

## 体内時計が内外のリズムと同期する性質を簡便に評価する手法を提案

概日時計（体内時計）は内外の周期的なシグナルと同期する性質を持ちますが、その特性を調べるには、刺激への応答を逐一計測する必要があり、時間とコストがかかります。本研究では、概日時計の脱同期状態に着目し、数理モデルを用いて、概日時計の同期特性を一度の計測で評価する手法を提案しました。

多くの生物は日周期で生じる光や温度の環境変化に適応するため、概日時計（体内時計）を備えています。概日時計は、環境や生体内のリズムに合わせて自身の時刻（位相）を調整するため、光や温度などの同期刺激に応じて位相を変化させる性質を持ち、この応答は刺激を受けた際の位相によっても変化します。これを一つのグラフにまとめたものは位相応答曲線（PRC）と呼ばれ、概日時計と内外の同期刺激との関係を明らかにする上で重要な役割を果たします。しかしながら、PRCを取得するためには、刺激を与えた時刻ごとの応答を逐一計測する必要があり、多くの時間とコストがかかることが課題でした。

本研究では、植物に見られる概日時計の脱同期状態（細胞それぞれの概日時計の時刻がばらばらになった状態）における刺激応答（特異点応答、SR）を用いた PRC 推定手法を哺乳類の概日時計に適用し、さまざまな刺激に対する概日時計の応答特性の評価を行いました。その結果、マウスやラットの培養細胞でも SR が観察されること、温度刺激や化学刺激などに対する概日時計の PRC を一度の計測から評価できることを示しました。さらに、マウスから得られた腎臓や肺などの組織切片を用いた計測により、組織によって同じ同期刺激でも応答の性質が異なることが分かりました。

本研究成果は、概日時計が環境や生体内の刺激に合わせて自身のリズムを調整するメカニズムの解明につながるるとともに、時差ボケや概日リズム障害の治療薬の開発への応用も期待されます。

### 研究代表者

筑波大学国際統合睡眠医科学研究機構（WPI-IIIS）／筑波大学医学医療系

平野 有沙 助教

櫻井 武 教授

## 研究の背景

多くの生物は、地球の自転に伴う光や温度の環境変化に適応するため、概日時計<sup>注1)</sup>を備えています。概日時計は環境や生体内のリズムに対して、自身の周期や時刻（位相）を同期させるために、光や温度などの刺激に対して応答する性質を持っています。例えば、海外旅行で時差ボケが起こった後、徐々に現地の時刻に順応していくのは、概日時計が現地の光サイクルに応答して時刻調節をするからです。この応答は、刺激を受けた際の概日時計の位相（刺激を受けた時刻）にも大きく依存します。この概日時計の時刻ごとの刺激に対する応答を一つのグラフにまとめたものは、位相応答曲線（PRC）と呼ばれており、概日時計が環境や生体内のリズムと同期するメカニズムを説明するとともに、時差ボケや概日リズム障害の治療のためにも重要な情報を与えてくれます。しかしながら、PRCを得るには、一日のうちのさまざまな時刻における応答を逐一計測する必要があります。（図1上）。

一方、植物の概日時計に関しては、一度の計測で PRC を推定する手法が提案されています（Masuda et al., 2021）。この方法では、細胞それぞれの概日時計の時刻がばらばらになった脱同期状態にすることにより、見かけ上はリズムのない状態（特異点状態）を作り出します（図1下）。これは時刻がない状態であるため、刺激を与えるタイミングによらず、概日時計は一定の刺激応答を示します。この特異点状態でのリズムの応答は特異点応答（singularity response, SR）と呼ばれ、数理モデルを用いた解析から、SR は PRC の性質を反映していることが分かっています。そのため、たった一度の SR の計測から PRC を予測することができます。しかしながら、植物と動物では概日時計の性質は大きく異なり、この手法が動物の概日時計にも適用できるかはこれまで不明でした。そこで、本研究では、哺乳類の概日時計においても SR に基づいた PRC 推定手法が有効であることを確かめるとともに、さまざまな同期刺激に対する概日時計の同期特性の違いを評価しました。

## 研究内容と成果

まず、先行研究（Manella et al. 2021）で計測された、マウスの概日時計の一細胞レベルでの PRC 計測データを用いて、SR を用いた PRC 推定手法の精度の検証を行いました。その結果、SR から予測した PRC と実際に計測された PRC がよく一致することが確かめられました。また、マウスやラットの培養細胞を用いて温度刺激やさまざまな化学刺激を与えたところ、それぞれの刺激に対して SR が観察されるとともに、刺激ごとの応答の性質を定量的に評価できることが確認できました（図2）。このことから、SR を利用した手法では、従来法の 10 分の 1 以下の計測回数でも、環境刺激や薬剤投与が概日時計に与える影響を評価できることが分かりました。

従来、体温のリズムは生体内の臓器の概日時計を調整することで、組織ごとのリズムを同期させる役割があると考えられてきました。そこで、マウスから取得された腎臓や肺の組織培養を用いて、体温変化を模倣した刺激を与えたところ、温度刺激に対して組織ごとに概日リズムの同期特性が異なることが示唆されました。

以上の結果から、SR を用いた PRC 推定手法は非常に簡便でありながら、定量的かつ汎用性の高い手法であることが明らかになりました。また、本手法を用いて、哺乳類の概日時計が、内外のさまざまな同期刺激に対して、多様な応答特性を持つことが示されました。

## 今後の展開

本研究により、さまざまな刺激に対する概日時計の同期特性を定量化することに成功しました。これは、哺乳類の概日時計が、環境や生体内の概日時計のネットワークの中で、自身の時刻情報を調整するメカニズムの解明につながると考えられます。また、今回提案した手法は、安価かつ定量的に概日時計の同期特性を評価できることから、時差ボケや概日リズム障害を改善するための薬剤の探索などにも活用できると期待されます。

## 参考図

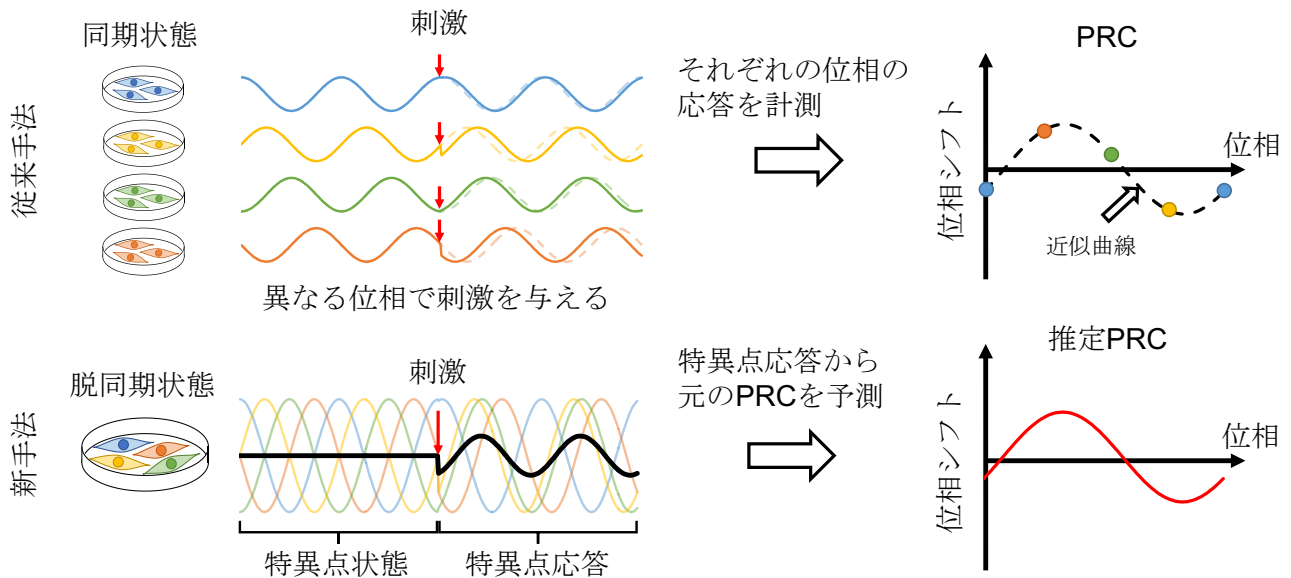


図1 従来の PRC 計測手法と特異点応答を用いた PRC 推定手法

従来の PRC 計測では、計測前にすべての細胞の概日時計の時刻（位相）をそろえることで、特定の時刻での刺激に対する応答を計測する。刺激応答時に誘導される時刻の変化は位相シフトと呼ばれる。複数の時刻に対して計測を行い、一つのグラフにまとめることで PRC を求める。この方法では一つの PRC を得るために複数回の計測が必要となる。

新たに提案した手法では、まず細胞の概日時計を脱同期状態にする。これにより細胞ごとのリズムが打ち消しあい、集団レベルでのリズムの振幅は極めて低下した状態（特異点状態）となる。ここに刺激を与えると、集団の応答は、すべての位相状態の応答を平均した一定のリズム（特異点応答、SR）として現れる。この応答は PRC の振幅や位相によって形を変化させることから、逆算して PRC の形状を予測することができる。この方法では一度の計測からでも PRC の形が予測可能となる。

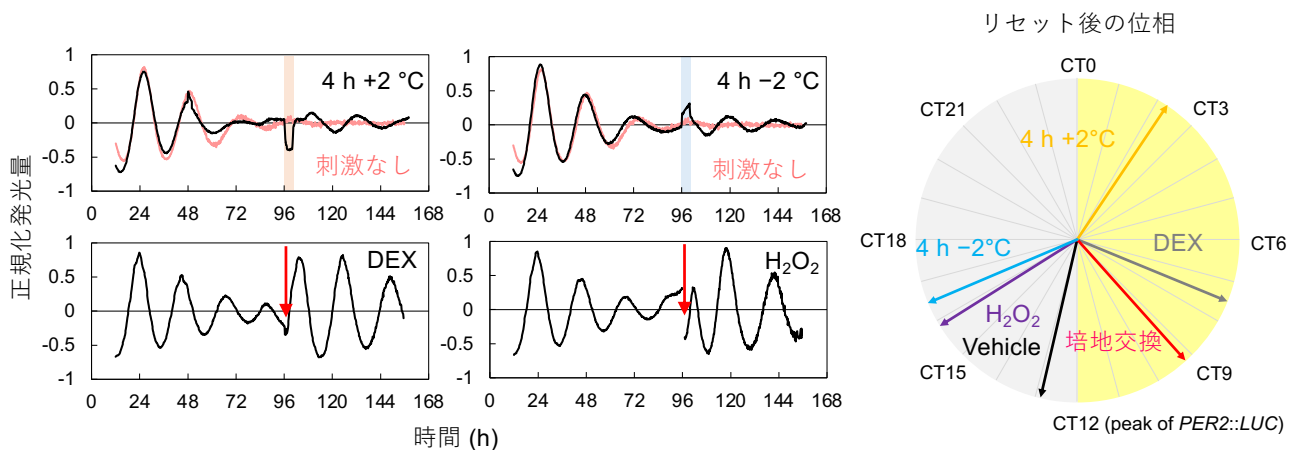


図2 マウス胎児線維芽細胞を用いたSR計測

左図：マウスの時計遺伝子 *Period2*<sup>注2)</sup> の発現量をルシフェラーゼアッセイ<sup>注3)</sup> により計測した。培養細胞では、細胞ごとの個体差や環境ノイズの影響で徐々に細胞ごとの概日時計が脱同期し、この場合では4日程度で特異点状態に至った。その後、各種刺激を与えると、刺激の種類に応じて、概日時計がリセットされる特異点応答を観察することができた。高温刺激 (+2°C) および低温刺激 (-2°C) は色背景部分において4時間与えた。酸化ストレス (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)、概日時計の時刻を調整する作用のあるデキサメタゾン (DEX) は赤矢印のタイミングで細胞培養培地に添加した。

右図：刺激後にどの時刻に概日時計の時刻が変化したのかを表した図である。左図のルシフェラーゼリズムのピーク時刻を Circadian Time (CT)12<sup>注4)</sup>、リズムの谷の時刻を CT0 と定めた。温度、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、DEX の刺激により、概日時計がそれぞれ異なる時刻に調節されることが確認された。

### 用語解説

#### 注1) 概日時計

体内時計の一種であり、多くの生物が持つ約24時間周期の自発的な生体リズム（概日リズム）を生み出す生体システム。哺乳類では、睡眠・覚醒や体温など、多くの生命活動の概日リズムを制御している。

#### 注2) *Period2*

哺乳類の概日時計を構成する時計遺伝子の一つ。発現量のリズムが約24時間周期で変動することから、概日時計を評価する際の指標とされることが多い。

#### 注3) ルシフェラーゼアッセイ

生体内の遺伝子の発現量を非侵襲的に計測する方法の一つ。対象の遺伝子の発現制御領域にホタルの発光遺伝子を組み込むことにより、発光の強さから遺伝子発現量を評価することができる。

#### 注4) Circadian Time (CT)

概日時計の主観の時刻。概日時計によって生まれるリズムの周期は完全には24時間ではないため、時刻（位相）を表記する際には、実時間ではなく、概日リズムの1サイクルを0～24の値で表したものをCTとして表記する。CT0-12を主観的明期、CT12-24を主観的暗期と設定することが多い。

### 研究資金

本研究は、科研費 (17H06096、22J00270、22K15157)、日本医療研究開発機構 (AMED) ムーンショット型研究開発事業 (JP21zf0127003)、内藤記念科学振興財団による研究プロジェクトの一環として実施されました。

## 掲載論文

【題名】 Singularity response reveals entrainment properties in mammalian circadian clock.  
(特異点応答による哺乳類概日時計の同期特性の解明)

【著者名】 Kosaku Masuda, Naohiro Kon, Kosuke Iizuka, Yoshitaka Fukada, Takeshi Sakurai, Arisa Hirano

【掲載誌】 Nature communications

【掲載日】 2023年5月17日

【DOI】 10.1038/s41467-023-38392-x

## 問い合わせ先

【研究に関すること】

平野 有沙 (ひらの ありさ)

筑波大学国際統合睡眠医科学研究機構 (WPI-IIIS) / 筑波大学医学医療系 助教

URL: <https://sakurai-lab.com>

【取材・報道に関すること】

筑波大学国際統合睡眠医科学研究機構

TEL: 029-853-5857

E-mail: [wpi-iiis-alliance@ml.cc.tsukuba.ac.jp](mailto:wpi-iiis-alliance@ml.cc.tsukuba.ac.jp)