

生物時計のシステム理解

Understanding of the Biological Clock as a System

本間 研一 (Honma Ken-ichi)

北海道大学・大学院医学研究科・教授



研究の概要

本研究は、哺乳類の生物時計を多数の概日振動体からなる階層的なシステムとしてとらえ、時計機能を遺伝子レベルから行動リズムの発現に到るまで、総合的に理解することを目的とした。その結果、中枢時計である視床下部視交叉上核の細胞内振動系、核領域振動系、出力振動系を明らかにし、さらに視交叉上核以外に存在する末梢振動系の役割を解明した。

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 基礎医学・環境生理学（含体力医学・栄養生理学）

キーワード： 生物時計、視交叉上核、時計遺伝子、分子振動系、生物発光

1. 研究開始当初の背景・動機

哺乳類の生物時計は階層構造をもつ多数の振動体からなる。概日振動は複数の時計遺伝子が関与する分子オートフィードバック機構により細胞内で発振され、細胞間コミュニケーションにより安定した概日リズムを刻むと推定される。中枢時計である視交叉上核振動系とそれ以外の組織に存在する末梢振動系の構造と機能については不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究の目的は、哺乳類の生物時計を階層的な多振動体システムとしてとらえ、時計機能を遺伝子レベルから行動発現に到るまで総合的に理解することにある。

以下の5項目に焦点を当てる。1) 概日リズム発振の分子機構、2) 分子振動系から電気活動リズムに至る細胞内出力系、3) 細胞リズムの統合と細胞コミュニケーション、4) 視交叉上核サブ振動系の局在と相互作用、5) 行動を制御する末梢振動系の局在と中枢振動系へのフィードバック機構。

3. 研究の方法

本研究では、階層的な概日振動系を遺伝子レベルから行動レベルまで、総合的に解析した。遺伝子レベルでは、従来の分子生物学的研究手法に加えて、遺伝子発現の発光レポーター系を導入したトランスジェニック動物による時計遺伝子発現リズムの長期リアルタイム計測（生物発光画像解析シス

テム、遺伝子発現測定装置）や CCD カメラによる単一細胞レベルの観察（Helios Gene Gun）、細胞レベルでは単一ニューロンの電気活動リズム（マルチチャンネル細胞外記録システム）、個体レベルでは、行動リズムを感熱式センサーで記録した（クロノバイオキット）。

4. 研究の主な成果

1) 概日リズム発振の分子機構

新規時計関連遺伝子 *Dec1* のプロモーター活性を解析し、*Dec1* 転写は転写因子 BMAL1/CLOCK によって亢進するが、DEC1、DEC2、PER1/CRY によって抑制されることを明らかにし、コアグループに共役する DEC ループの存在を示した。また、行動リズムが消失する Clock 変異マウスで、視交叉上核 *Dec1*, *Dec2* 発現リズムは位相が6時間ほど後退しており、コアグループとの共役は *in vivo* でも確認された (*J Biol Rhythm*, 2004)。また、分泌型と非分泌型発光酵素を用いて、*Per1* および *Bmal1* 遺伝子発現の同時モニター系を作成し、視交叉上核振動系と末梢振動系の分子機構の差異を明らかにした (*Genes to Cells*, 2006)

2) 分子振動からの電気活動リズムに至る細胞内出力系

Naチャンネルブロッカーである TTX を視交叉上核に作用させると、概日振動のコアグループや関連ループを構成する遺伝子群、AVP など一部の出力遺伝子の発現リズムは維持されたが、行動発現に関係する *PK2*

および *BDNF* 遺伝子の発現リズムは消失、あるいは大きく減衰した。行動へのリズム出力系には細胞電気活動が必要であることを示した (*Eur J Neurosci*, 2008)。

3) 細胞リズムの統合と細胞間コミュニケーション

シナプス形成が未熟な出生直後の視交叉上核で観察される概日リズムは、成獣にはみられない非光同調 (母子同調) を示す (*Physiol Behav*, 2005)。新生時期の視交叉上核は、外乱に対する時計遺伝子発現リズムの反応性が成熟期に比べ反応性が大きいことが判明し、シナプスによる細胞間コミュニケーションが概日リズムの機能に関係していることが示された (*Eur J Neurosci*, 2008 in press)

4) 視交叉上核サブ振動系の局在と相互作用

光周期への反応が、視交叉上核の吻側と尾側で異なり、さらに吻側の概日リズム位相は行動開始位相と、尾側の概日リズム位相が行動終了位相と強く相関し、行動リズムを制御する2振動体に対応することが判明した。さらに、長日条件でのみ、吻側視交叉上核に2相性の概日振動が認められた。2振動系の位相関係が行動リズムの活動期の長さを決めていると想定される。これらのサブ振動系は概日リズムの位相が異なる細胞集団によることが明らかとなった (*PNAS*, 2007)。

5) 行動を制御する末梢振動系の局在と注す振動系へのフィードバック

ヒト睡眠覚醒リズムのモデル動物であるメタンフェタミン慢性投与ラットを用いて、視交叉上核振動系および末梢振動系における時計遺伝子発現リズムを解析し、その結果メタンフェタミンが視交叉上核以外の脳部位に存在する末梢振動系に作用していることが示された (*Sleep Biol Rhythm*, 2007)。

回転輪を含む新奇環境への暴露が、行動リズム、視交叉上核および末梢各組織の時計遺伝子発現リズムへ及ぼす効果を解析し、新奇環境暴露は、行動リズムだけでなく筋肉や肺臓などの末梢振動系にも作用することが明らかとなった。また、末梢振動系でも新奇環境に反応する部位としない部位があり、組織特異性が示された (*Genes to Cells*, 2008 in press)。

5. 得られた成果の世界・日本における位置づけとインパクト

視交叉上核振動系が複数のサブ振動系をもち、その局在と機能を明らかにしたこと、その学術的価値は大きく、日本はもとより世界的に強いインパクトを与えた。分子機

能から細胞機能へ、そして組織、個体機能への統合を目指すポストゲノム研究のモデルとなるものである。

6. 主な発表論文

(研究代表者は太字、研究分担者には下線)

1. S.Nishide, S.Honma, **K.Honma**. The circadian pacemaker in the cultured suprachiasmatic nucleus from pup mice is highly sensitive to external perturbation. *Eur J Neurosci*, (2008) in press
2. Y.Yamanaka, S.Honma, **K.Honma**. Scheduled exposures to a novel environment with a running-wheel differentially accelerate re-entrainment of mice peripheral clocks to new light-dark cycles. *Genes to Cells*, 13: (2008) in press
3. K.Baba, D.Ono, S.Honma, **K.Honma**. A TTX sensitive local circuit is involved in the expression of *PK2* and *BDNF* circadian rhythms in the mouse suprachiasmatic nucleus. *Eur J Neurosci*, 27:909-916 (2008)
4. N.Inagaki, S.Honma, D.Ono, Y.Tanahashi, **K.Honma**. Separate oscillating cell groups in mouse suprachiasmatic nucleus couple photoperiodically to the onset and end of daily activity. *PNAS*, 104:7664-7669 (2007).
5. S.Masubuchi, S.Honma, H.Abe, M.Namihira, **K.Honma**. Methamphetamine induces circadian oscillation in the brain outside the suprachiasmatic nucleus in rats. *Sleep and Biol Rhythm*, 5:132-140, (2007)
6. S.Nishide, S.Honma, Y.Nakajima, M.Ikeda, K.Baba, Y.Ohmiya, **K.Honma**. New reporter system for *Per1* and *Bmal1* expressions revealed self-sustained circadian rhythms in peripheral tissues. *Genes to Cells*, 11:1173-82 (2006)
7. A.Yamazaki, Y.Ohtuski, T.Yoshihara, S.Honma, **K.Honma**: Maternal deprivation in neonatal rats of different conditions affects growth rate, circadian clock and stress responsiveness differentially. *Physiol. Behav.*, 86:136-144 (2005)
8. M.Butler, S.Honma, T.Fukumoto, T.Kawamoto, K.Fujimoto, M.Noshiro, Y.Kato, **K.Honma**. *Dec1* and *Dec2* expression is disrupted in the suprachiasmatic nuclei of clock mutant mice. *J Biol Rhythms*, 19:126-134 (2004)

ホームページ等

<http://babu.med.hokudai.ac.jp/~phys-1w/>