

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「生命動態の理解と制御のための
基盤技術の創出」
研究課題「クロノメタボリズム:時間相の生物学」

研究終了報告書

研究期間 2014年10月～2020年3月

研究代表者:岡村 均
(京都大学大学院薬学研究科、
特任教授)

§ 1 研究実施の概要

(1) 実施概要

生物は時間という位相の中で生きている。細胞には、一日という外的時間に対応して内的リズムを刻む機構があり、これが組織、個体に張り巡らされ、全ての階層で時が刻まれる。長らく生物の時間は、時計遺伝子による転写クロックに支配されていると考えられていたが、新たにメタボリッククロック(レドックス、アセチル化、メチル化、cAMP、カルシウムイオンなどのリズム)が発見され、生物時計研究はパラダイムシフトを迎えている。この古典的転写クロックと新奇メタボリッククロックのインターロックしたクロノメタボリックシステム(図1)は、代謝を動的に管理し、生命機構に根源的な時間秩序を与えていると考えられるが、その実体や全体像は未だ明らかでない。このような中、我々は、mRNAメチル化が転写クロックの周期を調節することを見出し、RNAレベルでの代謝(メチルサイクル)と転写クロックを接合する分子機構を解明し、クロノメタボリックシステムの一部を初めて明らかにした(Cell 2013)。

本研究では、不可分に絡み合った、時間と代謝を結ぶクロノメタボリズムという観点を、RNAのメチル化・メチルサイクルを足掛かりに、生体リズム機構の階層間に展開し、DNA情報の読み取り、RNA修飾、翻訳、タンパク質修飾、細胞間伝達から神経・ホルモンによる個体に至る基盤分子ネットワークを定量的・経時的データに基づく数理モデルをもとに解析した(図2)。さらに、狙った部位でRNAメチル化を操作できる分子ツールを作製し、時計の制御におけるRNAメチル化の意義を示した。研究者参加者は、実験生物学(京都大学岡村グループ、後に大阪大学富永グループ参加)、計算生物学(理研黒澤グループ、後に東京大学郡グループ参加)、タンパク質化学(京都大学今西グループ)という三つの全く異なった研究背景を持つ。これら三者の一体となったアプローチにより、数理解析と分子解析を統合し、生体リズムのインターロック機構という全く未知の機構の解明に挑んだ。

主な研究成果としては、(1) RNAメチル化修飾のうち代表的なm6Aメチル化が、CK1δの選択的スプライシングを介して、時計タンパク質を制御し、リズム周期を調節する機構を解明し、この分子機構による家族性睡眠相前進症候群 FASPS の新たな分子機構を提唱(PNAS 2018)、(2)脳内概日リズム中枢である視交叉上核 SCN に発現する新規 GPCR である GPR176 の発見(Nature Com 2017)、(3)時間機構である生体リズム機構が、細胞分裂のタイミングを制御することにより、細胞のゲノム量の倍化(多倍体細胞)の形成に

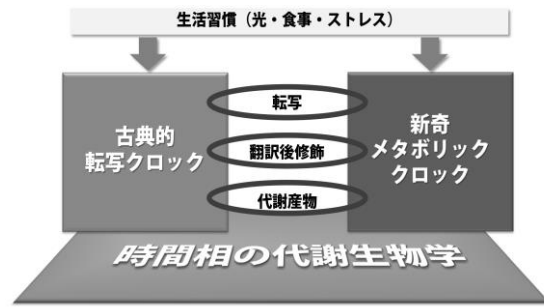


図1 時間相の代謝生物学における古典的転写クロックと新奇メタボリッククロック

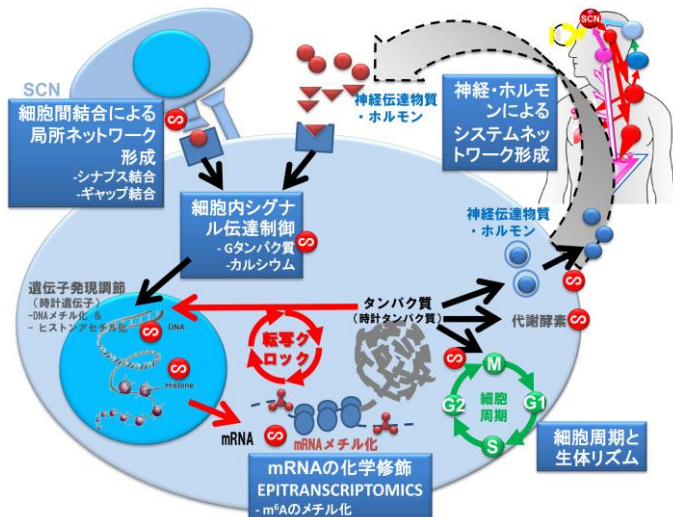


図2 生体リズムの発振機構 本プロジェクトでの研究項目は濃青色に白字で記載する。

成に参与することの証明(Nature Com 2017)がある。その他、時差ボケの数理機構の解明による、新たな防止機構の予測と、マウスでの実証、老齢マウスの時差負荷による生存率の向上のための分子機構の発見、m6Aメチル化のハイスループットな検出法の開発、変温動物・恒温動物共通のリズム同調の分子機構の解明を行った。今回の検索により、従来の時計遺伝子によるリズム生成機構の他、メチル化を中心としたメタボリズムが、疾病や老化時の生体リズム発振や調節の重要な機構となっていることが明らかとなった。

(2) 顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

1. m6A メチル化は CK1δの選択的スプライシングを介して概日リズム周期を制御する

概要:

メッセンジャーRNAのm6Aメチル化修飾が生体時計の周期を調整する分子機構を、細胞および個体レベルで明らかにした。これは、m6A修飾が、時計遺伝子Perのリン酸化を司るキナーゼCK1δ(カゼインキナーゼ1-delta)の選択的スプライシングを引き起こし、異なる機能を持つキナーゼが量的に変動することにより、概日リズムの周期を調整する。mRNAのm6Aメチル化修飾が生理作用を持ち、リズム周期異常の分子機構を解明したのは、世界初である。

2. 「時系列波形の歪み」が様々なリズムの周期の決定に重要であることの理論式を提示

概要:

最新の分子生物学的知見を取り込んだ概日リズムシミュレータと、低次元の可積分モデルの双方を解析し、これまで注目されてこなかった「時系列波形の歪み」が周期の決定に重要であること、またこの性質が概日リズムのみならず電気回路上の振動モデルなどにも適応可能なことを見つけた。

3. RNAメチル化 m6A のハイスループットな検出法の開発

概要:

m6A感受性を有するRNA切断酵素を世界で初めて見出した。(m6)ACA配列を含み、両末端に蛍光団と消光団を併せ持つ核酸プローブに、このRNA切断酵素MazFを作用させることにより、RNA中のm6A修飾の有無を定量的かつハイスループットで評価することができた。RNAメチル化調節酵素阻害剤スクリーニングや、特定のメッセンジャーRNA中のm6Aの抗体非依存的な定量評価法への応用が注目される。

<科学技術イノベーションに大きく寄与する成果>

1. 概日リズム中枢SCNに発現する新規GPCRであるGPR176の発見

概要:

中枢時計SCNにおけるGPCR発現の網羅的解析から、生理作用のある新たなオーファンGPCRであるGPR176受容体を発見した。これは、長時間のシグナル伝達を制御するGzにカップルしcAMPを抑制する全く新しい受容体であった。SCNにおいて、cAMPシグナル伝達系は、時計遺伝子により生じた転写リズムをより強力に安定したリズムに統合しており、これを元にしたニュータイプの睡眠リズム制御薬の開発を目指す。

2. 時差ボケの新しい分子機構の発見

概要:

海外旅行などで経験する、多くの人を悩ませる時差ボケの原因を、数理シミュレーションによって解明した。出発当日の早起きだけで時差ボケを軽減する方法を提案し、マウスを使った実験で実証した。時差ボケの症状の軽減だけでなく、シフト労働者の体の負担を軽減するスケジュール作りにも応用の可能性がある。また、バソプレッシン受容体が老齢マウスの慢性時差負荷に重要であることを発見した。

3. 正常な時計遺伝子リズムは細胞分裂の完遂に必須で、多倍体化を防止する

概要:

体内時間を生み出すPer時計遺伝子群は、肝細胞の分裂と増殖に必要であり、この遺伝子の欠損で増殖シグナルErk1/2が低下し細胞質分裂が失敗し、多倍体化した核を持つ巨大細胞となることを初めて明らかにした。今後、Erk1/2の活性化剤や阻害剤を利用した、細胞の多

倍体化や大きさの決定機構が解明されることが期待される。

<代表的な論文>

1. Jean-Michel Fustin, Rika Kojima, Kakeru Itoh, Hsin-Yi Chang, Shiqi Yea, Bowen Zhuang, Asami Oji, Shingo Gibo, Rajesh Narasimamurthy, David Virshup, Gen Kurosawa, Masao Doi, Ichiro Manabe, Yasushi Ishihama, Masahito Ikawa, and Hitoshi Okamura, "Two Ck1 δ transcripts regulated by m6A methylation code for two antagonistic kinases in the control of the circadian clock", *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 115, No. 23, pp 5980-5985, 2018.
2. Hsu-Wen Chao, Masao Doi, Jean-Michel Fustin, Huatao Chen, Kimihiko Murase, Yuki Maeda, Hida Hayashi, Rina Tanaka, Maho Sugawa, Naoki Mizukuchi, Yoshiaki Yamaguchi, Jun-ichiro Yasunaga, Masao Matsuoka, Masahito Sakai, Michihiro Matsumoto, Shinshichi Hamada, Hitoshi Okamura, "Circadian clock regulates hepatic polyploidy by modulating Mkp1-Erk1/2 signaling pathway", *Nature Communications*, vo. 8, No 1, pp :2238, 2017.
3. Masao Doi, Iori Murai, Sumihiro Kunisue, Genzui Setsu, Naohiro Uchio, Rina Tanaka, Sakurako Kobayashi, Hiroyoshi Shimatani, Hida Hayashi, Hsu-Wen Chao, Yuuki Nakagawa Y, Yukari Takahashi, Yunhong Hotta, Jun-ichiro Yasunaga, Masao Matsuoka, Michael H Hastings, Hiroshi Kiyonari, HitoshinOkamur, "Gpr176 is a Gz-linked orphan G-protein-coupled receptor that sets the pace of circadian behaviour", *Nature Communications*, 7, 10583, 2016.

§ 2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

グループ名	研究代表者または主たる共同研究者氏名	所属機関・部署・役職名	研究題目
岡村グループ	岡村 均	京都大学・大学院薬学研究科・特任教授	クロノメタボリズムの生物学
黒澤グループ	黒澤 元	理化学研究所・専任研究員	クロノメタボリズムの数理モデルの構築
今西グループ	今西 未来	京都大学・化学研究所・准教授	人工機能性核酸結合蛋白質によるクロノメタボリズムの動的制御
郡グループ	郡 宏	東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授	時差症候群の数理モデルの構築
富永グループ	富永 恵子	大阪大学・大学院生命機能研究科・准教授	生理活性シグナルのクロノメタボリズム

① 「岡村」グループ

- ・研究代表者: 岡村 均 (京都大学大学院薬学研究科 特任教授)
- ・研究題目: クロノメタボリズムの生物学
- ・研究項目
 - ・m6A エピトランスクリプトームのリズムへの作用機構
 - ・RNA メチル化のサーカディアン制御機構の解明
 - ・RNA メチル化の進化上の保存
 - ・時計遺伝子による細胞分裂制御機構の解明
 - ・生体時計による細胞周期制御機構の解明
 - ・時間シグナルと生理活性シグナルの細胞レベルでの融合の分子機構
 - ・バソプレッシン局所ネットワークによる時差症候群の解明
 - ・局所ネットワークによる時差症候群の数理モデルの構築

② 「黒澤」グループ

- ・主たる共同研究者: 黒澤 元 (理化学研究所 専任研究員)
- ・研究題目: クロノメタボリズムの数理モデルの構築
- ・研究項目
 - ・メタボリッククロック分子機構の数理モデルの構築
 - ・RNA メチル化リズムと時計遺伝子によるリズム発振の数理モデルの構築
 - ・細胞時計と細胞分裂周期の分子相互作用モデル
 - ・細胞時計の機能原理の数理モデルの構築

③ 「今西」グループ

- ・主たる共同研究者: 今西 未来 (京都大学化学研究所 准教授)

- 研究題目:人工機能性核酸結合蛋白質によるクロノメタボリズムの動的制御
- 研究項目
 - 人工 RNA 結合蛋白質の物性基盤の構築
 - 部位特異的 RNA メチル化調節酵素の創製と時計の制御

④「郡」グループ

- 主たる共同研究者:郡 宏 (東京大学大学院新領域創成科学研究科 教授)
- 研究題目:時差症候群の数理モデルの構築
- 研究項目
 - 時差症候群の数理モデルの構築
 - 実データからのパラメータ推定

⑤「富永」グループ

- 主たる共同研究者:富永 恵子 (大阪大学大学院生命機能研究科 准教授)
- 研究題目:生理活性シグナルのクロノメタボリズム
- 研究項目
 - 時間シグナルと生理活性シグナルの細胞レベルでの融合の分子機構

(2)国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

- m6A エピトランスクリプトームのリズムへの作用機構
 1. 真鍋一郎教授(千葉大学医学研究科):RNA メチル化の Chip-Seq 解析での共同研究。
- RNA メチル化のサーカディアン制御機構の解明
 1. 伊川正人教授(大阪大学微生物研究所発工学):Ckl1d キナーゼのスプライスバリエーションのマウス作成での共同研究。
 2. 石濱泰教授(京都大学薬学研究科):質量解析によるプロテオミクスから、PER タンパク質のリン酸化制御部位の同定での共同研究。
- RNA メチル化の進化上の保存
 1. 伊佐正教授(京都大学大学院医学研究科):マーモセットの飼育・行動の共同研究。
 2. William Schwartz 教授 (Dell Medical School, University of Texas at Austin): 行動リズムの社会性の研究での共同研究。
 3. 各種生物におけるメチル化シグナルの解析:David Whitmore 教授 (University College London, ゼブラフィッシュ)、影山龍一郎教授(京都大学:ウイルス再生医科学研究所, 体節リズム)、松尾拓哉講師(名古屋大学遺伝子実験施設, クラミドモナス)との共同研究。
- 時計遺伝子による細胞分裂制御機構の解明
 1. 松岡雅雄教授(京都大学ウイルス研究所:現熊本大学大学院生命科学研究部):肝細胞でのレンチウイルスベクターの作成と運用の共同開発。
 2. 松本道宏部長(国立国際医療センター研究所):*Per* 欠損マウス肝臓 kinase アッセイを共同開発。
 3. 浜田新七部長(大津市民病院病理学):*Per* 欠損マウスの病理検査。
- 時間シグナルと生理活性シグナルの細胞レベルでの融合の分子機構
 1. 伊川正人教授(大阪大学微生物研究所発工学):G タンパク質制御因子の構造特異的ミュータントマウスの作成によるリズム制御系の共同開発。
 2. 笹野公伸教授(東北大学医学研究科病理診断)・佐藤文俊教授(東北大学医学研

究科難治性高血圧・内分泌代謝疾患)・西川哲男(横浜労災院長): ヒト原発性アルドステロン賞におけるステロイド産生での共同研究。

3. 稲富勉講師(京都府立医科大学眼科:現国立長寿医療研究センター部長):眼疾患におけるステロイド代謝の共同研究。
4. Fumika Hamada 准教授(Cincinnati Children's Hospital Medical Center):温度制御リズムの *Drosophila* とマウスの比較研究。
5. 程肇教授(金沢大学)、重吉康史教授(近畿大学):自由行動下での Per1-luc, Per2-luc ラットの脳内時計中枢におけるリアルタイム遺伝子発現リズムの検出研究。

・バソプレッシン局所ネットワークによる時差症候群の解明

1. 崎村健司教授(新潟大学脳研):バソプレッシン受容体部位特異的欠損系作成マウス作成、ピリオド遺伝子の共同研究。
2. 井樋慶一教授(東北大学情報科学研究科):部位特異的バソプレッシン欠損系での共同研究。
3. 清成寛ユニットリーダー(理研生命機能科学研究センター生体モデル開発ユニット):ピリオド遺伝子制御部位および GPR176 に関する共同研究
4. Michael Hastings 教授(MRC Cambridge Univ):SCN のペプチド受容体の相互作用での共同研究。

・RNA メチル化リズムと時計遺伝子によるリズム発振の数理モデルの構築

1. 御子柴克彦シニアチームリーダー(理化学研究所脳科学総合研究センター):マイクロ RNA による mRNA 分解と翻訳の制御に関する共同研究。本研究における RNA メチル化による mRNA の制御についての数理モデルの発展。

・細胞時計と細胞周期の分子相互作用モデルの構築

1. 重吉康史教授(近畿大学医学部):生体時計の温度補償性に関する共同研究。
2. 河原吉伸教授(九州大学マスフォアインダストリ研究所/理研 AIP)、坂内健一教授(慶応大学理工学部/理研 AIP)、中尾裕也教授(東京工業大学工学院)、國広悌二教授(京都大学理学部):くりこみ群や作用素論の数学を用いて、詳細シミュレータと低次元の可積分モデルの振る舞いを関連づける研究。