

## 研究テーマ

概日リズムによる基本生理機能の制御機構の解明

## 1. はじめに

概日リズムはホルモン分泌等の基本的生理現象の周期を外環境に適応させ維持する機構である。この機構の異常は精神（時差症候群、不眠、うつ）、循環器（心筋梗塞、高血圧）、呼吸器（喘息）疾患を含む多くの疾患の病態に関与している。最近では、近代化がもたらす飽食に伴うメタボリック症候群、高齢化と関連する骨粗鬆症や発癌といった現代生活を脅かす疾患が概日リズムと密接に関係していることが明らかになっている。脊椎動物の概日リズムは全身の個々の細胞に存在する分子時計により制御されている。この分子時計はCLOCK, BMAL1, 及びCRYの3つの蛋白質により構成される転写/翻訳に依存したフィードバックループである。CLOCKとBMAL1は二量体を形成し、CRYの転写を活性化する。転写活性化されたCRYは翻訳後、CLOCK:BMAL1二量体に直接結合しその転写を抑制する。過去10年の間にこの分子時計自体の制御機構についての研究は急速に進展してきたが、分子時計がどのように疾患に関与する様々な基本的生理機能を制御しているかについては現時点ではほとんど解明されていない。

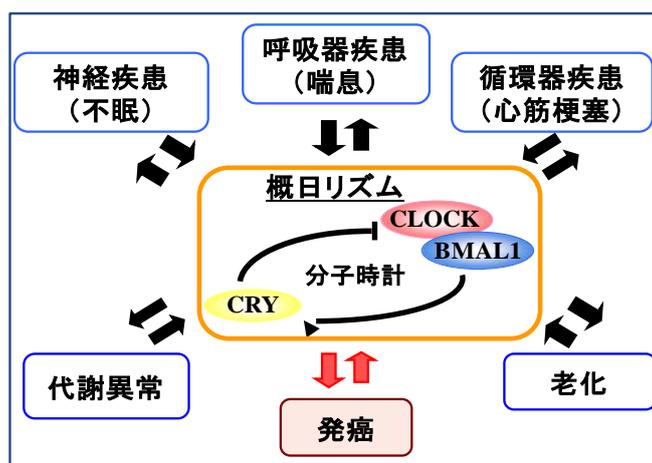


図1：概日リズムと疾患との関連

概日リズムを制御する分子時計はゼブラフィッシュといった下等脊椎動物から哺乳動物まで広く保存されている。特にゼブラフィッシュの分子時計は光に直接応答し、その周期を外界に同調させる。また、ゼブラフィッシュにおいて、「光照射により個体がDNA損傷に対して耐性を獲得する」Photoreactivationという現象が知られている。本研究は、分子時計の光同調とPhotoreactivationという光依存的な2つの現象に注目し、概日リズムとDNA損傷応答の関連の分子機構の一端を解明することを試みた。

## 2. 方法

本研究のために、私はゼブラフィッシュ胚由来の培養細胞を樹立した。この培養細胞において、分子時計は光に直接応答しその周期を外界に同調させる。従って、この実験系は概日リズムの同調をはじめと

する光シグナル経路を細胞レベルで解析するのに適している。この培養細胞を用いた分子細胞生物学・生化学的な解析を行った。

### 3. 結果 研究成果

#### 概日リズムと DNA 損傷応答を共通に制御するシグナル経路の同定

概日リズムの重要な特性の一つは、外部からの光刺激を利用して、自身のリズムの周期を外環境に同調させることである。私は、概日リズムの光同調についてゼブラフィッシュ培養細胞を用いて、光照射による細胞内の MAPK シグナル経路の活性化が概日リズムの光同調に重要であることを見出した (図 2)。また、「光照射により個体が DNA 損傷に対して耐性を獲得する」現象である Photoreactivation に注目し、ゼブラフィッシュにおいて、DNA 損傷修復蛋白質である光回復酵素 (64PHR) の光誘導及び誘導された 64PHR による紫外線による DNA 損傷の修復が Photoreactivation の重要な過程であることを見出した。さらに、64PHR の光誘導が分子時計の光同調に関わる CRY の誘導と同様に MAPK シグナル伝達系の一つである ERK 系により正に、p38 系により負にそれぞれ調節されることを見出し、概日リズムと DNA 損傷修復が共通のシグナル経路を介して制御されることを明らかにした (図 3)。

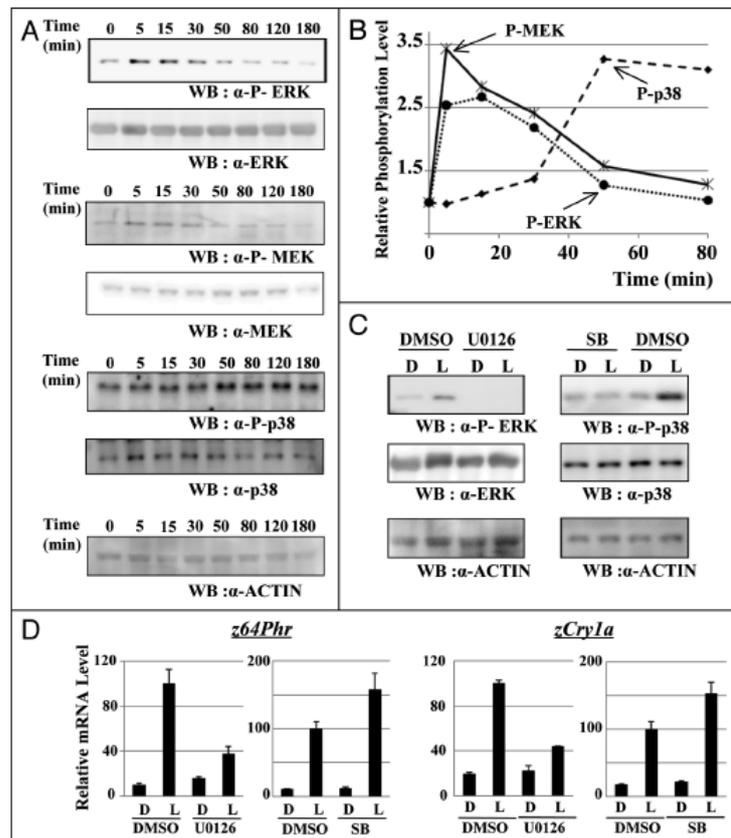


図 2. MAPK シグナル経路による DNA 損傷応答と概日リズムの共通の制御

(A) 培養細胞に光照射後の経時的に ERK、MEK、P38 のリン酸化のレベルをウエスタンブロット法により解析した。(B) A の結果を定量シグラフ化した。(C) ERK シグナル経路の阻害剤 (U0126) 及び P38 シグナル系の阻害剤 (SB) の効果をウエスタンブロット法により ERK 及び P38 のリン酸化のレベルを解析することで検討した。(D) ERK シグナル経路の阻害剤 (U0126) 及び P38 シグナル系の阻害剤 (SB) の DNA 損傷修復遺伝子 (64Phr) と概日リズム制御遺伝子 (Cry1a) 効果を RT-PCR により解析した。

#### 4. 考察 まとめ

本研究は、ゼブラフィッシュ培養細胞において、概日リズムとDNA損傷修復を共通に制御するシグナル伝達経路の存在を示した。この研究成果は、哺乳動物においても概日リズムとDNA損傷応答が共通に制御されている可能性を示唆している。近年、BMAL1やCLOCK等の分子時計制御因子の変異マウスがリンパ腫、早老症、代謝異常を発症することが報告され、一部その病態メカニズムに分子時計が関与していることが強く示唆されている。分子時計は細胞周期制御因子 *Wee1* や癌遺伝子 *c-Myc* 等の転写制御を介して他の細胞機能に影響を与えることが報告されている。また、時計蛋白質CLOCKがBMAL1だけでなく、グルココルチコイドレセプター (GR) といった他の細胞機能制御因子をそのHAT活性によりアセチル化し機能調節することが報告されている。さらに、分子時計はCLOCKのHAT活性によりターゲット遺伝子の発現調節領域のクロマチンリモデリングを行うが、これは分子時計が細胞のエピジェネティック応答を担う可能性を示唆する。本研究の知見は、分子時計による転写、翻訳後修飾、クロマチンリモデリングの調節という新規のDNA損傷応答機構の存在を強く示唆する。

#### 5. 発表論文、参考文献

1. Tamaru T, **Hirayama J**, Isojima Y, Nagai K, Norioka S, Takamatsu K, and Sassone-Corsi P. CK2 $\alpha$  phosphorylates BMAL1 to regulate the mammalian clock. *Nat Struct Mol Biol.* 16:446-448, 2009.
2. Miyamura N\*, **Hirayama J**\*#, , Sawanobori K, Tamaru T, Asaoka Y, Honda R, Yamamoto T, Uno H, Takamatsu K, Nishina H. CLOCK:BMAL-independent circadian oscillation of zebrafish Cryptochrome1a gene. *Biol. Pharm. Bull.* 32:1183-1189, 2009.  
(\*Contributed equally; #Corresponding author)
3. **Hirayama J**#, Miyamura N, Uchida Y, Asaoka Y, Honda R, Sawanobori K, Todo T, Yamamoto T, Sassone-Corsi# P, and Nishina H.  
Common light signaling pathways controlling DNA repair and circadian clock entrainment. *Cell Cycle* 8:2794-1189, 2801. (#Corresponding author)