

令和 5 年 4 月 20 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03292

研究課題名(和文)ユニバーサル時計遺伝子から紐解く体内時計の原理と起源

研究課題名(英文)Principles and origins of biological clocks unraveled from universal clock gene

研究代表者

金 尚宏 (Kon, Naohiro)

名古屋大学・生命農学研究科(WPI)・特任講師

研究者番号：80822931

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではCa<sup>2+</sup>シグナルが、概日時計の温度補償性に生物種を超えて普遍的に関わるメカニズムであることを示した。また、細胞膜のNa<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>交換輸送体(NCX)およびCa<sup>2+</sup>/CaM依存性タンパク質キナーゼII(CaMKII)の各アイソフォームの体内時計における役割をマウスを用いて解析した。NCX2heteroノックアウトマウスおよびNCX2heteroNCX3homoノックアウトマウスは、野生型マウスと比べて長周期の輪回し行動リズムを示すことを報告した。さらに、CaMKIIalpha、CaMKIIbeta変異マウスでは行動リズムのリズム性が低下することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

転写ループ(TTFL)モデルは、概日時計の基本骨格として30年近く受け入れられてきた。しかし近年、時計遺伝子が機能しない細胞においても概日リズムが観察され、振動メカニズムの再考が求められている。そして、動物、植物、真菌、シアノバクテリアで保存された起源的な振動本体が存在することが示唆されていた。申請者は、温度補償性という概日時計の特性の研究から、Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>交換輸送体(NCX)とCa<sup>2+</sup>/カルモジュリン依存性タンパク質キナーゼII(CaMKII)がTTFLの上流に位置する鍵分子であることを見出し、細胞内Ca<sup>2+</sup>シグナルは生物系統で保存された起源的な時計の仕組みであることを突き止めた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we showed that Ca<sup>2+</sup> signaling is a universal mechanism for temperature compensation of the circadian clock. In addition, we investigated which isoforms of the plasma membrane Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger (NCX) or Ca<sup>2+</sup>/CaM-dependent protein kinase II (CaMKII) are involved in the control of mammalian behavioral rhythms by using mutant mice. We reported that NCX2 hetero knockout mice or NCX2 hetero NCX3 homo knockout mice exhibit long period length in wheel-running rhythms compared to wild-type mice (Science Advances, 2021). Furthermore, we found that the CaMKIIalpha and CaMKIIbeta mutant mice showed decreased amplitude in locomotor activity rhythms.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：概日時計 Ca<sup>2+</sup>シグナル 温度補償性 CaMKII 進化的保存性

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

約 24 時間周期の生物時計である概日時計はシアノバクテリアからヒトまで存在し、光環境の周期的な変化を予測することで生物の適応度を高めている。概日時計の分子研究は、リズム変異体の発見を基に 1990 年代から爆発的に進み、ショウジョウバエ、哺乳類、アカパンカビ、シロイヌナズナ、シアノバクテリアにおいて時計遺伝子が次々にクローニングされた。これらの生物系統における時計遺伝子の配列相同性は限定的ではあるものの、自身の転写を抑制する転写・翻訳フィードバックループ (TTFL) を形成することは共通していた。すなわち、動物、植物、真菌、細菌において概日リズムを担う転写ループは独立に進化したと考えられている。しかし 12 年ほど前から、核の無い赤血球や時計遺伝子の欠損細胞においても概日リズムが見出され [Nature, 469, 498, (2011) など]、TTFL が概日時計のコア振動体であるという考えが大きく揺らいでいる。そして、細胞のハウスキーピング機能に関わるいくつかの概日リズムは多くの生物系統に共通して観察されることが報告され、種を超えて存在する起源的な振動本体・ユニバーサルクロックの存在が想定された [Nature, 485, 459 (2012) など]。これまで、世界中の研究者が血眼になってその振動本体を追求してきたが、実体解明には至っていない状況である。

### 2. 研究の目的

申請者は上記の課題にアプローチする上で、温度補償性という概日時計の温度特性に着目した。温度補償性とは全ての生物種の概日時計に観察され、時計の発振速度が生理的温度範囲で一定に保たれる性質である。温度補償の分子メカニズムは、最初の時計遺伝子変異体の報告から 40 年ほどたった現在でも未解明であった。そこで申請者は、これまでに哺乳類の概日時計の新規シグナリングを同定してきた経験を活かし (Kon et al., Nature Cell Biology, 2008; Kon et al., Genes and Development, 2014)、さらに製薬企業にて培ったスクリーニング技術 (Kon et al., Scientific Reports, 2017) を応用して、培養細胞の転写リズムに対して化合物や遺伝子をハイスループットに評価する系を構築した。本研究計画では、温度補償性の分子メカニズムの解明を通じて、生物に普遍的に存在する概日時計の原理にアプローチした。

### 3. 研究の方法

上記の細胞評価系を用いて、温度補償性に関わる遺伝子および低分子化合物をスクリーニングする。温度補償性に関わる分子が同定できた際には、どういったメカニズムで温度補償性が成立するのかを分子細胞生物学的に解析する。

また、当該遺伝子が同定された際には、哺乳類だけでなく、昆虫や植物、細菌の時計における役割を解析することで、メカニズムの普遍性を検証する。

さらに、哺乳類における時計機構を深く理解するため、遺伝子改変マウスを用いた解析により、分子と行動との関連を精査する。

### 4. 研究成果

培養細胞を用いた概日リズムの解析により、ほとんどの時計遺伝子群は温度補償性への寄与が無いことが分かった (論文投稿準備中)。そこで、低分子化合物を用いたスクリーニングを行ったところ、Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin protein kinase II (CaMKII) 阻害剤、および細胞膜のイオン輸送タンパクである Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger (NCX) 阻害剤の存在下では、転写リズムの温度補償性が破綻することを見出した。これら 2 つのタンパク質はともに Ca<sup>2+</sup>シグナルを伝達する重要経路である。そこで、細胞内 Ca<sup>2+</sup>レベルのイメージング解析を進めたところ、細胞内 Ca<sup>2+</sup>レベルは温度低下によって NCX 依存的に活性化し、転写ループの振動速度低下を補償することを突きとめた (Wang et al., Scientific Reports, 2022)。また、高濃度の CaMKII 阻害剤や NCX 阻害剤の存在下では転写時計が停止することを見出し、NCX-CaMKII シグナリングは温度補償性と自律振動性の両性質に必須であることが明らかとなった。これらことから、Ca<sup>2+</sup>シグナルは転写ループの上流で機能するシグナルであることが明らかとなった。そこで、国内の様々な研究室と共同研究にて、多様な生物種において概日時計の Ca<sup>2+</sup>シグナリングの役割を検証した。ショウジョウバエにおいては、NCX を欠損すると活動リズムが完全消失することが分かった。シロイヌナズナの遺伝子発現リズムにおいては、Ca<sup>2+</sup>シグナル阻害によって温度補償性が大きく崩れることが分かった。そして、低温応答性 Ca<sup>2+</sup>によるタンパク質リン酸化シグナルは、哺乳類、昆虫、植物で保存された低温応答であることを確認した。さらに、シアノバクテリアにおいて NCX 欠損株を作製したところ、転写リズムの温度補償が大きく阻害されることがわかった。すなわち、動物、植物、原核生物に共通する世界初のユニバーサル時計遺伝子として、NCX の存在が明らかとなった (Kon et al., Science Advances, 2021)。

また、NCX および CaMKII が哺乳類の個体レベルの概日時計においてどのような役割を果たすかを理解するため、どのアイソフォームがどのようにマウスの行動リズムの制御に関与しているのかを調べた。その結果、NCX2hetero ノックアウトマウスおよび NCX2heteroNCX3homo ノックアウトマウスは、野生型マウスと比べて長周期の輪回し行動リズムを示すことが分かった。さらに、CaMKIIalpha、CaMKIIbeta 変異マウスを解析したところ、行動リズムのリズム

性が低下することを見出した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Naohiro Kon, Hsin-Tzu Wang, Yoshiaki S Kato, Kyouhei Uemoto, Naohiro Kawamoto, Koji Kawasaki, Ryosuke Enoki, Gen Kurosawa, Tatsuto Nakane, Yasunori Sugiyama, Hideaki Tagashira, Motomu Endo, Hideo Iwasaki, Takahiro Iwamoto, Kazuhiko Kume, Yoshitaka Fukada	4. 巻 7
2. 論文標題 Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> exchanger mediates cold Ca <sup>2+</sup> signaling conserved for temperature-compensated circadian rhythms.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 abe8132
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.abe8132	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 -

1. 著者名 Manhui Zhang, Kouhei Kobayashi, Haruki Atsumi, Yuma Katada, Yusuke Nakane, Junfeng Chen, Ryo Nagano, Naoya Kadofusa, Taeko Nishiwaki-Ohkawa, Naohiro Kon, Tsuyoshi Hirota, Ayato Sato, Toshiaki Makino, Takashi Yoshimura	4. 巻 11
2. 論文標題 Modulation of circadian clock by crude drug extracts used in Japanese Kampo medicine	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 21038
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-00499-w.	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 -

1. 著者名 Hsin-tzu Wang, Shiori Miyairi, Miho Kitamura, Kosuke Iizuka, Yoshimasa Asano, Takashi Yoshimura, Naohiro Kon	4. 巻 12
2. 論文標題 Real time monitoring of cold Ca <sup>2+</sup> dependent transcription and its modulation by NCX inhibitors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 17325
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-22166-4.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Daisuke Ono, Huan Wang, Chi Jung Hung, Hsin-Tzu Wang, Naohiro Kon, Akihiro Yamanaka, Yulong Li, Takashi Sugiyama	4. 巻 9
2. 論文標題 Network-driven intracellular cAMP coordinates circadian rhythm in the suprachiasmatic nucleus	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eabq7032
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.abq7032.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 K. Masuda, N. Kon, K. Iizuka, Y. Fukada, T. Sakurai and A. Hirano.	4. 巻 in press
2. 論文標題 Singularity response reveals entrainment properties in mammalian circadian clock.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 in press
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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計23件 (うち招待講演 20件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 金 尚宏
2. 発表標題 表出リズムの温度補償性
3. 学会等名 名古屋リズム研究会 2021年6月11日 オンライン形式 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hsin-tzu Wang, Naohiro Kon, Takahiro Iwamoto, Yoshitaka Fukada.
2. 発表標題 Cold Ca <sup>2+</sup> signaling for temperature compensation of circadian rhythms.
3. 学会等名 Society for Mathematical Biology 2021 Virtual Annual Meeting, Mini symposium 2021年6月15日 オンライン形式 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金 尚宏
2. 発表標題 生物時計の温度補償性 -変化する外部環境の中で一定の内因リズムを刻む仕組み-
3. 学会等名 生理学研究所研究会 温熱生理研究会 オンライン形式 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金 尚宏
2. 発表標題 新規の創薬標的の同定を目指した低分子化合物の探索
3. 学会等名 Bio Japan 横浜市、ポスター発表
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金 尚宏, 岩本 隆宏, 深田 吉孝
2. 発表標題 環境温度と生物時計
3. 学会等名 第94回日本生化学会 オンライン形式、オーガナイザー兼任 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金 尚宏
2. 発表標題 分子時計の温度補償性
3. 学会等名 生理学研究所研究会 極限環境適応 ハイブリッド形式、岡崎市、オーガナイザー兼任 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金 尚宏, 岩本 隆宏, 深田 吉孝
2. 発表標題 分子発振の起源をたどる
3. 学会等名 第28回日本時間生物学会、ハイブリッド形式、那覇市、オーガナイザー兼任 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮入菜、王幸慈、吉村崇、金尚宏
2. 発表標題 概日時計におけるミトコンドリアカルシウムユニポーター (MCU) の役割とMCU制御化合物の開発
3. 学会等名 第28回日本時間生物学会、ハイブリッド形式、那覇市、ポスター発表
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林 耕平、T. Katherine Tamai, 武田紗輔、角房直哉、佐藤綾人、金尚宏、中根右介、吉村崇
2. 発表標題 概日リズム振幅を制御する化合物の探索
3. 学会等名 第28回日本時間生物学会、ハイブリッド形式、那覇市、ポスター発表
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Naohiro Kon, Takahiro Iwamoto, Yoshitaka Fukada
2. 発表標題 Biological Clock in Cold World
3. 学会等名 日本分子生物学会、ハイブリッド形式、横浜市（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金 尚宏
2. 発表標題 生物時計の温度補償性 -低温環境でも概日時計が一定の速度を保つ仕組み-
3. 学会等名 第4回冬眠休眠研究会、オンライン形式（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金 尚宏, 岩本 隆宏, 深田 吉孝
2. 発表標題 体内時計におけるNa <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> 交換輸送体の役割とその創薬応用
3. 学会等名 第95回日本薬理学会、ハイブリッド形式、福岡市（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金 尚宏, 岩本 隆宏, 深田 吉孝
2. 発表標題 低温適応を担うCa <sup>2+</sup> シグナリング：概日時計の温度補償性
3. 学会等名 第99回日本生理学会、ハイブリッド形式、仙台市（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金 尚宏
2. 発表標題 カルシウムクロック：体内時計と生命の環境応答
3. 学会等名 名古屋大学農学部セミナー 2020年10月29日 オンライン形式（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 金 尚宏
2. 発表標題 概日時計と生命の環境応答
3. 学会等名 生理学研究所バイオフィトニクス研究グループセミナー 2020年12月2日 岡崎市（招待講演）
4. 発表年 2020年



1. 発表者名 Naohiro Kon
2. 発表標題 Calcium Clock: Mechanism of Circadian Oscillator and Environmental Responses of Life
3. 学会等名 名古屋大学ITbMセミナー 2020年12月14日 オンライン形式(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 金 尚宏
2. 発表標題 革新的分子として何を指すか? -学術と臨床、ビジネスを歩んで-
3. 学会等名 名古屋大学ITbM Tea breakセミナー 2021年2月25日 オンライン形式(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金 尚宏
2. 発表標題 概日時計の分子発振機構とその起源
3. 学会等名 名古屋市立大学薬学部セミナー 2021年3月16日 名古屋市(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金 尚宏
2. 発表標題 カルシウムシグナルから紐解く概日リズムの生成原理
3. 学会等名 第100回日本生理学会(招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 金 尚宏
2. 発表標題 リズムの無い細胞から紐解く概日時計の成立条件
3. 学会等名 生理学研究所研究会 第二回極限環境適応（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金 尚宏
2. 発表標題 概日リズムの源流をたどる-時間生物学のディープな世界-
3. 学会等名 第4回冬眠生物学領域会議（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Naohiro Kon
2. 発表標題 Roles of Ca <sup>2+</sup> signaling in molecular clocks
3. 学会等名 Sapporo Symposium（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金 尚宏
2. 発表標題 概日時計の温度補償性 -低温Ca <sup>2+</sup> シグナルによる生化学振動の制御-
3. 学会等名 Neuro2022（招待講演）
4. 発表年 2022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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------