科学研究費助成事業（特別推進研究）公表用資料
〔令和２(2020)年度 研究進捗評価用〕

平成 29 年度採択分
令和２年３月３１日現在

フレキシブルな概日ロバスト振動体の分子解剖と個体制御

MOLECULAR DISSECTION OF ROBUST AND FLEXIBLE CIRCADIAN CLOCK AND ITS CONTROL OF ANIMAL PHYSIOLOGY

課題番号：17H06096

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（４行以内）
本研究では、安定な日周リズムを刻む自律振動体の頑強性と、環境に応答して柔軟に位相応答する二面性の分子基盤を探る。また、時計遺伝子制御による転写時計の概念から踏み出し、普遍的な細胞機能に基づく新しい振動原理を追究する。さらに、不可逆な時間軸に沿って進行する老化を概日時計の出力と捉え、概日時計と老化時計が双方向性に制御する分子機構に迫る。

研　究　分　野：生物学

キ　ー　ワ　ー　ド：概日リズム、翻訳後修飾、位相制御、高次脳機能、老化、概日振動機構

１．研究開始当初の背景

多くの生物が持つ概日時計は、自律振動して生理現象を安定に制御する頑強性と、環境変化に応答して位相制御する柔軟性を兼ね備えているが、その仕組みは謎であった。さらに概日時計の振動機構は時計遺伝子の転写リズムにより生み出されるという従来の考えに対し、中枢時計遺伝子の欠損、あるいは転写が起こらない条件でも概日時計振動が見られる例が報告され、時計振動の本質的な仕組みは未だ充分な理解に至っていない。

２．研究の目的

本研究では、頑強な概日振動が時計遺伝子の転写リズムにより生み出されるとする従来の転写時計の概念から踏み出し、時計タンパク質の翻訳後制御によるリズムや、さらに根源的な振動子を追究する。一方、柔軟な位相制御として、細胞外環境からの多彩なシグナルに応答する巧妙な分子機構に迫る。また、不可逆な時間軸に沿って進行する老化と時計の双方向性の相互制御メカニズムに迫る。

３．研究の方法

本研究では、光・温度など外部環境を正確にコントロールしたマウス飼育環境を整備し、これまでに作製した数多くの変異マウスと本研究で新しく系統立って作製する一群の変異マウスを用いて、脳機能・シナプス可塑性のリズム制御に迫る。また中枢時計 SCN や末梢時計の肝臓、さらにそのモデルとして培養細胞を用い、細胞・分子・アミノ酸レベルでのリズム解析を展開する。

４．これまでの成果

【頑強な時計振動へのアプローチ】
時計タンパク質の時刻依存的な翻訳後修飾パターンを記述するため、最新の質量分析装置を導入し、多検体試料をプロテオーム解析する実験環境を立ち上げた。時計タンパク質の修飾状態の組合せで時が刻まれるという新しい概念「クロノコード」の理解を目指し、時計タンパク質に Flag タグを付加して培養細胞に発現させ、それらの相互作用因子を決定すると共に、翻訳後修飾の状態を解析した。さらに、マウスに内在する時計タンパク質に Flag タグを付加した変異マウスを作製し、分子間相互作用や翻訳後修飾の状態に明瞭な概日変動があることを示した。また、PER2 のリン酸化コードの新たな責任分子としてキナーゼ SIK3 を同定し、SIK3 による PER2 のリン酸化はその分解を促進し、時計の周期を制御することを示した（*eLife,* 2017）。PER2 は CKI キナーゼによって Ser478 がリン酸化されると分解に導かれる一方、Ser659 がリン酸化されると安定化する。PER2 の Ser659 の点変異により時計周期は短くなり睡眠相前進症候群の原因となるが Ser478 の生理的な役割は不明であった。本研究では、PER2 の Ser478 を Ala に置換したマウスを作成して解析した結果、変異 PER2 タンパク質が安定化して行動リズム周期が長くなることを見出した（*PNAS*, in press）。

時計タンパク質による転写ネットワークを理解するため、DBP 抗体と E4BP4 抗体を作製して ChIP-Seq 解析を行うと共に、バイオインフォマティクス技術 MOCCS2 を開発し、

ChIP-Seq データから機能的な時計シス配列 D-box を抽出した（*Commun. Biol.*, 2019)。

また、生理レベルでの時計出力の理解に向けて海馬機能の解析を行い、マウスの空間記憶は明期前半に学習すると長期維持されやすいことを見出した。この仕組みを分子レベルから解析するため、ニューロステロイド 7α-OH-Pregnenolone と 7α-OH-DHEA に着目した。これらニューロステロイドの合成酵素 CYP7B1 の遺伝子欠損マウスは、明期前半に学習しても空間記憶が長期維持できない。この記憶維持障害は 7α-OH-Preg と 7α-OH-DHEA の投与により回復したため、これらのニューロステロイドは記憶の長期維持に極めて重要な役割を果たすと考えられた（投稿中)。

【柔軟な位相制御機構へのアプローチ】
行動リズムの光同調を担う網膜神経節細胞 ipRGC において、光受容体メラノプシンが新奇シグナル経路を光活性化する可能性を見出し、マウス個体での機能解析を展開している。また、行動リズムの光同調を担う鍵分子の同定を目指し、カリフォルニアマウス CM558 変異体を米国テキサス大学より入手・繁殖し、日本初となるカリフォルニアマウスのクローズドコロニーを樹立した。RNA-Seq 解析やゲノムシーケンシングにより原因遺伝子の同定に向けて解析を進めている。さらに、概日時計の柔軟な位相制御に関わる新規時計分子として ASK キナーゼを同定した。培養細胞のリズム解析において、培養培地の浸透圧の変化に伴い培養細胞のリズム周期や位相が変化することを見出した。この時計の浸透圧応答には ASK が必須であることが判明した。リン酸化プロテオーム解析を行った結果、浸透圧変化に応答して ASK 依存的に CLOCK の C 端領域の Ser845 がリン酸化されることを見出した。また、*Ask* 欠損マウスにおいて恒明条件化での時計周期の延長効果が有意に減弱していることを見出した。さらに、光照射による時計位相シフトも *Ask* 欠損マウスにおいて顕著に減弱したことから、ASK は光入力にも寄与することを見出した（*PNAS*, 2018)。また、時計中枢（SCN）や光入力系（網膜）の発生を制御する分子としてホメオボックス型転写因子 Six3/6/7 ファミリーに注目した研究を行い、Six6 と Six7 が網膜の青色および緑色の光受容細胞の発生分化および遺伝子発現に必須であることを見出した（*PNAS*, 2019)。

５．今後の計画
細胞時計の自律振動性を指標として機能因子をスクリーニングしたところ、細胞の普遍的なシグナル経路に関わる遺伝子群が分子発振メカニズムに必須である可能性が浮上した。そこで、これら遺伝子の改変マウスを用いて概日時計機能を解析したところ、変異マウスにおいては行動リズム異常だけでなく光入力にも欠陥が観察された。すなわち、頑強な自律振動と柔軟な位相応答性という 2 つの性質は、環境応答性シグナルの自律振動を基盤とすることが見えてきている。今後の研究では進化学や発生学的視点も含めて時計振動子の実体解明に尽力する。また、光受容細胞 ipRGC における新奇シグナル経路が古典的経路とどのように役割分担しているのかを、人工リガンド受容体等を用いて追究する。さらに、「老化」と「時計」の双方向性制御の実態解明に向け、若齢・老齢マウスから様々な時刻の試料調製を完了した。今後、RNA レベル、転写後調節レベル、タンパク質量レベル、細胞内局在レベル、翻訳後修飾レベルでの時刻変動を網羅的に解析し、加齢と時計振動の相互作用の分子基盤に迫る。

６．これまでの発表論文等（受賞等も含む）

1. Mutation of PER2 phosphodegron perturbs the circadian phosphoswitch. S. Masuda, R. Narasimamurthy, H. Yoshitane, J. K. Kim, Y. Fukada* & D. M. Virshup* ***Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*** (in press)
2. Functional D-box sequences reset the circadian clock and drive mRNA rhythms. H. Yoshitane*, Y. Asano, A. Sagami, S. Sakai, Y. Suzuki, H. Okamura, W. Iwasaki, H. Ozaki & Y. Fukada* ***Commun. Biol.*** *2,* 300 (2019) DOI:10.1038/s42003-019-0522-3
3. Six6 and Six7 coordinately regulate expression of middle-wavelength opsins in zebrafish. Y. Ogawa, T. Shiraki, Y. Asano, A. Muto, K. Kawakami, Y. Suzuki, D. Kojima* & Y. Fukada* ***Proc. Natl. Acad. Sci. USA*** *116,* 4651-4660 (2019)
4. ASK family kinases mediate cellular stress and redox signaling to circadian clock. K. Imamura, H. Yoshitane*, K. Hattori, (3 名省略) I. Naguro, H. Ichijo & Y. Fukada* ***Proc. Natl. Acad. Sci. USA*** *115,* 3646-3651 (2018)
5. Salt-inducible kinase 3 regulates the mammalian circadian clock by destabilizing PER2 protein. N. Hayasaka*, A. Hirano, Y. Miyoshi, I. T. Tokuda, H. Yoshitane, J. Matsuda & Y. Fukada. ***eLife*** *6*, e24779 (2017) DOI: 10.7554/eLife.24779

【受賞】平成 30 年度　日本光生物学協会協会賞 受賞（2018 年 8 月 9 日）

７．ホームページ等
http://www.biochem.s.u-tokyo.ac.jp/fukada-lab/index-j.html