

令和 2 年 4 月 3 日現在

機関番号：34509

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08536

研究課題名(和文)多機能メタロプロテアーゼによる概日リズム制御機構の解明

研究課題名(英文)A metalloprotease regulates the circadian clock

研究代表者

平岡 義範(HIRAOKA, yoshinori)

神戸学院大学・薬学部・助教

研究者番号：60397552

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ナルディライジン(NRDC)はM16ファミリーに属するメタロプロテアーゼで、細胞局在に依存した多機能性(細胞表面：シェディング活性化、核：転写調節)を有し、様々な生体恒常性の維持において重要な働きをしている。今回、核におけるNRDCの転写制御機能をより詳細に検討するため、肝臓のChIP-Seq解析、および、網羅的な結合モチーフ解析を行ったところ、時計遺伝子の転写制御に重要なE-boxが上位に検出された。したがって、本研究はNRDCによる概日リズム制御機構の解明を目的とし、細胞実験、および、マウス実験により検討を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで生物時計とは何の関連も指摘されていなかったNRDCが、概日リズムを制御する新規時計調節因子である可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：Nardilysin (N-arginine dibasic convertase; NRDC) is a zinc peptidase of the M16 family. We have reported that NRDC has multiple functions, which depend on its cellular localization. In the extracellular space, NRDC enhances ectodomain shedding of a variety of membrane proteins. On the other hand, NRDC in the nucleus works as a transcriptional coregulator. These findings suggest important roles of NRDC in various homeostasis in vivo. To evaluate the role of NRDC in the nucleus in more detail, we performed ChIP-seq of NRDC in mouse liver. ChIP-seq and motif analysis of the NRDC-binding sites revealed a significant enrichment for E-box motif. Thus, we investigated the role of NRDC on the mammalian circadian clock in the present study.

研究分野：時間生物学

キーワード：概日時計 時計遺伝子 転写制御

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

Nardilysin (N-arginine dibasic convertase ; NRDC) は M16 ファミリーに属するメタロプロテアーゼで、細胞局在に依存した多機能性を有する。これまでの我々の研究で、NRDC は細胞表面では膜型増殖因子 HB-EGF、炎症性サイトカイン TNF- $\alpha$ 、アミロイド前駆体タンパク質 (APP) など広範な膜タンパク質のシェディング活性化因子として働き、癌やアルツハイマー病などの病態制御において重要な働きをしていることを明らかにした (Kanda *et al.*, EMBO Mol. Med. 2012、Ohno *et al.*, Neurobiol. Aging. 2014)。一方、核では転写調節因子として働き、褐色脂肪組織 (BAT) において NRDC は転写コアクチベーター PGC-1 $\alpha$  と結合して、熱産生を司る脱共役タンパク質 UCP1 の発現を制御していること (Hiraoka *et al.*, Nat. Commun. 2014)、膵  $\beta$  細胞において NRDC は、 $\beta$  細胞特異的な転写因子 MafA を介して  $\beta$  細胞の機能維持に必須であることを明らかにした (Nishi *et al.*, Diabetes. 2016)。以上述べたように、NRDC は細胞局在に依存した多機能性 (細胞表面: シェディング調節、核内: 転写調節) を有することが分かってきており、この多機能性が NRDC 欠損マウスの多彩な表現型 (低体温、成長遅延、行動異常など) の原因になっていると考えられる。つまり、NRDC は生体恒常性の維持において重要な働きをしていると考えられる。

### 2. 研究の目的

今回、核における NRDC の転写制御機能をより詳細に検討するため、作製した抗 NRDC 抗体を用いて肝臓のクロマチン免疫沈降シーケンス (ChIP-Seq) 解析を行ったところ、数多くの時計遺伝子の転写開始点付近に NRDC の結合ピークを認め、網羅的な結合モチーフ解析の結果、時計遺伝子の転写制御に重要な E-box が上位に検出されたことから、NRDC が時計遺伝子の転写制御に関わっていることが示唆された。したがって、本研究は、NRDC による概日リズム制御機構の解明を目的とした。

### 3. 研究の方法

NRDC による概日リズム制御機構の解明に向け、以下の項目を検討した。

#### (1) NRDC 欠損マウスの行動リズムの検討

野生型マウス (NRDC<sup>+/+</sup>) と NRDC 欠損マウス (NRDC<sup>-/-</sup>) を明暗条件下 (明期: 12 時間、暗期: 12 時間) で 2 週間馴化後、恒暗条件下でのマウスの自発運動量を計測し、行動リズムを解析した。

#### (2) 肝臓における時計遺伝子の発現リズムの検討

NRDC<sup>+/+</sup> と NRDC<sup>-/-</sup> の肝臓を経時的に採取し、時計遺伝子 (*Clock*, *Bmal1*, *Per1/2*, *Cry1/2* など) の発現リズム (mRNA、および、タンパク質レベル) を検討した。

#### (3) NRDC と時計タンパク質の複合体形成の検討

293T/17 細胞に NRDC と時計タンパク質 (CLOCK、BMAL1、PER1/2、CRY1/2 など) を強発現させ、免疫沈降法 (IP) により複合体形成を検討した。

#### (4) NRDC による時計遺伝子の転写制御機構の検討

NRDC が時計遺伝子の転写制御機構にどのようにかかわっているのかを明らかにするため、レポーター遺伝子として E-box Luc を用いたルシフェラーゼレポーターアッセイにより検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) NRDC 欠損マウスの行動リズム

明暗条件下では NRDC<sup>-/-</sup> は NRDC<sup>+/+</sup> と同様、明暗サイクルに同調して、夜行性の行動リズムを示した。一方、恒暗条件下での NRDC<sup>-/-</sup> の行動リズムは NRDC<sup>+/+</sup> と比べて顕著な違いがみられた。

#### (2) 肝臓における時計遺伝子の発現リズム

NRDC<sup>+/+</sup> と NRDC<sup>-/-</sup> の肝臓を経時的に採取し、時計遺伝子の発現リズムを検討したところ、数多くの時計遺伝子の発現リズムで両者に違いがみられた。

#### (3) NRDC と時計タンパク質の複合体形成

NRDC と時計タンパク質との複合体形成を IP で検討したところ、NRDC はいくつかの時計タンパク質と複合体を形成することが分かった。

#### (4) NRDC による時計遺伝子の転写制御機構

レポーターアッセイにより NRDC による時計遺伝子の転写制御機構を検討したところ、NRDC は複合体を形成する時計タンパク質の機能調節に関与している可能性が示唆された。

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

Morita Y, Ohno M, Nishi K, Hiraoka Y, Saijo S, Matsuda S, Kita T, Kimura T, Nishi E. Genome-wide profiling of nardilysin target genes reveals its role in epigenetic regulation and cell cycle progression. Sci Rep. 査読有, 7, 2017, 14801

DOI: 10.1038/s41598-017-14942-4.

Nishi K, Sato Y, Ohno M, Hiraoka Y, Saijo S, Sakamoto J, Chen PM, Morita Y, Matsuda S, Iwasaki K, Sugizaki K, Harada N, Mukumoto Y, Kiyonari H, Furuyama K, Kawaguchi Y, Uemoto S, Kita T, Inagaki N, Kimura T, Nishi E. Nardilysin is required for maintaining pancreatic  $\beta$ -cell function. Diabetes. 査読有, 65, 2016, 3015-27

DOI: 10.2337/db16-0178.

〔学会発表〕(計 5 件)

Hiraoka Y, Yoshitane Y, Ohno M, Morita Y, Nunokawa R, Nishi K, Kume N, Kimura T, Fukada Y and Nishi E. Nardilysin, a new PER2-interacting protein, regulates the mammalian circadian clock, The 43rd FEBS Congress, 2018

平岡義範、吉種光、大野美紀子、布川莉奈、西清人、森田雄介、久米典昭、木村剛、深田吉孝、西英一郎、ナルディライジンによる PER2 の機能調節を介した概日リズム制御機構、ConBio2017、2017

平岡義範、吉種光、大野美紀子、布川莉奈、西清人、森田雄介、久米典昭、木村剛、深田吉孝、西英一郎、ナルディライジンによる PER2 を介した概日リズム制御機構、第 24 回日本時間生物学会学術大会、2017

Hiraoka Y, Yoshitane Y, Ohno M, Morita Y, Nunokawa R, Nishi K, Kume N, Kimura T, Fukada Y and Nishi E. Nardilysin regulates the mammalian circadian clock via modulating PER2 function, EBRS2017, 2017

平岡義範、吉種光、大野美紀子、布川莉奈、西清人、森田雄介、久米典昭、木村剛、深田吉孝、西英一郎、ナルディライジンによる概日リズム制御機構の解明、第 23 回日本時間生物学会学術大会、2016

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 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

## 6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：西 英一郎

ローマ字氏名：(NISHI, eiichiro)

所属研究機関名：滋賀医科大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：30362528

研究分担者氏名：久米 典昭

ローマ字氏名：(KUME, noriaki)

所属研究機関名：神戸学院大学

部局名：薬学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：20252455

(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。