

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791255

研究課題名(和文) 赤血球が刻む概日リズム測定系の開発

研究課題名(英文) Development of a novel system measuring a circadian rhythm of erythrocytes

研究代表者

大澤 要介(Ohsawa, Yosuke)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：50528429

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、生物発光共鳴エネルギー移動(Bioluminescence resonance energy transfer: BRET)を用いて、ペルオキシレドキシニン2(PRX2)二量体の形成を経時的にモニタリングできる測定系を開発した。本研究からPRX2の酸化還元リズムは過酸化水素が同調因子となっていることが示唆された。核も時計遺伝子も持たない赤血球のPRX2の酸化還元リズムの制御機構の解明は、液性・神経性の概日シグナルによる末梢時計の制御システムや、末梢組織間の多様な内的脱同調のあり方の理解に大きく寄与する。

研究成果の概要(英文)：I developed a measuring system based on bioluminescence resonance energy transfer (BRET). The system can sequentially monitor the homodimer formation of Peroxyredoxin 2 (PRX2). The temporal resolution of the luminescent data was dramatically improved by measuring the PRX2 dimeric rhythm at 10-minute intervals, which enabled us to calculate the acrophase or free-running period from the luminescent data with high accuracy.

This research suggested that hydrogen peroxide acts as an entraining agent (Zeitgeber) on the oxidation-reduction rhythm of PRX2. The elucidation of the time-keeping mechanism of the redox PRX2 rhythm in erythrocytes which lack a cell nucleus and clock genes may contribute greatly to our understanding of how the humoral or neuronal circadian signals control the peripheral clocks, and how the internal desynchronization between peripheral tissues occurs.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・精神神経科学

キーワード：ペルオキシレドキシニン 概日リズム 赤血球 BRET

## 1. 研究開始当初の背景

シアノバクテリアから動植物にいたる生物の多くは地球の自転に伴う昼夜のリズムに同調するべく、体内に約24時間の時刻を知らせる概日時計を発達させてきた。動物において生物時計の中核は脳視床下部の視交叉上核に存在し、光を受容した網膜からのインパルスが入力されることにより、外部時刻との位相のズレがリセットされている。一方、末梢組織にも中枢時計と同様の時計遺伝子が発現しており、中枢時計による支配の下、ホルモン分泌や体温調節などをタイムリーに制御している。研究代表者の所属する研究室では末梢血単核球における時計遺伝子の発現を定量することで概日リズムを測定してきた(Kusanagi et al. *Neurosci Res* 61(2):136-144, 2008)。

時計遺伝子は転写・翻訳され、細胞質でリン酸化されると核内に移行し、自身の発現調節領域に結合することで転写を抑制する。このネガティブ・フィードバックループが概日リズムを形成することから、生物時計が時を刻むメカニズムは遺伝子発現のセントラルドグマに従うと思われてきた。ところが、本年、分化の過程で脱核し、もはや時計遺伝子が発現できなくなっている赤血球でもペルオキシレドキシニン2 (PRX2) の二量体形成と単量体への解離に概日リズムが存在することがわかった (O'Neill et al. *Nature* 469(7331):498-503, 2011)。PRX2はスーパーオキシドの代謝によって生じる過酸化水素を自身のシステイン残基のプロトンで水に還元する。このとき、2つのPRX2分子は酸化され、S-Sのジスルフィド結合を介した二量体が形成される。PRX2二量体はチオレドキシニンによって再び還元され元の単量体となる。

このような転写レベルの発現調節を受けない概日リズムには一体どのような意義があるのか。末梢組織の概日リズムは中枢時計の位相を反映していると考えられており、血液や神経を介して何らかの同調シグナルが伝達されていると考えられる。赤血球のPRX2は過酸化水素によって二量体が形成され、過酸化水素はスーパーオキシドの代謝によって生じる。すなわち、赤血球内ではPRX2の二量体形成の引き金になっている過酸化水素やスーパーオキシドにも概日リズムが存在する可能性が考えられる。過酸化水素はスーパーオキシドと比べ酸化力が弱いが細胞膜を透過する性質があり、赤血球における過酸化水素の出納が中枢時計と末梢時計を結ぶ内的同調に関係している可能性がある。

中枢時計の位相を末梢時計に伝える内的同調のメカニズムは不明な点が多く、同調物質の同定には至っていない。しかし、日内変動を示す血清中の物質としてメラトニンや

コルチゾールなどが知られており、標的器官や同調のタイミングの異なるいくつかの同調物質が末梢時計を補償していると推察される。赤血球の破壊により細網内皮系から遊離する血清鉄にも日内変動があることから、研究代表者は赤血球のPRX2の概日リズムに注目し、血液を介した同調機構において血清成分ではなく、血球成分を含めた新しい概日リズム測定系の構築をする。

O'Neillらは4時間おきにサンプリングした赤血球のライセートのウエスタンブロットティングから二量体形成したPRX2のタンパク質量を測定した。ヒトの概日リズムは平均24時間11分であるので、少なくとも24時間と24時間11分を弁別できる時間分解能が必要となる。研究代表者が提案する測定系はBRETによりPRX2の二量体形成をリアルタイムでモニターできるため、サンプリングの必要がなく、ウエスタンブロットティング以上の精度とダイナミックレンジをもった高時間分解能のデータを得ることができる。また、複数のサンプルを同時に解析することが可能になるため、種々の薬剤の影響を容易に調べることができる。

外部時刻に中枢時計が同調できなくなると、本来の活動時間帯とのズレが生じてしまう。ヒトにおいてこのような概日リズムが障害されると、学校や職場などで多くの人と活動時間を共有することが困難になるため、社会的な信用が失われるだけでなく、抑うつや不眠、倦怠感といった症状が現れ、患者のQOLは著しく低下する。概日リズム睡眠障害のフリーラン型ではメラトニンから算出した概日周期が健常人よりも長いことから、外部時刻との同調が十分に行われなくなっていると考えられている。しかし、全盲の視覚障害者の約半数がフリーラン型であることは中枢時計のリズムは正常であっても外的同調が起きにくいとリズム障害になることを示唆している。一方、中枢時計の位相を末梢時計に伝える内的同調に異常が起こった内的脱同調はリズム障害の精神症状の発現に関与していると考えられている。

## 2. 研究の目的

中枢時計の概日リズムを赤血球が末梢組織に伝達していると仮定し、その仮説を検証するため、高時間分解能の赤血球の概日リズム測定系を構築する。

### 3. 研究の方法

#### 生物発光共鳴エネルギー移動

(Bioluminescence resonance energy transfer: BRET)は生物発光を触媒するルシフェラーゼ(ドナー)と蛍光色素であるEYFP(アクセプター)という2つの物質が50Å以内に近接した際に、ドナーが放出した光のエネルギーをアクセプターが吸収する現象である。すなわち、ドナーとアクセプターのタンパク質間距離が非常に近い場合にルシフェラーゼによる発光の波長(480nm)がそのままEYFPを励起して、EYFPの黄色い蛍光波長(530nm)を放出する(図1)。ドナーに蛍光

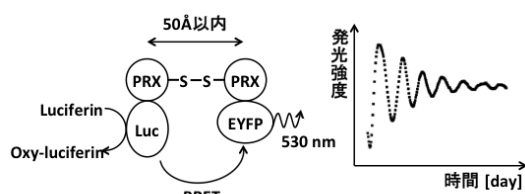


図1. 生物発光共鳴エネルギー移動 (BRET)

色素を用いるFRETと比べ、BRETは励起光を照射する特別な装置が必要なく、ドナーの蛍光色素の退色や自家蛍光の検出も考慮しなくてよいので、概日リズムを長期に亘りリアルタイムで測定できる。

本実験ではCMVのプロモーターの下流にPRX2とウミシイタケのルシフェラーゼ(Rluc)またはPRX2とEYFPの改変タンパクであるVenusを融合タンパクとして発現するコンストラクトを作製する。ヒトのPRXはPRX1からPRX6までのパラログが存在し、このうちPRX2は赤血球で最も発現しており、PRX3はほとんど発現していない。X線構造解析よりヒトのPRX2に非常によく似ているラットのPRX1の二量体はN末端同士が5Å、C末端同士が28Åと近接している(図2)ので、N末端また

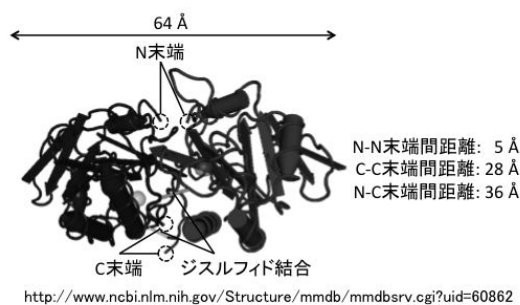


図2. ベルオキシレドキシニ二量体の構造

はC末端にRlucあるいはEYFPを融合させたプロンプを作製し、BRETシグナルの強度や概日リズムから最適な組み合わせを選出する。

BRETコンストラクトはヒト網状赤血球にLipofectamine 2000を用いてリポフェクションにて遺伝子導入する。ヒト網状赤血球はクエン酸加末梢血をPercoll密度勾配遠心により分離することで得られる。網状赤血球は核をもたないが、RNAポリメラーゼはまだ細

胞質に残存しており、CMVのプロモーターの下流でBRETプローブを十分に発現できる。遺伝子導入した網状赤血球は同時に採血した成熟赤血球と共培養することで、個体の成熟赤血球の概日リズムにin vitroで同調させる。これらの成熟赤血球をルシフェリンを含む培地に移し、Kronos Dio (ATTO)によりEYFPの蛍光をリアルタイムでモニターする。得られた蛍光強度の経時データをプロットしたサインカーブの頂点位相から概日周期を算出する。

### 4. 研究成果

PRX2の二量体形成と単量体への解離の概日リズムを測定するため、BRETプローブを発現するベクターを構築した。ドナープローブとして、PRX2のN末端あるいはC末端にRlucを融合タンパクとして発現するように作製した。一方、アクセプタープローブとして、PRX2のN末端あるいはC末端にVenusの173番目のアミノ酸が先頭になるように円順列変異(circular permutation; cp)を導入したVenus cp173を融合タンパクとして発現するように作製した。VenusはEGFPよりも蛍光強度が高いことが知られているが、Venus cp173は野生型のVenusよりも蛍光強度が高い。ドナー・アクセプターともにプローブがN末端にある融合タンパク(Rluc-PRX2・Venus-PRX2)がHEK293細胞において発現量が高く、S-S結合による二量体形成能も保持されていた。

Rluc-PRX2とVenus-PRX2をHEK293細胞に共発現させ、Rlucの安定型ルシフェリンであるEnduRENを培養液中に添加して得られたBRETシグナルを含む全体の発光は数日で減衰してしまっ。概日周期の算定には少なくとも3つの極大点が必要であるが、得られた発光強度の経時データを24時間隣接平均という算術処理でデトレンドすると極大点は多くても2点しか得られなかった。そこで、研究代表者はRlucに酵素活性や安定性に寄与する8個のアミノ酸置換を導入したRluc8-PRX2を作製した。Rluc8-PRX2を用いると発光が減衰せずに一週間に亘ってモニターできるようになった。これまでは野生型のRlucやルシフェリンの不安定性からBRETを用いた概日リズムの測定は不可能であると考えられてきたが、本研究によりBRETによるタンパク質の会合に基づいた新たな概日リズムの測定が可能になった。

Rluc8-PRX2同士が二量体を形成するとBRETが起こらないため、共発現において、Venus-PRX2に比べて、Rluc8-PRX2の発現を低く抑えることがBRETシグナルの増大に重要であった(図3)。

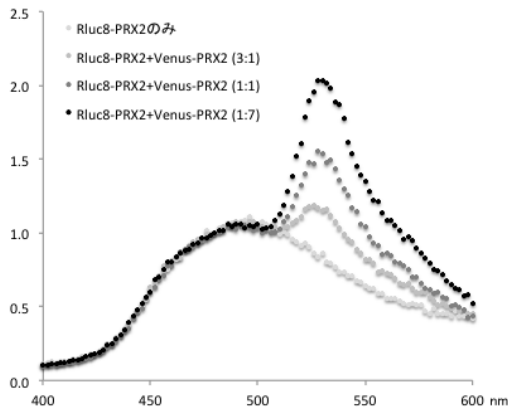
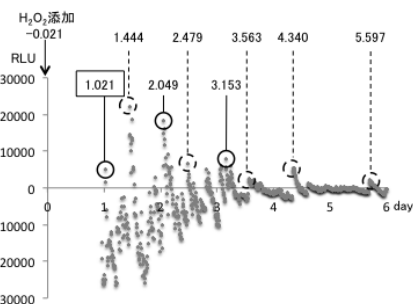


図3. BRETスペクトル

HEK293細胞のような有核の培養細胞ではチオレドキシ還元酵素の活性が高いため、二量体を形成したPRX2は速やかに単量体に解離してしまい、概日リズムを示さなかった。そこで、チオレドキシ還元酵素や過酸化水素を分解するカタラーゼの活性をジニトロクロロベンゼンとアジ化ナトリウムで阻害すると、過酸化水素の添加によって、明瞭なPRX2の二量体形成リズムが観察された(図4)。



100 $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>は測定の30分前(-0.021 day)に添加した。添加後約25時間にBRETシグナルの頂点位相が現れた。実線の周期は25.6時間、点線の周期は24.4時間であった。実線と点線の周期が交互に現れるのは、細胞分裂により同調していたPRX2が希釈されてしまった影響と考える。

図4. HEK293細胞におけるBRETコンストラクトの発現

赤血球ではこれら酵素の発現量が低いために、PRX2が概日リズムを示していると推測される。HEK293細胞はコンフルエント後も垂直方向にやや増殖するため、完全なコタクト・インヒビションがかからない。そのため、細胞分裂により同調していたPRX2が希釈されてしまい、図4において実線と点線の頂点位相が交互に現れるパターンを示している。興味深いことに、過酸化水素の添加後約25時間に最初の頂点位相が現れた。すなわち、過酸化水素はPRX2の二量体形成のタイミングを決定する同調因子として作用することがわかった。

研究をはじめた当初はウサギの再生不良性貧血の回復期に末梢血に増加する網状赤血球に導入した遺伝子の発現がみられることから、ヒト網状赤血球にもリボソームだけ

ではなく、DNAポリメラーゼも残存していると考えていた。しかし、導入する遺伝子としてDNAだけでなく、5'キャップ構造やポリAを付加したmRNAも用いたが、発現を確認することができなかった。おそらく、生理的なヒト末梢血の網状赤血球は病的なウサギ網状赤血球と違って、かなり分化が進んでおり、BRETプローブの発現に十分な転写・翻訳が行えなくなっているのであろう。今後はBRETタンパクを用いて、赤血球にタンパク質導入を行う計画である。既にエレクトロポレーションやリポフェクションを用いて、蛍光標識したIgGを赤血球に導入できることは確認できており、BRETに必要なドナーとアクセプタータンパク質の精製を行っている。

以上の研究により、BRETを用いて、PRX2二量体の形成を経時的にモニタリングできる測定系を開発できた。先行研究ではウエスタンブロットングにてPRX2二量体を検出していたため、4時間おきにサンプルを採取する必要があったが、BRETにより10分おきに連続測定が可能となったことで、時間分解能が飛躍的に向上し、頂点位相や周期を高精度に算出できるようになった。本測定系は時計遺伝子のプロモーターを用いたレポーターアッセイとは異なるタンパク質のインタラクションに基づく新しい測定法である。すなわち、本測定系は時計遺伝子の発現をモニターするのではなく、タンパク質の酸化還元状態をモニターしている。本測定系は細胞を生きたままりアルタイムで測定するのでサンプリングを行う必要がない。また、複数のサンプルを同時に測定することが可能になるため、種々の試薬の影響を並行して調べることができる。これまでBRETを用いて、概日リズムを測定した先攻研究はなかったが、本研究の成果は他の概日リズムを形成するタンパク質の会合に応用した測定系の開発の基礎となると考える。

本測定系の開発によって、PRX2の酸化還元リズムは過酸化水素が同調因子となることが示唆された。時計遺伝子コンポーネントをもたない赤血球のPRX2の酸化還元リズムの制御機構の解明は、液性・神経性の概日シグナルによる末梢時計の制御システムや、末梢組織間の多様な内的脱同調のあり方の理解に大きく寄与する。また、本研究の成果は概日リズム睡眠障害の病態生理だけでなく、環境光や社会的接触などのリズム同調因子が大きく減弱する精神疾患患者でしばしば認められる内的脱同調や二次的に惹起される種々の精神身体症状の発現機序の解明にもつながる可能性がある。本研究で得られた成果を基に、平成26~27年度の科研費若手研究(B)「赤血球の概日リズムの同調機構の解明」において、BRETタンパクを赤血球に導入し、睡眠時無呼吸症候群の患者の概日リズムを測定する計画である。

## 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2件)

1. Hida A, Kitamura S, Ohsawa Y, Enomoto M, Katayose Y, Motomura Y, Moriguchi Y, Nozaki K, Watanabe M, Aritake S, Higuchi S, Kato M, Kamei Y, Yamazaki S, Goto Y, Ikeda M, Mishima K: In vitro circadian period is associated with circadian/sleep preference, Sci Rep, 査読あり, 3, 2074: 2013 1-7, DOI: 10.1038/srep02074
2. Watanabe M, Hida A, Kitamura S, Enomoto M, Ohsawa Y, Katayose Y, Nozaki K, Moriguchi Y, Aritake S, Higuchi S, Tamura M, Kato M, Mishima K: Rhythmic expression of circadian clock genes in human leukocytes and beard hair follicle cells, Biochem Biophys Res Commun, 査読あり, 425(4): 2012, 902-907, DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.08.008

〔学会発表〕(計4件)

1. 肥田昌子, 北村真吾, 大澤要介, 中崎恭子, 元村裕貴, 綾部直子, 片寄泰子, 野崎健太郎, 榎本みのり, 加藤美恵, 小野浩子, 亀井雄一, 三島和夫:概日リズム睡眠障害患者の体内時計機能障害, 第128回日本薬理学会関東部会, 2013.7.14, 東京(新宿区)
2. 肥田昌子, 北村真吾, 片寄泰子, 榎本みのり, 大澤要介, 渡邊真紀子, 野崎健太郎, 有竹清夏, 樋口重和, 加藤美恵, 守口善也, 亀井雄一, 池田政明, 三島和夫:末梢時計機能は個人の概日/睡眠特性を反映する, Neuroscience2012, 2012.9.18-21, 愛知(名古屋市)
3. 肥田昌子, 北村真吾, 大澤要介, 片寄泰子, 野崎健太郎, 榎本みのり, 有竹清夏, 樋口重和, 加藤美恵, 亀井雄一, 池田政明, 三島和夫:末梢時計リズムは個人の睡眠特性・生物時計機能を反映する, 第19回日本時間生物学会学術大会, 2012.9.15-16, 北海道(札幌市)
4. 肥田昌子, 北村真吾, 大澤要介, 榎本みのり, 片寄泰子, 野崎健太郎, 加藤美恵, 守口善也, 亀井雄一, 三島和夫:生体組織を利用したヒト生物時計機能評価 概日リズム睡眠障害患者への応用, 日本睡眠学会第37回定期学術集会, 2012.6.28-30, 神奈川(横浜市)

〔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:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

大澤 要介(Ohsawa Yosuke)  
慶應義塾大学・医学部・助教  
研究者番号:50528429