

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 26 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06334

研究課題名(和文)概日リズム・睡眠・代謝に共通の制御因子SIK3と恒常性維持の分子基盤解明

研究課題名(英文) Understanding molecular basis of homeostatic maintenance by SIK3, a regulator common to circadian rhythm, sleep and metabolism

研究代表者

早坂 直人 (HAYASAKA, Naoto)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・客員研究員

研究者番号：80368290

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、リン酸化酵素(SIK3)による時計タンパク質(PER2)の分解機序同定、体内時計・睡眠・代謝制御におけるSIK3の下流の分子(基質)探索、概日時計がSIK3を介して睡眠や代謝を制御するとの仮説の検証を目的とした。本研究の結果、SIK3によるPER2の分解には、オートファジー(自食作用)が関与することが示唆された。また、SIK3の新たな基質候補として見出した、特定のケモカインとその受容体の遺伝子欠損マウス双方で、活動リズム異常が観察されたため、SIK3による体内時計制御の一部がケモカインを介していること、さらにはSIK3はケモカインの制御を介して睡眠にも関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

体内時計は生物の活動や生理現象を制御し、恒常性維持に重要な役割を果たすが、体内時計が行動や多様な生理現象を制御する共通のメカニズムの存在については、未解明であった。本研究では、進化の過程で下等動物から哺乳類まで保存されてきたSIK3というリン酸化酵素が、体内時計に関わる複数の新たに同定されたタンパク質の制御を介して恒常性の維持に重要な役割を果たしていることが示唆された。本研究は、常に変動する環境の中で生体内の安定性を維持する仕組みである恒常性における体内時計の重要性をより明らかにし、恒常性維持機構の破綻ともいえる疾患の研究に体内時計という視点が不可欠であることを強く示唆するものであるといえる。

研究成果の概要(英文)：This study aimed that 1) analysis of the degradation mechanism of PER2 by SIK3, 2) identification of new SIK3 substrates involved in the regulation of circadian rhythm, sleep, and metabolism, and 3) elucidation of whether circadian clock is involved in the regulation of sleep and metabolism via SIK3 signaling.

Our data suggest that autophagy is involved in the degradation pathway of PER2. We also identified a chemokine receptor as a candidate SIK3 substrate. Abnormal circadian activity rhythms were observed in both of the chemokine receptor and its ligand KO mice, suggesting that regulation of circadian rhythm by SIK3 is mediated by the chemokine signaling. In addition, our results suggest that SIK3 is also involved in sleep regulation, at least in part, through the chemokine and its receptor.

研究分野：動物生理化学、生理学および行動学関連

キーワード：SIK3 PER2 ケモカイン オートファジー 概日時計 睡眠

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

SIKs (Salt-inducible kinases) は、エネルギーセンサーとして知られ、エネルギー恒常性の維持に貢献する AMPK (AMP-activated protein kinase) ファミリーに属し、3つのアイソフォーム (SIK1, 2, 3) が存在する。中でも、SIK3 は糖代謝、脂質代謝、ビタミン代謝など、複数の重要な代謝経路に不可欠な調節因子であり、*Sik3* KO マウスの解析では、低体重、低血糖、低脂血症、胆汁鬱滞といった重篤な症状を呈する (Uebi et al. PLoS ONE, 2012)。また、SIK3 は骨発生への関与も報告されている (Sasagawa et al. Development, 2012)。一方、脳でも広く発現する SIK3 の中枢神経系における機能は不明であった。

代表者は、*Sik3* KO マウスの代謝異常解析の中で、酸素消費や摂食、体温に見られる昼夜変動 (概日リズム) の位相 (ピーク) が、野生型マウスと比較して約 6 時間後退していることを見出した (図 1)。また、KO マウスの概日リズムを詳細に検討したところ、恒暗条件下における活動リズムの周期の有意な延長 (長周期) を認めた (図 2)。更には、概日リズム制御において中心的な役割を果たす時計タンパク質 PER2 の *Sik3* KO マウスが著明に蓄積しており、PER2 の分解機構の異常が示唆された。詳細な解析の結果、SIK3 は概日時計駆動に中心的な役割を果たす PER2 の分解を促進するが、KO マウスでは PER2 が蓄積することによってリズム異常を引き起こすことが示唆された (図 3、以上 Hayasaka et al. eLIFE 2017)。以上の結果から、SIK3 はエネルギー代謝の制御に関与するのみならず、代謝の概日リズム、さらには行動や分子レベルの概日リズム制御に重要な役割を持つことが示唆された。*Sik3* 遺伝子の人為的突然変異マウスで、睡眠の延長や短縮といった異常が報告された (Funato et al. Nature 2016) ことと合わせると、線虫やショウジョウバエなどでも非常に進化的に保存性が高い SIK3 が「代謝、睡眠、概日リズム制御の共通因子」であることが新たに示唆された。以上の背景から、生体の恒常性維持において SIK3 が "key factor" として機能しているとの仮説を証明すべく、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

(1) PER2 タンパク質の安定性制御には、SIK3 のほかに casein kinase I (CKI) が報告されている。しかし、我々の研究結果は、SIK3 のリン酸化による PER2 の分解促進は、CKI で報告されている proteasome を介した機構ではないことを示唆している。また、*Sik3* KO マウスと CKI 変異マウスでは表現型が異なっており、SIK3 が CKI とは独立の機構で PER2 制御に関与していることが示唆される。そこで、SIK3 を介した PER2 分解機構を明らかにした上で、複数のリン酸化酵素が同一のタンパク質の安定性を独立に制御する仕組みに迫る。

(2) リズム制御では PER2 を基質として同定したが、KO マウスにおける多様な表現型が単一の基質で制御されているかどうかは不明である。また、SIK3 は睡眠、代謝、概日リズムに加えて骨形成にも関与しており、多様な生理機能を担う主要な制御因子といえる。そこで、SIK3 による複数の生理機能支配に共通の経路が存在するの否かを探るべく、基質探索を実施する。多様な生理機能の調節機構における固有の経路あるいは共通経路の実態を明らかにする。

(3) 概日時計と睡眠の相互作用は古くから注目されてきたが、両者の関連を説明し得る分子基盤は未解明である。また、近年時計遺伝子 KO マウスの研究などで、エネルギー代謝と概日時計の関連も示唆されているが、そのメカニズムは不明な点が多い。本研究では、「概日時計の正常な駆動が睡眠やエネルギー代謝を含む恒常性維持に必要である」との仮説を検証する。

3. 研究の方法

(1) PER2 の分解における SIK3、CKI による PER2 の個別分解のダイナミクスと相関解析
PER2 は SIK3 と CKI によってそれぞれリン酸化され、独立の経路で分解誘導されることが示唆される。そこで、SIK3 による PER2 分解経路を同定し、並行して複数の kinase が関与する生理的意義を明らかにする。阻害剤を用いた薬理学実験や後述するプロテオーム解析で、PER2

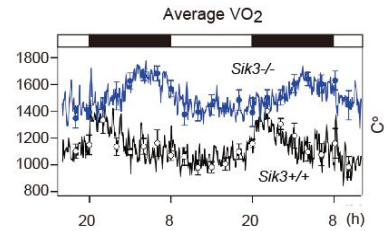


図 1 *Sik3* KO マウスにおける酸素消費リズムの位相後退 (上: KO マウス、下: 野生型) 酸素消費のリズム位相が約 6 時間後ろにずれている。

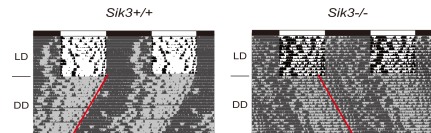


図 2 *Sik3* KO マウス (右) の活動リズムの劇的異常 明暗条件 (LD) で休息期 (昼) の活動亢進と夜の活動低下。恒暗条件 (DD) では、活動リズム周期の有意な延長が見られる。

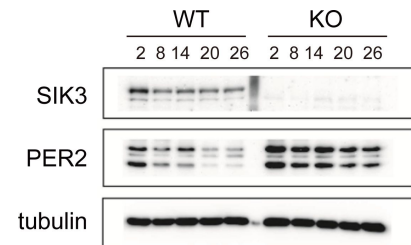


図 3 SIK3 の基質の発見: *Sik3* KO 線維芽細胞における PER2 時計タンパク質の発現亢進
野生型 (WT) と比較して、KO マウスでは PER2 の著明な発現の情報が見られる。SIK3 のリン酸化による PER2 分解の促進を示唆。

の分解経路とその下流で発現が変動する因子を同定する。また、CRISPR/Cas9 システムで PER2 の SIK3/CKI 被リン酸化部位に突然変異を導入した複数の細胞を用いるなどして、2 つの kinase による PER2 リン酸化が概日リズム制御に果たす役割をそれぞれ明らかにする。

(2) 概日リズム、睡眠、代謝に関与する共通または個別の基質探索・同定

Sik3 KO マウス組織や細胞を用いて、時計関連タンパク質、既に報告されている SIK3 の基質候補とリズムとの関連を検討する。また、必要に応じてプロテオーム解析を実施し、SIK3 の新たな基質候補を同定する。既に SIK3 の代謝制御関連で報告された基質 (HDAC class II や CRTIC1/2) が脳視床下部 (リズム・睡眠制御) でも SIK3 の支配下にあるのか、PER2 以外の時計あるいは睡眠関連タンパク質が同定されるかが注目される。基質候補の解析から、SIK3 による独自の生理機能制御と普遍的な経路の差異や共通項を明らかにする。

(3) 概日時計中枢特異的な SIK3 機能操作と睡眠・代謝に及ぼす影響の検討

上記 (1) (2) で解析した SIK3 を含む概日リズム制御機構が、睡眠やエネルギー代謝の制御にも積極的に関与するののかについて明らかにする。アデノ随伴ウイルス (AAV) と CRISPR/Cas9、Cre-loxP システムを組み合わせ、脳視床下部概日時計中枢 (視交叉上核、SCN) 特異的な *Sik3* KO マウス (GAD67-Cre マウスや Nestin-CreER^{T2} マウスの SCN に FLEX-Cas9 ウイルス及び *Sik3*-gRNA ウイルスを誘導するなど) を作製して、睡眠や代謝への影響について解析を行う。

4 . 研究成果

(1) SIK3 が関与する PER2 分解経路を明らかにし、また、既に報告された CKI のリン酸化による PER2 の分解促進機構とは異なる経路が存在する意義について明らかにするため、代表者は SIK3 による PER2 分解に関与するシグナル伝達経路の探索を実施した。その結果、経路の候補として、オートファジーに注目した。SIK3 の KO 細胞や SIK3 過剰発現細胞と正常群でのオートファジーマーカーの量的比較を実施した結果、SIK3 の発現オートファジーマーカーの発現には有意な相関が見られた。以上の結果から、CKI が PER2 を時間特異的に分解するメカニズムとは独立して、SIK3 が共通の基質 PER2 の分解を誘導していることが示唆された。次に、CKI と SIK3 が概日リズム制御の中でどのような役割を果たし、協調的あるいは相反する役割を果たしているのか、という疑問が残る。そこで、タンパク質の発現自体には日内変動が見られない SIK3 の被リン酸化部位の特定を試みた。SIK3 の複数の被リン酸化部位に対する抗リン酸化 SIK3 抗体を複数作製したが、特定被リン酸化部位を特定できる抗体を見出すことが出来なかった。これは、SIK3 タンパク質が構造的に適正な抗リン酸化抗体の作製が困難である要因となっていることが示唆される結果となった。また、プロテアソーム阻害剤を用いて、CKI が制御する PER2 分解経路を阻害することにより、SIK3 特異的な PER2 分解の概日変動について検討を行なったが、SIK3 独自の制御による PER2 の量的変動を有意に捉えられなかった。この結果は、PER2 タンパク質自体の発現が複数の抗体を用いた限りでは非常に低く、厳密に定量的といえる実験が困難であるために、正確な量的変動が再現性良く検出できなかったことに一因があると考えられる。CKI、*Sik3* 双方の KO マウスあるいはそれぞれの個体から採取した細胞における PER2 の概日変動や、それぞれの阻害剤を投与した場合の PER2 の量的変動の厳密な比較解析など、さらなる検討が必要であると考えられる。

(2) 概日リズム、睡眠、代謝の制御に独自に、あるいは共通して関与する SIK3 の新規基質候補探索を実施し、注目すべき分子に焦点を当てて SIK3 シグナル伝達経路に果たす役割を解析した。その結果、PER2 以外に、HDAC class II (histone deacetylase class II) の複数のタンパク質や、脳における機能が発生の期の神経の適所配置 (migration) 以外に報告されていなかったケモカイン受容体 (CXCR4)、cAMP 反応性遺伝子と呼ばれる一群の遺伝子の発現を誘導する CREB (cyclic AMP-responsive element-binding protein) の共役因子 CRTICs (cAMP-regulated transcriptional co-activators)、時計タンパク質、オートファジー関連タンパク質など、複数の基質候補群を同定した。その中で、ケモカイン受容体 (CXCR4) およびそのリガンド (CXCL12 ケモカイン) を介した概日リズム制御について解析を行った結果、ケモカイン受容体は主として視交叉上核の神経に発現し、ケモカインリガンドは視交叉上核のアストロサイトを含む一部の細胞に発現していることが明らかになった。ケモカイン・受容体を介した化学走性と実際にアストロサイトの局在の変化に概日リズムが見られることから、神経とアストロサイトの相互作用の概日変動がケモカインシグナルを介して制御されている可能性が浮上した。このことをさらに検証するために、中枢神経系、またはアストロサイト特異的なケモカインあるいはケモカイン受容体 KO マウスを作製し、活動リズム等に関する解析を実施した。その結果、ケモカイン、ケモカイン受容体 KO マウスではいずれも、活動の概日リズム周期の有意な短縮が観察された。以上の結果から、上記のケモカインシグナルは、行動の概日リズムに積極的に関与することが示唆され、その制御は SIK3 のリン酸化を直接、あるいは間接的に介していることが示唆された。

(3) SIK3 による概日リズムの制御が睡眠や代謝に及ぼす影響について、概日時計中枢特異的な *Sik3* 遺伝子組換えマウスや細胞を用いて検討した。神経特異的、グリア特異的、あるいは神

経系特異的 *Sik3* KO マウスを作製し、行動リズム測定と並行して、同じ個体で睡眠測定を実施した。以上の実験の結果、神経またはグリア特異的な *Sik3* ノックアウトマウスで、活動リズムと睡眠の双方に異常が観察され、*SIK3* シグナルが概日時計と睡眠という、これまでブラックボックスであった相互作用の実態を分子レベルで繋げる経路の一部であることが示唆された。一方で、概日リズム変容が共通して観察されたのに対し、睡眠の異常は量（時間）、質（パターン）とも問わずであり、有意な変化が観察されない個体が約半数を占めていた。以上の結果から、*Sik3* ノックアウトマウスで観察された睡眠・覚醒リズムの異常は、主として概日時計に起因するリズム異常によるものであるとの可能性が考えられる。睡眠パターンの異常については、活動リズムの「乱れ」の結果（活動期の夜のみならず、休息期の昼間にも断続的に活動を続け、正常のマウスのような一定時間の睡眠や正常なレム、ノンレム睡眠の継続が観察されない。これには個体差があり、それが睡眠異常の有無に影響されている可能性がある。上記図2の黒で示された活動期の分布で、右の KO マウスが昼夜問わず活動している点に注目）、睡眠の量的あるいは質的な変化が二次的に観察されている可能性も否定できない。したがって、*SIK3* が睡眠制御において中心的な役割を果たしているとの可能性は低く、*SIK3* が概日時計の正確な駆動の制御を介して、正常な睡眠を維持していることが示唆された。

脳内の概日時計と睡眠中枢の相互作用は未解決の点が多いが、本研究の成果から、*SIK3* という共通分子を介して、概日リズムと睡眠の一部が共通分子を介して制御されていることが初めて示され、やはり睡眠とリズム制御の両者に関与するとの報告がある *PER2* のみならず、新たに同定された別の基質も *SIK3* シグナル伝達経路に含まれる可能性を新たに示すことができた。今後 *SIK3* がそれぞれを制御する脳内領域の特定や、神経とグリアが共存し、それらの相互作用によって機能発現する脳の制御中枢（ネットワーク）の中で、細胞種ごとにどのような役割分担あるいは協調的作用があるのかを解明するなど、現段階における技術的制約を克服した上で、より厳密な研究の実現が重要になると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 早坂直人、平野有沙、深田吉孝	4. 巻 267
2. 論文標題 概日リズム、睡眠、代謝をともに制御する新たなリン酸化シグナル	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 439-444
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Naoto Hayasaka
2. 発表標題 SIK3 signaling: Exploring the missing link between circadian clock and sleep
3. 学会等名 XVI European Biological Rhythms Society Congress (Symposium, Lyon, France) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Naoto Hayasaka
2. 発表標題 A Homeostasis Regulator SIK3 Directs Circadian Rhythms And Sleep Through Multiple Downstream Substrates
3. 学会等名 Society for Research on Biological Rhythms (SRBR) Meeting 2018 (Symposium, Florida, USA) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	深田 吉孝 (Fukada Yoshitaka)	東京大学・大学院理学系研究科・教授 (12601)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	山中 宏二 (Yamanaka Koji)	名古屋大学・環境医学研究所・教授 (13901)	
研究協力者	小野 大輔 (Ono Daisuke)	名古屋大学・環境医学研究所・講師 (13901)	
研究協力者	中村 渉 (Nakamura Wataru)	長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授 (17301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関