

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15274

研究課題名（和文）生理的微小温度変化によるuORFを介した生物時計位相制御メカニズムの解明

研究課題名（英文）Mechanisms of uORF-mediated biological clock phase entrainment by physiological body temperature rhythms

研究代表者

三宅 崇仁（Miyake, Takahito）

京都大学・薬学研究科・助教

研究者番号：70836866

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題においては、体内時計が概日体温変動という微小で緩やかな温度変化により調律される分子メカニズムの解明を行い、コア時計遺伝子Per2のmRNA 5'非翻訳領域にORFがあること（uORF）、これがPer2のmRNA量はそのままにタンパク質発現量だけを温度上昇に合わせて増加させるために必要なエレメントであることを同定した（Miyake et al., Cell Rep 2023）。さらにその制御分子として、PERK/PKRおよびPI3Kを同定した（Shao et al., BPB 2024; Miyake et al., Cell Rep 2023）。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現代化に伴い増えた慢性時差勤務等は、体内時計と外部環境サイクルとの間に同調不良を生み、それが生活習慣病リスク上昇の起因のひとつとなっている。しかし、外部環境サイクルによる生物時計の位相合わせの仕組みには未だ不明な点が多い。特に、われわれ哺乳類の体温はたった1-3℃という微細な幅で1日に1回ゆるやかに変化する概日リズムを示すが、この概日変動が生物時計を調律する分子機構はほとんどわかっていなかった。本研究の成果は、概日体温変動が生物時計を調律する機構を明らかにしたものである。本成果を応用すれば、体内での時計の不調和を是正し、生活習慣病リスクの軽減や慢性時差ストレスの軽減につながると期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, I found a minimal uORF (upstream open reading frame), which consists of only ATG and stop codons, in the 5'UTR region of core clock gene Per2. Biochemical and genetic assays revealed an important role of Per2 uORF in the expression of Per2 protein in response to physiological temperature changes (Miyake et al., Cell Rep 2023). Further chemical library screening and pharmacological experiments identified PERK/PKR and PI3K as molecular mediators for temperature-dependent Per2 protein expression (Shao et al., BPB 2024; Miyake et al., Cell Rep 2023).

研究分野：時間生物学

キーワード：生物時計 発現制御 mRNA翻訳 uORF 体温

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現代化に伴い増えた慢性時差勤務等は、体内時計と外部環境サイクルとの間に同調不良を生み、それが生活習慣病リスク上昇の起因のひとつとなっている。しかし、外部環境サイクルによる生物時計の位相合わせの仕組みには未だ不明な点が多い。その背景には、これまで mRNA 転写制御を介した生物時計調律機構ばかりが注目されてきた一方で、外部環境サイクルの多くは、日の出によるゆるやかな照度変化に代表されるように、緩徐かつ連続的であるため、閾値の突破を要する mRNA 転写を誘導できないことがある。特に、我々の体内の温度(体温)は、1-3 という小さい幅で、睡眠/覚醒等に合わせて緩やかに概日変動し、これが生物時計の時刻調律に重要であると考えられている。しかし、この緩徐な体温の概日リズムが生物時計に影響を与えるその分子メカニズムについては、一部は転写や mRNA 安定性により説明がなされていたものの、多くが不明なままであった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、体温の概日変動リズムが生物時計の位相を調律するその分子メカニズムの解明である。特に、我々が研究開始当初にその可能性を見出していた upstream open reading frame (uORF) について注目し、体内時計の振動制御に uORF を介した翻訳速度調節機構が関わるかどうかを明らかにする。

3. 研究の方法

所属研究室でこれまでに用いてきた中核時計タンパク質 Per2 への特異的抗体に加え、本研究課題内でゲノム内 Per2 のコーディング領域(CDS)の終末にレポーター遺伝子として特殊なルシフェラーゼ変異体(LucTS、外部環境温度の影響をほとんど受けないように人為的に変異を加えたもの、Tisi *et al.*, *Anal Chim Acta*, 2002 を元に作製)を融合させたマウス線維芽細胞(Per2::LucTS MEF)を作製し、それらを用いて時計遺伝子発現の日内変動を観察した。また、uORF を介した mRNA 翻訳を可視化するために、ribosome profiling を実施した。さらに、uORF の機能をマウス個体レベルで明らかにするために、uORF に変異を加えたマウスを作出した。In vitro における生化学実験に関しては常法に従って行った。なお、本研究における遺伝子改変体(動物・細胞等)を用いる実験は、京都大学(所属機関)において組換え DNA 実験計画書を提出し承認を得て行い、本研究におけるすべての動物実験に関しては、京都大学において策定された動物実験倫理規定に従ったプロトコルの下、動物実験委員会による承認を得た後に実施した。

4. 研究成果

本研究課題において私はまず、Per2::LucTS MEF 細胞を作製した。具体的には、CRISPR-Cas9 を用いてコア時計遺伝子のひとつである Period2 (Per2) のコーディング領域に LucTS をノックインした MEF 細胞を作製した。その後、この Per2::LucTS MEF を 4 つの異なる dish に播種し、互いの細胞時計時刻に 6 時間の位相差を持つように、それぞれに 6 時間毎にデキサメタゾン(Dex)を処置した。次に、これら 4 つのディッシュを長時間リアルタイム発光測定が可能で庫内温度を 0.1 レベルで制御可能な装置(Kronos DI0)にセットし、4 つのディッシュに等しくマウスの体温を模した温度サイクルを与えながら、各ディッシュから放出される発光を経時的に観察した。測定開始 1-2 日目では、各ディッシュは温度の影響を受けておらず、それぞれ互いに 6 時間の位相差を保ったまま、24 時間周期の発光リズムを示した。ところが、観察 1 週間後(180 時間後)では、それぞれのディッシュから観察される発光リズムは完全に同調した。この同調したリズムを詳細に調べると、庫内温度が上昇する少し前のタイミングから Per2::LucTS の発光量が増加してくるということがわかった(図 1)。この結果は、Per2 の発現量が増加するタイミングに温度が上がるのが、細胞にとって都合が良いことを示唆している。

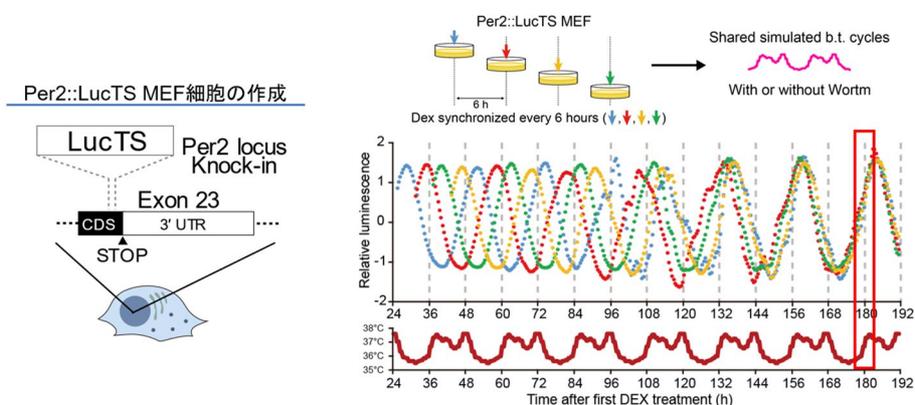


図 1 Per2::LucTS 発現の概日リズムは、マウス体温を模したの温度サイクルに同調する

では、Per2 の発現量が増加するタイミングで温度変化を細胞に与えると、Per2 の発現量にどういった変化が起こるのであろうか？我々は、endogenous な Per2 の発現量を指標に、Per2 発現量に体温レベルの温度変化が与える影響を確かめるために、マウス線維芽細胞 (MEF) の時計を Dex でリセットし、その 24 時間後 (Per2 タンパク質の増加するタイミング) に、細胞に対して温度変化 (35 から 38.5 の温度上昇、以降 warming temperature shift (WTS) と呼ぶ)。なお、本温度設定はマウスの休眠期 (35) と活動期 (38.5) における平均体温に基づいている) を与えた。その細胞よりタンパク質を回収し、ウェスタンブロッティングに供したところ、Per2 のタンパク質発現量が WTS に伴い増加することがわかった。しかし、その同時タイミングにおいて回収した RNA サンプルを qRT-PCR 方にて解析したところ、Per2 mRNA の発現量は WTS を受けても全く変化していなかった (図 2)。さらなる生化学的実験を行い、この温度依存的な Per2 タンパク質発現量の増加は、転写やタンパク質分解速度の変化ではなく、タンパク質合成速度すなわち翻訳レベルで変化していることが明らかになった。これらの結果から、概日体温変動など、生体内における微小な生理的体温変化は、Per2 のタンパク質発現速度 (翻訳速度) に影響を与え、生物時計を調律する可能性が示唆された。

次に我々は、ribosome profiling 法により mRNA 上のリボソーム位置を可視化することで、Per2 の翻訳が温度によってどのように制御されるのかを調べた。WTS を与えていないコントロール群の細胞では、リボソームは Per2 mRNA の CDS 上に位置することがほとんどであった。ところが、WTS を与えた細胞では、リボソームは Per2 の CDS だけでなく、その上流の非翻訳領域 (5 untranslated region, 5 UTR) にも多く存在することが明らかになった。このリボソームの集積している場所を 1 塩基レベルで調べると、5 側の非翻訳領域であるにもかかわらず、開始コドンと終止コドンからなるオープンリーディングフレーム

Dex-synchronized MEF cells



Time 24: 35°C → 38.5°C
(warming temp. shift, WTS)

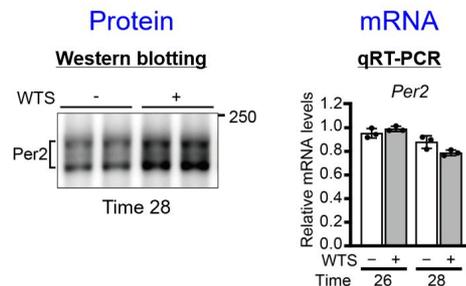


図 2 Per2 の発現は生理的微小温度変化にตอบสนองしタンパク質レベルで変動する

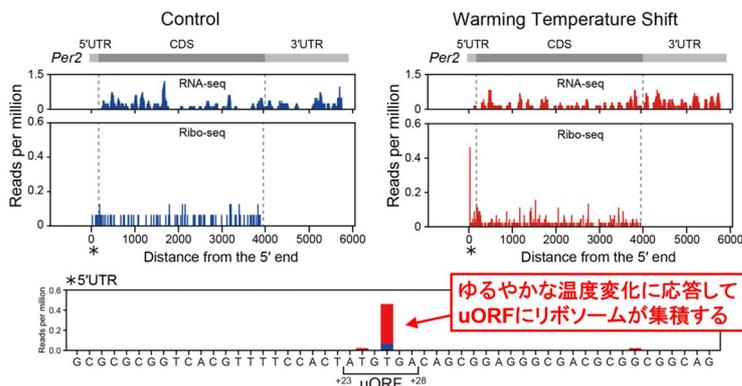


図 3 温度にตอบสนองする Per2 uORF の発見

(ORF) があり、ここに温度変化に合わせてリボソームが集まることが明らかになった (図 3)。さらなるレポーターアッセイにより、この上流 ORF (upstream ORF, uORF) があるだけで、下流 CDS は温度変化に応じて翻訳量を変化させることもわかった。

Per2 の翻訳温度応答はどのような分子メカニズムで制御されるのか？我々は Per2::LucTS MEF 細胞の Per2::LucTS 発光強度温度応答を指標に、150 種類程度の化合物をライブラリスクリーニングし、6 種類のヒットを得、そのうち 4 つが PI3K 阻害薬であることがわかった。PI3K が生物時計の体温リズムに対する同調を制御する因子である可能性が高いため、我々は図 1 で行った実験を、PI3K 阻害薬 (17 ヒドロキシワートマニン, Wortm) 存在下で行った。

Wortm 存在下においても Per2::LucTS の強い概日発光リズムは観察された一方で、これらの細胞は 1 週間、温度サイクル条件下に附してもまったく同調することはなく、それぞれ 6 時間の位相差を保ち続けたまま 1 週間振動し続けた (図 4)。これらの結果より、PI3K が Per2 翻訳温度応答のマスターレギュレーターであることが明らかになった。その後の検討により、PI3K の活性を制御する因子として eIF2 制御キナーゼである PKR/PERK を同定した。WTS は、細胞内において Akt および eIF2 のリン酸化を誘導する (それぞれ PI3K および PKR/PERK のリン酸化基質である)。WTS にともなう Akt のリン酸化は PKR/PERK の阻害薬 (C16/GSK2656157) で阻害される一方で、WTS にともなう eIF2

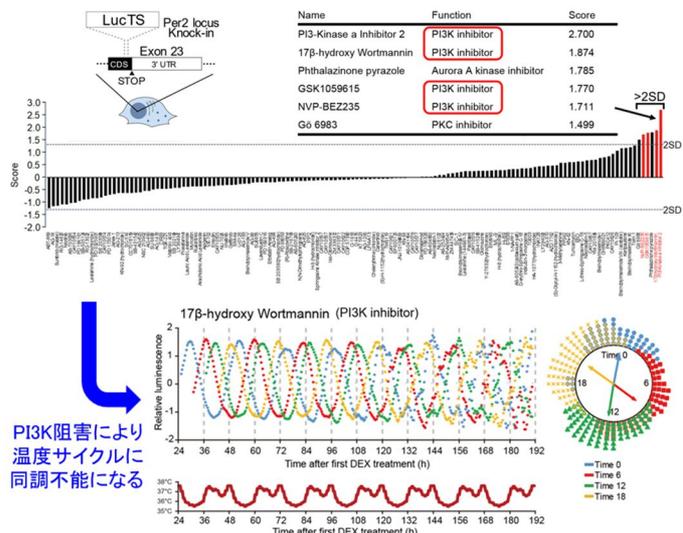


図 4 Per2 温度応答制御因子 PI3K の発見

のリン酸化は Wortm では抑制されなかった。これら一連の薬理的検討の結果より、生理的微小温度変化はまず PKR/PERK に作用し、その後 PI3K の活性化を介して Per2 の翻訳温度応答を惹起すると考えられる。

Per2 uORF の生理学的な意義を明らかにするため、我々は作出した Per2 uORF 変異マウスの背面に傷を与え、その創傷治癒効率を調べた。ヒト臨床において、ヒト活動期である昼間に負傷した患者の方が、休眠期である夜間に負傷した患者よりも、その傷の修復が早いことが報告されている (Hoyle *et al.*, *Sci Transl Med*, 2017)。マウスにおいても同様に、活動期である夜間 (ZT12) と休眠期である昼間 (ZT0) それぞれで傷を与え、その修復を調べたところ、野生型マウスにおいてはヒトと同様に、活動期 (夜間) に傷を与えたマウスの方が、休眠期 (昼間) に傷を与えたマウスよりも、傷修復効率が高かった。ところが、同様の実験を Per2 uORF 変異マウスで実施すると、そのような傷修復の時刻依存的变化は観察されず、全体的に野生型マウスの休眠期と同様の修復効率を示した (図 5)。このことは、Per2 uORF を介した生物時計の体温リズムへの同調が、皮膚をはじめとした臓器ホメオスタシスの維持に重要であることを示唆している。

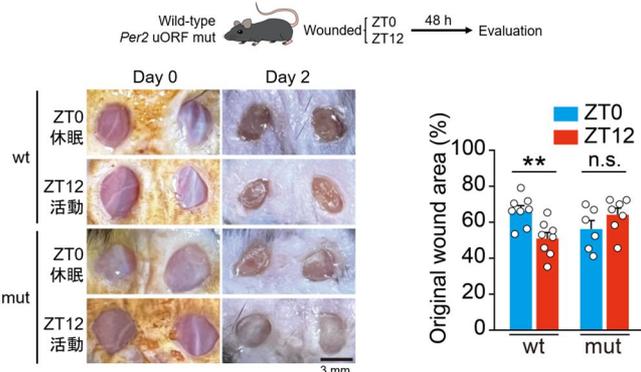


図 5 Per2 uORF 変異マウスは皮膚修復効率が悪い

最後に、野生型マウスおよびこの Per2 uORF 変異マウスより線維芽細胞を回収し、Per2 タンパク質発現リズムをウェスタンブロッティングにより調べた。一定温度で培養した細胞より 4 時間おきに連続 4 日間、サンプルを回収し、その Per2 発現量を anti-Per2 抗体で可視化すると、野生型マウス・Per2 uORF 変異マウス両方において Per2 の発現は、はじめの 2 日間で強いリズムを示し、3 日目にはそのリズムは減弱し、4 日目には消失した。次に、同様の 4 日間連続サンプリングを、概日温度変動条件下で培養した細胞より実施すると、野生型マウス由来の細胞においては、先程とは異なり、3 日目にも強いリズムが観察され、4 日目にもリズムミミックな Per2 タンパク質の発現が確認された。ところが、Per2 uORF 変異マウスにおいては、温度変動条件にもかかわらず、一定温度条件と同様に、4 日目には Per2 発現リズムは消失した (図 6)。これらの結果より、Per2 uORF は生物時計の概日体温リズムへの同調に重要であることがわかった (Miyake and Inoue *et al.*, *Cell Rep*, 2023; Shao and Miyake *et al.*, *Biol Pharm Bull*, 2024、各図はこれら原著論文データの一部を改変して掲載した)。

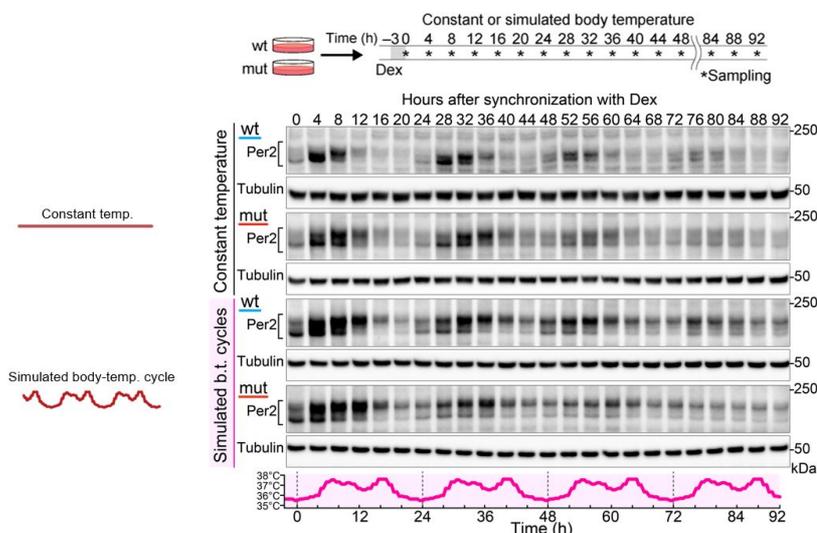


図 6 Per2 uORF 変異細胞は温度サイクルに同調しない

引用文献

- Tisi, L.C., White, P.J., Squirrell, D.J., Murphy, M.J., Lowe, C.R., and Murray, J.A.H. (2002). Development of a thermostable firefly luciferase. *Anal. Chim. Acta* **457**, 115-123.
- Hoyle, N.P., Seinkmane, E., Putker, M., Feeney, K.A., Krogager, T.P., Chesham, J.E., Bray, L.K., Thomas, J.M., Dunn, K., Blaikley, J., and O'Neill, J.S. (2017). Circadian actin dynamics drive rhythmic fibroblast mobilization during wound healing. *Sci. Transl. Med.* **9**, eaal2774.
- Miyake, T., Inoue, Y., Shao, X., Seta, T., Aoki, Y., Nguyen Pham, K.T., Shichino, Y., Sasaki, J., Sasaki, T., Ikawa, M., Yamaguchi, Y., Okamura, H., Iwasaki, S., Doi, M. (2023). Minimal upstream open reading frame of Per2 mediates phase fitness of the circadian clock to day/night physiological body temperature rhythm. *Cell Rep.* **42**, 112157.
- Shao, X., Miyake, T., Inoue, Y., Hasegawa, E., Doi, M. (2024) Temperature-dependent upregulation of Per2 protein expression is mediated by eIF2 kinases PERK and PKR through PI3K activation. *Biol. Pharm. Bull.* **47**, 600-605.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Shao Xinyan, Miyake Takahito, Inoue Yuichi, Hasegawa Emi, Doi Masao	4. 巻 47
2. 論文標題 Temperature-Dependent Upregulation of Per2 Protein Expression Is Mediated by eIF2 Kinases PERK and PKR through PI3K Activation	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 600 ~ 605
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b23-00739	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 三宅 崇仁、土居 雅夫	4. 巻 95
2. 論文標題 最小単位uORF翻訳を介した体内時計調律	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 837 ~ 841
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14952/SEIKAGAKU.2023.950837	査読の有無 無
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 Miyake Takahito, Inoue Yuichi, Shao Xinyan, Seta Takehito, Aoki Yuto, Nguyen Pham Khanh Tien, Shichino Yuichi, Sasaki Junko, Sasaki Takehiko, Ikawa Masahito, Yamaguchi Yoshiaki, Okamura Hitoshi, Iwasaki Shintaro, Doi Masao	4. 巻 42
2. 論文標題 Minimal upstream open reading frame of Per2 mediates phase fitness of the circadian clock to day/night physiological body temperature rhythm	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 112157 ~ 112157
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2023.112157	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11件（うち招待講演 8件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 三宅崇仁、井ノ上雄一、土居雅夫
2. 発表標題 非翻訳領域の翻訳を介した生理的微小温度変化による生物時計調律
3. 学会等名 第5回 量子生命科学会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 三宅崇仁、土居雅夫
2. 発表標題 パラメトリックmRNA翻訳速度調節を介した体温による概日時計調律機構
3. 学会等名 第41回 日本内分泌学会内分泌代謝学サマーセミナー YECシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 三宅崇仁
2. 発表標題 体温と翻訳を介した生物時計のしなやかな調律メカニズム
3. 学会等名 大阪大学蛋白質研究所セミナー 「生命のしなやかさに着目したタンパク質研究の現状と展望」（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 三宅崇仁、井ノ上雄一、土居雅夫
2. 発表標題 非翻訳領域に位置する最小翻訳フレームを介した概日時計温度制御機構
3. 学会等名 日本睡眠学会第45回定期学術集会・第30回日本時間生物学会学術大会 合同大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 三宅崇仁、土居雅夫
2. 発表標題 体内時計を介した概日体温リズムによる生体恒常性維持機構
3. 学会等名 2024年度生理学研究会 臓器連関による生体恒常性維持機構と生体活動の統合的理解
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 三宅崇仁、井ノ上雄一、土居雅夫
2. 発表標題 コア時計遺伝子Per2 の最小単位上流翻訳領域は生物時計の概日体温リズムへの同調に重要である
3. 学会等名 2023年度 文部科学省 学術変革領域研究 学術研究支援基盤形成 先端モデル動物支援プラットフォーム 成果発表会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 三宅崇仁、土居雅夫
2. 発表標題 生理的微小温度変化を感知するmRNA翻訳制御エレメントの発見とその生理的意義
3. 学会等名 第3回関西RNAクラブ（招待講演）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 三宅崇仁、土居雅夫
2. 発表標題 Temperature entrainment mechanism of peripheral clocks via circadian body temperature and its role in physiology
3. 学会等名 第101回日本生理学会大会（招待講演）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 三宅崇仁、土居雅夫
2. 発表標題 The minimal upstream open reading frame of Per2 has a role in enhancing the integrity of the physiological circadian response
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 三宅崇仁、井ノ上雄一、土居雅夫
2. 発表標題 微小な温度変化がもたらすmRNA翻訳速度調節と概日時計制御
3. 学会等名 温熱生理学研究会2022 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三宅崇仁、井ノ上雄一、土居雅夫
2. 発表標題 生理的な微小温度変化がもたらすmRNA翻訳速度調節を介した概日時計制御機構
3. 学会等名 第12回 都医学研シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>全身の体内リズムを調和させるRNA配列の発見 体温の日内変化に合わせてしなやかに調和させる https://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research-news/2023-03-07-0 体内リズムの時刻合わせ役 新たなRNA配列発見 https://sci-news.co.jp/topics/7563/</p>

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