

外界刺激による概日時計の調節機構

羽鳥 恵[✉]

Salk Institute for Biological Studies

はじめに

哺乳類は全身のほぼすべての細胞に概日時計が備わっている。中でも行動を支配する概日時計は視床下部の視交叉上核 (suprachiasmatic nucleus; SCN) に存在し、中枢時計と呼ばれる。SCNの時計は外界の光周期に同調する。一方、全身に存在する末梢時計は食餌に強く影響される。種々の時計遺伝子破壊マウスにおいて肥満やメタボリックシンドロームが報告されてきた。逆に、代謝分子を破壊した場合に時計の出力に影響が見られることも知られている。

まず概日時計の光による調節機構に関して、次に食餌と末梢時計の関係について、私共の最近の研究成果を中心に紹介させて頂く。

ニワトリの松果体において時刻特異的に活性化される遺伝子群およびニューロステロイド

主観的夜の前半の光刺激によって概日時計の位相は後退し、一方、主観的夜の後半の光では位相が前進する。この時刻依存的な光位相シフトは生物種を超えて保存されており、概日時計の重要な特性の一つである。ニワトリの松果体は概日時計機能と共に、位相シフトに必要な内在性の光受容能を持つ。私共はこの特徴を生かし、ニワトリ松果体において時刻特異的に光誘導される松果体遺伝子群を単離し [1, 2]、夜の後半に光誘導される新規の遺伝子を *Lcg* (*Light-inducible and clock-controlled gene*) と命名した [3]。LCGタンパク質の性状解析から、中心体に局在する初の概日時計関連分子であることを見出した。

さらにニワトリ松果体を用いたDNAマイクロアレイ解析の結果、コレステロールの生合成に関係する多数の遺伝子が主観的夜の前半の光で活性化されることを見出した [4]。興味深いことにこれらの

遺伝子の光応答は、*E4bp4* 遺伝子の光応答パターンと類似していた。*E4BP4* は時計遺伝子 *Per2* を抑制して概日時計の時刻合わせをする [1, 5]。コレステロール生合成系の遺伝子群を誘導する転写因子 SREBP が主観的夜の前半の光によって活性化され、*E4bp4* は SREBP の新規標的遺伝子であることを見出した [4]。

主観的夜の前半の光でコレステロール生合成系の遺伝子群が活性化される生理的意義は何であろうか？松果体はコレステロールをもとに *7 α -hydroxypregnenolone* というニューロステロイドを合成・分泌することを見出した。松果体からの *7 α -hydroxypregnenolone* の分泌量は主観的夜の前半の光照射によって上昇し、脳内に *7 α -hydroxypregnenolone* を投与すると行動量が大きく上昇した。さらに、主観的夜の前半の光照射による行動量の上昇は、松果体の摘出によって抑制された。

以上の研究から、時刻に依存して光で活性化される経路を明らかにしただけでなく、遺伝子発現が行動の変化を導く過程を示すことが出来た。メラトニンを介して睡眠を促進すると考えられてきた松果体が、*7 α -hydroxypregnenolone* を介して覚醒にも寄与することを見出した [4]。

光受容体メラノプシン

鳥類の松果体は直接光を感じるのに対し、哺乳類の唯一の光受容感覚器は網膜である。網膜には桿体・錐体に加え、第三の光受容細胞がごく一部 (約 1%) の網膜神経節細胞 (retinal ganglion cell; RGC) に存在する [6]。この細胞は光受容タンパク質であるメラノプシン (melanopsin 別名 *Opn4*) を発現しているため、他の RGC と区別してメラノプシン発現網膜神経節細胞 (melanopsin-expressing

✉mhatori@salk.edu

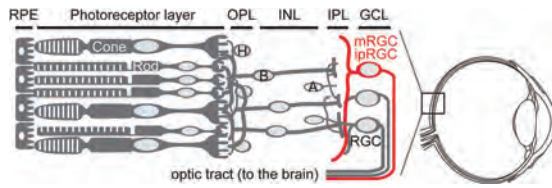


図1 哺乳類の3種の光受容細胞 —桿体・錐体・メラノプシン発現網膜神経節細胞—

目の網膜において、光情報は電気信号に変換され、脳へと伝達される。網膜の細胞は秩序だった層構造を形成し、視細胞層の桿体・錐体が受け取った光情報は、双極細胞や水平細胞などを経て網膜神経節細胞 (retinal ganglion cell; RGC) に伝わり、RGCから視神経を経て大脳視覚中枢に伝達され、視覚応答が起こる。130年以上に渡り、桿体・錐体が唯一の光受容細胞だと考えられてきたが、数%のRGCにメラノプシンという光受容タンパク質が発現していることが2000年に見出された。このRGCはメラノプシン発現RGC (melanopsin-expressing RGC; mRGC) と呼ばれ、第三の光受容細胞として機能する。mRGCは光受容能を保持するためipRGC (intrinsically photosensitive retinal ganglion cell) とも呼ばれる。RPE (retinal pigment epithelium); 網膜色素上皮、OPL (outer plexiform layer); 外網状層、INL (inner nuclear layer); 内網状層、IPL (inner plexiform layer); 内網状層、GCL (ganglion cell layer); 神経節細胞層、Cone; 錐体、Rod; 桿体、H (horizontal cell); 水平細胞、B (bipolar cell); 双極細胞、A (amacrine cell); アマクリン細胞、optic tract; 視索。

RGC; mRGC) と呼ばれる (図1)。mRGCは自身で光を感じると共に (故にmRGCsはintrinsically photosensitive retinal ganglion cells; ipRGCsとも呼ばれる) 桿体・錐体からの投射も受ける。mRGCは視覚以外の光応答を担っており、概日時計の位相調節、睡眠、瞳孔収縮、光回避反応や片頭痛の光による悪化などの非視覚応答に寄与する。メラノプシンは無脊椎動物の光受容体に類似した情報伝達系を持つと示唆されている。

桿体・錐体を失ったマウスでも概日時計の光同調は正常であるが、桿体・錐体の欠失に加えメラノプシンをノックアウトしたマウスは光同調が不可能である [7] ことから、メラノプシン遺伝子は光同調に必須であることがわかる。しかしながらメラノプシン遺伝子破壊マウスにおいては光同調が完全に消滅するわけではなく、光感度が減少するのみであり [8]、mRGCから生じる樹状突起の形態およびSCNへの投射も正常である [9]。したがって非視覚応答には桿体・錐体も関与していると考えられるが、これらの細胞から脳への情報伝達経路は不明であった。

視覚情報および非視覚情報の伝達におけるmRGCの役割を解明すべく、私共はmRGCを後天的に失う

マウスを作製した [10]。ジフテリア毒素をマウスに注入すると血液脳関門を通して、免疫反応を引き起こすことなくジフテリア毒素受容体を持つ細胞のみを消失させることが可能である。このことからmRGC特異的にジフテリア毒素受容体を発現させ、ジフテリア毒素の注入によってmRGCの消失を誘導することとした。具体的には、メラノプシン遺伝子座にCreを持つノックインマウスと、組織普遍的に発現する遺伝子であるROSA26遺伝子座に誘導性ジフテリア毒素受容体 (iDTR) を持つマウスを掛け合わせた。 $Opn4^{Cre/+}; R26^{iDTR/+}$ マウスは正常に発生し、iDTRはCre-loxPシステムによってstopカセットが除去された時のみに発現する。8週齢マウスにジフテリア毒素を注射することにより、1週間以内にメラノプシン抗体陽性細胞が消失し、成体マウスの網膜の特定の細胞を迅速に消去することに初めて成功した。網膜の形態および網膜電図 (ERG) は正常であった。さらに視覚認識能力への影響の有無を知るため視覚クリフ行動テストを行ったところ、ジフテリア毒素を注射された $Opn4^{Cre/+}; R26^{iDTR/+}$ マウスは野生型マウスと同程度の視覚機能を保持しており、mRGCの消失は視覚伝達には影響を与えないことが判明した。

次に非視覚情報へ与える影響を解析した。蛍光色素で標識したコレラ毒素サブユニットBを目に注入して脳への投射を観察したところ、ジフテリア毒素を注射された $Opn4^{Cre/+}; R26^{iDTR/+}$ マウスではSCNへの投射がほぼ全て消失していた。この結果と一致して、概日時計の位相は24時間の明暗周期に同調されなくなり、23.5時間の周期でフリーランした。さらに瞳孔反射や光による行動抑制などの非視覚応答も完全に失っていたことから、mRGCが桿体・錐体からの情報とメラノプシン情報伝達の両者を統合しており、非視覚情報はmRGCを経由して脳に伝達されることを明らかにした [10]。

mRGCはSCN以外にどのような脳領域に投射するのであろうか? $Opn4^{Cre/+}; R26^{iDTR/+}$ マウスのmRGCがほぼ完全に消失したことから、すべてのmRGCを標識できる $Opn4^{Cre}$ マウスを作製することに成功したといえる。そこでこの $Opn4^{Cre}$ マウスとアルカリフォスファターゼ (AP) レポーターマウスを掛け合わせた ($Opn4^{Cre/+}; Z/AP$ マウス)。メラノプシン抗体を用いた免疫染色とほぼ同数 (97%一致) の陽性細胞がRGC層に局限して観察され、 $Opn4^{Cre}$ マウスの特異性が確認できた。非視覚情報を担うSCNや膝状体間小葉 (Intergeniculate leaf; IGL)、視蓋前

域オリブ核 (olivary pretectal nucleus; OPN) に陽性シグナルが観察でき、これらの投射先は過去の知見 [11] と一致した。さらに、外側膝状体 (lateral geniculate nucleus; LGN) や上丘 (superior colliculus; SC) へも投射していることを発見した。LGNやSCは視覚情報を受容することから、mRGCが視覚応答へ寄与している可能性を考えた。実際に、視覚を失っていると思われていた桿体・錐体の変異マウス (*rd/rd cl*マウス) においてもLGNはメラノプシン情報伝達系によって活性化された。大脳皮質視覚野 (visual cortex) までもが光依存的に活性化され [12]、mRGCが光照度を認識して脳に伝達することを明らかにした。

時間制限給餌

SCNの時計は外界の光周期に同調する一方、全身に存在する末梢時計は食餌に強く影響される。私共は食餌の時間が末梢時計の振幅および高脂肪食の作用に与える影響を調べた。

よく知られていることであるが、高脂肪食を摂取し続けると肥満やメタボリックシンドロームになりやすい。それは何故か？夜行性であるマウスに通常食を与えた場合は主に夜に餌を摂取するが、高脂肪食を与えた場合には昼夜の差なく食べ続ける。それに伴い、肝臓などにおいて時計遺伝子や代謝遺伝子の発現の日内変動が減弱する。つまり、高脂肪食に自由にアクセスできる環境におかれたマウスは「食事の種類」と「概日時計の振幅」の両方が変化する。そこで「高脂肪食が引き起こす肥満やメタボリックシンドロームは食事の種類に起因するのか、それとも概日リズムの振幅が減弱することによるのか？」という疑問を持った。

C57BL/6J野生型マウス (2-3ヶ月齢、雄) を以下の4群にわけた。

- 通常食 (normal chow; 13 % fat) へ一日中アクセスできる (ad libitum) 個体群; NA
- 通常食へ夜の時間帯に8時間のみアクセスできる (time-restricted) 個体群; NT
- 高脂肪食 (high-fat diet; 61% fat) へ一日中アクセスできる個体群; FA
- 高脂肪食へ夜の時間帯に8時間のみアクセスできる個体群; FT

すべてのマウスは明期12時間-暗期12時間の環境下で飼育され、水へは一日中アクセスできる。この食事スケジュールを5ヶ月に渡って続け、食事を摂取する時間帯が与える影響を調べた。本稿では簡便化

して、主に高脂肪食群 (FA; 自由摂食およびFT; 時間制限摂食) に注目する。

NA群はこれまでの報告通り、主に夜に食事を摂取し、呼吸交換比にも顕著な概日リズムが見られた。FA群は摂食および呼吸交換比ともに日内変動を示さず、つまり一日中食べ続けていた。一方、夜間に8時間のみ餌にアクセスできる個体群 (NTおよびFT) において、呼吸交換比の概日リズムは自由摂食群 (NAおよびFA) と比べ顕著に改善されていた。それでは、食事の摂取量に差はあるのだろうか？時間制限摂食マウスは自由摂食マウスと同程度の食事量およびカロリーを摂取することをすぐに覚え、18週に渡り同程度のカロリーを日々摂取し続けた (FA 群 13.84 ± 1.12 kcal/day、FT 群 13.29 ± 0.85 kcal/day)。

肝臓の概日時計の機能は影響を受けるだろうか？まず、metabolic regulatorsとして知られているCREB、mTORおよびAMPKの発現を調べたところ、FA群と比べFT群ではそれらの日内リズムの振幅が回復していた。次に肝臓での*Per2*、*Bmal1*、*Rev-erba*などの時計遺伝子の日内発現リズムを調べた。過去に報告されている通り [13]、時計遺伝子の日内振動の振幅はNA群およびNT群と比べFA群において顕著に減弱していた。しかしながらFT群においてはそれらの遺伝子の振幅は通常食群と同程度にまで回復していた。つまり、同じ種類の食事を同じ量食べているにも関わらず、食事時間を変え

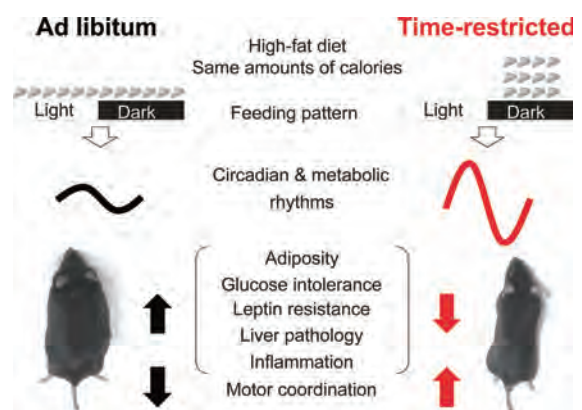


図2 高脂肪食を時間制限して摂取すると肥満を防ぐことができる
通常食に一日中アクセスできるマウスは主に夜に食事を摂取し、概日時計の振幅は大きく、健康である。一方、高脂肪食に一日中アクセスできる場合 (左 Ad libitum) には昼夜を問わず食べ続け、時計の振幅は小さくなり、肥満やそれに伴う疾患を呈する。今回の研究で、高脂肪食を活動時間帯に限りて与えた場合 (右 Time-restricted)、カロリー摂取量は高脂肪食の自由摂食群と同程度であるにも関わらず時計遺伝子の振幅は改善し、肥満にならないことを明らかにした [14]。

るだけで概日時計の発振機能が改善されることを見出した(図2) [14]。

18週に渡りマウスの体重を継続的に測定したところ、4群いずれのマウスも実験開始時の体重は約25gであったが、18週目にNT群は 30.5 ± 0.4 g、NA群は 32.6 ± 0.4 gに増加していた。高脂肪食を一日中食べるマウス群(FA群)は 47.4 ± 0.7 gにまで達していた。しかしながら時間を制限して高脂肪食を摂取する(FT群)と 34.2 ± 0.6 gにしかならなかった。

グルコース耐性テストを行ったところ、FA群で見られた高血糖およびグルコース不耐性は、FT群で大幅に改善されていた。同様に、血中のインシュリンおよびコレステロール量もFA群のみ顕著に高く、FT群は通常食群と同程度の値を示した。

肝臓の重量を比較したところ、FA群で観察された肝肥大はFT群では見られなかった。電子顕微鏡によって肝臓の組織切片像を詳細に解析したところ、FT群では脂肪沈着が観察されず、そのみならず小胞体やミトコンドリアの占める割合が増加しており、時間制限摂食が細胞質小器官の構成を変化させることが示唆された。さらに、褐色脂肪細胞や白色脂肪細胞においてFAマウスで観察された脂肪細胞肥大やマクロファージの存在が、FTマウスでは減少していた。

上述の通り、FAマウスにみられる体重増加はFTマウスでは観察されなかった。この体重減少は、脂肪の減少によるのであろうか、それとも筋肉量なども失われているのであろうか?核磁気共鳴画像法によって身体組成を計測したところ、FT群はFA群と比べ脂肪量のみが著しく減少していた。両群のマウスを回転する輪の上のせ、落ちることなく滞在することができる時間を測定したところ、FA群と比べFT群は顕著に長い時間、輪に滞在することができ、さらにNA群やNT群と比べても優れた運動能力を示した。上述した変化のみならず、FT群においてはグルコース代謝、脂質代謝、胆汁酸産生、炎症などにも著しい改善が見られた。

以上まとめると、野生型マウスを使用して高脂肪食に夜の時間帯の8時間のみアクセスできるようにした結果、高脂肪食を一日中自由に摂取できる個体と同程度の食事量およびカロリーを摂取しているにも関わらず、時計遺伝子発現の振幅が改善された。さらに肥満、高インシュリン血症、肝脂肪変性、炎症などが通常食を与えたマウスと同程度にまで緩和しただけでなく、運動能力が向上していた。つまり食事時間を制限することによって、食事量を減らす

ことなく、肥満や関連する病態を防ぐことができることを、マウスを用いた研究より見出した(図2) [14]。

今回の研究により「何を食べるか」だけではなく、「いつ食べるか」も重要であることを明らかにし、薬を用いることなく肥満や関連する疾患を防ぐ方法の糸口を見つけることができた。ただし本知見は齧歯類によって得られたものであり、ヒトでも同様の結果が得られるかの研究が今後の課題であろう。

謝辞

第10回日本時間生物学会学術奨励賞・基礎科学部門を受賞できました事を大変光栄に存じます。この場をお借りして東京大学の深田吉孝教授ならびにソーク研究所のDr. Satchidananda Panda、両研究室メンバーおよび共同研究者に深く感謝申し上げます。

文献

- 1) Doi M, Nakajima Y, Okano T, Fukada Y. Light-induced phase-delay of the chicken pineal circadian clock is associated with the induction of cE4bp4, a potential transcriptional repressor of cPer2 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98(14):8089-8094(2001)
- 2) Doi M, Nakajima Y, Okano T, Fukada Y. Light-dependent changes in the chick pineal temperature and the expression of cHsp90 alpha gene: a potential contribution of in vivo temperature change to the photic-entrainment of the chick pineal circadian clock. *Zoolog Sci*. 19(6):633-641(2002)
- 3) Hatori M, Okano T, Nakajima Y, Doi M, Fukada Y. Lcg is a light-inducible and clock-controlled gene expressed in the chicken pineal gland. *J Neurochem*. 96(6):1790-1800(2006)
- 4) Hatori M, Hirota T, Iitsuka M, Kurabayashi N, Haraguchi S, Kokame K, Sato R, Nakai A, Miyata T, Tsutsui K, Fukada Y. Light-dependent and circadian clock-regulated activation of sterol regulatory element-binding protein, X-box-binding protein 1, and heat shock factor pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108(12):4864-4869(2011)

- 5) Doi M, Okano T, Yujnovsky I, Sassone-Corsi P, Fukada Y. Negative control of circadian clock regulator E4BP4 by casein kinase Iepsilon-mediated phosphorylation. *Curr Biol.* 14 (11):975-980 (2004)
- 6) Hatori M, Panda S. The emerging roles of melanopsin in behavioral adaptation to light. *Trends Mol. Med.* 16(10):435-446 (2010)
- 7) Panda S, Provencio I, Tu DC, Pires SS, Rollag MD, Castrucci AM, Pletcher MT, Sato TK, Wiltshire T, Andahazy M, Kay SA, Van Gelder RN, Hogenesch JB. Melanopsin is required for non-image-forming photic responses in blind mice. *Science* 301(5632):525-527 (2003)
- 8) Panda S, Sato TK, Castrucci AM, Rollag MD, DeGrip WJ, Hogenesch JB, Provencio I, Kay SA. Melanopsin (Opn4) requirement for normal light-induced circadian phase shifting. *Science* 298(5601):2213-2216 (2002)
- 9) Lucas RJ, Hattar S, Takao M, Berson DM, Foster RG, Yau KW. Diminished pupillary light reflex at high irradiances in melanopsin-knockout mice. *Science* 299(5604):245-247 (2003)
- 10) Hatori M, Le H, Vollmers C, Keding SR, Tanaka N, Buch T, Waisman A, Schmedt C, Jegla T, Panda S. Inducible ablation of melanopsin-expressing retinal ganglion cells reveals their central role in non-image forming visual responses. *PLoS One.* 3(6):e2451 (2008)
- 11) Hattar S, Kumar M, Park A, Tong P, Tung J, Yau KW, Berson DM. Central projections of melanopsin-expressing retinal ganglion cells in the mouse. *J Comp Neurol.* 497(3):326-349 (2006)
- 12) Brown TM, Gias C, Hatori M, Keding SR, Semo M, Coffey PJ, Gigg J, Piggins HD, Panda S, Lucas RJ. Melanopsin contributions to irradiance coding in the thalamo-cortical visual system. *PLoS Biol.* 8(12):e1000558(2010)
- 13) Kohsaka A, Laposky AD, Ramsey KM, Estrada C, Joshu C, Kobayashi Y, Turek FW, Bass J. High-fat diet disrupts behavioral and molecular circadian rhythms in mice. *Cell Metab.* 6(5):414-421(2007)
- 14) Hatori M, Vollmers C, Zarrinpar A, DiTacchio L, Bushong EA, Gill S, Leblanc M, Chaix A, Joens M, Fitzpatrick JA, Ellisman MH, Panda S. Time-restricted feeding without reducing caloric intake prevents metabolic diseases in mice fed a high-fat diet. *Cell Metab.* 15 (6):848-860 (2012)