

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H01843

研究課題名(和文) SCNにおける時間発振機構の解明

研究課題名(英文) Circadian clock oscillation in the SCN

研究代表者

岡村 均 (OKAMURA, HITOSHI)

京都大学・薬学研究科・教授

研究者番号：60158813

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 30,900,000円

研究成果の概要(和文)：ショウジョウバエの時計遺伝子の転写翻訳フィードバックループの解明は、2017年ノーベル医学生理学賞に輝いた。我々は、1997年に哺乳類時計遺伝子Perのクローニングに成功し、さらに、哺乳類では時計遺伝子だけではリズム形成は不十分で、時計中枢SCNの時計細胞同士の神経伝達が必要であることを明らかにした。今回、SCNのGPR176 cAMP系がリズム発現の鍵物質であること、時差の数理モデル、PERの活性を制御するCk1dの選択的スプライシングによって生成するCK1D2が概日周期を司る事、哺乳類カルシトニン受容体が昼寝時の体温調節に関与する事、Per遺伝子が細胞の多倍体化に関与することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In *Drosophila*, it was elucidated that the transcription and translation feedback loop of the clock gene causes a circadian rhythm with a period of about 24 hours, and it won the 2017 Nobel Prize in Medicine and Physiology. We cloned mammalian Per gene in 1997, and clarified that the circadian oscillation was not generated simply clock genes by themselves, but needs intercellular neurotransmission among clock oscillating cells. In this research project, we identified GPR176-cAMP system as a key system to generate the rhythm, mathematical model of jet lag, alternative splicing of Ck1d gene for determining period length, mammalian calcitonin receptor in temperature regulation during nap, and role of Per for the formation of polyploidization.

研究分野：基盤・社会脳科学

キーワード：概日リズム 時計遺伝子 シグナル伝達 視交叉上核 Gタンパク質 細胞周期 時差 昼寝

1. 研究開始当初の背景

生体リズムは、5 億年前地球上に現れた生物が、地球の自転により起こる太陽エネルギーの昼夜変化に適応するため獲得した基本形質であり、ヒトにおいても約 24 時間周期で変動する生理的・生態行動が存在する。本研究においては、物質・分子・細胞・回路という現代の新しい考え方で、生体リズムの中核である視交叉上核 (suprachiasmatic nucleus: SCN) を研究の中心として遂行し、分子から行動までのリズム発振の分子メカニズムを解明する。

2. 研究の目的

SCN における時間発振機構の解明のため、我々は幅広い手法を用いて研究を遂行した。まず SCN から直接物質を同定する試みである。これまでの約 10 年間で、我々は SCN の遺伝子を網羅的にノックアウトするプロジェクト(SCN-Gene Project)にて、SCN 特有の物質的基盤を明らかにしてきた。2011 年我々は、SCN 特異的な G タンパク質シグナルを担う RGS16 が時計の下流でリズムに働くことを明らかにした (Nature Com 2011)。それ以来、RGS16 の上流にある G 蛋白質共役受容体 (GPCR) の同定に全力をあげてきた。その結果、SCN に強く発現する新規オーファン受容体分子 Gpr176 を同定した (Nature Com 2016)。さらにこの Gpr176 は、これまで過去によく解析されてきた他の GPCR とは異なり、Gz という特殊な G 蛋白質を介して下流にシグナルを伝えることを解明した。GPCR は創薬ターゲットとして優れた性質を持っているので、今後、この Gpr176 を標的とした、睡眠障害に対する新しい治療法や予防法の開発が期待される。

次に、SCN の約 24 時間の周期が如何に決まるかの研究である。これまでの時計遺伝子の研究ではリズムが起こることが説明可能であるが、その周期が何故 24 時間なのかは、解明されていない。今回我々は、時計タンパク質 PER のリン酸化酵素である Ck1d がその調節に重要であることを明らかにした。その機構は、選択的スプライシング機構にあり、一つの遺伝子 Ck1d から生み出される、正反対の機能を持つ新旧 2 つの酵素 Ck1d1 と Ck1d2 が、崩壊と安定と言う正反対の機構があり、このバランスが 24 時間周期を作ること明らかにした (PNAS 2018)。

SCN の機能発現としては、睡眠覚醒がきわめて重要である。今回は、昼寝に注目した。昼寝は従来から、生体リズムによるものと言う説の他、体内時計とは関係なく、単に脳機能が朝から数時間経って疲れるだけで起こる、という説があった。今回我々は、昼寝が SCN の細胞によって惹起されること、また、無脊椎動物も脊椎動物も共通の GPCR が担っていることを明らかにした (Genes Dev 2018)。

時計遺伝子の主振動体遺伝子である *Per* 遺伝子群は、SCN では *Per1* と *Per2* の 2 種類が働いているが、この両者の位相関係は良く分

かっていない。そこで我々は、無麻酔・無拘束下の動物の SCN から *Per1* と *Per2* の転写発現を luciferase 発光としてモニターできる遺伝子改変ラットを用いて、脳内に直接光ファイバーを挿入しリズム発振を検出し、*Per1* 転写が *Per2* 転写に先行してリズムを描くことを生体で初めて解明した (J Biol Rhyth 2016)。

SCN の直接の機能として時差がある。生体リズムは、多くの脳機能の中で数式で説明され、予測される稀有の機能である。このことを利用して、計算式にて時差の機構シミュレートし、時差当日の早起きが、時差症状を克服することを予測し、マウスの実験でそれを証明した (Sci Rep 2017)。

24 時間と言う時間周期で回る SCN の生体リズムに近い周期の生体現象に、細胞周期がある。ただ、この細胞周期と生体リズムとがどのように相関するかは、あまり良く分かっていない。今回、時計遺伝子 *Per* 遺伝子群が、細胞分裂が正しく行われることに必要であることを、肝細胞を使い明らかにした。*Per* 欠損は、増殖シグナル Erk1/2 を引き起こし、細胞質の分裂が失敗し、核が多倍体化 polyploidy した巨大細胞となる分子機構を初めて明らかにした。Polyploidy は 100 年以上前から良く知られた生命現象であるが、その分子機構が明らかとなるのは、これが初めてである (Nature Com 2017)。

生体リズムは、時計遺伝子だけでなく、多くの神経伝達物質や生理活性物質も関与する。そのため、生体リズムとアセチルコリンの作用の研究 (J Biol Rhythm 2017)、ATP の研究 (Sci Rep 2018)、質量分析計によるアミノ酸リズムの解析 (J Biol Rhythm 2017) などを行った。

3. 研究の方法

用いた手法は、物質、生理、病態など多岐にわたる。具体的には、質量分析計による解析、遺伝子の網羅的解析 (SCN-Gene Project)、RNA トランスクリプト解析、ノックアウトマウス解析、CRISPR-Cas9 細胞リズム解析、さらに計算科学によるシミュレーションを駆使して研究を進める。

4. 研究成果

(1) 生体リズムを調整する新規 G タンパク質 Gz 共役の GPCR である GPR176 の同定 (Nature Communications, 7, 10583, 2016, doi: 10.1038/ncomms10583)

GPR176 は、SCN に強く発現し、遺伝子欠損によってマウス個体の活動リズムが変調した。細胞実験に置いて、GPR176 の発現誘導により細胞内 cAMP 濃度は低下したが、通常の GPCR と異なり、百日咳毒素テトロドトキシンには非感受性であった。cAMP 低下は、GPR176 の siRNA 及び、ドミナントネガティブ Gz 阻害により消失した。さらに、通常 Gz を発現しない NIH3T3 細胞へ Gz 導入をすると、cAMP が低下することが分かり、GPR176

が Gz と共役して cAMP を低下させることが分かった。今後、この受容体のリガンドを同定し、全く新しいリズム創薬に基づいた、睡眠薬の開発が望まれる。

(2) 体内リズムの 24 時間周期を決めるタンパク質を発見 - 家族性睡眠相前進症候群 (FASPS) の分子機構の解明 -

(PNAS, May 21, 2018 published on line, doi: 10.1073/pnas.1721371115)

2017 年のノーベル賞受賞対象にもなった時計遺伝子の発見は、ヒトを含む生物では、身体の時間を刻む機構が、遺伝子に書き込まれていることを明らかにした。時計遺伝子からできる時計タンパク質 PER が、時計遺伝子自身を抑制するフィードバックループが体内リズムを形成することを解明した。ただ、現在でも、なぜ「24 時間」という周期が決まっているのかは分かっていません。

今回我々は、時計タンパク質 PER を安定させる酵素が、一つの遺伝子 Ck1d から生み出される、正反対の機能を持つ新旧 2 つの酵素 Ck1d1 と Ck1d2 が、時計タンパク質 PER を安定させることを明らかにした。今回の発見は、遺伝性の家族性睡眠相前進症候群 (Familial Advanced Sleep Phase Syndrome: FASPS) の病態を世界で初めて解明したもので、睡眠リズムの研究に突破口を開いたものと期待される。

(3) マウスとハエに共通にみられる体温の日内リズムを制御機構：脳内のカルシトニン受容体を介した体温制御の仕組み

(Genes & Development, 32, 140-155, 2018, doi: 10.1101/gad.307884.117)

恒温動物は、恒温といっても、四六時中体温が一定ではなく、ヒトもマウスも体温には顕著な日周リズムが見られる。体温は一日の中でも活発な活動期に合わせて上昇し、休息期には低下する。外気温には左右されないが、恒温動物には自律的に体温の日内制御を行う仕組みがある。

一方、小型の変温動物であるハエは、非常に敏感に外気温に影響され、自らが至適な温度環境下へ移動し、外部からの熱を取り込むことで体温を制御している。一日の中でも活発な活動期にはハエは高い温度環境を好み、反対に休息期には低い温度を好む。このような温度選択リズムによってハエは体温のリズムを生み出す。このように、恒温動物と変温動物とも、一日の時間帯に応じて体温を上げ下げするという点では共通するが、その体温制御の仕組みは全く知られていなかった。

我々は、マウス・ハエどちらの生物種においても体温の日内制御に関与する共通の G 蛋白質共役受容体であるカルシトニン受容体ファミリーが関与することを明らかにした。哺乳類ではカルシトニン受容体はリズム中枢 SCN の一部の細胞に大量に存在する。進

化的に保存された動物の体温制御のメカニズムとその生物学的意義の解明に向け、最初の突破口を開く重要な所見を提供した。

(4) 肝細胞の分裂に必須の時計遺伝子：時計遺伝子 *Period* 欠損で肝細胞が多倍体化 (Nature Communications, 8, 2238, 2017. doi: 10.1038/s41467-017-02207-7.)

体内時間を生み出す時計遺伝子 *Per* が、肝細胞の分裂と増殖に必要であり、この遺伝子がないと増殖シグナル *Erk1/2* が低下し細胞質分裂が失敗。核が大きな巨大細胞となることを初めて明らかにした。

食事、睡眠などのリズムカルな定常的日常生活は、健康的で安全な生活を営む上での基盤である。しかし、21 世紀に入って長時間労働やシフトワークの従事者が急増し、古来より人類が守ってきた概日リズムシステムが生活習慣の変化により乱れ、疾病の誘因ともなることが懸念されている。

我々はこれまでの研究で哺乳類の時計遺伝子の同定や、身体の全ての細胞がリズムを刻んでいることを発見し、なぜ体の細胞がリズムを刻んでいるのか、その解明に取り組んできた。今回、肝細胞にある時計遺伝子 *Per* が、細胞の分裂と増殖を正常に行うのに必要な因子であり、肝細胞の多倍体化 polyploidy に関与していることを解明した。肝細胞のターンオーバーに伴う多倍体化は、老化や肝炎、肝硬変などで加速することは、100 年も前から知られていた有名な現象であるが、その分子機構は不明であった。今回の研究で、多倍体化に時計遺伝子が必要であることが明らかになり、細胞を大きくしたり、小さくしたりする因子も解明された。今後は肝疾患の治療などに役立つことが期待される。

(5) 出発当日の早起きで時差ボケを軽減～シフトワーカーのからだに優しい勤務スケジュールの作成に期待～ (Scientific Reports, 7, 46702, 2017. doi: 10.1038/srep46702.)

時差ボケは、時差によって環境の明暗周期が変わったときに、体内時計のリズムが乱れることで起こる。体内時計は体内の細胞のどこにでもあるが、それらを束ねるのが時計中枢 SCN の時計細胞である。中枢時計細胞はそれぞれ約 24 時間周期で遺伝子発現を繰り返しており、リズムを合わせて体内時計を機能させている。我々は、このリズム集団のを数式で表し、時差が与えられた際のリズム予測を行った。

その結果、現地時間が遅れる (1 日が長くなる) 時差では、時計細胞のリズムは集団でよくそろったままで、数日で昼夜のリズムに合わせることができた。一方、現地時間が早まる (1 日が短くなる) 時差では、集団のリズムがバラバラになり、昼夜のリズムにもなかなかタイミングを合わせることができず、時差ボケからの回復が長引いた。

これらの結果から、時計細胞のリズムがバラバラになることが時差ボケの大きな原因

と考えられる。時差を小分けにして与えた場合をシミュレーションすると、リズムはバラバラにならず、時差からの回復が数日早まることが予測された。マウスで実際実験すると、この予測通りになり証明された。これは、現地時間が早まる東向きの旅行時であれば、当日に早起きし、受ける時差を短くすると、時差の症状が軽減される。今後、実際の、シフト労働者の負担を軽減させるスケジュール作りに応用できると期待される。

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 40 件)

*Fustin JM, Tanaka R, Santo Y, Yamada H, Takahashi Y, Araki M, Nakao K, Aizawa S, Kobayashi M, Obrietan K, Tsujimoto G, *Okamura H: Two Ck1 δ transcripts regulated by m6A methylation code for two antagonistic kinases in the control of the circadian clock. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2018 May 21, published on line. 査読有
* 読売・毎日・京都・日刊工業新聞掲載
Narasimamurthy R, Hunt SR, Lu Y, Fustin JM, Okamura H, Partch CL, Forger DB, Kim JK, *Virshup DM. CK1 δ/ϵ protein kinase primes the PER2 circadian phosphoswitch. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2018 May 21, published on line. 査読有
Goda T, Doi M, Umezaki Y, Murai I, Shimatani H, Chu ML, Nguyen VH, *Okamura H, *Hamada FN. Calcitonin receptors are ancient modulators for rhythms of preferential temperature in insects and body temperature in mammals. *Genes Dev*. 32:140-155, 2018. 査読有
* * 読売・毎日・京都・日刊工業新聞掲載
Sengiku A, Ueda M, Kono J, Sano T, Nishikawa N, Kunisue S, Tsujihana K, Liou LS, Kanematsu A, Shimba S, Doi M, Okamura H, Ogawa O, *Negoro H. Circadian coordination of ATP release in the urothelium via connexin43 hemichannels. *Sci. Rep.* 8:1996, 2018. 査読有
Tainaka M, *Doi M, Inoue Y, Murai I, Okamura H. Circadian PER2 protein oscillations do not persist in cycloheximide-treated mouse embryonic fibroblasts in culture. *Chronobiol. Int.* 35:132-136, 2018. 査読有
Ito K, Yasuda M, Maeda Y, Fustin JM, *Yamaguchi Y, Kono Y, Negoro H, Kanematsu A, Ogawa O, Doi M, *Okamura H. Circadian rhythms of micturition during jet lag. *Biomed Res.* 39:57-63, 2018. 査読有

Chen Y, *Yamaguchi Y, Suzuki T, Doi M, *Okamura H: Effect of daily light on c-Fos expression in the suprachiasmatic nucleus under jet lag conditions. *Acta Histochem. Cytochem.*, 51:73-80, 2018. 査読有
Chao HW, Doi M, Fustin JM, Chen H, Murase K, Maeda Y, Hayashi H, Tanaka R, Sugawa M, Mizukuchi N, Yamaguchi Y, Yasunaga J, Matsuoka M, Sakai M, Matsumoto M, Hamada S, *Okamura H: A molecular mechanism of hepatic polyploidy unmasked by circadian dysregulation of Mkp1. *Nature Communications*, 8:2238, 2017. 査読有
* 読売・日刊工業新聞掲載
*Kori H, Yamaguchi Y, Okamura H: Accelerating recovery from jet lag: prediction from a multioscillator model and its experimental confirmation in model animals. *Sci. Rep.* 7: 46702, 2017. 査読有
Oishi Y, Hayashi S, Isagawa T, Oshima M, Iwama A, Shimba S, Okamura H, *Manabe I: Bmal1 regulates inflammatory responses in macrophages by modulating enhancer RNA transcription. *Sci. Rep.* 7: 7086, 2017. 査読有
Dojo K, Yamaguchi Y, Fustin JM, Doi M, Kobayashi M, *Okamura H: Carbachol induces phase dependent phase shifts of Per1 transcription rhythms in cultured suprachiasmatic nucleus slices. *J. Biol. Rhythms*, 32: 101-108, 2017. 査読有
Goto K, *Doi M, Wang T, Kunisue S, Murai I, Okamura H: G-protein-coupled receptor signaling through Gpr176, Gz, and RGS16 tunes time in the center of the circadian clock. *Endocr J*, 29: 571-579, 2017. 査読有
Takei D, Nishi M, Fukada S, Doi M, Okamura H, Uezumi A, Zhang L, Yoshida M, Miyazato M, Ichimura A, *Takeshima H. Gm7325 is MyoD-dependently expressed in activated muscle satellite cells. *Biomed Res.* 38:215-219, 2017. 査読有
*Doi M, Murai I, Kunisue S, Setsu G, Uchio N, Tanaka R, Kobayashi S, Shimatani H, Hayashi H, Chao HW, Nakagawa Y, Takahashi Y, Hotta Y, Yasunaga J, Matsuoka M, Hastings MH, Kiyonari H, *Okamura H: Gpr176 is a Gz-linked orphan G-protein-coupled receptor that sets the pace of circadian behaviour. *Nature Communications*, 7: 10583, 2016. 査読有
* 産経・京都・日刊工業新聞掲載
*Yamaguchi Y, Okada K, Mizuno T, Ota T, Yamada H, Doi M, Kobayashi M, Tei H, Shigeyoshi Y, *Okamura H: Real-time recording of circadian Per1 and Per2

expression in the suprachiasmatic nucleus of freely moving rats. *J. Biol. Rhythms*, 31: 108-111, 2016. 査読有

*Okamura H, Doi M, Goto K, Kojima R: Clock genes and salt-sensitive hypertension: A new type of aldosterone-synthesizing enzyme controlled by the circadian clock and angiotensin II. *Hypertens Res*, 39: 681-687, 2016. 査読有

Konosu-Fukaya S, Nakamura Y, Satoh F, Felizola SJ, Maekawa T, Ono Y, Morimoto R, Ise K, Takeda KI, Katsu K, Fujishima F, Kasajima A, Watanabe M, Arai Y, Gomez-Sanchez EP, Gomez-Sanchez CE, Doi M, Okamura H, *Sasano H: β -hydroxysteroid dehydrogenase isoforms in human aldosterone-producing adenoma. *Mol Cell Endocrinol*, 408: 205-212, 2015. 査読有

*Okamura H, Yasuda M, Fustin JM, Doi M. Hypertension caused by disruption of the circadian system: Blood pressure regulation at multiple levels. In **Circadian Medicine**, pp135-142, Ed by Christopher S. Colwell, 376 pages, Wiley-Blackwell, Hoboken, New Jersey, 2015. 査読無

Yarimizu D, *Doi M, Ota T, Okamura H: Stimulus-selective induction of the orphan nuclear receptor NGFIB underlies different influences of angiotensin II and potassium on the human adrenal gland zona glomerulosa-specific β -HSD isoform gene expression in adrenocortical H295R cells. *Endocr J*, 62: 765-776, 2015. 査読有

【学会発表】(計 81 件)

Okamura H: (Invited Speaker) Molecular mechanism of circadian clock in mammals: past and future, 8th Niigata BRI International Symposium 2018, February 10-12, 2018, Niigata, Japan.

Okamura H: (Plenary Lecture: Video Lecture) Clock on Clocks: Integration of mammalian circadian rhythms, in XV European Biological Rhythms Society Congress, July 31, 2017, Amsterdam, Netherlands.

Okamura H: (Invited Speaker) New cellular regulations of the circadian clock in mammals, in Time of Our Life: Circadian Clock Mechanisms, July 14, 2017, Hanover, NH, USA.

Okamura H: (Special Lecture) Circadian rhythms, vasopressin and diseases. July 1, 2016, ICCS 2016 (International Children's Continnence Society (ICCS) 2016), Kyoto (Hotel Granvia Kyoto), Japan.

Okamura H: (Luncheon Seminar; invited speaker) New cellular regulations of the

circadian clock from cell surface receptors to RNA metabolism, RNA2016 (The 2016 joint annual meeting of the RNA Society and the RNA Society of Japan) June 29 (June 28 - July 2.), 2016, Kyoto (Kyoto International Conference Center), Japan.

Okamura H: (Invited Lecture) Orphan GPCR and non-transcriptional control of the circadian rhythms in the SCN, 3 May 2016, Cam-Su GRC, Soochow Univ, Soochow, China.

Doi M, Okamura H: Identification of a new class of GPCR signalling that tunes the central clock, Asian Forum on Chronobiology 2015, 7-9 September, Sapporo (Keio-Plaza), Japan.

Okamura H: Cell Clock and Cell Cycle: Ten years of Progress, The 4th International Symposium on Molecular Clock, 27 March, 2015, Kyoto (Shiran-Kaikan), Japan.

Okamura H: Cell Clock and Cell Cycle, International Symposium on RNA and Clock 2015, 25-26 March, 2015, Awaji Awaji (Yumebutai Intl Conf Cent), Japan.

【その他】

受賞

岡村 均 第 56 回 東レ科学技術賞
東レ科学振興会 日本工業倶楽部
(東京) 2015/3/15

報道

1. ラジオ NIKKEI「小児科診療 Up-to-DATE」どこまでわかったのか時計遺伝子 (岡村均), 2015 年 10 月 21 日 21 時-21 時 15 分
2. 京都新聞 体内時計調律 新タンパク質 安全な睡眠薬開発に期待 2016/2/18
3. 日刊工業新聞 体内時計調節たんぱく質 発見 京大 生活習慣病治療に道 2016/2/23
4. 産経新聞 体内時計に影響 遺伝子確認 京大チーム 新たな睡眠薬の候補物質研究へ 2016/3/1
5. 日経産業新聞 体内時計調節の受容体 京大 睡眠薬の副作用抑制に道 2016/2/18

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡村 均(OKAMURA HITOSHI)
京都大学・薬学研究科・教授
研究者番号: 60158813

(2) 研究連携者

山口 賀章(YAMAGUCHI YOSHIAKI)
京都大学・薬学研究科・助教
研究者番号: 30467427 (H21-H22)

ジャンミッシェル フスタ(JEAN-MICHEL FUSTIN) 京都大学・薬学研究科・特定講師、研究者番号: 50711818