

時計遺伝子研究から認知症の解決を目指して

— 国立研究所30年の総括 —

石田 直理雄

著者が設立した研究グループが哺乳類時計遺伝子*Period2* (*per2*) を発見したのは1998年である。本稿では、その後の生物時計分子機構の進展についてまとめる。マウスやヒトの生物時計による睡眠覚醒を始めとするさまざまな24時間振動現象に*Clock/Bmal*、*Period/Cry*によるE-box制御だけでなく、bZIP型転写因子E4BP4による*per2*振動発現やグリコーゲン合成酵素キナーゼによる*per2*リン酸化の時間特異的核移行が重要であることを明らかにした。また滋賀県のツジコ株式会社で育てたアイスプラントの機能分析をお手伝いした過程で、イノシトールが体内時計の周期を延長することを見出した。研究開始当初は24時間のリズム生成機構のみを研究しているつもりだったが、日長を測れる生物が持つ季節時計も時計遺伝子からその新たな分子経路が解明された(休眠)。我々は基礎シフトといわれた時代に国研に入所したが、それから24~5年ほど経ったところに基礎研究予算が大幅にカットされた。「すぐ役に立つ研究をやれ」という世の中の大きなうねりが来た。悩んだあげくお金のかかるマウス研究をあきらめショウジョウバエに絞った。その結果、神経変性疾患と体内時計分子機構が関わることを見出し、中でもパーキンソン病、ゴーシェ病モデルショウジョウバエで若年期から睡眠覚醒リズム異常を示すことを見出した。現在はこれらのモデルを用いて認知症の分子機構を遺伝子レベルで研究しており、その成果と応用についても報告する。1986年の工業技術院微生物工業技術研究所入所以来、30年間生物時計一筋で研究者生活を送れたことに感謝しつつこの論説をまとめている。

キーワード: 体内時計、時計遺伝子、転写因子、睡眠、神経変性疾患、ゴーシェ病、パーキンソン病

Toward overcoming neurodegenerative disease by the circadian molecular clock study

—My 30 year history in a national institute—

Norio ISHIDA

The mammalian clock gene, *Period2*, was discovered by my research group studying clock genes in 1998. I summarize the progress of understanding the circadian clock molecular mechanism after this discovery. Our group has demonstrated the importance of glycogen synthase kinase 3 – dependent phosphorylation of *Period2* and its nuclear transfer and E4BP4 (vrille) negative transcriptional regulation, as well as *Clock/Bmal*, *Period/Cry* E-box dependent negative feedback loop. A role of myo-inositol for elongation of the circadian clock was uncovered through collaboration on iceplant projects with Tsujiko Co., Ltd, Shiga prefecture. When we started the molecular study of the circadian clock, we only considered the daily rhythm. Fortunately, our research on the peripheral clock mechanism (PPAR α) revealed a new mechanism of seasonal clocks, which can count photoperiods to adapt to winter (torpor). Our generation of researchers entered Japanese national institutes during a period called “the basic research shift era.” But, basic research grants were cut significantly during the 24 to 25 year period after we joined the institutes, and our research mission was abruptly changed to applied science. After several years of frustration and contemplation, we gave up studies using mice and concentrated on using *Drosophila* to reduce costs and save time. Consequently, we found a causative role of sleep abnormality around a young age in two neurodegenerative (Gaucher’s and Parkinson’s) diseases by using fly models. I summarize an application for the molecular mechanism of neurodegenerative disease. I am greatly thankful that I was able to spend more than 30 years on the study of molecular circadian clocks with the people who have been involved, from when I started as a researcher in 1986 at the Fermentation Research Institute of the Agency of Industrial Science and Technology to the present day at AIST.

Keywords: Circadian clock, clock gene, transcriptional factor, sleep, Neurodegenerative disease, Gaucher’s disease, Parkinson’s disease

1 体内時計遺伝子研究の幕開け

1986年、著者が工業技術院微生物工業技術研究所に入所したのは当時の動物細胞研究室・三井洋司室長の強い勧めによるものであった。彼の研究室では血管内皮細胞増殖因子の実体を知りたくて、哺乳類遺伝子クローニング技術を持つ人間を探していた。このとき、他に国立大学か

らも2件ほど求人があったが、一番自由にやらせてくれそうなのでここを選んだ。赴任早々、朝早くから夜は12時過ぎまでさまざまなクローンを単離してはシークエンスするという肉体労働に明け暮れたが、目的の遺伝子は拾えなかった。見かねた室長が筑波大・村上和雄先生の部屋から学生(現川崎医大・西松伸一郎氏)を一人リクルートして

国際科学振興財団 時間生物学研究所 〒305-0821 つくば市春日3-24-16

Institute for Chronobiology, Foundation for Advancement of International Science (FAIS) 3-24-16 Kasuga, Tsukuba 305-0821, Japan
n.ishida@aist.go.jp

Original manuscript received February 10, 2017, Revisions received March 22, 2017, Accepted March 23, 2017

くれた。しかし、その後3か月もたたないうちに日米2か所からFGFクローニング成功の知らせが入り、このプロジェクトは中止となった。まさに敗北感に打ちひしがれている時に、米国からショウジョウバエ時計遺伝子 *Period* に似た特異なRNA配列がトリ、マウス、ヒトに保たれているらしいとの報告がNature誌に載った^[1]。これを見て著者は大いに興奮した。なぜなら行動に関わる遺伝子の研究こそが、著者がこの世界に飛び込んでやりたかったことであり、これは高校で心理学・行動学に興味を持って以来の夢だったからだ。当時時計遺伝子はショウジョウバエで *Period* 遺伝子が初めて1984年にクローニングに成功しただけで、なぜこのような遺伝子が行動にまで影響を与えるのかは全くの謎であった。そこで即座にターゲットを時計遺伝子に変更し、日々さまざまなクローンを単離してはシークエンスするという肉体労働に明け暮れた。しかし、ここでも釣れてくる配列は *Period* に似た特異なRNA繰り返し配列 (ACNGGC) ばかりであり、狙った1100以上のアミノ酸からなる *Period* 相同遺伝子は得られなかった。今思えばこれらは現在分子生物学の一大潮流となっている non-coding RNA であると思われる。この時期に生物時計グループに加わり盛り上げてくれたのは松井三和氏 (In situ hybridization)、鞍馬正江氏 (エンドセリンの日周発現)、斎田要氏 (エンドセリンファミリーのクローニング)、筑波大応用生物系宗像英輔先生のラボからポストクの加香孝一郎氏 (EMSA法の確立、現筑波大TARAセンター講師)、三菱化学から渡部素生氏、技術補助員をやりながら大学卒業した鈴木悟氏らが挙げられる。

2 生物時計研究の背景

我々が生物時計研究を始めた頃はほとんどが生理学・解剖学分野の仕事であり、物質レベルの仕事が大変遅れていた。ヒトを含む我々哺乳類の24時間リズムを支配するマスター時計は、脳内視床下部の視交叉上核 (suprachiasmatic nucleus, SCN) と呼ばれる部分に存在する。左右の視神経が脳内で交叉する部分の真上に存在するためこの名が与えられた。この約10⁴個からなる神経細胞組織には視神経からの入力があり(光が時計の位相を変えられるのはこのため)、さらに出力系としては松果体(メラトニンの主要な産生組織)や満腹中枢、摂食中枢、体温中枢、自律神経系等がある。このSCNでの1個1個の神経細胞の発火頻度が昼高く夜低いリズムを持ち、SCNでのホルモン分泌等に24時間リズムが存在することは徐々に解明されてきたが、どのような分子(遺伝子産物)がこのような24時間リズム生成に必要なのかは全くの謎であった。

上述したようにショウジョウバエ分子生物学の進展によ

表1 ショウジョウバエとヒトの時計遺伝子
時計遺伝子は驚くべきことに、クロック遺伝子を除きほとんどがショウジョウバエから最初に見出された。

ショウジョウバエ遺伝子	ヒト遺伝子
ペリオド	ペリオド1 ペリオド2 ペリオド3
タイムレス	該当なし
タイムアウト/タイムレス2	タイムレス
クリプトクローム	クリプトクローム1 クリプトクローム2
クロック(ジャーク)	クロック エヌバス2/MOP4
サイクル	ビーマル1/MOP3 ビーマル2/MOP9/CLIF
ダブルタイム	拮抗インリ酸化酵素1 epsilon 拮抗インリ酸化酵素1 delta グリコーゲン合成酵素/酸化酵素3 beta
シャギイ 蛋白脱リン酸化酵素2A	該当なし
スリム	FWD1/β-TrCP
ブリル	E4BP4
パールドメイン蛋白1	CBP
ウルトラスピラクル	Coup-TF
クロックワークオレンジ	Dec1, Dec2
トウィンオブアイレス	PAX6
該当なし	蛋白リ酸化酵素 G type2
アタキシシ2	アタキシシ2
該当なし	FBXL3, 21
ジェットラグ	FBXL15
キスメット	CHP7 (カチン/リカセ) DNA 結合タンパク質7)
アンフルフィロド	NR2E3
該当なし	RORα
E75	Rev-erbα, Rev-erbβ

り、この謎が解明され始めた。ショウジョウバエではリズム異常を示す変異バエの遺伝子を解析するという方法で、現在では *Period* 遺伝子を始めとする表1で示した多数の遺伝子産物が24時間リズム生成に関わっていることが明らかになっている。

時計遺伝子の定義とは、この遺伝子に変異がある場合、行動のリズムに影響を与える(表現型としては無周期、長周期、短周期のいずれかまたはすべてを示す)遺伝子と言う。個々の遺伝子の表現型についてはそれぞれ原著にあたっていただきたい。これら時計遺伝子の特徴の1つに、その遺伝子産物(mRNAまたはタンパク質)が24時間でリズム的に我々の体内で発現することがある。我々が世界に先駆け単離したラット *per2* 遺伝子の例を述べる^[2]。驚いたことには、体内時計遺伝子のラット *per2* 遺伝子は、脳内時計中枢(SCN)ばかりか我々の体内の胃、肝臓、腎臓等の組織細胞や血球、髪の毛や爪の細胞にさえ存在することも明らかとなった(これら脳以外に存在する体内時計を末梢時計と呼ぶ)^[3]。これら末梢時計が、脳内SCNによりそのリズム同調性をコントロールされていることは、SCN破壊による末梢時計遺伝子発現リズムの消失や、器官培養するとSCN細胞は長期間24時間リズムを失わない

自動性を有するが、肝臓・腎臓・心臓等の末梢臓器はほぼ数日でそのリズムを消失することからも明らかである。我々の体内では脳組織や末梢細胞ばかりでなく時計遺伝子の発現も24時間で自転しているのである。

3 生物時計遺伝子 *Period2* は周期決定因子である。

哺乳類の生物時計分子機構は、*Period* を始めとする時計遺伝子産物の転写 / 翻訳のフィードバックループにより構成されたと考えられている (図 1b)。この分子機構の大筋はショウジョウバエをモデルとして発展してきた (図 1a)。ショウジョウバエの時計変異株 *Period* は、1971年に R. Konopka と S. Benzer により単離された^[4]。残念ながら、2007年11月に Benzer 博士は他界された。体内時計分野でノーベル賞が出るときには最有力候補であった。物理学から転身し、Francis Crick、Sydney Brennerとともに第1期分子生物学の流れを作った人であり、この分野の真の創始者と言える。なぜなら、行動に関する形質は多因子で決まると考えられていた時代に一遺伝子一行動説を提唱した先見性は今でも輝いており、物理学から転身した第1期分子生物学者らしい大胆な仮説は見事に哺乳類まで花開いた。初期の Benzer 博士は T4 フェージ系を用いて遺伝子の直線性やポイント変異の質的差異 (シストロン) を見出した。その後、1984年に *Period* 遺伝子がクローニングされ、別の位置の1つのアミノ酸変異が、それぞれ短周期、長周期、無周期 (ストップコドン) の形質を生み出していることが明らかとなった^[5]。

その後、長い暗黒時代があり、哺乳類の時計遺伝子の存在が知られるのはゲノムプロジェクトが完了する1990年後半のこととなる。この時期幸運にも NEDO グラントが当たり著者のグループも多くのポストドクが活躍した (黒岩朋子

氏、Marek Banasik 氏、浜田俊幸氏 (現北大准教授)、定金豊氏 (現鈴鹿医療大教授)、曲志強氏 (現青島大教授)、早坂直人氏、山崎紀彦氏)。我々もかずさ DNA 研究所と共同で、ラット *Period2* (*rper2*) 遺伝子の同定とその末梢臓器での24時間振動発現を見出した^[2]。この論文の最大の貢献者は長瀬隆弘氏 (かずさ DNA 研究所) と当時ポストドクの坂本克彦氏 (現神戸大農学部昆虫機能学教授) であるが、米国との競争のため Science 誌にもう少しのところで蹴られ、泣く泣く JBC 誌に送ったところ Rapid Communication に1週間で採択されたのには驚いた。我々はかずさ DNA 研究所と組んだお蔭でヒトとラットの *Period* 遺伝子クローニングで先行することができたが、マウスでは東大榎佳之先生のグループとテキサス大 CC Lee 博士のグループの後塵を拝した^[6]。ショウジョウバエ *Period* 遺伝子のホモログがヒトを含む哺乳類では3つ存在し (*per1*、*per2*、*per3*)、後に最も行動の時計機能に深く関わるのが *per2* であることがわかるが、これは全くの偶然であり我々が *per2* 中心に解析を進めたのは幸運である。それぞれの遺伝子欠損マウスが作られ、単独では *per1* が短周期、*per3* はほとんど表現型がなかった (後に *per3* は睡眠リズム異常 [DSPS]^[6] や肺や副腎等の末梢時計に関わることがわかる)。ところが、*per2* 破壊マウスや *per2* 過剰発現マウスは行動が恒暗条件下または恒明条件下で無周期というドラスティックな形質を示した。さらに、*per1* 破壊マウスでは見られないが、*per2* 破壊マウスでは SCN での *Bmal1* 等、他の時計遺伝子の振動発現も失われていた。この事実から *per2* は、他の時計遺伝子の振動発現をも制御する重要な因子と考えられた。また最初に我々がクローニングした *rper2* 配列の中に双極型核移行配列^[7]を見出した^[7]。そこで我々の研究室でポストドクから職員に採用した

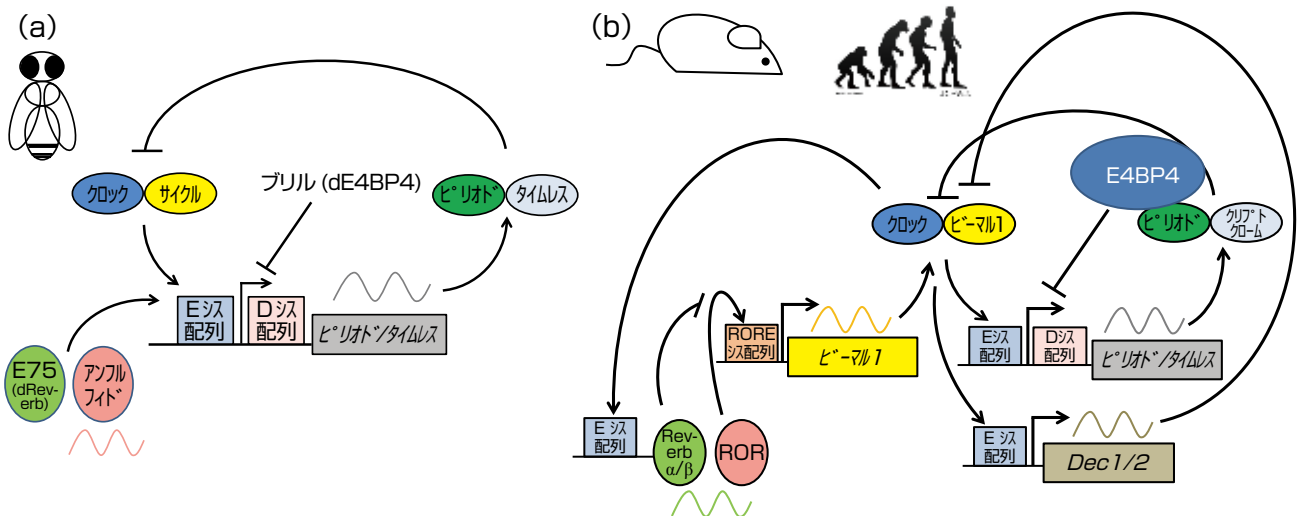


図1 ショウジョウバエ (a) と哺乳類 (b) の生物時計分子モデル
 兩種で大変配列の似た蛋白質の発現量フィードバックで説明できる。

宮崎歴氏は、この核移行配列を欠失させた *rper2* 遺伝子を用意した。*rper2* を COS1 細胞^{用語2} で過剰発現させると内在性^{用語3} の *per2* ばかりか *Cry1*^{用語4} をも細胞質にトラップし *Cry1* の核移行も阻害することが明らかとなった¹⁷。そこでこの核移行配列結失型 *rper2* を過剰発現させたトランスジェニックマウス (TG) と正常 *rper2* を過剰発現した TG 作製を試みた¹⁸。その結果、日周行動のリズムにおいて、核移行配列欠失型 *rper2* マウスは長周期を、正常型 *rper2* 発現マウスは短周期を示した。この仕事は我が研究室で *in vitro* (試験管内) で観察した現象が *in vivo* (生体) でも再現できた最初の例となった。

SCN への *per2* の核移行の免疫染色の結果、長周期型で核移行が遅れていたことから、図 1b の *Period* や *Cry* の抑制系タンパク質の核移行の遅れが周期を延長していると考えている。さらに、*rper2* 過剰発現マウスでは活動期の覚醒度、体温が高いことなど SCN の以外の脳部位での作用も考えられ、今後の解析が望まれる。その後東工大大学院生として我々のグループに加わった飯高 (現木下) 千里氏 (現帝京大薬理) が、*per2* の核移行を促進する因子として、glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) を見出した¹⁹。GSK-3 β が *per2* に直接結合し、リン酸化を引き起こし、核移行を促進する。この経路は、うつ病に効く LiCl の作用機序をよく説明する。すなわち、LiCl が GSK-3 β の自己リン酸化を起こすと不活化し *per2* の核移行を遅らせ、これが行動の周期を長くするわけである。この経路は現在、抗精神薬の開発を目指す人たちの間で新しい創薬のターゲットとして注目されている。最近筑波大学院生坂田一樹氏らが高濃度のイノシトールがショウジョウバエの求愛行動リズムや歩行活動リズムの周期を延ばすことを見出した¹⁰。ミオイノシトールは元来滋賀県のツジコー株式会社が植物工場で育てたアイスプラント由来の成分として求愛行動リズムに影響を与える物質のスクリーニング中に見出したものである。ミオイノシトールはうつ病薬として今後期待の高い物質である。

ショウジョウバエの系でも GSK-3 β の謎を解く大きな発見がなされた。栄養刺激のシグナル経路で有名な ATP mediated protein kinase B (AKT 別名 PKB) が target of rapamycin (TOR) を動かし時計遺伝子産物 *Timeless* の核移行を阻害するという報告である¹¹。AKT 過剰発現バエでは脳内の中枢時計の TOR-S6 kinase を活性化しこの時 Glycogen Synthase Kinase-3 β (SGG) がリン酸化を受け、最終的に時計遺伝子産物 *Timeless* の核移行を阻害したことを示した。つまり食事から来る栄養刺激は末梢時計を動かし、このフィードバックで中枢時計の針を遅らせたのである。これは哺乳類とも共通の構図である。

4 リズム異常症と時計遺伝子変異

ヒトの睡眠覚醒リズム障害として睡眠相前進症候群 (ASPS)、睡眠相後退症候群 (DSPS)、非 24 時間睡眠覚醒症候群がよく知られている。これらの疾患は家族性に見られるがその原因遺伝子が全く知られていなかった。ところが 2001 年に米国ユタ州の家族性 ASPS の 1 家系でリンゲージ解析を行ったところ染色体 2 番にその原因遺伝子がマップされ、最終的に *hper2* 遺伝子の 662 番目のセリンがグリシンに変化していることが報告された¹² (図 2)。この領域はカゼインキナーゼ I ϵ (CKI ϵ) の結合領域であり、特にこの N 端側最初のセリンがリン酸化を開始させるのに重要なアミノ酸であるとされている。主に *per2* の機能は位相後退にあると考えられており、このリン酸化部位の変異が *per2* タンパクの機能喪失を引き起こし位相が前進したのではないかと推定している。この発見と同時期に海老沢らのグループは、*hper3* においてカゼインキナーゼ I ϵ リン酸化部位のごく近傍のアミノ酸の *hper3* でバリンがグリシンに変異している例を DSPS 家系で見出した¹³。どちらの家系も時計遺伝子産物の 1 個のアミノ酸配列の変化が同調機能に影響している。最近ではヒトやマウスの夜型昼型傾向の背景に時計遺伝子配列のポリモルフィズムが関与することも明らかになってきた。また、我々は *Clock* 遺伝子の変異株から夜型傾向を示すモデルマウス作製に成功した。今後オーダーメイド医療の時代が来ると個人の睡眠傾向の遺伝的背景を考慮することの重要性はますます増加するであろう。

5 *Period2* 振動発現に影響する因子

前述したように、*per2* の 24 時間振動発現は生体リズムの維持に重要であり、その主要な調節点は転写である。これまで *per2* mRNA 振動発現に関わるシス配列^{用語5} として CACGTT という非正規の E2-box^{用語6} が知られていた。著者が客員教授をしていた東工大生命理工大学院の

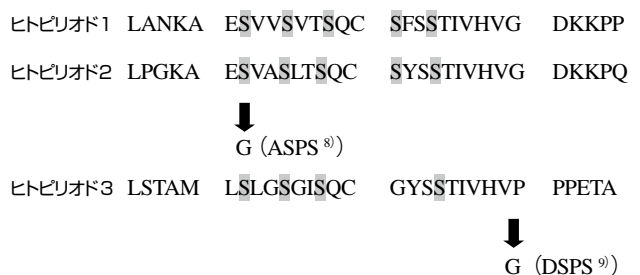


図 2 ヒトリズム異常症の時計遺伝子産物変異部位
セリン (S) がカゼインキナーゼ I のリン酸化ターゲットとなるアミノ酸で、リズムの位相調節に重要である。矢印は ASPS (睡眠相前進症候群) や DSPS (睡眠相後退症候群) で変異したアミノ酸。

院生として我々のグループに加わった大野智哉氏がこの *per2* 振動発現に bZIP 型転写因子^{用語7} E4BP4 (ショウジョウバエ *vriille* homolog) が抑制的に関与することを生化学的に同定した (図 1b)^[14]。詳細な解析の結果 *mper2* プロモーター^{用語8} 付近には A-site^{用語9} と B-site^{用語10} の 2 か所の E4BP4 結合サイトが存在することが見出された。この 2 か所の配列に変異を入れたところ、B-site 特異的に *per2* 発現抑制が解除された。さらに、時間特異的ゲルリターデーション法、ChIP 法のいずれでも B-site の時間特異的結合が確認された。最後に A-site、B-site と E2-box のそれぞれに変異を入れた *per2* プロモーターの振動発現活性をリアルタイムモニター系でルシフェラーゼの活性として測定してみた。大変興味深いことに E2 単独の変異では 24 時間振動はなくなるが、E2-box と B-site の両方に変異を入れると 24 時間振動が消失することが細胞のレベルで証明できた。このことは従来 *in vitro* で A-site の重要性のみが指摘されてきたが^[14]、振動発現のような複雑な系では細胞の系または個体の系に戻して解析することの重要性を物語っている。また、E2-box 単独の変異では振動発現が維持されていることから、これまでの *Clock/Bmal* と *per/Cry* だけのネガティブ・フィードバックモデルだけでは *per2* の振動が説明できないことが明らかとなった。さらに我々は、E4BP4 が *per2* や *Cry2* とともに細胞内で結合することを見出した^[15]。これらの事実から新しい生物時計の負の転写調節因子複合体のモデルを提唱した (図 1b)。これらの複合体が時間特異的に核内移行を起こし、*per2*、*Cry2* は *Clock/Bmal* 複合体をターゲットにして、E4BP4 は B-site (D-box) をターゲットに転写を負に制御することが予想される。その後ホスファチジルコリンのトランスポーター *Mdr2*^[16] や、薬物代謝に関わるシトクロム P450 3A4 (CYP3A4) や胆汁酸合成に関わる cholesterol 7 α -hydroxylase (Cyp7 α) の 24 時間振動発現にも E4BP4 が重要という報告が相次いでおり、転写因子 E4BP4 が 24 時間リズム転写形成に負に働くという構図は末梢時計、特に肝臓機能において重要と考えられる。

6 クロマチンによる生物時計制御

この大きな課題に果敢に取り組んだのは産総研の他グループから移籍してきたクロマチンの生化学を専門とする大西芳秋氏 (現産総研関西センター) であった。時計遺伝子産物 *Clock* 蛋白とともにヘテロダイマーを形成する *Bmall* は細胞レベルの 24 時間振動を引き起こす大変重要な蛋白でありネガティブフィードバックループの一員である。しかしこの遺伝子がなぜ 24 時間振動して転写されるのかは全くの謎であった。まず *Bmall* 遺伝子の上流を含むさまざまな

なコンストラクトを用いて時計転写因子 REV-ERB α と ROR α が結合して転写制御することを見出した。大西氏はさらにそのシス配列 RORE の下流に核内マトリックス蛋白 SAF-A (別名 hnRNPU) がリズム的に結合してその転写を制御することを見出した^[17]。つまりクロマチンの状態が大きく開いたり閉じたりするわけである。その後 SAF-A は c-Myc-Max 複合体の制御にも関わることが明らかとなり、今後癌細胞の制御に大変重要となるであろう。

7 ショウジョウバエと哺乳類で明らかにされた末梢時計 (腹時計) と中枢時計の異なる機能

これまで末梢時計 (腹時計) と中枢時計の関係はほとんどが哺乳類を中心になされてきたが、米国の Sehgal A のグループによってショウジョウバエを用いて大変興味深い研究が出された^[18]。ショウジョウバエではヒトの肝臓と脂肪組織の両方の機能を併せ持つ組織が Fat body (脂肪体) と呼ばれる (図 3)。彼らは遺伝子工学的手法を用いてドミナントネガティブ型の *Clock* 遺伝子を導入し脂肪体での生物時計機能を喪失させたところ、グリコーゲン貯蔵量が著しく低下し絶食に大変弱い (餓死する) ハエができた。そのため、このハエは夜間にもよく餌をとるようになっていた。不思議なことに全身で *Clock* 遺伝子に変異を持つ CLK^{JRK} のハエではこのような異常が見られなかった。そこで彼らは中枢時計と末梢時計に対する時計遺伝子の効果が異なるのではないかと仮説を立て、中枢時計特異的に *Clock* 遺伝子機能を喪失したハエを作製した。その結果、脂肪体でのグリコーゲン貯蔵量が増加し期待どおり絶食に対しても正常バエより強くなった。この実験より末梢時計 (腹時計) と中枢時計の機能は哺乳類同様異なることが明らかとなった。残念ながらこの論文では時計遺伝子とグリコー

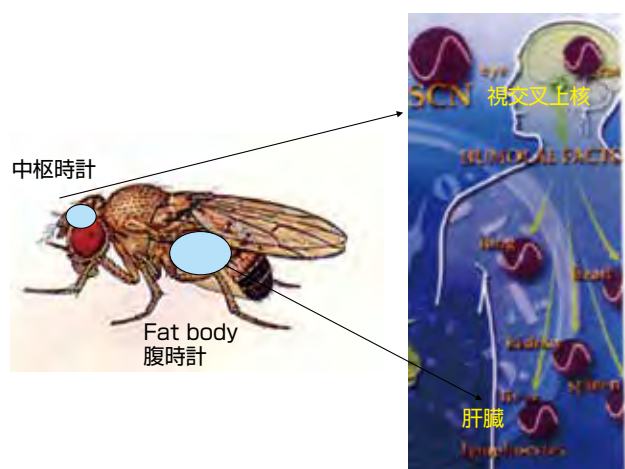


図 3 ショウジョウバエの肝臓に当たる臓器、脂肪体 (Fat body) ショウジョウバエの中枢時計は Lateral neurons に局在する。

ゲン貯蔵量の直接の関係は示されなかったが、当時著者が連携大学院教授をしていた筑波大学院生の土井亮介氏 (現アステラスつくば研) らがこの問題に哺乳類を用いて証明したので紹介する^[19]。

哺乳類のグリコーゲン貯蔵や血中グルコース濃度の維持にとって最も重要な臓器は肝臓である。グリコーゲン合成の律速酵素であるグリコーゲン合成酵素にサーカディアンリズムが存在することは1970年代に知られていた。その後の分子生物学的解析により Glycogen synthase 2 (Gys2) が肝臓で主に発現し、そのファミリーである Glycogen synthase 1 は筋肉、神経、脂肪で発現していることが明らかにされている。土井氏らは Gys2 の肝臓でのリズム発現調節機構に着目した。最初にリアルタイム PCR 法を用いて正常と時計遺伝子 *Clock* 変異マウス (Cl/Cl) でグルコース代謝に関わる遺伝子のリズム発現を検討した。その結果、Phosphoenolpyruvate carboxykinase (Pepck)、Glucose-6-phosphate、Glucose transporter 2 等のリズム発現に *Clock* 変異マウスで異常が見られた。中でも最も注目すべきは Gys2 mRNA の発現リズムがほとんど消失した点である。一方、グリコーゲン分解の律速酵素である Glycogen phosphorylase には正常と *Clock* 変異マウスで顕著な差が見られなかった。このことから肝臓でのグリコーゲン貯蔵量リズムはグリコーゲン合成に律速があることが考えられた。さらに Gys2 mRNA リズムと *Clock* 変異マウスでの Gys2 無周期性は蛋白レベルでも確認されたばかりか、絶食下でもこのリズムは継続した。つまりこれらのリズムは食事により変動するインスリンやグルカゴンに依存しないことが明らかとなった。これらの事実から Gys2 のリズムは内因的な mRNA の発現調節であることが推察されたので、時計遺伝子産物に直接支配されるのではとの仮説を立て、リズム発現に関わるシス因子の探索をゲノム上で行った。5'上流約 3 kb の中に典型的リズムシス配列は見出なかったので、試行錯誤の末 Gys2 遺伝子の第 1 イントロンの中に 2 個のタンデムな E-box 配列を見出した。この E-box 配列のそれぞれに変異を導入した結果 *in vitro* リポーターアッセイでも肝抽出液によるクロマチン免疫沈降法でも両方の配列が同程度に貢献していることが明らかとなった。つまりこれらの配列は *in vivo* でも機能していると考えられた。そこでこの点をリアルタイムリポーターアッセイ法でリズム振動性に及ぼす影響を検討した。*mper2-dLuc* をポジティブコントロールとして、E1、E2 それぞれと両方に変異を入れたものを比較した。その結果、両方に変異を入れたものの振動性が最も減弱した。これらの実験から、グリコーゲン合成律速酵素 Gys2 は *Clock* や *Bmal* により認識される E-box 配列を介してリズムに転写レベルで調節されるこ

とを示す。つまり Gys2 遺伝子は末梢時計に支配されるアウトプットの1つでありグリコーゲン代謝も時計の直接支配のもとにあることを世界に先駆け示した。後に米国から帰国して我々のグループに加わった川崎陽久氏 (国際科学振興財団時間生物学研究所) がこの仕事を発展させ胎児の肝臓でグリコーゲン貯蔵に関わる重要な転写因子 C/EBP α もその遺伝子上流の E-box 配列を介した生物時計のコアフィードバックで制御されることを見出した^[20]。

8 体内時計を構成する3つのシス配列

最近時計の入力系として光以外のものが次々に明らかになってきている。それはあらゆる組織に時計分子が存在する末梢時計という概念が定着してきたためである。最新の末梢時計のモデルを図4に示した^[21]。従来から体内時計を同調させる因子として重要と思われてきた、食事の中に含まれるコレステロールや血液から供給される HEME (ヘモグロビン) は最近特に注目されている。なぜならコレステロールは転写因子 ROR を通して、HEME は転写因子 REV-ERB を介して^[11]RORE 依存的に、時計蛋白質 *Clock* や *Bmal* を前者は正に後者は負に制御するからである (図1、図4)。ROR α のリガンド結合部位を昆虫細胞で発現させるとコレステロールが共沈してくる。さらに X 線結晶解析から、このリガンド結合部位にコレステロール以外に硫酸コレステロールや 25-ヒドロキシコレステロールも結合するので、ROR α のアゴニスト^{用語¹¹}である可能性が指摘されている。一方時間生物学領域では時計蛋白質 *Clock* や *Bmal* の上流は何かということが大問題であり、これが解かれ始めている。これら時計蛋白質 *Clock* や *Bmal* はコアグループとして *Period*、*Cry* を制御する以外に、出力系として転写因子 DBP、TEF、HLF を制御し D-box と呼ばれる 9 塩基に結合し、大きな 24 時間リズムを細胞内に作り出す (図4)。最近この D-box を制御配列に持つ因子として、絶食誘導性ホルモン FGF21 が報告された。

生物時計グループの研究補助員から後に研究員に採用した大石勝隆氏が以前に時計変異マウスを使った網羅的遺伝子解析により、時計遺伝子産物にリズム転写制御される遺伝子の中に、核内受容体で脂肪酸をリガンドとする Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α (PPAR α) を見出し、この PPAR α を介して脂質分解 (β -酸化) が夜時間特異的に起こることも見出した^{[22][23]}。さらに核内受容体 Peroxisome Proliferator Receptor α のリガンドであるフィブレート Maus 腹空内投与すると FGF21 がサーカディアンリズムで発現することを報告している^[24]。フィブレートにより体内に誘起された空腹状態 (特に脂肪酸の異化) が FGF21 リズムの振幅を増長したことが考えられる。

このケースは PPAR α KO マウスで起こらなくなることから Peroxisome Proliferator Response Element (PPRE) 依存的と考えられた。しかしケトンダイエット (高脂肪低炭水化物を取るダイエット法) を行うと PPAR α 非依存的に FGF21 を増加させた。つまり PPRE に依存しない FGF21 誘導の経路が予想された。最近の報告ではマウス FGF21 プロモーターを詳細に解析し、既知の PPRE ばかりか新たに D-box と E-box を見出したとの報告がなされた (図 4)。さらに面白いことには、転写因子 E4BP4 が *Bmal/Clock* 依存の転写と PPAR α 依存の転写を同時に抑制した事実である。E4BP4 が *Bmal/Clock* 依存の転写を抑制することは、すでに我々が E4BP4 と E-box (CACCTG からなるシス配列) 依存の負の制御因子、*Period2* や *Cry* との複合体を作った^[8] ことで容易に予想される。しかし E4BP4 が PPAR α 依存の PPRE 配列依存転写を同時に抑制したことは大変興味深い。このことはつまり E4BP4 のリズム転写抑制は我々が当初考えた以上に強力で、D-box 以外の E-box や PPRE にも作用し、末梢時計において相当重要なブレーキの役割を果たすことを示唆している。E4BP4 は食事後のインスリン依存的に D-box をターゲットに、転写を負に制御することが知られている。5 章でも述べたが転写因子 E4BP4 が 24 時間リズム転写形成に負に働くという構図は、特に肝臓機能において重要と考えられる。さらにトリの松果体の系ではあるが、E4BP4 が時刻特異的な光に依存して脂質転写因子 SREBP により活性化されるとの報告もあり、光と食事の影響は一遺伝子の間でも複雑に絡み合うことは十分予想され今後も目を離せない領域である。

またヒトでも血中 FGF21 が脂肪酸のリズムに追従して

サーカディアンリズムで発現しているとの面白い報告がなされた^[25]。同じ論文で彼らはヒト肝臓癌由来細胞 HepG2 を用いて、パルミチン酸のような飽和でなくリノレイン酸のような不飽和脂肪酸で FGF21 が誘導されることを示している。さらに驚くべきことには、この FGF21 のサーカディアンリズムを正常のヒトと肥満者 (BMI25 以上のヒト達) を比べたところ、その振幅が肥満者で大変小さくなった点である^[25] (図 5)。今後このような絶食誘導性ホルモン FGF21 の日内動態を検査し、この振幅を増大させることで肥満や老化を予防することが可能になる可能性が考えられる。また最近スィスマウスを低温で飼育すると褐色脂肪細胞から FGF21 が誘導されることが報告された。FGF21 は冬眠や日内休眠 (トーパー) を誘導する因子としても研究されているがこの点は他の総説を参照されたい^[26]。まとめると肝臓では絶食により核内受容体 PPAR α が PPRE に結合し、褐色脂肪細胞では低温により転写因子 ATF2 が CRE に結合し FGF21 を誘導することが考えられた。ただし先に述べたケトンダイエットで PPAR α 非依存的に FGF21 を誘導する場合は、D-box や CRE を介した経路が想定される (図 4)。このように FGF21 の誘導を総合的にとらえることで絶食と脂質代謝の関係が今後より明らかになって来るであろう^{[26][27]}。

9 ショウジョウバエから学ぶ生物時計の基本モデル

これまで述べたようにほとんどの役者 (分子) とその関係性 (経路) を我々はショウジョウバエから学んできた (表 1)。この期に及んでどうしてもショウジョウバエをやりたいくなった。当時徳島大生物工学の野地澄晴先生 (現徳島

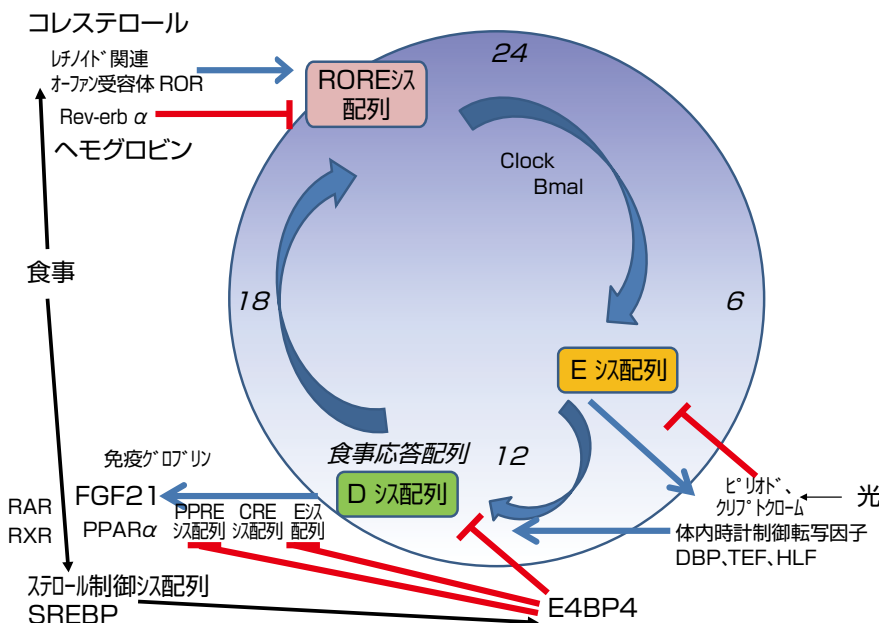


図 4 体内時計は光、食事、脂質等さまざまな因子に同調する ROR、Rev-erb、クロック (*Clock*)、ビーマル (*Bmal*)、ペリオド (*Period*)、クリプトクローム (*Cry*) は時計遺伝子で DBP、TEF、HLF、E4BP4、PPAR、RAR、RXR、SREBP は体内時計制御転写因子で、RORE、E、D、CRE、PPRE は転写因子の DNA 上のターゲット配列 (シスエレメント) を示す。

大学長) に分子生物学会でお会いするたびにショウジョウバエの研究を勧められた。偶然にも当時の生命工学工業技術研究所(現産総研) 曾良達生所長から筑波大連携大学院の勧めもありラボに学生を増やせることになった。ここで我々の時計グループに東邦大富美智子先生の勧めで入ってきたのが岡田哲也氏である。大富先生はメラトニンの松果体での日内リズムの発見者出口武夫先生(老人研)の高弟で、永年生物時計を研究していた。後年この岡田氏が睡眠研究で有名な大阪バイオサイエンス研理事長の、2015年に亡くなられた早石修先生の薫陶を受ける。ここでショウジョウバエ遺伝学をやったことのない著者ははたと困った。このとき近くでやれる人がいないかと思いついたのが理研つくばの村田武英氏であった。彼は日本でショウジョウバエ *Timeless* (律) 遺伝子を同定した谷村禎一先生(現九大理学)から直接分子遺伝学を学んだ本格派であった。理研でしばらく修行した岡田氏はショウジョウバエ時計遺伝子 *Timeless* の上流解析を行い24時間振動発現に必要なシス配列 E-box ばかりか *vriille*/E4BP4 遺伝子産物結合配列が時計制御に重要なことをいち早く見出した^[28]。その後筑波大生物系小熊譲先生の部屋からポストドクとして坂井貴臣氏(現首都大理学部)が我々のグループに加わりショウジョウバエ時計遺伝子研究が一挙に加速された。坂井氏は大学院時代に取り組んだ求愛行動に興味を持ち、この行動に時間特異性があること、時計遺伝子依存性があることを見出した^[29]。さらに興味深いことには雌の求愛行動の受容性に種特異性があることを見出した。そこでこのような種特異性が生殖隔離を原動力にした種分化に効いているとの大胆な仮説を考えた。この仮説を検証するため岡山山岡憲二先生の部屋から技術補助員として採用した西ノ首いずみ氏が実験を引き継いだ。アナナスショウジョウバエ時計遺伝子 *Timeless* を単離しキイロショウジョウバエ

(*D. Melanogaster*) の *Timeless* ノル変異体に導入しヒートショックプロモーターで制御した。この結果は時計遺伝子1個の入れ替えでアナナス型の求愛行動を再現させるほど単純ではなかった(アナナスとキイロの中間型)が、*Timeless* 蛋白の発現時期を12時間ずらすことで昼行性のハエの歩行リズムを夜行性に変えられるという思わぬ副産物を得た^[30]。この結果はネズミ等でも環境適応で夜行性から昼行性に变化できるという最近の生態学的実験を支持している。その後この辺りの事情をまとめて[Time, love and species]という英文総説を書いたのは良い思い出である^[31]。前述したように *Period* 遺伝子の発見者 S. Benzer 博士は残念ながら亡くなったが、彼が書いた[Time, love and memory]は米国でベストセラーになった。坂井氏から西ノ首氏の時代は求愛行動でも雌の受け入れの時間特異性を主に研究した。その後スウェーデンで学位を取得した浜坂康貴氏が我々生物時計チームに加わった。彼と話してみると、雄が雌を追いかける求愛行動のリズム(Close-Proximity リズム: 近接行動リズム)の神経支配に興味を強く持っていた。当時我々が最初に出した Proc. Natl. Acad. Sci. 誌の論文を見て米国グループが新たな CCD カメラを用いた求愛行動測定系を立ち上げた^[32]。この方法は坂井氏の使ったお見合い法に比べて格段にスループットがよく早速うちのラボでもこの系を取り入れた。浜坂氏は分子遺伝学的手法(ある神経のみで細胞死を起こさせる等)を駆使してさまざまな体内時計神経破壊ショウジョウバエを作成した。その結果ショウジョウバエの近接行動リズムを担う脳の中核をつきとめ、夜時計と呼ばれる脳内部位が壊れると雄が雌を追いかけなくなることを明らかにした^[33]。この中核が夏場に活発になることから季節性リズムにも関わると考えられる。その後雄が雌を追いかける求愛行動のリズムの自動化を試みた。このためタイセー社と共同で IR カメラの動画解析を導入し、後述する当時筑波大学院ポストドクの鈴木孝洋氏が C 言語でプログラムの作成で貢献する。完成したマシンを Automated Circadian System (AutoCircas) と命名した(図6)。この小動物行動測定装置ははじめ我々の研究室の片隅で試作されたものだが、タイセー社と鈴木孝洋氏(ベンチャー企業シグレイ社)が共同で製品化にこぎつけた。お蔭で2016年の千葉ものづくり認定製品に選ばれ表彰された。

ある日、旧知の霜田政美氏(つくば農生研)から電話が入り、ある精神疾患の遺伝子欠失のショウジョウバエがどうも行動異常を起こすのでは非協力してほしいとのことだった。早速詳しい話を聞くと精神遅滞を伴う脆弱 X 症候群^{脚註12}の原因遺伝子 (*difmr1*) を壊したショウジョウバエがあり、哺乳類ではファミリー遺伝子が3つあるがハエでは1つ

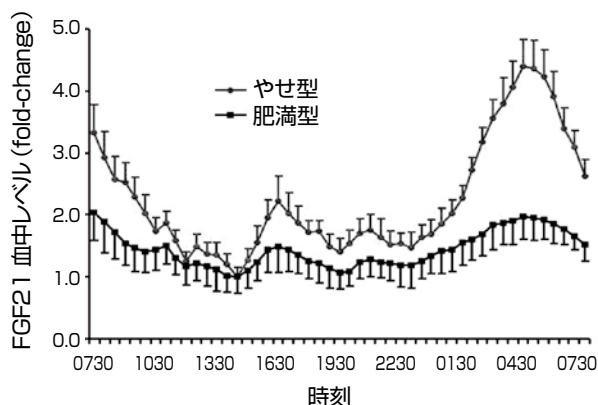


図5 絶食誘導ホルモン FGF21 が示す1日3回のリズム^[25]
肥満者 (obese) に比べ痩せ型 (lean) のヒトが綺麗なリズムを示す。

しかないとのことだった。これはとても解析し易いと考え早速行動を解析すると、歩行活動リズムがきれいに無周期であった。そこで霜田氏が中心となり正常 *dfmr1* 遺伝子をレスキューすると正常に戻る（図 7）、コアの時計神経は保たれていること、羽化のリズムは正常なことを示した^[34]。これらの実験から *dfmr1* 遺伝子が時計中枢から行動までの出力系の機能を持つことが明らかとなった。後に神経細胞の伸長が悪いことがヒトでもショウジョウバエでも共通の病因であることも解明される。このように現在ではショウジョウバエをモデルにした原因不明の神経難病の研究が大変進んできている。

統合失調症は神経難病の中でも最も難しいとされる疾患である。近年、スコットランドの統合失調症多発家系の遺伝学的解析より、第 1 染色体と第 11 染色体の相互転座が頻発している遺伝子として Disrupted-In-Schizophrenia 1 (DISC1) が報告された。DISC1 に関しても前述の霜田政美氏や筑波大の古久保・徳永克男先生や米国 Johns Hopkins 大医学部澤明先生と共同でヒト DISC1 をショウジョウバエで発現させて研究を行った^[35]。その結果このヒト DISC1 トランスジェニックバエでは睡眠時間が長くなる傾向が見られた。

10 ショウジョウバエから学ぶ認知症の本質

パーキンソン病はアルツハイマー病につき 2 番目に多く発症し、いわゆる認知症症状を伴う、長寿社会となった現代が抱える大きな課題である。家族性パーキンソン病のショウジョウバエモデルは変異型 α -シヌクレイン^[13]を導入したものが有名です。Nature 等に発表されている。さら

に我々はこのパーキンソン病ショウジョウバエモデルを用いてふるえ等の行動異常より早く睡眠異常を起こすことも見出した。最近、変異型ゴーシェ病^[14]原因遺伝子をヘテロに持つ患者がパーキンソン病のリスクが 28 倍上昇するという報告がなされた^[36]。つまりパーキンソン病の最強の憎悪因子がゴーシェ病原因遺伝子であることが明らかにされた。しかし、その分子メカニズムは現在ほとんど解明されていない。このメカニズムが時計・睡眠遺伝子経路から解明できれば新たな視点から疾患の治療方法が開発できる。

石田生物時計特別研究チームの当時筑波大大学院の鈴木孝洋氏（現シグレイ社）らは変異型ヒトゴーシェ病遺伝子を導入しショウジョウバエの複眼で発現するモデル動物を作ることに成功した^[37]。ゴーシェ病は難治性疾患克服研究事業の特定疾患に指定されているライソゾーム病^[15]である。遺伝的要因により、生まれつきグルコセレブロシダーゼという酵素の活性が低下してしまう。そのため、この酵素の基質グルコセレブロシド（糖脂質）をセラミドに分解できず、基質が肝臓、脾臓、骨、神経等に蓄積してしまう疾患である。このグルコセレブロシダーゼ遺伝子は 1986 年、日本の辻省次先生（現東大医）らにより初めてクローニングされた酵素遺伝子である。ヒトゴーシェ病は幼少で亡くなるケースも多く現在でも疾患の根治は大変困難である。鈴木氏達はゴーシェ病ショウジョウバエモデル動物を作る目的で、このヒト変異型グルコセレブロシダーゼ遺伝子を複眼特異的ドライバーでショウジョウバエに発現させると、複眼に形態異常を引き起こした。我々はさらに詳細な分子生物学的解析によりこの形態異常が小胞体ストレスから生じることを解明した。そこで小胞体ストレス^[16]を緩和す

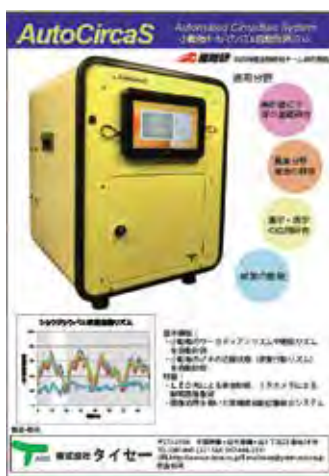


図 6 新しい全自動小動物行動観測装置 AutoCircaS を用いたショウジョウバエの睡眠・活動・求愛行動リズムの測定、シグレイ社の鈴木孝洋がソフト作成。

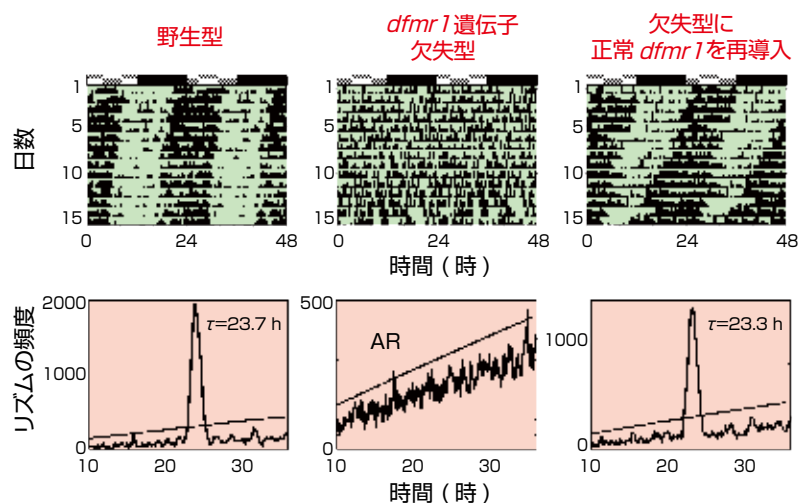


図 7 精神遅滞原因遺伝子を欠失させたモデルショウジョウバエ *dfmr1* B55 に正常の *dfmr1* 遺伝子を導入すると見事に行動のサーカディアンリズムが回復する。

るといわれるシャペロン薬剤、アンブロキシソールを与えたところ上記形態異常と小胞体ストレスが緩和された (図 8)。以上のことからヒトゴーシェ病は従来いわれた酵素基質の蓄積ばかりでなく、変異タンパクそのものの蓄積による小胞体ストレスが新しい病態分子機構であることが明らかとなった。

そこでこれらの神経変性分子機構をパーキンソン病と結び付け、さらにその治療法を提唱するため、最近我々はヒト変異型グルコセブレロシダーゼを部位特異的ばかりか全身で発現するゴーシェ病モデルショウジョウバエの作成に成功した。マウスより早くモデルを作れるショウジョウバエを用いて、最近パーキンソン病とゴーシェ病を合わせ持った疾患モデルバエを作製にも成功した。

最近我々はこのゴーシェ病モデルショウジョウバエの第 2 世代を開発した。これはショウジョウバエの GBA 相同遺伝子^{用語 17} にミノス挿入変異^{用語 18} を導入したモデルであり、患者と同様酵素の基質であるヒドロキシグルコセブレロシドを蓄積している。このゴーシェ病モデルショウジョウバエを用いてパーキンソン病発症の遺伝子発現を解析したところ幾つかのオートファジー^{用語 19} 関連のパーキンソン病原因遺伝子群 (因子) の発現上昇が観察された。このゴーシェ病モデルショウジョウバエは短寿命、運動障害ばかりでなく睡眠障害を起こすことが明らかとなった^[38]。面白いことにはゴーシェ病ショウジョウバエモデルやヒトパーキンソン病原因遺伝子を導入したモデルショウジョウバエにおいても若年時 (ヒトでいえば 20 代後半から 30 代) に睡眠障害が見出された。これらの事実から今後認知症を伴う神経変性疾患では発生初期の睡眠障害を防ぐことが重要と考えている。これらの成果はパーキンソン病、ゴーシェ病等の

認知異常を伴う神経変性疾患の新しい治療方法の開発、早期診断および疾患の予防によるに繋がる。そこでこれらの認知症モデルショウジョウバエを用い現在も薬のスクリーニングを続けている。

11 終わりに

このように産総研での時計遺伝子研究はマウスや細胞株を使って始めたが、マウス個体では 1 つの遺伝子を遺伝子工学的に操作するのに 2 年を要し、それらの系統維持や培養維持に高額な予算も必要であった。後半では予算がなくなってきたので、ショウジョウバエと哺乳類細胞株だけに絞って研究を続けた。ショウジョウバエはライフサイクルが約 60 日と短く、全世界にストック施設ができており、研究者の組織もフレンドリーで、変異個体も容易に供給してもらえる。認知症等の神経変性疾患の新しい治療法の開発にも有用な変異個体も作成した。この変異個体を用いて薬の 1 次スクリーニングを行い、企業から資金提供を受けている。このように 30 年の国研での研究生活を振り返ると多くの人たちの参入と協力があったことが今改めて実感している。すべての協力者のお名前を出せなかったが紙面を借りて深く御礼申し上げたい。

現在も国の科学予算は応用志向が高まり、すぐに役立つことを求める傾向が強まっている。ますます国研や大学での基礎研究はやりにくい時代になってきている。しかし抗体医薬のような本当の科学技術革新は我が国の純粋基礎研究が礎となっている。今後とも我が国のバイオサイエンスが衰退することなきよう、是非各省庁では横断的な基礎研究の目利きを育てていただきたい。

著者は 2016 年 4 月より国際科学振興財団 (つくば市春

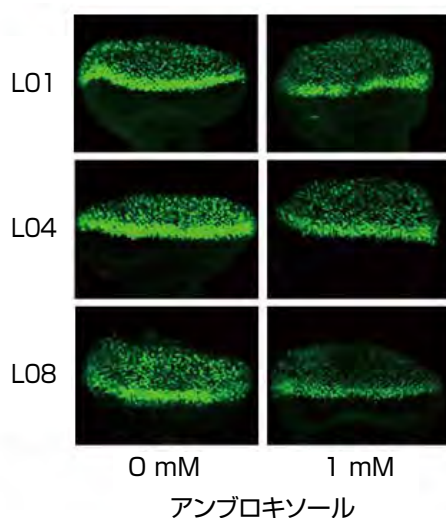
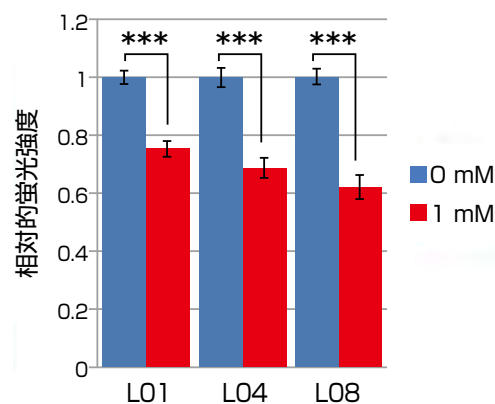


図 8 アンブロキシソールはゴーシェ病モデルショウジョウバエに効果
アンブロキシソール処理後小胞体ストレスマーカー蛋白の発現 Xbp-1 (緑色) が減少。



(PLOS ONE(2013), T. Suzuki *et al.*)^[37]

日3-24-16)の中に時間生物学研究所を立ち上げた。ここでも時計遺伝子や睡眠と認知症の研究を継続しているので是非お立ち寄りいただければ幸いです。

用語の説明

- 用語1: 双極型核移行配列:細胞質で合成された特定のタンパク質を核に輸送し、局在化させるためにタンパク質自身が持つ特別なアミノ酸配列の部分。
- 用語2: COS細胞: COS細胞はAfrican Green Monkeyの腎線維芽細胞をSV40で形質転換したもの。外来遺伝子の発現効率が良いので、タンパク質を一過的に発現させる場合に良く用いられる。
- 用語3: 内在性: 一般的には、ある現象がその根拠、原因を自己自身のうちにもっている事態。
- 用語4: Cry: 青色光受容体タンパク質で、元来植物で見出されたが、その後ヒトを含む多くの動物でも見出された。
- 用語5: シス配列: シス作用配列ともいう。遺伝子の近傍にあって、その部分に調節タンパク質が結合すると遺伝子の転写(DNAからRNAが読み取られる)が調節される領域。この領域自体はタンパク質を合成せず、他のタンパク質(転写因子)が結合する領域。
- 用語6: E2-box: E-box配列を分類すると正規のCAGNTG配列と第2のCACGTT配列に分けられ第2のE-boxと呼ばれる。E-boxは時計転写因子*Clock*、*Bmal*等が結合するDNA配列。図1ではE-シス配列と翻訳した。
- 用語7: bZIP型転写因子: bZIP(ベーシックジッパープロテイン)はタンパク質の二次構造のモチーフの1つでDNAに結合能を持つ。
- 用語8: *mper2*プロモーター: DNA上のmouse *Period2*遺伝子上流の転写制御領域。
- 用語9: A-site: 上流側のE4BP4転写因子結合DNA配列。
- 用語10: B-site: 下流側のE4BP4転写因子結合DNA配列。
- 用語11: アゴニスト: 生体内の受容体分子に働いて神経伝達物質やホルモンなどと同様の機能を示す作動薬。
- 用語12: 脆弱X症候群: 現在遺伝性であることが確認されている知的障害を伴う精神疾患で神経細胞の分化が阻害されている。
- 用語13: 変異型 α -シヌクレイン: SNCA遺伝子によってコードされるアミノ酸140残基からなるタンパク質のミスセンス変異。家族性パーキンソン病の原因となる。
- 用語14: 変異型ゴーシェ病: フランスの医師フィリップ・ゴーシェによって発見された病気で、遺伝的要因により生まれつき、グルコセレブロシダーゼ(GBA)という酵素が不足であったり欠損していたりして活性が低下するため、グルコセラブロシド(糖脂質)をセラミドに分解できず、肝臓、脾臓、骨などにグルコセラブロシドが蓄積してしまう疾患。重篤な場合2歳までに死亡。

- 用語15: ライソゾーム病: 細胞内にある小器官の一つであるライソゾーム(lysosome)に関連した酵素が欠損しているために、分解されるべき物質が老廃物として体内に蓄積してしまう先天代謝異常疾患の総称。
- 用語16: 小胞体ストレス: 正常な高次構造に折り畳まれなかったタンパク質(変性タンパク質; unfolded protein)が小胞体に蓄積し、それにより細胞への悪影響(ストレス)が生じることである。小胞体ストレスは細胞の正常な生理機能を妨げるため、細胞にはその障害を回避し、恒常性を維持する仕組みが備わっている。
- 用語17: GBA相同遺伝子: ヒトのゴーシェ病原因遺伝子、グルコセラブロシダーゼをGBAと略した。このヒト遺伝子とDNA配列ばかりか機能も同様の遺伝子がショウジョウバエから見つかり、これをGBA相同遺伝子と呼ぶ。
- 用語18: ミノス挿入変異: ショウジョウバエで良く使われる遺伝子工学技術。元来染色体DNAの上を動き回る性質を持つトランスポゾン的一种、この性質を用いて特定の遺伝子の中に挿入変異を起こすことができる。
- 用語19: オートファジー: 細胞が持っている、細胞内のタンパク質を分解するための仕組みの一つ。自食とも呼ばれる。東工大の大隈良典先生がこの仕組みの解明で2016年ノーベル生理学・医学賞を受賞した。

参考文献

- [1] HS. Shin, T. A. Bargiello, B. T. Clark, F. R. Jackson and M. W. Young: An unusual coding sequence from a *Drosophila* clock gene is conserved in vertebrates, *Nature*, 317 (6036), 445-448 (1985).
- [2] K. Sakamoto, T. Nagase, H. Fukui, K. Horikawa, T. Okada, H. Tanaka, K. Sato, Y. Miyake, O. Ohara, K. Kako and N. Ishida: Multitissue circadian expression of rat period homolog (rPer2) mRNA is governed by the mammalian circadian clock, the suprachiasmatic nucleus in the brain, *J. Biol. Chem.*, 273, 27039-27042 (1998).
- [3] N. Ishida, K. Maki and A. Ravi: Biological clocks, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96 (16), 8819-8820 (1999).
- [4] R. J. Konopka and S. Benzer: Clock mutants of *Drosophila melanogaster*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 68 (9), 2112-6 (1971).
- [5] J. C. Dunlap: Molecular bases for circadian clocks, *Cell*, 96 (2), 271-90 (1999).
- [6] 石田直理雄: 体内時計のしくみ、看護のための最新医学講座 第31巻 医学と分子生物学 (日野原重明, 井村裕夫監修), 中山書店, (2003).
- [7] K. Miyazaki, M. Mesaki and N. Ishida: Nuclear entry mechanism of rat PER2 (rPER2): role of rPER2 in nuclear localization of CRY protein, *Mol. Cell Biol.*, 21 (19), 6651-6659 (2001).
- [8] K. Miyazaki, M. Wakabayashi, S. Chikahisa, H. Sei and N. Ishida: PER2 controls circadian periods through nuclear localization in the suprachiasmatic nucleus, *Genes Cells*, 12 (11), 1225-1234 (2007).
- [9] C. Iidaka, K. Miyazaki, T. Akaike and N. Ishida: A role for glycogen synthase kinase-3 β in the mammalian circadian clock, *J. Biol. Chem.*, 280 (33), 29397-29402 (2005).
- [10] K. Sakata, H. Kawasaki, T. Suzuki, K. Ito, O. Negishi, T. Tsuno, H. Tsuno, Y. Yamazaki and N. Ishida: Inositols affect

- the mating circadian rhythm of *Drosophila melanogaster*, *Front. Pharmacol.*, 6 (111), doi: 10.3389/fphar.2015.00111 (2015).
- [11] 石田直理雄: 時計遺伝子と糖質代謝—栄養が時計の針を遅らせる機構, *循環器内科*, 68 (5), 428–433 (2010).
- [12] K. L. Toh, C. R. Jones, Y. He, E. J. Eide, W. A. Hinz, D. M. Virshup, L. J. Ptáček and YH. Fu: An *hPer2* phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phase syndrome, *Science*, 291 (5506), 1040–1043 (2001).
- [13] T. Ebisawa, M. Uchiyama, N. Kajimura, K. Mishima, Y. Kamei, M. Katoh, T. Watanabe, M. Sekimoto, K. Shibui, K. Kim, Y. Kudo, Y. Ozeki, M. Sugishita, R. Toyoshima, Y. Inoue, N. Yamada, T. Nagase, N. Ozaki, O. Ohara, N. Ishida, M. Okawa, K. Takahashi and T. Yamauchi: Association of structural polymorphisms in the human *period3* gene with delayed sleep phase syndrome, *EMBO Rep.*, 2 (4), 342–346 (2001).
- [14] T. Ohno, Y. Onishi and N. Ishida: A novel E4BP4 element drives circadian expression of *mPeriod2*, *Nucleic Acids Res.*, 35 (2), 648–655 (2007).
- [15] T. Ohno, Y. Onishi and N. Ishida: The negative transcription factor E4BP4 is associated with circadian clock protein PERIOD2, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 354 (4), 1010–1015 (2007).
- [16] M. Kotaka, Y. Onishi, T. Ohno, T. Akaike and N. Ishida: Identification of negative transcriptional factor E4BP4-binding site in the mouse circadian-regulated gene *Mdr2*, *Neurosci. Res.*, 60 (3), 307–313 (2008).
- [17] Y. Onishi, S. Hanai, T. Ohno, Y. Hara and N. Ishida: Rhythmic SAF-A binding underlies circadian transcription of the *Bmal1* gene, *Mol. Cell. Biol.*, 28 (10), 3477–3488 (2008).
- [18] K. Xu, X. Zheng and A. Sehgal: Regulation of feeding and metabolism by neuronal and peripheral clocks in *Drosophila*, *Cell Metab.*, 8 (4), 289–300 (2008).
- [19] R. Doi, K. Oishi and N. Ishida: CLOCK regulates circadian rhythms of hepatic glycogen synthesis through transcriptional activation of *Gys2*, *J. Biol. Chem.*, 285 (29), 22114–22121 (2010).
- [20] H. Kawasaki, R. Doi, K. Ito, M. Shimoda and N. Ishida: The circadian binding of CLOCK protein to the promoter of *C/ebpa* gene in mouse cells, *PLoS One*, 8 (3), e58221, doi: 10.1371/journal.pone.0058221 (2013).
- [21] 石田直理雄, 鈴木孝洋: 時計遺伝子研究の最近の進歩とコレステロールや食事との関り, *オレオサイエンス*, 11 (10), 391–396 (2011).
- [22] K. Oishi, K. Miyazaki, K. Kadota, R. Kikuno, T. Nagase, G. Atsumi, N. Ookura, T. Azama, M. Mesaki, S. Gyosei, H. Kobayashi, C. Iidaka, T. Umehara, M. Horikoshi, T. Kudo, Y. Shimizu, M. Yano, M. Monden, K. Matida, J. Matsuda, S. Horie, T. Todo and N. Ishida: Genome-wide expression analysis of mouse liver reveals CLOCK-regulated circadian output genes, *J. Biol. Chem.*, 278 (42), 41519–41527 (2003).
- [23] K. Oishi, H. Shirai and N. Ishida: CLOCK is involved in the circadian transactivation of peroxisome proliferator-activated receptor α (*PPAR α*) in mice, *Biochem. J.*, 386 (Pt 3), 575–581 (2005).
- [24] K. Oishi, D. Uchida and N. Ishida: Circadian expression of *FGF21* is induced by *PPAR α* activation in the mouse liver, *FEBS Lett.*, 582 (25–26), 3639–42 (2008).
- [25] H. Yu, F. Xia, K. S. Lam, Y. Wang, Y. Bao, J. Zhang, Y. Gu, P. Zhou, J. Lu, W. Jia and A. Xu: Circadian rhythm of circulating fibroblast growth factor 21 is related to diurnal changes in fatty acids in humans, *Clin. Chem.*, 57 (5), 691–700 (2011).
- [26] N. Ishida: Role of *PPAR α* in the control of torpor through FGF21-NPY pathway: From circadian Clock to seasonal change in mammals, *PPAR Res.*, 412949 (2009).
- [27] 石田直理雄: 時を刻む時計分子研究の最近の進歩—季節時計と求愛行動, *心臓*, 43 (2), 132–139 (2011).
- [28] T. Okada, T. Sakai, T. Murata, K. Kako, K. Sakamoto, M. Ohtomi, T. Katsura and N. Ishida: Promoter analysis for daily expression of *Drosophila timeless* gene, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 283 (3), 577–582 (2001).
- [29] T. Sakai and N. Ishida: Circadian rhythms of female mating activity governed by clock genes in *Drosophila*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98 (16), 9221–9225 (2001).
- [30] I. Nishinokubi, M. Shimoda and N. Ishida: Mating rhythms of *Drosophila*: rescue of *tim01* mutants by *D. ananassae timeless*, *J. Circadian Rhythms*, 4 (4), doi:10.1186/1740-3391-4-4 (2006).
- [31] T. Sakai and N. Ishida: Time, love and species, *Neuro Endocrinol. Lett.*, 22 (4), 222–228 (2001).
- [32] S. Fujii, P. Krishnan, P. Hardin and H. Amrein: Nocturnal male sex drive in *Drosophila*, *Curr. Biol.*, 17 (3), 244–251 (2007).
- [33] Y. Hamasaka, T. Suzuki, S. Hanai and N. Ishida: Evening circadian oscillator as the primary determinant of rhythmic motivation for *Drosophila* courtship behavior, *Genes Cells*, 15 (12), 1240–1248 (2010).
- [34] S. Inoue, M. Shimoda, I. Nishinokubi, M. C. Siomi, M. Okamura, A. Nakamura, S. Kobayashi, N. Ishida and H. Siomi: A role for the *Drosophila* fragile X-related gene in circadian output, *Curr. Biol.*, 12 (15), 1331–1335 (2002).
- [35] N. Sawamura, T. Ando, Y. Maruyama, M. Fujimuro, H. Mochizuki, K. Honjo, M. Shimoda, H. Toda, T. Sawamura-Yamamoto, L. A. Makuch, A. Hayashi, K. Ishizuka, N. G. Cascella, A. Kamiya, N. Ishida, T. Tomoda, T. Hai, K. Furukubo-Tokunaga and A. Sawa: Nuclear DISC1 regulates CRE-mediated gene transcription and sleep homeostasis in the fruit fly, *Mol. Psychiatry*, 13 (12), 1138–1148, doi: 10.1038/mp.2008.101. (2008).
- [36] E. Sidransky, M. A. Nalls, J. O. Aasly, J. Aharon-Peretz, G. Annesi, E. R. Barbosa, A. Bar-Shira, D. Berg, J. Bras, A. Brice, CM. Chen, L. N. Clark, C. Condroyer, E. V. De Marco, A. Dürr, M. J. Eblan, S. Fahn, M. J. Farrer, HC. Fung, Z. Gan-Or, T. Gasser, R. Gershoni-Baruch, N. Giladi, A. Griffith, T. Gurevich, C. Januario, P. Kropp, A. E. Lang, GJ. Lee-Chen, S. Lesage, K. Marder, I. F. Mata, A. Mirelman, J. Mitsui, I. Mizuta, G. Nicoletti, C. Oliveira, R. Ottman, A. Orr-Urtreger, L. V. Pereira, A. Quattrone, E. Rogaeva, A. Rolfs, H. Rosenbaum, R. Rozenberg, A. Samii, T. Samaddar, C. Schulte, M. Sharma, A. Singleton, M. Spitz, E. K. Tan, N. Tayebi, T. Toda, A. R. Troiano, S. Tsuji, M. Wittstock, T. G. Wolfsberg, YR. Wu, C. P. Zabetian, Y. Zhao and S. G. Ziegler: Multicenter analysis of glucocerebrosidase mutations in Parkinson's disease, *N. Engl. J. Med.*, 361 (17), 1651–1661, doi: 10.1056/NEJMoa0901281 (2009).
- [37] T. Suzuki, M. Shimoda, K. Ito, S. Hanai, H. Aizawa, T. Kato, K. Kawasaki, T. Yamaguchi, H. D. Ryoo, N. Goto-Inoue, M. Setou, S. Tsuji and N. Ishida: Expression of human Gaucher disease gene *GBA* generates neurodevelopmental defects and ER stress in *Drosophila* eye, *PLoSOne*, 8 (8), doi: 10.1371/journal.pone.0069147 (2013).
- [38] H. Kawasaki, T. Suzuki, K. Ito, T. Takahara, N. Goto-Inoue, M. Setou, K. Sakata and N. Ishida: Minos-insertion mutant of the *Drosophila* *GBA* gene homologue showed abnormal phenotypes of climbing ability, sleep and life span with accumulation of hydroxy-glucocerebroside, *Gene*, 614, 49–55, in press, doi:10.1016/i.gene.2017.03.004 (2017).

執筆者略歴

石田 直理雄 (いしだ のりお)

1980年筑波大学第二学群卒業。1982年大阪大学大学院医学研究科修士課程修了。1986年京都大学大学院医学研究科生理系博士課程修了。1982年工業技術院微生物工業技術研究所入所。1990年～91年米国ラ・ホヤ癌研究所客員研究員。1998年工業技術院生命工学工業技術研究所生体情報部時計遺伝子グルー



プ室長。1999年東京工業大学大学院生命理工学研究科教授併任。2003年筑波大学生命環境科学連携大学院教授。2007年産総研生物機能生物時計グループ長・首席研究員。1995年つくば奨励賞「生物時計機構の分子生物学的研究」。1995年工業技術院長賞「生物時計の遺伝子工学的研究」。1997年第25回内藤記念特定研究助成金「生物時計の分子生物学」。2007年キッズデザイン賞リサーチ部門「体内時計のメカニズムとその応用研究」。
