

哺乳類体内時計の脳内制御に関する研究

研究管理統括者：岡村 均（神戸大学大学院医学研究科）

I 試験研究の全体計画

1. 研究の趣旨

生体時計はほとんどの生命体に備わった基本的機構にもかかわらず、その解明が著しく遅れており、現代の生命科学に残された数少ないフロンティアの一つである。最近の本邦における時計機構の分子遺伝学・分子生物学のバイオニオの開発は、従来からの豊富なリズム生理の研究成果と人材とを結びつけることにより、本領域は格段の発展が期待できる状況となってきた。本研究は、以下の項目に代表される時間生物学の先導的意義を持つ課題を遂行する事により、他の研究領域に大きな波及効果をもたらすとともに、社会的諸課題の解決に貢献する事を目的とする。

(1) 生体リズムの発振メカニズムの解明

サーカディアン振動は一種の永久運動であり、生命の大きいなる不思議の一つである。この振動は振り子の役割をする時計振動遺伝子が振動遺伝子自身を産生する過程を抑制する抑制因子として働くネガティブ・フィードバック機構が基本である。このフィードバック機構は物理学でいうリミットサイクルを形成するが、その構成因子である転写促進因子、転写抑制因子、抑制遅延因子を明らかにする。

(2) フォトンイメージングによる単一細胞レベルでのリズムモニター系の開発

遺伝子組換えの技術によって、遺伝子発現を生きたまま観察する事が可能になりつつある。しかし、現在の技術では比較的大きな組織からしか生体リズムの遺伝子発現は検出できない。細胞レベルで生体リズムを観察できる超高感度のフォトンイメージング検出装置を開発し、遺伝子発現を単細胞レベルのリアルタイムイメージングで経時的に測定する。さらに、このシステムを基にして、広くライフサイエンスの各分野に応用できる、遺伝子の細胞内でのリアルタイムモニターシステムや、遺伝子発現から細胞活動までをつなぐシステムを開発する。

(3) 時計シグナル伝達機構の解析

体内時計の情報は24時間という長周期で、しかもきわめて正確で、時計遺伝子の振動情報を伝える新しい細胞伝達系が関与している事が考えられる。マイクロアレイ・ディフェレンシャルディスプレイ等を利用した遺伝子発現解析を確立し、時計により制御される全遺伝子の時間階層性を明らかにする。

(4) 時計発振の環境周期への同調機構および時計情報の出

力機構に関する研究

体内時計の重要な性質に、環境周期との同調の機構がある。今回、環境周期への光同調、細胞時計相互のリズム同期、時計情報の出力機構を、分子レベルで解明する。

(5) 哺乳類における全身の時計の時刻の測定と人工生物時計（バイオクロック）の開発

哺乳類においては、時計の最高位中枢である視交叉上核から発振された時間情報は、他の脳部位にある時計に伝わり、さらに末梢臓器の時計を調律する。遺伝子発現の検索により、全身各組織の時刻を知り、哺乳類階層の時計機構が実際のどの様に働いているのかを探る。また、通常はリズムのない細胞に、時計遺伝子発振機構を導入する事により、数々の周期を持つ人工的な生物時計を作成する。これにより、将来のヒトにおける臨床応用を見据えた、資料を作成する。

2. 研究内容及び目標

1. 時計遺伝子の発現制御に関する研究

サーカディアン振動は遺伝子レベルで発振される永久運動である。この地球の生命体に特異的な、長周期のしかも極めて正確な振動はリミットサイクルを形成し、振り子の役割をする時計振動遺伝子が振動遺伝子自身を産生する過程を抑制する抑制因子として働くネガティブ・フィードバック機構によって成り立っている。この哺乳類におけるフィードバック機構の分子機構を明らかにする。

(1) 時計遺伝子の転写制御に関する研究（神戸大学医学部）

振動という独特の現象は、時計遺伝子の転写制御部位という場での個々のドラマにより生まれる。この機構を明らかにする。具体的には、

① 哺乳類時計遺伝子 mPer 遺伝子群の転写制御に関する研究

② リズム発振の新規ポジティブフィードバックシステムに関する研究

③ 哺乳類時計遺伝子導入トランスジェニックショウジョウバエを用いた複数の振動体遺伝子の形成するリミットサイクル間の同期に関する研究

④ mPer プロモーターに微弱発光レポーター遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウス・細胞系によるリズムアッセイ系を確立する研究

⑤ 時計遺伝子ノックアウト細胞を用いた時計発振機構の解析

⑥ リズム同調には、環境因子が働く時間と働かない時間がある。これを「ゲーティング」と言うが、これを転写レ

ベルで説明する。

(2) 時計遺伝子の核移行と時計フィードバックループに関する研究 (神戸大学医学部)

時間を形成する時計振動体蛋白はループを形成し、これにより、時が形成される。ここではその細胞内ドラマを、視交叉上核と細胞系を用いて、詳細に決定する。

- ① 哺乳類における時計遺伝子の核内移行に関する研究
- ② 時計遺伝子のリン酸化の研究

(3) 時計遺伝子間の分子結合に関する研究 (矢内原研究所)

時の機能発現には時計遺伝子産物間の結合が重要である。ここでは、時計蛋白の機能ドメインに対する中和抗体を作成し検討する。

(4) 時計遺伝子のトランスジェニックマウス・ノックアウトマウスの行動解析に関する研究 (山口大学理学部)

時計遺伝子トランスジェニックマウス・ノックアウトマウスの作成は様々な時を持つ動物ができる。これを相互に組み合わせ (移植など)、体内時計の全貌を解明する。

(5) 高感度リアルタイムリズムモニター系の開発に関する研究 (神戸大学医学部)

プロモーター・luciferase 時間遺伝子発現を単細胞レベルで経時的にとらえ、薬物の作用などをリアルタイムで見ることができる系を開発。また、空間分解能で優れた ICCD カメラと顕微鏡像を併用する事により、細胞質・核レベルでの移動を検出する装置を開発する。光情報受容から時計遺伝子に至るまでの時計シグナル解析の武器となる。

(6) 時間軸での遺伝子マッピングによる時計シグナル伝達機構の解析

コア・ループから如何にして時が伝達されるかを解明する。

- ① リズムセンター視交叉上核での高頻度発現遺伝子のスクリーニング
- ② 視交叉上核内での時間特異的発現遺伝子のスクリーニング

(7) 生物に応用可能な高感度フォトニクス・デバイスの開発

単一周波数グリーンレーザーを励起光源として用い、コヒーレント検出イメージング法による蛍光タンパクの組織内分布計測技術を開発する。

2. 時計発振の環境周期への同調機構に関する研究

(1) 情報受容から時計遺伝子に至る経路に関する研究 (早稲田大学人間科学部)

環境周期との同調は、発振と並ぶ体内時計のもう一つの特徴である。明暗周期、非光同調因子 (食餌・睡眠など) の同調機構を探る。

- ① 視交叉上核における光情報伝達から時計遺伝子発現に至る細胞内情報伝達系路に関する研究
- ② 細胞内シグナルによる時計遺伝子のリン酸化に関する研究
- ③ 従属的振動発振細胞におけるリズム発振調節機構の研究

(2) 新規光情報伝達因子に関する研究

現在まだ不明なリズム同調光受容因子を特定する。

① Cry1, Cry2 の時計遺伝子フィードバックループへの情報伝達の解析と結合蛋白の同定

① Cry ノックアウト細胞によるリズム変動の解析

3. 時計出力機構の研究

(1) 視交叉上核細胞内での時計出力機構に関する研究

時計情報は、どのようにして出力されるのか? そのメカニズムをマスタークロックのある視交叉上核でさぐる。

① 時計遺伝子から情報が膜電位として伝達される仕組みの解明

② 視交叉上核から他の脳部位までの出力伝達機構の解明

(2) 生体内埋込みマイクロダイアリスプローブによる生体での時計出力機構に関する研究

生体におけるリズム出力マーカーとしてメラトニンを数ヶ月もモニターする系を考案し、リズム解析を行う。また、このような長期モニター系を利用して、リズムと脳機能の関係を探る。

(3) 網膜培養系の時計機構に関する研究

網膜の他の例を見ない特徴は、光の入力から出力に至るまで全てこの培養系だけで解析可能だからである。この系で、発振機構、同調機構の解明を行う。

4. 生体時間とバイオクロック (人工生物時計) に関する研究

哺乳類においては、時計の最高位中枢である視交叉上核から発振された時間情報は、他の脳部位にある時計に伝わり、さらに末梢臓器の時計を調律する。リズム発振・同調・出力機構がわかった上で、通常はリズムのない細胞に、時計遺伝子発振機構を導入することによって人工的な生物時計を作製する。これにより、数々の周期を持つ時計を作製し、将来の時間薬理学的な治療や診療に役立つ細胞工学的な基礎を作る。各種臓器にある末梢の時計に対する基礎的研究を進めて成果が上がってきており、臨床医学を見据えた研究も行う。

① パーマネントセルラインとバイオクロックの作成

末梢の時計は通常の細胞にあると想定されるが、連続的な発振はできない。今回、細胞に時計遺伝子発振機構を導入する事により、数々の周期を持つ人工的な生物時計を作成する。

② シングルセル活動検出システム・生体シグナル検出システムの開発

マイクロ-TAS を活用したシングルセル活動検出システムを開発し、細胞活動の長期モニター系を確立する。生体の非侵襲的な情報モニター系はバイオクロックの生体応用に必須であるので、生体シグナルのリアルタイムモニターを開発する。

③ 全身の時刻決定と従属的振動末梢臓器に関する研究

全身の時計細胞の時刻を、微小組織片を用いる方法を開

発することにより行う。将来の臨床応用を見据え、末梢各臓器の時刻、とくに疾病の多い循環器を中心に検索する。これにより、オーダーメイドメディスンの重要な柱として立ち立てる。

3. 年次計画

本プロジェクトでは、全く新しい情報発振系により発振され、伝達される体内時計の分子機構を解明し、従来解析が困難であった生命現象の時間軸に沿った研究分野を切り開く事を目的とする。前年度で第一期が終わったが、(1)「時計遺伝子の発現制御に関する研究」はほぼ目標が達成され、(2)「時計発振の同調機構」と(3)「時計出力機構」は、物足りない分野もあるが、満足行く達成度であった。(1)の分野は、当初予測よりもさらに進んだ研究が達成され、国際的にも非常に競争が熾烈であるが、この分野のトップグループに立っている。各分野とも、ごく一部のものをのぞいて、順調に研究が進展している。当初予想より、テーマに沿った研究が進展しているのが特徴である。

今年度より開始する第二期では、上記の研究の集大成を

計りながら、第一期のリズム発振・同調・出力の分子機序解明の成果を新しい臨床医学の方向と、全く新しい生命科学に広く展開可能な機器開発に向ける。従来は3研究項目が上がっていたが、終了した分野を整理し、新たな分野を加え2つに統合した。まず、工学的研究と生物学との共同研究が非常にうまくいっているのが我々の研究の一つの特徴であるので、時計発振機構の研究の分担課題として、生物に適用可能な高感度フォトニクス・デバイスの開発、マイクロ-TASを活用したシングルニューロン活動検出システムの開発、生体シグナルテレポートシステムの開発を加える。また、我々は各種臓器にある末梢の時刻に対する基礎的研究を進めて成果が上がってきており、臨床医学を見据えた研究が可能となってきた。これには、リアルタイムでの個々個人の体内時間を決めるオーダーメイドメディスンとしても重要であり、高血圧、心疾患、うつ病などへの応用が期待される。このため、生体時間と人工生物時計の研究の分担項目として新たに、ヒトを中心とした「末梢臓器の生体時間に関する研究を加え、今後より体系的な基礎医学的データを収集することとする。

研究項目	14年度	15年度
1. 時計遺伝子の発現制御に関する研究		
(1) 哺乳類時計遺伝子の転写制御とシグナル伝達に関する研究	← mPer 遺伝子群のリズム発振 →	
	← 時計遺伝子の転写制御 →	
(2) 時計遺伝子の核移行と時計フィードバックループに関する研究	← 時計遺伝子の核内移行 →	
	← 時計シグナル伝達系の解明 →	
(3) 時計遺伝子間の分子結合に関する研究	← 時計遺伝子間の分子結合 →	
(4) 時計遺伝子のノックアウトマウス・トランスジェニックマウスの行動解析に関する研究	← 時計遺伝子改変動物の脳移植による行動解析 →	
(5) 高感度リアルタイムリズムモニター系の開発に関する研究	← 極微弱光リズム計測による遺伝子改変マウス →	
	← 極微弱発光細胞内リズム計測システムの開発 →	
(6) 生物に適用可能な高感度フォトニクス・デバイスの開発	← 高感度フォトニクス・デバイスの開発 →	
2. 時計発振の環境周期への同調および出力機構に関する研究		
(1) 光情報受容から時計遺伝子に至る経路に関する研究	← 細胞内同調情報伝達経路 →	
(2) 視交叉上核細胞内での時計出力機構に関する研究	← 視交叉からの時計出力機構に関する研究 →	
(3) 生体内埋込みマイクロダイアリシスプローブによる生体での計出力機構に関する研究	← 松果体埋込プローブによるメラトニンリズム →	
	← ダイアリシスによる薬物自己投与リズムに関する研究 →	
3. 生体時間とバイオクロック（人工生物時計）に関する研究		
(1) バイオクロックに関する研究	← パーマネントセルラインとバイオクロックの作成 →	
	← マイクロ TAS シングル細胞活動検出システムの開発 →	
	← 生体シグナルテレポートシステムの開発 →	
(2) 末梢臓器の生体時間に関する研究	← 全身の時刻の決定と従属的振動末梢臓器 →	
	← 循環器での時計遺伝子の発振の研究 →	
所要経費（合計）	250百万円	

4. 平成14年度における実施内容と達成目標

1. 時計遺伝子の発現制御に関する研究

(1) 時計遺伝子の転写制御に関する研究（神戸大学大学院医学系研究科）

① mPer 遺伝子群のリズム発振に関する研究

哺乳類の時計振動遺伝子 mPer1 の遺伝子上流域の遺伝子解析が終わったので、さらに mPer2 の遺伝子の発振制御コードを解明し、新規発振機構を解析する。昨年発見した PAR 蛋白・E4BP4 を介するアンタゴニスティック制御はその一つである。今回、これをさらに究明する。

② 哺乳類時計遺伝子の転写制御に関する研究

コア・ループの制御機構を、遺伝子改変マウスを用いて解明する。

(2) 時計遺伝子の核移行と時計フィードバックループに関する研究（神戸大学大学院医学系研究科）

① 哺乳類における時計遺伝子の核内移行に関する研究

線維芽細胞系のセルラインを用いて、哺乳類の時計蛋白の核内移行メカニズムを、昨年に続き検索する。FRET テクニックを利用した細胞内蛋白相互作用の研究を行う。また、CRY ノックアウトマウス細胞系を用い、時計遺伝子の核移行とフィードバックループを解明する。

② 時計シグナル伝達系に関する研究

I 期での「時間軸での遺伝子マッピングによる時計シグナル伝達機構の解析」を発展的に解消し、時計遺伝子のコア・フィードバックループがどのようにシグナル伝達されていくのかを遺伝子改変マウスを用いて解析する。

(3) 時計遺伝子間の分子結合に関する研究（矢内原研究所）

① 時計遺伝子間の分子結合に関する研究

時計蛋白の機能ドメインに対するモノクローナルおよびポリクローナル中和抗体を作成し、蛋白間結合がどのようにして時計フィードバックループに関与するかを検索する。今年度は特に、時計発振の機能中心に対するペプチド抗体を作成する。

(4) 時計遺伝子のノックアウトマウス・トランスジェニックマウスに関する研究（山口大学理学部）

① 時計遺伝子改変マウスの脳移植による行動解析

時計遺伝子改変マウス間の脳移植を通じて、行動リズムを決定する機構を探る。

(5) 高感度リアルタイムリズムモニター系の開発に関する研究：フォトンイメージングによる単一細胞でのリズムモニター（神戸大学大学院医学系研究科）

我々は宇宙放射線よりも弱い光を検出できる極微弱項検出装置を開発し、時間遺伝子発現を単細胞レベルで経時的にとらえ、薬物の作用などをリアルタイムで見ることに成功した。また、生きた動物での遺伝子発現を世界に先駆けとらえることに成功した。今年度も微細形態が観察可能な「超高感度連続微細 CCD カメラシステム」を発展開発する。

① 微弱発光レポーター遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウス・細胞系による超微弱発光リズム系に関する研究

遺伝子発振を細胞レベルで捉える画期的なシステムを構築する。

② 超高感度連続微細 CCD カメラシステムの開発

「極微弱発光細胞内リズム計測システム」をさらにグレードアップした単細胞レベルで解析できるシステムを開発する。

(6) 生物に応用可能な高感度フォトリクス・デバイスの開発（東北工業大学工学部）

単一周波数グリーンレーザーを励起光源として用い、コヒーレント検出イメージング法による蛍光タンパクの組織内分布計測技術を開発する。

① 高感度フォトリクス・デバイスの開発

組織内部における多重散乱光に埋もれた励起レーザーの近軸コヒーレント成分を、光ヘテロダイン法により分離抽出することにより、蛍光タンパクの脳内空間分布を非侵襲リアルタイム計測する技術について検討する。そのためには、超低雑音で単一周波数発振が可能な高性能レーザーが必要である。

2. 時計発振の環境周期への同調および出力機構に関する研究

(1) 光情報受容から時計遺伝子に至る経路に関する研究（早稲田大学人間科学部）

体内時計の重要な性質に、環境周期との同調の機構がある。ヒトでは明暗周期のみならず、非光同調因子（食餌・睡眠など）も重要である。この同調因子が、いかにして時計遺伝子の発振に結びつくかを検索する。

① 時計細胞内同調情報伝達経路に関する研究

視交叉上核における、光情報伝達から時計遺伝子発現に至る細胞内情報伝達系路を、カイネース・リン酸化に注目して検索する。

(2) 視交叉上核細胞の時計出力機構に関する研究（早稲田大学人間科学部）

① 視交叉上核からの出力伝達機構の解明

視交叉上核から末梢組織での時計遺伝子の入力出力情報伝達を検討する。また、生体内のほとんどの細胞には時計発振機構が備わっている。視交叉上核以外の末梢の振動細胞の規則的食事性リズム発振モデル、メトアンフェタミンリズム発振モデルを用いて、発振現象を解析する。

(3) 生体内埋込みマイクロダイアリスプローブによる生体での時計出力機構に関する研究（浜松医科大学）

① 松果体埋込みマイクロダイアリスプローブによるメラトニン研究

視交叉上核の指令下で活動が制御されているメラトニンを長期間持続的に検出できるプローブを用いて遺伝子改変動物で検索する。

② マイクロダイアリシスによる薬物の自己投与リズムに関する研究

長期松果体埋込みプローブをさらに改良し、メラトニンのみならず神経伝達物質の変動をマウスで測定できる系を開発する。この系を利用して、中枢時計と末梢時計の神経機構を解析する。

4. 生体時間とバイオクロック（人工生物時計）に関する研究

(1) バイオクロックに関する研究（神戸大学大学院医学系研究科）

細胞に時計遺伝子を導入し、長周期で発振する細胞を作り、応用する。

① パーマネントセルラインとバイオクロックの作成

末梢の時計は通常の細胞にあると想定されるが、連続的な発振はできない。今回、細胞に時計遺伝子発振機構を導入する事により、数々の周期を持つ人工的な生物時計を作成する。

② マイクロ-TAS シングルセル活動検出システム

マイクロ-TASを活用したシングルセル活動検出システムを開発し、細胞活動の長期モニター系を確立する。

③ 生体シグナルテレポートシステムの開発

生体の非侵襲的な情報モニター系はバイオクロックの生体応用に必須であるので、生体シグナルのリアルタイムモニターを開発する。

(2) 末梢臓器の生体時間に関する研究（神戸大学大学院医学系研究科）

① 全身の時刻決定と従属的振動末梢臓器に関する研究

全身の時計細胞の時刻を、微小組織片を用いる方法を開発することにより行う。将来の臨床応用を見据え、末梢各臓器の時刻も決める。

② 循環器での時計遺伝子の発振の研究

リアルタイムでの個々個人の体内時間を決める方法を開発し、高血圧、心疾患などの循環器疾患のオーダーメイドメディスンを目指す。今回、循環器を中心とした体系的な基礎医学的データを収集する。

II 平成14年度における実施体制

研究項目	担当機関	研究担当者
1. 時計遺伝子の発現制御に関する研究		
(1) 哺乳類時計遺伝子の転写制御とシグナル伝達に関する研究	神戸大学大学院医学系研究科	山口 瞬
(2) 時計遺伝子の核移行と時計フィードバックループに関する研究	神戸大学大学院医学系研究科	八木田 和 弘
(3) 時計遺伝子間の分子結合に関する研究	(株)矢内原研究所	矢内原 千鶴子
(4) 時計遺伝子のノックアウトマウス・トランスジェニックマウスの行動解析に関する研究	山口大学理学部	井 上 慎 一
(5) 高感度リアルタイムリズムモニター系の開発に関する研究	神戸大学大学院医学系研究科	山 口 瞬
(6) 生物に応用可能な高感度フォトニクス・デバイスの開発	東北工業大学	小 林 正 樹
2. 時計発振の環境周期への同調および出力機構に関する研究		
(1) 光情報受容から時計遺伝子に至る経路に関する研究	早稲田大学人間科学部	柴 田 重 信
(2) 視交叉上核細胞内での時計出力機構に関する研究	早稲田大学人間科学部	柴 田 重 信
(3) 生体内埋込みマイクロダイアリシスプローブによる生体での計出力機構に関する研究	浜松医科大学	中 原 大 一 郎
3. 生体時間とバイオクロック（人工生物時計）に関する研究		
(1) バイオクロックに関する研究	神戸大学大学院医学系研究科	八木田 和 弘
(2) 末梢臓器の生体時間に関する研究	神戸大学大学院医学系研究科	江 口 憲 昭
4. 研究管理	神戸大学大学院医学系研究科	岡 村 均

Ⅲ リエゾン会議

委 員	所 属
○岡 村 均	神戸大学 大学院医学系研究科 教授
井 上 慎 一	山口大学 理学部自然情報科学科 教授
江 本 憲 昭	神戸大学 大学院医学系研究科 助手
小 林 正 樹	東北工業大学 助教授
柴 田 重 信	早稲田大学 人間科学部薬理学教室 教授
中 原 大 一 郎	浜松医科大学 医学部 教授
矢内原 千鶴子	(株)矢内原研究所 所長
八木田 和 弘	神戸大学 大学院医学系研究科 助手
山 口 瞬	神戸大学 大学院医学系研究科 助教授

(注：○は研究管理統括者)