HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	概日時計の温度補償性とCa2+シグナルの役割
Author(s)	金, 尚宏; 榎木, 亮介
Citation	低温科学, 81, 109-117
Issue Date	2023-03-20
DOI	10.14943/lowtemsci.81.109
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/89105
Type	bulletin (article)
Note	第二章：恒温動物（哺乳類）
File Information	12_p109-117_LT81.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

低温科学 81 （2023） 109-117
doi: 10.14943/lowtemsci. 81. 109

概日時計の温度補償性と Ca^{2+} シグナルの役割

金　尚宏[1, 2, 3]，榎木　亮介[4, 5]

2022 年 12 月 1 日受付，2023 年 1 月 16 日受理

概日時計は自律振動性，同調性，温度補償性という三つの重要な性質を持つ．概日時計の分子メカニズムの研究は，リズムに異常を示す時計遺伝子の変異体の発見から進展した．動物において，概日性の遺伝子発現リズムは転写翻訳フィードバックループによって生み出されている．この転写翻訳フィードバックループは概日性の Ca^{2+}-CaMKII シグナルの活性化によって制御されており，CaMKII は転写因子 CLOCK をリン酸化することで活性化する．概日時計の特性として，生理的な温度範囲において周期が約 24 時間に保たれる温度補償性が知られている．概日時計の周期がいかにして低温で維持されるのかは不明な点が多かったが，近年の研究から，Na^{+}/Ca^{2+} 交換輸送体（NCX）に依存した低温で活性化する Ca^{2+} シグナルが転写翻訳フィードバックループの振動速度を調節することが分かってきた．

Temperature compensation of circadian clock and the role of Ca^{2+} signaling

Naohiro Kon[1, 2, 3] and Ryosuke Enoki[4, 5]

Three important features of the circadian clocks are autonomous oscillation, entrainment and temperature compensation. Molecular mechanisms of the clocks were clarified by the discoveries of clock genes, and the circadian rhythms are generated by transcriptional and translational feedback loops. The feedback loops are regulated by rhythmic phosphorylation of CLOCK by circadian Ca^{2+}-CaMKII signaling. In response to temperature decrease, NCX promotes Ca^{2+} influx to activate CaMKII for regulation of the feedback loop in the temperature compensation of period

連絡先
金　尚宏
〒464-8601　愛知県名古屋市千種区不老町　名古屋大学 ITbM 棟 505 室
Institute of Transformative Bio-Molecules (ITbM), Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya, 464-8601, Japan.
Tel. 052-789-4070
e-mail：kon.naohiro@itbm.nagoya-u.ac.jp
榎木　亮介
〒444-8787　愛知県岡崎市明大寺町字東山 5-1
Higashiyama 5-1, Myodaiji, Okazaki, Aichi 444-8787, Japan.
Tel. 0564-59-5258
e-mail：enoki@nips.ac.jp
１）名古屋大学　トランスフォーマティブ生命分子研究所（ITbM）
Institute of Transformative Bio-Molecules (ITbM), Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya, 464-8601, Japan.
２）名古屋大学大学院　生命農学研究科　動物科学専攻　動物統合生理学教室
Laboratory of Animal Integrative Physiology, Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya, 464-8601, Japan.
３）Suntory Rising Stars Encouragement Program in life Sciences（SunRiSE）, SunRiSE, Suntory Foundation for Life Sciences, Suntory World Research Center, 8-1-1 Seikadai, Seika-cho, Soraku-gun, Kyoto, 619-0284, Japan
〒619-0284　京都府相楽郡精華町精華台 8-1-1　サントリーワールドリサーチセンター　サントリー生命科学財団
４）自然科学研究機構生理学研究所　バイオフォトニクス研究部門
Division of Biophotonics, National Institute for Physiological Sciences, National Institutes of Natural Sciences, Higashiyama 5-1, Myodaiji, Okazaki, Aichi 444-8787, Japan.
５）自然科学研究機構生命創成探究センター　バイオフォトニクス研究グループ
Biophotonics Research Group, Exploratory Research Center on Life and Living Systems (ExCELLS), National Institutes of Natural Sciences, Higashiyama 5-1, Myodaiji, Okazaki, Aichi 444-8787, Japan.

length.

キーワード：概日時計，温度補償性，Ca^{2+}シグナル，CaMKII，Na^{+}/Ca^{2+}交換輸送体
Circadian clock, temperature compensation, Ca^{2+} signaling, CaMKII, Na^{+}/Ca^{2+} exchanger

1．概日リズムと時計

動物の睡眠や覚醒，植物の光合成活性などは，環境変化を一定にした条件下でも約一日周期のリズムが観察される．これらのリズムは概日リズムと呼ばれ，英語ではサーカディアンリズム（circadian rhythm）と表される．この概日リズムを生み出しているのが概日時計という生物時計である（海老原史樹文，深田吉孝，1999；岡村均，深田吉孝，2004；海老原史樹文，吉村崇，2012）．概日時計は，動物や植物だけでなく，真菌，シアノバクテリアのような原核生物にも存在している．概日時計を持つことによって，生物は環境の周期的な変化を予測することが可能となり，生存競争で有利に働くと考えられている．概日時計の重要な特性は3つあり，一つ目は**「自律振動性」**である．恒暗条件下において，ショウジョウバエの歩行活動リズムは24.4時間，ハツカネズミの輪回し行動リズムでは23.6時間というように，約一日周期のリズムが継続する（Refinetti, 2016）．概日時計の二つ目の重要な特性は，環境サイクルとの**「同調性」**である．概日時計の位相（時刻）は，明暗や温度などの同調因子によって調節される．そのため，概日時計の周期が24時間より少しずれていても，環境サイクルに同調することができる．そして，概日時計の三つ目の性質は**「温度補償性」**である．温度補償性とは，季節や昼夜の寒暖に伴う温度変化に依らず，概日リズムの周期がほぼ一定に保たれる性質である．温度係数Q_{10}は，温度が10℃変化した際の反応速度の変化を示す指標としてよく用いられる．例えば酵素反応の場合，37℃での反応速度を27℃での反応速度で割った値によりQ_{10}を求められるが，一般的な生化学反応ではQ_{10}は約2から3である．概日時計は生化学反応で構成されているにも関わらず，実際に観察される概日リズムのQ_{10}は0.8から1.2の間に保たれている．この温度補償性は，環境温度によって細胞の温度が強く影響される昆虫，植物，あるいは細菌においてとりわけ重要である．本性質は1950年代まで，概日時計の周期の温度非依存性と呼ばれていた（Pittendrigh, 1954）．しかし，1957年に渦鞭毛藻ゴニオラックスの生物発光リズムの研究において，温度を下げるとリズム周期はやや短くなる（Q_{10}が1よりも小さくなる）という過補償現象（overcompensation）が見出された（Hastings & Sweeney, 1957）．この観察により，概日時計の周期は温度に非依存というわけではなく，むしろ積極的に周期を補償するメカニズムが存在すると考えられるようになり，温度補償性という呼び方が定着した．温度補償性は内温動物の概日時計にも観察され，哺乳類の培養細胞の転写リズムも生理的な温度範囲でほぼ一定の周期に保たれている．

2．哺乳類の概日時計の存在場所

哺乳類の概日時計は睡眠，覚醒，あるいは摂食などを強く制御する一方で，絶食，断眠，あるいは内分泌器官の除去によって大きな影響を受けない（Richter, 1965）．1972年，外科的な切除実験から，脳の視床下部領域に存在する視交叉上核（Suprachiasmatic nucleus）に概日時計の中枢が存在することが分かった（Moore & Eichler, 1972; Stephan & Zucker, 1972）．視交叉上核は約2万個の神経細胞から構成されるネットワークを形成しており，個々の細胞レベルで代謝や活動電位の概日リズムが観察される．この視交叉上核の中枢時計は全身の組織に存在する末梢時計の位相を調節している（Yamazaki et al., 2000）．そして，時計遺伝子の発現リズムはいくつかの不死化した培養細胞株においても観察されることから（Balsalobre et al., 1998），生体外という非生理的な条件下においても概日時計は機能することが分かる．末梢細胞のリズム位相を調節する代表的な因子としては，副腎皮質から分泌されるグルココルチコイドの一種であるコルチゾールが知られており（Balsalobre et al., 2000a），ヒトの場合，血中コルチゾール濃度は明け方にピークを持つ概日リズムを示す．その他，上皮成長因子，線維芽細胞増殖因子，エンドセリン，トランスフォーミング増殖因子ベータやインスリンなど，多くの因子が末梢時計の同調に関わっている（Balsalobre et al., 2000b; Kon et al., 2008）．このような末梢組織とは異なり，視交叉上核の組織を *in vitro* で培養した場合では数十日に渡って遺伝子発現リズムが維持される．これは，視交叉上核の個々の神経細胞はシナプス結合や神経ペプチドを介して同調しており，単離した培養条件下でも脱同調が起こりにくいためである．このような細胞間カップリングによる個々の神経細胞のリズム同調は，中枢時計の安定な高振幅リズムを生み出す上で重要である．

3. リズム変異体と転写翻訳フィードバックループ

概日リズムの形成に関わる分子メカニズムは，いくつかの生物種においてリズム変異体が同定されたことにより飛躍的に理解が進んだ．1971 年，Konopka と Benzer は最初のリズム変異体であるショウジョウバエ *period*（*per*）変異体を報告した（Konopka & Benzer, 1971）．1973 年にはアカパンカビの胞子形成リズムに異常を示す *frequency*（*frq*）変異体が報告され，1988 年には哺乳類におけるハムスターの *tau* 変異体，1994 年にはマウスの *Clock* 変異体が報告された（海老原史樹文，深田吉孝，1999；岡村均，深田吉孝，2004；海老原史樹文，吉村崇，2012.）．そして，1994 年には光合成細菌のシアノバクテリアにおいて *kai* 変異体群が報告された．1984 年に米国の 2 つの独立のグループからショウジョウバエの *per* 遺伝子がクローニングされ，それに続いて哺乳類，植物，真菌，および細菌で時計遺伝子が続々と明らかになった．各生物種における時計遺伝子を比較すると，動物，植物，真菌，および細菌の時計遺伝子の配列相同性は限定的であることが分かった．そのため，これらの生物系統において時計遺伝子は独立に進化したと考えられている．しかし，いずれの種においても時計遺伝子は転写翻訳フィードバックループを形成し，遺伝子発現の概日リズムを生み出すという共通点を持つことが分かった．そして 2017 年，ショウジョウバエ *per* 遺伝子の報告を行った Jeffrey Hall，Michael Rosbash，Michael Young の 3 氏に，ノーベル生理学・医学賞が授与された．

哺乳類の転写翻訳フィードバックループにおいては，CLOCK と BMAL1 が転写活性化因子として機能する．これらのタンパク質には DNA 結合モチーフである bHLH（basic helix-loop-helix）ドメインと PAS ドメインが存在する．PAS ドメインとは，PER タンパク質，ダイオキシン受容体 AHR とヘテロダイマーを形成する ARNT タンパク質，および発生に重要な転写因子 SIM に共通して見られるドメインであり，タンパク質間の相互作用に関わる．CLOCK と BMAL1 は PAS ドメインを介してヘテロ二量体を形成し，*Period*（*Per*）や *Cryptochrome*（*Cry*）遺伝子の転写制御領域に存在する DNA シスエレメント（E-box）に結合して転写を活性化する（図 1）．転写・翻訳された PER タンパク質は CRY タンパク質と複合体を形成して核内へ移行し，CLOCK と BMAL1 による *Per*・*Cry* 遺伝子の転写活性化を阻害する．このような転写翻訳フィードバックループにより，E-box を介した *Per*・*Cry* 遺伝子の発現は約一日周期の増減リズムを示す．*Clock* 変異マウス，*Bmal1* 欠損マウス，*Per1* と *Per2* の二重欠損マウス，*Cry1* と *Cry2* の二重欠損マウスは行動リズムおよび遺伝子発現リズムがほとんど消失することから，これらの因子は哺乳類の転写翻訳フィードバックループを形成する中心的な因子である．さらに，このコアループと連動するサブループが知られている．*Bmal1* 遺伝子などの転写制御領域には RORE（ROR/REV-ERB response element）が存在する．この RORE 配列に転写活性化因子 ROR と転写抑制因子 REV-ERB が拮抗的に結合し，*Bmal1* 遺伝子の転写リズムが生み出されると考えられている．このようなサブループの存在により，遺伝子ごとに一日のさまざまな時刻に発現ピークを示す転写リズムが生み出されている．

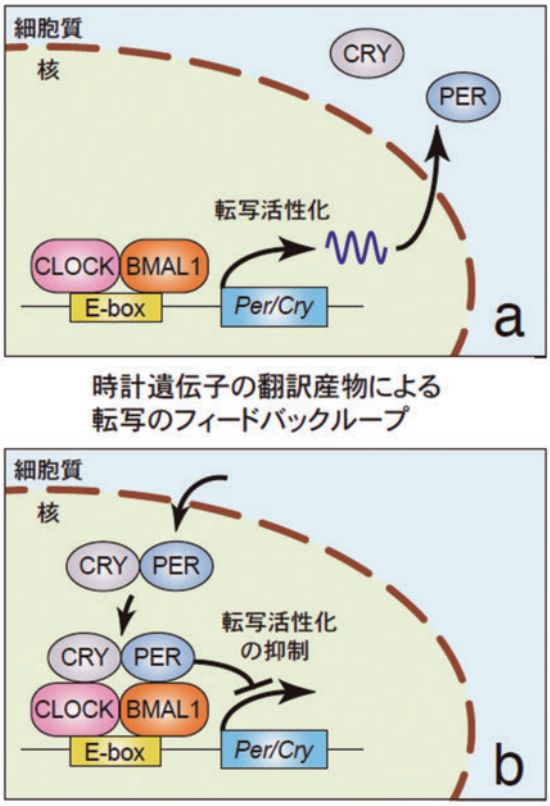

図 1：概日リズムを生み出す転写翻訳フィードバックループ（a）bHLH 型転写因子である CLOCK と BMAL1 はヘテロ二量体を形成し，E-box 配列に結合して *Per* 遺伝子や *Cry* 遺伝子の転写を活性化する．（b）転写・翻訳された PER・CRY タンパク質は核に移行し，CLOCK-BMAL1 複合体による転写活性化を抑制する．この転写翻訳フィードバックループが約 24 時間の周期で繰り返し，時計遺伝子を含む多くの遺伝子群の概日性の発現リズムを生み出す．本図は先行文献より改変して使用した（金　尚宏，深田吉孝　2019）．

哺乳類の概日時計における翻訳後修飾の重要性は，ハムスターの行動リズム周期が大きく変化する自然発生変異 *tau* の責任遺伝子の同定から明らかとなった．ハムスターは恒暗条件下で約 24 時間の自由継続周期を示すが，

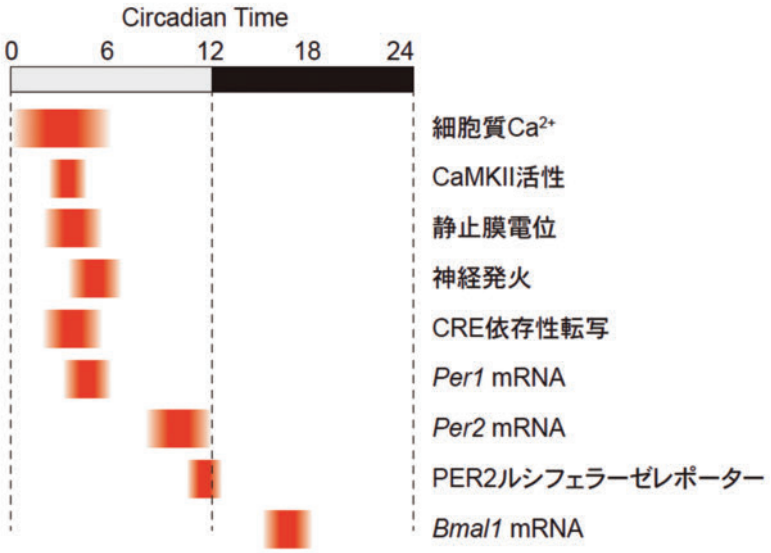

図 2：視交叉上核における各種リズムのピーク位相
各種リズムのピーク位相を赤いボックスにて示す．細胞内 Ca^{2+} リズムのピーク位相は主観的明期の前半に観察され，それに続いて CaMKII の自己リン酸化リズム，Ca^{2+}/cAMP 応答配列（CRE）に依存した転写リズム，E-box 配列に依存した転写リズムのピークが観察される．

tau 変異はヘテロ接合体で約 22 時間，ホモ接合体で約 20 時間というリズムの短周期化を引き起こす．この *tau* 変異の表現型は Casein Kinase I（CKI）ε の遺伝子変異に起因し，本変異によってキナーゼ活性が変化する．また，ヒトの家族性睡眠相前進症候群を引き起こす変異として hPER2 の Ser662Gly 変異が同定された（Toh et al., 2001）．この点変異は hPER2 の CKIε との結合部位に存在する．試験管内におけるリン酸化アッセイから，CKIε は PER2 をリン酸化することが示された．CKIε による PER2 のリン酸化はユビキチンリガーゼ複合体 SCF-β-TrCP により認識されてユビキチン化され，プロテアソームにより分解される．

転写翻訳フィードバックループは多くの真核生物で共通したリズム生成機構だが，この機構が自律振動体を形成できるかは証明されていない．原核生物であるシアノバクテリアにおいては，転写翻訳フィードバックループではなく，時計タンパク質 KaiA，KaiB，KaiC の複合体が自律振動体を形成することが証明された．KaiC タンパク質は 6 量体を形成し，自己リン酸化活性と自己脱リン酸化活性を持つ（Cohen & Golden, 2015）．概日リズムの位相は KaiC の Ser431 と Thr432 という 2 つのアミノ酸のリン酸化状態によって決定される．主観的昼（文末の用語説明 1 参照）に両アミノ酸は脱リン酸化状態となり，KaiA は KaiC に結合する．KaiA は KaiC のリン酸化を促進することで，KaiC と KaiB との結合を促進する．一方で，KaiB は KaiA と KaiC との結合を阻害し，KaiC の脱リン酸化を促進する．その結果，KaiC にはリン酸化リズムが生まれる．精製した KaiA，KaiB および KaiC タンパク質を ATP と共に試験管内で混合することにより，KaiC のリン酸化リズムを再構成できることが示されている（Nakajima et al., 2005）．

4. Ca^{2+} による概日リズムの制御

哺乳類の視交叉上核において，細胞内の Ca^{2+} レベルは概日リズムを示す．Ca^{2+} 指示薬である fura-2-AM により細胞内 Ca^{2+} レベルを定量すると，恒暗条件下で動物にとって昼に当たる時刻（主観的昼）に採取したラットの視交叉上核の神経細胞では，主観的夜に採取した細胞と比べて Ca^{2+} 濃度が高いことが示された（Colwell 2000）．この結果と一致して，電気生理学的な解析によって，昼間（ZT4–8，用語説明 2 参照）に採取されたラットの視交叉上核の細胞は，夜間（ZT13–20）に採取されたものと比べて，高振幅の Ca^{2+} 電流が観察される（Pennartz et al., 2002）．池田らは，組織培養した視交叉上核の神経細胞においても細胞質 Ca^{2+} レベルは明瞭な概日リズムを示すことを報告し，細胞内 Ca^{2+} は自律的に概日振動していることを明らかにした（Ikeda et al., 2003）．Ca^{2+} リズムのピークはおよそ CT1–6（用語説明 2 参照）に観察され，これは視交叉上核の発火頻度の概日リズムと比べて 2 から 7 時間ほど先行している（Ikeda et al., 2003; Enoki et al., 2017）（図 2）．この Ca^{2+} リズム

は視交叉上核の領域内において，背側領域に比して腹側領域の方がより高振幅のリズムを示し，ピーク位相が遅れている（Enoki et al., 2012）．この視交叉上核内での領域ごとのリズムのタイミングの差異は，PER2 タンパク質の発現リズムにも観察されることから，視交叉上核内では分子レベルでリズム振幅や位相に領域特異性が存在することが分かる（Enoki et al., 2017）．視交叉上核における Ca^{2+} リズムの振幅の見積もりは，実験条件によって見積もり値に差はあるものの，いくつかの報告で行われている（Harvey et al., 2020）．一例を挙げると，遺伝子コード型 Ca^{2+} センサーである Yellow cameleon 3.60 を用いた解析の場合，Ca^{2+} リズムのトラフおよびピーク値はそれぞれ，約 85 nM および約 120 nM であった（Enoki et al., 2012）．重要なことに，視交叉上核の単一の神経細胞を他の神経細胞やグリア細胞との物理的な接触が無い条件下で培養した場合でも，概日性 Ca^{2+} リズムは観察される（Hirata et al., 2019）．また，視交叉上核においては静止膜電位にも概日リズムが観察され，主観的昼にピークを示す（Enoki et al., 2017）．興味深いことに，この静止膜電位のリズムには Ca^{2+} や PER2 で観察されるような視交叉上核内の領域特異性は観察されない．そのため，静止膜電位は視交叉上核内で均一となるように制御されていると考えられる．

培養した視交叉上核の細胞において，培養液中の Ca^{2+} イオンを欠乏させると，神経の発火リズムやグルコースの取り込みリズムが消失する（Shibata et al., 1984; Shibata et al., 1987）．また，Ca^{2+} 結合タンパク質であるカルビンジン D28K の欠損マウスにおいて，自発行動の概日リズムの自律性および光同調性が障害されることから（Kriegsfeld et al., 2008），Ca^{2+} シグナルは視交叉上核における概日リズムの生成に重要であると考えられていた．Lundkvist らは，細胞内 Ca^{2+} イオンを BAPTA-AM によってキレートすると，*Per1* や PER2 ルシフェラーゼレポーターによる転写リズムが消失することを報告した（Lundkvist et al., 2005）．さらに，電位依存性 Ca^{2+} チャネル阻害剤を視交叉上核の培養スライスに投与すると，*Per1* ルシフェラーゼレポーターによる転写リズムは減衰する．また，人工受容体である DREADD システムによって Gq-Ca^{2+} シグナルを人為的に制御すると，視交叉上核の時計遺伝子の発現リズムが影響されることが示された（Brancaccio et al., 2013）．これらの結果より，細胞内 Ca^{2+} は転写翻訳フィードバックループの振動形成に深く関わっていることが分かったが，どういったシグナル分子が転写翻訳フィードバックループを制御するのかは明らかになっていなかった．

5. Ca^{2+} シグナルは CaMKII よって転写翻訳フィードバックループに伝達される

金らは，Rat-1 線維芽細胞を用いて概日時計の発振メカニズムを解析している過程で，Ca^{2+} 依存性のリン酸化酵素の活性が，転写翻訳フィードバックループの振動に必須であることを見出した（Kon et al., 2014; Kon et al., 2015）．*Bmal1* ルシフェラーゼレポーターを発現した Rat-1 線維芽細胞に CaMKII 阻害剤の KN-93 を投与すると，用量依存的に転写リズムの振幅は減衰した．CaMKII は細胞内 Ca^{2+} の上昇によって活性化するタンパク質リン酸化酵素である．細胞内で上昇した Ca^{2+} はカルモジュリンと結合し，Ca^{2+}-カルモジュリン複合体は CaMKII に結合する．これにより，CaMKII は自己リン酸化を介して活性化型となり，種々のタンパク質基質をリン酸化する．哺乳類において，CaMKII は CaMKIIα, CaMKIIβ, CaMKIIγ, CaMKIIδ という 4 つの遺伝子にコードされており，CaMKIIα と CaMKIIβ は脳に強く発現し，CaMKIIγ と CaMKIIδ は様々な組織に広範に発現する．NIH3T3 細胞において，CaMKIIγ および CaMKIIδ を siRNA にてノックダウンした場合，*Bmal1* ルシフェラーゼレポーターによる発光リズムの振幅が大幅に低下したことから，CaMKII は転写リズムの生成に必要であることが分かった（Kon et al., 2014）．また，Rat-1 細胞において CaMKII 阻害剤を投与すると，E-box により制御されている *Per1*，*Per2* などの遺伝子の発現は強く抑制される一方，*Bmal1* など RORE によって制御されている遺伝子は発現上昇した状態で転写リズムが停止する．そして生化学的な解析から，CaMKII は CLOCK のリン酸化を促進することで CLOCK と BMAL1 のヘテロ二両体の形成を促進し，E-box を介して遺伝子の転写を活性化することが分かった（図 3）．

視交叉上核において，Ca^{2+} は CT1–6 にピークを示し，CaMKII の自己リン酸化のピークは CT4 に観察される（Agostino et al., 2004）．この CaMKII の活性化ピークから少し遅れて *Per1* 遺伝子が発現ピークを示す（Ueda et al., 2005）．末梢組織である肺においても，CaMKII の自己リン酸化リズムと時計遺伝子の発現リズムはともに CT10–14 においてピークを示す（Kon et al., 2015）．このことから，視交叉上核だけでなく，末梢の組織においても CaMKII の活性化リズムと E-box 依存的な転写リズムはほぼ同じ位相でピークを示すことが分かった．視交叉上核に発現するアイソフォームの一つである CaMKIIα に関して，キナーゼ失活変異（ノックイン）マウスの輪回し行動リズムを解析したところ，リズム周期

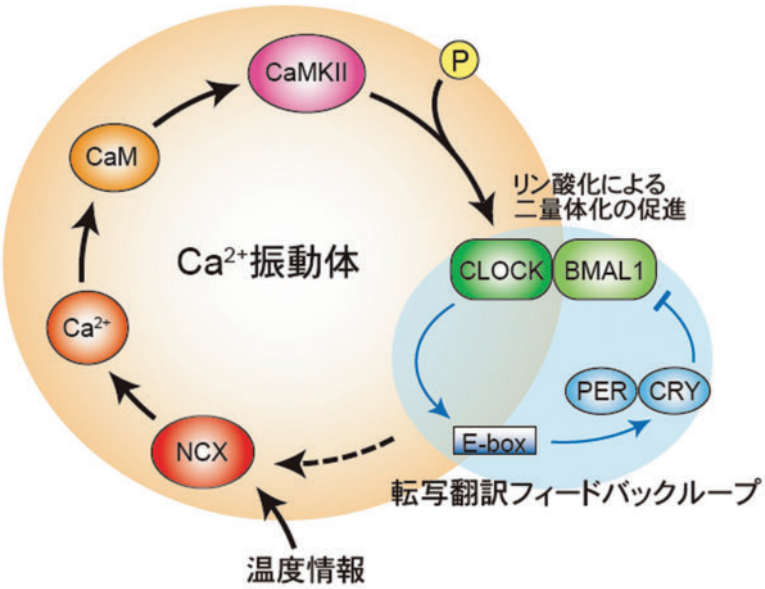

図 3：哺乳類の概日時計の分子メカニズム
概日性の Ca^{2+} リズムは CaMKII の活性リズムを生み出す．CaMKII は CLOCK をリン酸化して CLOCK と BMAL1 の結合を促す．活性化した CLOCK-BMAL1 によって *Per* や *Cry* の遺伝子発現が亢進する．NCX は温度低下に応じて細胞内 Ca^{2+} 流入を促進し，CaMKII を活性化することで転写翻訳フィードバックループを加速し，転写リズムの温度補償性を担う．本図は先行文献より改変して使用した（Kon et al. 2014; Kon et al. 2021）．

の長周期化と一過的なリズム消失が観察された（Kon et al., 2014）．視交叉上核の急性培養スライスを用いた PER2 ルシフェラーゼレポーターによるイメージング解析の結果，CaMKII 活性は単一の細胞レベルのリズム振幅の維持に加え，細胞間のカップリングにも重要な因子であることが分かった．

6. Ca^{2+} による転写リズムの温度補償性の制御

転写リズムを生み出す転写翻訳フィードバックループは，遺伝子の転写や翻訳，タンパク質の核移行など，温度感受性の反応が多く含まれている．そのため私たちは，転写翻訳フィードバックループの温度補償性には，温度に応じて機能する細胞内シグナルが存在するのではないかと着想し，温度補償性に関わる分子の探索を試みた．Rat-1 線維芽細胞の転写リズムを *Bmal1* ルシフェラーゼレポーターにより測定した際には，37℃での転写リズムの周期は 23.3 時間に対し，32℃では 21.2 時間であることが分かった．そのため，培養細胞においても概日リズム周期の過補償現象が観察されることが分かった（Kon et al., 2021）．この細胞実験系を用いて，転写リズムの温度補償性に影響を及ぼす低分子化合物をスクリーニングした．その結果，CaMKII 阻害剤 KN-93，あるいは Na^{+}/Ca^{2+} 交換輸送体の阻害剤である KB-R7943 や SEA0400 の存在下では，転写リズムの温度補償性が大きく阻害されることが分かった．本結果から Ca^{2+} シグナルが温度補償性に関わることが示唆されたため，筆者らは Ca^{2+} シグナルと温度の関係に関して文献を検索した．そして，Rapid cold hardening（RCH）という低温耐性の獲得機構に着目した．ニクバエの一種である *Sarcophaga crassipalpis* では，通常の飼育温度である 25℃の状態から，－10℃で 2 時間飼育すると，80％以上の個体が死亡する（Lee et al., 1987）．しかし，25℃の状態から，0℃で 1 時間飼育した後に，－10℃に暴露すると，死亡個体は 20％以下へと大きく減少する．この数分から数時間で獲得される低温耐性は RCH と呼ばれ，Ca^{2+} や CaMKII が関わることが知られていた（Teets et al., 2013）．そこで私たちは，哺乳類の細胞においても温度低下に応じて細胞内 Ca^{2+} レベルが上昇し，CaMKII が活性化することで概日時計の温度補償性を担っているのではないかと着想した．

Ca^{2+} 指示薬である Fluo-4 を用いて，マウス由来線維芽細胞である NIH3T3 細胞における Ca^{2+} レベルを定量イメージングしたところ，37℃から 27℃への温度低下に伴い，Fluo-4 の蛍光レベルの上昇が観察された．この温度低下による蛍光シグナルの上昇は，NCX 阻害剤である KB-R7943 あるいは SEA0400 により阻害されたことから，NCX は温度低下に応じて細胞内 Ca^{2+} レベルを上

昇させることが明らかとなった．またこの際，細胞内のCaMKII活性も上昇することが分かった．さらなる解析から，細胞内CaMKII活性の上昇は転写フィードバックループの振動速度を早めることが分かった．そのため，低温で活性化するCa^{2+}-CaMKIIによって転写フィードバックループの振動速度が加速されることで，温度補償性が成立することが示唆された（図3）．

次に私たちは，低温性Ca^{2+}シグナルによるタンパク質リン酸化の亢進が昆虫や植物の組織でも観察されるのかを調べた．外気温を25℃から4℃に変化させた場合，ショウジョウバエの頭部組織ライセートにおいてCaMKII活性の上昇が確認された．また，シロイヌナズナの地上部組織を用いたライセートにおいても，22℃から4℃に変化させた際に，CaMKIIの基質ペプチドであるsyntide-2に対するリン酸化活性の上昇が観察された．シロイヌナズナにおいてCaMKIIは存在しないが，Ca^{2+}やカルモジュリン依存性のリン酸化酵素は多く存在している（Liese & Romeis, 2013）．そのため，植物における低温性Ca^{2+}シグナルを媒介するリン酸化酵素の発見は，概日リズムや低温応答の分子機構の理解に貢献すると考えられる．

哺乳類の視交叉上核におけるCa^{2+}シグナルの温度応答を解析するため，光イメージング実験を行った．視交叉上核の培養スライスにおいて，35℃において観察された明瞭な概日Ca^{2+}リズムは，28℃においても継続したが，この際，リズムのピークおよびトラフはともに上昇することが分かった．この結果から，環境温度の変化は，細胞内のCa^{2+}レベルを全体的に上昇させる形で細胞内へ情報伝達されることが分かった．

低温性Ca^{2+}シグナルは進化的にどの生物まで保存されているのだろうか？　シアノバクテリアにおいても，環境温度の低下は細胞内Ca^{2+}レベルを上昇させることが知られている（Torrecilla et al., 2003）．そのため，低温性Ca^{2+}シグナルはバクテリアのような原核生物においても保存された低温応答であると考えられる．また，低温性Ca^{2+}シグナルを媒介するNCXは全ての真核生物と原核生物に存在すると言われている（Emery et al., 2012）．そこで，シアノバクテリアにおいてNCXをコードする*yrbG*遺伝子のノックアウト株を作製し，概日リズムの温度補償性を解析した．その結果，野生型におけるP_{KaiBC}::luxABレポーターの発光リズムのQ_{10}値は1.2であったのに対し，*yrbG*欠損株では1.5となり，転写リズムの温度補償が阻害されることが明らかとなった．これらの結果から，NCXに依存した低温性Ca^{2+}シグナルは，生物界を超えて概日リズムの温度補償性に関わることが明らかとなった．すなわち，真核生物と原核生物に保存された初めての時計因子として，NCXの存在が明らかとなった（図4）．

7. 今後の展開

転写フィードバックループを構成する転写関連因子は各生物界で異なるため，これまで，概日時計機構そのものが生物界で独立進化したと考えられていた．しかし最近の私たちの研究から，真核生物と原核生物に保存された初めての時計因子としてNCXの存在が明らかとなったため，Ca^{2+}に基づいた祖先的な概日時計が共通祖先に存在していたことが示唆された．NCXの機能保存性を考慮すると，NCXによる低温性Ca^{2+}シグナルが祖先的な概日時計の形成に寄与したとも考えられる．もしかしたら，日内の環境変化に伴う温度サイクルが低温性Ca^{2+}シグナルのサイクルを生み出し，起源的な時計を形成したのかもしれない．今後の研究によってNCX依存的なCa^{2+}シグナルの理解が進めば，各生物界における概日時計の進化や，起源が明らかになると期待される．

用語説明

1. 主観的昼・主観的夜

24時間周期の明暗環境サイクルでは，昼間（明期）と夜間（暗期）に応じて動物の行動や生理は変化する．一方，環境変化の無い恒常的な環境（例えば恒常的な暗条件）でも約24時間周期で昼と夜にみられる概日リズムが現れる．このような概日リズムの自由継続条件において，昼間に相当する生理現象がみられる時間帯を主観的昼と呼び，夜間に相当する生理現象がみられる時間帯を主観的夜という．一定の環境条件においても生物が「主観的に」昼と判断している時間帯と，「主観的に」夜と判断している時間帯があるという考え方に基づく用語である．

2. Zeitgeber Time（ZT）・Circadian time（CT）

Zeitgeber（ドイツ語）は英語のTime giverを表し，環境サイクルに合わせた時間制を示す．例えば，明期12時間，暗期12時間という24時間の明暗サイクルで動物を飼育した場合，明周期の開始時刻をZeitgeber Time（ZT0），暗周期の開始時刻をZT12とする．

一方でCircadian time（CT）は，身の回りに存在する機械式の時計ではなく，生物の概日リズムに基づいた時間制である．概日リズムの周期は正確には24時間ではないが，この周期を24時間に見立て，24等分して用いる．例えば周期が23時間の概日リズムの場合には，1 Circadian Timeは，23/24時間で57.5分に相当する．普通は，主観的昼の始まりをCT0とする．この位相は，生物が24時間の明暗サイクルに同調しているとき，明期の開始（ZT0）に対応する．

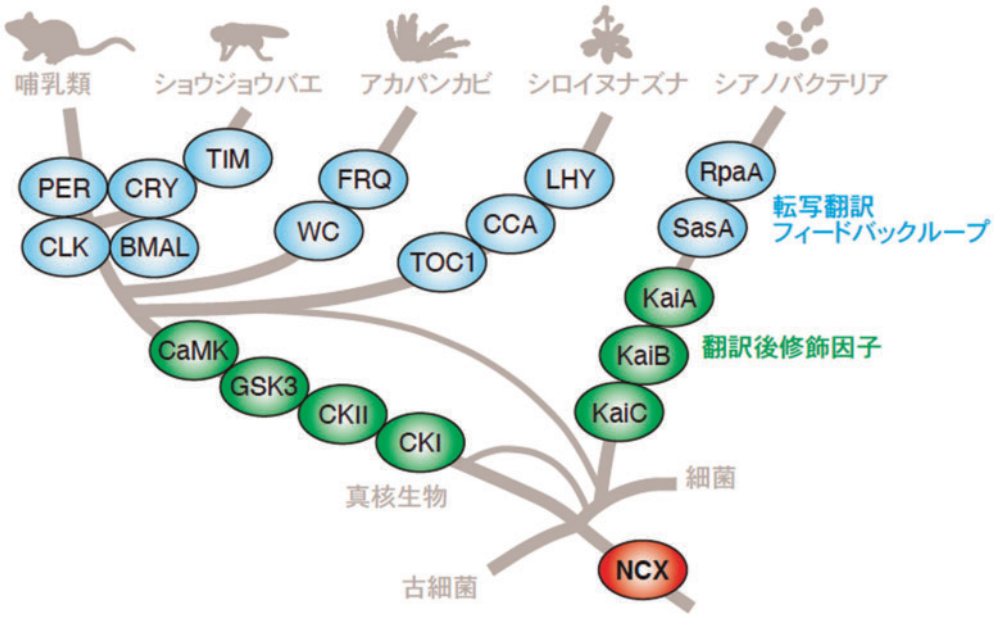

図 4：各生物界における時計遺伝子と進化的保存性
転写リズムを生み出す時計遺伝子は動物界，真菌界，植物界，細菌界で配列の相同性が限定的であることから，独立進化したと考えられている．真核生物においては，カゼインキナーゼ 1（CK1）やカゼインキナーゼ 2（CK2），グリコーゲンシンターゼキナーゼ 3（GSK3）などのリン酸化酵素は周期制御という観点で役割が保存されている．シアノバクテリアにおいては KaiA，KaiB，KaiC のタンパク質複合体が自律振動体を形成する．NCX は現生の全ての生物種に保存されていることから，全生命の共通祖先から存在した遺伝子と考えられている．本図は先行文献より改変して使用した（Kon et al. 2021）．

引用文献

海老原史樹文，深田吉孝（1999）生物時計の分子生物学．シュプリンガー・フェアラーク，東京．

岡村均，深田吉孝（2004）時計遺伝子の分子生物学．シュプリンガー・フェアラーク，東京．

海老原史樹文，吉村崇（2012）時間生物学．化学同人．

金尚宏，深田吉孝（2019）生物時計と体のリズム．学術の動向．24，8–19

Agostino, P. V., Ferreyra, G. A., Murad, A. D., Watanabe, Y., Golombek, D. A. (2004). Diurnal, circadian and photic regulation of calcium/calmodulin-dependent kinase II and neuronal nitric oxide synthase in the hamster suprachiasmatic nuclei. Neurochem Int., **44**, 617–625.

Balsalobre, A., Brown, S. A., Marcacci, L., Tronche, F., Kellendonk, C., Reichardt, H. M., Schütz, G., Schibler, U. (2000). Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. Science, **289**, 2344–2347.

Balsalobre, A., Damiola, F., Schibler, U. (1998). A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. Cell, **93**, 929–937.

Balsalobre, A., Marcacci, L., Schibler, U. (2000). Multiple signaling pathways elicit circadian gene expression in cultured Rat-1 fibroblasts. Curr Biol., **10**, 1291–1294.

Brancaccio, M., Maywood, E. S., Chesham, J. E., Loudon, A. S. I., Hastings, M. H. (2013). A Gq-Ca^{2+} axis controls circuit-level encoding of circadian time in the suprachiasmatic nucleus. Neuron, 78, 714–728.

Cohen, S. E., Golden, S. S. (2015). Circadian Rhythms in Cyanobacteria. Microbiol Mol Biol Rev., **79**, 373–385.

Colwell, C. S. (2000). Circadian modulation of calcium levels in cells in the suprachiasmatic nucleus. Eur J Neurosci., **12**, 571–576.

Emery, L. Whelan, S., Hirschi, K. D., Pittman, J. K. (2012). Protein phylogenetic analysis of Ca^{2+}/cation antiporters and insights into their evolution in plants. Front. Plant Sci., **3**, 1.

Enoki, R., Kuroda, S., Ono, D., Hasan, M. T., Ueda, T., Honma, S., Honma, K. (2012). Topological specificity and hierarchical network of the circadian calcium rhythm in the suprachiasmatic nucleus. Proc Natl Acad Sci USA., **109**, 21498–21503.

Enoki, R., Oda, Y., Mieda, M., Ono, D., Honma, S., Honma, K. (2017). Synchronous circadian voltage rhythms with asynchronous calcium rhythms in the suprachiasmatic nucleus. Proc Natl Acad Sci USA., **114**, E2476-E2485.

Enoki, R., Ono, D., Kuroda, S., Honma, S., Honma, K. (2017). Dual origins of the intracellular circadian calcium rhythm in the suprachiasmatic nucleus. Sci Rep., **7**, 41733.

Harvey, J. R. M., Plante, A. E., Meredith, A. L. (2020). Ion Channels Controlling Circadian Rhythms in

Suprachiasmatic Nucleus Excitability. Physiol Rev., **100**, 1415–1454.

Hastings, J. W., Sweeney, B. M. (1957). On the mechanism of temperature independence in a biological clock. Proc Natl Acad Sci USA., **43**, 804–811.

Hirata, Y., Enoki, R., Kuribayashi-Shigetomi, K., Oda, Y., Honma, S., Honma, K. (2019). Circadian rhythms in Per1, PER2 and Ca^{2+} of a solitary SCN neuron cultured on a microisland. Sci Rep., **9**, 18271.

Ikeda, M., Sugiyama, T., Wallace, C. S., Gompf, H. S., Yoshioka, T., Miyawaki, A., Allen, C. N. (2003). Circadian dynamics of cytosolic and nuclear Ca^{2+} in single suprachiasmatic nucleus neurons. Neuron, **38**, 253–263.

Kon, N., Hirota, T., Kawamoto, T., Kato, Y., Tsubota, T., Fukada, Y. (2008). Activation of TGF-beta/activin signalling resets the circadian clock through rapid induction of Dec1 transcripts. Nat Cell Biol., **10**, 1463–1469.

Kon, N., Sugiyama, Y., Yoshitane, H., Kameshita, I., Fukada, Y. (2015). Cell-based inhibitor screening identifies multiple protein kinases important for circadian clock oscillations. Commun Integr Biol., **8**, e982405.

Kon, N., Wang, H., Kato, Y. S., Uemoto, K., Kawamoto, N., Kawasaki, K., Enoki, R., Kurosawa, G., Nakane, T., Sugiyama, Y., Tagashira, H., Endo, M., Iwasaki, H., Iwamoto, T., Kume, K., Fukada, Y. (2021). Na^{+}/Ca^{2+} exchanger mediates cold Ca^{2+} signaling conserved for temperature-compensated circadian rhythms. Science Adv., 7, eabe8132.

Kon, N., Enoki, R., Wang, H., Fukada, Y. Roles of Ca^{2+} Signaling in Molecular Clocks. Circadian clocks, In press

Kon, N., Yoshikawa, T., Honma, S., Yamagata, Y., Yoshitane, H., Shimizu, K., Sugiyama, Y., Hara, C., Kameshita, I., Honma, K., Fukada, Y. (2014). CaMKII is essential for the cellular clock and coupling between morning and evening behavioral rhythms. Genes Dev., **28**, 1101–1110.

Konopka, R. J., Benzer, S. (1971). Clock mutants of Drosophila melanogaster. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 68, 2112–2116.

Kriegsfeld, L. J., Mei, D. F., Yan, L., Witkovsky, P., Lesauter, J., Hamada, T., Silver, R. (2008). Targeted mutation of the calbindin D28K gene disrupts circadian rhythmicity and entrainment. Eur J Neurosci., 27, 2907–2921.

Lee, J. R. E., Chen, C. P., Denlinger, D. L. (1987). A rapid cold-hardening process in insects. Science, 238, 1415–1417.

Liese, A., Romeis, T. (2013). Biochemical regulation of in vivo function of plant calcium-dependent protein kinases (CDPK). Biochim Biophys Acta, **1833**, 1582–1589.

Lundkvist, G. B., Kwak, Y., Davis, E. K., Tei, H., Block, G. D. (2005). A calcium flux is required for circadian rhythm generation in mammalian pacemaker neurons. J Neurosci., 25, 7682–7686.

Moore, R. Y., Eichler, V. B. (1972). Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. Brain Res., **42**, 201–206.

Nakajima, M., Imai, K., Ito, H., Nishiwaki, T., Murayama, Y., Iwasaki, H., Oyama, T., Kondo, T. (2005). Reconstitution of circadian oscillation of cyanobacterial KaiC phosphorylation in vitro. Science, **308**, 414–415.

Pennartz, C. M. A., de Jeu, M. T. G., Bos, N. P. A., Schaap, J., Geurtsen, A. M. S. (2002). Diurnal modulation of pacemaker potentials and calcium current in the mammalian circadian clock. Nature, 416, 286–290.

Pittendrigh, C. S. (1954). On temperature independence in the clock system controlling emergence time in Drosophila. Proc Natl Acad Sci USA., **40**, 1018–1029.

Refinetti, R. (2016). Circadian Physiology, 3rd edition. CRC Press.

Richter C. P. (1965). Biological Clocks in Medicine and Psychiatry. Charles C. Thomas, Springfield.

Shibata, S., Newman, G. C., Moore R. Y. (1987). Effects of calcium ions on glucose utilization in the rat suprachiasmatic nucleus in vitro. Brain Res., 426, 332–338.

Shibata, S., Shiratsuchi, A., Liou, S. Y., Ueki, S. (1984). The role of calcium ions in circadian rhythm of suprachiasmatic nucleus neuron activity in rat hypothalamic slices. Neurosci Lett., 52, 181–184.

Stephan, F. K., Zucker, I. (1972). Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. Proc Natl Acad Sci USA., **69**, 1583–1586.

Teets, N. M., Yi, S. X., Lee J. R. E., Denlinger, D. L. (2013). Calcium signaling mediates cold sensing in insect tissues. Proc Natl Acad Sci USA., **110**, 9154–9159.

Toh, K. L., Jones, C. R., He, Y., Eide, E. J., Hinz, W. A., Virshup, D. M., Ptácek, L. J., Fu, Y. H. (2001). An hPer2 phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phase syndrome. Science, **291**, 1040–1043.

Torrecilla, F. Leganés, I. Bonilla, F. Fernández-Piñas. (2000). Use of recombinant aequorin to study calcium homeostasis and monitor calcium transients in response to heat and cold shock in cyanobacteria. Plant Physiol., **123**, 161–176.

Ueda, H. R., Hayashi, S., Chen, W., Sano, M., Machida, M., Shigeyoshi, Y., Iino, M., Hashimoto, S. (2005). System-level identification of transcriptional circuits underlying mammalian circadian clocks. Nat Genet., **37**, 187–192.

Yamazaki, S., Numano, R., Abe, M., Hida, A., Takahashi, R., Ueda, M., Block, G. D., Sakaki, Y., Menaker, M., Tei, H. (2000). Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. Science, **288**, 682–685.