

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24240058

研究課題名(和文) 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

研究課題名(英文) SCN-Gene-Project: Molecular analysis of biological rhythms

研究代表者

岡村 均 (Okamura, Hitoshi)

京都大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：60158813

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 36,200,000円

研究成果の概要(和文)：視交叉上核(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。我々は今回、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研究(SCN-Gene Project: SCNジーンプロジェクト)を行った。これまでに、行動周期の延長、明暗位相変位時に生じる時差の消失、光照射での過剰変位など、さまざまなリズム異常を呈する遺伝子を単離した。これらの遺伝子の多くはSCN特異的に発現し、細胞間のシグナル伝達に関するものや細胞内メッセンジャー関与物質をコードしていた。

研究成果の概要(英文)：Suprachiasmatic nucleus (SCN) is a center of biological rhythm. SCN emits a powerful circadian rhythm signals to other brain regions and various peripheral organs, and synchronizes systemic clocks in order of the central clock. We started SCN-Gene Project, in which genes expressed in SCN were identified histochemically, and were characterized in rhythms by making their knockout mice. By the SCN-Gene Project, we so far identified animals with longer period length, or with stronger reaction to light pulse in the night. Moreover, we isolated mice without jet lag: they abruptly change their behavioral rhythms when they are exposed to new light-dark cycles. Many of these genes, were not directly related to circadian transcription, but directly linked to intercellular or intracellular signal transductions. These findings suggest that posttranscriptional processes are strongly involved to characterize the nature of the clock.

研究分野：時間医学

キーワード：時計遺伝子・視交叉上核・時差

1. 研究開始当初の背景

生体リズムはほとんどの生理現象に関与しているが、とりわけ睡眠覚醒と深く関係している。睡眠異常には各種あるが、ライフスタイルの急速な変貌による生体リズム異常による睡眠障害が増加している。これは、ジェット機海外旅行や、交替制勤務によるものとともに、概日リズム睡眠障害 circadian rhythms sleep disorders (睡眠相後退症候群、睡眠相前進症候群、非 24 時間睡眠・覚醒症候群など) によるものが注目されている。その病因としては、全身の時計を束ねる視交叉上核 (SCN) の機能異常が特に注目されている。しかるに、SCN の神経分子機構は、その大部分が未解明なままである。

今回、SCN に発現する遺伝子を *in situ* hybridization により網羅的に探索し、それらの遺伝子の個々のノックアウトマウスを作製し、概日行動リズム異常を検索する SCN-Gene Project による新たな生体リズムの制御因子を同定する。

2. 研究の目的

本研究は、SCN-Gene Project によりヒト概日リズム睡眠障害に類似した動物モデルを作成し、疾患の原因遺伝子を探る試みである。

3. 研究の方法

SCN-Gene Project の具体的なプロセスは以下のように進められる。1) 直径 0.5mm の SCN をパンチアウトし、Affimatrix Mouse Genome 430 2.0 Array による第一次スクリーニング。2) SCN での定量形態学的手法 (*in situ* hybridization) による二次スクリーニングにて 2000 個同定、そのうち GPCR 関連 137 個選定。3) 順次、ノックアウトマウスを作成。4) 専用の明暗コントロールボックスにて、個体ごとのマウスの 24 時間行動リズム測定するのみで無く、明暗位相の 8 時間位相前進負荷を行い、時差変異マウスを同定する三次スクリーニング、からなる。

4. 研究成果および考察

1) 時差消失マウスの発見

時差は、自身の体内で正確に時を刻み続ける時計が、瞬時には海外の現地時間にリセットされないため引き起こされる。現在まで、この分子機構は明らかでは無い。我々は、まず、正常の個体において、時差時に時計がどのような律動をしているのかを検索した。時差実験は、日本から米国西海岸への移動にあたる、飼育する明暗環境を 8 時間早める条

件で行った。まず、時差を起こす前後 10 日間にわたって、4 時間毎に SCN をレーザーマイクロディセクション法 (LMD) でサンプリングし、定量的に時計遺伝子の量を測定した。Per2 時計遺伝子は、時差を起こす前は明瞭な日周リズムを示していたが、時差を起こした直後はそのリズム性が消失した。これは他の時計遺伝子も同様であった。その回復には、8 日を要した。この SCN 時計遺伝子の結果は、行動レベルに反映され、マウスは、時差の後、新しい明暗環境に順応するのに 9 日を要した。

次に、全身臓器の体内時計の代表として肝臓と腎臓の 24 時間リズムを検索した。その結果、末梢臓器の時計の時計遺伝子のリズムは、SCN のようなリズム振幅の減弱は伴わず、十分保たれていた。しかし、新しい明暗周期への同調は、SCN の位相変位より 1—2 日長くかかること、肝臓と腎臓では位相変位の程度はほぼ同程度に進行していた。

SCN-Gene Project と時差環境の行動実験パラダイムを組み合わせ、8 時間の位相前進実験をしたところ、バソプレッシン V1a と V1b 受容体を共に欠損したダブルノックアウトマウス (V1a^{-/-}V1b^{-/-}マウス) では、時差が消失していた (作成した V1a^{-/-}V1b^{-/-}マウスは瞬時に新しい明暗位相に変位した)。LMD で SCN の時計を見ても、欠損マウスにおいては、時計遺伝子リズムは、時差を起こしてから 2-3 日目に位相・振幅ともに回復した。しかし、欠損マウスの恒常暗条件下での概日行動リズムの周期、SCN における時計遺伝子の発現リズム、および短時間光照射に対するリズム応答性は全て正常であった。すなわち、V1a^{-/-}V1b^{-/-}マウスは、慣例的な時間生物学的見地からは一見正常なマウスであるが、唯一、時差環境下におかれた時のみ、素早く同調するという特徴を持ったマウスである。

バソプレッシンは SCN ニューロンの主要神経ペプチドであり、V1aV1b 受容体の発現する腹側線条体や中隔核では社会行動に、視床下部背内側核や弧束核で血圧調節に関与すると言われている。今回、細胞レベルの検索より、SCN のほとんどのバソプレッシンニューロンに V1a 受容体が発現することが分った。電子顕微鏡ではまた、バソプレッシン終末とバソプレッシン樹状突起や細胞体への豊富なシナプスがあるが、これは、バソプレッシン神経細胞同士が SCN 内の局所神経ネットワークを形成していることを示してい

る。このネットワークが、V1a^{-/-}V1b^{-/-}マウスでは機能消失していると考えられる。

この SCN の局所ネットワークが如何にして時差に結びつくのかを検証するため、我々は、リアルタイムで SCN 各細胞の各々のリズムが測定可能な Per1-luc レポーターマウスから作成した SCN スライスの生物発光をモニタリングすることにより、SCN の細胞時計は、パソプレッシンによりその順番が規定されていることを明らかにした。

現在まで、本 SCN-Gene Project により、現在までに、行動周期の延長 2 種、行動周期の短縮 1 種、光照射での過剰変位 1 種、リズムの不規則 1 種の遺伝子を単離し、現在神経分子機構を同定中である。本プロジェクトは、生体リズム異常を高率に発見する研究と言え、本研究が、シフトワークにともなう生活習慣病（糖尿病、高血圧、発癌等）の増大が懸念されている現今、その病因および、治療に貢献することを願っている。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 28 件)

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*, 査読有, 342: 85-90, 2013.

産経新聞(10月4日1面) 日刊工業新聞(10月4日17面) 日本経済新聞(10月4日42面) 毎日新聞(10月4日24面) 京都新聞(10月4日25面) 読売新聞(10月6日2面) および科学新聞(11月1日4面)に掲載。BBC News, Independent, CBC News, National Geographic など多数の海外メディアで紹介。また Science に紹介記事 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*, 査読有, 155:793-806, 2013.

Ota T, Fustin JM, Yamada H, Doi M, Okamura H. Circadian clock signals in the adrenal cortex. *Mol. Cell. Endocrinol.*,

349:30-37, 2012.

Fustin J-M, Doi M, Yamada H, Komatsu R, Shimba S, Okamura H: Rhythmic nucleotide synthesis in the liver: Temporal segregation of metabolites. *Cell Reports*, 1:341-349, 2012..

Negoro H, Kanmatsu A, Doi M, Suadicani SO, Matsuo M, Imanura M, Okinami T, Nishikawa N, Oura T, Matsuji S, Seo K, Tainaka M, Urabe S, Kiyokage E, Todo T, Okamura H*, Tabata H, Ogawa O* (*Corresponding): Involvement of urinary bladder Connexin43 and the circadian clock in coordination of diurnal micturition rhythm. *Nature Com*, 3:809, 2012.

Imanishi M, Yamamoto K, Yamada H, Hirose Y, Okamura H, Futaki S. Construction of a rhythm transfer system that mimics the cellular clock. *ACS Chem Biol* 7:1817-1821, 2012.

Negoro H, Kanematsu A, Matsuo M, Okamura H, Tabata Y, Ogawa O. Development of diurnal micturition pattern in mice after weaning. *J Urol* 189:740-746, 2013.

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*, 155:793-806, 2013.

Nugrahaningsih DA, Emoto N, Vignon-Zellweger N, Purnomo E, Yagi K, Nakayama K, Doi M, Okamura H, Hirata KI. Chronic hyperaldosteronism in Cryptochrome-null mice induces high-salt- and blood pressure-independent kidney damage in mice. *Hypertens Res*. 37: 202-209, 2014.

Doi M, Satoh F, Maekawa T, Nakamura Y, Fustin JM, Tainaka M, Hotta Y, Takahashi Y, Morimoto R, Takase K, Ito S, Sasano H, Okamura H. Isoform-specific monoclonal

antibodies against 3β -hydroxysteroid dehydrogenase /isomerase family provide markers for subclassification of human primary aldosteronism. *J Clin Endocrinol Metab*, 99: E257-262, 2014.

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. *Mol Cell Endocrinol*, 382:131-138, 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 3β - Hydroxy steroid dehydrogenase isoenzyme through de novo protein synthesis of the orphan nuclear receptors NGFIB and NURR1. *Mol Cell Biol*, 34:3880-3894, 2014.

Suehiro K, Nakamura Y, Xu S, Uda Y, Matsumura T, Yamaguchi Y, Okamura H, Yamashita T, Takei Y. Ecto-domain phosphorylation promotes functional recovery from spinal cord injury. *Sci Rep*, 4:4972, 2014.

Azmahani A, Nakamura Y, Felizola SJ, Ozawa Y, Ise K, Inoue T, McNamara KM, Doi M, Okamura H, Zouboulis CC, Aiba S, Sasano H. Steroidogenic enzymes, their related transcription factors and nuclear receptors in human sebaceous glands under normal and pathological conditions. *J. Steroid Biochem Mol Biol*, 144 Pt B:268-279, 2014.

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. 3β -hydroxysteroid dehydrogenase isoforms in human aldosterone-producing adenoma. *Mol Cell Endocrinol*, 408:205-212, 2015.

岡村均：生体リズム異常と食塩感受性高血圧、*医学のあゆみ* 243:579-585, 2012 .

岡村均、土居雅夫：生体リズムと高血圧、*日本臨床*、第 70:339 - 347、2012 .

岡村均、Fustin J.M.: 生体時計ネットワ

ークによる動的ホメオスタシスとその破綻、*実験医学* 31:765-772, 2013.

山口賀章、岡村均：神経インパルスからホルモンへの時間変換機構（特集：【最新臨床睡眠学-睡眠障害の基礎と臨床】、*日本臨床*、71、 705-710、2013 .

⑲ 山口賀章、岡村均：生物時計と臓器ネットワーク：時差の体内機構（特集：代謝内分泌神経ネットワーク）、*BIO Clinica*、28、 29-34、2013 .

⑳ 山口賀章、鈴木暢、岡村均：バソプレッシン受容体 V1a および V1b を欠損したマウスは時差症状を示さない、*ライフサイエンス新着論文レビュー FIRST AUTHORS* (Online Journal)、 <http://first.lifesciencedb.jp/archives/7777>, 2013.

㉑ 山口賀章、岡村均：視交叉上核、脳科学辞典 (Online Journal) <http://bsd.neuroinf.jp/w/index.php?title=%E8%A6%96%E4%BA%A4%E5%8F%89%E4%B8%8A%E6%A0%B8&oldid=21150>, 2013.

㉒ 山口賀章、岡村均：時差をつかさどる視交叉上核のバソプレッシン神経回路。 *生化学* 86, 687-692, 2014.

㉓ 山口賀章、岡村均：脳内バソプレッシンは時差ボケの原因か。 *医学のあゆみ* 250, 1195-1196, 2014.

㉔ J.M. Fustin, 岡村均：生体リズムの周期はメッセンジャーRNA のメチル化で変動する。 *医学のあゆみ* 251, 179-180, 2014.

㉕ 岡村均 バソプレッシン受容体と時差 *睡眠医療* 8: 211-218, 2014.

㉖ 岡村均、土居雅夫 体内時計とアンジオテンシン II により制御される新規アルドステロン合成酵素と高血圧 *最新医学* 69, 2329-2340, 2014.

〔学会発表〕(計 16 件)

Okamura H: (Keynote lecture) Circadian clocks and diseases. 2012 UCLA Symposium “Circadian Clocks and Metabolic Disease”, in Lake Arrowhead, CA, USA, April 20-22, 2012.

Okamura H. (Plenary Lecture) Circadian Clock genes and hypertension, 15th International Congress of Endocrinology & 14th TH European Congress of Endocrinology, Florence (Fortezza da

Basso), Italy May 05-09, 2012.

Okamura H: (Invited Speaker) Clock genes and hypertension; Symposium "Primary Aldosteronism - Advances in genetics and management", 94th Ann Meeting American Endocrine Society. (ENDO 2012)- Houston (George R. Brown Convention Center), TX, USA, June 23-26, 2012.

Okamura H: (Invited Speaker) Clock gene, aldosterone and hypertension, Hypertension Sydney 2012: 24th Scientific Meetings of the International Society of Hypertension, Hypertension Sydney 2012, Sydney (Australia), Sept 30 - Oct 4, 2012.

Okamura H: (Invited Speaker) Dysregulated clock controlled genes and hypertension, Aldosterone & Salt: Heart and Kidney 2012, Palm Cove (Australia), Oct 5-7, 2012.

Okamura H: (Invited Speaker) Clock genes and aldosterone production, Symposium of Adrenal gland, 15th International Congress on Hormonal Steroids and Hormones & Cancer, Kanazawa (Ishikawa Ongakudo), Nov 15-17, 2012.

Okamura H: (Invited Speaker) Clock, Light and Diseases 1st International Symposium of blue Light Society. JP TOWER Hall & Conference Tokyo, June 6-8, 2013.

Okamura H: (Invited Speaker) New cellular regulations of the circadian clock, Homeodynamics in Clocks, Sleep and Metabolism "Ito International Research Center/Tokyo Univ (Tokyo). Sept 24, 2014.

Okamura H: (Invited Speaker) New inter- and intracellular regulation of the circadian pacemaker. SRBR 2014, Big Sky (Montana USA), June 14-18, 2014.

岡村均: (教育講演) 生体リズム異常と高血圧、第 85 回日本内分泌学会学術総会、名古屋市(名古屋国際会議場) 2012 年 4 月 19 日

岡村均(招待講演) 時計遺伝子の研究最前線、シンポジウム「長寿の秘訣を時間栄養学から探る」、国際素材会議 (International Food Ingredients & Additives Exhibition and Conference: IFIA)および健康食品エキスポ(Health Food Exposition; HFE)健康食品エキスポ、東京(東京ビックサイト) 2012 年 5 月 25 日

岡村均(基調講演) 生体リズム異常と疾病: 臓器の時計とその異常、第 21 回日本小児泌尿器科学術総会、岡山市(岡山コンベンションセンター) 2012 年 7 月 5 日

岡村均(公開講座) からだの時計は今何時? 狂った時計は病気の原因となるのか、第 26 回いのちの科学フォーラム: 体内時計と健康、京都(芝蘭会館) 2012 年 12 月 8 日

岡村均(特別講演) 中枢・肝の時間医学と生活習慣病、第 3 回肥満と消化器疾患研究会(日本消化器病学会付置研究会)、鹿児島(城山観光ホテル): 2013 年 3 月 23 日

岡村均(特別講演) クロノメタボリズム: 時間相の医学生物学、第 51 回日本臨床分子医学会、東京(東京国際フォーラム) 2014 年 4 月 11 - 12 日

岡村均(特別講演 II) 地球と時間と時計遺伝子、第 39 回日本睡眠学会定期学術集会、徳島(あわぎんホール) 2014 年 7 月 3 日 4 日

〔図書〕(計 3 件)

岡村均、山口賀章: 時差の分子機構とその治療。「脳内環境 維持機構と破綻がもたらす疾患研究」(遺伝子医学 MOOK26)、漆谷真、山中宏二・樋口真人・高橋良輔(編集)、228 頁、メディカルドリ(大阪) 2014 .

岡村均、山口賀章、脳内バソプレッシンと時差、「Annual Review 糖尿病・代謝・内分泌 2015」、寺内康夫・石橋俊・伊藤裕(編集)、209 頁、中外医学社(東京)2015 .

岡村均、バソプレッシン V1a 受容体と V1b 受容体の遺伝子を二重欠損させたマウスは時差ぼけに耐性を持つ。「サイエンス誌に載った日本人研究 2013」、American Association for Advancement of Science (AAAS)発行、2014 .

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件) 該当無し

○取得状況(計 0 件) 該当無し

〔その他〕

時差ぼけを防ぐことはできるのか (ニュートン編集部記事: 協力: Newton 2014 年 1 月号 p8.)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

岡村 均 (OKAMURA HITOSHI)

京都大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：60158813

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

山口賀章 (YAMAGUCHI YOSHIAKI)

京都大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号：30467427