

皮膚における生体リズムの分子機構

神戸大学大学院 医学系研究科脳科学講座分子脳科学分野

岡村 均

Most organisms living on earth have an internal clock and thus circadian rhythm represent a basic feature of life. In mammals, as in other many organisms, cellular circadian core oscillator is thought to be composed of an autoregulatory transcription-(post)translation-based feedback loop involving a set of clock genes. Although master clock of the body was localized in the suprachiasmatic nucleus of the brain, the molecular core clock oscillatory loop is known to exist in most of the cells in the body including skin. Here we investigated the expression of *mPer1* and *mPer2* genes in the skin, and found that skin keratinocytes and fibroblasts rhythmically expressed *mPer1* and *mPer2* genes. Clock signals were transmitted from the SCN to peripheral tissues through oscillation conducting systems, in which corticosterone and adrenergic signals may play the important part. Arrived clock signals entrain the cell-clock in the skin, and the intracellular oscillating loop coordinates the timing of the expression of a variety of genes with specific cellular function.

1. 緒言

体内時計（生物時計 biological clock）は24時間周期で自転する地球の環境変動に適応するため地球上の生命が獲得した基本的な生命原理である。この体内時計を司る、長らく囑望されていた哺乳類時計遺伝子 *clock*, *mPer1* が、我々を含む複数グループにより、1990年代後半に発見されたのをきっかけに、哺乳類リズム研究は全く新しい局面を迎え急速に仕事が進んでいる。

今回着目するのは、皮膚における時計遺伝子の発現である。時計遺伝子の発見とともに体内時計のある視交叉上核以外の皮膚を含む末梢臓器に時計遺伝子がリズムに発現することが注目された。今回、この分子メカニズムを解明する。この末梢臓器における時計機構の発見により、体内の24時間リズムは、視床下部の視交叉上核を頂点とし、他の神経系や内分泌系を中間とし、末梢臓器を底辺とする階層的時計機構により精妙に制御されていると想定されている。従来より、皮膚の代謝・血管・運動・立毛・発汗・細胞分裂像が日内リズムを呈する事は知られているが、体系的に検索はされていない。今回我々は、正常マウスにおける時計遺伝子の日内リズムを検索し、皮膚のサーカディアンリズムと活動の相関を検索した。

2. 実験

2.1 マウス皮膚における時計遺伝子の発現のサーカディアンリズム

時計遺伝子 *mPer1*, *mPer2* の皮膚における日周変動を、ノーザンプロットにて4時間毎、12時間明・12時間暗の明暗条件下で検索した。次に、これらの変化が、光刺激によるものか、内因性リズムによるものかを判別するため、恒常暗条件下で検索した。

2.2 マウス皮膚における時計遺伝子の発現のミクロ解析

哺乳類 *mPer2* 遺伝子の産物である mPER2 蛋白質に対する特異的抗血清を用いて、マウス皮膚における時計蛋白質発現のサーカディアンリズムを検索した。

2.3 時計遺伝子の転写制御機構

時計遺伝子の発振機構で注目されるのは、転写から行動まで、地球上の生物で共通する法則があることである。それは、時計遺伝子が転写・翻訳後産生された時計蛋白質が、自分自身の転写制御を抑制するというオートフィードバックループによる発振分子機構である。哺乳類では、コア振動体を構成する発振の中心となる振動子は、*mPer1* と *mPer2* の2つの遺伝子である。*mPer1*, *mPer2* の転写によって産生された *mPer1* mRNA, *mPer2* mRNA から、PER1 蛋白質、PER2 蛋白質ができる。これが、細胞質から核の中へ入ってCRY 蛋白質と結合して、ポジティブ因子の転写を押さえる。これでループが閉じ、転写減少に続くPER1、PER2 蛋白質減少にともなう抑制効果の減少により、*mPer1*, *mPer2* 時計遺伝子の転写が再開される¹⁾。*mPer1* の5つのE-box (CACGTG, CACGTT) を介する転写制御を、bHLH-PAS 蛋白質であるCLOCK とBMAL1、CRY1、



Molecular Mechanisms of Biological Clocks in the Skin

Hitoshi Okamura

Division of Molecular Brain Science,
Department of Brain Sciences, Kobe
University Graduate School of Medicine.

CRY2を用いて検索し、DBP結合部位(D-box: RTTAY-GTAAAY (R: purine, Y: pyrimidine))のPAR蛋白質群(HLF, TEF, DBP)と転写抑制因子であるE4BP4との結合解析を行った。

2.4 時計遺伝子の転写制御と時計蛋白質PER2の細胞内での時間的・空間的位置変化

時計遺伝子の単純なフィードバックループにさらに、蛋白質レベルの修飾が加わり、24時間リズムができると考えられる。まず初めは、リン酸化による分解制御である。まず、できたPER1, PER2蛋白質モノマーは、細胞質中に存在するcasein kinase Iε (CKIε)によりリン酸化され²⁾、リン酸化されたPER1, PER2は分解される。時計蛋白質PER1, PER2の分解に、ユビキチン・プロテアソームが関与しているかどうかを検索した。

2.5 視交叉上核の中核時計が末梢臓器の末梢時計に与える影響

視交叉上核では*mPer1*, *mPer2*を中心とする分子時計が昼をピークとする発現振動を起こし、これが全身のリズムを引き起こすと考えられている(図1)。1998年Schiblerのグループは*rat1*線維芽細胞系に血清刺激を加えると、

約24時間の時計遺伝子の振動が認められるという事実を発見した³⁾。このリズムは¹⁾、*mPer1* mRNA, *mPer2* mRNAとPER1蛋白質、PER2蛋白質の発現差異が4-8時間あること²⁾、*Cry1*^{-/-}*Cry2*^{-/-}のダブルノックアウトマウスがリズム消失すること、*Cry1*^{-/-}が短周期を示すこと、*Cry2*^{-/-}が長周期を示すことなど、行動リズムと全く同じ変異を示した。行動リズムの性質は視交叉上核で完全に決定されるので、末梢臓器の時計も視交叉上核と同じ完全なサーカディアン時計があるといえる。

次に、この末梢時計が自律的なリズムを持つかどうか決定するため、視交叉上核を電気凝固の方法で破壊した後の、末梢臓器の末梢時計の時計遺伝子の発現リズムを経時的に免疫組織化学とノーザンブロットにて検索した。

3. 結果

3.1 マウス皮膚における時計遺伝子の発現のサーカディアンリズム

時計遺伝子*mPer1*, *mPer2*の皮膚における日周変動を、ノーザンブロットにて4時間毎、12時間明・12時間暗の明暗条件下で検索すると、著明な昼夜差が認められた。次に、これらの変化が、光刺激によるものか、内因性リズムによるものかを判別するため、恒常暗条件下で検索しても、

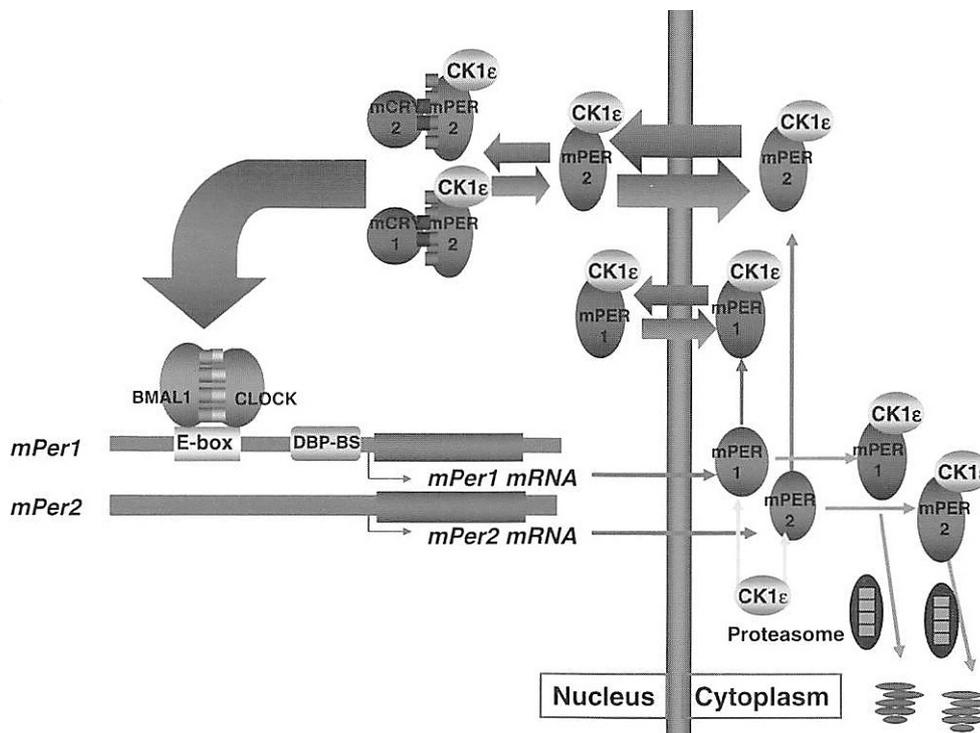


図1 哺乳類における時計のコア・ループ

時計遺伝子群のE-boxにCLOCK/BMAL1のヘテロ二量体が結合し、*mPer1*, *mPer2*転写を促進する。*mPER1*, *mPER2*はカゼインキナーゼIε (CKIε)によるリン酸化を受けた後分解されるため、蓄積するのに時間がかかる。核・細胞質にはシャトリング機構があり、これもPER2の核内移行に時間をかからせる原因である。核内では、PER2, CRY1, CRY2抑制性の複合体がCLOCK/BMAL1による転写の活性化を解除し、自分自身(時計遺伝子群)の転写を抑制することによりループが取れる。この繰り返しが約24時間の周期を作り出す。

著明な昼夜差が認められた (図2)。この結果は、皮膚にも内因性リズムが存在すること、時計のコア・ループによる発振が行われていることを示唆する。

3.2 マウス皮膚における時計遺伝子の発現のミクロ的解析

哺乳類時計遺伝子の中でリズム発振に最も重要な遺伝子と目される *mPer2* 遺伝子の産物である mPER2 蛋白質に対する特異的抗血清を用いて、皮膚におけるサーカディアンリズムを検索した。ケラチノサイトに時計遺伝子が体内時計の夜の時間に強く発現していることを見出した。これは、上記のノーザンブロットの結果とよく一致して、転写の増大は、時計蛋白質の増大を引き起こすことを示している。

3.3 時計遺伝子の転写制御機構

mPer1, *mPer2* の転写は、bHLH-PAS 蛋白質である CLOCK と BMAL1 のヘテロダイマーが *mPer1*, *mPer2* のプロモーターの E-box にポジティブ因子として結合して促進される (図1)。また *mPer1* プロモーターには、転写促進因子である PAR 蛋白質群 (HLF, TEF, DBP) と転写抑制因子である E4BP4 があり、D-box での競合制御が重要である。PAR 蛋白質は昼間に発現し転写を促進するが、E4BP4 は夜に発現し、転写を抑制した⁴⁾。

3.4 時計遺伝子の転写制御と時計蛋白質 PER2 の細胞内での時間的・空間的位置変化

PER1, PER2 の蛋白質分解は、MG132 で抑制され、MG132 で処理した PER2 はユビキチン化されていた。従って、PER2 分解にはユビキチン・プロテアソームが関与していると想定される⁵⁾。従って、転写のはじめの段階では、RNA はできても、蛋白質は次々に分解されて、いっこうに貯まらないという状態が続く (図3)。ところが、*mPer1*, *mPer2* の転写は刻々と増大し、PER1, PER2 蛋白質もたくさんできてくると、CKIε は一日中一定であるので、蛋白質をリン酸化し分解しきれない状態となる。リン酸化が時計ループの周期を決定する重要な過程であることはヒトでも示されている。最近米国の家系調査により、PER2 のリン酸化の障害を示す家系が、体内時計の周期が短いことで、時計遺伝子の転写フィードバックループの存在とリン酸化反応の重要性が劇的に証明された⁶⁾。

分解されなかった PER1 と PER2 は、PER3 等とダイマー形成し、自身の NLS (nuclear localization signal) を利用して、核内に移行する。ここで、第二の抑制遅延機構が存在する。それは、PER2 蛋白質内の NES (nuclear export sequence) による制御であり、核内から細胞外に PER2 蛋白質は排出される。このシャトリングは mPER2 (1-916) GFP を発現する NIH3T3 細胞と Hela 細胞の細胞融合系で

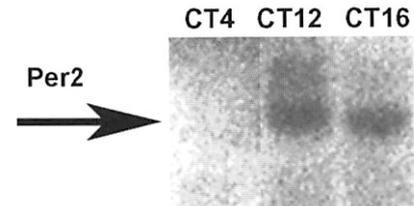


図2 皮膚の mPer2 mRNA 発現の昼夜差
恒常暗条件で、CT4 (体内時計の朝)、CT12 (体内時計の夕刻)、CT16 (体内時計の夜半) の時期での皮膚 mPer2 mRNA のノーザンブロットによる検出。

証明した⁵⁾。この NLS-NES によるシャトリング機構により PER1, PER2 蛋白質の核内濃度は調節される。

この核—細胞質間の平衡状態を打ち破るのが、核蛋白質 CRY1, CRY2 である。CRY1, CRY2 の核内出現は厳密に時間によりコントロールされているが、これが核内に多量になると、PER2 と結合し、安定な PER2-CRY1 及び PER2-CRY2 複合体を形成し、これがポジティブ因子に結合して引き剥がし、Per1, Per2 の転写を阻害する。これで時計発振のフィードバックループが閉じると考えられる。この PER2, CRY1, CRY2 による抑制を解除するのが、ユビキチン・プロテアソームによる分解である。この抑制因子の分解により、転写は再開される。

3.5 視交叉上核の中核時計が末梢臓器の末梢時計に与える影響

全身のマスター時計は脳の視交叉上核にある。最近我々は、Per1 プロモーター・ルシフェラーゼ (*mPer1-luc*) を導入したトランスジェニックマウスを開発し、細胞組織レベルで mPer1 の転写発現を可視化することで長時間リアルタイムで観察することに成功した^{7, 8)}。この *mPer1-luc* から取った視交叉上核のスライス培養系を極微弱光検出冷却 CCD カメラにて観察することにより、細胞一個一個のリズムを観察することが可能となった⁸⁾。この結果、驚くべきことに、視交叉上核の一つ一つは独立した細胞時計であり、各々のリズム位相は微妙に違い、最大では 10 時間ものピーク位相の格差が存在する。お互いの細胞時計は連絡しており、全体は絶妙なハーモニーを奏でて視交叉上核の強力な振動を生み出すことが明らかとなった。このような検出システムは、細胞内の遺伝子振動がいかにしてトータルとしての脳・生体機能である行動にまで至るかを解析する有力な実験系として、今後末梢組織のサーカディアンリズムの研究に広く用いられて行くであろう。

末梢組織では、血管平滑筋の時計遺伝子が非常に大きい振幅を持って振動すること⁹⁾、線維芽細胞でもペプチド刺激により時計遺伝子の 24 時間周期のリズムが数周期惹起された¹⁰⁾。従来リズム発振機能が全く無いとされてきた

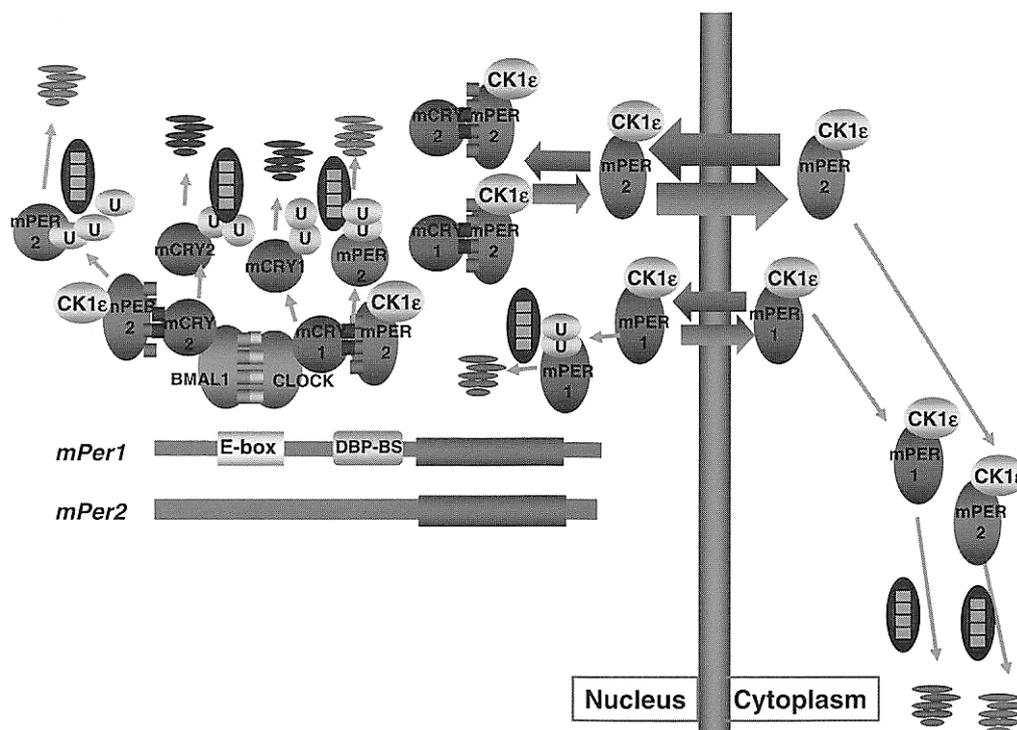


図3 哺乳類におけるコア・ループを構成する時計蛋白質の分解
 コア・ループの抑制機構を司る PER1, PER2, CRY1, CRY2 はユビキチン化されプロテアソームにより分解され、再びフリーとなった CLOCK/BMAL1 が E-box に再結合し、転写が再開する。

肝臓や胃腸などの末梢臓器にも、食餌に同調する、基本的な時計発振機構が備わっている¹¹⁾。では、視交叉上核と同様、末梢臓器の時計は自律発振能を持っているのだろうか？最近、リズム異常の線維芽細胞を正常の個体に移植してこの線維芽細胞の時計遺伝子発現を検索すると、正常のリズムを示すことがわかった¹²⁾。これは、末梢臓器の時計は自律振動能が弱く、中枢時計の支配下にあることを示している。今回、視交叉上核を破壊したマウスでは、末梢臓器のリズムは消失していた。

4. 考察

皮膚における発汗、皮膚血流、表皮細胞分裂など、さまざまな皮膚組織で起こる現象に概日リズムがあることがわかっているが、その詳細は未だ検索されていない。前記したように、この数年間で生体リズムの分子機構が次々に解明されつつあり、時計遺伝子の発振シグナルが、コレステロール合成酵素、アルブミン産生、各種ミトコンドリア酵素など生体機能のベーシックな遺伝子の転写をコントロールすることが知られている。

皮膚組織は、ケラチノサイトを中心とした表皮、線維芽細胞が主たる真皮、血管・神経の豊富な疎な結合組織である皮下組織よりなる。今回の検索で皮膚組織もサーカディアン振動体を持つことがわかった。細胞内のコア振動体は

細胞時計として働き、さまざまな細胞内プロセスに時刻シグナルを伝達する。時計シグナルにより転写レベルで制御されている遺伝子を被時計制御遺伝子 clock controlled genes (ccg) と総称しているが、この ccg が想定されているよりはるかに多く、少なくとも数百の遺伝子にのぼることは、最近のジーンチップ解析から明らかとなった¹³⁾。このコア・ループのシグナルが、これら遺伝子のリズムを引き起こす最初の機序は、やはり BMAL/CLOCK の E-box への結合だと考えられている。

CLOCK/BMAL1 ヘテロダイマーは vasopressin, dbp など多くの遺伝子が持つプロモーターの部位にある E-box に結合し、転写を増大させる。また、先ほど述べた、転写促進因子である PAR 蛋白質群 (HLF, TEF, DBP) と転写抑制因子である E4BP4 との DBP-bs での競合制御も重要である。PAR 蛋白質は昼間に発現し転写を促進するが、E4BP4 は夜に発現し、転写を抑制する⁴⁾。これにより、アルブミン、cholesterol 7 α hydroxylase、ドーパ脱炭酸酵素などの遺伝子が転写制御されると考えられる。夜に発現する多くの遺伝子は抑制性の転写因子 RevErba α によって引き起こされる。

多細胞生物において、非常に分化した多種類の細胞に時計機能が存在することは、その細胞に特殊化した機能にリズムがあることが想定される。ケラチノサイトにおいて

も各種酵素の発現の日内リズムはあるであろう。エネルギー代謝、膜蛋白の機能、さらに細胞周期のコントロールなど多くの必須の細胞機能に時計シグナルは利用されていると考えられる。

皮膚の細胞種のうち、どれがもっとも時計遺伝子の発振がなされているのかは、非常に重要な問題である。この解明により、皮膚の粘性、湿潤など、時間特異的な化粧品が開発が可能になるかもしれない。また、細胞増殖の時期やその制御因子がわかれば、紫外線などによる皮膚の障害に「時間特異的に」防護できる新しい方法が可能になるのかもしれない。リズム遺伝子が高いときは効率的な代謝変動になり、リズム遺伝子が低いときは非効率となる。したがって、時計遺伝子の転写変動が滞ると、代謝が低下し、細胞ダメージが増大する。従って、ストレスなどによるリズムの乱れが、代謝の滞りを引き起こし、細胞障害を急速に増大する可能性が高い。これを防止する化粧品の開発が可能かもしれない。

(文 献)

- 1) Okamura H, Yamaguchi S and Yagita K.; Molecular machinery of the circadian clock in mammals. *Cell Tissue Res.*, 309: 47-56, 2002.
- 2) Lowrey PL, Shimomura K, Antoch MP, et al.; Positional syntenic cloning and functional characterization of the mammalian circadian mutation tau. *Science*, 288, 483-492, 2000.
- 3) Balsalobre A, Damiola F, Schibler U.; A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell*, 93, 929-937, 1998.
- 4) Mitsui S, Yamaguchi S, Matsuo T, et al.; Antagonistic role of E4BP4 and PAR proteins in the circadian oscillatory mechanism. *Genes Develop.* 15, 995-1006, 2001.
- 5) Yagita K, Tamanini F, Yasuda M et al.; Nucleocytoplasmic shuttling and mCRY dependent inhibition of ubiquitination of the mPER2 clock protein. *EMBO J.*, 21, 1301-1314, 2002.
- 6) Toh KL, Jones CR, He Y, et al.; An hPer2 phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phase syndrome. *Science*, 291, 1040-1043, 2001.
- 7) Asai M, Yamaguchi S, Isejima H, et al.; Visualization of mPer1 transcription in vitro by luciferase mediated bioluminescence: NMDA induces a rapid phase-shift of mPer1 gene in cultured SCN. *Curr. Biol.*, 11, 1524-1527, 2001.
- 8) Yamaguchi S, Isejima H, Matsuo T, et al.; Synchronization of cellular clocks in the suprachiasmatic nucleus. *Science*, 302, 1408-1412, 2003.
- 9) Nonaka, H., Emoto N., Ikeda K., et al.; Angiotensin II induces circadian gene expression of clock genes in cultured vascular smooth muscle cells. *Circulation*, 104, 1746-1748, 2001.
- 10) Yagita K, Tamanini F, van der Horst GTJ, et al.; Molecular mechanisms of the biological clock in cultured fibroblasts. *Science*, 292, 278-292, 2001.
- 11) Hara R, Wan K, Wakamatsu H, et al.; Restricted feeding entrains circadian clock in the mouse liver without participation of suprachiasmatic nucleus. *Genes Cells*, 6, 269-278, 2001.
- 12) Pando MP, Morse D, Cermakian N, et al.; Phenotypic rescue of a peripheral clock genetic defect via SCN hierarchical dominance. *Cell*, 110, 107-117, 2002.
- 13) Panda S, Antoch MP, Miller BH, et al.; Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. *Cell*, 109, 307-320, 2002.