

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：23304

研究種目：基盤研究(C)（特設分野研究）

研究期間：2018～2020

課題番号：18KT0068

研究課題名（和文）体内時計制御を担う細胞時計の組織内・組織間同調機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of mechanism underlying synchronization of cellular clocks, an essential process for establishment of circadian clock

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） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：体内時計は、体内環境を外界の昼夜の変化に対し最適化する恒常性維持機構である。この破綻は、睡眠障害や代謝異常といった様々な疾病を引き起こすことが知られている。体内時計の形成には生物の細胞に内在する細胞時計が光により同じ時刻に同調（光同調）することが必須の過程である。本研究は、ヒトの共通の体内時計を持つゼブラフィッシュを用いた遺伝子改変個体の作出と解析から、細胞時計の光同調を制御する分子を複数、見出した。また、これらの細胞時計の光同調分子が、1) 個体内の個々の細胞時計を同調させ体内時計を形成させること、および2) エネルギー代謝を通じて行動量を制御することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現代産業社会の構造は、ヒトが本来自然サイクルに同調していた生活を、社会構造に合わせた生活時間に順応せざるを得ない状況を作り上げている。そのために生じるシフトワークや夜食の常習化といった生活習慣の乱れが、体内時計を破綻させ、睡眠障害、代謝異常、または高血圧症といった様々な疾患を引き起こすことが明らかになっている。このような背景より、体内時計の重要な制御過程である細胞時計の同調の新規メカニズムを明らかにした本研究成果には、体内時計の異常と関連する様々な疾患の予防法ならびに治療戦略の構築のための有益な知見の提供が期待できる。

研究成果の概要（英文）：Circadian clocks are intrinsic, time-tracking systems that bestow upon organisms a survival advantage. Under natural conditions, organisms are trained to follow a 24-h cycle under environmental time cues such as light to maximize their physiological efficiency. The circadian clock is established by cell-autonomous oscillators called cellular clocks which are present in every cell of a living organism. The synchronization of cellular clocks in tissues and organs by environmental signals such as light is required to orchestrate the circadian clock at the organismal level. This study found that zPER2, zCRY1a, and zCRY2a synchronize cellular clocks in a light-dependent manner to form the behavioral rhythms in zebrafish. In addition, we uncovered unforeseen roles for zPER2 and zCRY1a in regulating the total level of locomotor activity, likely via regulating cellular energy metabolism.

研究分野：時間生物学

キーワード：体内時計 転写 光 ゼブラフィッシュ 細胞時計 メラトニン

1. 研究開始当初の背景

体内時計は、行動、睡眠、および代謝といった多様な生理機能に観察される約 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。この破綻は、睡眠障害、代謝異常、および癌を含む様々な疾病を引き起こす (Sahar S et al. Nat Rev Cancer 2009)。体内時計は、生物の組織を構成する個々の細胞に存在する日周期性を持つ転写機構 (細胞時計) により制御される (図 1)。細胞時計の日周期性を適切に維持することは、体内時計の形成に重要な過程である。

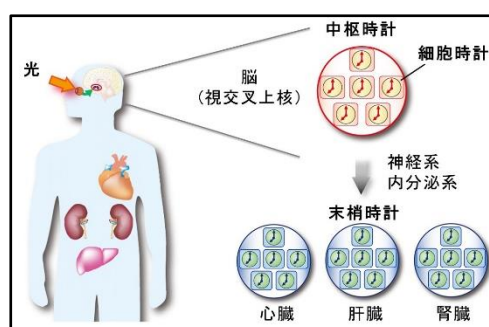


図 1: 体内時計の形成機構

体内時計は、脳組織に存在する中枢時計と各末梢組織に存在する末梢時計からなる階層構造系として存在する (図 1)。正常な体内時計の制御には、細胞時計が組織内で互いに同じ時刻に同調し組織レベルの時計 (中枢時計と末梢時計) を形成することまた各組織レベルの時計の時刻の関係が適切に維持されることが必要である。

現代産業社会の構造は、ヒトが本来自然サイクルに同調していた生活を、社会構造に合わせた生活時間に順応せざるを得ない状況を作り上げている。そのために生じるシフトワークや夜食の常習化といった生活習慣の乱れが、細胞時計の組織内の同調を破綻させ、睡眠障害や代謝異常を引き起こすことが示唆されている。このような背景より、体内時計の障害に起因する疾病を予防するために、細胞時計の組織内同調の分子機構の理解が求められている。

2. 研究の目的

光は、細胞時計を組織内で同調させるための重要な刺激である。本研究の目的は細胞時計が光依存的に組織内で同じ時刻に同調 (光同調) する分子機構を明らかにすることである。

3. 研究の方法

3-1; 実験モデルとした動物と系

本研究では、ヒトと共通の体内時計を有するゼブラフィッシュを実験モデル動物として用いた。ゼブラフィッシュの器官形成は 28°C で飼育下、受精後 2 日目までに完了し、稚魚は受精後 5 日目より行動を開始する (図 2A)。この行動の日周変動は脳の松果体に存在する細胞時計により形成される。ゼブラフィッシュの細胞時計は受精後 0 から 1 日目の初期胚には存在せず、器官形成が完了する受精後 2 から 4 日目の間に、松果体を含む各組織内の細胞に形成されていく。各細胞に形成された細胞時計の周期の位相は、外界の光に応答し互いに組織内で同調する。この結果、松果体を含む組織レベルの時計が機能的になり、行動などの概日リズム (行動リズム) が形成される (図 2B)。本研究では、このゼブラフィッシュの発生過程の光による細胞時計の同調 (光同調) と行動リズムの形成を解析した。

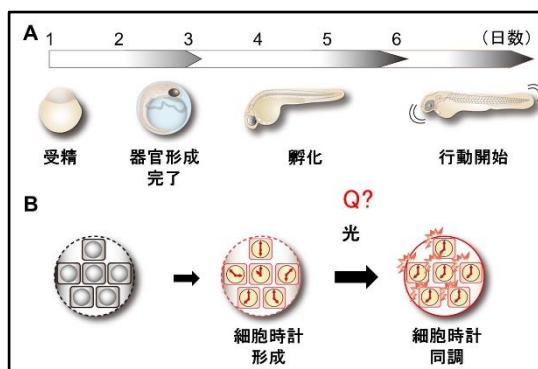


図 2: ゼブラフィッシュの発生と時計形成

3-2; 遺伝子改変ゼブラフィッシュの作出

遺伝子のノックアウト (knock out; KO) ゼブラフィッシュをゲノム編集技術 CRISPR-Cas9 法を用いて作出した。まず、*in vitro* で合成した標的遺伝子を機能阻害する sgRNA と Cas9 mRNA を、野生型の受精卵にインジェクションした。その胚を成魚まで育て Germline に変異が生じた F0 founder を選定した。まず、この個体を選定し解析に用いた。また、F0 founder と野生型個体のかけ合わせることで系統を樹立し、安定に KO 個体を解析に使用できるようにした。

3-3 ; KO 個体の行動リズムの解析

3-2 で作出した KO ゼブラフィッシュ稚魚の行動リズムを行動解析装置 DanioVision により評価した。この装置の下部は温度と照明条件を一定に保つインキュベーターである (図 3 左)。ここに、48 個体の稚魚を multi-well plate に入れ飼育する。機器の上部に設置された赤外線カメラで稚魚を追跡し経時的にそれらの 10 分間あたりの移動距離を同時測定した。この測定値より行動解析ソフト ActgramJ によりアクトグラムを作成した (図 3 右)。このアクトグラムより、再度 ActgramJ を使用し行動リズムの有無の判定を行った。行動リズムが観察された場合には、リズムの周期と位相を算出した。

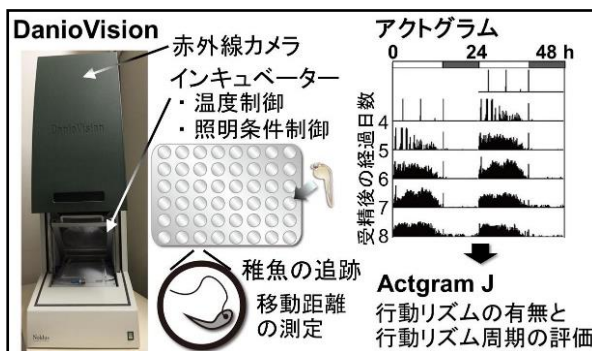


図 3 : ゼブラフィッシュ稚魚の行動解析系

3-4 ; バイオプローブを用いた細胞時計の解析

作出した KO 個体の細胞時計を発光バイオプローブを用いて可視化した。細胞時計の動態を 1 細胞レベルで解析し、その周期と位相を評価した。これにより作出した KO 個体の細胞時計光同調の過程を解析した。

4. 研究成果

本研究では、細胞時計の光同調を制御する光誘導性の細胞時計の制御分子 zPER2 zCRY1a、および zCRY2a を次の通り同定した。まず、これら分子をコードする遺伝子を全て破壊したゼブラフィッシュ [*zPer2;zCry1a;zCry2a* triple knockout (TKO)ゼブラフィッシュ] を作出し解析した。その結果、野生型ゼブラフィッシュと比較し、光刺激による行動リズム (体内時計) の形成が障害されていることを見出した (図 4)。

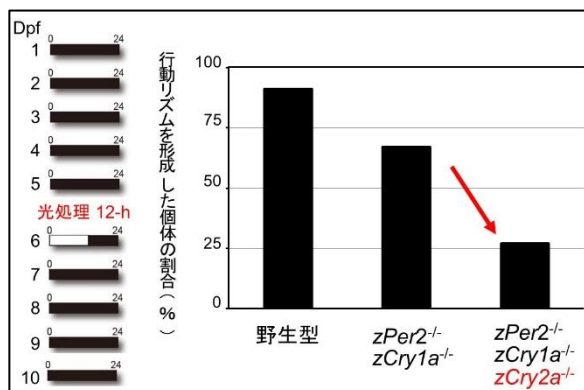


図 4 : ゼブラフィッシュの行動解析の結果

次に、この原因を解明するために、野生型個体と作出した TKO 個体の細胞時計をバイオプローブを用いて可視化した。その結果野生型細胞では、異なる時刻を示した各細胞時計が光照射により同じ時刻に同調したが TKO 細胞では、光照射を行っても異なる時刻のままで同調しなかった。以上の結果は

光誘導性の細胞時計制御分子が個体内の個々の細胞時計を光同調させ、体内時計を形成させることを示唆する。

本研究は、野生型ゼブラフィッシュに比較して、作出した *zCry1a; zPer2* double KO (DKO) と TKO ゼブラフィッシュの行動量が低下することを見出した。これらの遺伝子改変ゼブラフィッシュでは、エネルギー代謝を調節する遺伝子群の発現パターンが変化し、エネルギーの源である ATP 量が減少することを見出した (図 5)。以上の結果は、zPER2 と zCRY1a がエネルギー代謝を通じて行動量を制御することを示唆する。

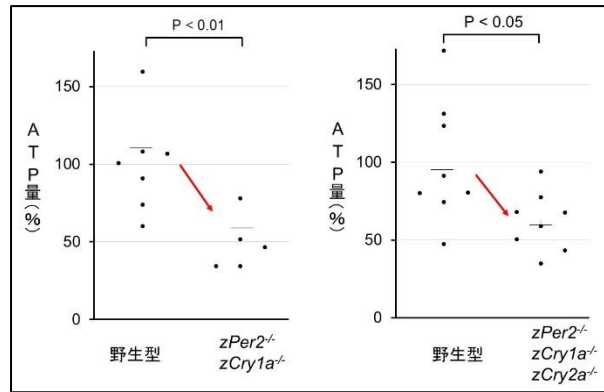


図 5：遺伝子改変個体の ATP 量の解析の結果

以上に加えて、上記の同定した細胞時計の光同調を制御する分子が発現を制御するホルモンであるメラトニンが骨細胞の活性を調節することを報告した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 12件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Nishimura A, Izawa J, Hattori A, Suzuki N, Hirayama J# #Corresponding author	4. 巻 21
2. 論文標題 The use of chemical compounds to identify the regulatory mechanisms of vertebrate circadian clocks.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Curr Drug Targets.	6. 最初と最後の頁 425-432
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2174/1389450120666190926143120.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ikegame M, Hattori A, Tabata MJ, Suzuki H, Hirayama J (53名中52番目), Suzuki N.	4. 巻 e12594
2. 論文標題 Melatonin is a potential drug for the prevention of bone loss during space flight.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Pineal. Res.	6. 最初と最後の頁 .
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jpi.12594.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Izawa J, Nishimura A, Hattori A, Suzuki N, Hirayama J# #Corresponding author	4. 巻 20
2. 論文標題 Post-translational modifications are required for circadian clock regulation in vertebrates.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Curr. Genom.	6. 最初と最後の頁 332-339
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2174/1389202919666191014094349	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Izawa J, and Hirayama J# #Corresponding author	4. 巻 .
2. 論文標題 Roles for MAPKs in circadian clock regulation in vertebrates.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPKs): Activation, Functions and Regulation (Edited by Charles K. Hester) Nova Science Publishers	6. 最初と最後の頁 29-54
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 平山 順# #責任著者	4. 巻 31
2. 論文標題 体内時計の磁場に対する応答	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 磁気と健康	6. 最初と最後の頁 19-23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 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, Nishina H.	4. 巻 9
2. 論文標題 The clock components Period2 Cryptochrome1a and Cryptochrome2a function in establishing light-dependent behavioral rhythms and/or total activity levels in zebrafish.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci. Rep	6. 最初と最後の頁 196
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-37879-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Izawa J, and Hirayama J*	4. 巻 IntechOpen2018
2. 論文標題 A molecular link between the circadian clock, DNA damage responses and oncogene activation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncogene (Edited by Pinar Erkekolu) InTechOpen	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kitamura Kei ichiro, Hirayama Jun, Tabuchi Yoshiaki, Minami Takao, Matsubara Hajime, Hattori Atsuhiko, Suzuki Nobuo	4. 巻 -
2. 論文標題 Glyoxal induced formation of advanced glycation end products in type1 collagen decreases both its strength and flexibility in?vitro	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Diabetes Investigation	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.13528	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Igarashi-Migitaka Junko, Seki Azusa, Ikegame Mika, Honda Masato, Sekiguchi Toshio, Mishima Hiroyuki, Shimizu Nobuaki, Matsubara Hajime, Srivastav Ajai K., Hirayama Jun, Maruyama Yusuke, Kamijo-Ikemori Atsuko, Hirata Kazuaki, Hattori Atsuhiko, Suzuki Nobuo	4. 巻 122
2. 論文標題 Oral administration of melatonin contained in drinking water increased bone strength in naturally aged mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Acta Histochemica	6. 最初と最後の頁 151596 ~ 151596
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.acthis.2020.151596	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Tabuchi Yoshiaki, Hasegawa Hideyuki, Suzuki Nobuo, Furusawa Yukihiro, Hirano Tetsushi?, Nagaoka Ryo, Hirayama Jun, Hoshi Nobuhiko, Mochizuki Takashi	4. 巻 23
2. 論文標題 Genetic response to low?intensity ultrasound on?mouse ST2 bone marrow stromal cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Medicine Reports	6. 最初と最後の頁 173
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/mmr.2020.11812	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Furusawa Yukihiro, Yamamoto Tatsuki, Hattori Atsuhiko, Suzuki Nobuo, Hirayama Jun, Sekiguchi Toshio, Tabuchi Yoshiaki	4. 巻 22
2. 論文標題 De?novo transcriptome analysis and gene expression profiling of fish scales isolated from Carassius?auratus during space flight: Impact of melatonin on gene expression in response to space radiation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Medicine Reports	6. 最初と最後の頁 2627-2636
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/mmr.2020.11363	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 YAMAMOTO Tatsuki, IKEGAME Mika, HIRAYAMA Jun, KITAMURA Kei-ichiro, TABUCHI Yoshiaki, FURUSAWA Yukihiro, SEKIGUCHI Toshio, ENDO Masato, MISHIMA Hiroyuki, SEKI Azusa, YANO Sachiko, MATSUBARA Hajime, HATTORI Atsuhiko, SUZUKI Nobuo	4. 巻 41
2. 論文標題 Expression of sclerostin in the regenerating scales of goldfish and its increase under microgravity during space flight	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomedical Research	6. 最初と最後の頁 279 ~ 288
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2220/biomedres.41.279	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto Tatsuki, Ikegame Mika, Kawago Umi, Tabuchi Yoshiaki, Hirayama Jun, Sekiguchi Toshio, Furusawa Yukihiro, Yachiguchi Koji, Matsubara Hajime, Urata Makoto, Hattori Atsuhiko, Suzuki Nobuo	4. 巻 34
2. 論文標題 Detection of RANKL-producing cells and osteoclastic activation by the addition of exogenous RANKL in the regenerating scales of goldfish	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biological Sciences in Space	6. 最初と最後の頁 34 ~ 40
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2187/bss.34.34	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 平山順
2. 発表標題 遺伝子改変ゼブラフィッシュを用いた 体内時計の光制御に関する研究
3. 学会等名 富山大学 第97回 生命科学先端研究支援ユニット 学術セミナー (富山大学 杉谷キャンパス) (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平山順
2. 発表標題 ゼブラフィッシュモデルを用いた体内時計の形成と光制御の研究
3. 学会等名 金沢大学 環日本海域環境研究センター セミナー (金沢大学 臨海実験施設) (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平山順
2. 発表標題 遺伝子改変魚類を用いた体内時計研究
3. 学会等名 北里大学海洋生命科学部 特別講義II (北里大学) (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平山順
2. 発表標題 ゼブラフィッシュモデルを用いた体内時計の光制御機構の解明
3. 学会等名 2019年度 難治疾患共同研究拠点シンポジウム（東京医科歯科大学）（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hirayama Jun
2. 発表標題 Circadian rhythm establishment and sleep control by the light-induced clock factors
3. 学会等名 The 41st Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (Kobe, Japan)（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 平山順
2. 発表標題 Regulation of behavioral rhythms and locomotor activity by light-inducible components of the circadian clock in zebrafish
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会 / 第98回日本生理学会大会 合同大会：解剖と生理の時計（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Researchmap https://researchmap.jp/khr
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------