

平成26年4月25日

平成25年度共同研究報告書

京都大学再生医科学研究所長 殿

研究代表者（申請者）

所属：京都府立医科大学医学研究科

職名：教授

氏名：八木田 和弘

下記のとおり共同研究課題の実施結果について報告します。

記

1. 研究課題：キメラマウスを用いた概日リズム成立の階層縦断的解析
2. 再生医科学研究所共同研究者：近藤 玄 教授
3. 研究期間： 短期研究課題 ・ 長期研究課題
(平成25年4月1日～平成26年3月31日)

4. 研究経過及び研究成果：

我々は、概日時計の発生メカニズムの解明を目的として本共同研究を提案した。つまり、「概日リズム成立機構」を細胞-組織-個体の各階層を貫いた統合的解析手法で解き明かしていくことを目的としている。概日時計のリズム発振は受精卵や初期胚には見られず、出生後にはほぼ全ての体細胞で概日時計の発振が見られることから、哺乳類概日時計は発生・胎生期に形成されることが示唆されている。しかし、胎生期のどの時期にどのようなメカニズムで概日時計振動体が形成され、自律振動をはじめめるのかは現在まで分かっていない。そのため、我々は、ルシフェラーゼを発光レポーターとして用い、発生及び発達過程における概日リズムの成立状況を時空間的にリアルタイム・イメージングできる系を構築している。

本共同研究では、特に発生工学的手法を駆使して、概日リズムをモニターできる発光レポーターを有した様々な遺伝子改変 ES 細胞株を用いてキメラマウスを作出し、その発生期及び発達期における細胞-組織-臓器の各レベルにおける長期間リアルタイム・イメージング解析を行った。

その結果、現在までに、1) マウス embryo を用いた個体発生における概日時計の細胞

自律的発生についてキメラマウス胚を用いて解明、2) マウス大腿骨をモデルとした発達期間を通じた超長期器官培養による概日時計イメージング法の確立、などの成果を上げた。さらに、細胞分化異常による概日時計成立機構の破綻メカニズムなどの解明を進めており、具体的な分子機序についても明らかになってきている。

さらに、本共同研究の枠組みの中で、新たなゲノム編集技術である CRISPR/Cas9 システムを用い、概日時計発生異常と疾患との関連を統合的に解析するモデルマウスの作製系を構築した。これにより、今後、さらなる有機的な連携による共同研究へと発展していく基盤が整った。

5. 研究成果の公表

※発表論文リスト（掲載予定、プレプリントを含む。準備中も可）、学会発表等

・論文

1. Umemura Y, Yoshida J, Wada M, Tsuchiya Y, Minami Y, Watanabe H, Kondoh G, Takeda J, Inokawa H, Horie K, **Yagita K***. An in vitro ES cell-based clock recapitulation assay model identifies CK2a as an endogenous clock regulator. *PLoS One*, 8, e67241, 2013
(*Corresponding author)
2. Tsuchiya Y, Minami Y, Umemura Y, Takahashi T, Watanabe H, Kondoh G, Matsuishi T, **Yagita K**. Involvement of MeCP2 in the molecular and behavioral circadian rhythms in mice. (投稿予定)
3. Inada Y, Uchida H, Umemura Y, Nakamura W, Sakai T, Koike N, **Yagita K***. Cell and Tissue-autonomous development of the circadian clock in mouse embryos. *FEBS Lett.*, 588, 459-465, 2014. (*Corresponding author)
4. Okubo N, Minami Y, Fujiwara H, Umemura Y, Tsuchiya Y, Shirai Y, Oda R, Inokawa H, Kubo T, **Yagita K***. Prolonged Bioluminescence Monitoring in Mouse ex vivo Bone Culture Revealed Persistent Circadian Rhythms in Articular Cartilages and Growth Plates., *PLoS One*, 8, e78306, 2013 (*Corresponding author)
5. Koinuma S, Asakawa T, Nagano M, Furukawa K, Sujino M, Masumoto KH, Nakajima Y, Hashimoto S, **Yagita K**, Shigeyoshi Y. Regional circadian period difference in the suprachiasmatic nucleus of the mammalian circadian center., *Eur J Neurosci.*38, 2832-41, 2013
6. Engelen E, Janssens RC, **Yagita K**, Smits VA, van der Horst GT, Tamanini F. Mammalian TIMELESS is involved in period determination and DNA damage-dependent phase advancing of the circadian clock. *PLoS One*, 8, e56623, 2013

・学会発表

1. **Yagita K.**, Circadian Clock: A cell-autonomous time-keeping system in our body. *6th Asia Oceania Conference of Photobiology*, Sydney, 2013 (Invited speaker)
2. 八木田和弘, 「イメージング技術を用いた生体機能の Cutting Edge」, 関西実験動物研究会

30周年記念大会, 京都, Dec. 6. 2013 (シンポジスト)

3. 八木田和弘, : 「ES 細胞を用いた概日時計の in vitro 再現と分化制御機構との関連」, 第 36 回日本分子生物学会, 神戸, Dec. 5. 2013 (ワークショップ講演・オーガナイザー)
4. 八木田和弘, : 「MYC induced disruption of circadian clock development」, 第 86 回日本生化学会, 横浜, Sep. 11. 2013 (シンポジスト・オーガナイザー)
5. 八木田和弘, : 「体内時計はいつ動き出すか」, 第 14 回日本抗加齢医学会, 横浜, June. 30. 2013 (シンポジスト・オーガナイザー)
6. 八木田和弘, : 「ES cell-based in vitro evaluation system of circadian clock phenotypes in mammals」, 第 90 回日本生理学会大会, 東京, Mar. 27. 2013 (シンポジスト・オーガナイザー)