

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06679

研究課題名(和文)哺乳類個体発生初期における体内時計抑制機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of the inhibitory mechanisms for circadian clock oscillation during early development of mammals

研究代表者

梅村 康浩 (Umemura, Yasuhiro)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：40612734

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：マウス個体発生初期において、CLOCKタンパク質の発現抑制など概日時計の振動が様々なメカニズムによって抑制されていることを報告してきたが、その生物学的意義については全く明らかにされていない。そのような個体発生初期において、CLOCK/BMAL1が機能するとHes7の遺伝子発現制御に関わる signaling pathwayが大きく影響を受け、hes7の振動に影響することがわかった。これらのことから、発生初期に体内時計が抑制されていることの生物学的意義は、CLOCK/BMAL1の体節形成への干渉を防ぐことが一因であると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生命は、どのように「時間」を内包して進化してきたのか。これまでに、概日時計と体節時計という2つのリズム制御機構が存在することが知られていた。リズムを刻むということは、同時に、そこに時間が流れていることを意味する。これら2つの時計は、個体発生過程において相互排他的に存在しているのであるが、その意義については不明であった。本研究により、これらの2つのリズム制御機構が干渉するということが示唆され、生命が時間を内包する原理を明らかにする手がかりとなる可能性があり、時間生物学的な意義は大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Although it has been reported that there are several mechanisms to inhibit the circadian clock oscillation such as the post-transcriptional suppression of CLOCK protein during mouse early development, the biological significance is unknown. In the present study, we reported that the premature expression of functional CLOCK/BMAL1, circadian clock core transcriptional factors, may affect the Hes7 gene expression oscillations and the somitogenesis process via the signaling pathways regulating the Hes7 expressions. These results suggested that the suppression of circadian clock oscillation during early development may be caused by preventing the CLOCK/BMAL1 from interfering with the normal somitogenesis process.

研究分野：時間生物学

キーワード：体内時計 体節時計 概日時計

## 1. 研究開始当初の背景

哺乳類の体内時計の中枢は視床下部にある視交叉上核であるが、全身の細胞に概日リズムの遺伝子発現振動があることがわかっている (Yagita et al., Science, 2001)。これまでの研究から、概日時計は発生初期には無く、個体発生が進むにつれて細胞自律的に約 24 時間周期の振動を生じることが明らかにされている。しかし、その発生初期に概日時計がないことの生物学的重要性は明らかになっていないし、あまり注目さえされてこなかった。

本研究室では、マウス ES 細胞を *in vitro* で分化させることや体細胞をリプログラミングして iPS 細胞を作製することで、「概日時計は細胞分化と細胞レベルで共役する」ということを報告している (Yagita et al., PNAS, 2010)。加えて、研究代表者は、様々な遺伝子改変した ES 細胞株を用いて、細胞分化に伴う概日リズムの形成メカニズムの一旦を明らかにしてきた (Umemura et al., PNAS, 2014; Umemura et al., PNAS, 2017)。具体的には、概日時計の振動をつくりだす時計たんぱく質群である、CLOCK タンパク質の翻訳後抑制や PER タンパク質の局在変化など、個体発生の初期では、複数の機構が概日時計を抑制するように働いていたのである。さらに、驚くべきことに、体内時計のある母親からの同調シグナルでさえ、発生初期の胎児には伝わっていないことが示唆された (Umemura et al., PNAS, 2017)。これらのことから、哺乳類の個体発生初期において、概日時計の振動が抑制されていることに大きな意味があることが推察されるが、その生物学的意義に関しては、これまで全く明らかにされてこなかった。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、哺乳類個体発生初期における体内時計抑制機構の解明を目的に研究を遂行していく中で、その生物学的意義について検討を加えることにした。具体的には、個体発生初期において CLOCK タンパク質の発現抑制などにより、概日時計の振動のコアの転写因子である CLOCK/BMAL1 が抑制されていることの生物学的意義を明らかにすることを目的とし、本研究を行なった。

## 3. 研究の方法

体節形成に中心的な役割を果たすことが知られている *hes7* の発現振動を発光イメージングでモニタリングマウス ES 細胞において (Matsumiya et al., Development 2018)、ドキシサイクリン依存的に CLOCK/BMAL1 を機能させることができる細胞株の樹立を行なった。この細胞を用いて、前分節中胚葉を誘導し (Matsumiya et al., Development 2018)、*hes7* の発現振動を発光イメージングでモニタリングした。また、同じ ES 細胞から、胎児性オルガノイドであるガストロイドを作製し (van den Brink et al., Nature 2020) 体節形成への影響を調べた。さらに、これらの細胞を用いて、免疫染色やウェスタンブロッティングなどによるタンパク質発現解析や、定量的 PCR や RNA シーケンスによる網羅的な遺伝子発現解析を行なった。また、*in situ* hybridization により、体節形成のマーカーとして知られる *Uncx4.1* mRNA の局在を可視化し、体節形成が *in vitro* で再現されているか確認を行なった。

## 4. 研究成果

個体発生初期において、CLOCK タンパク質の発現抑制など概日時計の振動が様々なメカニズムによって抑制されていることを報告してきたが (Umemura et al., PNAS 2017)、その生物学的意義については全く明らかにされていない。

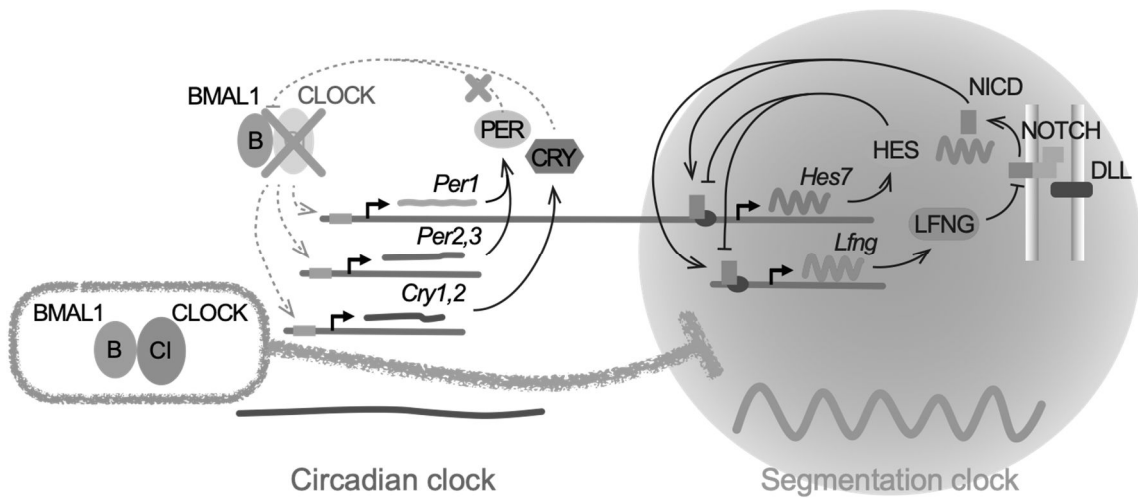
本研究課題では、マウス ES 細胞において、ドキシサイクリン依存的に CLOCK/BMAL1 を機能させることができる細胞株の樹立を行なった。その結果、ドキシサイクリン依存的に機能的な CLOCK/BMAL1 を誘導すると、E-box を介した *Per* や *Cry* などのコアの時計遺伝子の発現誘導を引き起こすことができることがわかった。さらに、驚くべきことに、ゲノム上において、*Per1* 遺伝子の近傍にある体節形成に必須の遺伝子 *Hes7* の発現量も上昇してくることがわかった。これらの領域は、高等な脊椎動物でよく保存されている領域である。

これらのことから、体内時計と体節時計の関係についてさらに検討を進めた。ドキシサイクリン依存的に CLOCK/BMAL1 を機能させることができる ES 細胞から、未分節中胚葉やガストロイドを作製し、*Hes7* 発現振動や体節形成への CLOCK/BMAL1 の強制的な発現の影響を検討した。その結果、体節リズムが大きく影響を受け、体節形成が破綻することがわかった。

さらに、RNA シーケンスによる網羅的な遺伝子発現解析によって、CLOCK/BMAL1 が機能すると *Hes7* の遺伝子発現制御に関わるシグナリング伝達経路が複数、大きく影響を受けることがわかった。さらに、ゲノム上において *Per1* と隣接する *Hes7* だけでなく、さらに近傍の遺伝子も含めて、遺伝子発現の影響を受けていることがわかった。

これらのことから、発生初期において、体内時計の振動が抑制されていることの生物学的意義

は、CLOCK/BMAL1 の体節形成への干渉を防ぐことが一因である可能性が考えられる。



#### < 参考文献 >

- K. Yagita, F. Tamanini, G. T. van Der Horst, H. Okamura, Molecular mechanisms of the biological clock in cultured fibroblasts. *Science* **292**, 278-281 (2001).
- K. Yagita et al., Development of the circadian oscillator during differentiation of mouse embryonic stem cells in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 3846-3851 (2010).
- Y. Umemura et al., Transcriptional program of Kpna2/Importin-2 regulates cellular differentiation-coupled circadian clock development in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111**, E5039-E5048 (2014).
- Y. Umemura et al., Involvement of posttranscriptional regulation of *Clock* in the emergence of circadian clock oscillation during mouse development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **114**, E7479-E7488 (2017).
- M. Matsumiya, T. Tomita, K. Yoshioka-Kobayashi, A. Isomura, R. Kageyama, ES cell-derived presomitic mesoderm-like tissues for analysis of synchronized oscillations in the segmentation clock. *Development* **145**, dev156836 (2018).
- S. C. van den Brink et al., Single-cell and spatial transcriptomics reveal somitogenesis in gastruloids. *Nature* **582**, 405-409 (2020).

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Umemura Yasuhiro, Koike Nobuya, Tsuchiya Yoshiki, Watanabe Hitomi, Kondoh Gen, Kageyama Ryoichiro, Yagita Kazuhiro	4. 巻 119
2. 論文標題 Circadian key component CLOCK/BMAL1 interferes with segmentation clock in mouse embryonic organoids	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2114083119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2114083119	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 Tsuchiya Y, Umemura Y, Yagita K	4. 巻 27
2. 論文標題 Circadian clock and cancer: From a viewpoint of cellular differentiation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Urol.	6. 最初と最後の頁 518-524
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/iju.14231	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 Umemura Y, Yagita K	4. 巻 432
2. 論文標題 Development of the Circadian Core Machinery in Mammals.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Mol Biol	6. 最初と最後の頁 3611-3617
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jmb.2019.11.026	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 Ikeda R, Tsuchiya Y, Koike N, Umemura Y, Inokawa H, Ono R, Inoue M, Grieten T, Yagita K	4. 巻 15
2. 論文標題 REV-ERBalpha and REV-ERBbeta function as key factors regulating Mammalian Circadian Output.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep	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) 10.1038/s41598-019-46656-0	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 Umemura Y, Maki I, Tsuchiya Y, Koike N, Yagita K	4. 巻 34
2. 論文標題 Human Circadian Molecular Oscillation Development Using Induced Pluripotent Stem Cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Biol Rhythms	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) 10.1177/0748730419865436	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 -

[学会発表] 計4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 梅村康浩, 小池宣也, 土谷佳樹, 渡邊仁美, 近藤玄, 影山龍一郎, 八木田和弘
2. 発表標題 Circadian key component CLOCK/BMAL1 interferes with segmentation clock in mouse embryonic organoids
3. 学会等名 第28回日本時間生物学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 梅村康浩, 小池宣也, 土谷佳樹, 渡邊仁美, 近藤玄, 影山龍一郎, 八木田和弘
2. 発表標題 概日時計コア因子CLOCK/BMAL1による体節時計振動への干渉作用
3. 学会等名 日本生理学会第113回近畿生理学談話会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 梅村康浩, 八木田和弘
2. 発表標題 ヒトiPS細胞を用いた概日時計の発生
3. 学会等名 第16回日本時間生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 梅村康浩, 八木田和弘
2. 発表標題 ヒトiPS細胞を用いた概日時計の発生
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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