

概日時計の細胞自律性

Cell-Autonomous Formation of Mammalian Circadian Clock

八木田 和 弘

Kazuhiro Yagita

京都府立医科大学大学院医学研究科神経生理学

要 旨 概日時計（体内時計）は、約 24 時間周期の生体リズムである概日リズム（サーカディアンリズム）を司る内因性の自律振動体であり、バクテリアから人に至るまで地球上のほとんどの生物に備わる普遍的な生命機能の一つである。加えて、環境周期に同調する性質を持ち、周期的に変動する環境条件に生体機能を適応させることができることから、概日時計の生理学的意義が多岐にわたることが近年の研究の進展から明らかになってきている。本稿では哺乳類概日時計について概説し、特に概日時計の細胞自律性について述べる。

キーワード：概日リズム、時計遺伝子、発生、細胞自律性

1. はじめに

約 24 時間周期の概日リズムは地球上のほとんどの生物に見られる普遍的な生命現象であり、内在性の測時機構である概日時計（体内時計）によって制御されている。概日時計は、多くの生理機能の時間的統合を担い、哺乳類の測時機構の基盤をなし、生体機能に周期性を与える内因性の自律振動体であり、環境周期に同調する性質を持つ。これにより、周期的に変動する環境条件に生体機能を適応させることができる。本稿では、線維芽細胞など末梢の細胞にも概日時計が備わっていること、概日時計は細胞分化と密接に関連して細胞自律性に形成されること、などを中心に、概日時計の分子メカニズムから生理学的意義について、これまで記述してきたことを再度要約して述べる^{1~4}。

2. 全身の細胞に存在する哺乳類概日時計

哺乳類概日時計の中核は、視床下部の視交叉上核（Suprachiasmatic nucleus: SCN）に存在している。SCNは、破壊によって睡眠覚醒や活動といった行動リズムが完全に消失することから、中枢時計と呼ばれる。長年、哺乳類では SCN のみが概日時計を発振することができる唯一無二の器官であると考えられてきた。しかし、時計遺伝子の発見以降の分子レベルでの研究が進むにつれ、実際はほとんどの臓器や組織に概日時計振動体が備わっており、それぞれの組織において時刻を刻んでいることが分かってきた^{5,6}。生体から完全に切り離された状況にある *rat-1* や *NIH3T3* などの細胞株においても、概日時計の基本的な振動メカニズムが保存されており、自律

性の概日リズムを刻むことが明らかとなった^{7,8}。これらの研究を通じて、哺乳類の概日時計は、ほとんどの組織において個々の細胞に備わっており、1 細胞レベルで振動を発振することができることが証明された。

一方で、SCN を破壊すると行動リズムは消失し、末梢臓器においても臓器レベルでの時計遺伝子発現リズムも消失する。この現象は一見、末梢組織にも概日時計振動体が備わっているという上の記述に矛盾しているように思われる。しかし、実は末梢臓器における個々の細胞の概日時計が脱同調しているために、リズムが消失しているように見えるだけで、1 細胞レベルでは個々の細胞がリズムを刻み続けているのである。

この知見は、哺乳類においては、SCN が全身の末梢組織の概日時計を同調させていることを示しており、それゆえ SCN を中枢時計とし、それ以外の組織細胞の概日時計を末梢時計と総称することになった。つまり、オーケストラに例えると、SCN は指揮者であり、個々の楽器を奏でる末梢細胞の時計を調律しているということになる。このように、哺乳類の概日リズムは中枢時計と末梢時計が階層的に協調して制御しているのである。

3. 哺乳類概日時計の発振機構

現在のところ、概日時計の振動は、時計遺伝子と呼ばれる一連の遺伝子群の転写と翻訳を介したフィードバックループであると考えられている。哺乳類では、bHLH 型転写因子である CLOCK と BMAL1 がヘテロ二量体を形成し、*Period (Per)* や *Cryptochrome (Cry)* などネガティブ因子と呼ばれる遺伝子のプロモーター領域にある E-box と呼ばれる CACGTG 配列に結合することで、*Per* や *Cry* などの遺伝子発現を正に調節する^{9,10}。発現した PER タンパク質は Casein Kinase I ϵ , δ

〒602-8566 京都市上京区河原町通広小路上の梶井町 465
TEL: 075-251-5313
2012 年 2 月 28 日受付

などによってリン酸化された後に分解される¹¹⁾。さらに PER タンパク質と CRY タンパク質は結合することで互いに安定化して核内に蓄積していき、ポジティブ因子 BMAL1-CLOCK によって活性化された *Per* および *Cry* 遺伝子の発現を抑制する。BMAL1-CLOCK による転写活性が一日のうちで大きく変動するのには理由がある。BMAL1 および CLOCK タンパク質の C 末端部分には転写活性化に必須のドメインがあるが、このドメインに重なるように抑制因子の CRY タンパク質が結合し、転写を抑制することで切れの良い転写の ON と OFF の制御が可能になるのである¹²⁾。これらの時計遺伝子を欠失させたマウスでは、概日リズムに異常をきたすことから、これらの時計遺伝子が構成するフィードバックループを特にコアグループと呼ぶこともある。他の生物でも、それぞれの時計遺伝子が構成するフィードバックループが概日時計の基本骨格であると考えられている。

さらに、哺乳類では、コアグループに加えて、副次的ループが機能している。BMAL1/CLOCK によって転写が活性化される *Rev-erb* 遺伝子と *Ror* 遺伝子の翻訳産物 REV-ERB タンパク質と ROR タンパク質は二量体を形成して *Bmal1* 遺伝子のプロモーター領域に結合し、*Bmal1* 遺伝子の転写を抑制する。また、別の副次的ループとして、同じように BMAL1/CLOCK によって転写が活性化される *Dbp* 遺伝子の翻訳産物 DBP は *Per1* や *Per2* 遺伝子のプロモーター領域に結合してこれらの遺伝子発現を正に制御する。これに対して E4BP4 は DBP タンパク質と同じ配列に結合し *Per1* や *Per2* 遺伝子発現を抑制する。これらの副次的ループを構成する遺伝子をノックアウトしても概日リズムは消失することはなく、必須の機構ではないと考えられるが、おそらく概日リズムの安定性に寄与していると考えられている。

一方で、近年、シアノバクテリアでは、時計タンパク質 KaiABC のみで 24 時間周期の自己リン酸化反応を生み出すことが示されている¹³⁾。概日時計の様々な性質は全ての生物間で共通の普遍的であることを考えると、哺乳類にもこのような安定した 24 時間を生み出す機構が備わっている可能性は高いと思われるが、現在のところ、哺乳類でシアノバクテリアの KaiABC に当たるような正確な 24 時間周期を発振するタンパク質、あるいは化学振動子の存在は証明されていない。しかし、2010 年、イギリスのグループから、哺乳類の赤血球で peoxyredoxin (PRX) の酸化還元反応に約 1 日の周期性が見られ、転写のフィードバックループを介さない振動の存在が報告された¹⁴⁾。ただ、この PRX の酸化還元リズムは不安定であり、周期を決定している安定な化学振動子と考えるには合理性に欠ける部分もある。いずれにしても、いまだ哺乳類の概日時計の発振原理は解明された訳ではなく、今後の更なる研究が待たれる。

4. 体内時計の発生と細胞分化との関連

哺乳類の概日リズムの発生は遅く、ヒトでは、生後すぐには睡眠覚醒リズムが見られず、約 2 ヶ月後になってようやく

概日リズムが出現する。マウスやラットなどの実験動物でも同様に、出生直前までは遺伝子レベルでも視交叉上核などで概日リズムが見られず、時計の振動体の形成が完了していないことを示している¹⁵⁾。

約 24 時間の周期はどのように形成されていくのか、その過程を詳細に解析することで、概日時計の特徴である非常に安定な周期を示す発振原理を真に理解する事ができる。その理解があつてはじめて、概日リズム異常との関連が示唆されている様々な疾患の克服に向けた治療・予防戦略を正しく構築できるのではないだろうか。このような考えのもと、筆者らは、多能性幹細胞である embryonic stem cell (ES 細胞) や induced pluripotent stem cell (iPS 細胞) の性質を利用した細胞レベルでの概日時計の発生メカニズムを明らかにする試みを行った。

まず、時計遺伝子 *Bmal1* および *Dbp* のプロモーターにホタルルシフェラーゼ遺伝子をつないだレポーターを作製し、マウスの ES 細胞に導入して、概日時計振動の状態を検出できる発光 ES 細胞株を樹立した。上述のように、初期胚では概日時計の振動が見られないことは報告されているが、ES 細胞は不死化した細胞株であり、まずこの ES 細胞自体に概日時計の振動が見られるかどうかを検討した。樹立した発光 ES 細胞を観察したところ、体細胞で見られるような時計遺伝子の概日リズムは全く見られず、ES 細胞には概日時計はリズム発振装置として機能していないことが明らかとなった¹⁶⁾ (図 1)。

前にも述べた通り、ES 細胞からマウス個体になりうる。in vivo では、ES 細胞由来の細胞がマウス胎仔組織内において分化していく過程で、概日時計が形成されていく。しかし、母体内の胚を細胞レベルで長期間連続観察することは非常に困難であり、また、母体内にあることで何らかの同調因子や細胞の周辺環境などが概日時計の成立に影響する可能性が除外しにくい、などの問題がある。これらの問題を回避するため、そして、そもそも受精卵が発生・分化の過程で、個々の細胞自律的に概日時計の振動体を成立させ得るものなのか、という問を明らかにするため、筆者らは、ES 細胞の in vitro での分化誘導培養による概日時計形成能をみることにした。

ES 細胞を in vitro で分化誘導するにあたり、筆者らはレチノイン酸を投与する方法を試みた。ES 細胞の分化誘導法は様々なものが報告されているが、今回の実験における目的ではできるだけ一斉に同じようなスピードで ES 細胞を分化させる必要があると考えたためである。ES 細胞をレチノイン酸投与によって分化誘導したところ、分化誘導開始後数日間は全く概日時計振動は見られなかった。一週間ほどたったところでも、明瞭なリズムは見られなかったが、さらに分化誘導開始後二週間まで引き続き観察したところ、*Bmal1* プロモーターおよび *Dbp* プロモーターで転写されるルシフェラーゼの発光に、明瞭な概日振動が出現した。顕微鏡を用いた単一細胞レベルでの詳細な解析から、概日時計振動体は個々の細胞において細胞の分化に伴って徐々に形成されることが示

概日リズムの発生とリプログラミング

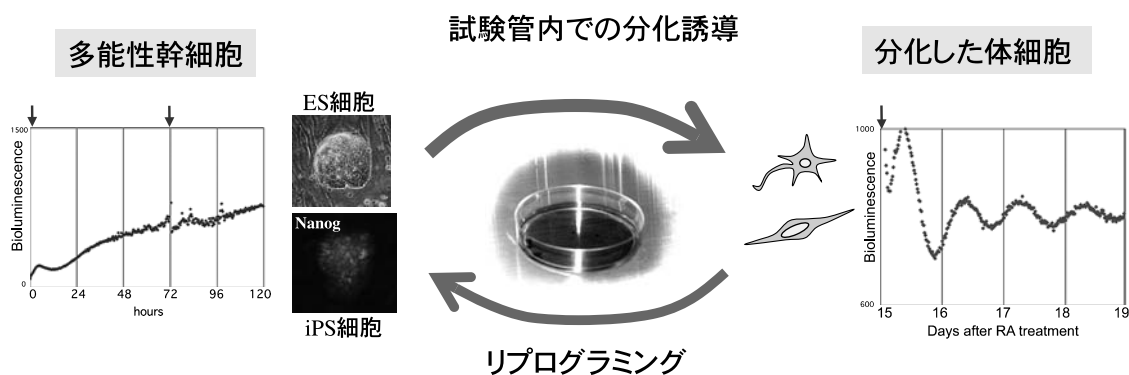


図1 細胞分化・リプログラミングと哺乳類概日時計の発生

ES細胞を *in vitro* で分化誘導すると概日時計の振動体が形成される。時計が形成された細胞をリプログラミングすると概日時計は再び消失する。概日時計の発生は、細胞分化と密接に関連した現象である。

唆された¹⁶⁾。

レチノイン酸投与条件では約2週間で概日時計の形成が見られ、これが *in vivo* で見られる胚発生期の概日時計の発生時期とかなり近いものであった。しかし、我々自身の研究によって、常にどのような培養条件でも約2週間で概日時計が形成されるという訳ではなく、培養条件によって細胞の分化スピードが異なることに依存して概日時計の形成までに要する時間はまちまちであることが分かっている。

このように、細胞の分化と概日時計の形成に相関がある可能性が示唆されたが、これを確かめるために、分化して概日時計が備わっている細胞をリプログラミングすることで、iPS細胞にしたとき、形成された概日時計はどのような影響を受けるのかを解析した。まず、ES細胞から *in vitro* で神経幹細胞に分化誘導し、同様に概日時計の振動が生じることを確認した¹⁶⁾。その上で、山中らの方法に従って、この神経幹細胞に Sox2, Klf4, Oct3/4, c-Myc を導入し、リプログラミングを行った¹⁷⁾。ES細胞のマーカーである Nanog を強く発現している iPS細胞の概日リズムを測定してみると、再びES細胞と同様に概日振動が消失していた。さらに、リズムが消失した iPS細胞を再度レチノイン酸で分化誘導すると、また明瞭な概日時計の振動が現れた⁵⁾。これらの結果から、概日時計振動体の形成が、細胞の分化というプロセスと密接に関連していることが明らかになった(図1)。

5. おわりに

このように、哺乳類概日時計は細胞機能から全身状態に至るまで様々なレベルで生体機能に関与している。概日時計が最も基本的な細胞機能であることを考えると当然とも言えるが、上述の様に、哺乳類概日時計の振動原理が全て理解できている訳ではない。普遍的な生命現象であり、なおかつ我々の健康にも密接に関連している概日時計の基礎的研究はまず

まず重要度を増している。そこから得られた知見をもとにして、概日時計を意識した疾病の治療法や予防法を考えていくことで、より健康の増進に寄与できると考えられる。

文 献

- 1) 八木田和弘：細胞工学, 29, 366-377 (2010)
- 2) 八木田和弘：太陽紫外線防御研究委員会(編), からだと光の辞典, 朝倉書店, 東京, 293-297 (2010)
- 3) 八木田和弘：細胞工学, 30, 1288-1292 (2011)
- 4) 八木田和弘：京都府立医科大学雑誌, 120, 845-852 (2011)
- 5) Yamazaki, S. *et al.*: *Science*, 288, 682-685 (2000)
- 6) Yoo, S. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 5539-5546 (2004)
- 7) Balsalobre, A., Damiola, F. and Schibler, U.: *Cell*, 93, 929-937 (1998)
- 8) Yagita, K., Tamanini, F., van der Horst, G. and Okamura, H.: *Science*, 292, 278-281 (2001)
- 9) Reppert, S.M. and Weaver, D.R.: *Nature*, 418, 935-941 (2002)
- 10) Lowrey, P.L. and Takahashi, J.S.: *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, 5, 407-441 (2004)
- 11) Lowrey, P.L., Shimomura, K., Antoch, M.P., Yamazaki, S., Zemenides, P.D., Ralph, M.R., Menaker, M. and Takahashi, J.S.: *Science*, 288, 483-492 (2000)
- 12) Kiyohara, Y.B., Tagao, S., Tamanini, F., Morita, A., Sugisawa, Y., Yasuda, M., Yamanaka, I., Ueda, H.R., van der Horst, G.T.J., Kondo, T. and Yagita, K.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, 10074-10079 (2006)
- 13) Nakajima, M., Imai, K., Ito, H., Nishiwaki, T., Murayama, Y., Iwasaki, H. *et al.*: *Science*, 308, 414-415 (2005)
- 14) O'Neill, J.S. and Reddy, A.B.: *Nature*, 469, 498-503 (2011)
- 15) Sumova, A., Bendova, Z., Sladek, M., El-Hennamy, R., Laurinova, K., Jindrakova, Z. and Illnerova, H.: *FEBS Lett.*, 580, 2836-2842 (2006)
- 16) Yagita, K., Horie, K., Koinuma, S., Nakamura, W., Yamanaka, I., Urasaki, A., Shigeyoshi, Y., Kawakami, K., Shimada, S., Takeda, J. and Uchiyama, Y.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107, 3846-3851 (2010)
- 17) Takahashi, K. and Yamanaka, S.: *Cell*, 126, 663-676 (2006)