

# 遺伝子改変ゼブラフィッシュを用いた塩類の過剰摂取による 体内時計の乱れを誘発する分子の同定

平山 順

公立小松大学保健医療学部臨床工学科

## 概要

体内時計は、行動、睡眠、および代謝といった多様な生理機能に観察される約 24 時間の周期変動を作り出す生体の恒常性維持機構である。この異常は、精神(時差症候群, 不眠, うつ), 循環器(心筋梗塞, 高血圧), 呼吸器(喘息), および代謝(メタボリック症候群, 糖尿病)に関連する疾患を含む多くの病態に関与することが明らかになっている。最近, 細胞内の塩濃度の変化が, 体内時計を不安定にすることが示唆されている。本研究の目的は, 飼育水中の塩濃度の増加がヒトと共通の体内時計をもつゼブラフィッシュの行動の日周変動(行動リズム)の位相(時刻)を変化させる分子機構を解明することである。これまでの研究は, 体内時計の光依存的な形成を制御する候補因子として, 光誘導型の時計蛋白質 *zPER2* と *zCRY1a* を見出している<sup>16,17</sup>。また, 高塩濃度の飼育水で維持したゼブラフィッシュ胚においては, これらの発現が抑制されることを見出している。この背景より, 高塩濃度の飼育水で維持した稚魚の光による行動リズムの形成は低下することを見出しているが, この低下が *zPER2* と *zCRY1a* の発現の抑制に依存していると考えた。ゲノム編集技術により作出した *zPer2* と *zCry1a* 遺伝子の double knock out (*zPer2/zCry1a* DKO) 個体の行動を解析したところ, DKO 個体では, 体内時計の形成が阻害されることを確認した。以上より, これらの分子の発現の低下が, 高塩濃度条件が行動リズム形成を阻害する一因であることが強く支持された。以上に加えて, DKO ゼブラフィッシュから調整したサンプルを使用した解析により, 複数の高塩濃度条件下で体内時計の乱れを誘発し得る候補分子をコードする遺伝子を同定した。また, これらの分子をコードする遺伝子の KO ゼブラフィッシュのゲノム編集技術を用いた作出とそれらの解析を進めた。今後の研究を通じて, 作出した, または作出中の遺伝子改変個体の体内時計に関する表現型の解析を進め, 塩濃度の変化が体内時計を不安定する機構をさらに詳細に理解していきたい。

## 1. 研究の背景と目的

体内時計は、行動、睡眠、および代謝といった多様な生理機能に観察される約 24 時間の周期変動を作り出す生体の恒常性維持機構である<sup>1,2</sup>。「光を利用し自然界の昼夜の変化に対し、体内環境を最適化する」という重要な生理的な役割を担っている。この機構は、生物個体の組織を構成する個々の細胞に内在する日周性を持つ遺伝子発現のネガティブフィードバックループ(細胞時計)により制御される<sup>3,4,5</sup>。従って、動物では脳組織に内在する中枢時計と各末梢組織に内在する末梢時計からなる階層構

造系として存在する(図 1)。正常な体内時計の制御には、1)細胞時計の日周性が適切に維持されること、と 2)細胞時計が、外界の光情報を利用して組織内で互いに同じ時刻に同調し組織レベルの時計を形成することが必須である。

体内時計の異常は、精神(時差症候群, 不眠, うつ), 循環器(心筋梗塞, 高血圧), 呼吸器(喘息), および代謝(メタボリック症候群, 糖尿病)に関連する疾患を含む多くの病態に関与することが明らかになっている<sup>6,7</sup>。特に 2007 年には「体内時計の障害を伴う交替性勤務」が国連 WHO

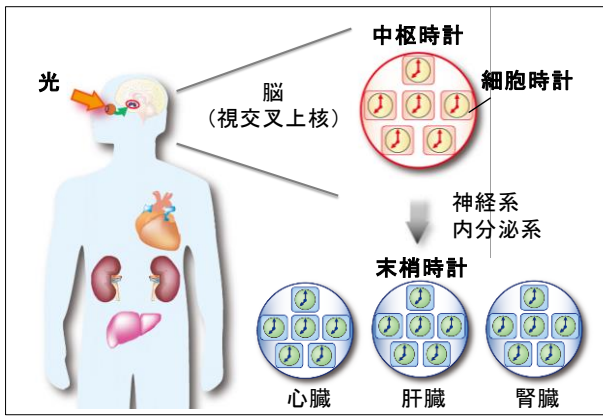


図 1: 体内時計の形成機構

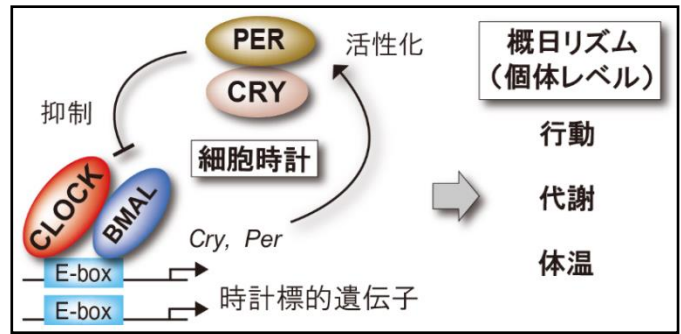


図 2: 細胞時計の分子実体

により発癌のリスク因子として提唱され、体内時計の異常が発癌に関連することが認知されている。

現在までに報告されている生物の細胞時計は、その構成因子(時計蛋白質)は生物種間で異なっているが、共通に転写・翻訳に依存したネガティブフィードバックループである<sup>8,9</sup>。特に脊椎動物においては、細胞時計は転写活性化因子 CLOCK, BMAL および転写抑制因子 CRY, PER の時計蛋白質により構成される(図 2)。CLOCK は BMAL と二量体を形成し *Cry* および *Per* 遺伝子の転写を活性化し、一方で CRY と PER は CLOCK:BMAL 二量体の転写能を抑制する。この転写の活性化と抑制は約 24 時間の周期で繰り返されるため細胞時計の標的遺伝子の発現および遺伝子産物の制御する行動、睡眠、代謝といった生理機能には日周変動が形成される。細胞時計による生理機能の日周期的な調節は、生体の恒常性維持に重要な役割を担っている。実際に、時計蛋白質をコードする遺伝子の変異マウスの解析およびヒト疾患の遺伝子変異データを用いた解析から、細胞時計の制御不全が、睡眠障害、代謝異常、躁鬱病、および癌といった疾患と関係することが報告されている<sup>10,11</sup>。

最近、細胞内の塩濃度の変化が細胞時計の制御を乱し、体内時計を不安定にすることが示唆されている。本研究の目的は、飼育水中の塩濃度の増加がヒトと共通の体内時計をもつゼブラフィッシュの行動の日周変動(行動リズム)の位相(時刻)を変化させる分子機構を解明することである。

## 2. 研究方法

### 体内時計の評価指標の設定の背景

ゼブラフィッシュの器官形成は 28°C で飼育下、受精後 2 日目までに完了し、稚魚は受精後 5 日目より行動を開始する(図 3A)。この行動の日周変動は、脳の松果体に存在する細胞時計により形成される。ゼブラフィッシュの細胞時計は、受精後 0 から 1 日目の初期胚には存在せず、器官形成が完了する受精後 2 から 4 日目の間に、松果体を含む各組織内の細胞に形成されていく<sup>12,13</sup>。各細胞に形成された細胞時計の周期の位相は外界の光に応答し互いに組織内で同調する。

また、20 から 33 時間と広く分布する周期は 26 時間に均一化する。この結果、松果体を含む組織・器官レベルの時計が機能的になり、行動などの概日リズム(行動リズム)が形成される(図 3B)。本研究では、この光による細胞時計の同調と行動リズムを指標にして、体内時計を評価した。

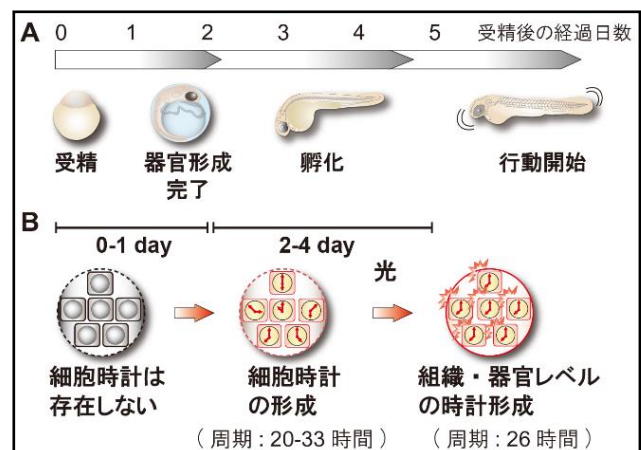


図 3: ゼブラフィッシュの発生と時計形成

## 2. 1 遺伝子改変ゼブラフィッシュの作出:

遺伝子のノックアウト(knock out; KO)ゼブラフィッシュをゲノム編集技術 CRISPR-Cas9 法を用いて作出した。まず, *in vitro* で合成した標的遺伝子を機能阻害する sgRNA と Cas9 mRNA を, 野生型の受精卵にインジェクションした。その胚を成魚まで育て, Germline に変異が生じた F0 founder を選定した。まず, この個体を選定し解析に用いた。また, F0 founder と野生型個体のかけ合わせることで系統を樹立し, 安定に KO 個体を解析に使用できるようにした。

## 2. 2 KO 個体の行動リズムの解析:

2.1 で作出した KO ゼブラフィッシュ稚魚の行動リズムを行動解析装置 DanioVision により評価した。この装置の下部は温度と照明条件を一定に保つインキュベーターである(図 4 左)<sup>14</sup>。ここに, 48 個体の稚魚を multi-well plate に入れ飼育する。機器の上部に設置された赤外線カメラで稚魚を追跡し, 経時的にそれらの 10 分間あたりの移動距離を同時測定した。この測定値より, 行動解析ソフト ActgramJ<sup>15</sup> によりアクトグラムを作成した(図 4 右)。このアクトグラムより, 再度 ActgramJ を使用し行動リズムの有無の判定を行った。行動リズムが観察された場合には, リズムの周期と位相を算出した。これにより, KO した候補分子が, 行動リズムの時刻変化を担うかを判定した。本解析には, 野生型個体で行動リズムが形成することを確認済みの「受精後常に暗い恒暗環境下で飼育した稚魚に, 受精後 5 日目に 12 時間の光照射を行う」という条件を用いた。

## 2. 3 バイオプローブを用いた細胞時計の解析:

本解析では, 作出した KO 個体の細胞時計を蛍光バイオプローブを用いて可視化した。細胞時計の動態を 1 細胞レベルで解析し, その周期と位相を評価した。これによ

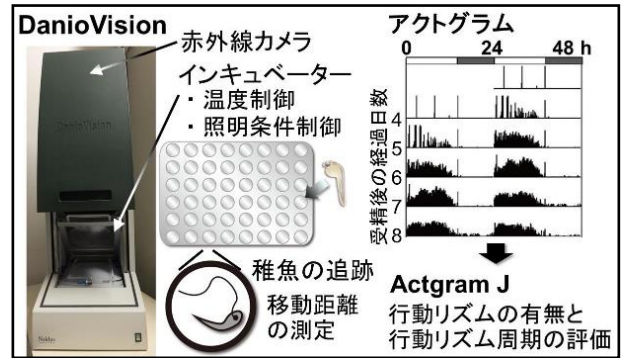


図 4: ゼブラフィッシュ稚魚の行動解析系

り作出した KO 個体の表現型が, 候補分子の機能阻害の細胞時計制御への影響に起因するかを判定した。

## 3. 研究結果

### 3. 1 細胞時計の光同調分子をコードする遺伝子の発現解析と機能阻害

これまでの研究は, ゼブラフィッシュ胚由来の培養細胞を用いた解析から, 上記の細胞時計の光同調を制御する候補因子として, 光誘導型の時計蛋白質 zPER2 と zCRY1a を見出している<sup>16,17</sup>。そこで, 先ず, これらの分子の発現パターンをゼブラフィッシュ胚で解析した。図 5 に示した通り, 培養細胞における発現と同様に, 光誘導されることを見出した。また, 高塩濃度の飼育水で維持したゼブラフィッシュ胚においては, この発現が抑制された(Not shown)。高塩濃度の飼育水で維持した稚魚の光による行動リズムの形成は低下することを見出しているがこの低下が zPER2 と zCRY1a の発現の抑制に依存していると考えた。ゲノム編集技術により作出した zPer2 と zCry1a 遺伝子の double knock out (zPer2/zCry1a DKO) 個体を用いた以下の通り解析を進めた。

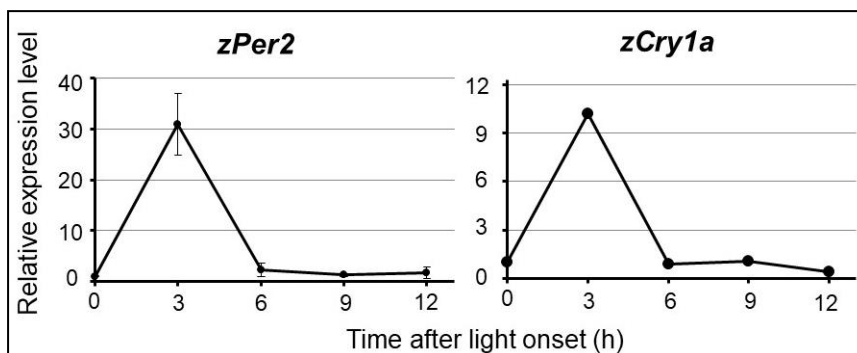


図 5: zPer2 と zCry1a 遺伝子の光依存的な発現

### 3. 2 ゼブラフィッシュ稚魚の行動解析と細胞時計の解析

まず、野生型個体に、3時間の光照射を行うと行動リズムが形成されることを確認した(図6)。

図中の黒いバーは行動量を示す。行動量は日中にあたる時間帯(Subjective day)に増加し、夜間にあたる時間帯(Subjective night)に減少している。次に、同様の条件の *zPer2/zCry1a* DKO 個体の行動リズムの形成率が低下することを見出した(図7)。以上より *zPER2* と *zCRY1a* が発生期の細胞時計の光同調を担うこと、およびこれらの発現の低下が、高塩濃度条件が行動リズム形成を阻害する一因であることが強く支持された。加えて、*zPer2/zCry1a* DKO 個体由来の細胞に存在する細胞時計は、光照射後の組織内同調が阻害されていることを確認した(Not shown)。以上より、高塩濃度処理は、細胞時計の組織内同調を阻害する可能性が示唆された。

### 3. 3 DKO 個体を用いた高塩濃度条件による体内時計の阻害に関わる候補遺伝子の同定とそれを機能阻害する遺伝子改変ゼブラフィッシュの作出

DKO ゼブラフィッシュから調整したサンプルを使用したマイクロアレイとパスウェイ解析により、複数の高塩濃度条件下で体内時計の乱れを誘発し得る候補分子をコードする遺伝子を同定した。また、本研究は、これらの遺伝子の KO ゼブラフィッシュのゲノム編集技術を用いた作出を進め、F0 ファンダーまたは F1 個体を準備した。さらに、一部の個体に関しては、行動リズムの評価を行ったが、明確な表現型が観察された個体を同定できていない。

## 4. 考察

ゼブラフィッシュは、ヒトと約 8 割共通した遺伝子構造を持ち、世界中でヒト疾患モデル生物として注目されている(図8)<sup>18</sup>。ノバルティスファーマなどの米国企業やシンガポールの研究所では、ゼブラフィッシュを用いた循環疾患や創薬に関する研究が行われている。また、日本や欧米では小型魚類を用いた個体発生を制御する分子とシグナル系の大規模スクリーニングが行われている。このようにゼブラフィッシュを医療へ活かそうという動きは、国内外で活発である。本研究では、ゼブラフィッシュのヒトと共通した体内時計を持つという特性<sup>19,20,21</sup>に注目し、高塩濃度という条件が体内時計の乱れを引き起こす機構の理解を目指した。

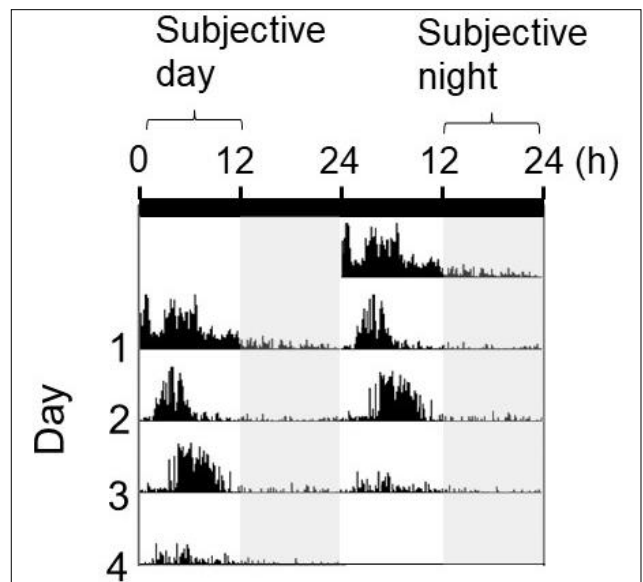


図6: 稚魚の光依存的な行動リズム形成

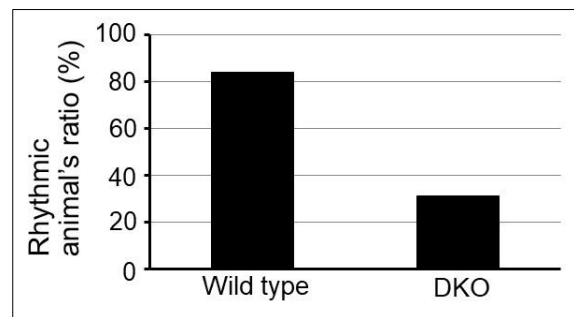


図7: WT と DKO 個体の行動リズム形成率

本研究は 1) 遺伝子改変ゼブラフィッシュを用いて、2) 稚魚の行動を指標として出生直後の概日リズムを評価すること、および 3) 生きた個体で発生期の細胞時計の形成過程を観察することにより、高塩濃度処理による体内時計の光依存的な形成の阻害に関与し得る分子を同定した。これらの分子をコードする遺伝子はヒトにおいても保存されている。体内時計は、その破綻が様々な疾患と関連することから、国内外の多くの研究者が注目している。特に、2017年のノーベル生理学・医学賞に、「体内時計を生み出す遺伝子の発見」が選定されている。本研究の成果には体内時計の異常と関連する高血圧症といった様々な疾患の予防ならびに治療戦略の構築への貢献が期待できる。



図 8: 国内外のゼブラフィッシュの医療への活用

## 5. 今後の課題

本研究では、複数の高塩濃度条件下で体内時計の乱れを誘発し得る候補分子をコードする遺伝子を同定し、それらの KO ゼブラフィッシュの F0 ファンダーまたは F1 個体を作出した。作出済みの KO 個体に関しては、十分な表現型の解析ができていない。特に、細胞時計の評価が不十分であるので、今後の研究で解析を進めたいと考えている。また、F0 ファンダーに関しては、掛け合わせにより、KO 個体を準備し、その行動リズムと細胞時計の評価を行っていきたいと考えている。

## 6. 謝辞

本研究は、公益財団法人ソルト・サイエンス研究財団による研究助成金により行われたものです。助成していただきましたソルト・サイエンス研究財団に深謝いたします。

## 7. 文献

1. Takahashi JS. Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock. *Nat Rev Genet.* 2017;18(3):164-79.
2. Okamura H. Clock genes in cell clocks: roles, actions, and mysteries. *J Biol Rhythms.* 2004;19(5):388-99.
3. Hirota T, Fukada Y. Resetting mechanism of central and peripheral circadian clocks in mammals. *Zool Sci.* 2004;21(4):359-68.
4. Dunlap JC. Molecular bases for circadian clocks. *Cell.* 1999;96(2):271-90.
5. Schibler U, Sassone-Corsi P. A web of circadian pacemakers. *Cell.* 2002;111(7):919-22.
6. King DP, Takahashi JS. Molecular genetics of circadian rhythms in mammals. *Annu Rev Neurosci.* 2000;23:713-42.
7. Sahar S, Sassone-Corsi P. Metabolism and cancer: the circadian clock connection. *Nat Rev Cancer.* 2009;9(12):886-96.
8. Hirayama J, Sassone-Corsi P. Structural and functional features of transcription factors controlling the circadian clock. *Curr Opin Genet Dev.* 2005;15(5):548-56.
9. Reppert SM, Weaver DR. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature.* 2002;418(6901):935-41.
10. Gallego M, Virshup DM. Post-translational modifications regulate the ticking of the circadian clock. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(2):139-48.
11. Uchida Y, Hirayama J, Nishina H. A common origin: signaling similarities in the regulation of the circadian clock and DNA damage responses. *Biol Pharm Bull.* 2010;33(4):535-44.
12. Kaneko M, Cahill GM. Light-dependent development of circadian gene expression in transgenic zebrafish. *PLoS biology.* 2005;3(2):e34.
13. Dekens MP, Whitmore D. Autonomous onset of the circadian clock in the zebrafish embryo. *Embo J.* 2008.

14. Hirayama J, Alifu Y, Hamabe R, Yamaguchi S, Tomita J, Maruyama Y, et al. The clock components *Period2*, *Cryptochrome1a*, and *Cryptochrome2a* function in establishing light-dependent behavioral rhythms and/or total activity levels in zebrafish. *Scientific reports*. 2019;9(1):196.
15. Schmid, B., Helfrich-Forster, C. & Yoshii, T. A new ImageJ plug-in "ActogramJ" for chronobiological analyses. *J Biol Rhythms* 26, 464-467, (2011).
16. Hirayama J, Cho S, Sassone-Corsi P. Circadian control by the reduction/oxidation pathway: catalase represses light-dependent clock gene expression in the zebrafish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(40):15747-52.
17. Hirayama J, Miyamura N, Uchida Y, Asaoka Y, Honda R, Sawanobori K, et al. Common light signaling pathways controlling DNA repair and circadian clock entrainment in zebrafish. *Cell Cycle*. 2009;8(17):2794-801.
18. Rihel J, Prober DA, Arvanites A, Lam K, Zimmerman S, Jang S, et al. Zebrafish behavioral profiling links drugs to biological targets and rest/wake regulation. *Science (New York, NY)*. 2010;327(5963):348-51.
19. Hirayama J, Kaneko M, Cardone L, Cahill G, Sassone-Corsi P. Analysis of circadian rhythms in zebrafish. *Methods in enzymology*. 2005;393:186-204.
20. Idda ML, Bertolucci C, Vallone D, Gothilf Y, Sanchez-Vazquez FJ, Foulkes NS. Circadian clocks: lessons from fish. *Prog Brain Res*. 2012;199:41-57.
21. Gandhi, A. V., Mosser, E. A., Oikonomou, G. & Prober, D. A. Melatonin is required for the circadian regulation of sleep. *Neuron* 85, 1193-1199, doi:10.1016/j.neuron.2015.02.016 (2015).

## Identification of the Mechanism Underlying the Circadian Clock's Disruption Induced by Abnormal Salt Concentration Using Genetically Modified Zebrafish

Jun Hirayama

Department of Clinical Engineering, Faculty of Health Sciences, Komatsu University

### Summary

The circadian clock generates behavioral rhythms to maximize an organism's physiological efficiency. The circadian clock is established by cell-autonomous oscillators called cellular clocks, which are present in every cell of a living organism. The synchronization of cellular clocks in tissues and organs by light is required to orchestrate the circadian clock at the organismal level. Previous studies have provided several lines of evidence that salt of high concentration have effect on circadian clock. Aim of the current study is to reveal the mechanism underlying the dysregulation of circadian clock induced by salt of high concentration by the use of zebrafish as experimental model animal.

Phase of cellular clocks are synchronized to establish functional circadian clocks at animal levels when treated with environmental stimuli, such as light. Thus, circadian rhythms in locomotor activity in zebrafish larva emerge only if embryos are exposed to environmental signals, with light being the most important signal. Current study tested behavior rhythm of zebrafish larvae to evaluate circadian clock at animal. The behavior of zebrafish were tracked by the DanioVision Tracking System (Noldus Information Technology). As the result, the current study identified the candidate molecules which are involved in circadian clock dysregulation induced by salt of high concentration. The disruption of genes coding them suppressed the light-dependent formation of circadian rhythm in behavior of zebrafish. It has been reported that stress factors induce dysregulation of circadian clocks. The disruption of circadian clocks can have a profound effect on animal health, and is linked to a variety of diseases, including sleep disorders, metabolic syndrome, and cancer. To understand how salt of high concentration induces dysregulation of circadian clocks would contribute to developing lifestyle intervention strategies to improve human health.