

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19147

研究課題名（和文）概日性Ca²⁺振動を担う分子的基盤の解明研究課題名（英文）Elucidation of the molecular basis of circadian Ca²⁺ oscillations

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） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：動物において多くの概日リズムは、転写ループによって生み出されている。しかし、転写ループが機能しない動物細胞でも概日リズムが報告され、仕組みの理解に関して混沌とした状態が続いている。申請者はこれまでの研究により、概日性Ca²⁺振動が転写ループの上位に位置する祖先的な振動体なのではとの考えに至った。本研究では、線維芽細胞や癌細胞といった非興奮性の細胞においても、明瞭な概日性Ca²⁺リズムが存在することを明らかにした。また、600種類のイオンチャネル阻害剤を用いた薬理スクリーニングから、概日性Ca²⁺リズムの生成には、K⁺イオンの制御因子が重要であることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

体内時計が生み出す約24時間の生物リズムは、動物では睡眠や代謝、免疫などの様々な生理機能に観察される。そのため、体内時計を自由に操ることができれば、動物の生産性や疾患の治療といった生命科学の技術イノベーションに直結する。これまでの研究から申請者は、細胞内Ca²⁺シグナルは、動物、植物、細菌において共通して機能する祖先的な時計因子であることを見出し、細胞内Ca²⁺振動、すなわちカルシウムクロックが体内時計の本質であるとの考えに至った。本研究では、非興奮性の細胞においても、明瞭な概日性Ca²⁺リズムが存在することを明らかとなり、概日Ca²⁺振動の役割に関して普遍的な役割が明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Many circadian rhythms in animals are generated by transcriptional loops. However, circadian rhythms have been reported in animal cells in which the transcriptional loop does not function, and understanding of the mechanism remains chaotic. The applicant's previous research led him to believe that circadian Ca²⁺ oscillations are ancestral oscillators that are superior to transcriptional loops. In this study, we demonstrated that clear circadian Ca²⁺ rhythms exist even in non-excitable cells such as fibroblasts and cancer cells. In addition, pharmacological screening using 600 types of ion channel inhibitors revealed that K⁺ ion control factors are important for the generation of circadian Ca²⁺ rhythms.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：概日時計 Ca²⁺シグナル 温度補償性 CaMKII 進化的保存性

1. 研究開始当初の背景

概日時計のメカニズム研究は時計遺伝子の発見を皮切りに 1990 年代から爆発的に進み、動物や植物においては転写フィードバックループモデルが定着した。しかし 10 年ほど前から、転写ループが機能しない動物細胞でもレドックス等のリズム現象が報告され、ノーベル賞の受賞対象ともなった定説「概日時計における転写ループ中心説」が揺らいでいた。さらに、全ての生物種で共通する振動体の存在を示唆するデータが相次ぎ、リズム研究者の学会が騒然となっていた。その後、世界中の研究者が生命共通の振動体を追求してきたが、その実体解明には至っていない状況であった (ゴードン会議、2019)。

申請者は、哺乳類の概日時計の新規制御因子を同定してきた中で (Kon et al., Nat Cell Biol, 2008; Kon et al., Genes Dev, 2014)、上記課題にアプローチする上で独自の方法を考案した。謎を解く鍵として、温度補償性 (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) に着目した。薬理的なランダムスクリーニングを行った結果、Ca²⁺/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⁺/Ca²⁺ 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。さらに解析を進めたところ、細胞内 Ca²⁺-CaMKII シグナ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 (Kon et al., Science Advances, 2021)。また、高濃度の CaMKII 阻害剤や NCX 阻害剤の存在下では転写ループ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。このような結果から、Ca²⁺振動は転写ループの上流振動体として働くコア振動体であることが示唆された。そのため、この概日性 Ca²⁺振動・カルシウムクロックこそが生命共通の振動体の最有力候補であると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、概日性 Ca²⁺振動を担う新規分子を哺乳類細胞で同定するとともに、その原理が多くの細胞種で共通して機能するかを検証する。

3. 研究の方法

これまでの研究から、概日 Ca²⁺振動が時計の重要な性質に深く関わることが明らかとなった。しかし、実際に明瞭な概日性 Ca²⁺リズムが報告されているのは哺乳類の時計中枢である視床下部の視交叉上核に限定されている。本研究を遂行する上で重要なリサーチクエスションは、視交叉上核以外の末梢細胞にも概日 Ca²⁺リズム観察されるのか? というポイントである。末梢の細胞は単離した培養下でも遺伝子発現に概日リズムが観察されるため、概日時計を有していることは明白である。そのため、もしカルシウムクロックが時計の中心的なメカニズムであるのならば、末梢の非興奮性細胞においても概日 Ca²⁺リズムが観察されるはずである。そこで本研究では、不死化した培養細胞株を用いて、概日 Ca²⁺リズムの計測系の構築を試みる。

また、その測定系を用いて、概日 Ca²⁺リズムの生成に関わる因子を 600 種のイオンチャンネル阻害剤ライブラリを用いて探索する。

4 . 研究成果

はじめに、視交叉上核の Ca^{2+} イメージングで確立した手法である GCaMP6s を用いて、蛍光顕微鏡により生細胞イメージング測定を行なった。種々の試行錯誤の結果、培養細胞では一細胞から得られる蛍光強度が低いこと、そして、細胞が時間とともに移動し、数日間にわたって一細胞を追跡することが難しいことが判明した。そのため、蛍光顕微鏡を用いた方法から、光電子増倍管 (PMT) を用いた方法に切り替えた。スプリット型のルシフェラーゼによる新規 Ca^{2+} プローブを安定的に発現する Rat-1 線維芽細胞を樹立し、35-mm dish に播種後、dish 全体からの発光を PMT で 1 週間にわたって計測した。その結果、約 24 時間周期の発光リズムを計測することができた。そして重要なことに、この Ca^{2+} リズムは、時計遺伝子 *Period2* の発現リズムのピーク位相と比べて数時間ほど先行していた。*Period2* に対する Ca^{2+} リズムの先行は、概日時計中枢である視交叉上核においても報告されている (Enoki *et al.*, Scientific Reports, 2017)。そのため、細胞内 Ca^{2+} の概日リズムは、視交叉上核と類似した位相関係で、非興奮性の末梢細胞においても観察されることが分かった。また、この培養細胞における概日 Ca^{2+} リズムの計測系を用いて、低分子阻害剤のスクリーニングを行なったところ、 K^+ イオンの制御因子が概日リズムに関わることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

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 ²⁺ 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 abq7032
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 14
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 2819
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-023-38392-x.	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 1)Ryosuke Enoki, Naohiro Kon, Kimiko Shimizu, Kenta Kobayashi, Yoshifumi Yamaguchi, Tomomi Nemoto.	4. 巻 26
2. 論文標題 Cold-induced Suspension and Resetting of Ca ²⁺ and Transcriptional Rhythms in the Suprachiasmatic Nucleus Neurons.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 108390
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2023.108390.	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5件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 1件）

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 ²⁺ 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Ca2+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