

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25293053

研究課題名(和文) 行動・代謝の概日リズム安定性、同調性を制御する新規リン酸化シグナルの解明

研究課題名(英文) A novel kinase signaling involved in the dual regulation of behavior and metabolism

研究代表者

早坂 直人 (Hayasaka, Naoto)

名古屋大学・環境医学研究所・准教授

研究者番号：80368290

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：Salt-inducible kinase 3 (Sik3) は、エネルギーセンサーとして知られるAMP kinase familyに属し、代謝や骨形成などに重要な役割を果たすことが知られている。本研究で我々は、SIK3が新たに概日リズム制御に必要不可欠であることを示した。ノックアウトマウスでは、活動リズムの有意な延長、周期の不安定化等の異常がまた、ノックアウトマウスから採取した培養細胞系や脳培養スライスでは、概日リズム周期の不安定化や細胞間同期の乱れが見出された。この原因を探る中で、時計タンパク質のひとつであるPER2タンパク質がSIK3のリン酸化によって不安定化することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Salt-inducible kinase (Sik3) belongs to AMP kinase family known as an "energy sensor", which is involved in the regulation of various aspects of metabolism and osteogenesis. In the present study, we further suggested that SIK3 is also involved in the circadian clock machinery. The knockout study demonstrated that an average free-running period of locomotor activity was significantly longer, and cells and brain slices from knockouts showed unstable circadian rhythms and intercellular desynchrony. We identified PER2 clock protein as a substrate for SIK3, and the PER2 protein was found destabilized by SIK3-mediated phosphorylation.

研究分野：時間生物学

キーワード：概日リズム リン酸化酵素 代謝 ノックアウトマウス 時計タンパク質

1. 研究開始当初の背景

塩誘導性キナーゼ SIK3 は、エネルギーセンサーとして知られる AMP 活性化プロテインキナーゼ (AMPK) ファミリーに属する。SIK の 3 つのアイソフォームは近年、食塩感受性高血圧シグナル分子候補として単離された。Sik3 KO マウスでは、代謝異常が示唆された。Sik3 KO マウスは 90% 以上が生後すぐ死亡し、残りも骨形成異常、低脂血症、低血糖、胆汁鬱滞などの重篤な病状を呈する。以上のように、SIK3 の代謝における機能の重要性が明らかになってきたが、申請者らは、KO マウスの解析過程で、酸素消費量の概日リズム位相が野生型よりも 6 時間後退していることを見出した。この位相後退は深部体温、摂食量の各リズムにも同様に観察された。Sik3 KO マウスの活動リズムは、夜間の活動リズムの位相後退に加えて、位相の不安定性が明らかになった。また、夜行性は保持するものの、明暗周期への同調 (光同調) が不明瞭であった。同時に、明期の活動・摂食量の有意な上昇が観察された。恒暗条件下では活動周期に有意な延長を認め、恒暗から明暗条件に移すと、明暗サイクルに同調する活動リズムと自由継続するリズムの乖離も見られた。概日時計遺伝子 *Per2* の発光レポーター遺伝子 (*Per2::Luc*) を導入した Sik3 KO 細胞では、不安定な概日リズム周期変動が見られ、SCN の培養スライスでも *Per2::Luc* の位相波 (SCN で同期した神経細胞間で生み出される時計遺伝子発現リズム位相の規則的な波) に異常を認めた。興味深いことに、SIK3 KO 細胞では、野生型とは対照的に、時計タンパク質 PER2 が時刻非依存的に主として核に局在していることも明らかになった。以上の結果から、SIK3 は、概日時計の入力系 (光同調等を制御) と概日振動体 (リズム周期や位相等の制御) の双方で機能する、概日リズム制御に不可欠な因子であることが示唆された。

以上の背景から、リズム研究ではこれまで全く報告の無い SIK3 が、概日リズム制御の鍵となる分子であることを示唆しており、SIK3 シグナルの理解が概日時計分子基盤の解明に不可欠であると考え、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

近年の概日リズム制御研究において、リズムの堅牢性、同調性といった概日時計の特性を理解する上で、タンパク質リン酸化の重要性が明らかになりつつある。我々は近年、代謝機能に不可欠であるリン酸化酵素 SIK3 を同定し、SIK3 の遺伝子 KO マウスを解析する中で、酸素消費、摂食、深部体温等の概日リズム位相が正常と比較して約 6 時間後退していることを発見した。また、このマウスは活動リズム周期の有意な延長、光同調性の異常、更には SCN 神経間の同期率の低下、培養細胞における概日リズム周期の不安定性など、これまでに例を見ない劇的なリズム

異常が観察された。本研究は、SIK3 を介した新規リン酸化シグナル伝達経路の解析を通して、リズム安定性、同調性を保持する概日時計駆動の分子基盤を明らかにすることを目的とする。同時に、本研究が未だ謎の多い代謝とリズムのリンクに重要な知見をもたらすことが期待される。

3. 研究の方法

本研究は、前述の研究目的を達成するために、以下の実験を計画し、実施する。

1) SIK3 のリン酸化制御標的の同定：

申請者らのこれまでの知見から、時計タンパク質 PER2、HDAC class II (Histon deacetylase)、TORC (CREB の co-activator) が SIK3 の制御標的候補として示唆されている。SIK3 によるこれらのタンパク質の概日リズム制御について、明らかにする。また、他の標的候補を同定すべく、作製した SIK3 リン酸化抗体や KO マウスの組織や樹立した細胞株を用いて、SIK3 によるリズム制御標的を、時計関連タンパク質を候補として、あるいは網羅的に探索し、特定する。

2) SIK3 の概日制御中枢 (SCN) におけるリズム周期、位相制御機構と、光入力系における光同調メカニズムの解明：

KO マウスで見られた、概日リズム周期の不安定性、位相後退から、SIK3 が概日振動体 (SCN) において周期、位相の確定や安定化に関与することが示唆された。そこで本研究では、SIK3 を含むシグナル伝達系がどのようなメカニズム概日時計の特性を決めているのかを明らかにする。

3) SIK3 の代謝リズム制御への関与の解明：

代謝機能と概日リズムの関連が近年報告されているが、その詳細なメカニズムは未解明の部分が多い。SIK3 がコレステロール、脂質、糖代謝において鍵を握る酵素であるという申請者らのこれまでのデータと、代謝に関わる器官、組織における SIK3 の高発現、そして、SIK3 が酸素消費や体温、摂食の各リズムを制御しているという結果から、代謝機能と SIK3 シグナルを含むリズム制御の関連が示唆される。「概日リズムと代謝の相関」に関して、SIK3 シグナルの解析を通して明らかにする。

4. 研究成果

1) SIK3 による時計タンパク質 PER2 のリン酸化と分解を介した概日リズム制御の証明

これまで KO マウス、脳 SCN スライス及び細胞培養系の解析から、Salt-inducible kinase 3 (SIK3) が活動リズムや多様な生理リズムの発振に不可欠な制御因子であることを明らかにしてきた。Sik3 KO 細胞及び OX (過剰発現) 細胞で PER2 の発現量の変動が見られたため、SIK3 が概日時計タンパク質 PER2 の安定性や、概日リズム周期や位相に寄与することを示唆した。実際 SIK3 が PER2 を直接リン酸化し、リン酸化された PER2 は積極的に分解されること、そして、PER2 をリン酸化する別の酵素 CKI (casein

kinase I)とは独立に作用し、更には CKI とは別経路で PER2 の分解を促進することを明らかにした。本研究は、概日時計の堅牢性に重要な PER2 タンパク質の量的な制御に、独立に作用する複数のリン酸化酵素が関与することを初めて示したものであり、時計タンパク質の合成と分解で成り立つ発現周期性の fine tuning が複雑な翻訳後修飾により達成されることを示唆した。

2) Sik3 KO マウスの概日リズム制御中枢における細胞間リズム同期変異解析

概日リズムの堅牢性(安定性)には、細胞毎に概日リズム周期が異なるとの報告があるため、細胞間リズム同期による周期の調整が重要であると考えられる。そこで、SIK3 欠損によるリズム周期の不安定化が細胞間リズム同期の破綻に起因するかどうかについて、解析を行った。まず、Sik3 KO マウスから採取したアストロサイト株でシングルセル発光イメージングを行い、Per2-luc の発光リズムを指標として、細胞間リズム同期について野生型細胞株と比較解析した。その結果、野生型アストロサイトでは、数週間細胞間の同期率が非常に高く、細胞全体のリズムが持続したのに対し、Sik3 KO アストロサイトでは、徐々に細胞毎のリズム位相のずれが拡大し、各細胞のリズムがバラバラになった。従って、SIK3 は細胞間リズム情報の伝達とリズム同期に必須の調節因子であることが示唆された。更に、Sik3 KO マウスの SCN のスライス培養で、同様に細胞間リズム同期に関して発光リズムイメージングを実施したところ、正常では細胞間リズム同期が 1 か月以上持続するのに対し、KO SCN では細胞間リズム位相がばらばらになり、約 1 週間で SCN 全体のリズムが消失することを見出した。以上の結果から、SIK3 はアストロサイト間で、また、SCN の神経とアストロサイトを含む細胞間で、細胞毎のリズム同期を制御しており、SIK3 の欠損により同期が失われてリズムが不安定化することが示唆された。

3) SIK3 欠損アストロサイトにおけるリズム不安定化と周期短縮

KO マウスの解析を行ったところ、活動リズムが非常に不安定であり、また、昼夜の光条件の変化に十分に適応できない(光同調不全)マウスであることが明らかになった。このような概日リズムの劇的な異常を示すマウスはこれまで報告されておらず、概日時計の安定性(堅牢性)や柔軟性(同調性)の維持に関与する因子であることが示唆された。また、このマウスからアストロサイト株を樹立し、前述の Per2-luc リズムを測定したところ、活動リズムと同様に、概日リズム周期の不安定性が観察されたが、興味深いことに、個体の活動リズムが延長したのに対して、細胞の平均リズム周期は数時間も短縮していることがわかった。以上から、脳のリズム制御中枢において、アストロサイトは周期の安定化のみ

ならず、リズム周期を規定する役割も果たすことが示唆された。SIK3 は特定の基質をリン酸化し、下流のシグナル伝達経路の調節を介して機能していることが示唆されているが、中枢神経系では基質は不明であった。そこで、SIK3 の基質を探索した結果、時計タンパク質のひとつである PER2 をアストロサイトでリン酸化していることが明らかになった。更に、SIK3 は PER2 を時刻依存的にリン酸化し、PER2 の分解を促進していることがわかった。以上の結果から、SIK3 はアストロサイトにおいて、時計タンパク質の安定性を制御し、概日リズムの堅牢性を保障していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Hayasaka N.*, Hirano A., Miyoshi Y., Tokuda I.T., Matsuda J., Fukada Y. Salt-inducible kinase 3 regulates the circadian clock by destabilizing PER2 protein (eLIFE in press) *Corresponding author

〔学会発表〕(計 4 件) シンポジウムのみ

1. Hayasaka N., A new understanding of the mammalian circadian clock as neuroglial networks. XIV European Biological Rhythm Society Congress (symposium), Manchester, UK, 2015.8

2. Hayasaka N. Involvement of astrocytes in the circadian clock machinery. Gordon Research Congress Chronobiology, Girona, Spain, 2015.6

3. 早坂 直人、代謝・リズムに共通の制御分子から恒常性維持機構を探る。第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会 第 92 回日本生理学会大会合同大会シンポジウム。2015.3 神戸

4. Hayasaka N., A role for Salt-inducible kinase 3 in the central circadian pacemaker in mammals: phosphorylation-dependent degradation of the clock protein. XIII Congress of the European Biological Rhythms Society (Symposium), Munich, Germany, 2013.8

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

早坂 直人 (HAYASAKA, Naoto)
名古屋大学・環境医学研究所・特任准教授
研究者番号：80368290

(2) 研究分担者

徳田 功 (TOKUDA, Isao)
立命館大学・理工学部・教授
研究者番号：00261389

(3) 研究分担者

吉岡 芳親 (YOSHIOKA, Yoshichika)
大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任教授
研究者番号：00174897

(4) 研究分担者

西郷 和真 (SAIGOH, Kazumasa)
近畿大学・理工学部・准教授
研究者番号：50319688