

課題番号 2

体内時計の存在しない初期胚において時計分子が発現制御する遺伝子群の同定

[1] 組織

代表者：平山 順

(文教大学教育学部理科専修)

対応者：渡辺 数基

(東北大学加齢医学研究所)

研究費：物件費 20 万円

[2] 研究経過

体内時計は、睡眠、代謝、および血圧といった多様な生理機能に約 24 時間の周期変動（概日リズム）を作り出す生命現象である。この現象は、ヒトを含む地球上のほぼ全ての生物に内在し、「自然界の昼夜の変化に対し体内環境を最適化する」という重要な恒常性維持機構として機能する一方、加齢により徐々に破綻をきたしていくことが知られている。体内時計は生体の個々の細胞に内在する細胞時計により構成されるが、脊椎動物の細胞時計の分子実体は、CLOCK、BMAL、CRY、およびPER の時計蛋白質により構成される日周期性を有する転写機構である (Hermer SL et al., Annu Rev Cell Dev Biol. 2001)。脊椎動物のヒトとゼブラフィッシュの細胞時計において、CLOCK:BMAL 二量体蛋白質は Cry と Per 遺伝子の転写を活性化し、CRY と PER はこの二量体の転写能を抑制する。この転写の活性化と抑制が、約 24 時間の周期で繰り返される。その結果、CLOCK:BMAL 二量体蛋白質の転写活性（細胞時計の活性）に日周変動が形成され、さらに、細胞時計が標的とする時計標的遺伝子の発現およびその転写産物が制御する行動、代謝、体温といった多様な生命現象に概日リズムが形成される。

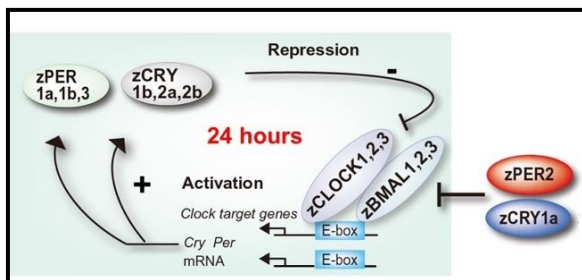


図 1: 細胞時計による制御機構

個々の細胞時計は光刺激がない場合でも、その活性に概日リズムを示すが、各細胞時計の周期の位相（時刻）は同調していない。光照射された細胞では、各細胞時計の活性が最小値まで低下することで互いに同じ時刻に同調する。申請者は、ゼブラフィッシュの細胞において、光依存的に細胞時計を同調させる分子として、ヒトで保存されている zCRY1a と zPER2 を見出している (Hirayama J et al., PNAS. 2007; Hirayama J et al., Cell Cycle. 2009)。細胞時計は生物の初期胚には存在せず、個体発生に伴い組織・器官を構成する個々の細胞内に形成されていくことが知られている。また小型魚類であるゼブラフィッシュは、ヒトと共通の細胞時計とその光同調機構を持ち、体内時計研究の有用なモデル生物として確立されている。これまでの先行論文より、細胞時計の光同調制御分子である zPer2 が、細胞時計が存在しない受精直後の受精卵において、光刺激がない状態でも発現していることが報告されている (Carr AJ et al., Nat Cell Biol. 2005; Tamai TK et al., Biochem Soc Trans. 2005)。この知見は、zPER2 が「細胞時計を光同調させる」という機能とは異なる生理機能を受精直後の細胞で担うことを示唆する。本研究は、受精直後の受精卵と細胞内環境が類似した未受精卵において zPer2 遺伝子破壊により、発現パターンが変化する遺伝子群を同定することを目的に設定した。

以下、研究活動状況の概要を記す。

本年度は、受け入れ研究者である渡辺助教と email や電話、web ミーティングを活用して、1 か月に 1 度程度の頻度で研究打ち合わせを行った。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

今年度はまず、zPer2 KO ゼブラフィッシュを作出した。zPer2 KO 及び野生型ゼブラフィッシュから未受精卵をサンプリングし、Total RNA を抽出した。その後 Illumina NovaSeq 6000 を用いてシーケンスを行なった。まず、取得したシーケンスリードに対し、FastQC を用いてシーケンスクオリティの検証を行い、次いで Trimmomatic によりアダプター配列および低クオリティリードの厳密な除去を施した。次に、フィルタリング済みの高精度リードを、HISAT2 を用いてリファレンスゲノムへ高効率にマッピングした。得られたマッ

ピングデータから、featureCounts を用いて各遺伝子領域に割り当てられた Raw リードカウントを算出し、発現量の定量的指標として活用した。さらに、サンプル間および遺伝子間での比較妥当性を確保するため、TPM (Transcripts Per Million) 各補正值を算出することで、発現変動解析に向けた定量的評価基盤を構築した。現在、得られた発現変動遺伝子に対して詳細な解析を行なっている。

（３－２）波及効果と発展性など

高齢者や日中に光を十分に浴びることができない家に引きこもりがちな要介護者では、細胞時計の光同調が不安定になり易いため、体内時計の破綻に起因する疾患が頻発する。当該共同研究に期待される研究成果は、数多くの疾患や生命活動に密接に関連している体内時計の制御機構を新しい視点から捉えるものであり、超高齢社会に突入した本邦が直面している問題に直結するものであるため、その波及効果は大きいものであると考えられる。

〔４〕成果資料

本共同利用共同研究の成果の一部は、現在論文投稿準備中であり、さらに成果がまとまり次第論文発表を行う予定である。