人間の体内リズムはなぜ起こるのか

Feasible Molecular Mechanisms for Human and Higher Animal Circadian Rhythm

1941年生。1967年九州大学農学研究科修士課程卒。現在、農林水産省畜産試験場生理部上席研究官、農学博士。共著「光バイオリズムストーリー」「UVと生物産業」など。

山田 眞裕
Masahiro Yamada

◀キーワード：概日リズム, Clock gene, 高等動物, 体内時計, 光環境, 代謝機能, 行動

1. はじめに

人間を含むいろいろな動物が生活している環境には多くの光放射が存在し、いろいろの光環境が動物の生理・行動・生態や進化などに顕著な影響をおよぼしてきたことは良く知られている¹⁾。これらの光環境と人間を含む動物の生理機能の一般的な関係は図1²⁾に示され、これらはともに地球の自転や公転および太陽の位置に依存した時間要因によって影響を受けている。このことは、朝、昼、夕、夜や日、週、月、年などの時間単位での動物のいろいろな生活サイクルからも明らかである。実際、人間の生活サイクルに関しても、生物時計、体内時計、バイオリズムなどの概念が醸成され、社会的な通念として容認されている。しかし、これらの概念は人間や動物の個体レベルでの生理機能や行動様式の表面的な観察の域に留まるものが多く、概念の実体、特に生理機能のリズム現象を引き起こし、さらに継続させる分子機構は依然として完全には解明されていないのが実情である。

最近、「Clock gene」(時計遺伝子)なる用語が動物

の代謝機能、脳科学、行動科学分野の科学雑誌に頻繁に出現している。このClock geneは、人間を含んだ動物の生理・行動・生態などにいろいろ関係し、動物が光環境の明暗変動に対応するための分子装置である生物時計の情報発信部分を構成すると考えられる³⁾。高等動物におけるいろいろな生体機能の概日リズム(Circadian rhythm)機構の形成と制御に関する遺伝子レベルでの解明は急激に進展しているので、Clock geneは従来の架空の概念から実際に存在する遺伝情報を所有した機能分子として報告されつつある。しかし、Clock geneの分子論的な実体は極めて複雑な分子機構であり、専門的な内容を多く含むので、自然科学、特に生物科学に関与している研究者や一般の人々にとってもあまり平易でなく、理解しがたい内容をかなり含んでいる。また、生体リズムの種類はリズムの周期の時間の長さによって区別される。1日は24時間であるが、 24 ± 4 時間周期のリズムを、ほぼ(circa)1日(dies)のラテン語にもとづいてサーカディアンリズム(Circadian rhythm)または概日リズムと呼び、人間や動物の多くの行動や生活様式がこれに入る。小動物の睡眠は60~90分の周期で繰り返されるが、このように 24 ± 4 時間の周期よりも短いリズムをウルトラディアンリズム、雌ラットの性周期は4、5日であり、 24 ± 4 時間周期よりも長いのでインフラディアンリズム、ほぼ1年周期の活動リズムをサーカニアルリズムと呼んでいる。いろいろな生体リズムのうちで、最も多く、かつ身近に感じられるものはサーカディアンリズムであろう。それゆえ、著者は課題「人間の体内リズムはなぜ起こるのか」に関して、生体リズム形成機構において中心的に重要な役割を果たすと思えるClock-geneの機能と性質およびサーカディアンリズム(概日リズム)に焦点を当て、人間を含んだ動物の行動・生理機能におけるリズム形成機構について述べる。

2. 生体リズムと生物時計の存在部位

バクテリアなどの単細胞生物から、人間などの高等動物に至るまでの多くの生物において、図2⁴⁾から図3⁵⁾に示されるように、いろいろな種類のサーカディアンリズム(概日リズム)が微生物から高等動物にわたって存在する。この概日リズムの発現は生物時計的作用によって制御され、これらの時計の存在場所は図4⁶⁾のように生物によって顕著に異なる。例えば、アメフラシなどでは

図1 高等動物における光受容器と繁殖・代謝機能の概要²⁾

眼が存在する神経節に生物時計が存在するが、昆虫では複眼と脳の中に位置する視葉に存在する。生物進化がすすみ脳機能が充実してくるにつれて、は虫類や鳥類では生体リズム形成機構における松果体の機能強化が行われはじめ、この松果体も生体リズムの発現を調節する生物時計としての重要な機能分担を行っている(図1)。高等動物の脳がさらに発達するに伴って人間を含む哺乳動物では頭蓋骨で脳を包囲し外部からの衝撃から防御するように進化したので、眼や脳幹の立体配置が効率よく整理され、主な生物時計は視交叉上核部位に局在するように変化している。実際、視交叉上核は動物の進化とともに発達し、主に眼や松果体およびその他の光受容体からの光情報を視神経をはじめとした関連神経群の興奮・発火現象として発現する経路を制御している⁷⁾。

3. 哺乳動物における視交叉上核 (SCN) の機能

哺乳動物を含む高等動物のサーカディアンリズム(概日リズム)は、脳視交叉上核 (Suprachiasmatic nucleus) (SCN) 上に存在する生物時計によって制御されている証拠が数多く報告されている。例えば、視交

差上核部位を外科的に摘出することによりいろいろな生理機能のサーカディアンリズムの発現が消失し、また、視交叉上核部位を摘出して他の個体に移植するとサーカディアンリズムの周期は移植した視交叉上核のリズム周期に従って変化した⁷⁾⁸⁾。これらのことは視交叉上核に存在する生物時計がサーカディアンリズム形成に必須であ

図2 生物発光遺伝子の移入によるシアノバクテリアの発光リズム⁴⁾

光合成系IIの *psbAI* 遺伝子のプロモーター (*PpsbAI*) 下流にルシフェラーゼ遺伝子 (*luxA luxB*) を連結し、シアノバクテリア *Synechococcus* sp. PCC7942のゲノムに組み込む。生物時計が *PpsbAI* の活性を制御するので、ルシフェラーゼ量の変動し、基質デカナルを与えれば、生物発光の概日リズムを示す。この概日リズムは周期が温度補償されており、位相が光条件でリセットできる。即ち真核生物と同じ性質を持っている。なおオリジナルの *PpsbAI* は無傷であるので成育は野生型と変わらない。発光強度は相対値で示してあるが、極めて弱く、ヒトの目の感度の1万分の1以下である。

図3 継続的な暗黒照明における正常および突然変異種ショウジョウバエの羽化リズム (文献5より引用・改変)

(a)対照 (24時間周期) 群, (b)無周期群, (c)短周期群, (d)長周期群。
横軸：時間 (日), 縦軸：単位時間あたりの羽化数

図4 眼から脳へと移行した生物時間⁶⁾

ることを示している。しかし、高等動物のサーカディアンリズム形成機構が視交叉上核の機能に依存することは予測されても、秒、分、時、日、週、月、年などの具体的な時間単位の決定機能がどんな情報要因によって制御され、個体の機能として発揮されるのかは明確でない。最近、視交叉上核の時計細胞 (Clock Cell) による機能発現機構が提唱されている⁸⁾。

4. Clock gene (時計遺伝子)

Clock gene が現実的な物質として実証されさらに遺伝情報物質としての塩基配列が詳細に決定されて、科学雑誌 CELL に報告されたのが1997年秋である。それ以前には染色体や生体レベルでの研究報告が主流を占めていた。また、Clock gene に相当する遺伝物質は微生物から人間に至るまでの多くの生物種に存在し、さらに生物が生存する外部環境に適応可能な機能を保持した特異的な形態で存在することが推察されてきたが、これらの遺伝物質の基本構造 (塩基配列) の相互比較によってかなりの相同性が認められることが明らかになりつつある⁹⁾⁻¹²⁾。

4.1 Clock gene の種類

臓器・器官に特異的な Clock gene の存在を考慮すると、Clock gene の種類は少なくとも生物種の数以上は存在すると考えられる。また、機能的に類似した生物時計が多く存在し、Clock gene の塩基配列の側面では構造的に相同的なものも多く認められることから、基本的には同質の Clock gene が生物界にはかなり存在するものと推察されている。生物種に特異的ないろいろの Clock gene の名前が提唱されているが、分子生物学的な解析が

進展するに伴って遺伝子間の構造および機能的相同性が証明され、近い将来 Clock gene の種類は整理統合されるであろう。最近急激に解析が進行している Clock gene としては、シアノバクテリア (Synechococcus) の kaiA, kaiB, kaiC, アカパンカビ (Neurospora) の frq, wc-1, wc-2, ショウジョウバエ (Drosophila) の変異株遺伝子 (per, tim), dbt, cyc, clk (jrk), マウス (Mouse) の per1, per2, per3, tim, clock, bmal1/mop3 gene およびハムスター (Hamster) の tau などである¹³⁾⁻¹⁸⁾。

4.2 サーカディアンリズム (概日リズム) に関する実証論的研究方法の展開

サーカディアンリズム (概日リズム) の形成および制御機構に関係している Clock gene の機能解明のためには、第一段階として、動物個体レベルでの概日リズムの存在の確認、第二段階として、明確なリズムの変異を示す動物群の作出、第三段階として、clock gene の機能および構造解析が重要である。事実、ショウジョウバエ、マウス、ハムスターなどを用いた研究では行動変異種の探索と人為的作出および作出系統の維持と多量生産が実施されてきた。変異株が多く、生理形質の遺伝的背景が比較的詳細かつ具体的に解明され、実際の個体実験に用いられているショウジョウバエの場合においては、Konopka and Benzer (1971) は Ethylenemethane sulfate (EMS) を用いることにより、図3のように対照群 (24h cycle) から短周期 (19h cycle)、長周期 (28h cycle)、無周期の3変異種を作出し、これらの行動変異種は X 染色体の特定部位の機能欠損に由来することを明らかにした⁹⁾。その後においてもショウジョウバエを用いた Clock gene の研究は鋭意継続され、遺伝子 per, tim などの機能を解明し、現在も尚、先導的な役割を担っている。

次に、高等な哺乳動物に関しては、米国の J. Takahashi グループは DNA 核酸の塩基配列に関して point mutation を誘起する N-Ethyl-N-Nitrosourea (ENU) を雄マウスに処理して、図5⁹⁾のように雌マウスと交配させ第1世代を作出した。この第1世代のマウス304頭のうちで、303頭のマウスが平均23.8時間の行動周期を示すのに対し、特定の1頭のマウスが1時間以上長いリズム周期 (24.8h) を示すことが見出された。この個体を繁殖・選抜用の開始基礎個体とし、戻し交配などと組み合わせたスクリーニングが実施された。その結果、暗黒 (暗期) の中で24.8時間の行動周期を示すマウスの系統が確立された (図5)⁹⁾。このマウス集団には +/+、clock/+、clock/clock の遺伝子型を示すマウスが存在するので、分子生物学的手法を用いておのおのの遺伝子型マウスの行動周期に関する生理的特徴および各遺伝子の機能と構造が詳細に研究されている。

4.3 構造

現実的に機能的な Clock gene として単離され、その一次構造が解明されたものは King らによって1997年に報告されたマウスの Clock gene である⁹⁾。この遺伝子はマウスの第5染色体上に存在し、図 6(a)に示すような24個の遺伝情報発現領域 (exon 領域) を持ち、ゲノム全体として約100000塩基対で構成された DNA であり、重要な遺伝形質発現領域の産物として855個のアミノ酸が

図5 ENU 処理マウスでの長周期行動リズムの系統の作出と行動パターンの解析 (a)作出法, (b)野生型 G 1 世代の雌の行動パターン, (c)304頭の G 1 世代における行動パターンの分布, (d) G 1 の NQ.25マウスの行動パターン, (e) G 2 世代での行動分布, (f) G 2 世代の雄マウスの行動パターン (文献 9 より引用・改変)

連結した Clock protein (時計タンパク質) を翻訳・合成する情報を保持している。さらに、この突然変異種 (clock/clock) の DNA 配列はある特定部分の欠落のため、野生型の DNA 配列よりも少し短い。この塩基配列の骨格はショウジョウバエの dClockgene と極めて相溶性が高い。特に、生理機能の発現に関して、遺伝子産物のタンパク質が結合する部位である basic Helix Loop Helix (塩基性 HLH) や PAS A および PAS B 領域の相溶性がいろいろの生物間で高いことが最近報告された。この事実は遺伝子機能を解明する研究集団にとっては非常に興味深いし、生物種による遺伝子の多様性をあまり考慮しなくてもよいことを示唆するので、Clock gene を構成している分子装置の共通的な理解と解析にとって構造の類似性は非常に便利である。いろいろの生物種の間で共通する遺伝情報物質の存在から、共通的な生物進化の過程と機能分子の保存機能が実際に発生したことが興味深く推察される。

マウス Clock gene には、野生型 (wild/wild) と突然変異種 (clock/clock) の存在が報告されている。両者の間には遺伝子の構造に関して何らかの差が存在すると予測され、詳細な構造解析がなされた結果、特定部位での塩基配列が異なっていることが明らかになった。例えば、第18exon の特定部位では野生型の塩基 A (アデニン, A) が clock/clock では塩基 T (チミン, T) に変化していた。

最近見出されたショウジョウバエの dClock gene は 1015個の塩基から構成されていて、bHLH, PAS A, PAS B などの塩基配列順序においてマウスの mClock gene と良く似ている。これらの事実は生物進化の過程において Clock gene が種を越えて多くの生物に強く保存されていることを示している⁹⁾⁻¹⁵⁾。

図6 時間遺伝子の構造⁹⁾ (a)時計遺伝子 (Clock gene) の cDNA clone と (b)時計タンパク質 (Clock protein) のアミノ酸配列。

4.4 機能発現機構

動物のサーカディアンリズムの現象はいろいろの生理機能や生理形質において見られるが、そのリズム形成における Clock gene の発現は個体、器官・臓器、細胞、分子レベルで観察される。高等動物での遺伝子発現機構は「遺伝子 DNA → (転写) → mRNA → (翻訳) → タンパク質合成 → 生理機能の発現」の過程を経由することが一般的である。この過程において一定の時間単位で周期性のあるリズムを生ずることが「体内リズム」の形成には必要である。体内における一連の生理反応のダイナミックスを解くには非平衡熱力学なども応用可能であるが、リズムの形成にはリズムの変化量の最大値 (山) および最小値 (谷) が存在し、この両者間で生体反応が周期性を示すことが重要である。このリズムの形成機構は product inhibition にもとづいたフィードバック制御方式で説明可能なので、細胞レベルでの遺伝子発現に関与する分子間相互作用が基本的な制御機構として最も重要であると思える。哺乳動物における Clock gene の発現機構は図 7¹³⁾のように要約される。図 7 の(a), (b), (c)に示されているように、いろいろの遺伝子 (DNA) 群と関連する代謝成分としてのタンパク質群 (CLOCK, TIM, PER など) との相互作用の結果として細胞レベルで最初に、次に細胞から器官レベルでの制御を経由して徐々に高次レベルでの発現と進展し最終的には個体レベルでのリズム現象が観察される。これらの分子間相互作用を Clock gene と Clock protein との相互作用に焦点を合わせてまとめたものが図 8¹⁹⁾である。

ヒト、マウスおよびショウジョウバエの Clock gene はともに bHLH-PAS 領域を持っているので、転写因子 (dCLOCK と dBMAL1タンパク質) との結合が可能であり (図 8), 実際、dCLOCK と dBMAL1がヘテロ 2 量体を形成し、Clock gene (per, tim) の上流に存在するサーカディアン エンハンサー (CE) の E-box (CACGTG) への結合が Clock gene の機能発現 (転写開始) を引き起こす。遺伝子の発現 (転写機能の強化あるいは継続) により産物 (PER, TIM) の濃度が増加する。これらの産物の増加期がリズム現象の立ち上がりから最高値に達する時である。産物 (PER, TIM) の濃度あるいは量は無限大に増加することではなく、ある濃度に達すると PER と TIM との複合体が形成され、図 8 に示すようにこの複合体が E-box 領域へ結合することにより転写促進活性の阻害を引き起こす。この PER-TIM 複合体による阻害が継続すると細胞中の TIM あるいは PER の濃度が減少するので、リズム現象の減少面が形成される。この後、再度、転写因子 (dCLOCK と dBMAL1) が E-box に結合可能となり、リズムの増加面を形成する過程が生ずる。事実、この制御機構の機序に焦点を合わせ、具体的な結合分子の性質および作用機構についての詳細

図 7 ショウジョウバエや哺乳動物でのリズム関連時計遺伝子群の動きと光による調節機構 (a) per1, per2, per3, tim, clock および bmal 遺伝子の動態, (b) 光による生物時計のリセット, (c) 哺乳動物における概日リズムの制御 (文献13より引用・改変)

図 8 PER と TIM による dCLOCK-dBMAL1転写因子の制御とリズム形成 (文献19より引用・改変) ショウジョウバエの dCLOCK (●), dBMAL1 (◆), タンパク質はヘテロ二量体を形成し転写因子として機能するらしい。その作用部位は per, tim 遺伝子上流にある E-box 配列である。翻訳された PER (▲), TIM (■) タンパク質は複合体をつくり核内へ移行し、dCLOCK-dBMAL1転写因子の活性を阻害し、日周変動ループを形成している。

な検討が鋭意なされつつある¹⁷⁾¹⁸⁾。このように Clock gene などの遺伝子の機能発現と産物である PER, TIM, CLOCK などのタンパク質との相互作用により図 7 および図 8 に示すようなリズム現象が形成され、このリズム周期の時間単位が24±4 時間であるとサーカディアンリズム (概日リズム) となる。

5. 将来展望

現代社会では高度な照明技術の普及が進み、いろいろの照明環境の造成が可能になり、さらには、交通・情報手段の高速化が進展しているので、生物の体内リズムは極めて容易に乱されやすい状況に曝されていると言える。このような社会環境で生活および生産活動を継続している高等動物、特に、人間は自己の生活サイクルを上手にコントロールすることがますます重要になってきて

いる。その理由としては、人間の生活環境において睡眠や覚醒などの基本的な生理機能のサイクル維持に対してそれを乱す可能性の大きい刺激要因がますます増加しているからである。分子レベルから個体レベルまでのいろいろな生体情報を集積し、これらを適切に組み合わせておのおの機能を発揮している高等動物²⁰⁾、特に人間の健全な生活リズムを長期に維持するには、時計遺伝子 Clock gene が正常に機能するようにいろいろの手段を用いて工夫することが必要である。そのためには人間の光受容機構と脳機能に関連した Clock gene の発現機構や生体全体の制御機構との関係が生理学的に詳細に解明されることが望まれるが、かなりの時間がかかるであろう。そこで、当面の応用可能な具体的方策として各自の生活リズムに適した時間帯に 1 日当たり最低 1 回明暗周期の操作を組み込むことが必要である²⁾³⁾¹³⁾¹⁸⁾。組み込み方法については今後の詳細な検討が望まれる。

参考文献

- (1) 山田眞裕：高等動物と光放射，光バイオインダストリー（照明学会編），オーム社，pp.43-67（1992）。
- (2) 山田眞裕：動物と照明，照学誌，Vol.80-10，pp.746-750（1996）。
- (3) 山田眞裕：Clock gene—動物における時間遺伝子の構造類似性と生理的意義，照学大全，pp.266-267（1999）。
- (4) 近藤孝男・石浦正寛：概日時計の分子機構（シアノバクテリアの時計遺伝子），科学，68号，pp.138-143（1998）。
- (5) Konopka, R. J. and Benzer, S. : Clock mutants of *Drosophila melanogaster*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 68, pp.2112-2116（1971）。
- (6) 長谷川建治・塚原保夫：生物の“時間”の意味するもの，科学，68号，pp.124-132（1998）。
- (7) Klein, D. C. et al. : The mind's clock, New York : Oxford University Press, (1991)。
- (8) Liu, C. et al. : Cellular construction of a circadian clock, Cell, 91, pp.855-860（1997）。
- (9) King, D. P. et al. : Positional cloning of the mouse circadian clock gene, Cell, 89, pp.641-653（1997）。
- (10) Allanda, R. et al. : A mutant *Drosophila* homolog of mammalian clock disrupts circadian rhythms and transcription of period and timeless, Cell, 93, pp.791-804（1998）。
- (11) Gekakis, N. et al. : Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism, Science, 280, pp.1564-1568（1998）。
- (12) Darlington, T. K. et al. : Closing the circadian loop : CLOCK induced transcription of its own inhibitors per and tim, Science, 280, pp.1599-1603（1998）。
- (13) Dunlap, J. C. : Molecular bases for circadian clocks, Cell, 96, pp.271-290（1999）。
- (14) Young, M.W. : The molecular control of circadian behavioral rhythms and their entrainment in *drosophila*, Ann. Rev. Biochem, 67, pp.135-152（1998）。
- (15) Vitaterna, M.H. et al. : Mutagenesis and mapping of a mouse gene, clock, essential for circadian behavior, Science, 264, pp.719-725（1994）。
- (16) Dunlap, J.C. : Genetic and molecular analysis of circadian rhythms, Ann. Rev. Genetics, 30, pp.579-601（1998）。
- (17) Rutila, J.E. et al. : Cycle is a second bHLH-PAS clock protein essential for circadian rhythmicity and transcription of *Drosophila* period and timeless, Cell, 93, pp.805-814（1998）。
- (18) Jin, X. et al. : A molecular mechanism regulating rhythmic output from the suprachiasmatic circadian clock, Cell, 96, pp.57-68（1999）。
- (19) 体内時計はどのように時をきざむか，現代化学，No.330，pp.10-11（1998）。
- (20) 山田眞裕：畜産領域における生体情報の利用，農業における新しい情報化技術（農業電化協会編），農業電化協会，pp.147-176（2000）。