

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26650033

研究課題名(和文) 赤血球前駆細胞を利用した転写翻訳に依存しない概日リズム発振機構の解明

研究課題名(英文) Investigation for the oscillatory mechanism of circadian rhythms independent of transcriptional-translational feedback loops using erythrocyte progenitor cells

研究代表者

大川 妙子(西脇妙子)(Ohkawa, Taeko)

名古屋大学・生命農学研究科・准教授

研究者番号：30432230

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：概日リズムの発振には、時計遺伝子の転写・翻訳が不可欠とされてきたが、近年これらの過程に不依存なリズムが報告されている。本研究ではこのようなリズムの発振機構と、概日リズムと細胞内レドックス制御の関連の解明を目指した。まず赤血球前駆細胞株を除核細胞に分化させ、抗酸化蛋白質ペルオキシレドキシンのウェスタン解析を行ったが、ヒト赤血球で報告された酸化リズムはまだ再現できていない。またレドックス制御関連化合物ライブラリーのスクリーニングを行ったところ、概日リズムの位相を制御する化合物が得られた。この化合物の作用機構の解明を通じて、概日時計機構におけるレドックス制御の意義が明らかになることが期待される。

研究成果の概要(英文)：It has been thought that transcription/translation of clock genes is indispensable for the circadian oscillation. Recently, however, several rhythms were reported to be independent of these processes. In this study, we tried to clarify the mechanism of such oscillations and the relationship between circadian rhythm and intracellular redox regulation. We differentiated erythroid-progenitor cells into enucleated cells, prepared time-series total protein samples, and checked the oxidation state of anti-oxidant protein peroxiredoxin by western analysis. However, the oxidation rhythm, previously reported for human erythrocyte, has not yet been reproduced. To elucidate the relationship between circadian oscillation and intracellular redox regulation, we screened a chemical library containing compounds with prooxidant/ antioxidant activity. We obtained a hit that regulates the circadian phase. Further study will reveal the role of redox regulation in the circadian clock system.

研究分野：時間生物学

キーワード：概日リズム レドックス制御

1. 研究開始当初の背景

概日リズムは、内因性の振動体である概日時計により発振される、約 24 時間周期の様々な生理活性のリズムである。そのリズム発振機構として、概日時計蛋白質が自身をコードする mRNA の転写を抑制する「転写・翻訳のネガティブフィードバックループモデル」が提案されているが、近年このモデルでは説明が困難な概日リズムがいくつか報告されている。

代表者らは以前、シアノバクテリアの概日時計蛋白質 KaiA、KaiB、KaiC を ATP 存在下で混合すると KaiC のリン酸化状態が試験管内で概日リズムを示すことを発見し(1)、その発振機構の全貌を明らかにした(2)。このような蛋白質レベルの振動は、原核生物に特異的なものと考えられてきたが、その後抗酸化蛋白質であるペルオキシレドキシンの酸化状態の概日リズムが、核をもたないヒト赤血球においても報告されたことから、時計遺伝子の転写・翻訳に依存しない概日時計の普遍性と、細胞内レドックス状態と概日時計の関連性が示唆された(3)。しかしながら真核生物においては、ペルオキシレドキシンの酸化・還元リズムを含めて、時計遺伝子の転写・翻訳に依存しない蛋白質レベルの概日リズム発振機構についてはその後ほとんど研究の進展が見られていない。

2. 研究の目的

本研究では、2種類の培養細胞株を用いて、時計遺伝子の転写・翻訳に依存しない概日リズムの発振機構を、生化学およびケミカルバイオロジーの手法により解明することを目的とした。具体的には、マウス由来の赤血球前駆細胞株 MEDEP BRC5 とヒト骨肉腫由来の U2OS 細胞を用いることとした。前者はエリスロポエチンを添加することで、転写・翻訳が起こらないと考えられる赤血球様の除核細胞に分化する。後者は概日時計の分野で、ケミカルバイオロジーを始め様々な研究に広く用いられている細胞株である。これらを用いて新たな細胞レベルの実験系を立ち上げ、時計遺伝子の転写・翻訳に依存しない概日リズムの発振機構、および細胞内レドックス制御と概日時計との関連を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

(a)マウス赤血球前駆細胞株 MEDEP BRC5 における蛋白質レベルの概日リズムの観測

マウス赤血球前駆細胞株 MEDEP BRC5 (4) は、理化学研究所 細胞材料開発室より提供を受けた。既報(4)に従って培養を行い、エリスロポエチンを加えることにより赤血球様細胞に分化させた。細胞をライトギムザ染色し、形態から分化状態を確認後、経時的に細胞を採取し、ウェスタンブロッティングによりペルオキシレドキシンの存在量や酸化、リン酸化などの

翻訳後修飾が日内変動するか否かを観察した。

(b) ヒト U2OS 細胞を用いた細胞内酸化還元状態のリアルタイムモニタリング

細胞内の酸化還元状態の変化をリアルタイムでモニターするために、酸化還元状態により FRET 効率が変化する蛍光蛋白質 Redoxfluor (5)の発現プラスミドを U2OS 細胞に導入し、安定発現株を得た。発現プラスミドは、京都大学農学研究科 阪井康能教授より譲渡を受けた。またこの細胞には、概日時計遺伝子 *Bmal1* プロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子を連結したレポーターをすでに導入してあり、転写・翻訳のネガティブフィードバックに依存すると考えられる概日時計遺伝子の発現リズムと、細胞内酸化還元状態を同時にモニターすることを目指した。さらに、*Bmal1* 遺伝子を CRISPR-Cas9 法により破壊することにより、転写・翻訳のネガティブフィードバックが機能しない株を得た。

(c) ヒト U2OS 細胞を用いた概日時計のケミカルバイオロジー

U2OS 細胞の *Bmal1* レポーター株を用いて、レドックス制御関連化合物ライブラリー、および名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所所有の低分子化合物のライブラリーのスクリーニングを行った。具体的には、384 ウェルプレートに培養した U2OS 細胞に化合物を加え、ルシフェラーゼレポーター由来の発光を、光電子増倍管を搭載した発光測定装置 (CL384 中立電機) により測定し、得られた発光リズムの周期や位相を付属のソフトウェアにより求めた。

4. 研究成果

(a)マウス赤血球前駆細胞株 MEDEP BRC5 における蛋白質レベルの概日リズムの観測

まず既報に従って幹細胞因子(SCF)を含む培地中で細胞を増殖させ、SCF を除きエリスロポエチン(EPO)を添加することにより赤血球様細胞に分化させた。EPO 存在下で3日間培養することで、細胞の色が赤く変化したことが

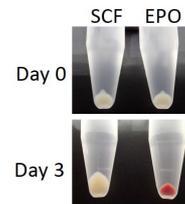


図1

ら(図1)、ヘモグロビンが合成されているものと考えられる。またライトギムザ染色を行ったところ、SCF 存在下ではすべての細胞が濃青色に染色されたのに対し、EPO 存在下では約 70%の細胞が赤血球の染色像に類似した淡紅色に染色された(図2)。これらの結果より、MEDEP BRC5 細胞は、EPO の添加により大部分が赤血球様

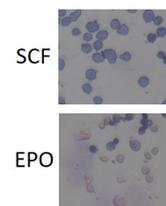


図2

の細胞に分化したものと考えられる。今後は細胞表面マーカーを用いてソーティングを行うことにより赤血球様細胞のほぼ純粋なポピュレーションを得ることも可能であると期待される。

次に SCF 存在下で培養した未分化な細胞、および EPO 存在下で培養した赤血球様に分化した細胞を、培地交換時を時刻 0 とし以後 4 時間毎 48 時間に渡って、細胞培養液を経時的に採取し、室温で遠心操作をすることにより細胞を回収した。赤血球の主要なペルオキシレドキシシンであるペルオキシレドキシシン 2、酸化型ペルオキシレドキシシン、および *Bmal1* の抗体を用いてウェスタンブロッティングを行い、シグナル強度やゲル上の移動度に日内変動があるか否かを調査した。しかしながら

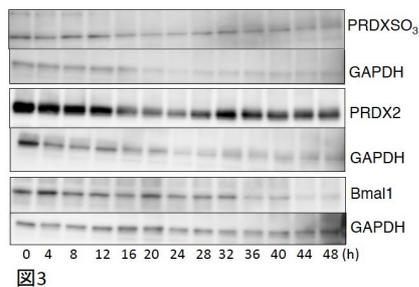


図3

SCF 処理群、EPO 処理群 (図 3) ともに、明確な日内変動はいずれの抗体を用いた場合も検出されなかった。今後の課題としては、細胞の回収法および同調法のさらなる検討が挙げられる。なお、U2OS 細胞についても、経時的に細胞を回収し、酸化型ペルオキシレドキシシンの抗体を用いてウェスタンブロッティングを行ったが、やはり日内変動は観察されなかった。

(b) ヒト U2OS 細胞を用いた細胞内酸化還元状態のリアルタイムモニタリング

U2OS 細胞に細胞内に Redoxfluor の発現プラスミドを導入し、安定発現株を複数得た。Redoxfluor は、酵母 Yap1p のレドックスセンサー領域の N 末端と C 末端に、それぞれ蛍光蛋白質 cerulean (Ex. 434 nm, Em. 476 nm) と citrine (Em. 526 nm) が結合した融合蛋白質である。cerulean と citrine の間の FRET 効率は、酸化状態では低く、還元状態では高い(5)。得られた細胞を 96 穴プレートで培養し、デキサメタゾン添加による同調処理を行った後、プレートリーダーで、30 分毎に約 1 週間に渡り測定を行った。しかしながら、FRET 効率の日内変動はこれまでのところ観察されていない。今後は、電気化学的測定など異なる原理の手法の併用や、応答性の異なるレドックスセンサー蛋白質の利用などの検討を通じて、酸化還元リズムの測定系を構築できれば、ケミカルライブラリーのスクリーニング等での利用が可能となる。また時計遺伝子 *Bmal1* の破壊株は、当初酸化還元リズムが検出された場合に、酸化還元リズムと転写・翻訳フィードバックループとの関連性を明らかにするために樹立した。*Bmal1* の破壊株では、*Bmal1* プロモーターの下流に結合したル

シフェラーゼ由来の発光リズムが、予想通り消失し無周期となった。

(c) ヒト U2OS 細胞を用いた概日時計のケミカルバイオロジー

細胞内レドックス制御と概日時計の関係を明らかにするために、U2OS 細胞の *Bmal1* レポーター株を用いて、酸化、還元作用を持つ化合物のライブラリーをスクリーニングした。ライブラリー中の 84 種類の化合物をスクリーニングした結果、発光リズムの周期や位相を変化させる化合物があわせて 11 化合物得られた。これらの中から、位相変化をもたらす化合物 (化合物 A) についてさらに研究を進めた。一般に概日リズムの位相変化は、位相反応曲線により理解することができ、概日リズムの位相変化の向き (位相の前進、後退) と大きさは、位相変化を誘導する刺激 (光刺激、温度刺激など) を与えた時刻に依存して決定される。そこで化合物 A についても様々な時刻で U2OS 細胞に投与し、*Bmal1* レポーターの発光リズムに対する影響を調査し、位相反応曲線を作成した (図 4)。その結果

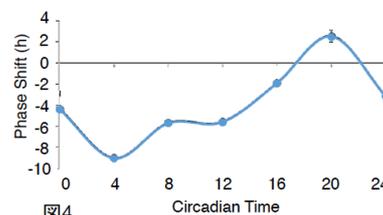


図4

結果昼にあたる時刻である概日時刻 (CT) 0 から 12 にかけては、4 時間から 10 時間もの大きな位相の後退を示したのに対し、夜にあたる CT12 から 20 にかけて、徐々に位相の後退量が減少し、CT20 においては 2 時間の位相の前進が観測された。これらの結果より、化合物 A は、概日時計遺伝子 *Bmal1* の転写リズムの位相を時刻依存的に制御していることが明らかとなった。化合物 A は、直接的あるいは間接的に、*Bmal1* に転写リズムをもたらす振動体に作用していることが考えられ、今後は化合物 A のターゲットの同定や、振動体に至るまでの情報伝達経路を明らかにする予定である。

< 引用文献 >

- (1) Nakajima et al. (2005) *Science* 308, 415
- (2) Nishiwaki-Ohkawa et al. (2014) *PNAS* 111, 4455
- (3) O'Neill et al. (2011) *Nature* 469, 498
- (4) Hiroshima et al. (2008) *PLoS One* 3, e1544
- (5) Yano et al. (2010) *Mol. Cell Biol.* 30, 3758

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 6 件)

1. Nishiwaki-Ohkawa, T., Kitayama, Y., Ochiai, E., and Kondo T. (2014) Exchange of ADP with ATP in the CII ATPase domain

- promotes autophosphorylation of cyanobacterial clock protein KaiC. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111, 4455-4460, 10.1073/pnas.1319353111, 査読有
2. Ikegami, K., Liao, X. -H., Hoshino, Y., Ono, H., Ito, Y., Nishiwaki-Ohkawa, T., Sato, C., Kitajima, K., Iigo, M., Shigeyoshi, Y., Yamada, M., Murata, Y., Refetoff, S., and Yoshimura, T. (2014) Tissue-specific post-translational modification allows functional targeting of thyrotropin. *Cell Reports* 9, 801-810, 10.1016/j.celrep.2014.10.006, 査読有
 3. Oshima, T., Yamanaka, I., Kumar, A., Yamaguchi, J., Nishiwaki-Ohkawa, T., Muto, K., Kawamura, R., Hirota, T., Yagita, K., Irle, S., Kay, S. A. Yoshimura T., and Itami, K. (2015) C-H activation generates period-shortening molecules that target cryptochrome in the mammalian circadian clock. *Angew. Chem. Int. Ed.* 54, 7193-7197, 10.1002/anie.201502942, 査読有
 4. Nishio, K., Pornpitra, T., Izawa, S., Nishiwaki-Ohkawa, T., Kato, S., Hashimoto, K., and Nakanishi, S. (2015) Electrochemical detection of circadian redox rhythm in cyanobacterial cells via extracellular electron transfer. *Plant Cell Physiol.* 56, 1053-1058, 10.1093/pcp/pcv066, 査読有
 5. Nishiwaki-Ohkawa, T., and Yoshimura, T. (2016) Molecular basis for regulating seasonal reproduction in vertebrate. *J. Endocrinol.* 2290, R117-127, 10.1530/JOE-16-0666, 査読有
 6. Nambo, M., Kurihara, D., Yamada, T., Nishiwaki-Ohkawa, T., Kadofusa, N., Kimata, Y., Kuwata, K., Umeda, M., and Ueda, M. (2016) Combination of synthetic chemistry and live-cell imaging identified a rapid division inhibitor in Tobacco and Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol.* 57, 2255-2268, 10.1093/pcp/pcw140, 査読有

〔学会発表〕(計4件)

1. 大川(西脇)妙子、小林茜、山中衣織、佐藤綾人、大島豪、Anupriya Kumar、山口純一郎、川邑里佳、武藤慶、廣田毅、八木田和弘、Steve A. Kay、Stephan Irle、伊丹健一郎、吉村崇 「哺乳類の概日リズムの周期を調節する化合物の探索」、第22回時間生物学会学術大会 2015年11月21日～22日、東京大学

2. 大川妙子、加藤優季、伊藤有花、Muhammad Yar, Zachary Ariki, Anupriya Kumar, Jacky Yim, 佐藤綾人、南保正和、Stephan Irle, Cathleen Crudden、吉村崇 「甲状腺ホルモンアナログの開発」、第23回時間生物学会学術大会 2016年11月12日～13日、名古屋大学
3. 石黒将照、小林茜、上園悠真、角房直哉、佐藤綾人、大松亨介、大川妙子、大井貴史、吉村崇 「ITbM化合物ライブラリーを用いた概日リズム調節分子の探索」、第23回時間生物学会学術大会 2016年11月12日～13日、名古屋大学
4. 小林茜、Katherine Tamai、上園悠真、佐藤綾人、大松亨介、大川妙子、大井貴史、吉村崇 「哺乳類の概日リズムの周期を延長する化合物の探索」、第23回時間生物学会学術大会 2016年11月12日～13日、名古屋大学

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1)研究代表者

大川 妙子 (OHKAWA, Taeko)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・准教授
研究者番号：31432230

(2)研究分担者

(3)連携研究者

(4)研究協力者

古川 祐子 (FURUKAWA, Yuko)
石黒 将照 (ISHIGURO, Masateru)
小林 茜 (KOBAYASHI, Akane)