

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料  
〔研究進捗評価用〕

平成 24 年度採択分  
平成 27 年 3 月 17 日現在

生存戦略としての体内時計システムの分子解剖

Dissection of Mammalian Biological Clock System  
at a Molecular Level

課題番号：24227001

深田 吉孝 (FUKADA, YOSHITAKA)

東京大学・大学院理学系研究科・教授



研究の概要 体内時計は睡眠覚醒や代謝リズムなど様々な日周変動を生み出す生体システムであり、光や食餌など環境のダイナミックな日内変化に応答して翌日のサイクルを予知できる。ほ乳類では視床下部に中枢時計機能が収斂し、この上に立ち高次脳機能が発達した。本研究では体内時計の入力や発振の分子機構を探求すると共に、高次脳機能への出力の分子的な仕組みを探り、体内時計が動物の脳機能においていかに発達・複雑化したのか動物の生存戦略に迫る。

研究分野：生物学

キーワード：動物生理化学

1. 研究開始当初の背景

体内時計を外部環境に同調させる「入力系」の中でも光入力系は生物に普遍的であり、ほ乳類の視交叉上核(SCN)に存在する中枢時計への光入力系はこれまで精力的に研究されてきた。しかし、光強度を時間積分して位相シフトに変換する仕組みは謎に包まれている。一方、体内時計は「出力系」によって生体機能を制御するが、多彩な脳機能に日周変動をもたらす分子機構はほとんど知られていない。さらに、「発振系」の研究では、従来の時計遺伝子の転写・翻訳フィードバック機構の概念を基礎に、新しい発展的概念の構築に向かおうとしている。このような背景の上で、本研究の目的を3つに分けて記載する。

2. 研究の目的

《1》入力系：中枢時計SCNへの光入力系は光感受性網膜神経節細胞ipRGCが担う。本研究では光受容体OPN4の新奇シグナリングを精査し、光情報が積分される仕組みを追求する。光以外の入力系としてはこれまで、培地のpH変化が細胞時計をリセットすることを見出し、アルカリ化はTGFβ-ALK/SMAD経路を介して時計遺伝子*Dec1*を誘導することを示した(Nat. Cell Biol. 2008)。一方、酸性化によるリセットの細胞内シグナルは不明である。本研究では*E4bp4*を鍵分子と捉え、新奇リセット経路の生理的意義に迫る。

《2》脳機能：情動や記憶形成の日周リズムは、敵の襲来など生存危機に対する個体の応答性を決定する。これらの脳機能リズムに扁桃体や海馬の時計機構が寄与する可能性について、部位特異的な時計遺伝子KOマウスやSCOP KOマウスを作成して検証すると共に、これら脳

機能が日周変動する分子機構に迫る。一方、最近同定された神経ステロイド7α-ヒドロキシプレグネノロン(7α-OH-Preg)のほ乳類における生理的役割と合成制御機構を解明する。

《3》分子時計：私共は、体内時計が24時間を刻む振動機構に着目して多くの鍵分子を同定し、時計タンパク質のリン酸化・ユビキチン化など翻訳後修飾が果たす役割を世界に先駆けて示した。本研究ではCRYとその修飾酵素であるE3リガーゼFBXL3とFBXL21に着目し、変異マウスを用いた個体レベルの研究を展開する。また、CLOCK-BMAL1のDNA結合リズムに着目して定量的ChIP-Seq解析を行うと共に、CLOCKをリン酸化するCaMKIIの機能解析を行う。

3. 研究の方法

マウスの行動リズムは自作の行動解析装置を用いて解析する。また中枢時計であるSCNや末梢時計の肝臓、さらにそのモデルの培養細胞を用い、細胞レベルのリズム解析と時計タンパク質の生化学的解析を展開する。

4. これまでの成果

《1》入力系：概日光受容を担う ipRGC において、光受容体 OPN4 は Gq/11 共役シグナル系を駆動すると考えられてきたが、最近この経路は時計入力に必須ではないことが示唆された。私共は、OPN4 が別の G タンパク質を介した経路を光活性化することを培養細胞を用いて見出した。一方、非光入力系では培養細胞で酸性化リセットに着目した研究を展開した。培地の酸性化が *E4bp4* を誘導すること、さらに *E4bp4* を欠損した繊維芽細胞において酸性化リセットが阻害されることを見出した。*E4bp4* は、時計の非光入力において重要な役割を担うことを明らかにした。

《2》脳機能：不安様行動・うつ様行動が体内時計により制御される事を見出した。一方、前脳特異的な時計遺伝子欠損マウスでは情動の変動が消失し、長期記憶効率の日周変動には海馬時計が必要であり海馬 CA1 ラフト内 SCOP 量の変動が重要である事を明らかにした。さらに、海馬の初代培養細胞において SCOP/K-Ras/ERK 経路により記憶形成シグナルに日周変動が生じる事を示した(投稿準備中)。一方、マウス脳内に  $7\alpha$ -OH-Preg の生合成系酵素の発現を確認し、間脳での発現が概日変動を示す事を見出した。

《3》分子時計：E3 リガーゼ *Fbx13* と *Fbx121* の KO マウスの行動リズムを解析した結果、*Fbx13* KO ではリズム周期の著しい延長が観察されたが、*Fbx13* と *Fbx121* の二重 KO では周期延長効果が緩和された一方、一部の二重変異マウスは行動リズムが消失した。CRY タンパク質は、FBXL3 によりユビキチン化されると分解促進されるが、FBXL21 でユビキチン化されると安定化する、というユニークな機構を報告した (Cell, 2014)。また CRY2 のリン酸化 Ser557 を Ala 置換した KI マウスを作製した結果、リン酸化依存的な CRY2 の分解は行動リズム周期の決定に重要であることが判明した (MCB, 2014a)。一方、転写因子 CLOCK の DNA 結合領域を決定するために ChIP-Seq 解析を行い、新たなインフォマティクス技術 MOCCS を開発して CLOCK の DNA 認識配列を網羅的に抽出した (MCB, 2014b)。また、CaMKII の活性を減弱させた変異マウスを用いた行動解析を行った結果、活動時間帯 (行動の開始から終了までの時間) が日に日に長くなり、ついには活動リズムが消失するという顕著な行動異常を示した (Genes Dev, 2014b)。

#### 5. 今後の計画

《1》入力系：概日光受容における新規シグナリングの役割を個体レベルで調べるため、既知経路を ipRGC 特異的に欠損させたマウスの行動を解析する。非光入力系では、ある生理活性物質が *E4bp4* を鍵分子とする経路に入力する事を見出したので、この経路が肝臓などマウス組織で機能する可能性を検証する。

《2》脳機能：情動の概日制御を司る脳内部位を同定するため、脳の局所的破壊を施したマウスを用いて不安様行動やうつ様行動の時刻変動を解析する。一方、海馬依存性の記憶形成効率の概日変動に寄与する SCOP の膜ラフト移行の機構解明を目指す。 $7\alpha$ -OH-Preg を定量分離する MASS-coupled HPLC を確立したので、 $7\alpha$ -OH-Preg の脳内分布・日周変動・光誘導性の解析を進める。また、その生理作用に迫るため、合成酵素の欠損マウスを用いて情動・記憶等に関わる行動解析を行う。

《3》分子時計：時計構成タンパク質の役割をアミノ酸残基レベルで理解することを目標とする。これまで、CRY をユビキチン化して安定化する FBXL21、CRY を脱ユビキチン化する USP7、CLOCK をリン酸化する CaMKII、BMAL1 をユビキチン化する UBE3A/E6-AP など、

多くの時計制御分子を同定した。この上に立ち CLOCK-BMAL1 の転写出力に着目したゲノムワイドな解析と、そこから浮かび上がる新たな生理機能リズムの研究を新たに展開する。

#### 6. これまでの発表論文等(受賞等も含む)

深田吉孝：平成 26 年度 文部科学大臣表彰 科学技術賞 受賞

N. Kon, (以下 9 名略) & Y. Fukada. CaMKII is essential for cellular clock and coupling between morning and evening behavioral rhythms. *Genes Dev*, 28, 1101-1110 (2014b)

H. Yoshitane, (以下 9 名略) & Y. Fukada. CLOCK-controlled polyphonic regulations of circadian rhythms through canonical and non-canonical E-boxes. *Mol. Cell Biol.*, 34, 1776-1787 (2014b)

V. Pekovic-Vaughan, (以下 12 名略), Y. Fukada & Q.J. Meng. The circadian clock regulates rhythmic activation of the NRF2/glutathione-mediated antioxidant defense pathway to modulate pulmonary fibrosis. *Genes Dev*, 28, 548-560 (2014a)

N. Gossan, (以下 7 名略), Y. Fukada, & Q.J. Meng. The E3 ubiquitin ligase UBE3A is an integral component of the molecular circadian clock through regulating the BMAL1 transcription factor. *Nucl. Acids Res.*, 42, 5765-5775 (2014)

S. Tamai, (以下 5 名略), Y. Fukada & K. Sanada. Neuroprotective role of the basic leucine zipper transcription factor NFIL3 in models of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Biol. Chem.*, 289, 1629-1638 (2014)

A. Hirano, (以下 5 名略) & Y. Fukada. *In vivo* role of phosphorylation of Cryptochrome2 in the mouse circadian clock. *Mol. Cell Biol.*, 34, 4464-4473 (2014a)

A. Hirano, (以下 8 名略) & Y. Fukada. FBXL21 regulates oscillation of the circadian clock through ubiquitination and stabilization of cryptochromes. *Cell*, 152, 1106-1118 (2013)

D. Kokel, (以下 9 名略) Y. Fukada, (以下 6 名略) & R. Peterson. Identification of non-visual photomotor response cells in the vertebrate hindbrain. *J. Neurosci.*, 33, 3834-3843 (2013)

K. Tsutsui, (以下 6 名略) & Y. Fukada. New biosynthesis and biological actions of avian neurosteroids. *J. Exp. Neurosci.*, 7, 15-29 (2013)

K. Tsutsui, S. Haraguchi, Y. Fukada & H. Vaudry. Brain and pineal  $7\alpha$ -hydroxy pregnenolone stimulating locomotor activity. *Front. Neuroendocrinol.*, 34, 179-189 (2013)

K. Tsutsui, (以下 3 名略) & Y. Fukada. Biosynthesis and biological actions of pineal neurosteroids in domestic birds. *Neuroendocrinol.*, 98, 97-105 (2013)

ホームページ等

<http://www.biochem.s.u-tokyo.ac.jp/fukada-lab/>