

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年9月4日現在

機関番号：23304

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08521

研究課題名(和文)脊椎動物の個体発生に伴う概日リズム形成機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of molecular mechanism for the circadian clock formation during vertebrate development

研究代表者

平山 順(Hirayama, Jun)

公立小松大学・保健医療学部・教授

研究者番号：90510363

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：体内時計は、行動や代謝などの多様な生理機能に約24時間の周期変動を作り出す生体の恒常性維持機構である。体内時計は、個体発生に伴い個々の細胞に形成される細胞時計が、光刺激によって組織・器官内で互いに同調すると機能的になる。しかしながら、個体発生に伴う体内時計の形成機構と細胞時計の光同調機構については不明な点が多く存在している。本研究は、哺乳動物と共通の体内時計を有するゼブラフィッシュ稚魚の行動リズムの解析系とゼブラフィッシュ初期胚の細胞時計の可視化系を用いて、発生期に光依存的に細胞時計を組織・期間内で同調させる新規の分子を同定することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトならびにマウスなどのモデル生物を用いた解析から、発生期の体内時計の形成不全が乳幼児の発達障害に関連することが報告されている。従って、生物の発生期の体内時計の形成機構の解明を目指す本研究の成果には、小児発達障害の予防や治療ならびに周産期医療の観点から有益な知見を提唱することが期待される。体内時計は、生物の恒常性維持を担う重要な機構であり、その異常は睡眠障害や代謝異常といった様々な疾患につながる。従って、この機構がどのように形成されるかを解明することは、体内時計の異常と関連する様々な疾患の予防ならびに治療戦略を構築する際に重要になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Circadian clocks regulate various physiological processes with a periodicity of approximately 24 h. The exact timing of this rhythm is established by cell-autonomous oscillators called cellular clock. In vertebrates, cellular clocks in early embryos are gradually set in motion during development. In mammals, it is quite difficult to analyze the processes of cellular clock formation during development because embryogenesis proceeds inside the maternal uterus. Thus, the molecular mechanisms underlying the establishment of cellular clocks during vertebrate development are not well understood. Zebrafish eggs are externally fertilized and are transparent. In addition, embryos rapidly develop from fertilized eggs to larvae that swim, making them an excellent model for studies on the ontology of vertebrate clocks. This study used zebrafish to identify noble light-inducible clock proteins as the factor responsible for the light-dependent synchronization of cellular clocks during development.

研究分野：時間生物学

キーワード：体内時計 細胞時計 光 ゼブラフィッシュ 転写 翻訳 発生 恒常性維持

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

体内時計は、行動や代謝などの多様な生理機能に約 24 時間の周期変動を作り出す生体の恒常性維持機構である。「光を利用し、自然界の昼夜の変化に対し体内環境を最適化する」という重要な役割を担っている。この破綻は、睡眠障害代謝異常、およびうつ病といった様々な疾病を引き起こす。体内時計は、生物個体の全身の各細胞に内在する遺伝子発現のネガティブフィードバックループ（細胞時計）が基本単位である。

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、行動などの生命現象に概日リズムが形成され、体内時計が機能的になる。個体発生に伴う細胞時計および体内時計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。

脊椎動物の体内時計の研究にモデル生物として広く用いられているマウスなど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、発生期の体内時計の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胚は母体外で発生が進行し、そ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。さらに、ゼブラフィッシュは、哺乳動物と共通の体内時計を有する。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体内時計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

本研究は、哺乳動物と共通の体内時計を有するゼブラフィッシュを用いて、**課題 1**：発生期の生体組織内で細胞時計が互いに同調する機構と、**課題 2**：個体発生に伴い細胞時計が形成される機構を解明することである。

3. 研究の方法

課題 1 発生期の細胞時計の生体組織内での光同調機構の解明

(1-1) 細胞時計の組織内同調の候補制御因子の遺伝子改変ゼブラフィッシュの作出；これまでの研究は、既に細胞時計の光同調制御因子の候補として、光誘導型の時計関連遺伝子を複数同定してきた。本研究では、これらの KO ゼブラフィッシュを CRISPR-Cas9 法により作出した。

(1-2) 遺伝子改変ゼブラフィッシュ稚魚の行動リズムの解析；上記の KO ゼブラフィッシュ

稚魚の出生直後の行動リズムを解析した。稚魚の行動解析は DanioVision を用いて行った（図 1）。この装置の下部は温度と照明条件を一定に保つためのインキュベーターになっている。ここに 48 匹の稚魚を multi-well plate に入れて飼育した。機器の上部に設置された赤外線カメラにより経時的に稚魚を追跡し、その 10 分間あたりの移動距離を計測した。この測定値より、行動解析

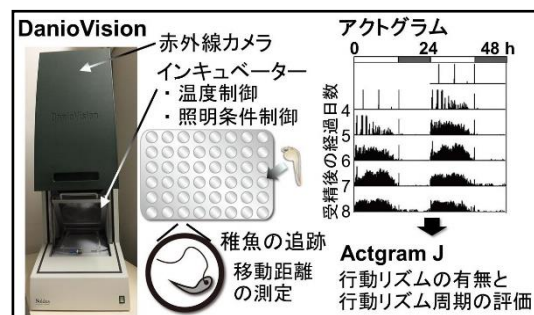


図 1：稚魚の行動解析系

ソフト ActgramJ（Schmid B et al. J Biol Rhythms 2011）を用いてアクトグラムを作成した（図 1 右）。アクトグラムより、再度 ActgramJ を使用し行動リズムの有無の判定し、行動リズムが観察される場合には、その周期を算出した。

(1-3) 細胞時計の可視化；本解析では、発光バイオプローブを用いて、ゼブラフィッシュ胚から樹立した培養細胞内の細胞時計を可視化した。タイムラプス顕微鏡によりバイオプローブの蛍光シグナルを経時的に観察し、細胞時計の動態を 1 細胞レベルで解析した。

課題 2 個体発生に伴う細胞時計の形成機構の解明

上記の (1-3) に記載した発光バイオプローブを用いて、発生期のゼブラフィッシュの細胞時計を可視化した。次に、標的既知阻害剤ライブラリーの中から、発生期の細胞時計の形成に

影響を与える阻害剤を探索した。

4. 研究成果

(4-1) 課題 1 に関する成果

これまでの研究は、光による細胞時計の組織内同調の候補制御因子として光誘導型の時計蛋白質 zPER2 と zCRY1a を見出していた (PNAS 2005; PNAS 2007)。ゲノム編集技術を用いて zPer2 と zCry1a 遺伝子の double knock out (DKO) 個体を作成し、その行動と睡眠を解析した。その結果、野生型の個体において 3 時間の光照射により形成される行動と睡眠の概日リズムが zPer2/zCry1a DKO 個体では観察されないことを見出した (図 2)。また zPer2/zCry1a DKO 個体では、光照射後の細胞時計の組織内同調が阻害されていることを明らかにした。以上より、zPER2 および zCRY1a が細胞時計を組織内で光依存的に同調させ行動と睡眠の概日リズムを作り出すと結論した。

本研究では、12 時間の光照射を行うと、DKO 個体でも細胞時計が光同調し、行動リズムが形成されることを見出した。さらに、この 12 時間の光処理による DKO 個体の行動リズム形成を担う因子として、zCRY2a を見出した。zPer2/zCry1a/zCry2a TKO 個体を作成し解析した結果、TKO 個体では 12 時間の光処理を行った場合でも、行動リズム形成と細胞時計の光同調が観察されないことを見出した (図 3)。

(4-2) 課題 2 に関する成果

化合物スクリーニングの結果、発生期の細胞時計の形成を阻害する薬剤を複数同定することに成功した。また、同定した薬剤の標的分子の機能阻害個体を作成した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

1. **Hirayama J***, Alifu Y, Hamabe R, Yamaguchi S, Tomita J, Maruyama Y, Asaoka Y, Nakahama K, Tamaru T, Takamatsu K, Takamatsu N, Hattori A, Nishina S, Azuma N, Kawahara A, Kume K, and Nishina H. The clock components Period2 Cryptochrome1a and Cryptochrome2a function in establishing light-dependent behavioral rhythms and/or total activity levels in zebrafish. **Sci. Rep.** 9 196. 2019.

*Corresponding author

2. Maruyama J, Inami K, Michishita F, Jiang X, Iwasa H, Nakagawa K, Ishigami-Yuasa M, Kagechika H, Miyamura N, Hirayama J, Nishina H, Nogawa D, Yamamoto K, and Hata Y. Screening with a fluorescence reporter-based assay for YAP1 activators identifies a novel compound that suppresses multiple myeloma proliferation. **Mol. Cancer Res.** 16. 197-211. 2018.

3. Yamasaki T, Deki-Arima N, Kaneko A, Miyamura N, Iwatsuki M, Matsuoka M, Fujimori-Tonou N, Okamoto-Uchida Y, **Hirayama J**, Marth J, Yamanashi Y, Kawasaki H, Yamanaka K, Penninger J, Shibata S, and Nishina H. Age-dependent motor dysfunction due to neuron-specific disruption of stress-activated protein kinase MKK7. **Sci. Rep.** 7. 7348. 2017.

4. Negishi J, Omori Y, Shindo M, Takanashi H, Musha S, Nagayama S, **Hirayama J**, Nishina H, Nakamura T, Mogi C, Sato K, Okajima F, Mochimaru Y, and Tomura H. Manganese and cobalt activate zebrafish ovarian cancer G-protein coupled receptor 1 but not GPR4. **J. Recept. Signal. Transduct. Res.** 137. 401-408. 2017.

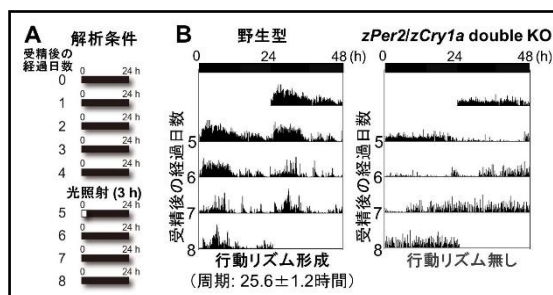


図 2: ゼブラフィッシュ稚魚の行動解析の結果

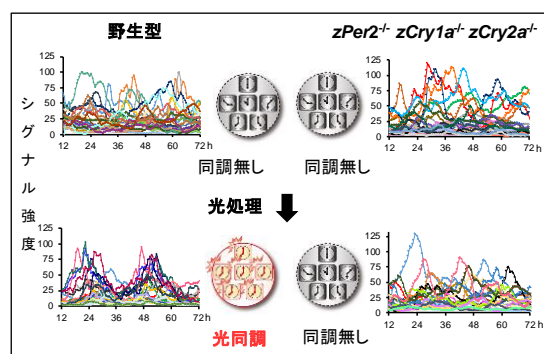


図 3: 細胞時計の光同調の解析結果

英文総説 *Corresponding author

5. Izawa J, Nishimura A, and **Hirayama J***. Light-dependent regulation of circadian clocks in vertebrates. **Chronobiology** (Edited by Pavol Svorc) InTechOpen. In press.

6. Izawa J, and **Hirayama J***. Roles of MAPKs in circadian clock regulation in vertebrates. **Mitogen-Activated Protein Kinases : Activation, Functions and Regulation** (Edited by Nathaniel Hayes) Nova Science Publishers. In press.

7. Izawa J, and **Hirayama J***. A molecular link between the circadian clock, DNA damage responses and oncogene activation. **Oncogene** (Edited by Pinar Erkekoğlu) InTechOpen, 1-15. 2019.

8. **Hirayama J***. The zebrafish as an attractive model animal for the study of the circadian clocks. **Circadian clock: Regulations, Genetic and External Factors** (Edited by Nathaniel Hayes) Nova Science Publishers, 103-127 2018.

和文総説 *責任著者

9. 平山 順*、西村 愛佳 体内時計の磁場に対する応答 **磁気と健康** Vol. 31 p19-23

[学会発表] (計 3 件)

招待講演

国際会議

1. **Hirayama J, Circadian rhythm establishment and sleep control by the light-induced clock factors.**

The 41st Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (Kobe, Japan) 2018 年 7 月

2. **Hirayama J, Molecular mechanism of light-dependent establishment of circadian rhythm.** 8th

Asia and Oceania Conference for Photobiology (Seoul, The Republic of Korea) 2017 年 11 月

国内会議

1. 平山 順、ゼブラフィッシュ体内時計の光制御機構

ウロコの会 (金沢大学) 2018 年 12 月

[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 :

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 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

<https://researchmap.jp/khr>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。