM 化合物ライブラリーを用いた概日リズム調節分子の探索 第 23 回日本時間生物学会学術大会
6. Keiko Kuwata, Kayoko Itou, Keiko Takahashi, Masahiko Kinoshita, Tomoyuki Hosono, Hiroyuki Fukuda (2016) Highly efficient enrichment of phosphopeptide by use of automated technology. JPrOS 2016 (14th JHUPO COncference)
 7. 大川 (西脇) 妙子、小林茜、山中衣織、佐藤綾人、大島豪、Anupriya Kumar、山口潤一郎、川邑里佳、武藤慶、廣田毅、八木田和弘、Steve A Kay、Stephan Irle、伊丹健一郎、吉村崇 (2015) 哺乳類の概日リズムの周期を調節する化合物の探索 第 22 回日本時間生物学会学術大会
 8. 桑田啓子 (2015) ケミカルバイオロジーを牽引する質量分析～有機合成から蛋白質相互作用構造解析まで～ 第 8 回北陸質量分析談話会
 9. Keiko Kuwata, Hirofumi Nagao, Shinichi Miki (2015) Miniaturization of MULTUM-FAB mass spectrometer and accurate mass measurement. The 63rd Annual conference on mass spectrometry

〔図書〕(計 1 件)

1. Tanaka G, Kawaguchi, Y, Kuwata K, Takeuchi T, Nakase I, Futaki S (2017) Photoaffinity labeling method to explore internalization mechanism of arginine-rich cell penetrating peptides. Photoaffinity labeling for structural probing within protein, 265 (225-240), Springer Japan, ISBN 978-4-431-56568-0

6 . 研究組織

(1)研究代表者

大川 妙子 (OHKAWA, Taeko)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・准教授
研究者番号：31432230

(2)研究分担者

望田 啓子 (MOCHIDA, Keiko)
名古屋大学・トランスフォーマティブ生命分子研究所・特任助教
研究者番号：70624352