

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860036

研究課題名(和文)概日リズム形成を担う時計遺伝子の新規分子機構の解明

研究課題名(英文)Functional analysis of a novel molecular mechanism of circadian clock genes.

## 研究代表者

高畑 佳史 (Takahata, Yoshifumi)

大阪大学・歯学研究科(研究院)・助教

研究者番号：60635845

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)：地球上の多くの生物には、様々な生理現象を支配する約24時間周期の概日リズムが存在する。時計タンパク質に特異的に作用する化合物は、リズム障害薬の開発候補として期待されているが、有効な化合物はほとんど存在しない。そこで、小分子化合物ライブラリを用いて時計遺伝子Per1を特異的に誘導する化合物を同定した。質量分析法により化合物とCRYタンパク質は物理的に相互作用し、CRYタンパク質の持つ転写抑制能を消失させることを見出した。以上の結果から、この化合物は時計遺伝子の新たな分子基盤の理解と、リズム障害に対する薬剤の開発に貢献する可能性があることが示唆される。

研究成果の概要(英文)：Circadian rhythms, biological oscillation with a period of about 24 hours, are maintained by a timekeeping system composed of the various molecular basis among circadian genes. Although small compounds that affect the clock function would apply for therapeutic strategies of physiological and metabolic disorders, there are few compounds identified that high selectively target of clock proteins. In this study, we identified a novel small molecule that specifically induced period1 (Per1) expression, resulting in shortening of the circadian period. Further, we revealed that this compound abolished the ability of transcriptional repressive function of cryptochrome (Cry) through the direct interaction with Cry protein used by MS analysis. Our data suggest this compound would be a tool for understanding the molecular basis of clock genes, and helpful for developing small compounds targeted at clock-based therapeutic of diseases.

研究分野：生化学

キーワード：時計遺伝子 転写因子

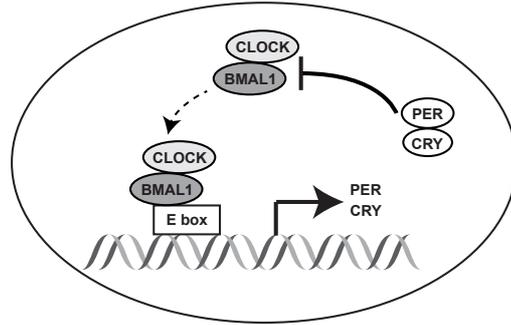
1. 研究開始当初の背景

地球上の多くの生物には、睡眠覚醒や体温、血圧、ホルモン合成などの生理現象を支配する約24時間周期の概日リズムが見出される。これは遺伝的に決定された生物種固有のリズムを刻む内因性の体内時計が存在するためである。体内時計は、環境変化に対する予期行動を可能にし、生体内の活動を環境変化にあらかじめ合わせていく環境適応の仕組みとして備わっていると考えられる。

体内時計は以下の3つの特性を持つ。(1) 約24時間のリズムを継続する自律性 (2) 明暗条件などの外部環境に対してリズムを同調させる同調性 (3) 環境の温度変化によって周期に影響を受けない温度保障が必要である。一般的に生化学的な反応は温度と反応速度に正の相関が見られるのに対して、生化学反応で構成されるネットワークを基盤としているはずの体内時計の速度は温度変化に依存せず、時計の進行速度を安定に維持する仕組みが備わっている。視床下部に存在する視交叉上核(SCN)を破壊した動物では活動・生理学的リズムが消失したことから、視交叉上核が概日時計の中核組織として機能することが明らかにされた。哺乳類の概日リズム形成には、複数の時計遺伝子が位相の異なる24時間周期の発現リズムにより制御される。

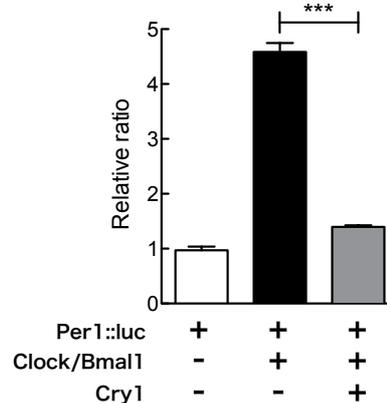
明期性発現遺伝子の転写誘導には、プロモーター上に存在する転写因子結合配列であるE boxに、CLOCK/BMAL1複合体が結合することが必要であり、その後の転写抑制には、CLOCK/BMAL1によって誘導されるPERIOD (Per) / CRYPTOCHROME (Cry)複合体が転写抑制因子として機能する。このように概日リズム発振には二つの制御機構の連続サイクルからなる転写・翻訳の負のフィードバック機構が必須である。

Fig.1 時計遺伝子による転写制御フィードバック機構



しかし、実際のところ時計遺伝子 Per1 のプロモーターにルシフェラーゼを連結させたレポーター遺伝子 (Per1::luc)を用いてレポーターアッセイを行うと、CLOCK/BMAL1によって誘導されたルシフェラーゼ活性は Cry1だけの導入で十分抑制された。

Fig.2 Reporter assay



Per 1 遺伝子の変異体は確かに顕著な行動リズム異常を示し、従来までは Cry と相互作用することのみの機能に注目されていたが、Perの詳細な分子機能についてはよく分かっていない。このように概日リズム発振分子機構を理解するためには時計遺伝子の織りなす分子基盤ネットワークを明らかにすることが必要である。

本研究により明らかとなった知見の生理学的役割を解明することで、新たな体内時計調節機構を理解するのみならず、時差ぼけ、リズム障害による睡眠障害などの診断や大賞薬の開発、治療戦略、予防対策発見の糸口につながる可能性もあり、臨床的な面においても大きな寄与が出来る。

## 2. 研究の目的

近年、体内時計の異常により不眠、抑うつ、メタボリックシンドロームなどの代謝性疾患を始めとする様々な病気の原因となることが示されている。概日リズム機構に対して作用する化合物は体内時計の異常に対する改善薬として薬剤候補になりうる。このような概日リズムに作用する化合物はこれまでにいくつかの報告はあるものの、いずれも行動リズムを消失させるものや、行動周期を延長させるような化合物であり、真に有効な薬剤開発にはほど遠いのが現状である。そこで、本研究では概日リズム発振機構に対して作用する化合物をスクリーニングにより同定し、その作用機構の解明を介して新たな時計遺伝子の分子基盤の理解を目標とした。

## 3. 研究の方法

上記の目的を達成させるため、具体的に以下のような実験を行った。

(1) 化合物ライブラリを用いて *Per1* を特異的に誘導する分子を同定する。

(2) 化合物による *Per1* の誘導効果は *Per1* プロモーターに存在する Ebox を介するものかどうか、レポーターアッセイ、Cas9 ゲノム編集法などを用いて検討する。

(3) 化合物を細胞に作用させ、リアルタイムルシフェラーゼを解析し、位相変化を検討する。

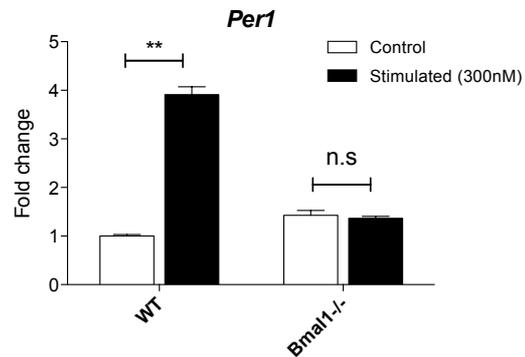
(4) 化合物と時計タンパク質に対する影響について検討する。

## 4. 研究成果

(1) *Per1* を誘導する化合物を同定した。最終濃度 300nM で化合物をマウス繊維芽細胞に処理し、RT-qPCR 法を用いて各種時計遺伝子の発現解析を行った。その結果、この化合物を処理することにより *Per1* と *Rev-α* 遺伝子のみの発現が上昇した。さらに *Bmal1* 欠損マウスから調製した線維芽細胞を用いて同様の実験を行ったところ、*Bmal1* 欠損線維芽細胞

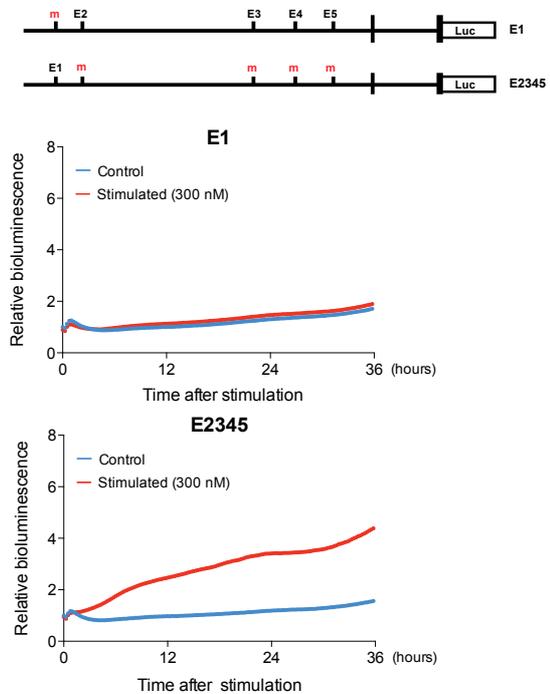
ではこの化合物の *Per1* 誘導能は認められなかった。

Fig.3



(2) 化合物による *Per1* 誘導能は Ebox を介するかどうか検討した。*Per1* の上流 5kb の間の 5つの Ebox を標的に変異型 Ebox を作成した。変異型 Ebox を含むレポーターベクターを HEK293T 細胞に遺伝子導入後、リアルタイムルシフェラーゼアッセイにより、化合物の効果を検討した。その結果、*Per1* プロモーター上の一番目の Ebox が *Per1* の誘導に必要であることが明らかとなった。

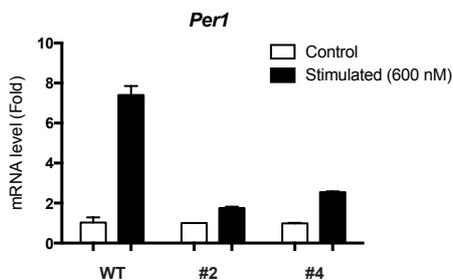
Fig.4



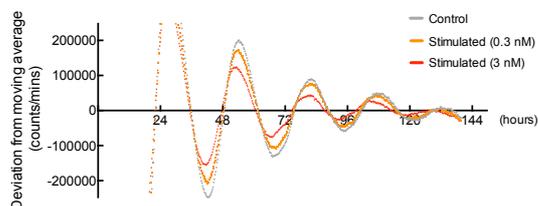
さらに、CRISPR/Cas9 ゲノム編集法を用いて、一番目の Ebox を挟むように gRNA を 2 種類

設計した。これらの 2 種類の gRNA と Cas9 タンパク質を発現させるレトロウィルスベクターを作成し、NIH3T3 細胞に遺伝子導入を行った。複数の得られたクローンからゲノム DNA を回収し、PCR にて切断領域を増幅後、スクリーニングを行い、2 種類の欠損株の取得に成功した。それらの欠損株細胞と野生型の細胞株に化合物を処理し、Per1 の発現誘導について RT-qPCR 法にて検討した結果、野生型では Per1 の誘導効果は認められるが、欠損細胞株では Per1 の誘導能は観察されなかった。以上の結果を合わせると、化合物は特定の Ebox の配列を認識して機能することが強く示唆される。

Fig.5

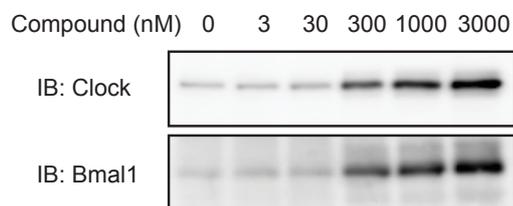


(3) Per1 上流 5kb のプロモーターベクターを NIH3T3 細胞に遺伝子導入を行い、デキサメタゾンで細胞を同調させ、経時的にルシフェラーゼを測定した。0.3 nM および 3 nM の濃度で化合物を処理したところ、位相前進効果が認められた。



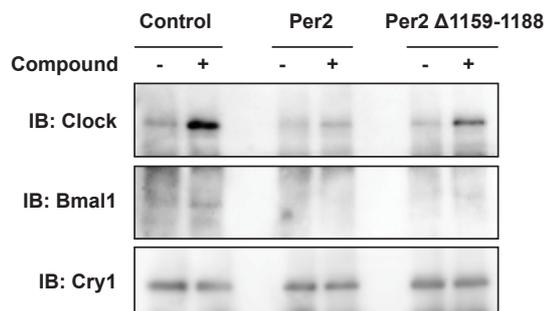
(4) 化合物が時計タンパク質に与える影響を検討するため、Bmal1/Clock と Cry1 に対する相互作用能について検討した。HEK293T 細胞に Flag-Cry1, Clock, Bmal1 をそれぞれ遺伝子導入し、48 時間経過後にタンパク質を回収した。細胞抽出物の中に化合物を添加し、Flag 抗体を用いた免疫沈降法を行い、Cry1 に結合する Clock, Bmal1 のタンパク質量を定量した。その結果、化合物により Cry1 に結合する Clock, Bmal1 とともに結合量が増大することが明らかとなった。

### IP Flag-Cry1



さらに、この Cry1 に対する Bmal1/Clock の結合能の増加は Per2 を同時に発現することで抑制されることが明らかとなった。また、Per2Δ1159-1188 は Cry1 と結合することができない変異体であるが、この Per2Δ1159-1188 は化合物の効果を減弱させる効果は見られなかった。

### IP Flag



以上の結果から、この化合物は Bmal1/Clock と Cry1 の相互作用を増強させるが、Cry1 の本来持つ転写抑制能を失わせるという効果が推察される。また特定の Ebox に作用するメカニズムについては今後の慎重な解析が必要である。

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔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〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

高畑 佳史 (TAKAHATA Yoshifumi)

大阪大学大学院歯学研究科 生化学教

室・助教

研究者番号：60635845

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし