

# 全身の体内リズムを調和させる RNA 配列の発見

## —体温の日内変化に合わせてしなやかに調和させる—

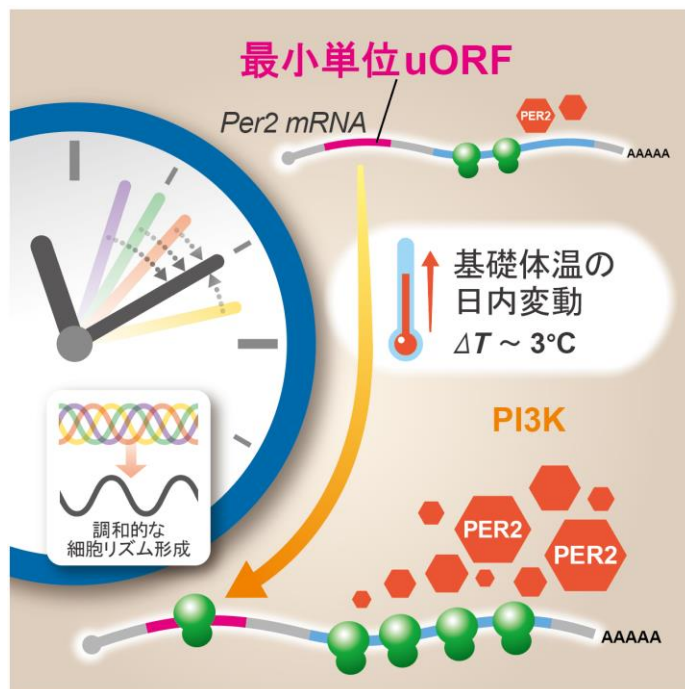
### 概要

三宅崇仁 薬学研究科助教、井ノ上雄一 同博士後期課程学生（研究当時）、土居雅夫 同教授 のグループは、体内リズムのしなやかな時刻合わせに必要なRNA 配列を発見しました。

私たちが健やかに生きていくためには、全身の 37 兆個もの細胞がそれぞれバラバラではなく、テンポをそろえて調和的に概日リズムを生むことが必要です。この調和の実現に体温が重要な役割を担います。これまでの研究から、体内でおこる数°Cレベルの基礎体温の変化が全身の細胞を調和する働きがあると示されてきました。しかし、その分子メカニズムは謎に包まれていました。

本研究では、最新の Ribo-seq 解析を通じて、体内時計の振動を生み出す中核遺伝子 *Per2* のメッセンジャーRNA の 5'非翻訳領域 (5'UTR) というこれまで理解が進んでいなかった領域に、最小単位 uORF というこれまで見過ごされていた新しい RNA エレメントを同定し、これが体温による細胞のリズム合わせに必須であることを見つけました。数°Cの生理的な温度変化は *Per2* の転写ではなく翻訳スピードを微調節することがわかりました。生命の「しなやかさ」の本質にせまる発見の一つであるといえます。

本成果は、2023 年 3 月 6 日に国際科学誌「*Cell Reports*」にオンライン掲載されました。



## 1. 背景

私たちが健やかであるためには、全身の 37 兆個もの細胞がそれぞれバラバラではなく、テンポをそろえて調和的に 24 時間周期のリズムを刻むことが重要です。バラバラの状態のリズムは時差ぼけで経験するような不健康な病的状態であり、そうならないために全身の細胞は親時計である脳の中樞時計からの指示を仰いでいます (図 1)。これまでの研究から、中枢時計によって生み出される基礎体温の規則的な変動が全体のリズムの調和に大きく寄与することが示されてきました。しかし、従来のホルモンや神経伝達物質を介したシグナル伝達とは異なり、『温度』という物理化学的な変化がどのようにして体内の時刻を調節するのかその分子メカニズムが謎でした (図 1)。

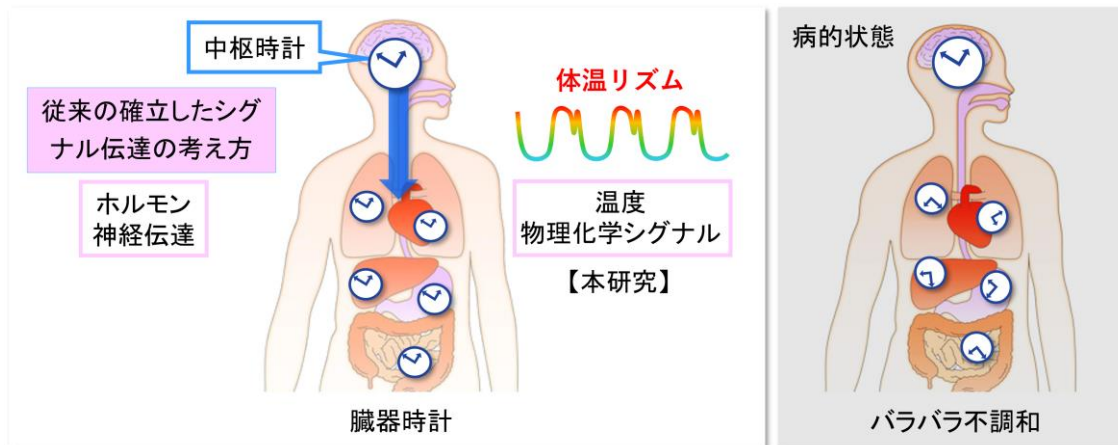


図 1. 体内時計の階層的構造：体温により全体が調和した状態（左）とそれが崩れた状態（右）

特に、この温度と体内リズムの関係は、生命の「しなやかさ」の原理を理解する上でも大きな課題となっていました。私たちの体温は 1 日中一定というわけではなく、リズムに変動しますが、それは決して大きな変化でなく、たかだか数°Cの幅を持った大変ゆるやかで連続的な変化です。このような数°Cの漸次的な変化にリズムを合わせる仕組みは、0 か 1 かのスイッチ型の様式では説明できず、ある程度の可変性をもった調節ねじタイプの速度調律（パラメトリック型速度調節）が必要であると考えられるため、これまでの研究ではまだとらえられていない新しいタイプの分子制御機構が潜んでいると考えられるのです。

## 2. 研究手法・成果

私たちは、微小な 35°Cから 38.5°Cの生理的温度変化（warming temperature shift, WTS）が体内時計遺伝子 *Per2* に及ぼす影響を調べるため次世代シーケンサーを用いた Ribo-seq 解析<sup>\*1</sup>を行いました (図 2)。その結果、*Per2* のメッセンジャーRNA 上の PER2 タンパク質をコードする領域の上流に位置する 5'非翻訳領域<sup>\*2</sup>に、タンパク質を合成するためのリボソームが集まってくる場所があることを見つけました (図 2)。その場所を 1 塩基レベルの解像度でみると、たった 1 つのアミノ酸（メチオニン）をコードする最小単位の読み枠配列であることが判明しました (図 2)。この最小上流読み枠配列<sup>\*3</sup>（minimal upstream open reading frame, m-uORF）は、ヒトを含む哺乳類全般において *Per2* で高度に保存されています。

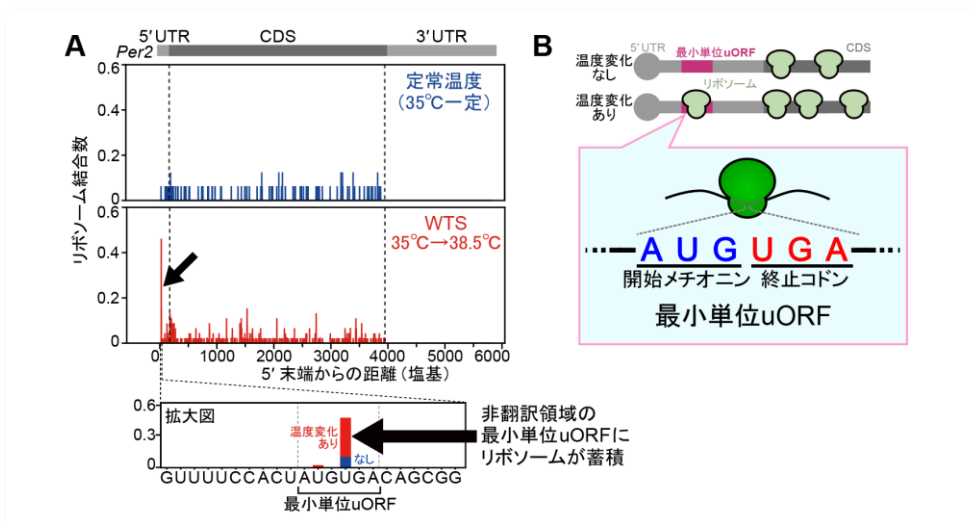


図 2. A) RNA-seq の結果: WTS により *Per2* 5'UTR の最小 uORF に結合するリボソーム. B) A) の模式図.

より詳細な検討により、WTS は *Per2* の mRNA 発現や PER2 タンパク質の寿命（分解速度）に変化を与えることなく PER2 タンパク質の合成速度を増加させること、さらに、*Per2*m-uORF をゲノム上で変異させたマウスの細胞では WTS による PER2 の発現増加が消失することを明らかにしました。

どのような分子が WTS 温度応答を媒介するのでしょうか。私たちはキナーゼ阻害薬ライブラリを用いて 150 種類以上の化合物をスクリーニングし、PI3K がそのマスターレギュレーターであることを突き止めました。WTS により誘発される m-uORF へのリボソームの集積は、PI3K 阻害薬で抑制されます。

重要なことに、*Per2* の m-uORF 配列および PI3K は細胞の温度変化による位相合わせに実際に必要です。複数の異なる位相の培養細胞を用意し、それらをマウスにおいて実際に測定した体温の変動サイクルに置くと、5 日後には共通の位相にそろいますが、*Per2*m-uORF 変異細胞や PI3K 阻害薬を処置した細胞では位相合わせが阻害されることを明らかにしました（図 3）。

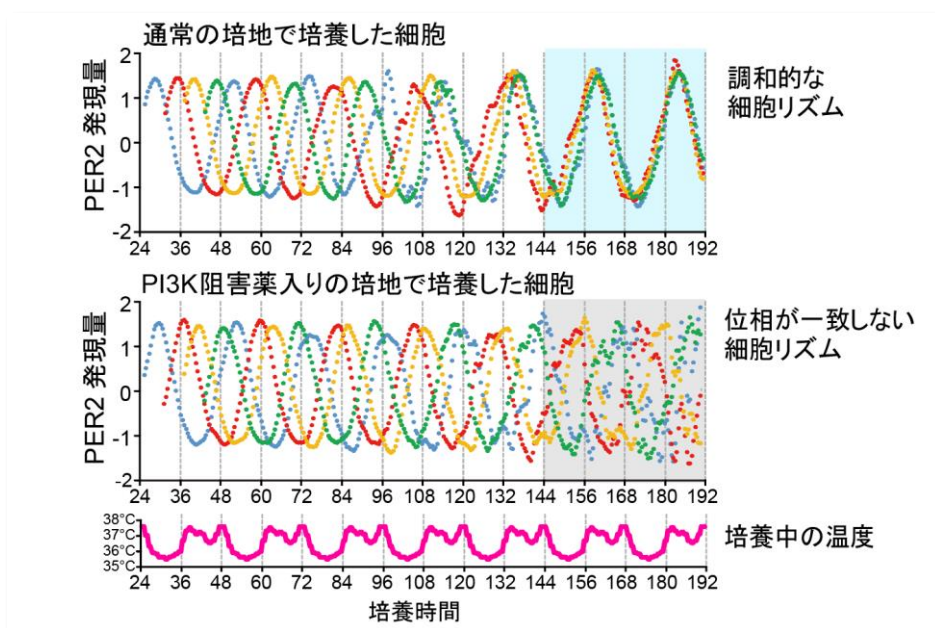


図 3. 生体を模した温度サイクル下において培養した細胞の PER2 発現リズム：PI3K 阻害薬の有無の比較.

では温度サイクルにうまく位相合わせができなくなると、どのようなことが問題になるのでしょうか？ 私たちは、傷の創傷治癒モデルを用いて、*Per2* m-uORF 変異型マウスでは皮膚の傷の治りが悪く、正常マウスでみられる傷の治りの時刻依存性がなくなってしまうことを見出しました(図4)。つまり、今回見出した PI3K-*Per2*m-uORF パスウェイは in vivo においても組織の正常な恒常維持に重要であることが示唆されました。

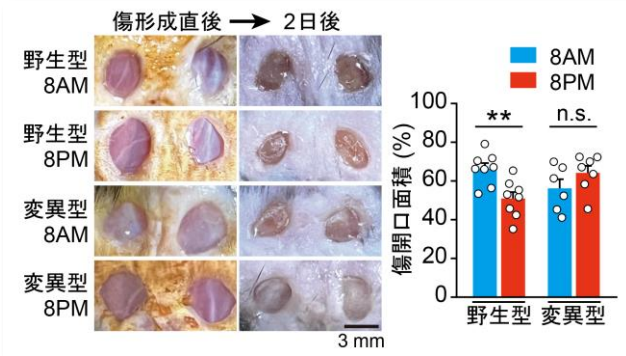


図4. 野生型マウスと *Per2*m-uORF 変異マウスの背中の傷の治り：午前8時もしくは午後8時につけた傷の48時間後の修復率を測定した。

### 3. 波及効果、今後の予定

これまでの生物学的研究では、ヒートショックなどの急性刺激に対する応答を見るものが多く、穏やかで漸次的な刺激に対する生命のしなやかな応答の理解は進んでいませんでした。全身の体内リズムの不調和は、多くの病気の原因になります。生理的温度への体内時計の応答を媒介する新しい RNA エLEMENTの発見は、全身の細胞リズムの調和に基づいた治療薬開発の土台になると考えられます。

タンパク質はリボソームにより mRNA から合成(翻訳)されます。翻訳はこれまで、ベルトコンベヤーのように定常的に繰り返される比較的単調な生化学反応であると思われてきましたが、次世代シーケンサーを用いた解析法の発展により、翻訳はむしろ細胞内外の状況に応じて速度を変えるダイナミックレンジの広い可変制御の場であると見直されつつあります。しかし、翻訳速度の変化が生体レベルにおいてどのような生理的機能変化をもたらすのかは不明なままでした。そのような中、本研究は、翻訳速度の調節を司る RNA 配列の生体における役割を動物レベルで明らかにした初めての成果といえます。翻訳速度調節を介した生命のしなやかさの原理を解明する上で最初の重要な一歩になるのかもしれない。

### 4. 研究プロジェクトについて

本研究は、日本学術振興会 (JSPS) 科学研究費助成事業 学術変革領域研究(B) (20H05783, 20H05784) および基盤研究(S) (22H04987) を含む補助金・基金 (20K21426, 21H05734, 22K15274)、先端モデル動物支援プラットフォーム (16H06276)、日本医療研究開発機構 (AMED) 創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム (JP21am0101092)、加藤記念バイオサイエンス振興財団研究助成、小林財団研究助成、武田科学振興財団薬学系研究助成、中外創薬科学財団研究助成、成茂神経科学研究助成基金、京都大学創立 125 周年記念ファンドくすのき・125 の支援を受けて行われました。

#### <用語解説>

##### \* 1 Ribo-seq 解析

リボソームが mRNA 上のどの位置にどの程度集まっているのかを定量的に検出する方法による解析

##### \* 2 5'非翻訳領域

mRNA のタンパク質コーディング領域の 5'側上流にある、一般的には翻訳されない mRNA 領域



### \* 3 最小上流読み枠 (minimal upstream open reading frame, m-uORF)

mRNA の 5'非翻訳領域にあり、開始コドンと終止コドンのみから構成される最小単位の読み枠のこと

#### <研究者のコメント>

「しなやかに生物が温度に合わせてリズムを調和させる不思議な現象に RNA 上の新奇の配列が必要だとわかりました。いま現在まだつかめていない生命のしなやかさの不思議に一步近づく発見だと考えています。」

#### <論文タイトルと著者>

タイトル： Minimal upstream open reading frame of *Per2* mediates phase fitness of the circadian clock to day/night physiological body temperature rhythm. (*Per2* の最小上流読み枠が体内時計の生理的な体温の昼夜変動への位相適合を仲介する.)

著者： 三宅崇仁<sup>1\*</sup>, 井ノ上雄一<sup>1\*</sup>, 邵欣彦<sup>1</sup>, 瀬田孟仁<sup>1</sup>, 青木祐人<sup>1</sup>, グエンファムカンティエン<sup>1</sup>, 七野悠一<sup>2</sup>, 佐々木純子<sup>3</sup>, 佐々木雄彦<sup>3</sup>, 伊川正人<sup>4</sup>, 山口賀章<sup>1</sup>, 岡村均<sup>1,5</sup>, 岩崎信太郎<sup>2,6</sup>, 土居雅夫<sup>1#</sup>  
<sup>1</sup>京都大学薬学研究科, <sup>2</sup>理化学研究所, <sup>3</sup>東京医科歯科大学, <sup>4</sup>大阪大学, <sup>5</sup>京都大学医学研究科, <sup>6</sup>東京大学, \*同等貢献著者, #責任著者

掲載誌： *Cell Reports*

DOI： <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.112157>

#### <その他: 参考イメージ>

