

## 論文の内容の要旨

論文題目 Novel Resetting Mechanism of Peripheral Circadian Clock in Mammals  
(哺乳類における末梢概日時計の同調機構の解析)

氏名 廣田 毅

地球上のほとんど全ての生物は体内に概日時計を持っており、代謝や行動など様々な生理現象が約1日周期のリズムを示す。哺乳類において概日時計の発振系は、転写因子 CLOCK-BMAL1 による *Per* および *Cry* 遺伝子の転写活性化を、PER・CRY タンパク質が自ら抑制するという、負のフィードバックループによって構成されている。この発振系は、行動リズムを支配する視床下部の視交叉上核だけでなく、肝臓や心臓など様々な末梢組織にも存在し、それぞれを中枢時計・末梢時計と呼ぶ。概日時計は自律的に発振するだけでなく、外界の環境変化に同調するという重要な特徴を持っており、中枢時計は網膜で受容された光シグナルを介して外界の24時間周期に同調する。一方、末梢時計は何らかの因子を介して中枢時計に支配されると考えられており、その研究モデルとして rat-1 細胞などの培養細胞が用いられている。というのも、rat-1 細胞を血清で刺激すると *Per1* と *Per2* の発現量が急激に増加し、それに続いて時計遺伝子の発現量が概日リズムを示すからである。この *Per1/2* の一過的な発現上昇は、中枢時計の光同調においても見られ、概日時計のリセットにおいて重要な役割を果たすと考えられてきた。しかしながら、生体内における末梢時計の同調機構および同調因子の分子実体は未だ謎に包まれている。そこで私は rat-1 細胞を用いて、哺乳類における末梢時計の同調機構の研究を行った。

ショウジョウバエやゼブラフィッシュにおいては、末梢時計が外界の明暗周期に直接的に

同調するため、まず初めに明暗周期が rat-1 細胞の時計遺伝子発現に与える影響を解析した。Rat-1 細胞を明暗条件下でコンフルエントに達するまで培養し、その 1 日後に培地を無血清培地に交換して、4 時間おきに細胞を回収した。各サンプルから RNA を調製し、定量的 RT-PCR 法によって時計遺伝子 *Bmal1* の発現変化を解析したところ、意外なことに、培地交換後に *Bmal1* 発現量が概日リズムを示すことを見出した (図 1、実線)。このリズムの位相は、明暗条件を逆転させた場合や恒暗条件においても変化しなかったことから、外界の明暗周期は rat-1 細胞の末梢時計に影響を与えないといえる。

ここで、培地交換による概日リズムの誘導は食餌による栄養補給を連想させ、興味深いと思われた。というのも最近の研究から、中枢時計による支配よりも食餌のタイミングが末梢時計を強く同調させることが明らかにされたからである。そこで、*Bmal1* 以外の時計遺伝子についても培地交換後の発現変化を解析したところ、*Per2* と *Dbp* の発現量も顕著な概日リズムを示すことが判明した (図 1、実線)。このリズムは血清刺激をした場合 (図 1、点線) と比較すると、位相が約 4 時間前進していた。しかも興味深いことに、血清刺激の場合とは異なり、*Per1* と *Per2* の発現量は培地交換の直後に増加せず、むしろ 4 時間後にかけて減少した。

以上の結果から、培地交換によるリズム誘導は血清刺激の場合とは異なる新規の経路を介すると考えられた。実際、血清刺激によるリズム誘導において重要な役割を果たす ERK/MAPK のリン酸化は、培地交換によるリズム誘導においては必須ではないことが判明した。

培地交換の操作は細胞に様々な影響を与えられ、次に *Per1/2* の発現低下を引き起こす原因を探索した。まず物理的な影響を調べるために、培地を他のディッシュ由来の使い古した培地と交換したが、*Per1/2* の発現量は変化しなかった。そこで培地の各成分である塩・グルコース・ピルビン酸・アミノ酸・ビタミンを個別に投与したところ、グルコースを投与した場合のみ、*Per1/2* の発現量がともに減少することを見出した。さらに、グルコースの投与が *Per2*・*Dbp*・*Bmal1* の発現リズムを誘導することを明らかにした。このリズムは培地交換後のリズムと波形が似ていたことから、培地交換によるリズム誘導の主な原因はグルコースの添加にあると考えられた。以上の結果は、食物の主成分のひとつであるグルコースが、rat-1 細胞の末梢時計

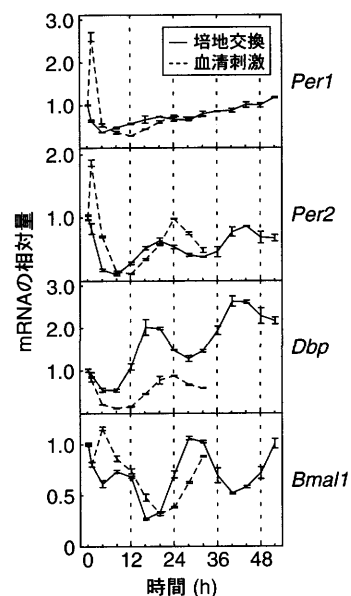


図1. 培地交換による新規の概日リズム誘導現象

実線：rat-1細胞をコンフルエントになるまで培養し、時間0に培地を無血清培地に交換した。

点線：先行研究に従い、細胞を時間0から2時間血清刺激した後、培地を無血清培地に交換した。

各時間に細胞を回収し、定量的 RT-PCR 法によって時計遺伝子の発現量を解析した。

を同調させうることを示している。血中グルコース濃度が日内変動することや、制限給餌下でおこる食餌予知行動リズムの位相をグルコースがシフトさせるという知見をあわせると、*in vivo*においてグルコースが食餌時間を末梢時計に伝達している可能性が高いと考えられる。

そこで次に、グルコースが *Per1/2* の発現を低下させ、概日リズムを誘導する機構を解析しようと考えた。まず、グルコースの代謝の必要性を調べるために様々なグルコース類似物質を投与したところ、代謝可能なガラクトース・フルクトース・マンノースは *Per1/2* の発現を低下させたのに対し、代謝されないマンニトールや 3-O-メチルグルコースは影響を与えなかった。この結果はグルコース代謝の重要性を示している。ここで、NADH/NAD<sup>+</sup>比は CLOCK-BMAL の DNA への結合を調節することから、この比の変化を介してグルコースが *Per1/2* 発現を低下させる可能性が考えられた。しかし、ピルビン酸は *Per1/2* 発現に影響を与えなかったことから、次にグルコースの効果が遺伝子の転写・翻訳を介する可能性を阻害剤を用いて検証した。その結果、タンパク質合成阻害剤および RNA 合成阻害剤の両者によってグルコースの効果が抑制されたため、グルコースは遺伝子の転写・翻訳を介して *Per1/2* の発現を低下させると考えられた。

そこで、*Per1/2* の発現低下を導くような因子を探索するため、グルコース投与によって発現量が増加する遺伝子を DNA マイクロアレイを用いて網羅的に解析した。グルコース投与の直前と投与の 1 時間後・4 時間後に、各時刻 4 点ずつ計 12 点で解析を行った結果、8,800 個のプロブセットの中からシグナル強度が 3 倍以上変化するものを 176 個（既知遺伝子 140 個、重複 3 個、機能未知 EST 43 個）見出した。これらを発現量の経時変化に基づいて分類したところ、8 個のクラスターに別れた。グルコース投与の 1 時間後にシグナル強度が増加する 3 個のクラスター（24 個のプロブセット）の中には、2 つ転写制御因子 *TIEG1* と *VDUP1* が存在し、さらに、1 時間後にシグナル強度が 2.5 倍に増加するものの中に転写抑制因子 *HES1* を見出した。一方、視交叉上核において光誘導される一連の転写因子の発現量は、グルコースの影響をほとんど受けなかった。この結果からも、グルコースによるリズム誘導が新規のものであることがわかる。

*Tiegl*・*Vdupl*・*Hes1* 遺伝子は *Per1/2* の発現低下に関与すると考えられたので、グルコース応答を RT-PCR 法によって詳細に解析したところ、いずれの発現量もグルコース投与の 1 時間後にピークに達することが判明した。一方、代謝されない 3-O-メチルグルコースを投与した場合、*Tiegl* と *Vdupl* の発現量はほとんど増加しなかったが、*Hes1* の発現はグルコース投与の場合と同様の変化を示した。これらの結果から、*Tiegl* と *Vdupl* の発現はグルコース代謝によって急激に上昇すると考えられた。*Per1/2* 発現の低下もグルコース代謝に依存していたことから、*Tiegl*・*Vdupl* 遺伝子の重要な役割が示唆された。さらに、タンパク質・RNA の合成阻害剤を用いた解析から、*Tiegl* と *Vdupl* 遺伝子はグルコース応答性の前初期遺伝子であるこ

とが判明した。

VDUP1 はチオレドキシンの機能阻害分子であり、チオレドキシンは-SH 基の還元反応を介して様々な転写因子と DNA や coactivator の CBP/p300 との結合を促進する。CLOCK-BMAL1 による転写の活性化も CBP/p300 を介することから、VDUP1 がチオレドキシンを阻害し、CLOCK-BMAL1 を不活性化することにより、*Per1/2* の発現低下をひき起こす可能性が考えられる (図 2)。一方、TIEG1 は Sp1 配列に結合する転写抑制因子である。*Per1* や *Bmal1* 遺伝子の転写開始点付近には Sp1 配列が存在することから、TIEG1 が転写抑制をひき起こす可能性があるため (図 3)、これをルシフェラーゼレポーターアッセイによって検証した。その結果、2.2 kb の *Per1* プロモーターおよび 2.8 kb の *Bmal1* プロモーターからの転写を、TIEG1 が用量依存的に抑制することが判明した。*Bmal1* プロモーターに対する TIEG1 の効果は強く、さらに Sp1 配列に依存していた。しかし、Sp1 配列を含む SV40 や CMV プロモーターからの転写は抑制されなかったことから、TIEG1 の作用は特異的であると考えられる。

これまで *Bmal1* 遺伝子の転写調節機構は不明であったことから、TIEG1 による *Bmal1* プロモーターの抑制は興味深く感じられた。そこで、マウスの肝臓における *Tieg1* の発現変化を解析したところ、*Per1* リズムに近く、*Bmal1* リズムとは正反対の位相でリズムを示すことが判明したため、末梢時計の発振において TIEG1 が *Bmal1* 遺伝子の負の制御因子として働く可能性が考えられた。

以上の解析を通じて本研究では、食物の主要成分であるグルコースが末梢時計の同調因子として働く可能性を示すことができた。さらに、グルコースによる時計同調が新規の経路を介することを示し、この過程に関与する候補因子の同定に成功した。なかでも TIEG1 は、*Bmal1* 遺伝子の負の制御因子として、末梢時計の発振においても重要な役割を果たすことが示唆された。

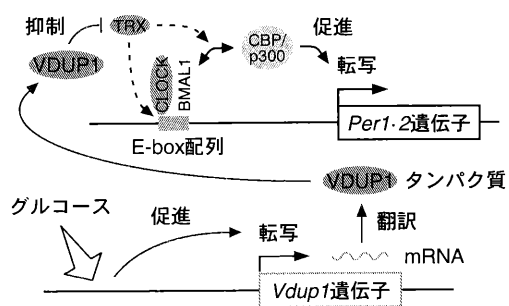


図2. グルコースによる末梢時計の同調において VDUP1が果たす役割 (モデル)  
TRX, チオレドキシシン

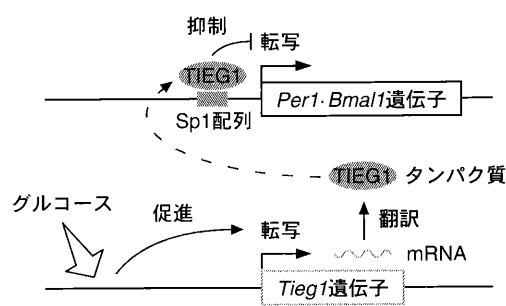


図3. グルコースによる末梢時計の同調において TIEG1が果たす役割 (モデル)