【教育講座】

生物時計による骨格筋機能制御

宮 崎 充 功^{1~4)}

THE CIRCADIAN CLOCK AND SKELETAL MUSCLE FUNCTION

MITSUNORI MIYAZAKI

Abstract

Circadian rhythms are approximate 24-hour biological cycles that synchronize the timing of an organism's behavior and physiology to daily environmental changes. This endogenously generated temporal coordination has been experimentally shown to provide an adaptive advantage by enhancing an organism's ability to anticipate daily changes in light, temperature and humidity etc. The molecular mechanism responsible for generating circadian rhythms is a highly conserved gene regulatory network composed of transcriptional-translational feedback loops referred to as the Core-Clock. In mammals, the proteins encoded by Core-Clock genes, Bmal1 and Clock, dimerize to drive transcription of Period and Cryptochrome and the protein products of these genes down-regulate BMAL1 and CLOCK function. BMAL1:CLOCK heterodimers also transcriptionally regulate a group of genes referred to as clock-controlled genes which are believed to be necessary for maintenance of normal cell physiology.

In this review, the bases of the circadian rhythms regulation in the central/peripheral tissues are discussed. Particular emphasis has been placed on understanding of circadian regulation of skeletal muscle structure and function. Recently, tissue-specific circadian transcriptome including MyoD1, which is the well-known myogenic lineage regulator, were identified in skeletal muscle. Understanding the molecular, physiological and biophysical mechanisms through which the Core-Clock genes and the tissue-specific circadian transcriptome maintain skeletal muscle structure/function is of great significance with broad translational implications associated with chronic disease, metabolic failure and disuse.

(Jpn. J. Phys. Fitness Sports Med. 2010, 59 : 233~242)

key word : Circadian Rhythm, Core-Clock, Bmal1, Clock, MyoD1

概日リズムとは

サーカディアン (Circadian) という単語はラテン語の*Circa*および*Diem*に由来し、それぞれ英語で*around*および*day*を意味する。つまりサーカディアンリズムとは、約24時間/約1日周期で振動する生物学的サイクルを意味し、日本語では概日リズムと表現される。この地球の自転周期にほぼ等しい約24

時間を1周期とする概日リズムは、生物進化の初期段階に獲得された生命機能であると考えられており、シアノバクテリアなどの原核生物からヒトを含む高等動物に至るまで、地球上に存在するほぼ全ての生物種に共通して存在する非常に高度に保存された生物システムである。特に人間をはじめとする哺乳類においては、睡眠・覚醒をはじめとする多くの生理的機能が、生物時計システムの発振する概日リ

¹⁾ケンタッキー大学医学部生理学部門、筋生物学センター

²⁾早稲田大学総合研究機構スポーツ科学未来研究所

³⁾札幌医科大学保健医療学研究科

⁴⁾日本学術振興会・特別研究員PD

Center for Muscle Biology, Department of Physiology, College of Medicine, University of Kentucky, Lexington, Kentucky, United States of America

Future Institute for Sports Science, Comprehensive Research Organization, Waseda University, Tokyo, Japan

Graduate School of Health Sciences, Sapporo Medical University, Sapporo, Hokkaido, Japan

Research Fellow of the Japan Society for the Promotion of Science, Tokyo, Japan

ズムと直接的にリンクしている^{1~3)}。この生物時計システムの存在は、海外渡航といった経度上の長距離移動に伴う睡眠および消化器系の失調、いわゆる「時差ボケ」として体感されることが多い^{4,5)}。人間の場合、睡眠・覚醒サイクルに限らず、血圧や心拍数の調節、糖代謝能、体温調節やホルモン分泌など多くの生理機能に明らかな日内変動が観察される^{6~9)}。またそれ以外にも、心筋梗塞をはじめとする急性冠症候群は早朝に多く発症することが臨床的に知られており¹⁰⁾、また薬物代謝能にも明らかな日内変動が認められるなど、効果的なドラッグデリバリーといった医療応用面からも注目を集める分野である¹¹⁾。

中枢時計と末梢時計

哺乳類における生物時計システムの支配中枢は視床下部の視交叉上核 (SCN: suprachiasmatic nucleus) に存在し、個体全体の概日リズムサイクルを規定するペースメーカーとしての役割を有している。視交叉上核を含む中枢神経領域を破壊した場合、睡眠・覚醒サイクルや活動リズム、ホルモン分泌や体温調節などあらゆる概日リズムシステムが失われてしまう^{12~14)}。一方SCNを破壊された個体に他の個体のSCN領域を移植した場合、これらの概日リズムシステムが回復されることなどから^{15,16)}、SCNは個体全体の概日リズム制御の支配中枢 (中枢時計) であると考えられている。概日リズムに関する研究の中で、特に哺乳類においてはSCNが唯一の概日リズム振動の制御体であり、その他の末梢組織で観察される様々な生理的現象の概日リズム変化はSCNに完全に依存していると考えられてきた (Master-Slave relationship)。しかしながら、哺乳類の培養細胞を比較的高濃度の血清などで刺激すると、後述する時計遺伝子の発現リズムを誘導することができること^{17,18)}、個体から取り出した各臓器を個別に組織培養しても、時計遺伝子の発現リズムが一定期間維持されることなどから^{19,20)}、ほとんどの末梢臓器でも時計遺伝子がリズムミッドに発現していることが明らかとなってきた (末梢時計)²¹⁾。このようにSCNの神経細胞も末梢組織細胞も、本質的には同様のリズム制御機構を備えているようである。現在のところ、概日リズム制御におけるSCN (中枢時計) とその他の末梢組織 (末梢時計) との関係は、その生理的役割からしばしば

オーケストラの指揮者と奏者の関係に例えられる。つまり、リズム発振の分子機構は個々の細胞内に共通して存在するが、各末梢組織に存在するそれぞれの分子時計 (各パートの奏者) は階層的に集合し、SCN (指揮者) が概日リズム制御の上位中枢としてこれらを統合・同調させることで、個体としてのより大きなリズム発振機構が形成されている。(図1)

細胞内分子時計 (Molecular Clock)

概日リズム制御の分子機構に関する研究は、1997年に哺乳動物における時計遺伝子が発見されて以来大きな進展を見せた。Takahashiらの研究グループは、ゲノム上にランダムに遺伝子変異を導入させ、恒暗条件下での行動リズムに異常を示すマウス個体をスクリーニングするといういわゆる順遺伝学的方法により、哺乳類で最初の時計遺伝子であるClock (Circadian locomotor output control kaput) のクローニングに成功した^{22~24)}。また同年にはBmal1 (Brain muscle arnt-like 1) やPeriod (Per1/2/3) といった時計遺伝子も相次いで発見されている^{25~28)}。その後の急激な研究分野の発展に伴い、現在までに細胞内分子時計の発振を制御する基本的なメカニズムとして、時計遺伝子の転写および翻訳を介した正負のフィードバックループの存在が明らかとなっている^{29,30)}。

哺乳動物における分子時計システムの正の制御ループは、bHLH-PAS (Per-Arnt/AhR-Sim basic helix-loop-helix) 型転写因子のBmal1およびClockにより構成されている。転写因子であるBmal1およびClockは、タンパク質へと翻訳された後にヘテロ複合体を形成し、Per やCryptochrome (Cry1/2) といった時計遺伝子の転写調節領域に存在するエンハンサー配列 (E-box; CANNTG) に結合し、これらの遺伝子の転写活性を促進する^{25,31~34)}。次いで、これらの遺伝子の翻訳産物であるPERおよびCRYタンパク質は、負の制御因子としてCLOCK:BMAL1複合体による転写促進活性を抑制するため、結果的に自らの遺伝子転写を負に制御するネガティブフィードバック機構が成立する^{34~36)}。これら時計遺伝子の転写および翻訳を介した正負のフィードバックループを総称し、コアクロック (Core-Clock) と名付けられている (図2)。このような基本的なフィードバック機構に加えて、各因子のmRNAやタンパク

Fig. 1. The synchronization of central and peripheral clock

The suprachiasmatic nucleus (SCN) of the hypothalamus is the central clock and is considered as the “pacemaker” based on its role in controlling the daily rhythms of organism’s physiological functions including blood pressure, body temperature, glucose metabolism and physical activity. In addition to the SCN, components of the molecular clock have also been identified in peripheral tissues such as the liver, heart and, more recently, skeletal muscle (peripheral clock). In mammals, the synchronization of the system’s clocks is orchestrated by the central clock through neurogenic and/or humoral mechanisms.

Fig. 2. Core Clock; the molecular mechanism regulating circadian rhythms

The molecular mechanism regulating circadian rhythms is described as a network composed of transcriptional-translational feedback loops and is referred to as the core clock. The positive loop of the core clock is formed by two members of the bHLH-PAS (Per-Arnt/AhR-Sim basic helix-loop-helix) family of transcription factors, Clock and Bmal1. The CLOCK:BMAL1 heterodimer activates transcription of additional core clock genes Period and Cryptochrome. The CRY and PER proteins constitute the negative loop of the core clock by forming a multimeric complex that inhibits CLOCK:BMAL1 activity upon translocation to the nucleus. Components of the core clock have also been shown to regulate the expression of genes outside the core and these genes are designated as clock-controlled genes.

質の合成・分解の時間的バランス³⁷⁾, 核内-細胞質間における空間的移行³⁸⁾, その他の時計遺伝子 (Rora; RAR-related orphan receptor alpha, Rev-erb α/β など) によるサブループ形成の影響^{39~41)} など多くの要因が巧みに共役し, これら全体の制御システムが24時間をかけて1サイクルすることにより, 細胞内の概日リズム振動が生じると考えられている。

各末梢組織における時計遺伝子発現レベルの変化の一例として, 骨格筋 (腓腹筋), 心筋 (左心室) および肝臓における Bmal1 (正の制御因子) および Per2 (負の制御因子) 遺伝子発現の経時変化の様子を図3に示した。Bmal1 および Per2 のどちらの遺伝子発現レベルも24時間周期の明らかな概日リズム振動を示しているが, 正の制御因子である Bmal1 遺伝子の発現レベルが Circadian Time (CT) 22 から CT26 (および24時間後の CT46-CT50) にピークを示すのに対し, Bmal1 による転写促進活性を負に制御する Per2 の遺伝子発現レベルの変化は, Bmal1 と全く逆の位相を示している (腓腹筋)。また興味深いことに, 各時計遺伝子の24時間周期の変化は, 骨格筋や心筋, 肝臓といったそれぞれ異なる末梢組織においても, ほぼ同期した発現パターンが確認できる。このよう

Fig. 3. Expression pattern of core clock genes in peripheral tissues

The expression levels of circadian genes were examined in peripheral tissues in Wistar-Kyoto male rats (6 wks of age). The rats were entrained to a 12 hour light: 12 hour dark cycle for 2 weeks and then placed in constant darkness for 30 hours. Skeletal muscle (gastrocnemius), cardiac muscle (left ventricle) and non-muscle tissue (liver) were collected every 4 hours for 40 hrs, totally 10 time points (N=3 for each time point). Expression of core clock genes, Bmal1 and Per2, were analyzed using real-time quantitative PCR. Expression pattern of both Bmal1 and Per2 genes had a very clear circadian pattern. In contrast, the phases for peak expression of the components of the core clock mechanism (Bmal1 and Per2) were completely opposite in muscle and liver tissue of rats.

に、時計遺伝子による24時間周期の概日リズム発振はそれぞれ個別の組織に共通して確認されるが、一方で各末梢組織における概日リズムの発振パターンは上位中枢 (SCN) により時間的に同調され、個体

全体として一つの時計発振機構を形成していることがわかる。

骨格筋特異的概日リズム遺伝子

Bmal1やClockといった時計遺伝子に加え、コアクロックによって直接的に制御される遺伝子群を総称し、時計遺伝子のアウトプットとしてClock Controlled Genes (CCGs)と呼ばれている。この中には、Dbp (D-site albumin promoter binding protein) や Tef (thyrotroph embryonic factor), Hlf (hepatocyte leukemia factor) など約10数種類の遺伝子が、各組織に共通して発現するCCGsとして確認されている^{42~44}。またこれに加えて、近年急速に発展したDNAマイクロアレイ技術およびバイオインフォマティクスを応用した網羅的遺伝子発現解析の結果、脳や肝臓をはじめとする様々な組織において、全トランスクリプトームのうち数パーセントの遺伝子の発現パターンが、24時間周期で変動する概日リズム振動を示すことが報告されている^{45~50}。特筆すべきことに、これら様々な組織における概日リズム遺伝子の発現には非常に強い組織特異性が認められ、各末梢組織の生理学的特性を規定する可能性が示唆されている。

McCarthyらは、特に骨格筋における組織特異的概日リズム遺伝子の同定を目的に遺伝子発現プロファイリングを行い、Bmal1をはじめとするコアクロック遺伝子に加えて、計215遺伝子を骨格筋特異的概日リズム遺伝子として特定した⁵¹。そのうち、21%の遺伝子は脂質・タンパク質代謝に関連するもので、また18%は転写因子、15%は細胞内情報伝達系に関連するものであった。この骨格筋特異的概日リズム遺伝子群の中には、E3ユビキチンリガーとして骨格筋タンパク質分解に関与するAtrogin1やMuRF1 (muscle-specific RING finger protein 1)^{52,53}、骨格筋エネルギー代謝やミトコンドリア産生に関与するPgc-1 β (peroxisome proliferative activated receptor, gamma, coactivator 1 beta), Pdk4 (pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 4) やUcp3 (uncoupling protein 3)^{54~56}、収縮タンパク質の一つであるMyh1 (myosin heavy chain II d/x) など、骨格筋機能の制御・維持において非常に重要な役割を果たす諸因子の遺伝子が含まれていた。それに加えて、骨格筋特異的概日リズム遺伝子の中でも特に興味深いことに、

骨格筋分化調節因子であるMyoD1(myogenic differentiation 1)の遺伝子発現パターンも明らかな概日リズム振動を示していた。一方MyoD1を除くその他の筋分化調節因子ファミリー(myogenin, myf5, mrf4)の遺伝子発現パターンは、概日リズム振動を全く示していない。またClock遺伝子変異マウスを用いた検討では、骨格筋におけるMyoD1遺伝子の概日リズム発現パターンは完全に消失していたことから、コアクロック遺伝子BMAL1:CLOCK複合体が、骨格筋におけるMyoD1遺伝子発現の概日リズム振動を生み出していることを強く示唆している(図4)。

MyoD1はbHLH型転写因子の一つであり、線維芽細胞から筋芽細胞への分化を決定する筋分化調節因子として知られ、骨格筋の分化・形成過程において必須の転写因子である^{57,58})。近年Caoらの報告により、数百種類の遺伝子が骨格筋細胞(C2C12 myoblasts)の分化過程における転写因子MyoD1のdirect binding targetsとして特定された⁵⁹)。またMcCarthyらは、Clock遺伝子変異マウスの骨格筋における遺

伝子発現の網羅的解析を行い、約2000種類の遺伝子が野生型に比較し発現抑制されることを確認している⁵¹)。興味深いことに、この2種類のデータベースに共通する遺伝子群の中に、Troponin Cやmyosin heavy chain II, myosin light chain I, II, IIIといった骨格筋の構造および収縮調節タンパク質の遺伝子が多く含まれていた。それに加え、TitinやNebulinといった横紋筋特異的構造タンパク質の遺伝子発現が、Clock遺伝子変異マウスの骨格筋において有意に抑制されることも確認している⁵¹)。これらの知見は、コアクロック遺伝子BMAL1:CLOCKおよび骨格筋特異的概日リズム遺伝子MyoD1による遺伝子発現調節システムが、成熟骨格筋収縮機構の形成および機能維持において中心的な役割を担っている可能性を強く示唆している。さらに筆者の所属する研究室では、電子顕微鏡による骨格筋微細構造分析の結果、概日リズム遺伝子変異マウス(Clock mutant, Bmal1^{-/-}, MyoD1^{-/-})の骨格筋においてZ-bandの歪みや暗帯の拡散、アクチン/ミオシンフィラメントの配列不全など、明らかなサルコメアの横紋構造異常を観察している(未発表データ, Skeletal Muscle Biology Laboratory, Dr. Karyn A. Esser, University of Kentucky)。以上の結果は、骨格筋の構造・収縮調節タンパク質の遺伝子発現が抑制されるという上記の遺伝子発現プロファイリングの結果と一致し、概日リズム遺伝子の変異によって筋原線維微細構造の異常が引き起こされ、発揮張力の低下など骨格筋収縮機構の機能不全が生じる可能性を示唆している。現在まで、骨格筋細胞の分化過程におけるMyoD1の重要性は明らかであるが、一方で成熟骨格筋におけるMyoD1の役割についてはほとんど解明されていない。今後、概日リズム遺伝子を介したMyoD1の転写制御機構の詳細を明らかにすることで、成熟骨格筋における筋組織の恒常性維持や筋機能制御機構の解明が強く期待される。

末梢組織における概日リズム同調の制御機構

これまで哺乳類における概日リズム制御の基本的概念として、視床下部のSCNが概日リズムの中核であり、ホルモン・サイトカイン分泌といった液性因子、および神経支配を中心とする電気的シグナルを介して各末梢組織の細胞内リズムを同調すると考えられている^{60~65})。しかしながら、末梢骨格筋細胞

Fig. 4. MyoD1 expression is non-rhythmic in skeletal muscle of Clock mutant mice

The MyoD1 transcript was identified as having a robust circadian pattern of gene expression. As with many of the circadian genes involved with transcription, MyoD1 peak expression occurred during subjective night at CT18 and CT42. In contrast, none of the other myogenic regulatory factors including Myf5, MRF4 and myogenin exhibited circadian pattern of expression. The circadian expression of MyoD1 transcript was significantly dampened in the muscle of Clock mutant mice. These results suggested that regulation of cyclic MyoD1 transcription might be under direct control of the core clock genes, CLOCK and BMAL1. (This figure was modified from the literature of McCarthy et al., 2007, *Physiol Genomics* 31, 86-95)⁵¹)

における概日リズムシステムがSCNからどのような制御機構を介して同調されているのかは、現在のところ全く未解明である。近年Guoらは、SCN領域を外科的に破壊したSCN-lesionedマウスと、侵襲を受けていない正常なSCN-intactマウスのparabiosisモデル（併体接合モデル：個体間の循環器系を接合し、血液を含む液性因子の一部を互いの個体間で共有させる実験的手法）を用い、末梢組織の概日リズム制御機構における液性因子の関与について検討を行った。その結果、肝臓および腎臓における概日リズム遺伝子発現の周期性維持には、液性因子を介した制御が必要であることが明らかとなった。しかしながら脾臓、心筋および骨格筋においては、同じ末梢組織であるにも関わらず、液性因子を介した制御は概日リズム遺伝子の周期的発現の維持に重要でないことを同時に報告している⁶⁶⁾。またMcCarthyらが行った網羅的遺伝子発現プロファイリングでは、骨格筋において同定された組織特異的概日リズム遺伝子のうち、約40%がCT-18およびCT-42に発現のピークを示した⁵¹⁾。CT-18およびCT-42は、通常飼育環境下における暗期開始後6時間目に相当し、これは夜行性であるマウスの身体活動量が最も活発な時間帯でもある。さらにZambonらは、ヒト骨格筋におけるコアクロック遺伝子Bmal1およびPer2の発現が、（時間や光刺激の影響に関係なく）レジスタンストレーニングによって引き起こされることを示している⁶⁷⁾。これらの結果から推測される仮説として、骨格筋における末梢概日リズムの遺伝子発現制御機構においては、全身の運動レベルの変化や神経-筋活動を介したリズム同調機構が存在するのかもしれない。

概日リズムの制御異常と疾患

これまで多くの疫学的研究から、睡眠・食事のタイミングなどのライフスタイルと、肥満や糖尿病を含む生活習慣病の発症との間に密接な関係があることが注目されている^{68,69)}。睡眠や食事のタイミングを一定に保つことの難しいシフトワーカーを対象にした疫学的調査の結果、心血管系疾患や糖尿病、癌など様々な疾病への罹患率が有意に高いことが報告されている^{70,71)}。また実験動物を用いた基礎研究領域における検討からも、概日リズム遺伝子の変異マウスにおいて様々な異常形質（肥満、耐糖能異常、インスリン抵抗性、サルコペニア様変化など）

が観察されている^{72~74)}。最近では、Bmal1遺伝子のハプロタイプによる高血圧・2型糖尿病の発症率の違いが報告されるなど、ヒトにおける概日リズム遺伝子の制御と生活習慣病を含む疾患との関連性が直接的に証明されつつある⁷⁵⁾。

現在までに、骨格筋収縮機構の形成および機能維持におけるBMAL1:CLOCKおよびMyoD1を含む骨格筋特異的概日リズム遺伝子の関与が、少しずつ明らかとなってきた^{50,51,76)}。しかしながら、骨格筋という末梢運動組織の機能維持における概日リズムシステムの制御機構について、SCNからの中枢時計による階層的な生物リズムの統合が必要であるのか、それとも骨格筋細胞内に存在する末梢時計が独自の制御機構を有しているのか、そのメカニズムは全く未解明である。コアクロックという個々の細胞内におけるリズム発振の基本メカニズムが明らかになる一方で、これらが個体という統合的な生物システムの中でどのように制御されているかを理解することは、概日リズムの破綻により引き起こされる疾患・病態の原因究明や新たな治療法の開発において非常に重要な課題といえる。今後、概日リズムシステムを介した骨格筋機能の制御・維持機構を解明することで、廃用性筋萎縮やサルコペニア、糖尿病などの代謝系疾患に対する新たな治療戦略の開発や効果的なリハビリテーションプログラムの考案へと繋がる基礎的知見の得られることが強く期待される。

References

- 1) Hastings M, O'Neill JS & Maywood ES (2007) Circadian clocks: regulators of endocrine and metabolic rhythms. *J Endocrinol* **195**, 187-198, doi: 195/2/187 [pii] 10.1677/JOE-07-0378.
- 2) Mellow M, Spoelstra K & Roenneberg T (2005) The circadian cycle: daily rhythms from behaviour to genes. *EMBO Rep* **6**, 930-935, doi: 7400541 [pii] 10.1038/sj.embor.7400541.
- 3) Dunlap JC (1999) Molecular bases for circadian clocks. *Cell* **96**, 271-290, doi: S0092-8674(00)80566-8 [pii].
- 4) Waterhouse J, Reilly T, Atkinson G & Edwards B (2007) Jet lag: trends and coping strategies. *Lancet* **369**, 1117-1129, doi: S0140-6736(07)60529-7 [pii] 10.1016/S0140-6736(07)60529-7.
- 5) Waterhouse J, Edwards B, Nevill A, Carvalho S, Atkinson G, Buckley P, Reilly T, Godfrey R & Ramsay R (2002) Identifying some determinants of "jet lag" and its symptoms: a study of athletes and other travellers. *Br J Sports Med* **36**, 54-60.

- 6) Liniger C, Favre L & Assal JP (1991) Twenty-four hour blood pressure and heart rate profiles of diabetic patients with abnormal cardiovascular reflexes. *Diabet Med* **8**, 420-427.
- 7) Schwartz GL, Turner ST & Sing CF (1992) Twenty-four-hour blood pressure profiles in normotensive sons of hypertensive parents. *Hypertension* **20**, 834-840.
- 8) Degaute JP, Van Cauter E, van de Borne P & Linkowski P (1994) Twenty-four-hour blood pressure and heart rate profiles in humans. A twin study. *Hypertension* **23**, 244-253.
- 9) Mazze R, Strock E, Morgan B, Wesley D, Bergenstal R & Cuddihy R (2009) Diurnal glucose patterns of exenatide once weekly: a 1-year study using continuous glucose monitoring with ambulatory glucose profile analysis. *Endocr Pract* **15**, 326-334, doi: Q4186317427H1N16 [pii] 10.4158/EP09046.0RR.
- 10) Muller JE, Tofler GH & Stone PH (1989) Circadian variation and triggers of onset of acute cardiovascular disease. *Circulation* **79**, 733-743.
- 11) Levi F & Schibler U (2007) Circadian rhythms: mechanisms and therapeutic implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **47**, 593-628, doi: 10.1146/annurev.pharmtox.47.120505.105208.
- 12) Rusak B & Zucker I (1979) Neural regulation of circadian rhythms. *Physiol Rev* **59**, 449-526.
- 13) Meijer JH & Rietveld WJ (1989) Neurophysiology of the suprachiasmatic circadian pacemaker in rodents. *Physiol Rev* **69**, 671-707.
- 14) Moore RY & Eichler VB (1972) Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res* **42**, 201-206, doi: 0006-8993 (72) 90054-6 [pii].
- 15) Ralph MR, Foster RG, Davis FC & Menaker M (1990) Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science* **247**, 975-978.
- 16) LeSauter J, Lehman MN & Silver R (1996) Restoration of circadian rhythmicity by transplants of SCN "micro-punches". *J Biol Rhythms* **11**, 163-171.
- 17) Balsalobre A, Damiola F & Schibler U (1998) A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell* **93**, 929-937, doi: S0092-8674 (00) 91199-X [pii].
- 18) Welsh DK, Yoo SH, Liu AC, Takahashi JS & Kay SA (2004) Bioluminescence imaging of individual fibroblasts reveals persistent, independently phased circadian rhythms of clock gene expression. *Curr Biol* **14**, 2289-2295, doi: S0960982204009157 [pii] 10.1016/j.cub.2004.11.057.
- 19) Yamazaki S, Numano R, Abe M, Hida A, Takahashi R, Ueda M, Block GD, Sakaki Y, Menaker M & Tei H (2000) Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science* **288**, 682-685, doi: 8481 [pii].
- 20) Yoo SH, Yamazaki S, Lowrey PL, Shimomura K, Ko CH, Buhr ED, Slepka SM, Hong HK, Oh WJ, Yoo OJ, et al. (2004) PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 5339-5346, doi: 10.1073/pnas.0308709101 0308709101 [pii].
- 21) Yamamoto T, Nakahata Y, Soma H, Akashi M, Mammine T & Takumi T (2004) Transcriptional oscillation of canonical clock genes in mouse peripheral tissues. *BMC Mol Biol* **5**, 18, doi: 1471-2199-5-18 [pii] 10.1186/1471-2199-5-18.
- 22) Antoch MP, Song EJ, Chang AM, Vitaterna MH, Zhao Y, Wilsbacher LD, Sangoram AM, King DP, Pinto LH & Takahashi JS (1997) Functional identification of the mouse circadian Clock gene by transgenic BAC rescue. *Cell* **89**, 655-667, doi: S0092-8674(00) 90246-9 [pii].
- 23) King DP, Zhao Y, Sangoram AM, Wilsbacher LD, Tanaka M, Antoch MP, Steeves TD, Vitaterna MH, Kornhauser JM, Lowrey PL, et al. (1997) Positional cloning of the mouse circadian clock gene. *Cell* **89**, 641-653, doi: S0092-8674(00) 90245-7 [pii].
- 24) Vitaterna MH, King DP, Chang AM, Kornhauser JM, Lowrey PL, McDonald JD, Dove WF, Pinto LH, Turek FW & Takahashi JS (1994) Mutagenesis and mapping of a mouse gene, Clock, essential for circadian behavior. *Science* **264**, 719-725.
- 25) Sangoram AM, Saez L, Antoch MP, Gekakis N, Staknis D, Whiteley A, Fruechte EM, Vitaterna MH, Shimomura K, King DP, et al. (1998) Mammalian circadian autoregulatory loop: a timeless ortholog and mPer1 interact and negatively regulate CLOCK-BMAL1-induced transcription. *Neuron* **21**, 1101-1113, doi: S0896-6273(00) 80627-3 [pii].
- 26) Ikeda M & Nomura M (1997) cDNA cloning and tissue-specific expression of a novel basic helix-loop-helix/PAS protein (BMAL1) and identification of alternatively spliced variants with alternative translation initiation site usage. *Biochem Biophys Res Commun* **233**, 258-264, doi: S0006-291X(97) 96371-3 [pii] 10.1006/bbrc.1997.6371.
- 27) Tei H, Okamura H, Shigeyoshi Y, Fukuhara C, Ozawa R, Hirose M & Sakaki Y (1997) Circadian oscillation of a mammalian homologue of the Drosophila period gene. *Nature* **389**, 512-516, doi: 10.1038/39086.
- 28) Sun ZS, Albrecht U, Zhuchenko O, Bailey J, Eichele G & Lee CC (1997) RIGUI, a putative mammalian ortholog of the Drosophila period gene. *Cell* **90**, 1003-1011, doi: S0092-8674(00) 90366-9 [pii].
- 29) King DP & Takahashi JS (2000) Molecular genetics of circadian rhythms in mammals. *Annu Rev Neurosci* **23**, 713-742, doi: 10.1146/annurev.neuro.23.1.713.
- 30) Schibler U & Naef F (2005) Cellular oscillators: rhythmic gene expression and metabolism. *Curr Opin Cell Biol* **17**, 223-229, doi: S0955-0674(05) 00013-X [pii].

- 10.1016/j.ceb.2005.01.007.
- 31) Darlington TK, Wager-Smith K, Ceriani MF, Staknis D, Gekakis N, Steeves TD, Weitz CJ, Takahashi JS & Kay SA (1998) Closing the circadian loop: CLOCK-induced transcription of its own inhibitors per and tim. *Science* **280**, 1599-1603.
 - 32) Gekakis N, Staknis D, Nguyen HB, Davis FC, Wilsbacher LD, King DP, Takahashi JS & Weitz CJ (1998) Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science* **280**, 1564-1569.
 - 33) Hogenesch JB, Gu YZ, Jain S & Bradfield CA (1998) The basic-helix-loop-helix-PAS orphan MOP3 forms transcriptionally active complexes with circadian and hypoxia factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 5474-5479.
 - 34) Kume K, Zylka MJ, Sriram S, Shearman LP, Weaver DR, Jin X, Maywood ES, Hastings MH & Reppert SM (1999) mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell* **98**, 193-205, doi: S0092-8674(00)81014-4 [pii].
 - 35) Lee C, Etchegaray JP, Cagampang FR, Loudon AS & Reppert SM (2001) Posttranslational mechanisms regulate the mammalian circadian clock. *Cell* **107**, 855-867, doi: S0092-8674(01)00610-9 [pii].
 - 36) Shearman LP, Sriram S, Weaver DR, Maywood ES, Chaves I, Zheng B, Kume K, Lee CC, van der Horst GT, Hastings MH, et al. (2000) Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. *Science* **288**, 1013-1019, doi: 8520 [pii].
 - 37) Etchegaray JP, Lee C, Wade PA & Reppert SM (2003) Rhythmic histone acetylation underlies transcription in the mammalian circadian clock. *Nature* **421**, 177-182, doi: 10.1038/nature01314 nature01314 [pii].
 - 38) Tamanini F, Yagita K, Okamura H & van der Horst GT (2005) Nucleocytoplasmic shuttling of clock proteins. *Methods Enzymol* **393**, 418-435, doi: S0076687905930206 [pii] 10.1016/S0076-6879(05)93020-6.
 - 39) Ripperger JA (2006) Mapping of binding regions for the circadian regulators BMAL1 and CLOCK within the mouse Rev-erbalpha gene. *Chronobiol Int* **23**, 135-142, doi: T28483346628N1M4 [pii] 10.1080/07420520500464411.
 - 40) Ripperger JA & Schibler U (2006) Rhythmic CLOCK-BMAL1 binding to multiple E-box motifs drives circadian Dbp transcription and chromatin transitions. *Nat Genet* **38**, 369-374, doi: ngl1738 [pii] 10.1038/ngl1738.
 - 41) Preitner N, Damiola F, Lopez-Molina L, Zakany J, Duboule D, Albrecht U & Schibler U (2002) The orphan nuclear receptor REV-ERBalpha controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell* **110**, 251-260, doi: S0092867402008255 [pii].
 - 42) Bozek K, Relogio A, Kielbasa SM, Heine M, Dame C, Kramer A & Herzog H (2009) Regulation of clock-controlled genes in mammals. *PLoS ONE* **4**, e4882, doi: 10.1371/journal.pone.0004882.
 - 43) Yamaguchi S, Mitsui S, Yan L, Yagita K, Miyake S & Okamura H (2000) Role of DBP in the circadian oscillatory mechanism. *Mol Cell Biol* **20**, 4773-4781.
 - 44) Ripperger JA, Shearman LP, Reppert SM & Schibler U (2000) CLOCK, an essential pacemaker component, controls expression of the circadian transcription factor DBP. *Genes Dev* **14**, 679-689.
 - 45) Akhtar RA, Reddy AB, Maywood ES, Clayton JD, King VM, Smith AG, Gant TW, Hastings MH & Kyriacou CP (2002) Circadian cycling of the mouse liver transcriptome, as revealed by cDNA microarray, is driven by the suprachiasmatic nucleus. *Curr Biol* **12**, 540-550, doi: S0960982202007595 [pii].
 - 46) Panda S, Antoch MP, Miller BH, Su AI, Schook AB, Straume M, Schultz PG, Kay SA, Takahashi JS & Hogenesch JB (2002) Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. *Cell* **109**, 307-320, doi: S0092867402007225 [pii].
 - 47) Rudic RD, McNamara P, Reilly D, Grosser T, Curtis AM, Price TS, Panda S, Hogenesch JB & FitzGerald GA (2005) Bioinformatic analysis of circadian gene oscillation in mouse aorta. *Circulation* **112**, 2716-2724, doi: CIRCULATIONAHA.105.568626 [pii] 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.568626.
 - 48) Storch KF, Lipan O, Leykin I, Viswanathan N, Davis FC, Wong WH & Weitz CJ (2002) Extensive and divergent circadian gene expression in liver and heart. *Nature* **417**, 78-83, doi: 10.1038/nature744 nature744 [pii].
 - 49) Young ME (2003) Circadian rhythms in cardiac gene expression. *Curr Hypertens Rep* **5**, 445-453.
 - 50) Miller BH, McDearmon EL, Panda S, Hayes KR, Zhang J, Andrews JL, Antoch MP, Walker JR, Esser KA, Hogenesch JB, et al. (2007) Circadian and CLOCK-controlled regulation of the mouse transcriptome and cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 3342-3347, doi: 0611724104 [pii] 10.1073/pnas.0611724104.
 - 51) McCarthy JJ, Andrews JL, McDearmon EL, Campbell KS, Barber BK, Miller BH, Walker JR, Hogenesch JB, Takahashi JS & Esser KA (2007) Identification of the circadian transcriptome in adult mouse skeletal muscle. *Physiol Genomics* **31**, 86-95, doi: 00066.2007 [pii] 10.1152/physiolgenomics.00066.2007.
 - 52) Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, Clarke BA, Poueymirou WT, Panaro FJ, Na E, Dharmarajan K, et al. (2001) Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science* **294**, 1704-1708, doi: 10.1126/science.1065874 1065874 [pii].
 - 53) Gomes MD, Lecker SH, Jagoe RT, Navon A & Goldberg AL (2001) Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein

- highly expressed during muscle atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 14440-14445, doi: 10.1073/pnas.251541198 251541198 [pii].
- 54) Holloway GP, Bonen A & Spriet LL (2009) Regulation of skeletal muscle mitochondrial fatty acid metabolism in lean and obese individuals. *Am J Clin Nutr* **89**, 455S-462S, doi: ajcn.2008.26717B [pii] 10.3945/ajcn.2008.26717B.
- 55) Schrauwen P (2002) Skeletal muscle uncoupling protein 3 (UCP3): mitochondrial uncoupling protein in search of a function. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **5**, 265-270.
- 56) Pilegaard H & Neufer PD (2004) Transcriptional regulation of pyruvate dehydrogenase kinase 4 in skeletal muscle during and after exercise. *Proc Nutr Soc* **63**, 221-226, doi: S0029665104000278 [pii].
- 57) Davis RL, Weintraub H & Lassar AB (1987) Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* **51**, 987-1000, doi: 0092-8674(87)90585-X [pii].
- 58) Weintraub H, Tapscott SJ, Davis RL, Thayer MJ, Adam MA, Lassar AB & Miller AD (1989) Activation of muscle-specific genes in pigment, nerve, fat, liver, and fibroblast cell lines by forced expression of MyoD. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 5434-5438.
- 59) Cao Y, Kumar RM, Penn BH, Berkes CA, Kooperberg C, Boyer LA, Young RA & Tapscott SJ (2006) Global and gene-specific analyses show distinct roles for Myod and Myog at a common set of promoters. *EMBO J* **25**, 502-511, doi: 7600958 [pii] 10.1038/sj.emboj.7600958.
- 60) Balsalobre A, Brown SA, Marcacci L, Tronche F, Kellendonk C, Reichardt HM, Schutz G & Schibler U (2000) Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. *Science* **289**, 2344-2347, doi: 8856 [pii].
- 61) Nonaka H, Emoto N, Ikeda K, Fukuya H, Rohman MS, Raharjo SB, Yagita K, Okamura H & Yokoyama M (2001) Angiotensin II induces circadian gene expression of clock genes in cultured vascular smooth muscle cells. *Circulation* **104**, 1746-1748.
- 62) McNamara P, Seo SB, Rudic RD, Sehgal A, Chakravarti D & FitzGerald GA (2001) Regulation of CLOCK and MOP4 by nuclear hormone receptors in the vasculature: a humoral mechanism to reset a peripheral clock. *Cell* **105**, 877-889, doi: S0092-8674(01)00401-9 [pii].
- 63) Ueyama T, Krout KE, Nguyen XV, Karpitskiy V, Kolbert A, Mettenleiter TC & Loewy AD (1999) Suprachiasmatic nucleus: a central autonomic clock. *Nat Neurosci* **2**, 1051-1053, doi: 10.1038/15973.
- 64) Bartness TJ, Song CK & Demas GE (2001) SCN efferents to peripheral tissues: implications for biological rhythms. *J Biol Rhythms* **16**, 196-204.
- 65) Buijs RM, la Fleur SE, Wortel J, Van Heyningen C, Zuiddam L, Mettenleiter TC, Kalsbeek A, Nagai K & Nijijima A (2003) The suprachiasmatic nucleus balances sympathetic and parasympathetic output to peripheral organs through separate preautonomic neurons. *J Comp Neurol* **464**, 36-48, doi: 10.1002/cne.10765.
- 66) Guo H, Brewer JM, Champhekar A, Harris RB & Bittman EL (2005) Differential control of peripheral circadian rhythms by suprachiasmatic-dependent neural signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 3111-3116, doi: 0409734102 [pii] 10.1073/pnas.0409734102.
- 67) Zambon AC, McDearmon EL, Salomonis N, Vranizan KM, Johansen KL, Adey D, Takahashi JS, Schambelan M & Conklin BR (2003) Time- and exercise-dependent gene regulation in human skeletal muscle. *Genome Biol* **4**, R61, doi: 10.1186/gb-2003-4-10-r61.
- 68) Prasai MJ, George JT & Scott EM (2008) Molecular clocks, type 2 diabetes and cardiovascular disease. *Diab Vasc Dis Res* **5**, 89-95, doi: 3041 [pii] 10.3132/dvdr.2008.015.
- 69) Wolk R & Somers VK (2007) Sleep and the metabolic syndrome. *Exp Physiol* **92**, 67-78, doi: expphysiol.2006.033787 [pii] 10.1113/expphysiol.2006.033787.
- 70) Rajaratnam SM & Arendt J (2001) Health in a 24-h society. *Lancet* **358**, 999-1005, doi: S0140-6736(01)06108-6 [pii] 10.1016/S0140-6736(01)06108-6.
- 71) Mosendane T & Raal FJ (2008) Shift work and its effects on the cardiovascular system. *Cardiovasc J Afr* **19**, 210-215.
- 72) Turek FW, Joshu C, Kohsaka A, Lin E, Ivanova G, McDearmon E, Laposky A, Losee-Olson S, Easton A, Jensen DR, et al. (2005) Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice. *Science* **308**, 1043-1045, doi: 1108750 [pii] 10.1126/science.1108750.
- 73) Bunger MK, Walisser JA, Sullivan R, Manley PA, Moran SM, Kalscheur VL, Colman RJ & Bradfield CA (2005) Progressive arthropathy in mice with a targeted disruption of the Mop3/Bmal-1 locus. *Genesis* **41**, 122-132, doi: 10.1002/gen.20102.
- 74) Kondratov RV, Kondratova AA, Gorbacheva VY, Vykhovanets OV & Antoch MP (2006) Early aging and age-related pathologies in mice deficient in BMAL1, the core component of the circadian clock. *Genes Dev* **20**, 1868-1873, doi: 20/14/1868 [pii] 10.1101/gad.1432206.
- 75) Woon PY, Kaisaki PJ, Braganca J, Bihoreau MT, Levy JC, Farrall M & Gauguier D (2007) Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like (BMAL1) is associated with susceptibility to hypertension and type 2 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 14412-14417, doi: 0703247104 [pii] 10.1073/pnas.0703247104.
- 76) Zhang X, Dube TJ & Esser KA (2009) Working around

the clock: circadian rhythms and skeletal muscle. *J Appl Physiol* **107**, 1647-1654, doi: 00725.2009 [pii]

10.1152/jappphysiol.00725.2009.