

ハイスループットスクリーニングを用いた 哺乳類概日時計の分子機構の研究

廣田 毅[✉]

カリフォルニア大学サンディエゴ校生物科学部門

KonopkaとBenzerが*per*変異体を報告してから40年になる。この間、遺伝学的・分子生物学的・生化学的な手法により、多くの時計遺伝子が発見されてきたが、未知の時計因子はまだ存在すると考えられる。哺乳類において、一部の神経細胞だけでなく、株化された培養細胞でさえも概日時計機能を持つことが明らかになり、細胞をモデルとした研究が可能となった。近年開発されたハイスループットスクリーニング技術を応用することにより、新規時計因子の同定を加速できるに違いない。

1. はじめに

ショウジョウバエの*per*変異体の発見 [1] に始まり、遺伝学的スクリーニングは成功を収め、概日時計の発振系を構成する遺伝子群が様々な生物種において同定されてきた。さらに、ショウジョウバエの*per*遺伝子との相同性をもとに哺乳類の*Per1*がクローニングされ [2]、両者の間で時計遺伝子が保存されていることが明らかにされた。哺乳類においては、輪回し行動の周期変化を示す変異体のスクリーニングにより、マウスから*Clock*および*Fbxl3*が、ハムスターから*CKIε*が発見された [3]。また、ヒト睡眠相前進症候群の家系解析から*Per2*および*CKIδ*が見出され [4]、CKIによるPERのリン酸化が時計の周期調節に重要であることが示された。このように、個体の周期変化に着目した表現型スクリーニングは時計因子の探索において非常に重要な役割を果たしてきた。一方、既知時計因子の制御機構を解析することからも新たな時計因子が多数同定されてきた。本稿ではまず、このようなメカニズム側からのアプローチについて、網羅的なスクリーニングを用いた手法を中心に概説する。さらに、近年の技術革新により、周期変化を指標としたハイスループットスクリーニングを細胞レベルで行うことが可能になった。この技術は大規模化合物ライブラリーやゲノムワイドRNAiライブラリーと組み合わせることにより、新規時計因子を探索するた

めの強力な手段と成り得る。本稿後半では、このフェノタイプ側からの新しいアプローチについて、筆者らの試みを中心に紹介する。

2. メカニズム側からの網羅的なアプローチ

既知の時計因子をもとに新たな時計因子を探索しようという試みにおいても、網羅的なスクリーニングは有効である。その例を、時計発振の重要なプロセスである(a)時計タンパク質との相互作用、(b)時計遺伝子の転写調節、および(c)時計タンパク質のリン酸化について、以下に挙げる。

(a) **タンパク質間相互作用**：結合因子の探索に古くから用いられているのがyeast two-hybridスクリーニングである。哺乳類の*Per1*および*Clock*がクローニングされて間もなく、yeast two-hybridスクリーニングによりCLOCKの結合因子としてBMAL1が同定され、両者のヘテロダイマーが*Per1*遺伝子の転写を活性化することが発見された [5]。同時期に発表されたショウジョウバエの一連の論文とあわせ、動物時計のfeedback loopモデルが確立された [6]。その後、yeast two-hybridスクリーニングからCLOCK結合因子としてCIPCも同定された [7]。一方、時計タンパク質を培養細胞に発現させてpull downし、質量分析によって結合因子を同定する試みもなされている。この方法から、PER1結合因子としてNONOとWDR5が [8]、

✉thirot@ucsd.edu

CRY1結合因子としてMybbp1aが [9]、BMAL1結合因子としてRACK1が [10] それぞれ見出された。さらに様々な研究者によって、yeast two-hybridスクリーニングやpull down-質量分析などの手法を用いたタンパク質間相互作用の解析がゲノムワイドに行われており、その結果がNCBI Geneデータベース (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>) にまとめられている。この情報は新規の時計タンパク質結合因子を探索するのに役立つであろう。

(b) 遺伝子転写調節：発現量がリズムを示し（すなわち時計機構に制御され）、さらに時計遺伝子の発現を調節するような転写因子として、DBP、E4BP4、REV-ERB、ROR、DEC、PPAR、TIEG1/KLF10などが同定された。これらの転写因子は標的遺伝子群の調節を介して代謝などの出力系にも関与する [11]。このようなサブグループを形成する転写因子の探索において、発現リズムを示す遺伝子群のマイクロアレイ解析による包括的な同定 [12, 13] が重要な役割を果たす。各転写因子の標的遺伝子群のChIP-seq解析による網羅的な同定 [14-16] と組み合わせることにより、新規のサブグループを含む概日時計の転写因子ネットワークが解明されるであろう。その階層性から、概日時計がいかに出力系遺伝子群のリズムを生み出すのかも明らかになるに違いない。また、これらの遺伝子発現（トランスクリプトーム）に加え、タンパク質発現（プロテオーム） [17-19] や代謝物質量（メタボローム） [20] のリズムを組み入れた、高次のネットワークモデルの構築が期待される。

(c) タンパク質リン酸化：質量分析を用いた解析から、培養細胞に発現させたPER2およびCRY1のリン酸化サイトが網羅的に同定されている [21, 22]。これらのサイトは細胞に内在する複数のキナーゼによってリン酸化されると考えられるが、その多くは不明である。リン酸化コンセンサス配列をもとにした解析から、CRY1のキナーゼとしてAMPKが [22]、CRY2のキナーゼとしてGSK-3 β が [23] 見出された。また、時計タンパク質を*in vitro*でリン酸化するキナーゼを細胞懸濁液中から生化学的に精製することで、BMAL1のキナーゼとしてCK2が [24]、CRY2のキナーゼとしてDYRK1Aが [25] 同定された。一方、キナーゼの機能解析からは、ERK2がCRY1/2を [26]、GSK-3 β およびCK2がPER2を [27-29] それぞれリン酸化することが見出された。これらのアプローチに加え、上述のタンパク質間相互作用のスクリーニングや、後述する時計

周期に影響を与えるキナーゼのスクリーニングが、新規の時計キナーゼの同定に役立つと期待できる。

3. フェノタイプ側からの新しいアプローチ：ハイスループットスクリーニング系の構築

リズム周期を指標とした表現型スクリーニングは非常に強力であるが、マウス個体を用いた遺伝学的方法は他のモデル生物（シアノバクテリア、アカパンカビ、シロイヌナズナ、およびショウジョウバエ）と比べると、世代間隔や個体サイズ、維持費などの問題から限界がある。一方、近年の技術革新、特にロボティクスの発展により、タンパク質や細胞を用いた様々なハイスループットスクリーニングが可能になっている。例えば筆者らが共同研究をしているノバルティス財団ゲノミクス研究所（GNF）では、化合物を大規模スクリーニングするための装置 [30]、およびsiRNAスクリーニングをゲノムワイドに行うための装置 [31] が独自に開発され、多様な生理現象を対象にハイスループットスクリーニングが行われている。なお、アメリカでは民間の研究所だけでなく、NIHの主導でスクリーニングセンターが各地に設立され、ハイスループットスクリーニングは国家プロジェクトとなっている。このようなハード面の整備に加え、哺乳類の培養細胞が時計遺伝子の発現リズムを示すこと [32]、そのリズムをルシフェラーゼなどのレポーターを用いて単一細胞レベルで経時的に測定できること [33, 34]、さらに時計遺伝子の変異は個々の細胞のリズムに影響を与えること [35] が見出され、培養細胞をモデルとした概日リズムの表現型スクリーニングを行うことが可能であると考えられた。

遺伝学における遺伝子変異の代わりに、化合物を用いて機能変化を導き、その作用機構を探る学問分野として、ケミカルバイオロジー（ケミカルジェネティクスとも呼ばれる）がある。ユニークな生理活性をもつ化合物は、生理現象の分子機構を解き明かすためのプローブとなるだけでなく、創薬の起点にもなり得る。筆者らは、概日時計の機能を大幅に変化させる新規の化合物を同定し、その化合物を用いて概日時計の分子機構に迫ることを目的に、大規模な化合物ライブラリーをハイスループットスクリーニングする系を構築した [36]。具体的には、*Bmal1*プロモーターにルシフェラーゼ遺伝子を連結したレポーターを持つヒトU2OS細胞を384ウェルプレート上で培養し、各ウェルに化合物を投与した後生物発光を2時間おきに3-4日間にわたって計

測するという作業を、GNFの化合物スクリーニング装置を用いて行った。それまでGNFで行われていたスクリーニングは、ある一時刻の状態しか測定しないものであったため、経時変化を追うための様々な改変が必要であり、また、他のスクリーニングの妨げにならないよう測定は週末に限られた。さらに、得られる膨大なデータから周期などのパラメーターを抽出するために、CellulaRhythmという解析プログラムを開発した。なお、現在はActimetrics社が開発したMultiCycleという、より多機能で使いやすいプログラムを用いている。スクリーニングの成否の鍵を握るのはアッセイ系の安定性であり、筆者らの系では、コントロール（化合物なし）の条件において384ウェルプレート内の97%以上のウェルの周期を平均値から±0.5時間以内に収めることに成功した。

4. フェノタイプ側からの新しいアプローチ：小規模化合物ライブラリーのスクリーニング

スクリーニング系の有効性を確認するため、筆者らはまず1,280種類の既知化合物からなる市販ライブラリー（LOPAC; Sigma）を用いて解析を行った [36]。LOPACは化合物スクリーニングのためのエントリーモデルであり、機能がよく解析されているため、当たりの化合物が見つかった時に作用機序を容易に推測できるという利点があるが、数が限られている。なお、機能がわかっている化合物を用いるこの方法は、遺伝学におけるリバースジェネティクスに相当する。化合物の終濃度7 μ Mでスクリーニングを行った結果、再現性よく0.5時間以上の周期変化を導く化合物を11種類見出した。この中には、時計の周期延長を導くことが他の生物・組織において既に示されていたCDKの阻害剤roscovitine [37]、JNKの阻害剤SP600125 [38]、p38の阻害剤SB203580 [39] のアナログSB202190、およびCK2の阻害剤DRB [40] が含まれていた。なお、これら4つの周期延長化合物は上田先生のNIH3T3細胞およびU2OS細胞を用いたLOPACスクリーニング [41] や八木田先生のrat-1細胞を用いたキナーゼ阻害剤のスクリーニング [42] でも見出されている。

筆者らはさらに、CDKとGSK-3の両者を阻害するindirubin-3'-oximeおよびkenpaulloneが周期短縮を導くことを見出した。GSK-3に特異的な阻害剤およびGSK-3 β に対するRNAiを用いた解析から、哺乳類の培養細胞においてはGSK-3の阻害が周期短縮を導くことを明らかにした。一方、多くの生物におい

て周期延長を導くことが知られているリチウムは、筆者らの系においても周期を延長させたことから、その効果はGSK-3以外の標的因子を介していると考えられる。以上の結果から、ハイスループットスクリーニング系の有効性が示されただけでなく、哺乳類末梢時計の周期調節におけるGSK-3の役割が明らかになった [36]。なお、LOPACの一次スクリーニングの周期データはPubChem (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) を介して公開している (AID: 2774)。

5. フェノタイプ側からの新しいアプローチ：大規模化合物ライブラリーのスクリーニング

大規模スクリーニングによって多様に富む化合物群の作用を解析することは、様々なタンパク質を標的とし得るため、小規模ライブラリーでは見出せない時計因子を見出せる可能性がある [43]。筆者らは、GNFが所有する大規模な合成化合物ライブラリー [44] を用いて、概日時計の周期を変化させる新規の化合物を探索している。機能未知の化合物を用いるこの方法は、遺伝学におけるフォワードジェネティクスに相当する。筆者らが構築した系は、1回の実験で60枚の384ウェルプレートを用い、約2万の化合物をスクリーニングすることができる。この系を用いて12万の化合物の効果を解析し、用量依存的に顕著な周期延長を導く化合物を複数見出した。そのひとつについて、スクリプス研究所化学科のSchultz研究室の協力を得て30種類以上のアナログを合成した結果、3倍強い活性をもつ新規化合物を見出し、これをlongdaysinと名付けた [45]。Longdaysinは上述のLOPACスクリーニングで同定したどの化合物よりも強い活性を示し、約20 μ Mの濃度で20時間もの周期延長を引き起こした。

機能未知の化合物の標的タンパク質を同定することは、遺伝学における原因遺伝子のクローニングと同様に手間のかかる作業であり、一般的には化合物に結合するタンパク質の生化学的な同定を試みる [46]。筆者らはlongdaysinにリンカーを結合する部位を探索し、周期延長活性を保つリンカー化合物を見出すことに成功した。このリンカー化合物にアガロスピーズを連結し、特異的に結合するタンパク質群を細胞懸濁液中からアフィニティー精製して質量分析で同定した。さらに、これら結合タンパク質をsiRNAを用いてノックダウンし、時計周期に与える影響を解析した結果、CKI δ 、CKI α およびERK2がlongdaysinの標的として周期を調節することを明

らかにした。なお、*in vitro*キナーゼアッセイにおいてlongdaysinはこれらのキナーゼの活性を阻害した。CKI δ 、CKI α およびERK2を同時にノックダウンしたところ、longdaysinに匹敵する周期延長が観察されたことから、longdaysinはこれらのキナーゼを同時に阻害することによって大きな周期延長を導くと考えられた。さらに、CKI α とERK2は共に時計タンパク質のうちPER1とPER2に結合すること、およびCKI α がCKI δ と同様にPER1をリン酸化して分解に導き、これらの反応がlongdaysinによって用量依存的に抑制されることを見出した。以上の解析から、CKI δ の重要性を再確認しただけでなく、CKI α およびERK2の周期調節における役割を見出し、これらキナーゼのネットワークによるPER1タンパク質の調節が時計周期の安定性に重要であることを明らかにした。Longdaysinは培養細胞だけでなく、マウス視交叉上核のスライス培養やゼブラフィッシュの個体においても顕著な周期延長効果を示し、さらなる改良を加えれば概日リズムの調節薬の候補になるかもしれない [45]。

6. フェノタイプ側からの新しいアプローチ： siRNAライブラリーのスクリーニング

RNAiを用いたアプローチは標的遺伝子が予めわかっているため、機能阻害がうまく働けば、化合物を用いたアプローチよりも直接的である。ショウジョウバエでは、発現リズムを示す133遺伝子に対するRNAiスクリーニングから、行動周期を変化させる新たな時計遺伝子として*cwo*が見出された [47]。また、S2培養細胞を用いた発現系において、CRYの光分解に影響を与える因子のゲノムワイドRNAiスクリーニングが行われている [48]。

ヒトU2OS細胞は高いトランスフェクション効率を示し、GNFにおいても細胞周期調節因子のゲノムワイドsiRNAスクリーニングなどに用いられてきた [49]。そこで筆者らは、siRNAスクリーニング装置 [31] を応用し、*Bmal1*レポーター U2OS細胞を用いて系の構築を試みた。384ウェルプレートを用いた場合、高いトランスフェクション効率を保ちつつ顕著なリズムを再現性よく得ることが非常に難しく、至適条件を見つけるまでに長い時間を要したが、最終的には40枚の384ウェルプレートを用い、約1万3千のsiRNAを1回の実験で解析することが可能になった [50]。ヒトの約2万2千遺伝子に対する市販のゲノムワイドsiRNAライブラリー (Qiagen) を用い、各遺伝子に対する4種類の

siRNAを、2種類ずつ混ぜた2つのプールとしてスクリーニングし、その結果をBioGPS (<http://biogps.gnf.org/circadian/>) にて公開した。このデータベースはsiRNAスクリーニングの結果だけでなく、遺伝子発現リズムや組織分布などのデータも各遺伝子について検索できる。

このスクリーニングによって見出した約300の時計調節遺伝子から、*Cry1*および*Cry2*に匹敵する強い周期効果を持つものをいくつか選び、そのノックダウンが既知時計遺伝子の発現量に与える影響を解析した。その結果、大部分において*Dbp*および*Rev-erba*の発現が低下していたことから、これらの因子はCLOCK-BMAL1の活性調節に関与すると考えられた。一方、約300の時計調節遺伝子を上述のNCBI Geneデータベース (項目2(a)を参照) およびGNFが所有するタンパク質間相互作用データベースで検索した結果から、新規の時計調節因子群の一部が直接的あるいは間接的に既知時計タンパク質に結合すると考えられた。また、DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>) を用いたパスウェイ解析からは、インスリンシグナル伝達と概日時計との相互関係が明らかになった。以上の解析から、新規の時計調節因子を多数見出し、それらがどのように時計機構に関与するのかを解明するための手がかりを示した [50]。なお、ドイツのKramer博士らはレンチウイルスを介したRNAiスクリーニングをU2OS細胞を用いて行い、キナーゼ、フォスファターゼおよびF-boxタンパク質の解析を完了した [28]。彼らのデータが公開されれば、筆者らのデータとの比較から、時計発振に関与するキナーゼに対するより精度の高い情報が得られるに違いない。

7. おわりに

留学をきっかけに、ハイスループットスクリーニングといういかにもアメリカらしい研究に足を踏み入れることになった。素晴らしいリソースに恵まれているからこそできた研究であり、Steve Kay教授をはじめ、チームの皆様は心より感謝したい。大規模スクリーニングは強力な手段であるが、気を付けられないといけないのが特異性である。例えば、LOPACスクリーニングから見出された周期延長を引き起こす化合物群は、CKI ϵ およびCKI δ をオフターゲットとして阻害することが報告されている [41]。また、臨床試験で用いられているキナーゼ阻害剤でさえも、それまで知られていなかった標的キ

ナーゼを持つことが明らかにされている [51]。これらの結果は、化合物を用いた研究において、その標的因子を正確に評価する必要性を示している。筆者らは、新規化合物longdaysinの標的タンパク質群を同定し、CKI δ 、CKI α およびERK2を同時に阻害することが大きな周期延長効果に重要であることを見出した。複数の標的タンパク質を持つことは、抗がん剤のsunitinibやsorafenibでも見られ、強い効果を示す化合物の特徴であると考えられる。一方、siRNAスクリーニングでは、同一遺伝子に対する2種類以上のsiRNAが同様の効果を示すことを指標としたが、様々な方法での検証が必要であろう。化合物スクリーニングとsiRNAスクリーニングは互いに相補しあうと考えられる。ハイスループットスクリーニングを用いたアプローチは始まったばかりである。得られた膨大な情報をいかに知識に変え、還元していくかが重要な課題であり、まさにこれからが面白いところであろう。

謝辞

この度、日本時間生物学会学術奨励賞を受賞できましたことを大変光栄に存じます。これまで、非常に多くの方々に支えられて研究を続けることができました。まず、長年に渡ってサポートして下さいました深田吉孝教授に心より感謝申し上げます。岡野俊行先生ならびに笠原和起先生には、学生時代よりご指導を頂き、とても感謝しております。また、共に研究を行ってくれた大学院生・学生の皆様にお礼申し上げます。なかでも、金尚宏さん、倉林伸博さん、辻崇裕さん、羽鳥恵さんは、それぞれ主体的に研究を行い、成果を挙げてくれました [18, 25, 52, 53]。さらに、留学の機会と素晴らしい研究環境を与えて下さっているSteve Kay教授に深く感謝申し上げます。最後に、共同研究を通じてお世話になった数多くの方々にこの場を借りてお礼申し上げます。

引用文献

- 1) Konopka RJ, Benzer S: Proc Natl Acad Sci U S A 68:2112-2116 (1971)
- 2) Tei H, Okamura H, Shigeyoshi Y, Fukuhara C, Ozawa R, Hirose M, Sakaki Y: Nature 389:512-516 (1997)
- 3) Takahashi JS, Shimomura K, Kumar V: Science 322:909-912 (2008)
- 4) Ptacek LJ, Jones CR, Fu YH: Cold Spring

- Harb Symp Quant Biol 72:273-277 (2007)
- 5) Gekakis N, Staknis D, Nguyen HB, Davis FC, Wilsbacher LD, King DP, Takahashi JS, Weitz CJ: Science 280:1564-1569 (1998)
- 6) Dunlap J: Science 280:1548-1549 (1998)
- 7) Zhao WN, Malinin N, Yang FC, Staknis D, Gekakis N, Maier B, Reischl S, Kramer A, Weitz CJ: Nat Cell Biol 9:268-275 (2007)
- 8) Brown SA, Ripperger J, Kadener S, Fleury-Olela F, Vilbois F, Rosbash M, Schibler U: Science 308:693-696 (2005)
- 9) Hara Y, Onishi Y, Oishi K, Miyazaki K, Fukamizu A, Ishida N: Nucleic Acids Res 37:1115-1126 (2009)
- 10) Robles MS, Boyault C, Knutti D, Padmanabhan K, Weitz CJ: Science 327:463-466 (2010)
- 11) Asher G, Schibler U: Cell Metab 13:125-137 (2011)
- 12) Hughes M, Deharo L, Pulivarthy SR, Gu J, Hayes K, Panda S, Hogenesch JB: Cold Spring Harb Symp Quant Biol 72:381-386 (2007)
- 13) Ukai H, Ueda HR: Annu Rev Physiol 72:579-603 (2010)
- 14) Hatanaka F, Matsubara C, Myung J, Yoritaka T, Kamimura N, Tsutsumi S, Kanai A, Suzuki Y, Sassone-Corsi P, Aburatani H, Sugano S, Takumi T: Mol Cell Biol 30:5636-5648 (2010)
- 15) Rey G, Cesbron F, Rougemont J, Reinke H, Brunner M, Naef F: PLoS Biol 9:e1000595 (2011)
- 16) Feng D, Liu T, Sun Z, Bugge A, Mullican SE, Alenghat T, Liu XS, Lazar MA: Science 331:1315-1319 (2011)
- 17) Reddy AB, Karp NA, Maywood ES, Sage EA, Deery M, O'Neill JS, Wong GK, Chesham J, Odell M, Lilley KS, Kyriacou CP, Hastings MH: Curr Biol 16:1107-1115 (2006)
- 18) Tsuji T, Hirota T, Takemori N, Komori N, Yoshitane H, Fukuda M, Matsumoto H, Fukada Y: Proteomics 7:3500-3508 (2007)
- 19) Deery MJ, Maywood ES, Chesham JE, Sladek M, Karp NA, Green EW, Charles PD, Reddy AB, Kyriacou CP, Lilley KS, Hastings MH: Curr Biol 19:2031-2036 (2009)
- 20) Minami Y, Kasukawa T, Kakazu Y, Iigo M, Sugimoto M, Ikeda S, Yasui A, van der Horst

- GT, Soga T, Ueda HR: *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:9890-9895 (2009)
- 21) Vanselow K, Vanselow JT, Westermark PO, Reischl S, Maier B, Korte T, Herrmann A, Herzel H, Schlosser A, Kramer A: *Genes Dev* 20:2660-2672 (2006)
 - 22) Lamia KA, Sachdeva UM, DiTacchio L, Williams EC, Alvarez JG, Egan DF, Vasquez DS, Juguilon H, Panda S, Shaw RJ, Thompson CB, Evans RM: *Science* 326:437-440 (2009)
 - 23) Harada Y, Sakai M, Kurabayashi N, Hirota T, Fukada Y: *J Biol Chem* 280:31714-31721 (2005)
 - 24) Tamaru T, Hirayama J, Isojima Y, Nagai K, Norioka S, Takamatsu K, Sassone-Corsi P: *Nat Struct Mol Biol* 16:446-448 (2009)
 - 25) Kurabayashi N, Hirota T, Sakai M, Sanada K, Fukada Y: *Mol Cell Biol* 30:1757-1768 (2010)
 - 26) Sanada K, Harada Y, Sakai M, Todo T, Fukada Y: *Genes Cells* 9:697-708 (2004)
 - 27) Iitaka C, Miyazaki K, Akaike T, Ishida N: *J Biol Chem* 280:29397-29402 (2005)
 - 28) Maier B, Wendt S, Vanselow JT, Wallach T, Reischl S, Oehmke S, Schlosser A, Kramer A: *Genes Dev* 23:708-718 (2009)
 - 29) Tsuchiya Y, Akashi M, Matsuda M, Goto K, Miyata Y, Node K, Nishida E: *Sci Signal* 2:ra26 (2009)
 - 30) Melnick JS, Janes J, Kim S, Chang JY, Sipes DG, Gunderson D, Jarnes L, Matzen JT, Garcia ME, Hood TL, Beigi R, Xia G, Harig RA, Asatryan H, Yan SF, Zhou Y, Gu XJ, Saadat A, Zhou V, King FJ, Shaw CM, Su AI, Downs R, Gray NS, Schultz PG, Warmuth M, Caldwell JS: *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:3153-3158 (2006)
 - 31) Konig R, Chiang CY, Tu BP, Yan SF, DeJesus PD, Romero A, Bergauer T, Orth A, Krueger U, Zhou Y, Chanda SK: *Nat Methods* 4:847-849 (2007)
 - 32) Balsalobre A, Damiola F, Schibler U: *Cell* 93:929-937 (1998)
 - 33) Nagoshi E, Saini C, Bauer C, Laroche T, Naef F, Schibler U: *Cell* 119:693-705 (2004)
 - 34) Welsh DK, Yoo SH, Liu AC, Takahashi JS, Kay SA: *Curr Biol* 14:2289-2295 (2004)
 - 35) Liu AC, Welsh DK, Ko CH, Tran HG, Zhang EE, Priest AA, Buhr ED, Singer O, Meeker K, Verma IM, Doyle FJ, 3rd, Takahashi JS, Kay SA: *Cell* 129:605-616 (2007)
 - 36) Hirota T, Lewis WG, Liu AC, Lee JW, Schultz PG, Kay SA: *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:20746-20751 (2008)
 - 37) Krucher NA, Meijer L, Roberts MH: *Cell Mol Neurobiol* 17:495-507 (1997)
 - 38) Chansard M, Molyneux P, Nomura K, Harrington ME, Fukuhara C: *Neuroscience* 145:812-823 (2007)
 - 39) Hayashi Y, Sanada K, Hirota T, Shimizu F, Fukada Y: *J Biol Chem* 278:25166-25171 (2003)
 - 40) Raju U, Koumenis C, Nunez-Regueiro M, Eskin A: *Science* 253:673-675 (1991)
 - 41) Isojima Y, Nakajima M, Ukai H, Fujishima H, Yamada RG, Masumoto KH, Kiuchi R, Ishida M, Ukai-Tadenuma M, Minami Y, Kito R, Nakao K, Kishimoto W, Yoo SH, Shimomura K, Takao T, Takano A, Kojima T, Nagai K, Sakaki Y, Takahashi JS, Ueda HR: *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:15744-15749 (2009)
 - 42) Yagita K, Yamanaka I, Koinuma S, Shigeyoshi Y, Uchiyama Y: *Acta Histochem Cytochem* 42:89-93 (2009)
 - 43) Hirota T, Kay SA: *Chem Biol* 16:921-927 (2009)
 - 44) Plouffe D, Brinker A, McNamara C, Henson K, Kato N, Kuhlen K, Nagle A, Adrian F, Matzen JT, Anderson P, Nam TG, Gray NS, Chatterjee A, Janes J, Yan SF, Trager R, Caldwell JS, Schultz PG, Zhou Y, Winzeler EA: *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:9059-9064 (2008)
 - 45) Hirota T, Lee JW, Lewis WG, Zhang EE, Breton G, Liu X, Garcia M, Peters EC, Etchegaray JP, Traver D, Schultz PG, Kay SA: *PLoS Biol* 8:e1000559 (2010)
 - 46) Rix U, Superti-Furga G: *Nat Chem Biol* 5:616-624 (2009)
 - 47) Matsumoto A, Ukai-Tadenuma M, Yamada RG, Houl J, Uno KD, Kasukawa T, Dauwalder B, Itoh TQ, Takahashi K, Ueda R, Hardin PE, Tanimura T, Ueda HR: *Genes Dev* 21:1687-1700 (2007)
 - 48) Sathyanarayanan S, Zheng X, Kumar S, Chen CH, Chen D, Hay B, Sehgal A: *Genes Dev* 22:1522-1533 (2008)

- 49) Mukherji M, Bell R, Supekova L, Wang Y, Orth AP, Batalov S, Miraglia L, Huesken D, Lange J, Martin C, Sahasrabudhe S, Reinhardt M, Natt F, Hall J, Mickanin C, Labow M, Chanda SK, Cho CY, Schultz PG: Proc Natl Acad Sci U S A 103:14819-14824 (2006)
- 50) Zhang EE, Liu AC, Hirota T, Miraglia LJ, Welch G, Pongsawakul PY, Liu X, Atwood A, Huss JW, 3rd, Janes J, Su AI, Hogenesch JB, Kay SA: Cell 139:199-210 (2009)
- 51) Fabian MA, Biggs WH, 3rd, Treiber DK, Atteridge CE, Azimioara MD, Benedetti MG, Carter TA, Ciceri P, Edeen PT, Floyd M, Ford JM, Galvin M, Gerlach JL, Grotzfeld RM, Herrgard S, Insko DE, Insko MA, Lai AG, Lelias JM, Mehta SA, Milanov ZV, Velasco AM, Wodicka LM, Patel HK, Zarrinkar PP, Lockhart DJ: Nat Biotechnol 23:329-336 (2005)
- 52) Kon N, Hirota T, Kawamoto T, Kato Y, Tsubota T, Fukada Y: Nat Cell Biol 10:1463-1469 (2008)
- 53) Hatori M, Hirota T, Iitsuka M, Kurabayashi N, Haraguchi S, Kokame K, Sato R, Nakai A, Miyata T, Tsutsui K, Fukada Y: Proc Natl Acad Sci U S A 108:4864-4869 (2011)