

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860615

研究課題名(和文) 赤血球の概日リズムの同調機構の解明

研究課題名(英文) The elucidation of the entraining mechanism of the circadian rhythm in the red blood cells.

研究代表者

大澤 要介(Ohsawa, Yosuke)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特任助教

研究者番号：50528429

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ペルオキシレドキシニン2(Prx2)とスルフィレドキシニンの結合に由来する生物発光共鳴エネルギー移動の測定系を開発した。K562細胞の内因性チオレドキシニンレダクターゼをノックダウンし、分化・脱核することで、擬似赤血球を作出した。擬似赤血球が32℃と37℃の温度サイクルに同調したことから、生体内においても、高体温期に産生される過酸化水素がPrx2の概日リズムを同調していると推測される。さらに、異なる位相の擬似赤血球を混合すると、概日リズムが干渉することを発見した。さまざまな位相の擬似赤血球と未知位相の赤血球を混合し、干渉の程度を測定することで、被験者の赤血球の位相を特定する基盤を作った。

研究成果の概要(英文)：A measuring system using the bioluminescence resonance energy transfer emitted from the binding between peroxiredoxin 2 (Prx2) and sulfiredoxin has been developed. Imitating red blood cells (iRBCs) were generated by knocking down endogenous thioredoxin reductase (TrxR) in K562 cells, next by differentiating and enucleating cells. The iRBCs were entrained in daily thermal cycles (32℃ for 12 hours and 37℃ for 12 hours). This result implies that the circadian rhythm of Prx2 may be entrained in vivo by hydrogen peroxide produced during the period of high body temperature. Moreover, circadian rhythm of Prx2 in iRBCs was interfered by mixing the iRBCs with an equal number of the iRBCs in which Prx2 rhythm was out of phase. I established a foothold that determines the phase of subject's red blood cells (RBCs) by measuring degrees of the interference between iRBCs with various phases and subject's RBCs.

研究分野：医歯薬学

キーワード：ペルオキシレドキシニン スルフィレドキシニン 概日リズム BRET 赤血球 睡眠時無呼吸症候群 間欠的低酸素 K562

## 1. 研究開始当初の背景

赤血球は酸素を運搬する役割を担うため、常に酸化的環境に曝されている。酸素分子は末梢の低酸素分圧下でヘモグロビンから解離する際に、その2~3%がスーパーオキシドとなる。スーパーオキシドはスーパーオキシドディスムターゼにより速やかに過酸化水素に代謝されるが、一部は細胞膜の多価不飽和脂肪酸と反応して脂質の過酸化に関与する。脂質の過酸化により細胞膜の柔軟性を失った赤血球は脾臓などの細網内皮系に捕捉され、破壊される。一方、赤血球は過酸化水素や過酸化脂質のような活性酸素種を還元するペルオキシレドキシニン2 (Prx2) という抗酸化酵素を備えており、細胞膜の柔軟性を維持している。Prx2はヘモグロビン・炭酸脱水酵素に次いで赤血球に多いタンパク質で、Prx2 ノックアウトマウスの赤血球では細胞膜の過酸化により、溶血性貧血を起こすことから、赤血球が約120日の寿命を全うするための保護的な因子と考えられている。

過酸化水素と反応したPrx2は自身のシステイン残基が酸化され、S-Sのジスルフィド結合を介した二量体を形成する。このPrx2二量体はチオレドキシニンによって還元され、元の単量体となる。近年、赤血球のPrx2の二量体形成と単量体への解離に約24時間周期の概日リズムが見つかった<sup>1</sup>。赤血球は分化の過程で脱核するため、Prx2のリズムは約24時間周期で変動する時計遺伝子による転写・翻訳を介した量的な増減のリズムではなく、酸化還元反応に由来する質的な状態遷移のサーカディアンリズムとして注目されている。

研究代表者は生物発光共鳴エネルギー移動 (Bioluminescence Resonance Energy Transfer: 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した。これまでの研究では、ウエスタンブロットにて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による10分おきの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。HEK293細胞のような有核の培養細胞ではチオレドキシニンレダクターゼの活性が高いため、二量体を形成したPrx2は速やかに単量体に解離してしまう。そこで、チオレドキシニンレダクターゼを2,4-ジニトロクロロベンゼンで阻害し、過酸化水素を分解するカタラーゼの活性を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。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できる。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。

哺乳動物の中枢時計である脳視床下部の視交差上核は光を受容した網膜からの求心性インパルスが同調刺激となり、約25時間周期の概日時計を地球の自転周期と同じ24時間にリセットしている。一方、末梢組織にも時計遺伝子は発現しており、肝細胞では食事により摂取したグルコースやアミノ酸が同調因子となる。このように、組織レベルの生物時計は固有の同調因子を手掛かりとして、自己の発振(振り子のタイミング)を補正している。では、赤血球の概日リズムの同調因子となる過酸化水素は個体内でいつ産生されるのか? 研究代表者は個体の酸素需要の増加により末梢の酸素分圧が低下するとヘモグロビンから酸素分子の解離が起きやすくなり、過酸化水素の元となるスーパーオキシドが増加することに注目している。すなわち、活動期の酸素消費量の増加がPrx2の二量体形成を招き、リズムが同調する発端となり、安静時に還元作用を持つ単量体に解離することで、活動期の酸化的環境に備えていると考えている。

活動期にはミトコンドリアの呼吸鎖においてもスーパーオキシドが増加することから、全身を巡る赤血球がその受け皿となっている可能性が指摘されている<sup>2</sup>。ヒトの赤血球は約25兆個あり、約100兆個からなる全ての体細胞の実に4分の1を占める。過酸化水素はスーパーオキシドより酸化力が弱いですが、細胞膜を透過する性質があることから、酸化応答におけるシグナル伝達のセカンドメッセンジャーとして作用することが示唆されている<sup>3</sup>。研究代表者は赤血球の概日リズムが全身の酸化還元リズムを反映していると仮定し、その同調機構を明らかにするため、健常人と同様の活動期を示すが、睡眠時に間欠的低酸素となり、ヘモグロビンから酸素分子の解離が起きやすくなっている睡眠時無呼吸症候群 (Sleep Apnea Syndrome: SAS) 患者の赤血球のリズムの測定を提案する。

間欠的低酸素は赤血球だけではなく、局所の組織のヒポキサンチンオキシダーゼや好中球のNADHオキシダーゼを活性化し、活性酸素種を増大させることがSASの動物モデルから明らかになっている<sup>4</sup>。研究代表者は間欠的低酸素によりPrx2の二量体形成のピークが日中の活動時から深夜の睡眠時にシフトしていると想定しており、このピークの位相差を検出できれば、個体内で赤血球の概日リズムを同調させている重要なメカニズムの存在を証明できると考えている。SAS患者の血液中の活性酸素種は経鼻的持続陽圧呼吸療法 (nasal Continuous Positive Airway Pressure: nCPAP) や口腔内スプリントを半年

～1年使用して、はじめて有意に低下することがわかっている<sup>5</sup>。つまり、覚醒後に酸素飽和度が戻ったとしても、睡眠時の酸化的な影響が患者の赤血球の概日リズムに色濃く残っている可能性が高い。睡眠時の間欠的低酸素に適応したSAS患者の赤血球の概日リズムと活動期に適応した健常人の赤血球の概日リズムの峻別は理論的に可能であると考える。

## 2. 研究の目的

Prx2の二量体形成リズムが全身の酸化還元リズムを反映していると仮定し、その同調機構を解明するため、睡眠時無呼吸症候群(SAS)患者の赤血球における二量体形成リズムを測定する。

## 3. 研究の方法

### (1) 成熟赤血球へのBRETプローブ導入法の確立

生物発光共鳴エネルギー移動(BRET)は生物発光を触媒するウミシイタケのルシフェラーゼRLuc(ドナー)と黄色蛍光タンパクEYFP(アクセプター)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RLucによる発光(480nm)がそのままEYFPを励起して、EYFPの黄色蛍光(530nm)を放出する。ドナーに蛍光色素を用いるFRETと比べ、BRETは励起光源を必要とせず、ドナーの蛍光色素の退色や自家蛍光の検出を回避できる利点がある。

研究代表者はこれまでHEK293細胞を用いた予備検討から、RLucの改変タンパクであるRLuc8をドナーに、EYFPの改変タンパクであるVenus cp173の循環置換体cp173をアクセプターに用いて、通常は数日で減衰してしまうBRETシグナルを1週間に亘りモニターできるように改良した。また、RLuc8やVenus cp173はPrx2のC末端よりもN末端に融合させると発現が安定し、二量体形成時にN末端同士はC末端同士よりも近位になるため、タンパク質間距離の6乗に反比例するBRETシグナルはより高強度のものが得られた。さらに、導入するプローブはドナーが内在性のPrx2やドナー自身とではなく、できるだけアクセプターと結合できるようにドナーの量比を減らすことが重要であった。

研究代表者は平成24年度～25年度の若手研究(B)「赤血球が刻む概日リズム測定系の開発」において、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DNAコンストラクトの発現がみられることから、網状赤血球にはリポソームだけではなく、RNAポリメラーゼも残存していると考え、ヒト末梢血の網状赤血球にBRETのDNAコンストラクトやmRNAを導入してきた。しかし、生理的条件下のヒト末梢血の網状赤血球は上述の病的なウサギ網状赤血球と比べ、かなり分化が進んでおり、十分なBRETプローブの発現が得られなかった。そこで、本実験では精製したBRETタンパクを成熟赤血球に導入することで、赤血球の概日リズムの測定を試みる。

血液はクエン酸ナトリウムを抗凝固剤としてヒト肘静脈より採血する。全血に含まれる白血球はLeukoCatch(Watson)フィルターに通すことで、99%が吸着除去できる。LeukoCatchの素通り画分を密度1.077g/mLのPercollに重層し、赤血球と血漿および血小板を遠心分離する。得られた高純度の成熟赤血球に精製したBRETプローブ2種を導入する。BRETプローブはPrx2のN末端にRLuc8を融合させたドナー(RLuc8-Prx2)とPrx2のN末端にVenus cp173を融合させたアクセプター(Venus cp173-Prx2)から構成され、それぞれのプローブはFreeStyle293F細胞にて発現させる。融合タンパクのN末端にはstrepタグを付加しており、融合タンパクはStrep-Tactinカラムにて精製する。タンパク質の発現宿主として大腸菌を第一選択としないのは、精製タンパクの夾雑物として大腸菌のLPSが混入すると、赤血球にわずかに混入している白血球を活性化させてスーパーオキシドを産生させる懸念があるためである。

BRETプローブの導入方法はエレクトロポレーションとリポフェクションを検討する。エレクトロポレーションは浮遊細胞に対する導入効率はよいが、細胞膜に穴を開けた際に、赤血球の内容物の一部が漏れ出る懸念がある。実際にエレクトロポレーションにて蛍光ラベルされたタンパク質(IgG)を赤血球に導入できることを確認している。一方、リポフェクションは脂質に細胞透過性ペプチドを加えたタンパク質導入試薬Xfect(Clontech)を用いる。実際にリポフェクションにおいてもエレクトロポレーションと同程度のタンパク質導入量を確認しているが、試薬の脂質と赤血球の細胞膜が融合すると、培地交換のための遠心分離で溶血しやすいことがわかっている。プローブの導入効率は蛍光顕微鏡で調べる。導入効率が低い場合には、Venus cp173の蛍光を指標にプローブが導入されている赤血球のみをセルソーターで分取する。

## (2) 赤血球の概日リズム測定系の酸素濃度の至適化

SAS患者のヘモグロビンの酸素飽和度は覚醒時の95%以上から睡眠時には70~80%に低下する。この値は肺動脈血の酸素分圧100mmHgの約半分に相当する。逆に、大気中の酸素分圧160mmHgは生体内よりも高いため、通常の炭酸ガス培養ではヘモグロビンから酸素分子が解離しにくい状態になっている。そこで、測定中の酸素濃度を制御することで、生理的な酸素条件下で赤血球の概日リズムを測定できるようにする。酸素濃度の調節はKronos Dioに酸素センサーを増設することで、窒素ガスによる任意の酸素濃度での測定が可能になる。BRETプローブ導入後の赤血球は導入されなかった余剰のBRETプローブを洗浄により除去した後、直ちにルシフェリンであるEnduREN (Promega)を加え、酸素濃度の制御が可能なインキュベーターと光電子増倍管を搭載したルミノメーターKronos Dio (ATTO)にてルシフェラーゼの発光とVenus cp173の蛍光を含む全体の発光を10分おきに一週間リアルタイムでモニターする。得られた蛍光を含む発光の経時データを24時間隣接平均でトレンドしたプロットから頂点位相(Prx2の二量体形成の極大値に相当する時刻)と周期を算出する。

ヒト検体は貴重であるため、予備検討には細胞株に由来する疑似赤血球も併用する。ヒト赤白血病K562細胞にBRETプローブを発現するDNAコンストラクトを遺伝子導入し、酪酸ナトリウムを作用させることで、赤芽球系細胞に分化させる。さらに、サイトカラシンBで脱核させることによって、Prx2のリズムにおける核の遺伝子発現の影響を除外する。

BRETの測定系に関しては、BRETを概日リズム測定に応用した米国Vanderbilt大学のCarl Hirschbiegel教授の指導を仰いでいる。発光データの解析については、国立精神・神経医療研究センター精神保健研究所精神生理研究部の肥田昌子室長の指導を仰いでいる。

## 4. 研究成果

### (1) 成熟赤血球へのBRETプローブタンパクの導入

申請時はBRETプローブタンパクを赤血球に直接導入する計画であったが、リポフェクションやエレクトロポレーションによるタンパク質導入では脂質融合や穿孔形成で細胞膜が脆弱になり、培地交換の遠心操作で容易に溶血し、数日で死滅してしまっただけでなく、リズムの解析には少なくとも6日間測定した発光データが必要であり、タンパク質導入は本測

定には不適であった。一方、培養細胞であるK562細胞にBRETのドナーとアクセプターをコードする遺伝子を共導入した場合は、細胞膜を修復する酵素遺伝子の発現によって損傷が回復するため、これを測定の対象とした。

### (2) バイシストロニック・コンストラクトの作製

これまでの研究では、ドナーとアクセプターをコードする2種類のBRETコンストラクトを遺伝子共導入していたため、双方のプロンプを同時に発現する細胞が制限されていた。そこで、遺伝子導入された細胞でBRETシグナルを確実に得るため、同一のプラスミド上にドナーとアクセプターをコードする遺伝子とその遺伝子の間にリボソーム内部進入部位(Internal Ribosomal Entry Site: IRES)を配置したバイシストロニック・コンストラクトを作製した(図1)。この改良によってBRETシグナルの強度と特異性が飛躍的に向上した。

### (3) siRNAによる内在性チオレドキシソレダクターゼのノックダウン

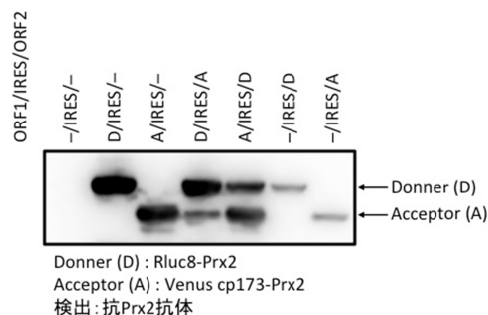


図1. バイシストロニック・ベクターによるBRETプローブの発現

培養細胞に発現する内在性チオレドキシソレダクターゼ(TrxR)は、酸化型チオレドキシソレダクターゼ(Trx)を還元する酵素である。そのため、TrxRが発現している細胞では、S-S結合によって形成されたPrx2二量体が還元型Trxによって素早く単量体に解離する(図2)。

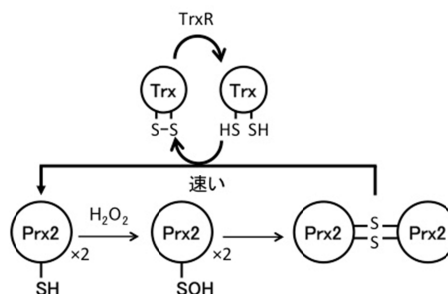


図2. 二量体形成と単量体への解離

実際に二量体形成に由来する BRET シグナルが得られる時間は大変短かった。そこで、二量体形成と単量体への解離の概日リズムを刻む赤血球の TrxR の発現をウエスタンブロットにより調べた(図3)。

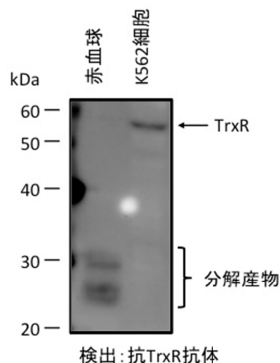


図3. 赤血球とK562細胞におけるTrxRの発現

その結果、完全長の TrxR の発現はなく、低分子量域に分解産物のみを確認した。赤血球では脱核によって、転写・翻訳が行われなため、脱核前に発現していた TrxR が次第に分解されていったと考える。一方、K562 細胞では完全長の発現がみられた。以上の結果から、K562 細胞の TrxR の発現レベルを赤血球並みに低下させることによって、より顕著な概日リズムが得られると考えた。そこで、TrxR の siRNA を K562 細胞に遺伝子導入し、内在性 TrxR をノックダウンした(図4)。

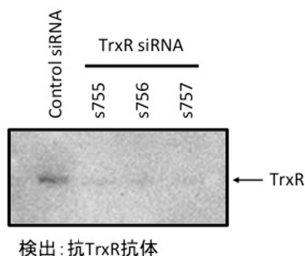


図4. K562細胞における内在性TrxRのノックダウン

#### (4) スルフィレドキシンをドナー、Prx2 をアクセプターとした BRET の構築

Prx2 二量体を構成しない Prx2 は、過酸化水素により Prx2 のシステイン残基(Cys-SH)が酸化(Cys-SOH)、あるいは過酸化(Cys-SO<sub>2</sub>H または Cys-SO<sub>3</sub>H)される。Cys-SO<sub>2</sub>H のスルフィレドキシンを有する過酸化型 Prx2 はスルフィレドキシニン(Srx)により、酸化型 Prx2 に還元される(図5)。

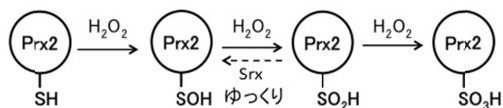


図5.システイン残基の酸化・過酸化

過酸化型 Prx2 には TrxR の作用が及ばないことから、研究代表者は Srx に着目し、BRET を用いた概日リズム測定系を構築した。Srx による過酸化型 Prx2 の還元反応は大変ゆっくり進むため、長時間に亘って BRET シグナルが持続した。Srx は Prx2 と近縁の Prx3 の過酸化型に対するアフィニティーが還元型の9倍高い<sup>7</sup>ことから、Srx の過酸化 Prx2 に対する指向性が BRET シグナルの増強に寄与したと考える。過酸化水素と Prx2 の反応は非常に速いため、TrxR をノックダウンして、Prx2 の酸化還元リズムを測定することで、内因性の過酸化水素の産生リズムを反映できるようにになった。

#### (5) サイトカラシン B による K562 細胞の脱核と温度サイクルによる擬似赤血球の同調

上記の細胞を酪酸ナトリウムで赤芽球系細胞に分化させた後、アクチンの重合阻害剤であるサイトカラシン B で脱核させた。この細胞を加熱冷却が可能なインキュベーター MIR-153 (SANYO) に入れ、32 12 時間、37 12 時間を1週間繰り返す温度サイクルで培養した。その結果、高温期の終わりに過酸化型 Prx2 のピークがくる明瞭な正弦波のリズムが得られた。同様に、生体内においても高体温期に産生される過酸化水素が Prx2 の酸化還元リズムを同調していると考えられる。以上の方法により作製した細胞を擬似赤血球として、以降の実験で使用した。

#### (6) 異なる位相のリズムの干渉

BRET プローブを導入し、37 で培養した擬似赤血球は、温度サイクルによる同調を行わなくとも自律的な概日リズムを生じる。この細胞に 32/37 サイクルで培養した異なる位相の擬似赤血球(BRET プローブを導入していない)を等量混合し、概日リズムを測定したところ、頂点位相が前進した。過酸化水素は細胞膜を透過するため、32/37 で培養した擬似赤血球が産生する過酸化水素のリズムが 37 で培養した擬似赤血球のリズムに干渉したと考える。この干渉の程度をさまざまな位相の組み合わせで詳細に測定することで、既知位相の擬似赤血球と被験者から採取した未知位相の赤血球を混合したときに得られる位相の変化から、被験者の赤血球の位相を算出できるかもしれない。平成 29~31 年度の科研費基盤研究(C)「抗酸化物質の飲み頃を探る」では、酸化還元リズムの干渉を手掛かりに被験者の赤血球の位相を推定する計画である。

#### (7) 赤血球の概日リズム測定系の酸素濃度

本研究では、生理的な酸素分圧下で赤血球の概日リズムを測定するため、ルミノメーターに酸素センサーを増設した。しかし、設置後に制御システムのエラーやセンサーの不良によって、低酸素測定を行うことが困難であった。現在もセンサーは故障中で、さらにチャンバー内から気体のリークがあり、5% CO<sub>2</sub>ではなく、100% air で測定を行なっている。平成 29~31 年度の科研費基盤研究(C)で故障を修理し、低酸素測定を行う予定である。

#### (8) 健常人と SAS 患者の赤血球の概日リズムの測定

本研究では、疑似赤血球の作製とその同調機構の解析に時間を費やし、実際に健常人と SAS 患者における赤血球の概日リズムを測定することができなかった。平成 29~31 年度の科研費基盤研究(C)では、本研究の成果である疑似赤血球を用いて、睡眠時無呼吸症候群の患者の赤血球の概日リズムを測定する計画である。

#### < 引用文献 >

Nature 469(7331):498-503,2011  
J Clin Invest 80(5):1486-1491,1987  
Free Radic Biol Med 28(3):463-499,2000  
Oxid Med Cell Longev 234631,2013  
Front Neurol 3:179,2012  
Blood 109(6):2611-2617,2007  
Mol Cell 59(4):651-663,2015

#### 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 1 件)

A Hida, Y Ohsawa, S Kitamura, K Nakazaki, N Ayabe, Y Motomura, K Matsui, M Kobayashi, A Usui, Y Inoue, H Kusanagi, Y Kamei, K Mishima: Evaluation of circadian phenotypes utilizing fibroblasts from patients with circadian rhythm sleep disorders, *Transl Psychiatry*, 査読あり, 7, e1106, 2017, 1-5, doi: 10.1038/tp.2017.75

#### 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・特任助教  
研究者番号: 50528429

##### (4) 研究協力者

肥田 昌子 (HIDA, Akiko)  
国立精神・神経医療研究センター・  
精神保健研究所 精神生理研究部・室長  
研究者番号: 20333354