

**平成28年度科学研究費助成事業（特別推進研究）自己評価書**  
**〔追跡評価用〕**

平成28年4月20日現在

<b>研究代表者 氏名</b>	岡村 均	<b>所属研究機関・ 部局・職 (研究期間終了時)</b>	京都大学・薬学研究科（研究院）・教授
<b>研究課題名</b>	分子時計による体内リズムの統合機構の解明		
<b>課題番号</b>	18002016		
<b>研究組織 (研究期間終了時)</b>	研究代表者 岡村 均（京都大学・薬学研究科（研究院）・教授） 研究分担者 山口 賀章（京都大学・薬学研究科・助教） 松尾 雅博（京都大学・薬学研究科・助教）		

**【補助金交付額】**

年度	直接経費
平成18年度	137,100 千円
平成19年度	80,100 千円
平成20年度	78,300 千円
平成21年度	74,800 千円
平成22年度	76,300 千円
総計	446,600 千円

## 1. 特別推進研究の研究期間終了後、研究代表者自身の研究がどのように発展したか

特別推進研究によってなされた研究が、どのように発展しているか、次の(1)~(4)の項目ごとに具体的かつ明確に記述してください。

## (1) 研究の概要

(研究期間終了後における研究の実施状況及び研究の発展過程がわかるような具体的内容を記述してください。)

特別推進研究「分子時計による体内リズムの統合機構の解明」は、2006. 4. 1-2011. 3. 31 に遂行された研究で、哺乳類の時計遺伝子がクローニングされ転写・翻訳フィードバック機構が確立された後を受け、時計遺伝子の生体における生理的・病理的役割解明を行なった。その主な成果として、①時計中枢の視交叉上核 (SCN) での、非時計遺伝子発振に関与する、G 蛋白質シグナル伝達-cAMP 機構の発見、②末梢臓器のリズム発振の生理機構の解明：肝細胞代謝、膀胱平滑筋ギャップ結合の排尿のリズム機構の分子レベル解明、③副腎のアルドステロン産生細胞にある分子時計の機能不全による、食塩感受性高血圧を引き起こす分子機構の解明がある。

この研究は終了後、以下の様に、その研究を進展させた。その成果は、大きく3つあり、以下簡潔に説明する。

1) Fustin JM, Doi M, Yamaguchi Y, Hayashi H, Nishimura S, Yoshida M, Isagawa T, Suimye-Morioka M, Kakeya H, Manabe I, Okamura H. RNA-methylation-dependent RNA processing controls the speed of the circadian clock. *Cell*, 155:793-806, 2013.

我々は、哺乳類において、化学修飾されたメッセンジャーRNA (mRNA) が概日リズムの周期を決定していることを解明した。従来、遺伝子情報の発現では、DNA の転写または、タンパク質の化学修飾 (リン酸化、アセチル化、メチル化、ユビキチン化など) が最重要であると考えられてきた。すなわち、ながら mRNA は DNA とタンパク質を結ぶ仲介役に過ぎないと思われてきた。しかし、今回の化学修飾された RNA Methyl-6-adenosine (m<sup>6</sup>A) が24時間という長周期のリズム形成の原因であるという発見で、RNA が遺伝子発現の主役の一つだということが判明した。今回の発見はエピトランスクリプトームの生理的意味を初めて解明した研究で、生体リズム研究を超えて、肥満や発癌のメカニズムの解明に大きな突破口を開くものと期待される。( \* エピトランスクリプトーム (epitranscriptome) は、細胞内の全転写産物 (mRNA) である「トランスクリプトーム」上 (epi) で起こる現象を指す言葉として名付けられた。)

本研究は、特別推進研究の成果②肝細胞のメタボローム研究からヒントを得て発展したものである。

2) Yamaguchi Y, Suzuki T, Mizoro Y, Kori H, Okada K, Chen Y, Fustin JM, Yamazaki F, Mizuguchi N, Zhang J, Dong X, Tsujimoto G, Okuno Y, Doi M, Okamura H. Mice genetically deficient in vasopressin V1a and V1b receptors are resistant to jet lag. *Science*, 342: 85-90, 2013.

我々は、時差ボケが起こるまったく新しい分子機構を解明した。時差ボケは、体内時計と周囲の環境時間の差によってもたらされることは明らかであったが、現在までその分子機構は不明であった。今回、体内時計の中枢で大量に発現している、バソプレッシン-V1 受容体系に着目し解析したところ、バソプレッシン受容体 V1aV1b ノックアウトマウスでは、時差が消失することが明らかとなった。細胞レベルでの時計遺伝子の発現解析により、この細胞間連絡を阻害すると、環境の明暗周期の変動にきわめて脆弱となり、体内時計が容易に環境の明暗周期に同調する可能性が示唆された。この結果は、海外旅行にともなう時差だけでなく、睡眠障害や生活習慣病といったシフトワーカーの病態の新たな治療薬の開発につながるものとして期待される。

本研究は、特別推進研究の成果①時計中枢 SCN 研究成果を進展させたものである。

3) Doi M, Murai I, Kunisue S, Setsu G, Uchio N, Tanaka R, Kobayashi S, Shimatani H, Hayashi H, Chao H-W, 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 Q1 receptor that sets the pace of circadian behavior. *Nature Commun.* 7:10583, 2016.

我々は、体内時計中枢 SCN に発現する G 蛋白質共役受容体 (GPCR) ファミリーに属する新規オーファン受容体分子 Gpr176 を同定した。Gpr176 は、生体リズムの中枢に作用して時刻調整を行うという優れた性質をもつ。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がわかった。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、Gpr176 を標的とした今後、睡眠障害に対する新たな生体リズム調整薬の開発が期待される。

本研究は、特別推進研究の成果①時計中枢 SCN 研究 RGS16 の研究成果を進展させたものである。

以上の研究の他、特別推進研究成果③時計による食塩感受性高血圧の研究に関しては、現在も継続して研究中で有り、既に英文論文 9 報を報告した (次項論文発表欄にそのうち 4 報を記載)。

## 1. 特別推進研究の研究期間終了後、研究代表者自身の研究がどのように発展したか（続き）

(2) 論文発表、国際会議等への招待講演における発表など（研究の発展過程でなされた研究成果の発表状況を記述してください。）

論文発表（英文論文 22 編のうち 10 編を示す。重要な論文は太字で示す。）

- Okamura H, Doi M, Yamaguchi Y, Fustin JM: Hypertension due to loss of clock: novel insight from the molecular analysis of Cry1/Cry2-deleted mice. *Curr. Hypertens. Rep.*, 13:103-108, 2011.
- Ota T, Fustin JM, Yamada H, Doi M, Okamura H: Circadian clock signals in the adrenal cortex. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 349:30-37, 2012.
- Negoro H, Kanmatsu A, Doi M, Suadican S, Matsuo M, Imanura M, Okinami T, Nishikawa N, Oura T, Matsui S, Seo K, Tainaka M, Urabe S, Kiyokage E, Todo T, Okamura H\*, Tabata H, Ogawa O\* (\*Co-corresponding authors): Involvement of urinary bladder Connexin43 and the circadian clock in coordination of diurnal micturition rhythm. *Nature Communications*, 3:809, 2012.
- Yamaguchi Y, Suzuki T, Mizoro Y, Kori H, Okada K, Chen Y, Fustin JM, Yamazaki F, Mizuguchi N, Zhang J, Dong X, Tsujimoto G, Okuno Y, Doi M, Okamura H\*. Mice genetically deficient in vasopressin V1a and V1b receptors are resistant to jet lag. *Science*, 342: 85-90, 2013.
- Fustin JM, Doi M, Yamaguchi Y, Hayashi H, Nishimura S, Yoshida M, Isagawa T, Suimye-Morioka M, Kakeya H, Manabe I, Okamura H. RNA-methylation-dependent RNA processing controls the speed of the circadian clock. *Cell*, 155(4):793-806, 2013.
- Doi M, Satoh F, Maekawa T, Nakamura Y, Fustin JM, Tainaka M, Hotta Y, Takahashi Y, Morimoto R, Takase K, Ito S, Sasano H, and Okamura H, Isoform-specific monoclonal antibodies against 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/isomerase family provide markers for subclassification of human primary aldosteronism. *J Clin Endocrinol Metab*, 99(2): E257-262, 2014.
- Yamamura K, Doi M\*, Hayashi H, Ota T, Murai I, Hotta Y, Komatsu R, Okamura H\*. Immunolocalization of murine type IV 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in the adrenal gland, testis, skin, and placenta. *Mol Cell Endocrinol*, 382(1):131-138, 2014.
- Ota T, Doi M, Yamazaki F, Yarimizu D, Okada K, Murai I, Hayashi H, Kunisue S, Nakagawa Y, Okamura H. Angiotensin II triggers expression of the adrenal gland zona glomerulosa-specific 3 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase isoenzyme through de novo protein synthesis of the orphan nuclear receptors NGFIB and NURR1. *Mol Cell Biol*, 34(20):3880-3894, 2014.
- 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(1):108-111, 2016.
- Doi M, Murai I, Kunisue S, Setsu G, Uchio N, Tanaka R, Kobayashi S, Shimatani H, Hayashi H, Chao H-W, 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 behavior. *Nat Commun*. 2016 Feb 17;7:10583.

海外からの招待講演（国際学会招待講演 31 回のうち、主なもの 10 回を示す）

- Okamura H: (Invited Speaker) New inter- and intracellular regulations of the circadian pacemaker, in 14th SRBR meeting, June 15-18, 2014, at Big Sky, Montana (USA)
- Okamura H: (Invited Speaker) Clock genes and diseases, in Keystone Symposium on Molecular Clockworks and the Regulation of Cardio-Metabolic Function, April 3-7, 2013, Snowbird (USA)
- Okamura H: (Plenary Lecture) Clock and hypertension. 15th International Congress of Endocrinology & 14th ECE, May 05-09, 2012 Florence (Italy).
- Okamura H: (Invited Speaker) Clock Genes and Hypertension. The 94th Annual Meeting of The Endocrine Society. (ENDO 2012), June 23-26, 2012, Houston (USA).
- Okamura H: (Plenary Lecture) Molecular dissection of the circadian clock in health and disease, Leopoldina Symposium: The Circadian System. March 22-24, 2012, Frankfurt am Main (Germany).
- Okamura H: (Invited Speaker) Clock gene, aldosterone and hypertension, in 24th Meeting of the International Society of Hypertension (ISH), Sept 30 - Oct 4, 2012, Sydney (Australia).
- Okamura H: (Invited Speaker) Dysregulated clock controlled genes and hypertension, Aldosterone & Salt: Heart and Kidney2012, Oct 5-7, 2012. Palm Cove, Queensland (Australia).
- Okamura H: (Keynote lecture) Circadian clocks and diseases. 2012 UCLA Symposium "Circadian Clocks and Metabolic Disease", April 20-22, 2012, in Lake Arrowhead, CA (USA).
- Okamura H: (Invited Speaker) Dysregulated, cell-specific cog's lead to disease. In Gordon Research Conference on Chronobiology, June 12-17, 2011, Lucca (Italy).
- Okamura H: (Invited speaker) Clock and renin angiotensin aldosterone system in adrenal gland and kidney. In 2011 APS Conference: 7th International Symposium on Aldosterone and the ENaC/Degenerin Family of Ion Channels: Molecular Mechanisms and Pathophysiology, September 18-22, 2011, Pacific Grove, CA (USA).

受賞

平成 28 年 3 月 第 56 回 東レ科学技術賞（東レ科学振興会：東京）

## 1. 特別推進研究の研究期間終了後、研究代表者自身の研究がどのように発展したか（続き）

(3) 研究費の取得状況（研究代表者として取得したもののみ） 金額は総額を示す。

1. 科学技術振興機構(JST)・戦略的創造研究推進事業(CREST)、平成26~31年度、研究代表者  
「クロノメタボリズム：時間相の生物学」、346,970千円（予定）  
（領域：生命動態の理解と制御のための基盤技術の創出：山本雅領域長）
2. 基盤研究(A)（一般）(No. 24240058)、平成27~29年度、研究代表者、  
「SCNにおける時間発振機構の解明」、37,110千円（予定）
3. 基盤研究(A)（一般）(No. 15H01843)、平成24~26年度、研究代表者  
「SCNジーンプロジェクトによる生体リズムの分子機構の解明」、47,060千円

(4) 特別推進研究の研究成果を背景に生み出された新たな発見・知見

生物時計 Biological Clock は、地球の自転に対応した、生命にとって最も根源的な「時間」の仕組みであり、細胞の基本代謝の昼夜の動的平衡状態を引き起こしている。このリズムは、時計遺伝子の形成する転写時計として細胞内で起こり、細胞間の連絡により統合され、個体としての24時間の生理変動を引き起こされる。哺乳類においては、脳内の時計中枢である視交叉上核(SCN)の細胞が形成するネットワークが、全身のリズムを統括している。しかし、SCNの中核時計のリズム発振は、時計遺伝子が形成する転写時計だけではない。この事実について初めて気づいたのは、SCNスライスカルチャーにて、Per-lucの細胞リズムが、テトロドトキシン投与後、まずバラバラとなり、やがて各々のリズムは消失したからである(Science 2003)。即ち、これは、非転写時計によるリズム発振システムがあることを示すものであり、これは、転写クロックだけがリズムを発振するという、古典的な常識に対する最初の一撃であった。しかし、後に百日咳毒素でもリズムの消失を報告するも、当時この概念を本格的に展開する手法は見当たらず、この実験結果はそのままになっていた。

2011年にあって、英国から、核の無い(従って転写の無い)赤血球でのperoxiredoxinsのリズムが報告され(O'Neill & Reddy, Nature 469:498-503, 2011)、非転写時計の考え方が、現実のものとなった。一方、非転写リズムの重要性はRNA研究からも起こった。Takahashiらは(Koike et al. Science 338:349-354, 2012)、ゲノムワイドのRNA-Seqの結果、トランスクリプトレベルでリズムに発現する遺伝子は数千個あるが(全遺伝子の5-10%)、直接時計遺伝子に転写制御されてリズムがあるのはごく少数であり、大部分のリズムはRNAレベルで初めて生ずると報告した。さらに、代謝産物の質量分析の研究からも、非転写レベルのリズムが報告された。我々はCE-TOFMSによるメタボロームによるメタボライトのリズムを検索したところ、想定より多数の物質がリズムを示し、ヌクレオチドではリズムを持つものが7割にも及ぶことを報告した(Cell Rep 2012)。Sassone-CorsiらもMS/MS解析で同様の結果を報告した(Eckel-Mahan et al. PNAS 109:5541-5546, 2012)。以上、各種検索の結果、従来の時計の概念は大幅に変更されることとなった。すなわち、時計遺伝子の転写によるリズム制御はほんの一部に過ぎず、大部分が非転写レベルでの制御だったのである。このパラダイムシフトの結果、従来結果に過ぎないと考えられてきた、レドックス、アセチル化、メチル化、cAMP、カルシウムイオンなどが、どこまで能動的に時計機能に関わっているのかが、見直され始めている。我々が現在、m<sup>6</sup>A-RNAメチル化解析に全力をあげているのも、この長い非転写時計の研究の歴史があったからであり、我々はこの研究の重要性を確信している。

今回の特別推進研究を通じて生まれたのは、以上のような、クロノメタボリズムの概念であり、私は、現在、このクロノメタボリズムの研究に全力をあげている。細胞で生み出される時間は、組織、個体に張り巡らされた生体リズムネットワークで統合され、全ての階層で時が刻まれ、環境の外的時間に照応する。転写クロックとメタボリッククロックがインターロックしたクロノメタボリックシステムは、基本代謝を動的に管理し、生命機構に根源的な時間秩序を形成していると考えられる。古典的転写クロックと新奇メタボリッククロックの運動によって生み出される時間は、糖・脂質・核酸などの基本代謝を動的に管理し、時間とともに動く動的細胞内ネットワークを形成し、細胞の増殖などの基本的な生命機構に時間秩序を与えている。興味深いことに、細胞代謝の動的制御が、細胞の増殖、分化、老化や、ストレス応答も支えていることが明らかになってきた。例えば、細胞が侵襲を受けたとき解糖系を主体とする代謝に切り替わるが、クロノメタボリックシステムは同時に脂質や蛋白代謝も調節し、細胞の分裂や肥大・形質変化へのスイッチングを行う。細胞レベルでも個体レベルでも、生物は環境からのシグナルを予測し、受入れや拒絶を行ない、各自が最も機能を発揮できるような体制を整え、生存している。現在取り組んでいるクロノメタボリズムの研究の進展により、環境・個体の時間軸を基にした生命階層の制御機構の一端が明らかになることが期待される。

## 2. 特別推進研究の研究成果が他の研究者により活用された状況

特別推進研究の研究成果が他の研究者に活用された状況について、次の(1)、(2)の項目ごとに具体的かつ明確に記述してください。

### (1) 学界への貢献の状況（学術研究へのインパクト及び関連領域のその後の動向、関連領域への関わり等）

#### ◎時計中枢 SCN 研究の広がり：その1. マウスからヒトへ

本年2(3)月、ヒトにおける大規模GWAS研究が3つ発表された(Hu et al Nature Commun 7:10448, 2016 Feb 2; Lane et al. bioRxiv 2016 Feb 2); Lane et al. Nature Commun 7:10889, 2016 Mar 9)。これらは、米国、EU、英国からのいずれも約10万検体を用いた報告で、クロノタイプ(ヒトの活動リズムには個人差があり、活動ピークが朝にある「朝型」と、夜にある「夜型」)に関する論文で有る。結果は驚くべき事に、この3研究ともRGS16の変異が朝型と非常に強い相関があることを示した。

RGS16に関しては、5年前、すでに実験動物(マウス)において、体内時計中枢で有る視交叉上核に特異的に発現するG蛋白質制御蛋白RGS16として、これをノックアウトすると「寝坊」マウスとなるという報告をしていた(Doi et al. Nature Commun 2:327, 2011)。このマウスの結果は、今回のヒトGWAS研究と一致していたことが非常に驚きで有り、体内時計が、睡眠覚醒をgeneticに制御する事を改めて示したものであり、マウス→ヒトの研究の正当性を示すものである。RGS16はSCNにしか発現しない物質で有り、これをターゲットにすると副作用の無い睡眠薬ができる可能性がある。なぜなら、ベンゾジアゼピンは良い睡眠薬であるが、大脳皮質に広く発現しているGABA<sub>A</sub>受容体に働き作用を及ぼすと考えられており、それによる副作用が報告され、代替の睡眠薬の開発が求められている。今後、SCNに発現する物質の同定は、有力な創薬のシーズとなる可能性がある。

この報告にさらに驚いたことは、これらGWASのデータは、Googleの出資するヒトゲノムを解析してのベンチャー企業23andMeから発表されていたことである。すなわち、一般の民間の100ドルでのゲノム診断に応募してきた方の中から、89283人を対象とする大規模GWAS研究をなされていることで、論文が書かれているのである。以上の研究の方向は、生体リズム研究の情報科学研究との相性の良さを示している。今後、ヒトをベースとした生体リズム研究は、将来性のある重要な研究分野と考えられ、我が国におけるデータベースの構築が急務である。

#### ◎時計中枢 SCN 研究の広がり：その2. GPCRから創薬へ

上述のRGS16の上流にあるGPCRが注目されるが、我々は最近、SCN特異的に発現し、百日咳毒素非感受性G蛋白質Gzと共役する新規オーファンGPCRであるGpr176を同定した(Nature Commun 2016)。興味深いことに、このオーファンGPCRは、これまでに知られる多くのGPCRとは異なり、Gzという特殊なG蛋白質を介して下流のcAMPシグナルを抑制する作用があることがわかった。今後このGpr176-Gzシグナルを標的とした中枢リズム調整薬の開発が期待される。

不規則な生活習慣に起因する睡眠障害やそれに付随する生活習慣病を根本的に是正するという目的の治療には、これまで開発されてこなかった脳内中枢時計機構に作用する新たな治療薬が効果を発揮する可能性がある。現在の睡眠薬・鎮静系向精神薬はリズム調整という観点においては対処療法に過ぎず、残念ながら、生体リズムの改善という根本的な視点からの医療はまだ実践されていない。全身の生体リズムを統率する時計のセンターはSCNと呼ばれる脳内の神経核にある。この特異的な神経核に存在する新たなG蛋白質共役受容体(Gpr176)とその下流のシグナル分子(Gz)の発見は、このセンターに直接作用する根本的な時間治療薬の開発を可能にするものと期待される。

#### ◎RNAメチル化修飾による新しい生物学

今までの生物学の考えでは、mRNAはDNAの遺伝情報を忠実に運ぶ運び屋に過ぎないと考えられてきたのであるが、我々は、糖(リボース)と塩基がリン酸を介して繋がった紐状のmRNAが、RNA塩基であるアデニンの窒素に新たな化学修飾(メチル化)が付加されると(m<sup>6</sup>A)、新たな機能が生まれることを初めて明らかにした(Cell 2013)。この発見は、生体リズムの観点からだけでなく、mRNAに関する見方を根本的に変えたものとして意味がある。我々の研究により、生体リズムはmRNA修飾の生理作用が初めて明らかになった生命現象となったが、RNA修飾は他の多くの未知の生命現象にも関与しており、事実、ごく最近m<sup>6</sup>Aメチル化がES細胞の分化に必須の現象である事が解明された(Geula et al. Science 2015)。既にCell誌にm<sup>6</sup>A RNA修飾がヒト遺伝子20%に、さらに最近新たにm<sup>1</sup>A RNA修飾が発見され(Nature 2016)、RNA修飾はエピジェネティック制御の主役となって来ており、肥満、発癌との関連が注目されている。現在、RNA修飾の関与が証明されている唯一の生理機能である生体リズム周期形成におけるRNA修飾の詳細な分子メカニズムを解明することに全力をあげている。

#### ◎国際交流

1. 国際会議(①Molecular Clock 2014: Kyoto 2014年3月29日、②RNA & Clock: Awaji-Yumenutai International Conference Hall: 2015年3月25-26日、③Molecular Clock 2015, Kyoto 2015年3月27日)を開催した。
2. J. Biol. Rhythms 編集長であるW. J. Schwartz教授(マサチューセッツ大学医学部神経学)が、私達の研究室に2ヶ月滞在し(2015年9月17日-11月16日)、研究室の全ミーティングに参加し活発に討論・交流した。

## 2. 特別推進研究の研究成果が他の研究者により活用された状況（続き）

(2) 論文引用状況（上位10報程度を記述してください。）

## 【研究期間中に発表した論文】

No	論文名・著者名・発行年・ページ数等	日本語による簡潔な内容紹介	引用数
1	Doi M, Takahashi Y, Komatsu R, Yamazaki F, Yamada H, Haraguchi S, Emoto N, Okuno Y, Tsujimoto G, Kanematsu A, Ogawa O, Todo T, Tsutsui K, van der Horst GTJ, Okamura H: Salt-sensitive hypertension in circadian clock-deficient mice involves dysregulated adrenal Hsd3b6. <i>Nature Medicine</i> , 16:67-74, 2010.	血圧は、日内変動がある代表的な生理現象である。今回、時計遺伝子 <i>Cry</i> を欠損させたマウスでは、食塩感受性高血圧となることを発見した。時計遺伝子 <i>Cry</i> は通常、昇圧物質アルドステロンの産生を調節して血圧を一定に保っているが、 <i>Cry</i> 欠損では、調節が効かず、食塩負荷時、高血圧になることを発見した。	161
2	Doi M, Ishida A, Miyake A, Sato M, Komatsu R, Yamazaki F, Kimura I, Tsuchiya S, Kori H, Seo K, Yamaguchi Y, Matsuo M, Fustin JM, Tanaka R, Santo Y, Yamada H, Takahashi Y, Araki M, Nakao K, Aizawa S, Kobayashi M, Obrietan K, Tsujimoto G, Okamura H: Circadian regulation of intracellular G-protein signalling mediates intercellular synchrony and rhythmicity in the suprachiasmatic nucleus. <i>Nature Communications</i> , 2:327, 2011.	時計遺伝子はあるとしても、ボツリヌス毒素や百日咳毒素を SCN に投与すると、体内時計のリズムは消失する。これは SCN リズム発振が、抑制性 G 蛋白質と強く関連する神経伝達機構にあることを示している。今回、SCN に発現する抑制性 G 蛋白質に関連物質を網羅的に解析し、RGS16 を同定した。今回、抑制型 G 蛋白質を不活化する RGS16 が朝に SCN に発現し、24 時間より長い周期の体内時計を 24 時間に調律していることを発見した。	42
3	Cheng H-YM, Papp JW, Verlamova O, Dziema H, Russell B, Curfman JP, Nakazawa T, Shimizu K, Okamura H, Impey S, Obrietan K: MicroRNA modulation of circadian clock period and entrainment. <i>Neuron</i> , 54:813-829, 2007.	microRNA (miRNA) は RNA の安定性や翻訳活性を調節する。今回、miRNA である miR-219 や miR-132 が、概日リズムの周期を調整することを明らかにした。miR-219 は CLOCK/BMAL1 の標的でありリズムカルに転写され、miR-132 は光により誘導され体内時計を調整する。オプリエタラボとの共同研究。	299
4	Okamura H: Suprachiasmatic nucleus clock time in mammalian circadian system. <i>Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.</i> , 72:551-556, 2007.	SCN は、生体リズムの中核であり、自身は強力なリズム信号を発生し、他の脳部位や全身の細胞で発生するリズムを調律・統合している。我々は SCN に発現する遺伝子を組織化学で同定し、リズムに及ぼす影響をノックアウトマウスで網羅的に検定するプロジェクト (SCN-Gene Project) を開始した。	38
5	Bando H, Nishio T, van der Horst GTJ, Masubuchi S, Hisa Y, Okamura H: Vagal regulation of airway clocks in mice. <i>J. Neurosci.</i> , 27:4359-4365, 2007.	時計遺伝子は、喉頭・気管支の粘膜上皮や漿液腺に強く発現している。今回、この発現の 24 時間リズムが、迷走神経による気管上皮の粘液・漿液腺のリズミックな制御によることを解明した。喘息発作の早期発現との関係が示唆される。	26
6	Moriya T, Aida R, Kudo T, Akiyama M, Doi M, Hayasaka N, Nakahata N, Mistlberger R, Okamura H, Shibata S: The dorsomedial hypothalamic nucleus is not necessary for food-anticipatory circadian rhythms of behavior, temperature or clock gene expression in mice. <i>Eur. J. Neurosci.</i> , 29:1447-1460, 2009.	食物摂取時に反応する視床下部腹内側核 (DMH) の時計遺伝子発現が、食物予期活動に必要などうかを、DMH 破壊マウスで検索した。DMH 破壊マウスでも、食物予期活動は保たれていたため、DMH が食物予期活動の司令塔との仮説は、支持できなかった。柴田ラボとの共同研究。	67
7	Hashiramoto A, Yamane T, Tsumiyama K, Yoshidam K, Komai K, Yamada H, Yamazaki F, Doi M, Okamura H, Shiozawa S: Mammalian clock gene Cryptochrome regulates arthritis via proinflammatory cytokine TNF- $\alpha$ . <i>J. Immunology</i> , 184:1560-1560, 2010.	時計遺伝子は数々の免疫現象に関与している。今回マウス関節炎モデルにおいて、LPS-抗コラーゲン抗体による関節炎症が <i>Cry</i> 遺伝子欠損で増悪することを見出した。これは <i>Cry</i> による TNF $\alpha$ の転写抑制不全によるものと推測される。塩沢ラボとの共同研究。	67
8	Kobayashi M, Kikuchi D, Okamura H: Imaging of ultraweak spontaneous photon emission from human body displaying diurnal rhythm. <i>Plos ONE</i> , 4(7):e6256, 2009.	ヒトの身体からは、活性酸素によると想定される微弱な発光がある。今回、全暗黒でも検出可能なヒト用超高感度カメラを開発し、身体からの数フォトンレベルの極微弱発光の 24 時間リズムを検出した。工学部の小林ラボとの共同研究。	27
9	Westermark PO, Welsh DK, Okamura H, Herzel H: Quantification of circadian rhythms in single cells. <i>PLoS Computational Biol.</i> , 5(11):e1000580, 2009.	我々は中枢時計 SCN の時間位相をリアルタイムで細胞レベルで見る技術を開発した ( <i>Nature</i> 2003)。今回、この SCN セルの数理解析の結果、従来の永久振動で無くとも減衰振動モデルでも、SCN リズムを説明できる事が判明した。Herzel ラボとの共同研究。	26
10	Imanishi M, Nakamura A, Doi M, Futaki S, Okamura H: Control of circadian phase by an artificial zinc finger transcription regulator. <i>Angew Chem. Int.</i> , 50:9396-9399, 2011.	概日リズムを自由に制御できれば、時差は解消し、夜間労働が身体に与える影響も軽微にとどまる可能性がある。時計遺伝子に選択的に結合する Zinc-finger 型人工転写因子を考案し、リズム位相を変えることであり、今回、世界で初めて成功した。化学研究所今西博士との共同研究。	3

## 【研究期間終了後に発表した論文】

No	論文名	日本語による簡潔な内容紹介	引用数
1	Fustin JM, Doi M, Yamaguchi Y, Hayashi H, Nishimura S, Yoshida M, Isagawa T, Suimye-Morioka M, Kakeya H, Manabe I, Okamura H. RNA-methylation-dependent RNA processing controls the speed of the circadian clock. <i>Cell</i> , 155(4):793-806, 2013.	時計遺伝子の24時間リズム周期が、mRNAのメチル化により調整されていることを発見した。RNAのメチル化はリズムを早める。この研究は、発見以来40年以上不明であったmRNAのN6-メチル化アデノシンの生理的意味を初めて解明した研究として特筆される。	72
2	Yamaguchi Y, Suzuki T, Mizoro Y, Kori H, Okada K, Chen Y, Fustin JM, Yamazaki F, Mizuguchi N, Zhang J, Dong X, Tsujimoto G, Okuno Y, Doi M, Okamura H*. Mice genetically deficient in vasopressin V1a and V1b receptors are resistant to jet lag. <i>Science</i> , 342: 85-90, 2013.	SCN最大のニューロン系であるAVP-V1aV1bニューロン系は、神経核内でネットワークを形成しており、V1aV1bノックアウトマウスでは、時差が消失することを発見した。これは、時差の分子機構の初めての解明であり、V1拮抗剤投与にて、時差が大きく軽減することも明らかとなった。	50
3	Doi M, Murai I, Kunisue S, Setsu G, Uchio N, Tanaka R, Kobayashi S, Shimatani H, Hayashi H, Chao H-W, 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 Q1 receptor that sets the pace of circadian behavior. <i>Nat Commun</i> . 7:10583, 2016.	SCNに発現するGzと共役する新規オーファンGPCRであるGPR176の発見した。GzはGi/o蛋白質と異なり、百日咳毒素に非感受性のG蛋白質である。ノックアウトマウス検索の結果、このGPR176はSCNにてVIP-VIPR2と競合的に作動していることが明らかとなった。	0
4	Negoro H, Kamatsu A, Doi M, Suadican SO, Matsuo M, Imanura M, Okinami T, Nishikawa N, Oura T, Matsui S, Seo K, Tainaka M, Urabe S, Kiyokage E, Todo T, Okamura H, Tabata H, Ogawa O* (*Corresponding authors): Involvement of urinary bladder Connexin43 and the circadian clock in coordination of diurnal micturition rhythm. <i>Nature Commun</i> , 3:809, 2012.	膀胱の体内時計が、夜に蓄尿容量を増やすことで、良好な睡眠を確保するしくみを支えていることを発見した。これは小児の夜尿症や老人の夜間頻尿という、排尿リズムが崩れた疾患の背後にある分子機構と考えられる。小川ラボとの共同研究。	30
5	Fustin J-M, Doi M, Yamada H, Komatsu R, Shimba S, Okamura H: Rhythmic nucleotide synthesis in the liver: Temporal segregation of metabolites. <i>Cell Reports</i> , 1:341-349, 2012.	肝臓は全臓器に核酸(RNA、DNA)の原料となるヌクレオチドを供給している。今回、質量分析計を用いて、肝臓の24時間メタボロームにて、ヌクレオチド代謝が肝臓の時計によりリズム的に行われることを発見した。	24
6	Doi M, Satoh F, Maekawa T, Nakamura Y, Fustin JM, Tainaka M, Hotta Y, Takahashi Y, Morimoto R, Takase K, Ito S, Sasano H, and Okamura H, Isoform-specific monoclonal antibodies against 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/isomerase family provide markers for subclassification of human primary aldosteronism. <i>J Clin Endocrinol Metab</i> , 99: E257-262, 2014.	血中アルドステロンが高値を示すヒトの原発性アルドステロン症には2型ある。今回、特異性アルドステロン症においては、HSD3B1の発現が亢進し、アルドステロン腺腫では、HSD3b2の発現亢進するという、全く別の病因であることが解明された。	13
7	Ota T, Fustin JM, Yamada H, Doi M, Okamura H: Circadian clock signals in the adrenal cortex. <i>Mol. Cell. Endocrinol.</i> , 349:30-37, 2012	副腎は、SCNから交感神経系を介し、時間情報が伝達され、これが、副腎皮質束状層にてグルココルチコイドシグナルに変換され、全身にホルモン情報として、時間シグナルを伝達する。一方、副腎皮質球状層では、細胞内に非常に強い生体時計があり、これが、アルドステロンの合成の24時間リズムを司る。	19
8	Ota T, Doi M*, Yamazaki F, Yarimizu D, Okada K, Murai I, Hayashi H, Kunisue S, Nakagawa Y, Okamura H. Angiotensin II triggers expression of the adrenal gland zona glomerulosa-specific 3β-Hydroxysteroid dehydrogenase isoenzyme through de novo protein synthesis of the orphan nuclear receptors NGFIB and NURR1. <i>Mol Cell Biol</i> , 34(20):3880-3894, 2014.	概日時計に制御され、ヒトの特異性アルドステロン症の原因酵素候補であるHSD3B1がアンジオテンシンII(AngII)により発現制御を受けることを示した。AngIIによって活性化された核内オーファン受容体NGFIBがHSD3B1の発現を急速に誘導する。レニン-アンジオテンシン-アルドステロン系による制御と時計遺伝子を介した体内時計の制御がHSD3B1のプロモーター上で収斂・統合される分子機構を解明した。	3
9	Yamamura K, Doi M, Hayashi H, Ota T, Murai I, Hotta Y, Komatsu R, Okamura H. Immunolocalization of murine type IV 3β-hydroxysteroid dehydrogenase in the adrenal gland, testis, skin, and placenta. <i>Mol Cell Endocrinol</i> , 382(1):131-138, 2014.	Cry-null副腎の時間特異的DNAマイクロアレイによる網羅的解析を行い、新規ステロイド合成酵素であるHsd3b6遺伝子がCry-nullマウスで異常に発現増加していることが明らかとなった。今回この酵素の特異抗体を作成し、この酵素が、副腎のみならず、皮脂腺、胎盤、精巣に発現することを明らかにした。	9
10	Tanaka R, Tainaka M, Mizuguchi N, Kato H, Urabe S, Chen Y, Fustin J-M, Yamaguchi Y, Doi M, Hamada S, Okamura H: Accurate determination of S-phase fraction in proliferative cells by dual fluorescence and peroxidase immunohistochemistry with 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) and Ki67 antibodies. <i>J. Histochem. Cytochem.</i> , 59:791-798, 2011.	細胞周期と体内時計は、両者とも約24時間周期で律動する時間システムとして注目される。その両者の相互関係を検索するため、単一切片において認識可能な、Ki標識された細胞周期に入った細胞におけるDNA合成期を特定するためのBrdUの二重染色法を開発した。	10

### 3. その他、効果・効用等の評価に関する情報

次の(1)、(2)の項目ごとに、該当する内容について具体的かつ明確に記述してください。

#### (1) 研究成果の社会への還元状況（社会への還元の程度、内容、実用化の有無は問いません。）

##### 【時差と体内時計研究の社会的的重要性】

生体リズム研究は 20 年前の時計遺伝子発見を契機にして、従来の現象的経験的理解が、分子レベルで説明できるようになり、革命の変貌を遂げた。現在では、時計遺伝子による転写リズムだけでなく、RNA 修飾や蛋白質修飾によるリズム制御が提唱されており、その変貌は加速度が付いている。現在では、生体リズム発振機構が細胞の核酸代謝や糖代謝と不可分であることも解明され、疾病との関連が注目されている。経済のグローバル化に伴い、交替制勤務や長時間労働は全労働者の三分の一にも達しており、今や我々は 24 時間社会に住んでおり、これによる睡眠障害が国民病になっている（世界一の短睡眠国）。それにともない、睡眠リズム異常による病態が注目され、特に高血圧・肥満・発癌などの生活習慣病の発症との関係が分子レベルで急速に解明が進んでいる。さらに、精神状態や労働災害の発生に深くかかわりも、重要な問題として、研究および対策が進んできた。

これに対応して、生体リズム研究は、1990 年代の米国の NSF Center for Biological Timing や、2006 年からの欧州連合 (EU) の EuClock プロジェクトなど、国家政策として研究に力を入れ、社会を支えてきた。しかし、我が国ではアカデミアが主体となり社会を巻き込む組織・機構は、未だ無い。しかし、24 時間労働に関する社会の関心は高く、コンビニエンスストアの営業時間、睡眠時無呼吸症候群による労働災害、残業の減少と早期出勤の奨励などは、たびたび全国規模で議論が巻き起こっている。しかし、これらの議論は、日本ではまだ十分な科学的視点に基づいた議論とは言いがたい面もある。欧米ではジェットラグ、ソーシャル・ジェットラグ（体内時計の時刻と違う生活活動）、シフトワーク等の社会的に重要な健康問題に対処するための取り組みが、アカデミアを中心とし、臨床医学や介護労働衛生の専門家も参加し、社会全体で強力に推進されている。学問的には、生体リズムの分野は、日本の基礎研究は欧米に互して研究成果を出しているとの文部科学省の俯瞰調査でも報告されているので、この生体リズムの研究成果を如何にして社会に取り入れるか、その方策を考えるのは今後の重要な課題である。

##### 【時差の原因は進化の末獲得したリズム発振能力という逆説】

概日リズムシステムは、地球における生命の誕生にまでその起源が遡る。原核生物、真核生物、動物、脊椎動物、哺乳類、ヒトと、膨大な時間を経ても、受け継がれてきた時間システムであると言うことが、大きな特徴である。その振動の基本になる時計遺伝子の転写・翻訳フィードバックシステムは、我々の身体の多くの細胞に受け継がれ、細胞の基本的な代謝・機能を司っている。哺乳類では、この概日リズム発振装置はその進化の頂点をきわめ、視床下部の視交叉上核 (SCN) が全細胞のリズムを指令・統合するシステムが確立した。SCN は、個々の細胞レベルの“弱い”振動を、細胞間結合で、非常に安定した規則正しいロバスタなリズムに仕上げているのである。この SCN 内にある細胞間結合のおかげで、周囲環境の一過性の明暗環境や温度環境の変化にも影響されず、安定してリズムを決めるシステムが形成されていた。

ところが、我々は 1950 年代にジェット機による旅行が始まった。経度に沿っての数時間での移動は、進化の上で、生物が全く経験しなかったことである（この面での淘汰圧はかかっている）。そこで初めて生物は、体内時間と環境時間のズレである「時差」を経験した。我々は、SCN 細胞間結合が脆弱なバソプレッシン V1a 受容体 V1b 受容体ノックアウトマウスが、環境の明暗周期に容易に同調する（＝時差が無くなる）ことを発見した。上述の、リズム形成に必須の、SCN の細胞間結合であるバソプレッシンニューロン系が無いと時差は無いことを示している。サーカディアンリズムを形成に必須の機能が、時差の原因になるのである。

この逆説的な事実は、しかし、ある意味では、現代の時差に関する諸問題の、解決法を示しているのかも知れない。すなわち、SCN の一時的なリズム形成能力の停止による、時差治療の可能性である。事実、V1 アンタゴニスト投与は、用量依存的に時差後の同調日時が短縮する。この結果は、薬剤投与でも時差を制御できる可能性を示したものである。パプタン系の V2 受容体拮抗剤はすでに低ナトリウム血症に対する治療薬としてしようされているが、V1 受容体拮抗剤についても開発されれば、“慢性時差”とも言える交替制勤務による、生活習慣病の予防や治療に可能な、新しいタイプのリズム調整剤としての効用が期待される。

この研究は時差の分子機構の初めての解明であったので、サイエンス誌に掲載時 (2013 年 10 月 2 日)、日本の全国紙で取り上げられたが、それ以上に海外における反響は大きく、BBC News (英国)、CNBC (米国) を初め各国マスコミに”Body clock 'reset button' found” (BBC) 等と詳細に報道された。

##### 【SCN 特異性を利用した創薬：オーファン GPCR への展開】

GPCR は、2012 年のノーベル化学賞の受賞対象となった分子として記憶に新しいが、創薬をする上で最も重要でかつ効率のよい標的分子である。SCN にも多くの GPCR が存在することが知られており、V1a, V1b 受容体も GPCR である。我々は、先に述べたように、SCN のリズム形成能力を持つ新たな GPCR の探索に乗り出した。ごく最近、我々は、Gpr176 というリガンド未知のオーファン受容体が、SCN のリズム周期を調節することを明らかにした (Nature Commun 2016)。今後も、シフトワークによる生活習慣病に対する新リズム調整薬の開発の重要なターゲットとして、SCN に特異的に発現する GPCR の研究を進めたい。



**3. その他、効果・効用等の評価に関する情報（続き）**

(2) 研究計画に関与した若手研究者の成長の状況（助教やポスドク等の研究終了後の動向を記述してください。）

1. 当時：京都大学・助教 →現在：滋賀医科大学・講師
2. 当時：日本学術振興会・外国人特別研究員 →現在：京都大学・特定講師