

# 時計遺伝子の転写制御機構とその生理的意義に関する研究

山宿 大介

## 略語表

Apo	apolipoprotein
ARNT	aryl hydrocarbon nuclear translocator
bHLH	basic helix-loop-helix
Bmal1	brain and muscle arnt like 1
CCG	clock-controlled gene
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CPT1 $\alpha$	carnitine palmitoyltransferase 1 $\alpha$
Cry	cryptochrome
CYP	cytochrome P-450
dbcAMP	dibutyryl cyclic adenosine monophosphate
DBP	D site albumin promoter binding protein
DEC	differentiated embryo chondrocyte
DEX	dexamethasone
dLuc	destabilized firefly luciferase
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNase	deoxyribonuclease
EDTA	ethylene diamine tetraacetate
E4BP4	E4 promoter binding protein
EHS gel	Engelbreth-Holm-Swarm sarcoma gel
FAS	fatty acid synthase
FBS	fetal bovine serum
FXR	farnesoid X activated receptor
Gapdh	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HDL	high-density lipoprotein
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HMG-CoA	3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A
LDLR	lowdensity lipoprotein receptor
LXR	liver X receptor
MEM	minimum essential medium
mRNA	messenger ribonucleic acid
NPAS2	neuronal PAS-domain protein 2
PAR	proline and acidic amino acid-rich
PAS	period-arnt-single-minded
PBS	phosphate-buffered saline
PER	period
PEST	Pro/Glu/Ser/Thr-rich
PGC1 $\alpha$	peroxisome proliferator-activated receptor coactivator1 $\alpha$
PMT	photomultiplier tube
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptor
PVLA	poly-N-p-vinylvenzyl-D-lactonamide
REV-ERB $\alpha$	reverse erythroblastosis virus- $\alpha$
RNA	ribonucleic acid
ROR	retinoic acid receptor-related orphan receptor
RRE	Rev-erbA/ROR-binding element
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
SCN	suprachiasmatic nucleus

SEM	standard error of the mean
SHP	small heterodimer partner
siRNA	small-interfering RNA
SREBP	sterol regulatory element binding protein
STZ	streptozotocin
TBS	tris buffered saline
TIC	type I collagen
TIVC	type IV collagen
Tris	tris (hydroxymethyl) aminomethane
TSS	transcription start site
VLDL	very-low-density lipoprotein
WAT	white adipose tissue
ZT	zeitgeber time

## 目次

序章 .....	1
第一章 時計遺伝子 <i>Per1</i> 、 <i>Per2</i> の異なる位相を決定する時計制御配列の同定 .....	11
序 .....	13
結果 .....	15
考察 .....	30
第二章 細胞自律的な概日振動体における D-box 制御因子の役割 .....	32
序 .....	32
結果 .....	34
考察 .....	44
第三章 インスリンによる肝臓時計の同調 .....	46
序 .....	46
結果 .....	48
考察 .....	65
第四章 摂食タイミングによる肝臓時計の制御 .....	68
序 .....	68
結果 .....	70
考察 .....	80
総括 .....	82
実験材料と方法 .....	88
参考文献 .....	100
謝辞 .....	110
論文目録 .....	111

## 序章

概日リズムは、約 24 時間周期で変動する生理現象であり、35 億年前に海洋に誕生した生物が地球の自転により起こる太陽エネルギーの周期的変化に適応するために獲得した基本形質である[Dunlap,1999]。20 世紀後半に登場した分子生物学的手法により、生体の生理現象は分子レベルまで解体され、膨大な分子生物学的知見が蓄積された。遺伝子や分子という構成要素にまで解体された生物学は、いまや個体レベル、集団レベルでの再構成の流れにある。その意味で、遺伝子から行動まで生体の各レベルで検出可能な概日リズム機構の研究は、「いかに生命現象を再構成、統合していくのか」という 21 世紀の生命科学の非常によいモデルといえよう。生体リズム研究は、遺伝子の発現調節機構から、全身の生理統合機構などを、リズムという生理学現象で総括、検証することを目指す、極めて魅力的な研究分野に成長している。すなわち、時計遺伝子の発見に始まり、普遍的な時計振動発振機構の存在を明らかにした生体リズム研究は、細部の分析的な研究によって分子レベルで解明された生命現象を、もう一度、個体レベルに統合再構成させようとする生命科学の前衛的な研究分野に成長している。

ヒトをはじめとする多細胞生物においては、個々の時計細胞が階層的に集合することによって大きな時計体制が形成されている。時計遺伝子は脳のみならず、全身のほとんどの細胞にあるが[Sakamoto, 1998]、それらを統制する中枢時計は哺乳類の場合、視交叉上核 (suprachiasmatic nucleus; SCN) に存在することが示されている。すなわち、SCN を破壊するとその個体の行動などの概日リズムが消失し[Moore, 1972] [Sakamoto, 1998] (Fig. A)、SCN を破壊したハムスターに SCN の細胞を移植すると行動リズムが回復する[Lehman, 1987]。加えて、SCN は培養条件下においても減衰することなくリズムを刻み続けることができる[Yamazaki, 2000]。このように、中枢時計とは自体で減衰することなくリズムを刻み続けることができる概日時計である。一方、末梢時計は SCN がなくなればリズムを刻み続ける力が弱く、

次第に減衰、脱同調してしまう性質を持つ[Yamazaki, 2000] [Yoo, 2004] [Sakamoto, 1998] (Fig. A)。

多くのモデル生物を用いた精力的な解析により、概日リズムの分子機構に関する知見が蓄積されてきた。概日時計の振動を生み出すメカニズムの中核は時計遺伝子と呼ばれる一連の遺伝子群の転写と翻訳を介したフィードバック制御である。シアノバクテリアは、概日リズムの存在が明らかにされた唯一の原核生物であり、概日時計をもつ最も単純な生物である。3つの時計遺伝子 *kai* で構成され、*kaiC* からつくられる KaiC タンパク質が自分自身の遺伝子発現を抑制する[Harmer, 2001]。真核生物であるアカパンカビやショウジョウバエの時計タンパク質に相同性は見られないが、フィードバック制御による概日時計の振動安定化機構は共通している [Harmer, 2001] (Fig. B)。

哺乳類では bHLH 型転写因子である CLOCK と BMAL1 がヘテロ二量体を形成し、*Per* や *Cry* などネガティブ因子と呼ばれる遺伝子のプロモーター領域にある E-box に結合することで *Per* や *Cry* などの遺伝子発現を正に調節する。PER/CRY 複合体が CLOCK/ BMAL1 による転写の活性化を解除し、自分自身の転写を抑制する。この繰り返しが約 24 時間の周期を作り出す。このフィードバックループに加えて、時計遺伝子の応答配列、RRE と D-box を介した副次的ループも機能している[Reppert, 2002] (Fig. C)。

筆者らのグループは概日時計の転写制御ネットワークを効率的に検証するために、光電子増倍管を用いた *in vitro* 概日振動測定系を開発した[Ueda, 2002]。繊維芽細胞に高濃度血清やステロイドホルモンである Dex で刺激すると、時計遺伝子の概日振動を惹起できることが知られていた[Balsalobre, 1998] [Balsalobre, 2000] (Fig. D)。本研究では、ホタルルシフェラーゼの C 末端にマウスのオルニチン脱炭酸酵素の分解促進配列 (Pro/Glu/Ser/Thr-rich; PEST) を融合させた不安定化ルシフェラーゼ (destabilized firefly luciferase; dLuc) を作製した。この dLuc レポーターを、視交叉上核で“昼”に発現している *Per2* 遺伝子のプロモーターと“夜”に発現している *Bmal1* 遺伝子のプロモーターにつなげたコンストラクトを作製した。それぞれ

のコンストラクトを繊維芽細胞にトランスフェクションし、Dex で繊維芽細胞に概日振動を誘起した後、ルシフェリンを入れてレポーターからの発光を測定した[Balsalobre, 2000]。その結果、*Per2* と *Bmal1* はお互いに逆位相の振動を示し、この経時的発現プロファイルは生体内のそれと一致していた。この *in vitro* 概日振動測定系を用いて、RRE 配列が *Bmal1* 遺伝子と同位相、*Per2* 遺伝子と逆位相の概日発現振動を引き起こすことを明らかにした[Ueda, 2002]。転写制御 RRE 配列は、REV-ERB / ROR ファミリー (REV-ERB $\alpha$ 、REV-ERB $\beta$ 、ROR $\alpha$ 、ROR $\beta$ 、ROR $\gamma$ ) に属する転写因子の結合配列である[Ueda, 2002]。同様のアプローチによって、16 個の転写因子から構成される動的で複雑な転写ネットワークの存在が示唆された [Ueda, 2005]。時計遺伝子の発現調節領域に存在する E-box (“朝”配列)、RRE (“夜”配列) および D-box (“昼”配列) の 3 種類の DNA 結合配列の組み合わせによって、時計遺伝子の位相が決定される可能性が提唱された (Fig. E)。

従来は、ゲノム情報から探索した E-box などの DNA 結合配列を取り出して SV40 プロモーターで駆動させたレポーターでリズム発現を確認する手法が採られていたが[Ueda, 2005]、転写調節は DNA 結合配列ばかりでなくその周辺の配列やその配列と関連した転写因子群の構成、リン酸化などの修飾によっても行われており、DNA 結合配列の組み合わせのみで転写の位相を決定しているかどうか、さらなる検証実験が必要であった。本研究では、細胞と概日リズムを惹起する刺激薬剤の組み合わせを検討し、従来法より実験精度を向上させることに成功した。これにより、これまで提唱されてきた時計遺伝子転写制御ネットワークに修正を加えるべき発見をした。

まず、中枢および末梢組織における時計遺伝子の発現解析を実施し、予測に反して、*Per* 遺伝子の中では、*Per2* の位相(ピーク時刻) が最も遅いことを見出した。加えて、*in vitro* 概日振動測定系において、時計遺伝子の結合配列やその変異プロモーターを利用して、*Per2* 遺伝子発現の位相の遅れに関与する新規配列を同定した(第一章)。続いて、時計遺伝子の siRNA ノックダウンおよび cDNA 過剰発現によって、細胞自律的な概日時計振動体の表現型



を検証し、D-box 制御因子の量が、細胞の周期の長さの決定に重要な役割を果たしていることを明らかにした(第二章)。

これらの発見により、時計遺伝子群の転写制御ネットワーク機構によって、概日リズムの発現は説明できるようになった。しかし、培養系に移行すると脱同調してしまうような肝臓などの末梢組織の時計が、動物個体において、何によって同調されているのかという点は未解明のままで、まして、末梢時計の生理的意義はわかっていなかった。一方、夜行性のマウスに“昼”の時間帯にだけ餌を与えると、肝臓などの末梢組織の時計遺伝子のリズム発現が逆位相になることが報告された[Damiola, 2000]。そこで、筆者は、「食餌によって変動するホルモンなどの液性因子が末梢時計を同調させる」また、「末梢組織においては各々の組織や細胞特異的に同調を引き起こすシグナルを使い分けている」という二つの仮説を立て、検証することにした。一般に、株化された繊維芽細胞は、末梢時計のモデル系として汎用されているが、これらの仮説の検証には、インスリン感受性が高い肝細胞がより適していると考え、肝細胞を用いて同調因子を探索する方針とした。同調因子として働く因子は、一般的に処理する時間帯によりその作用が異なることが分かっている。強い光を夜に当てると時計は遅れるが、明け方から早朝に当てると時計は早まる[Daan, 1976] (Fig. F)。概日時計の位相シフトの特徴を判り易く視覚化するため、刺激を受けた時刻を横軸にとり、その刺激で誘導された位相シフトの向きと大きさを縦軸にプロットしたグラフを位相反応曲線という。光刺激によって、位相反応曲線が示され、光が同調因子であることの証明となる[Daan, 1976]。肝細胞の時計に対して、インスリンによる位相反応を検証するために、肝臓の分化表現型を高く維持することができる、ラット初代培養肝細胞を用いて、リズムが長時間維持できる培養手法を開発した。この過程で、肝細胞の時計が、3次元培養することによりシャーレ上で長く維持されることを見出した。この3次元培養と*in vitro* 概日振動測定系を組み合わせ、世界で初めて、インスリンが肝細胞の同調因子として働いていることを証明した。このことは、食事によりどのようにして末梢時計が制御されているかという問いに答えるものであった(第三章)。

最後に、肝臓の概日リズムの生理的意義を考察した。肝臓に豊富に存在する転写因子の1つであるDBPに概日リズムがあること[Wuarin, 1990]、DBPが時計遺伝子の転写制御のみならず、コレステロールの異化代謝の律速段階を担うCYP7A1の概日リズムも制御すること[Lavery, 1993]、CYP7A1はコレステロールを胆汁酸へと変換し体外へ排出するほぼ唯一の経路であり、その働きは血中コレステロール濃度の制御に非常に重要であること[Lavery, 1993]、が報告されていた。これらの知見を基に、「肝臓の概日リズムの脱同調が起こると、コレステロール代謝に異常を来すのではないか」と考えた。この仮説を検証するために、一日の摂食量は変えずに、それを4分の1量ずつ1日4回にして与えることで、“昼”“夜”を問わずに1日中食べる摂食スケジュールを用いる実験を考案した。この摂食リズムの崩壊によって、血中コレステロール濃度が増加した。さらに、代謝の中心的臓器である肝臓に焦点を当てて、分子メカニズムを解析したところ、CYP7A1のリズム異常に原因があることが分かった。すなわち、摂食リズムが崩壊すると、食事のタイミングとCYP7A1のリズムのタイミングにズレが生じて、コレステロール異化代謝能が低下することを発見した(第四章)。逆に言うと、正常なコレステロール代謝を維持するには、正常な肝臓の概日リズムの維持、それを導く規則正しい摂食タイミングが必要であることを示した。

本研究は、創薬における基盤研究に位置すると考えている。病気の症状に時刻依存性が見られることは、医療の面からも大きな注目を集めている[Paschos, 2010]。投薬時刻を制御することにより、薬効を上げて副作用を低下させる、時間薬理学的アプローチが成功している。例えば、高血圧治療において、朝方血圧が高くなりやすい患者には、その時刻に血中濃度が高まるような薬物投与が行われている[Paschos, 2010]。インターフェロンによる中枢性の副作用、うつ病や自殺は、投薬時刻を管理することにより、回避できる[Ohdo, 2001]。これからの創薬研究の方向性として、概日リズムの分子機構を解明し、それに直接作用することによって、睡眠覚醒リズムの異常などを正常化させるような薬物の探索に取り組むべきではないかと考えている。

本研究において、時計遺伝子の転写制御機構を解明するために採用した、*in vitro* 概日振動系は化合物スクリーニングへの応用が可能である。実際に、概日振動に影響を及ぼす化合物の同定に成功している事例もある。Casein Kinase や c-Jun N-terminal Kinase の阻害薬が、概日振動の周期に影響を与えることが報告された[Yagita, 2009]。しかし、これらはキナーゼの阻害薬であるため、細胞選択性を出すのは困難であると推測される。より適切な創薬標的の探索が望まれる。概日振動を誘発させる細胞にも改善の余地があると考えている。すなわち、細胞、組織毎で同調因子が異なる可能性を考慮すべきである。本研究では、リズム惹起剤の工夫や、肝細胞の培養法の検討を通じて、精度の高い *in vitro* 概日振動測定系の構築に成功している。したがって、従来の繊維芽細胞を使用したスクリーニング系では探索できなかった、化合物や同調因子の同定が可能になると期待できる。

中枢時計と睡眠、うつ病との関連性は古くから知られているが、末梢時計と疾患との関連性は未解明であった。本研究では、肝臓における末梢時計の同調因子の同定のみならず、その生理的意義を明らかにした。概日時計の創薬標的としての妥当性、適応疾患の選定に貢献できるものと考えている。視交叉上核、肝臓及び脂肪組織の 24 時間サンプリングも、創薬の基盤データになると期待できる。病態における発現変動の解析は、創薬標的の選定に重要な位置を占める。しかしながら、これまでは、一日の中の一点のデータしか存在していなかった。DNA マイクロアレイを使用した網羅的な発現解析は進行中であるが、24 時間を通じての発現データベースは、標的と疾患との関連性を検証するための、確度の高いツールになると考えている。本研究の成果は、現在、社会問題となっているメタボリックシンドロームの病因解明や治療の端緒になることを期待する。

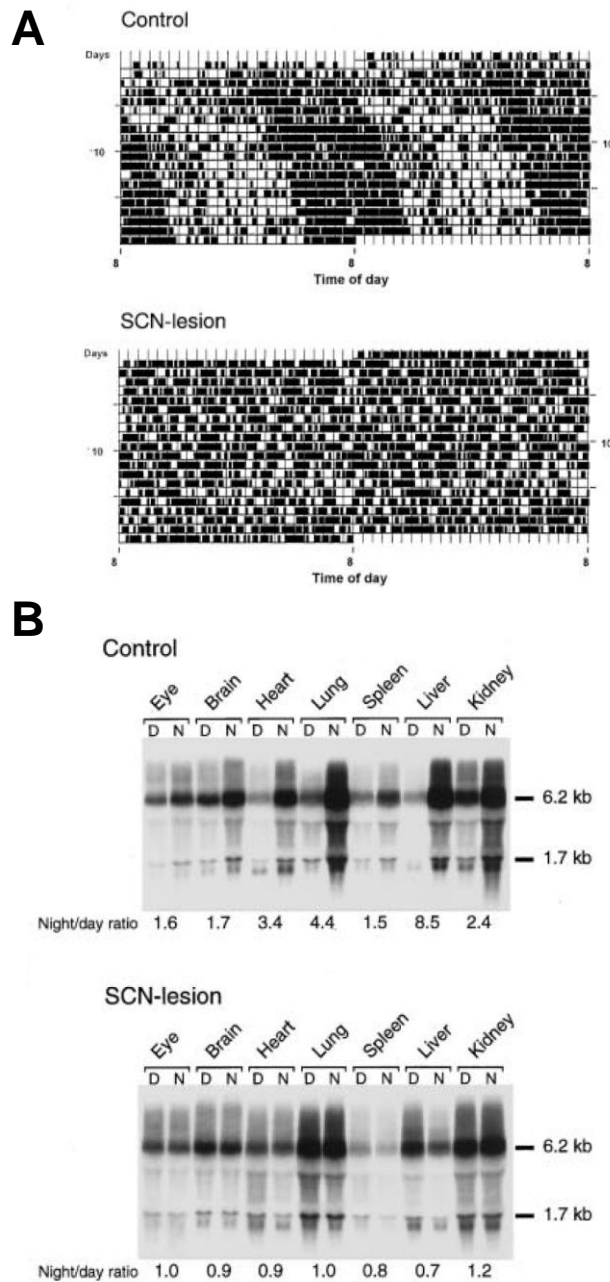


Figure A. Effects of an SCN lesion on circadian rhythms in the rat.

(A) Representative double-plotted actograms of locomotor activity in the control (intact) and SCN-lesioned rats. (B) Representative Northern blot analyses of *rPer2* mRNA in tissues from the control and SCN-lesioned rats. Animals were housed in LD12:12 (lights on at ZT 0) and were killed during the day (ZT 6) and at night (ZT 18). *D* or *N* above each lane indicates that the lane contained RNA obtained at day or at night, respectively. The night-to-day ratio of *rPer2* mRNA levels in each tissue was calculated with values quantified from Northern blots shown in each figure. *kb*, kilobases.

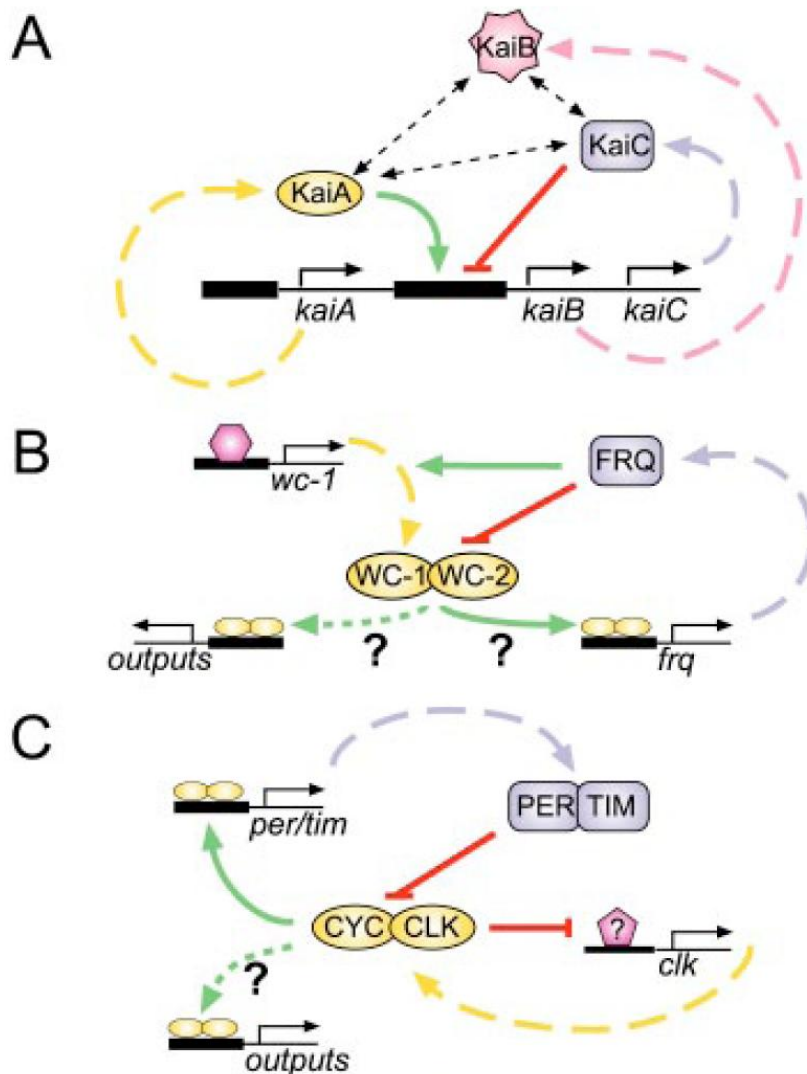


Figure B. Transcriptional feedback loops function in circadian clocks.

Colored dotted lines represent mRNAs and link genes with their respective proteins. Proteins with positive actions are in yellow, negative components are in blue. Protein-protein interactions are indicated with dotted black arrows. Green arrows indicate a positive effect of a component on some process or promoter, and red lines indicate an inhibitory action. (A) The cyanobacteria clock and (B) the *Neurospora* clock. The question marks indicate that the white-collar complex has not been shown to directly bind the promoters of *frq* or other clock-controlled genes. (C) The *Drosophila* clock. The question mark indicates that CYC and dCLK have not been shown to bind the promoters of output genes. Also, it is not known whether these proteins inhibit the activity of some activator of *dclk* transcription or act more directly.

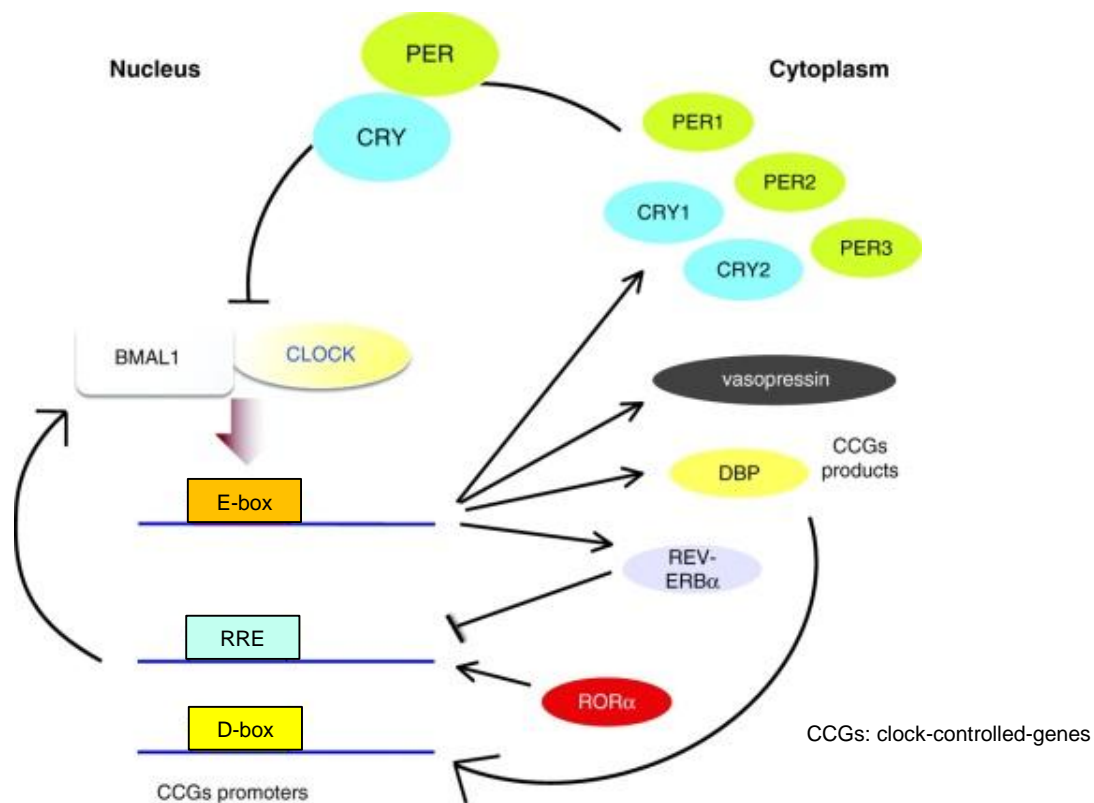


Figure C. Schematic representation of the transcriptional–translational loops regulating circadian rhythms in mammals.

The positive regulators CLOCK–BMAL1 activate genes with E-box elements in their promoters; these are commonly indicated as clock-controlled genes (CCGs). Among the CCGs are also the genes encoding the CRY and PER proteins that act as negative regulators of their own transcription. Additional loops of the circadian machinery involve other transcription factors, whose expression is primarily activated by CLOCK–BMAL1. These are DBP/E4BP4 and REV-ERB $\alpha$ /ROR $\alpha$ , which control the expression of genes with D-box and RRE elements in their promoters.

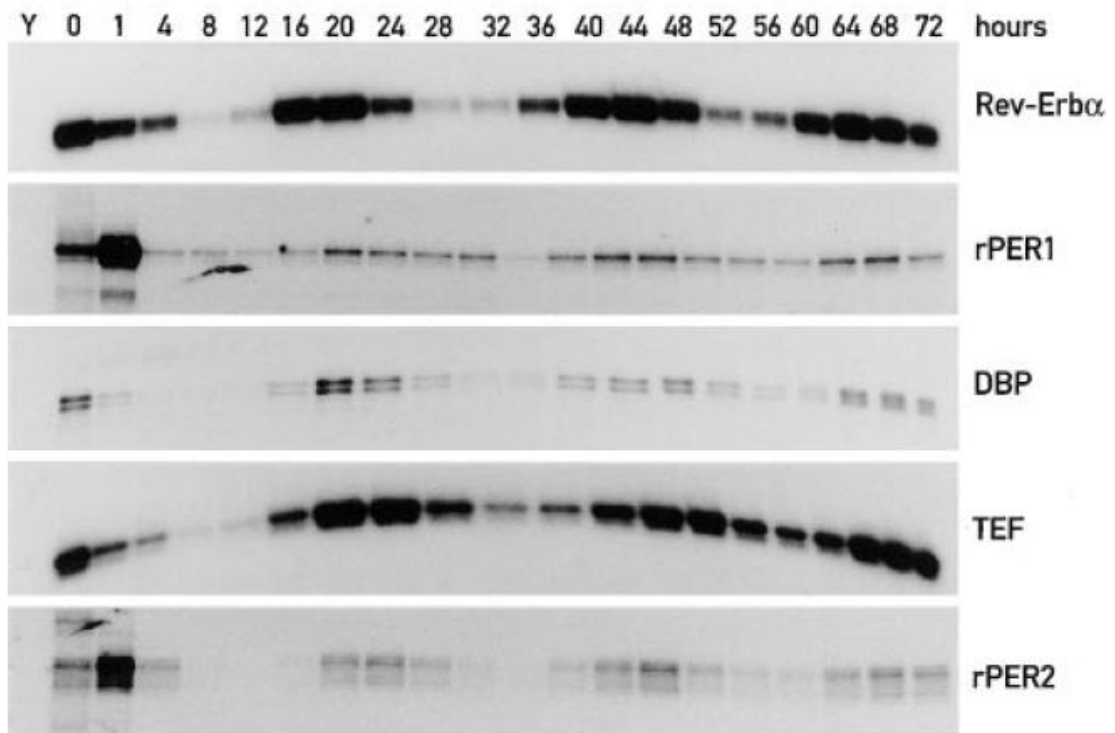


Figure D. Accumulation of Various mRNAs in Serum-Shocked Rat-1 Fibroblasts. Rat-1 cells were grown to confluence in a medium containing 5% fetal calf serum. After having been kept for 6 days in the same medium, cells were shifted to a medium containing 50% adult horse serum and incubated for 2 hr, after which the serum-rich medium was replaced with serum-free medium. Whole-cell RNA was prepared from about  $1.5 \times 10^7$  cells at the times shown on top of the figure after the serum shock, and the relative levels of the mRNAs indicated at the right side of the figure were determined by RNase protection assays.

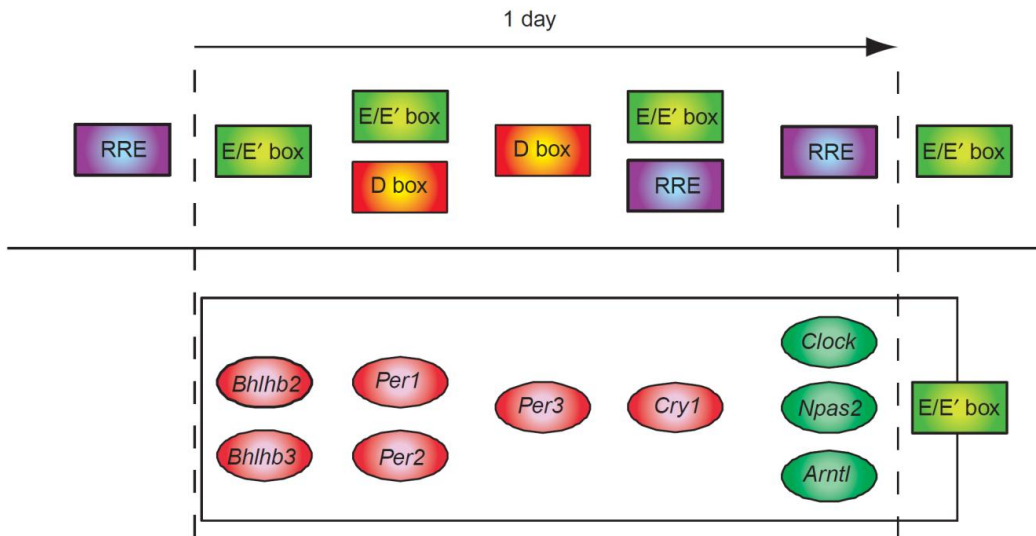


Figure E. Simple design principles encoded in the complex transcription circuits underlying mammalian circadian clocks.

We categorized them into five groups according to their upstream regulation: regulated by E/E' boxes, regulated by both E/E' boxes and D boxes, regulated by D boxes, regulated by both E/E' boxes and RREs and regulated by RREs.



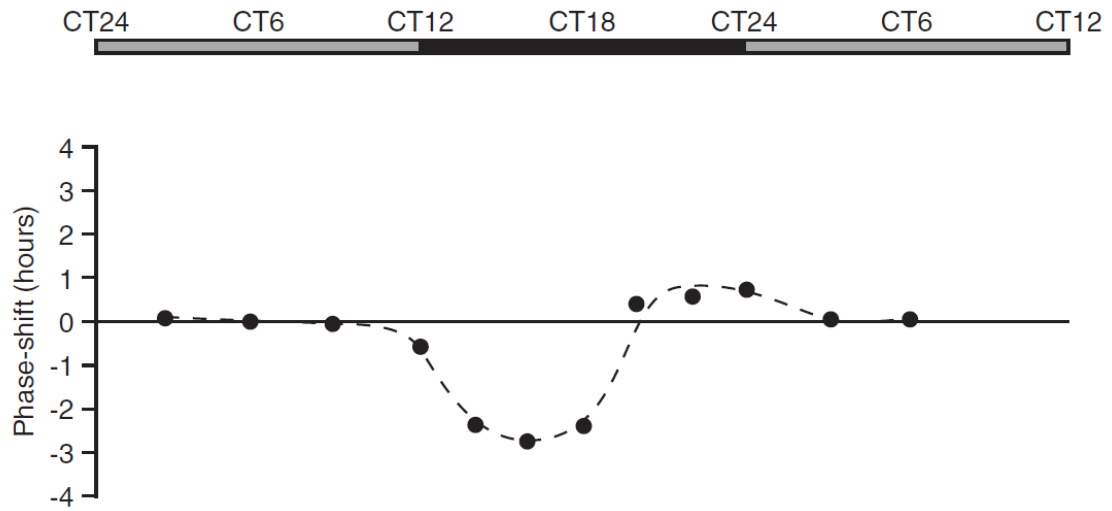


Figure F. Gated and nongated phase response curves.

The photic phase response curve (PRC) was obtained by recording actograms from mice exposed to a 15-min light pulse (for details, see Daan and Pittendrigh, 1976).

# 第一章 時計遺伝子 *Per1*、*Per2* の異なる位相を決定する時計制御配列の同定

## 序

これまで知られている時計遺伝子の転写制御メカニズムの実験的根拠は、主にショウジョウバエ *Period* 遺伝子の哺乳類ホモログとして最初にクローニングされた *Period1* (*Per1*) に関する解析で、主に時計遺伝子プロモーター領域-ルシフェラーゼ遺伝子の過剰発現系における一過性レポーターアッセイの結果である[Gekakis, 1998]。すなわち、*Per1* のプロモーター領域上の E-box (CACGTG) に時計転写因子である CLOCK/BMAL1 のヘテロ複合体が結合することにより、*Per1* の転写が促進され、細胞質内の PER1 のタンパク質発現(翻訳)が上昇する。細胞質内の PER1 はカゼインキナーゼによるリン酸化の翻訳修飾を受け、他の時計タンパク質 CRY とヘテロ複合体を形成し、再び核に移行することにより、自らの転写を抑制する。つまり、自己制御的フィードバックループによる転写制御機構である[Kume, 1998] [Sakakida, 2005]。

しかしながら、*Per1* はあくまで最初にクローニングされたもので[Tei, 1997]、そもそもコア分子というわけではない。実際、その後のノックアウトマウスの実験などからも、*Period* に関しては、2 番目にクローニングされた *Period2* (*Per2*) がむしろよりコア分子であると考えられている[Takumi, 1998]。筆者らのグループは、光電子増倍管を用いた *in vitro* 概日振動測定系を確立し、コア分子時計の概日振動機構を検証した[Ueda, 2002]。この実験系の利点として、①時計遺伝子のプロモーター活性をリアルタイムに連続的に記録できること、②代表的な時計遺伝子である *Per2* と *Bmal1* がお互いに逆位相の振動を示し、*in vivo* の発現リズムを反映するものであること、さらには、③ *in vivo* で作用する液性因子や体温などの影響を排除することができ、細胞自体の振動メカニズムを研究することができることが挙げられる。

時計遺伝子の大部分は 1 日の決まった時間に合成され、“朝”、“昼”、“夜”といった時間に

特徴的な発現を示す。上田らは、ヒトとマウスで進化的に保存されている 3 種類の発現制御配列、“朝”配列 (E-box/E'-box)、“昼”配列 (D-box)、“夜”配列 (RRE) の存在を提唱している [Ueda, 2005]。

*Per2* の遺伝子プロモーターには、典型的 E-box (CACGTG) は存在しないものの、E-box 様の CACGTT が各種間で保存されている配列として見出されている。*Per2* の転写開始点上流の 20bp に位置する E'-box (CACGTT) が振動発振に必須の領域であることが示された [Akashi, 2006]。この領域がリズムの発振強度に重要であることはノックインマウスを使った実験でも証明されている [Yoo, 2005]。最近になり、*Per2* の転写制御はさらに複雑で、転写開始点下流に位置する D-box も強固なリズム発振に関与すると報告された [Ohno, 2007a]。このようにリズム発振に関する情報は蓄積されてきたが、位相 (発現ピーク) の遅れを制御するメカニズム、それに関与する配列に関しては不明であった。

*Per1* の転写は、E-box と D-box により制御されていると報告されているが [Kume, 1999] [Hida, 2000] [Yamaguchi, 2000]、これは一過性の活性を検出する実験系で得られた結果であり、振動の概日変動で今一度このメカニズムの真相を調べてみる必要がある。一方、*Per3* に関しては、*in vitro* 概日振動測定系において、*Per3* が持つ D-box によってその発現ピークが説明できることが分かっている [Ueda, 2005]。

そこで、筆者は、時計遺伝子 *Per1*、*Per2* の詳細なプロモーター解析を実施することにした。その結果、時計応答配列の数が位相の決定に重要な役割を果たしていることが明らかになった。さらに、発現ピークの遅れに関与する新規配列 E''-box を同定した。

## 結果

### 中枢および末梢組織における時計遺伝子の発現解析

光変化のない状態での遺伝子発現プロファイルを得るために、マウスをサンプリングの 2 日前に恒暗条件に移した。恒暗条件下で飼育したマウスの SCN、肝臓および白色脂肪組織 (white adipose tissue ; WAT) を 2 日間にわたって 4 時間ごとに 12 点採取した。Total RNA を抽出し、定量的 PCR 法で各時計遺伝子の mRNA 量を測定し、発現パターンを検証した (Fig.1)。振動遺伝子の発現ピークを推定するために、各プローブの 12 時点の発現データと、ピークを 10 分間刻みで変更した 24 時間周期の余弦波との相関係数を求めた。この解析から、もっとも相関係数の高かった余弦波のピーク時刻を、振動遺伝子のピーク時刻とした [Ueda, 2004]。Per1 の各組織における発現ピークは、5.2 h (SCN)、11.3 h (肝臓) および 9.7 h (WAT) であった。Per2 の発現ピークは、8.7 h (SCN)、14.7 h (肝臓) および 12.8 h (WAT) であった。Per3 の発現ピークは、8.7 h (SCN)、11.3 h (肝臓) および 11.3 h (WAT) であった。

Per1 と Per2 遺伝子プロモーターには、E-box (“朝”配列) と D-box (“昼”配列) が存在する [Ueda, 2005]。一方、Per3 遺伝子プロモーターには E-box (“朝”配列) はなく、D-box (“昼”配列) のみが存在し、これまでの設計原理においては、Per 遺伝子の中で、Per3 のピーク時刻が最も遅れるとされていた [Ueda, 2005] (Fig. E)。しかし、筆者が中枢および末梢組織における時計遺伝子の発現解析を実施した結果、Per 遺伝子の中では、Per2 のピーク時刻が最も遅いことを認めた (Fig.1)。このことは、Per2 遺伝子プロモーターには、これまで明らかにされてこなかった位相を後退させる配列が存在する可能性を示唆している。そこで、*in vitro* 概日振動測定系において、詳細なプロモーター解析を実施することにした。

## 時計遺伝子 *Per1* の位相は E-box の数によって制御される

時計遺伝子 *Per1* は E-box と D-box によって発現が調節されている[Kume, 1999] [Hida, 2000] [Yamaguchi, 2000]。しかし、これまでの研究では、転写因子の結合候補配列を見つけた場合に、実際に機能するか否かを判定するために一過性の活性が測定されてきた。しかし概日リズムは動的な現象であり、候補配列の機能を検証するならば、転写活性の動的な変化を観察すべきである。Rat-1 細胞は高濃度血清や Dex 刺激等により簡単に概日振動を惹起できる細胞株であり[Balsalobre, 1998] [Balsalobre, 2000]、SCN とほぼ同等の時計機構を内在していることが、*Cry1*、*Cry2* のノックダウンによる表現型解析から明らかにされた[Yagita, 2001]。このことは Rat-1 細胞には少なくとも *in vivo* を反映するのに十分な時計関連の転写因子が備わっていることを意味している。それゆえ時計遺伝子の結合配列に易分解性の改変型ホタルルシフェラーゼをつないだレポーター遺伝子を Rat-1 細胞に導入して適切な刺激をすることで、振動が捉えられるか否かで、配列が機能するかについて評価できる。はじめに、概日振動を誘起させる適切な薬剤を探索した。Rat-1 細胞において、グルココルチコイドが *Per1* の急性誘導を引き起こし、概日性発現を誘発することが報告されていた [Balsalobre, 2000]。プロテインキナーゼ A についても、*Per1* の急性誘導に関与する可能性が示唆されていた[Yagita, 2000]。ここでは、Rat-1 細胞に *Per1* 遺伝子プロモーターレポーターを導入後、Dex または、dcAMP (dibutyryl cyclic AMP) で刺激して概日振動を誘起させた。レポーター遺伝子には、易分解性の改変型ホタルルシフェラーゼを用いて、発光を測定した。これまでは概日振動を誘起させる薬剤として Dex を使用してきたが、図に示したように、実験間で、ピーク時刻や振幅が安定しないという課題があった (Fig.2)。刺激薬剤として、dcAMP を選択することによって、これまでの Dex 刺激に比べて、安定したピーク時刻と振幅が得られることが分かった (Fig.2)。解析には、計測データ (生データ) から 24 時間分の移動平均値を引くデイトレンド処理を行い、その後 2 時間分の移動平均値で平滑化する平滑化処理を行った (Fig.2)。

*Per1* 遺伝子プロモーター解析を実施するために、時計遺伝子の結合配列や欠損変異体を

利用した、4種類のコンストラクトを準備した(Fig.3A)。-5,071bp から+1,694bp までを含むプロモーターである *mPer1*-dLuc を作製した。数字は転写開始点からの塩基数を示している。

E-box と D-box を 1 つずつ持つ、*mPer1* V-dLuc(-233 to +17) を作製した。さらに、E-box または D-box 該当領域を含む配列を 3 回直列に繰り返したものを組み込んだレポーター遺伝子を準備し、それぞれのコンストラクトを *mPer1* E-box、*mPer1* D-box と命名した。

Rat-1 細胞にこれらのレポーター遺伝子を導入後、dcAMP で刺激し、発光を観察した。時計機構には関係しない SV40 ベーシックプロモーターを dLuc につないだコンストラクトを導入した場合には概日振動は認められなかった(Fig.3B)。波形データの発光値の peak 値を算出し、peak の値が前進したか後退したかを評価の基準とした(位相の前進・後退)。

その結果、*mPer1*-dLuc(-5,071 to +1,694) は、*mPer1* E-box と同じ位相を示した(Fig.3B, C)。注目すべきことに、*mPer1* V-dLuc(-233 to +17) は、*mPer1* E-box と *mPer1* D-box の中間の位相を示した(Fig.3B, C)。*mPer1* V-dLuc(-233 to +17) は、E-box と D-box を 1 つずつ持っている。つまり、E-box(“朝”配列)と D-box(“昼”配列)の組み合わせで、“朝”と“昼”の中間に相当する新しい位相が作り出された。*Per1* 遺伝子プロモーターには、5 つの E-box と 1 つの D-box があるが、制御配列の数の多い E-box の位相が *Per1* の位相に反映されることが示唆された。なお、*Per1* 遺伝子プロモーターに存在する 5 つの E-box は、それぞれ CLOCK/BMAL1 によって活性化され、機能的であることが確認されている[Hida, 2000]。以上の結果は、時計制御配列の数が位相の決定に重要な役割を果たしていることを示している。

#### 時計遺伝子 *Per2* の位相の遅れは、新規配列 E'-box によって制御される

マウス *Per2* 遺伝子のプロモーター領域の制御機構を解析するために、以下のプロモーター領域を dLuc に連結したコンストラクトを作製した。*Per2*I、*mPer2*II、*mPer2*III はヒトとマウスで高度に保存された領域が 3 箇所(*Per2*I、*Per2*II、*Per2*III) ある(Fig.4A)。保存領域 I と II には、

単独でベーサルプロモーター活性が無かったため (data not shown)、それぞれ、SV40 プロモーターに連結したコンストラクトを作製した。

- *mPer2*-dLuc (-3,303 to +195): *mPer2* 遺伝子の転写開始点の上流-3,303bp から下流 195bp
- *mPer2* I sv40-dLuc: 保存領域 I+SV40 プロモーター
- *mPer2* II sv40-dLuc: 保存領域 II+SV40 プロモーター
- *mPer2* III-dLuc: 保存領域 III

Rat-1 細胞にこれらのレポーター遺伝子を導入後、dcAMP で刺激し、発光を観察した。

*mPer2* I sv40-dLuc と *mPer2* II sv40-dLuc は、概日振動を示さなかった (Fig.4B)。一方、*mPer2* III は明確な概日振動を示し、その位相は、*mPer2*-dLuc (-3,303 to +195) と一致した (Fig.4B)。以上の結果から、第 III 保存領域が *Per2* の概日振動を制御していることが示された。

*Per2* 遺伝子プロモーターの第 III 保存領域に典型的な E-box (CACGTG) は存在せず、E'-box (CACGTT) が振動発振に必須の領域であることが報告されている [Akashi, 2006]。この領域の重要性はノックインマウスを使った実験でも証明されている [Yoo, 2005]。筆者は、第 III 領域に、新たな E-box 類似配列 (CATGTG) を見出した (Fig.5)。この配列を E''-box と命名し、*Per2* の概日振動への関与を検証した。

まず、第 III 保存領域のさまざまな欠損配列レポーターを作製し (Fig.6A)、Rat-1 細胞に導入後、dcAMP で刺激し、発光を観察した。いずれのコンストラクトを導入した場合でも、明確な概日振動を示したが、位相が変化する現象が認められた。*mPer2* III (-254 to +41)-dLuc と *mPer2* III\_1 (-181 to +1)-dLuc は同様の位相を示した (Fig.6B, C)。*mPer2* III\_2 (-161 to +1)-dLuc と *mPer2* III\_3 (-142 to +1)-dLuc の位相は、*mPer2* III (-254 to +41)-dLuc と比較すると、1.5 時間、前進した (Fig.6B, C)。以上の結果から、E''-box を含む 20bp が *Per2* の位相後退に関与することが分かった。

続いて、位相の後退に関与する配列を特定するために、第 III 保存領域にある E''-box 配列 (CATGTG) を ACCGGT 配列に置換した変異体を作製した (Fig.7A)。陰性対照として、D-box と E'-box に対する変異体も作製した。D-box および E'-box の変異体が位相を変えなかったのに対して、E''-box 変異体は、位相の前進を引き起こした (Fig.7B, C)。このことから、E''-box が位相の後退を制御する配列であると示唆された。

位相後退のメカニズムを検証するために、トランス因子を過剰発現させる一過性レポーターアッセイを実施した。E-box の転写に影響を与える時計遺伝子産物として、CLOCK、BMAL1、CRY1、DEC1 が知られている [Ukai-Tadenuma, 2008]。CLOCK/BMAL1 は、E-box に結合して転写活性を促進させる。CRY1 は、CLOCK/BMAL1 複合体に作用することで転写活性を抑制する。DEC1 は、E-box に直接結合し、CLOCK/BMAL1 による転写活性を抑制する。E''-box 該当配列を 3 回直列につないだ配列を組み込んだ SV40 ベーシックプロモーターで稼働されるルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、CLOCK/BMAL1 によって、転写活性が促進され、この転写活性誘導は CRY1 により抑制された (Fig.7E)。一方、DEC1 は E''-box の転写活性にほとんど影響を与えなかった (Fig.7E)。同様の系で、DEC1 が E-box の転写活性を抑制することは確認できており (Fig.7E)、E''-box と E-box の 1 塩基の違いが DEC1 の作用強度に影響を及ぼし、これが異なる位相を生み出す原動力になっている可能性が示唆された。

#### 時計遺伝子 *Per2* の振幅は D-box や E'-box 周辺配列によって制御される

D-box と E'-box に変異を導入した場合は、位相は変化しなかったが、振幅が低下した (Fig.7B, C, D)。E'-box の変異がリズム発振の強度に影響したということは、これまで報告されたように E'-box がリズム発振において重要であることを示している [Akashi, 2006] [Yoo, 2005]。一方、転写開始点上流にある D-box は、リズム発振に関与しないという報告があるも



の [Ohno, 2007a]、過去の報告では刺激を与えて3日後にはリズムが大きく減衰していた [Ohno, 2007a]。そのために D-box の関与を判定するだけの差が認められなかった可能性がある。筆者らが確立した *in vitro* 概日振動測定系においては、刺激を与えて3日後にも明確な概日振動が認められた (Fig.7B)。つまり、概日振動を安定に長期間維持した実験系を構築できたことによって、従来は機能的でないと言われていた D-box が振幅の増大に寄与していることを示すことができた。

転写活性化因子と転写抑制因子が結合配列に結合する際の、結合の強さのバランスが重要であると指摘されている [Kumaki, 2008]。E-box の場合は、CLOCK/BMAL1 の E-box に対する結合が弱いほど、振幅が増大すると報告されている [Kumaki, 2008]。そこで、*Per2* 遺伝子のリズム発振機構を理解するために、E'-box の周辺配列について解析した。E'-box 配列から転写開始点まで含む配列 (E'-box Long) と、E'-box 配列から転写開始点上流 12bp まで含む配列 (E'-box) を 3 回直列につないだ配列を SV40 プロモーターレポーターに組み込んだコンストラクトを作製し (Fig.8A)、Rat-1 細胞に導入後、dcAMP で刺激し、概日振動を観察した。測定値のままの生データを見ると、E'-box と比較して E'-box Long の発光強度は弱かった (Fig.8B)。測定データを平滑化処理したところ、E'-box Long の方が、大きな振幅を示した (Fig.8C)。このことは、E'-box Long では、転写活性化因子の E'-box に対する結合性が弱まっているため、生データの値が小さかったのだと考えられる。以上の結果は、E'-box 配列のみならず、転写開始点からその上流 12bp を含む配列が組み合わせり、より強固なリズムが生成されることを示している。

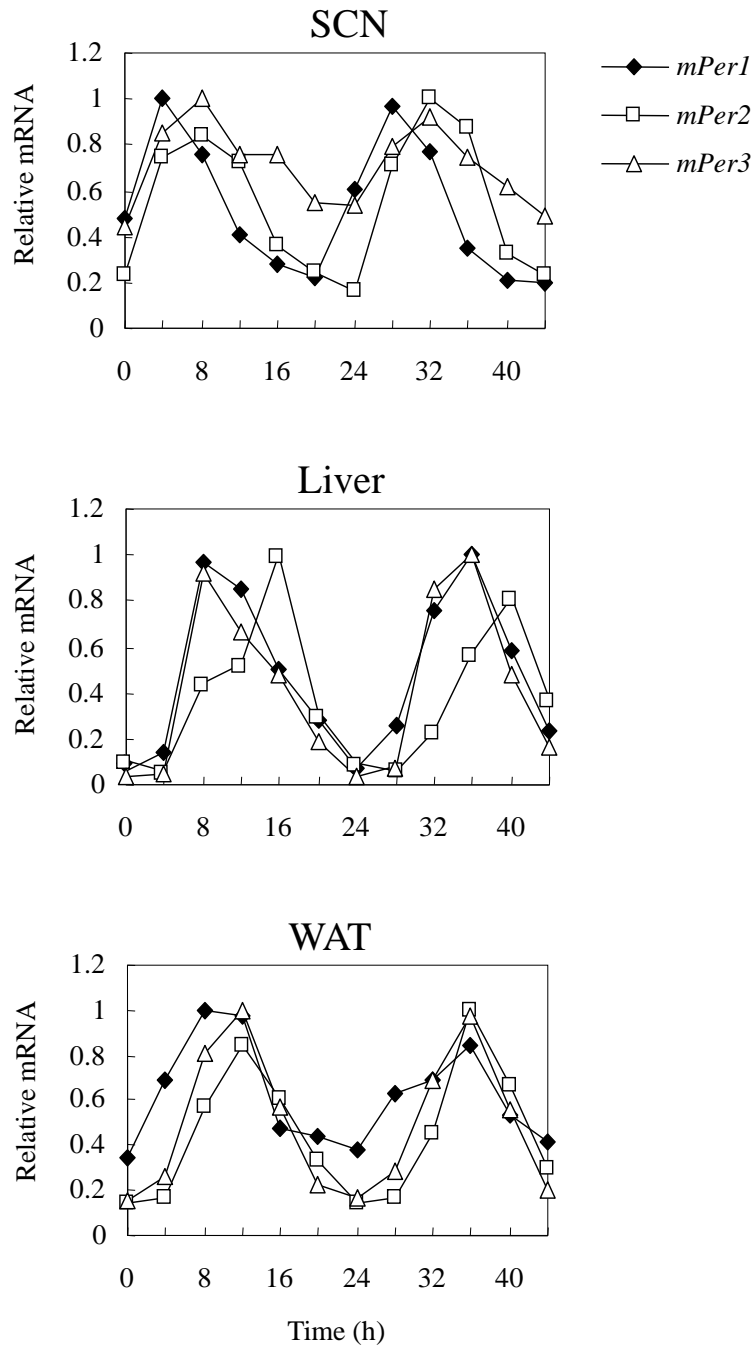


Figure 1. The expression rhythm of mouse *Per1*, *Per2*, and *Per3* mRNAs.

Total RNA was extracted from SCN, liver, and white adipose tissue (WAT), and Q-PCR was performed to examine *mPer1*, *mPer2*, and *mPer3* mRNA expression. The relative level of each mRNA was normalized to the corresponding *Gapdh* mRNA level. The maximal amount of mRNA was set to 1. Filled square, open square, and open triangle lines represent *mPer1*, *mPer2*, and *mPer3*, respectively.

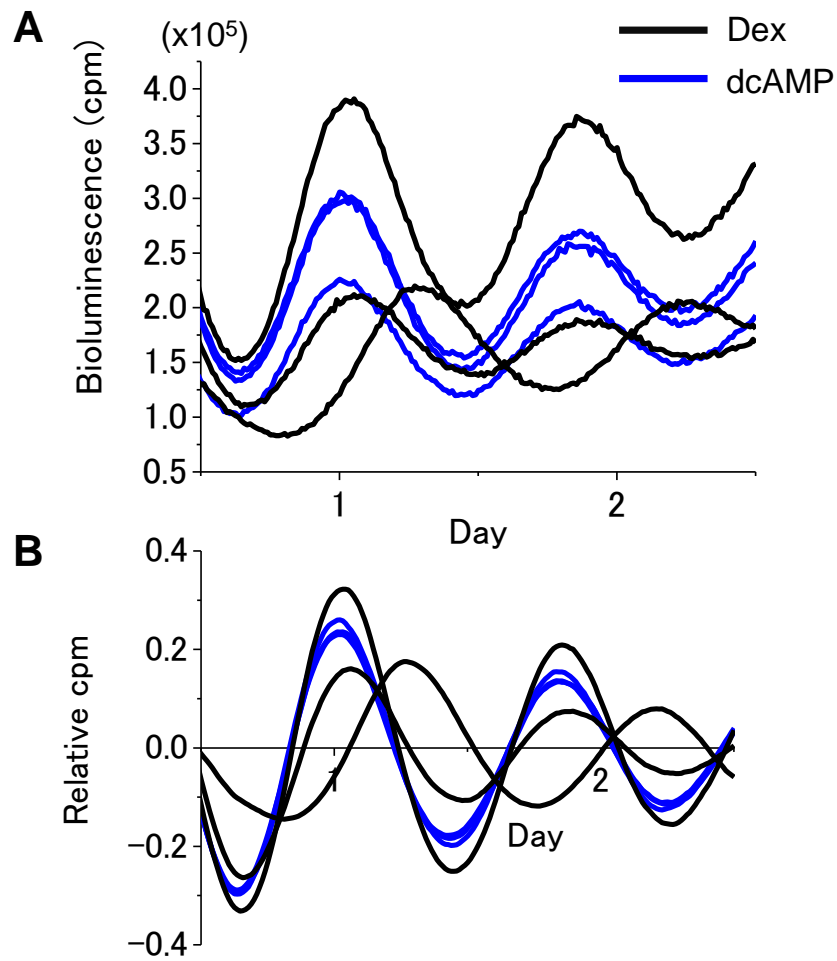


Figure 2. Robust circadian oscillation of *mPer1*-dLuc driven bioluminescence in rat-1 cells. Luciferase reporter constructs driven by the *mPer1* promoter were transfected into rat-1 fibroblasts and synchronized by treatment with Dex (black curves) and dcAMP (blue curves). (A) Bioluminescence monitoring was performed using photomultiplier tube detector assemblies. (B) To better visualize the phase differences, data sets were de-trended by subtracting the 24 h running average from the raw data.

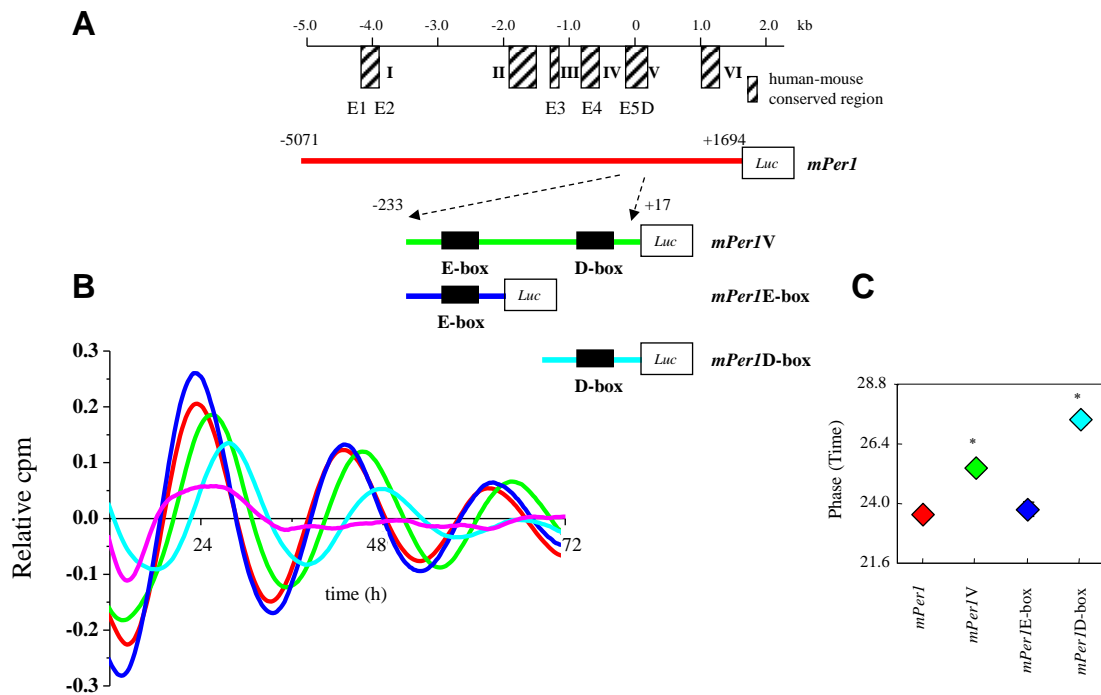


Figure 3. Real-time analysis of circadian expression of luciferase driven by the mouse *Per1* promoter.

(A) Schematic representation of reporter vectors for the *mPer1* promoter. +1 corresponds to the TSS. (B) Transcriptional oscillation of *mPer1* was monitored by a real-time monitoring system. Rat-1 cells were transfected with the *mPer1* reporter constructs and stimulated with 1 mM dbcAMP. Bioluminescence records were detrended by subtraction of the 24 h running average from the raw data. (C) Phase data for *mPer1*, *mPerIV*, *mPerIEbox*, and *mPerIDbox*. The phases were measured from the third peak after stimulation. \*  $P < 0.05$ .

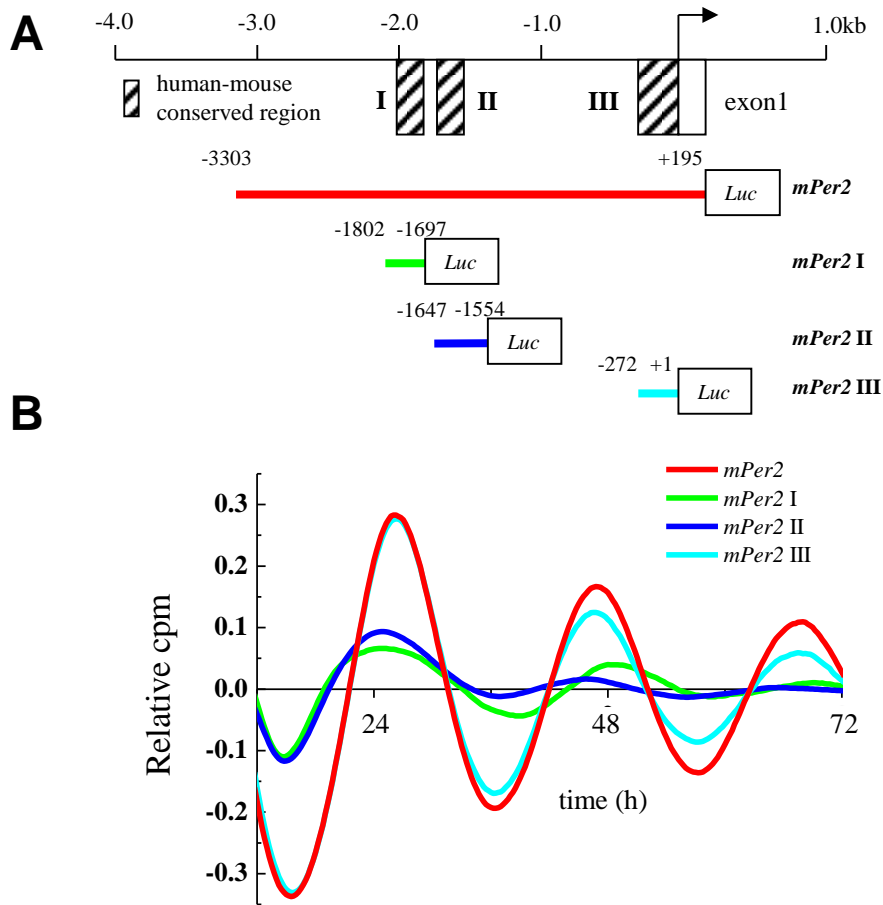


Figure 4. Segment III, conserved between human and mouse *Per2*, is responsible for *Per2* expression.

(A) Schematic representation of deletion mutants of the *mPer2* promoter. *mPer2*-dLuc and *mPer2* III-dLuc were subcloned into the dLuc vector, and *mPer2* I-dLuc and *mPer2* II-dLuc were subcloned into the SV40-driven dLuc reporter. I, II, and III are indicated in the conserved regions shared by human and mouse in the *Per2* promoter. +1 corresponds to the TSS. (B) Transcriptional oscillation of *mPer2* was monitored. Rat-1 cells were transfected with the *mPer2* construct and stimulated with 1 mM dbcAMP.

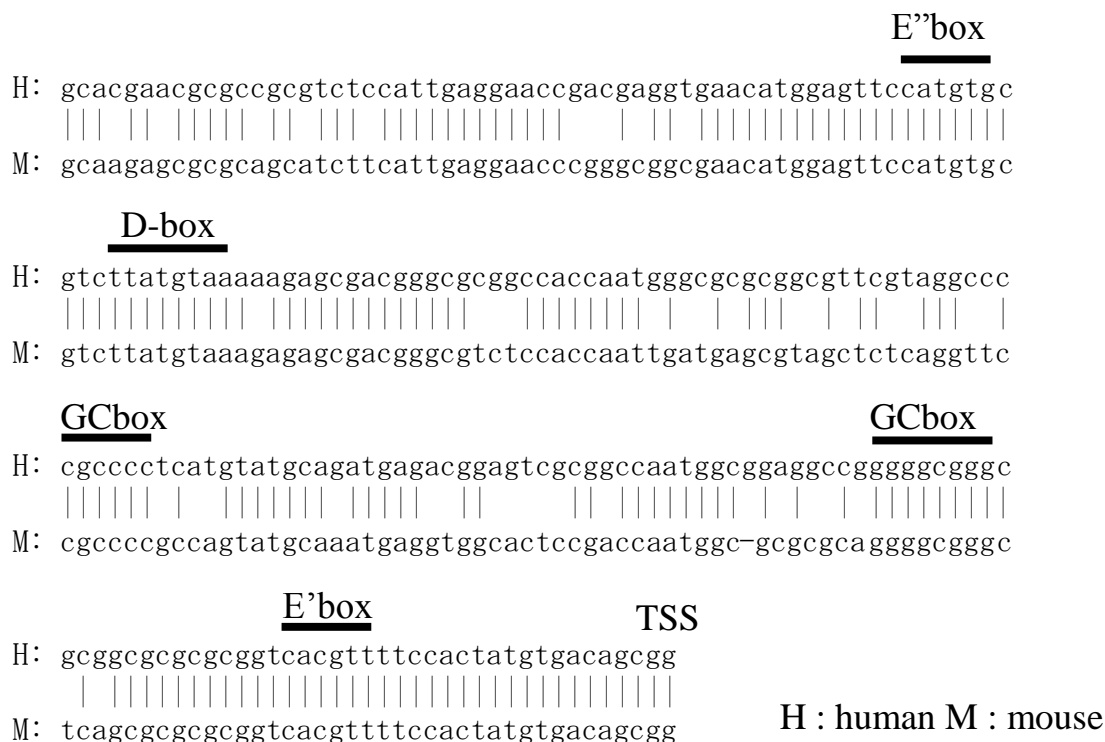


Figure 5. Nucleotide sequence alignments of conserved segment III shared by human and mouse *Per2*.

H and M represent human and mouse sequences, respectively. The colored letters represent the putative consensus sequence for transcription factors. A nucleotide sequence alignment of the 5'-proximal promoter of mouse *Per2* is presented with putative cis-regulatory elements of the E'' box (from -162 to -157), D-box (-152 to -145), Sp1 (-100 to -92 and -47 to -40), and E' box (-24 to -19). Promoter analysis was performed by TFSEARCH. Numbers indicate nucleotide distances from the predicted TSS.

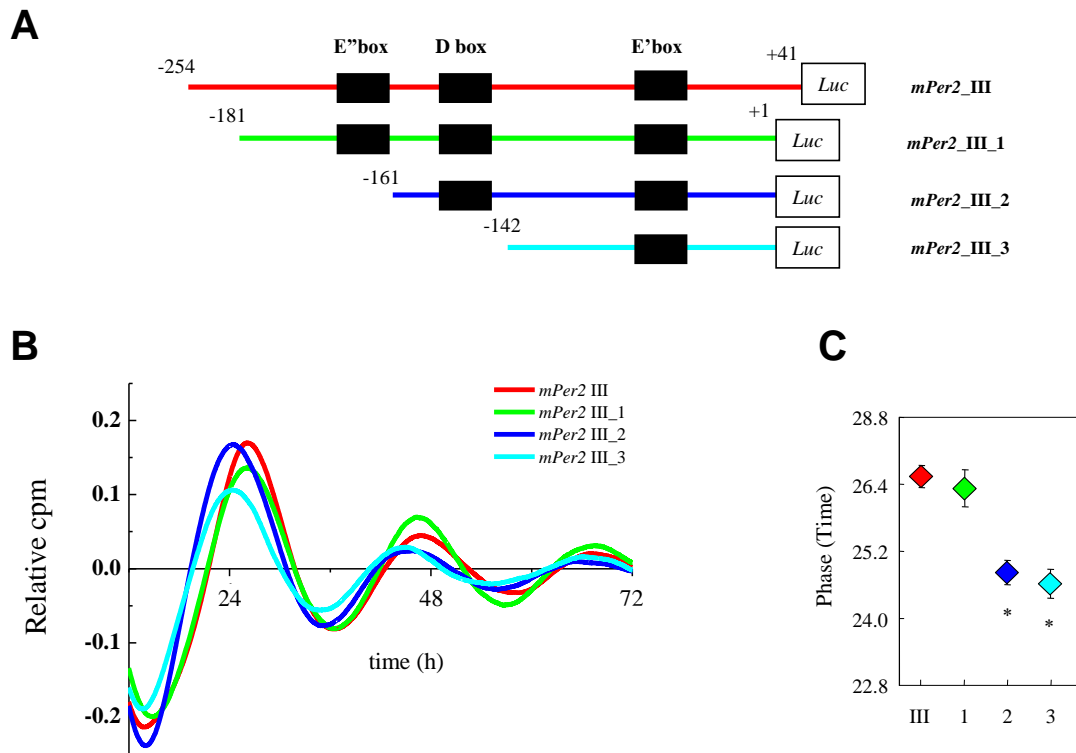


Figure 6. Deletion analysis of the third conserved region in the *mPer2* gene.

(A) Schematic diagrams of various *mPer2* promoter constructs are shown and the names of the plasmids are listed. (B) De-trended bioluminescence data of *mPer2* III and its deletion mutants fused to a dLuc reporter gene. Rat-1 cells were transfected with these constructs and stimulated with 1 mM dbcAMP. (C) Phase data for *mPer2* III-dLuc, *mPer2* III\_1-dLuc, *mPer2* III\_2-dLuc and *mPer2* III\_3-dLuc. The phases were measured from the third peak after stimulation. \*  $P < 0.05$ .

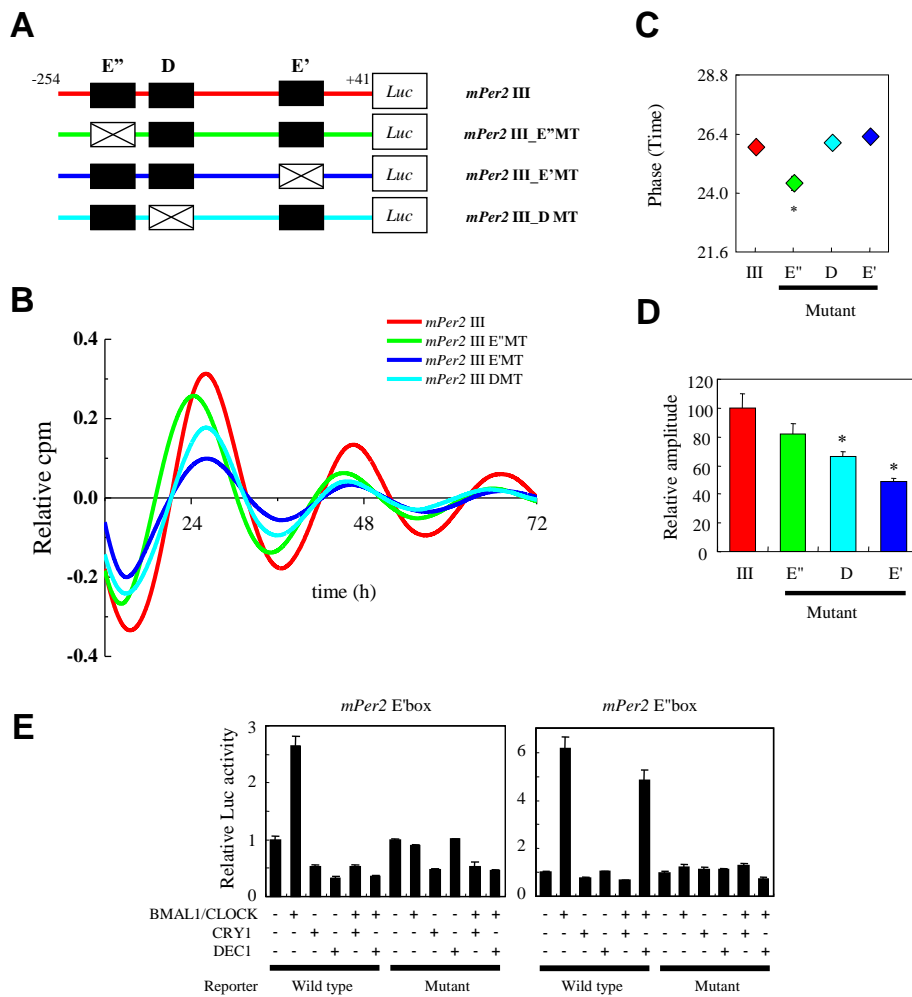


Figure 7. The E''-box (a novel E-box-like element) and the D-box in the third conserved segment of the *Per2* promoter are functional cis-elements.

(A) Schematic representation of point mutagenesis of putative cis-elements in the conserved segment III. The wild-type is indicated by a closed box and the mutant type is indicated by a white box (christcross). The mutations were as follows: mutated E'-box (ACCGGT), and mutated E''-box (ACCGGT), and mutated D-box (CACCCGGC). (B) Detrended bioluminescence data of *mPer2* III-dLuc and its point mutants. Rat-1 cells were transfected with the *mPer2* III-dLuc and its point mutants, and stimulated with 1 mM dbcAMP. (C) Phase data for *mPer2* III, *mPer2* III E''MT, *mPer2* III DMT, and *mPer2* III E'MT. \* P < 0.05. (D) Relative amplitude data were calculated from the third to the eighth peak of oscillation. Relative amplitudes of *mPer2* III\_E''MT, *mPer2* III\_DMT and *mPer2* III\_E'MT to *mPer2* III are shown. \* P < 0.05. (E) Transcriptional activation by CLOCK and BMAL1, and transcriptional repression by CRY1 or DEC1 of the reporters containing three tandem repeats of either the wild-type or the mutants. The presence (+) or absence (-) of the expression plasmid is denoted. Each value is the mean  $\pm$  SE of three replicates for a single assay.



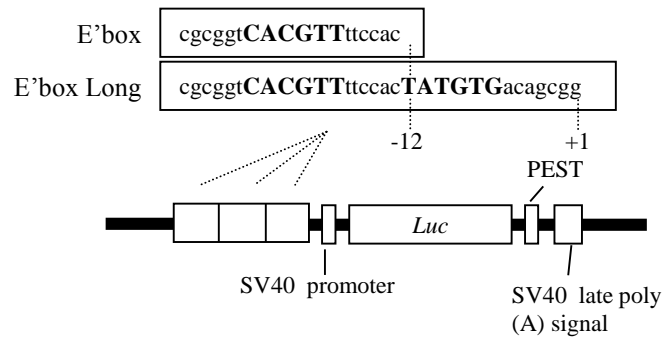
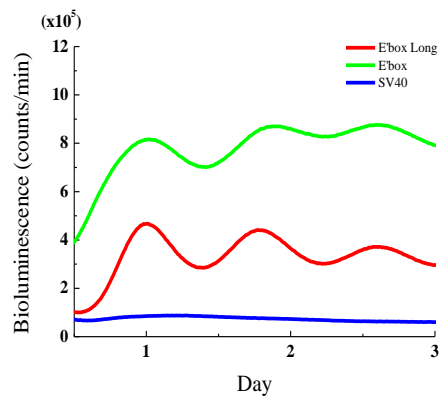
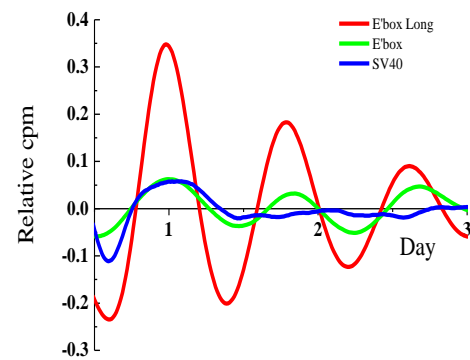
**A****B****C**

Figure 8. Analysis of the *mPer2* tightly-interlocked region.

(A) Schematic diagrams of various *mPer2* promoter constructs are shown and the names of the plasmids are listed. The E'-box Long regions contains a direct repeat of the E-box-like elements. (B) Transcriptional oscillations of E'box and E'box long-SV40-dLuc were monitored. Rat-1 cells were transfected with these constructs and stimulated with 1 mM dbcAMP. (C) The signals obtained in Fig. 8B were detrended.

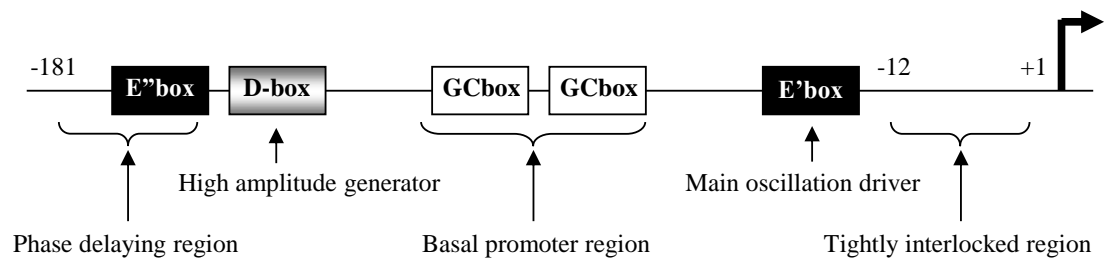


Figure 9. Schematic representation of molecular mechanisms of *mPer2* circadian transcription.

## 考察

発現が時間変動する遺伝子群の DNA マイクロアレイによる網羅的な解析により、調べた遺伝子の約 10% が時間変動するが、組織間でのオーバーラップはきわめて少ないことが知られている。実際、組織間 (SCN vs 肝臓、肝臓 vs 心臓) で共通に変動する遺伝子および時計関連遺伝子群、計 27 個の遺伝子の時間変動を定量 PCR 法で検討すると、末梢臓器 (心臓、肺、肝臓、胃、脾臓、腎臓) すべてでその発現に顕著な概日リズムが見られるのはわずか 8 遺伝子である [Yamamoto, 2004]。これらの遺伝子プロモーター上の DNA 結合配列が探索され、概日転写制御に関わる 3 つの DNA 配列 (E-box、D-box、RRE) が見出された [Yamamoto, 2004] [Ueda, 2005]。3 つの時計制御配列で概日リズムが説明できるという仮説は非常に興味深い。しかし、この仮説は、時計遺伝子の発現ピーク時刻と 3 つの DNA 結合配列の関係から導き出されたものである。転写調節は DNA 結合配列ばかりでなくその周辺の配列やその配列と関連した転写因子群の構成によっても行われており、DNA 結合配列の組み合わせのみで転写の位相を決定しているかどうか、さらなる検証実験が必要であった。合成生物学的手法を用いて、概日時計の設計原理を解明しようとする取り組みが進められているが、未だ基本時刻の 1 つである“朝”の発現を生成することに成功していない [Ukai-Tadenuma, 2008]

今回の時計遺伝子プロモーター解析からわかるように、個々のプロモーターからの詳細な解析で新たな事実がわかってくる。ここでは、*Per1* と *Per2* 遺伝子の転写タイミングの違いに注目した。両遺伝子とも、プロモーター領域に E-box/E'-box と D-box を持っている。しかし、中枢および末梢組織において、*Per2* の位相が数時間遅かった。*Per1* 遺伝子プロモーター解析においては、時計制御配列である E-box の数が位相決定に重要な役割を果たしていることを示した。*Per2* 遺伝子プロモーター解析においては、多様な変異プロモーターを作製し、位相の遅れに関与する新規配列として E''-box を同定した。この配列は非典型的 E-box である

CANNTG に該当する。興味深いことに、E-box を介した転写制御と同様に CLOCK/BMAL1 による活性化作用と CRY1 による抑制作用を保持していた。一方で、DEC1 による抑制作用は失われていた。これまでは、E-box/E'-box はリズム発振の生成に関与するとされていた。今回の検討で、E-box から僅か 1 塩基の違いにより、DEC1 の作用強度が変化し、これが異なる位相を生み出す原動力になっている可能性が示唆された。細胞レベルでの Dec1 の欠損が、時計遺伝子の位相を早めるという報告がある[Nakashima, 2008]。DEC1 が時計遺伝子の位相制御に重要な役割を果たしていることを支持する報告と考えている。最近では、筆者の結果と合致するように、E-box 様配列の重要性が指摘されはじめている[Guillaumond, 2011]。

それでは、複雑な転写ループの結合によるネットワーク形成が、概日リズムの維持になぜ必要なのであろうか。ひとつの理由として、わずかな位相の違いをもつ転写ループとそれに含まれる相同遺伝子群の存在が冗長性を高めることで振動系の堅牢さを強化している可能性が考えられる。もうひとつの理由としては、ひとつの転写ループでは数時間の周期しか形成できないため、約 24 時間の振動周期形成には複数の転写ループを結合する必要がある可能性が考えられる。そして、含まれる遺伝子やタンパク質を共有することで複数の転写ループを結合し、それらが共役して連続的に振動する機構を維持しているのであろう。

今回のように、各プロモーターでのより詳細な解析は、新たな研究の展開をもたらすかもしれない。*Per2* 遺伝子のプロモーター解析結果を Fig.9 にまとめた。*in vitro* 概日振動測定系は既に構築していたが、細胞と概日リズムを惹起する刺激薬剤の組み合わせを検討し、実験精度を向上させることに成功した。その結果、位相の遅れに関与する新規配列 E''-box を同定した。従来は機能的でないと報告されていた D-box が振幅の増大に寄与していることを示した。また、E'-box 配列とその周辺配列が組み合わせり、より強固なリズムが生成されることも明らかにした。このように、様々な時計応答配列の組み合わせによって、遺伝子発現の正確な時間的調節がなされていることを実験的に証明した。

## 第二章 細胞自律的な概日振動体における D-box 制御因子の役割

### 序

概日リズムの遺伝子レベルからの研究の歴史的起点は、ショウジョウバエの時計変異体 *period* の分離と遺伝子座の同定にある[Konopka, 1971]。*period* 遺伝子の点変異によって活動リズムの自由継続周期の長さが変化したり、リズムが完全になくなったりしたことから、この遺伝子が概日リズムの中核機構を制御しているのではないかと考えられた。哺乳類の場合も遺伝子機能を体系的に決めるアプローチの開発が注目を集めている。なかでも、アルキル化剤の一種である化学変異原 N-エチル-N-ニトロソ尿素を用いて大量の変異体マウスを作製し、新しい表現型をスクリーニングする手法が多くの研究で利用されている。この手法による大規模スクリーニングが可能になったのはゲノム情報の整備が進んだためであり、網羅的でゲノムワイドな解析という意味で、DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析と同質なポストゲノム実験手法といえる。変異誘導系を用いたマウスでの順遺伝学が最も成功したのは、Takahashi らの、リズム異常を示す *Clock* 変異体の発見である[Vitaterna, 1994]。この発見は、*period* 遺伝子をショウジョウバエでみつけたのと同じ戦略を用いてなされた。このプロジェクトは、マウスの概日リズムの測定として、ケージ中での行動量を赤外線ビームで測定する行動リズムのアッセイ系を採用している。行動リズムのアッセイ系は、血中メラトニンやコルチゾール濃度の測定と比べると、連続したサンプリングが必要でないなど、概日リズムの測定系として簡便で、安定した結果が得られる。

遺伝子改変動物の行動リズムを指標とした表現型解析は、その分子の時計機構への関与の確実な証明となる。*Per1* ノックアウトマウスとそれから得られた胎仔性繊維芽細胞を用いて、中枢時計と末梢時計の階層性が検証されている[Pando, 2002]。まず、*Per1* ノックアウトマウ

スから得た胎仔性繊維芽細胞のリズムを調べたところ、行動リズムと同様に短い周期を示していた。つづいて、この胎仔性繊維芽細胞を野生型マウスに移植した。すると、移植された胎仔性繊維芽細胞は野生型マウスと同じ周期の概日リズムを刻んだ。この結果は、末梢時計は自立振動能が弱く、中枢時計の支配下にあることを示している。即ち、哺乳類の場合は、リズム発振に関して階層性があり、行動リズムの表現型が細胞自律的な概日振動体の表現型を反映するとは限らないのである。

このような階層性があるため、中枢時計から切り離れた細胞自体の振動メカニズムを研究することは重要である。最近では、E-box に対する転写抑制因子である *Per2*、*Cry1* が末梢時計のリズム発振に必須であることが示された[Liu, 2007]。このことから、時計の分子機構の中心となるのが、E-box を介した転写調節であると言われている。RRE を介する転写ループについても詳細な解析がなされている[Liu, 2008]。しかしながら、細胞自律的な概日時計振動体における D-box 制御因子の役割は検証されていなかった。一過性の活性を検出する実験系において、*DBP* に代表される PAR 型転写因子が D-box に結合して転写を促進し[Mitsui, 2001]、*E4BP4* が D-box を介した転写を抑制することは知られていた[Mitsui, 2001]。

本章では、*in vitro* 概日振動測定系において、時計遺伝子の siRNA ノックダウンおよび cDNA 過剰発現によって、細胞自律的な概日時計振動体の表現型を検証した。その結果、D-box 制御因子の量が、細胞の周期の長さの決定に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

## 結果

はじめに、*in vitro* 概日振動測定系の妥当性を検証するために、Rat-1 細胞に dcAMP 刺激した後、内在性の時計遺伝子の発現を定量的 PCR 法により経時的に測定した。*Per2* と *Bmal1* がお互いに逆位相の振動を示したが、*Clock* はリズム発現を示さなかった (Fig. 10)。これらの mRNA の発現リズムは生体内でも同様のパターンを示す [Ueda, 2005]。これは、培養細胞でも時計遺伝子の転写フィードバック機構が機能していることを強く示唆する重要な所見である。

細胞自律的な概日時計振動体の表現型を検証するために、時計遺伝子を siRNA によってノックダウンした。Rat-1 細胞に *Per2* 遺伝子プロモーターレポーターと各種時計遺伝子の siRNA を導入後、dcAMP で刺激して概日振動を誘起させた。レポーター遺伝子には、易分解性の改変型ホタルルシフェラーゼを用い、発光を測定した。E-box に対する転写活性化因子である *Bmal1* と *Clock* をノックダウンさせたところ、細胞のリズムが消失した (Fig. 11A, B)。転写抑制因子である *Cry1* のノックダウンでは、リズムの振幅は減少したが、周期はほとんど変化しなかった (Fig. 11A, B)。RRE 配列に対する抑制因子である *Rev-erba* のノックダウンは振幅や周期に影響を与えなかった (Fig. 11A, B)。*Rev-erba* はアイソフォームの存在が知られているため [Liu, 2008]、*Rev-erba* の機能が代償された可能性がある。

D-box 制御因子のノックダウンでは、*DBP* では周期が短くなったのに対して、*E4BP4* では周期が長くなった (Fig. 11A, B)。E-box に対するトランス因子を siRNA によりノックダウンさせたところ、システム全体のリズムが崩壊したが、他の 2 つの制御配列に対するトランス因子をノックダウンさせてもその影響は周期が変化するという部分的なものであり、システム全体のリズムが崩壊することはなかった。このことから、E-box を介した転写制御が時計の分子機構の中心であると言える。なお、内在性の mRNA 量を指標として、実験に用いた siRNA によるノックダウン効果を確認している (Fig. 11C)。*DBP* と *E4BP4* の siRNA の効果はタンパクレベルで

も確認している (Fig. 12)。以上の結果より、D-box 制御因子の量を変化させると、細胞の周期長が変動することがわかった。

D-box 制御因子の周期変動への作用を確認するため、*in vitro* 概日振動測定系において cDNA を過剰発現させる実験を行った。はじめに、トランスフェクションにより、野生型 D-box が DBP で活性化され、E4BP4 で抑制されること、変異 D-box ではこれが起こらないことを検証した (Fig. 13)。図に示したように予想通りの結果が得られ、過剰発現させた遺伝子産物が機能的に働くことが確認された。*in vitro* 概日振動測定系において DBP を過剰発現させたところ、周期が長くなり、E4BP4 の過剰発現では、周期が短くなった (Fig. 14A, B)。cDNA 過剰発現系においても、DBP と E4BP4 は周期に対して、逆の変動を引き起こした。

こうした現象が、*Per2* 遺伝子プロモーター特異的なものか否かを検証するために、*Per1* 遺伝子プロモーターレポーターを用いて、同様の検討を行った。DBP を過剰発現させた時、周期が長くなり、E4BP4 を過剰発現させた時、周期が短くなる結果が得られた (Fig. 15A, B)。この結果は、*Per2* 遺伝子プロモーターを用いた結果と合致するものである。

*Per1* と *Per2* 遺伝子プロモーターは、D-box を持っている (第一章)。外因性に導入するプロモーターレポーターが D-box を含まない場合でも、これまでみてきた周期変動が起こるか否かを検討した。リズム発振に必要な最小配列である E'-box と SV40 プロモーターをレポーターに連結したコンストラクトを作製した。このレポーターを用いた場合でも、DBP を過剰発現させると周期の延長が起こった (Fig. 16)。さらに、*Per2* 遺伝子プロモーターの D-box に変異を導入したレポーターを用いた場合でも、同様の周期変動が引き起こされた (Fig. 17)。このことから、D-box 制御因子は、細胞に内在する時計に作用することで、周期の長さを調節していることが分かった。以上の結果より、D-box 制御因子の量が、周期の長さの決定に重要な役割を果たしていることが示された。



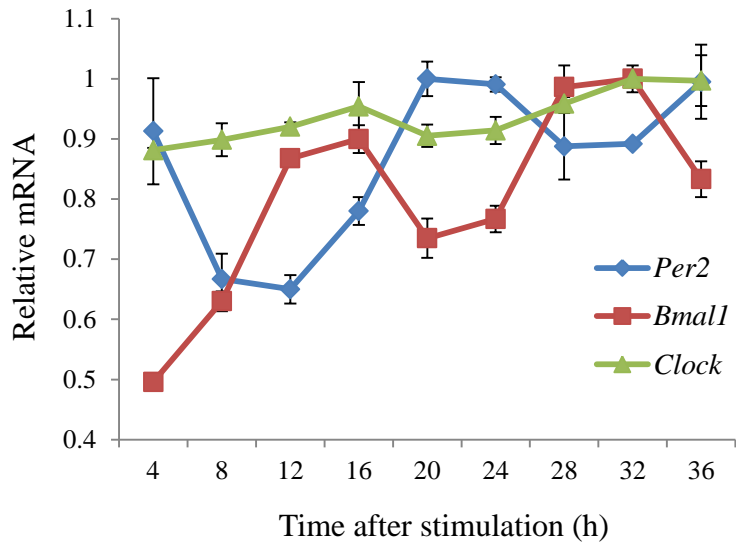


Figure 10. Temporal expression profiles of clock genes in rat-1 fibroblasts after dbcAMP treatment.

Quantification of temporal changes in *Per2*, *Bmal1*, and *Clock* mRNA. Top levels of each mRNA were arbitrarily set to 1. The time shown is after dbcAMP stimulation. Three time independent experiments were performed.

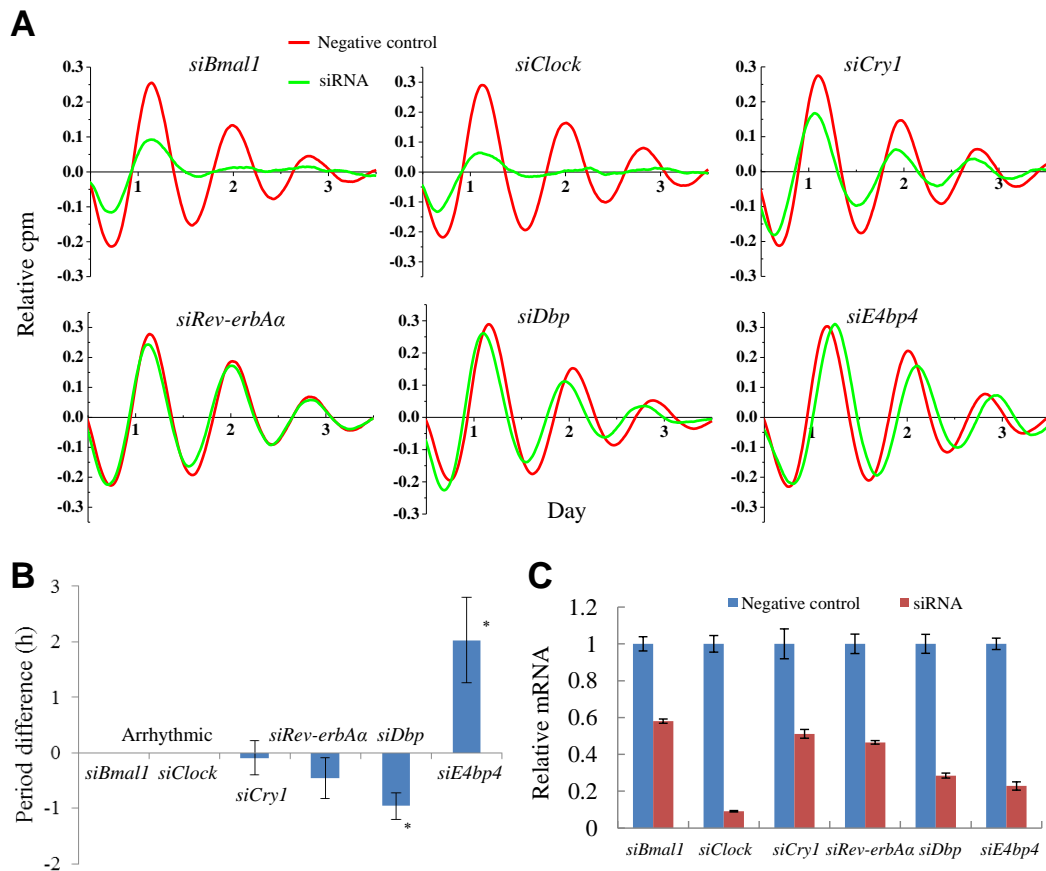


Figure 11. Effect of the siRNA knockdown of clock and clock-controlled genes on the cell autonomous circadian transcription of *mPer2*.

(A) After siRNA and *mPer2*-dLuc were co-transfected in rat-1 cells, bioluminescence was measured with photomultiplier tube detector assemblies. The red and green lines represent 50 nM of the negative control and target siRNA, respectively. The time shown is after dbcAMP stimulation. (B) Period length differences for cells transfected with siRNA as compared to cells transfected with negative control siRNA. All results are representative of three independent experiments, and the mean  $\pm$  SE is indicated. \* $P < 0.05$ . (C) At 24 h post-transfection, the reduction of target mRNA levels by their corresponding siRNAs in rat-1 cells was confirmed by Q-PCR. Values are relative to that of negative control transfected cells.

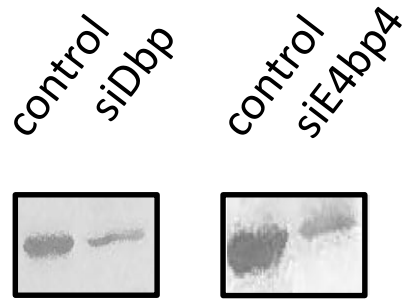


Figure 12. DBP and E4BP4 knockdown was confirmed by western blotting.

Rat-1 cells were transfected with Control siRNA or specific siRNA for DBP and E4BP4. Flag-tagged DBP or E4BP4 was co-transfected 24 h later. At 48 h after siRNA transfection, the DBP (left panel) or E4BP4 (right panel) protein level was determined by Western blotting using anti-Flag antibody.

*Per2*  
D-box

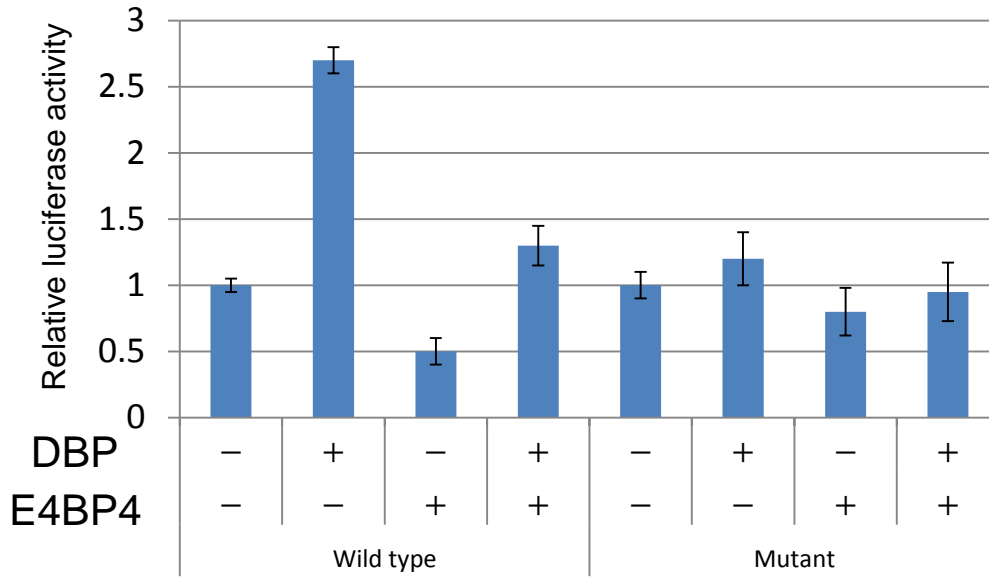


Figure 13. Exogenously transfected transgenes (DBP and E4BP4 protein) are functional in conventional reporter assay.

Transcriptional activation by DBP and transcriptional repression by E4BP4 of an SV40-driven destabilized luciferase (dLuc) reporter containing three tandem repeats of either the wild-type D-box (TTATGTAA) or the mutated D-box (CACCCGGC) and flanking sequences. Presence (+) or absence (-) of expression plasmid is denoted. Each value is the mean  $\pm$  SEM of three replicates for a single assay.

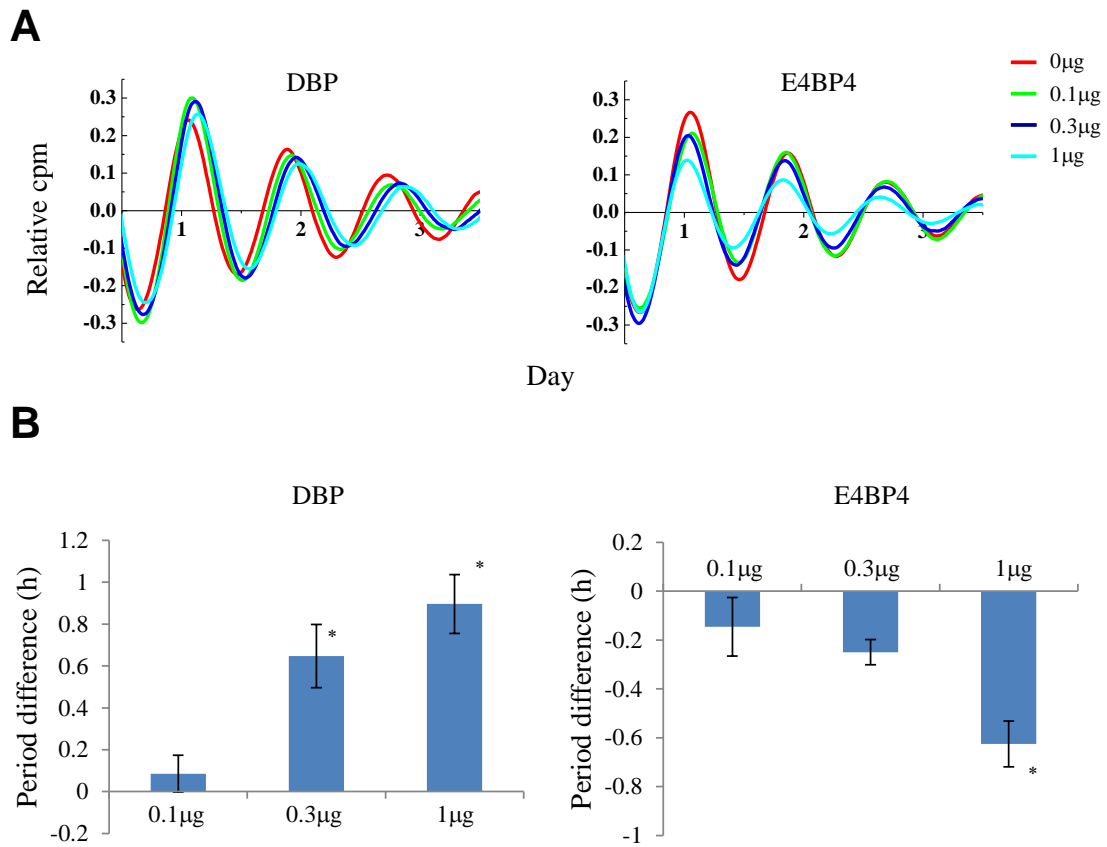


Figure 14. Effect of overexpression of DBP and E4BP4 on the cell autonomous circadian transcription of *mPer2*.

(A) After the introduction of the *mPer2*-dLuc reporter construct and the various cDNA expression vectors into the rat-1 cells, bioluminescence was measured with photomultiplier tube detector assemblies. The red, green, blue, and sky-blue lines represent 0 µg, 0.1 µg, 0.3 µg, and 1 µg of transfected cDNA, respectively. The time shown is after dbcAMP stimulation. (B) Period length differences for cells transfected with varying concentrations of the expression vectors as compared to cells expressing a control vector. All results are representative of three independent experiments, and the mean  $\pm$ SE is indicated. \*P<0.05.

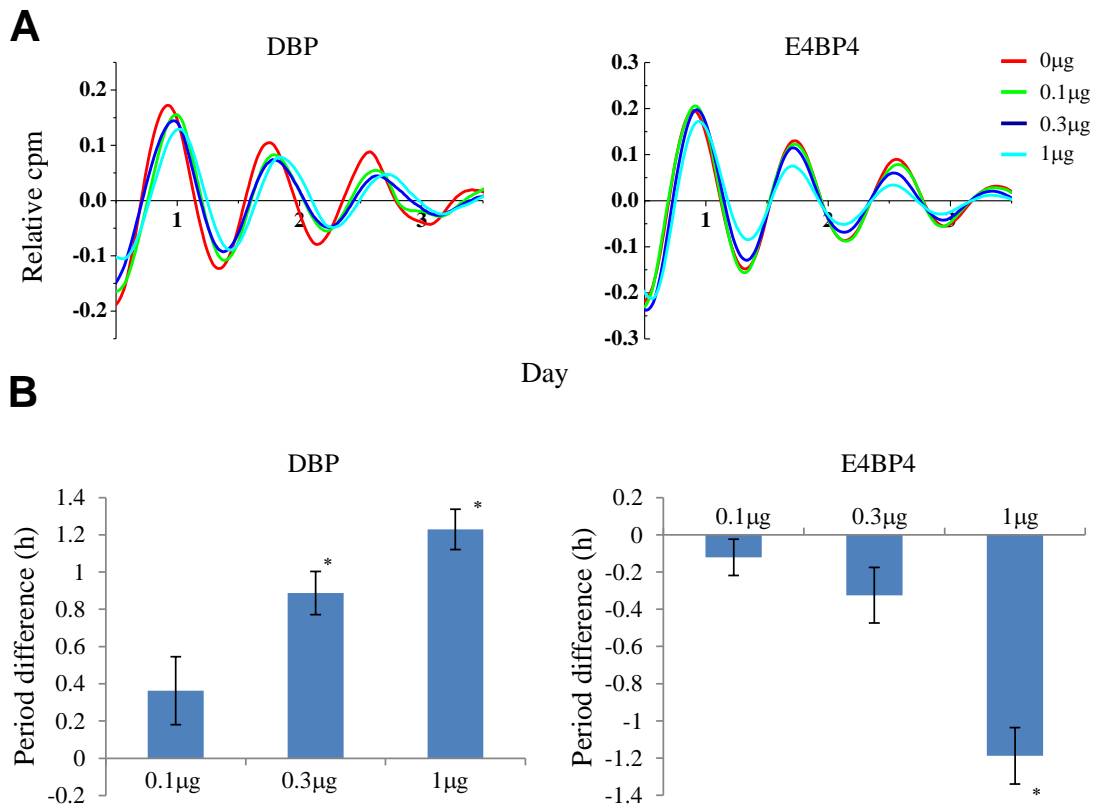


Figure 15. Effect of overexpression of DBP and E4BP4 on the cell autonomous circadian transcription of *mPer1*.

(A) After the introduction of the *mPer1*-dLuc reporter construct and the various cDNA expression vectors into the rat-1 cells, bioluminescence was measured with photomultiplier tube detector assemblies. The red, green, blue, and sky-blue lines represent 0 µg, 0.1 µg, 0.3 µg, and 1 µg of transfected cDNA, respectively. The time shown is after dbcAMP stimulation. (B) Period length differences for cells transfected with varying concentrations of the expression vectors as compared to cells expressing a control vector. All results are representative of three independent experiments, and the mean  $\pm$ SE is indicated. \*P<0.05.

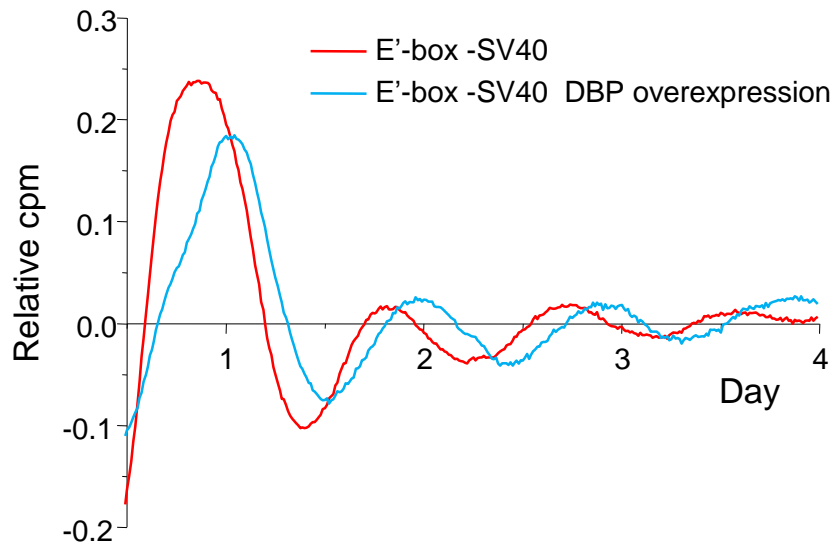


Figure 16. The E'-box SV40-dLuc displayed circadian oscillation, and DBP overexpression caused a longer period.

We performed cDNA overexpression studies of DBP genes with a real-time luciferase-monitoring assay using the E'-box region-SV40 driven luciferase reporter. This promoter construct did not contain the D-box elements. The time shown is after dbcAMP stimulation. The red and sky-blue lines represent 0  $\mu$ g and 1  $\mu$ g of transfected cDNA, respectively.

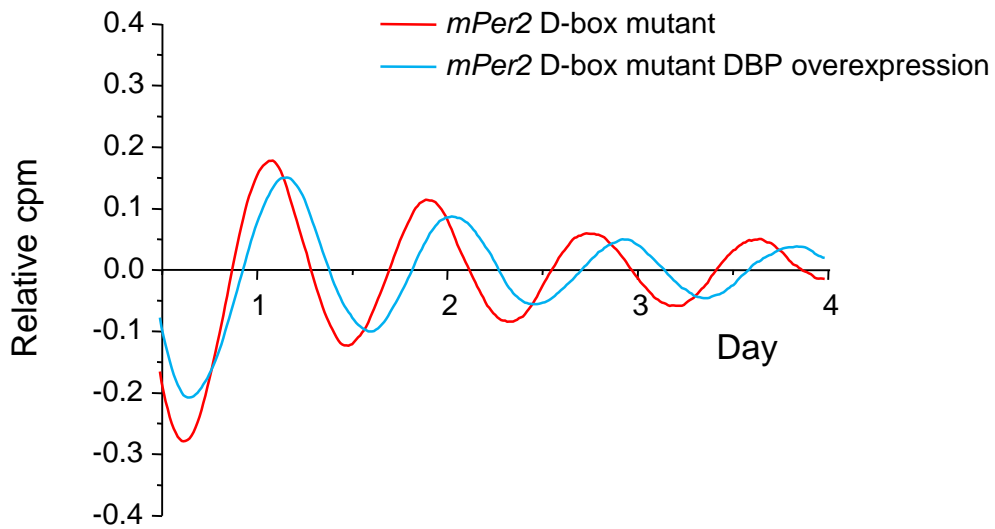


Figure 17. The D-box mutant of *mPer2* promoter-driven bioluminescence displayed circadian rhythms, and DBP overexpression caused a longer period.

We performed cDNA overexpression studies of DBP genes with a real-time luciferase-monitoring assay using the D-box mutant of *mPer2* promoter driven luciferase reporter. The D-box sequences were as follows: TTATGTAA (wild-type), CACCCGGC (mutant). The time shown is after dbcAMP stimulation. The red and sky-blue lines represent 0  $\mu$ g and 1  $\mu$ g of transfected cDNA, respectively.



## 考察

哺乳類の時計には、階層性があるので、行動リズムの表現型が細胞自律的な概日振動体の表現型を反映するとは限らない。今回の培養細胞で得られた表現型を、これまでに報告されてきた遺伝子改変動物の行動リズムを指標とした表現型と比較した。*Bmal1* ノックアウトマウスは、光変化のない状態で飼育した場合は、行動リズムが消失する[Bunger, 2000]。*DBP* ノックアウトマウスでは、行動リズムの周期長が短くなる[Lopez-Molina, 1997]。これらの遺伝子については、今回培養細胞で得られた表現型と一致した。

しかし、全ての遺伝子において表現型が一致したわけではなかった。*Clock* ノックアウトマウスでは、行動リズムが消失することはない[DeBruyne, 2006]。*Clock* については、相同遺伝子である *Npas2* が存在するため、単独のノックアウトでは、行動リズムに変化が現れないとされていた[DeBruyne, 2007]。本実験においては、*Clock* ノックアウトにより、リズムが消失する表現型となった。*Npas2* は前脳特異的に発現する *Clock* の相同遺伝子として見出された経緯がある[Dudley, 2003]。今回用いた Rat-1 細胞では *NPAS2* の発現量が低く、検出限界近いことを確認している (data not shown)。このため、末梢組織においては、*NPAS2* の発現量が少ないため、*Clock* の単独ノックアウトによって、リズム消失という劇的な表現型が現れたのだと考えられる。*Cry1* ノックアウトマウスについては、行動リズムは維持されるのに対して[van der Horst, 1999]、本実験では、リズムの振幅が大きく低下していた。このような違いは、中枢と末梢では、概日振動を形成するために必要な構成要素が異なる可能性、あるいは中枢時計が末梢時計を同調させるという階層性の存在が影響していると考えられる。なお、*E4BP4* の遺伝子改変動物の報告は無く、本論文は *E4BP4* が周期長の決定に関与することを示した初めての報告である。

それでは、どのようにして、約 24 時間という長い周期が作り出されるのであうか。*Per* 遺伝子に代表される時計遺伝子は、自分自身の転写を抑制するというフィードバック機構が働い

ている。産生されたタンパク質がすぐに抑制をかけてしまうと、長周期は形成されない。これには少なくとも2つの重要な遅延機構が存在すると考えられる。一つは、カゼインキナーゼ Iε による PER タンパク質のリン酸化とそれに引き続いて起こる PER タンパク質の分解である [Lowrey, 2000]。すなわち、ある閾値まで達しないと PER タンパク質は分解が合成を上回って蓄積せず、足止めされた状態になっていると考えられる。もう一つの遅延機構で重要であるのは、産生されたタンパク質の細胞質から核への移行メカニズムである。PER タンパク質と CRY タンパク質との二量体の形成が核移行とタンパク質の安定化を促進する [Kume, 1999]。このため、PER タンパク質のみではなく、他の因子も十分量発現することによってようやく、核内で自分自身の転写を抑制することができるようになる。

DBP は *Per2* の転写を活性化するので、DBP を過剰発現させると、PER2 タンパクは早く蓄積することになると思われる。そうすると、24 時間サイクルが短縮するはずであるが、実験結果はその逆で、DBP の過剰発現で周期は延長した。この結果は、別経路の存在を強く示唆している。E4BP4 タンパク質が、PER2 あるいは CRY2 とタンパク相互作用する報告がある [Ohno, 2007b]。このため、タンパク相互作用を介した、PER2 の核移行タイミングを検証していくことが、次のアクションプランになると考えられる。このように、D-box 制御因子が、概日振動体の形成過程において、複数の機序で関与していると思われる。

先に述べた PER タンパク質のリン酸化部位の変異を原因とする、睡眠相前進症候群 [Toh, 2001] [Xu, 2005] や睡眠相後退症候群 [Ebisawa, 2001] の報告がなされてきた。著者の知る限り、ヒトにおける D-box 制御因子の遺伝子多型の報告は無い。今回の研究は、周期長の決定における D-box 制御因子の重要性を示したものであり、今後、睡眠障害をはじめとするヒトにおける疾患関連性の解明に繋がることを期待している。

### 第三章 インスリンによる肝臓時計の同調

#### 序

哺乳類の体内時計における次なる課題は、末梢時計を制御する同調因子の同定である。先に述べたように、Rat-1 細胞に高濃度血清を処理すると、*Per1* および *Per2* のすみやかな発現誘導が起り、これが契機となって時計遺伝子が概日性の遺伝子発現を示すことが報告されている[Balsalobre, 1998]。この後、さまざまな薬剤を用いて培養細胞のリズムを引き起こすシグナル入力系の研究がなされた。培養細胞では、血清刺激直後に *Per1*、*Per2* 遺伝子が急性誘導され、そののち、概日性の遺伝子発現が認められる。この現象は SCN において照射後にみられる現象によく似ており、“夜”に光を当てると、*Per1*、*Per2* 遺伝子が急性誘導される[Shigeyoshi, 1997] [Zylka, 1998]。このことから、培養細胞における血清刺激には SCN における光によるリセットと同じような機構が働いていると考えられる。それ故、血清に含まれる成分を解析することで、生体内での同調因子を検索できるのではないかと考えられ、精力的な試みがなされた。

末梢組織の概日リズムを制御する液性因子として最も理解が進んでいるものとして、副腎皮質ホルモンであるグルココルチコイドがある[Balsalobre, 2000]。合成グルココルチコイドである Dex は血清刺激と同様に Rat-1 繊維芽細胞の系で時計遺伝子のリズム発現を誘導できることが証明された。グルココルチコイドの血中濃度には明瞭な概日リズムがあり、そのリズムは SCN によって厳密に制御されていることが知られていた。腹腔内へ Dex を投与してみると末梢臓器のリズムがシフトした。さらに、グルココルチコイド受容体の肝臓特異的ノックアウトマウスを用いて同様の投与実験を行うと、肝臓の概日リズムだけがシフトしなかった。このことから、グルココルチコイドが生体内でリズムの同調因子として働きうることが示された。

しかしながら、グルココルチコイド受容体の肝臓特異的ノックアウトマウス[Balsalobre, 2000]

や副腎を外科的に除去したラット[Le, 2001]においても肝臓の概日リズムは変わらず維持されることから、グルココルチコイド以外の同調因子が存在していることが示唆されていた。培養繊維芽細胞において、プロテインキナーゼ A[Yagita, 2000]、MAPK カスケード[Akashi, 2000]も同調を引き起こすシグナルとして働くことが分かってきた。また、血管内皮細胞においては、アンジオテンシン II の刺激によって時計遺伝子の概日性の発現が認められた[Nonaka, 2001]。したがって、末梢組織の概日リズムは単一の同調因子によって支配されているのではなく、複合的なものだと考えられる。末梢組織においては各々の組織や細胞特異的に同調を引き起こすシグナルを使い分けていることも考えられる。

夜行性のマウスに“昼”にだけ餌を与える給餌をくり返すと、肝臓などの末梢組織の時計遺伝子の発現パターンが逆位相になることが知られている[Damiola, 2000]。この時、腎臓、心臓、膵臓などの末梢組織の時計遺伝子の発現パターンは、“昼”にだけ餌を与える給餌をくり返してから完全に逆転するまでに1週間を要するが、肝臓のリズムは3日程度で逆転する[Le, 2001]。このことは、末梢組織の概日リズムを制御する因子の中でも肝臓に特異的に作用する、あるいは肝臓に感受性が高いものが存在することを示唆している。食餌によって変動するホルモンなどの液性因子が末梢時計を同調させている図式が考えやすい。そこで、本章では肝細胞の概日リズムの同調を引き起こす因子として、食餌による血糖の上昇に応答して放出されるインスリンを想定した。

インスリンによる肝臓時計に対する同調作用はこれまで検証されてこなかった。その理由として、概日リズムの研究に良く用いられる Rat-1 等の繊維芽細胞は肝細胞をはじめとするインスリンの標的細胞に比べて、インスリンに対する応答性が低いことが挙げられる。そのため本研究においては肝細胞を用いて、インスリンの同調因子としての可能性を検証した。培養細胞のみならず、インスリンを欠乏させた糖尿病ラットを用いて、動物個体でもインスリンが肝臓時計の同調因子であることを証明した。

## 結果

### インスリンは肝細胞において時計遺伝子の概日性発現を誘導する

はじめに、ラット肝細胞癌由来細胞株である H4IIE 細胞を用いて、インスリンの同調因子としての可能性を検証した。インスリンを 2 時間処理して時計遺伝子の発現を測定した。50nM のインスリンは、*Per1*、*Per2* および *Dec1* の遺伝子発現を急性誘導させた (Fig. 18A)。これらの遺伝子は、SCN において光照射後に発現誘導されることが知られている [Shigeyoshi, 1997] [Zylka, 1998] [Honma, 2002]。Rat-1 細胞では、50nM のインスリンによって *Per1* と *Per2* の遺伝子発現誘導は起こらなかった (Fig. 18A)。*Dec1* は、Rat-1 細胞においても H4IIE 細胞より弱くだが、インスリンによって発現誘導された (Fig. 18A)。Rat-1 と H4IIE 細胞におけるインスリンの作用濃度を *Dec1* の発現誘導を指標にして比較した。H4IIE 細胞においては、インスリンは 1nM で *Dec1* の遺伝子発現を誘導した (Fig. 18B)。一方、Rat-1 細胞では、*Dec1* の遺伝子発現を誘導するのに、インスリンは 50nM 必要であった (Fig. 18B)。インスリンによるホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼの遺伝子発現抑制作用は、ラット肝臓で認められる現象であるが、これを培養肝細胞で再現するためには、50nM のインスリン濃度が必要であることを筆者らのグループは報告している [Yoshida, 1996]。これまで末梢時計のモデル系として汎用されてきた Rat-1 細胞では、インスリンの感受性が弱く、インスリンの同調因子としての働きを検証するには適していない細胞であったといえる。この結果の魅力的な解釈の一つとして、細胞特異的な同調因子の存在の可能性が考えられる。

時計遺伝子が発現誘導されるシグナルを同定するため、MAPK の阻害剤である PD98059 と PI3K 阻害剤である LY294002 を前処理してインスリンの発現誘導作用への影響を検討した。PD98059 処理によって、*Per1* の発現誘導が阻害された (Fig. 18C)。また、LY294002 処理で *Per2* の発現誘導が阻害された (Fig. 18C)。この結果から、インスリンによる *Per1* の発現誘導には MAPK が、*Per2* の発現誘導には PI3K が関わっていることが示された。

インスリンが、肝細胞の時計遺伝子の概日性発現を誘導するかを検討した。H4IIE 細胞にインスリンを 1 時間処理した後、培地からインスリンを除いて、時計遺伝子の経時的な発現変動を測定した。インスリンを 1 時間処理すると *Per2* 遺伝子発現は 3 時間後まで上昇し、その後は 12 時間後を谷間、24 時間後をピークとするリズムを示した (Fig. 18D)。*DBP* 遺伝子発現はインスリン処理から 9 時間後を谷間とし、21 時間後をピークとするリズムを示した (Fig. 18D)。*DBP* の位相が *Per2* の位相より先行する現象は肝臓においても認められている [Ueda, 2005]。同調因子として働く因子は、一般的に処理する時間帯によりその作用が異なることが分かっている。このことを位相反応曲線が示されたという。H4IIE 細胞はインスリンによって時計遺伝子の概日性発現が誘導されるものの、リズムの持続安定時間は短く、位相反応を検証するには十分な細胞ではなかった。そこで、実際の肝臓の分化表現型を高く維持することができるラット初代培養肝細胞を用いて、インスリンの同調因子としての作用を検証した。

### 肝細胞の時計は、3 次元培養することによりシャーレ上で長く維持される

初代培養肝細胞といえども、通常良く使われる I 型コラーゲンをを用いた単層培養では急速に肝機能を失う (脱分化する)。一方、EHS (Engelbreth-Holm-Swarm sarcoma) 由来のマトリクス上で培養すると、肝細胞の分化が高く維持されることが分かっている [Oda, 2008]。したがって、本培養法は、リズム維持と細胞の分化状態との関係を検討できる優れた評価系であるといえる。肝細胞を単離してから培養 84 時間後まで、時計遺伝子の発現を経時的に測定した。時計遺伝子の中では、振幅が最も大きいとされている *DBP* をリズムの指標に選択した。I 型コラーゲン上の肝細胞では、*DBP* mRNA のリズムは急速に振幅が小さくなり、4 日目には低レベルでほぼリズムが消失することが分かった (Fig. 19B)。一方、EHS-gel 上の肝細胞では *DBP* mRNA のリズムは少なくとも 4 日間維持されていた (Fig. 19B)。

EHS-gel の主要構成成分として IV 型コラーゲンやラミニンが知られている [Kleinman, 1986]。

これらの成分が、肝細胞のリズム維持に影響を及ぼすかを検討した。IV型コラーゲン、ラミニン上で肝細胞を培養すると、培養3日目の *DBP* mRNA のリズムは低レベルでほぼ消失し、*Per1*、*Per2* mRNA のリズムは高レベルでほぼ消失した (Fig. 20A)。それに対して、EHS-gel 上の肝細胞ではこの培養時間においては *DBP*、*Per1* および *Per2* mRNA のリズムは維持していた (Fig. 20A)。これらの結果は、EHS-gel によるリズム維持は EHS-gel の主要構成成分の単独作用によるものではないことを示している。

これまで用いてきた EHS-gel 上の細胞は隣り合った細胞と密に接して凝集していた (Fig. 19A)。細胞同士の物理的相互作用を減らす目的で、細胞密度を減少させて培養した。その結果、1つ1つの細胞がほぼ単独で存在するようになった (Fig. 19A)。このような状況の肝細胞においても、高密度培養と同様に *DBP* mRNA のリズムは維持された (Fig. 19C)。肝細胞の場合はリズム発振に関して、細胞間相互作用の影響は少ないと考えられた。

細胞外マトリックスを変化させた時、肝細胞に起こる最も明らかな変化として細胞形態がある。I型コラーゲン、IV型コラーゲンおよびラミニン上で培養した肝細胞は、扁平な単層になり、EHS-gel 上で培養した肝細胞は丸い形態を示した (Fig. 19A)。Ingberらのグループは最初に細胞形態と肝機能について報告し、細胞接着面積(つまり広ければ単層になり、狭ければ立体になる)と肝機能が逆相関の関係にあることを報告した [Singhvi, 1994]。筆者らの研究グループも肝細胞に様々な細胞形態をとらせ肝機能を調べ、立体的な丸い細胞ほど機能が高いことを見出した [Oda, 2001]。ここでは、EHS-gel と同じく細胞形態を球形にできるポリスチレン誘導体である PVLA (poly-N-p-vinylbenzyl-D-lactonamide) 上で肝細胞を培養し [Kobayashi, 1994]、細胞の形態とリズム維持との関連を検証した。PVLA 上の肝細胞は報告にあったように、EHS-gel 上で見られるような丸い細胞形態を示した (Fig. 19A)。PVLA 上で培養した肝細胞では、*DBP* mRNA のリズムは EHS-gel 上で培養した肝細胞と比べると振幅は小さかったが、I型コラーゲン上で培養した肝細胞と比べると振幅が大きくリズムを維持していた (Fig. 19D)。*Per1* mRNA に関しては、PVLA と EHS-gel 上で培養した肝細胞では、大きな差はなく維持さ

れた(Fig. 20B)。これらの結果は、細胞外マトリックスの種類に関わらず、細胞形態が 3 次元の構造を示せば、肝細胞のリズムが維持されることを示している。

#### インスリンは肝細胞の時計の同調因子である

ラット初代培養肝細胞は I 型コラーゲン上の培養では、リズムを急速に失うが、マトリゲルを用いて培養すると、リズムが安定して維持されることを示した。先述した通り、筆者はレポーター遺伝子として、易分解性の改変型ホタルルシフェラーゼを用いることで、*in vitro* でリアルタイムに概日振動を測定する実験系を構築している。ここでは、*Per2* 遺伝子プロモーターに易分解性のルシフェラーゼを導入したトランスジェニックラットを作製した[He, 2007]。このラットから肝細胞を調製し、細胞の 3 次元構造を保持するように、EHS-gel 上で培養した。この培養方法は無血清、無ホルモンで一週間程培養でき、インスリンによる位相反応曲線を検証するには大変優れた評価である。なお、無血清・無ホルモン条件で培養を行っているが、アポリポタンパク質の発現レベルを指標として、肝細胞の単離直後のレベルを維持していることを確認している[Oda, 2005]。この実験系でリアルタイムに肝細胞の時計を観察することに成功した(Fig. 21)。これまで同調因子として知られている Dex の処理によって、位相シフトが引き起こされることも確認できた(Fig. 21)。

さまざまな時刻にインスリンを一過性に 2 時間処理して、その後のリズム位相に与える影響を検討した。ここでは、発光が谷間を迎える時刻を T0 と定義した。その結果、インスリンはいずれの時間帯においても、肝細胞のリズム位相をシフトさせることが分かった(Fig. 22A)。T0、T4 のインスリン処理では位相が前進し、T8、T12、T16、T20 の処理では位相が後退した(Fig. 22A)。つまり、「位相反応曲線」を示した(Fig. 22B)。ラットから肝細胞を単離する前の時刻で表現すると、インスリンは「朝」の処理では位相を前進させるが、「夜」の処理だと遅らせることが分かった。げっ歯類では「夜」の摂食時にインスリンが出ることから、インスリンは



生理的には位相を遅らせる方向で働いていると考えられた。このようなインスリンによる位相シフト作用が、PD98059 あるいは LY294002 の処理によって阻害された (Fig. 23)。このことはインスリンが MAPK と PI3K 経路で肝細胞のリズム位相をシフトさせることを示唆している。

以上の結果から、インスリンは肝細胞の時計に対して、位相反応曲線を示すような、同調因子であると結論した。

#### インスリンを欠乏させた糖尿病ラットでは、肝臓時計の位相が前進する

実際の個体において、インスリンが肝臓の時計に与える詳細な影響を検討するために、膵臓のランゲルハンス氏島に選択的な毒性を持つストレプトゾトシンをラットに投与することでインスリン分泌が阻害された I 型糖尿病ラットを作製した。血中グルコース濃度は、正常ラットに比べ、糖尿病群のラットで著しく高い値を示し、糖尿病が発症していることを確認した (Fig. 23)。非絶食状態の血清中のコレステロール、トリグリセライド、リン脂質の濃度を測定した結果、そのいずれも糖尿病のラットで高い値を示し、糖尿病時に見られる脂質代謝の異常が起きていることが確認できた (Fig. 24)。

糖尿病を発症したラットの肝臓における遺伝子発現の概日リズムを 4 時間毎で測定した。その結果、時計遺伝子全体のリズム位相が 4 時間程、前進していることが分かった (Fig. 25A)。中でも *Dec1*、*Dec2* の遺伝子発現は特徴的な変化を示した (Fig. 25A)。*Dec1* は、正常ラットでみられた、“夜”の時間帯に高く、“昼”の時間帯に低いといった mRNA のリズムが糖尿病ラットでは、低レベルで失われていた (Fig. 25A)。対照的に、*Dec2* mRNA 量は、糖尿病ラットでは、“昼”の時間帯に著しく上昇していた (Fig. 25A)。*Dec1* KO マウスにおいては、代償的に *Dec2* の発現レベルが亢進することが分かっている [Grechez-Cassiau, 2004]。さらに、細胞レベルでの *Dec1* の欠損は、E-box による転写制御を受ける時計遺伝子の位相を早めるという報告がある [Nakashima, 2008]。本章の冒頭で、*Dec1* がインスリンの感受性の高い時計遺伝子であることを確認している (Fig. 18A, B)。これらのことから、インスリン欠乏によって、*Dec1*

のリズム発現が低レベルで消失し、肝臓時計の位相前進が引き起こされたと考えられる。

以上の結果から、インスリンが欠乏したラットの肝臓では、時計の異常が起こっていることが示された。

#### 動物個体においてもインスリンは肝臓時計の同調因子として作用する

糖尿病の肝臓では、リズム位相が前進することが分かったが、その他の組織にも時計遺伝子のリズム異常が生じるのであろうか。正常ラットと糖尿病ラットの摂食量を 3 時間毎に渡って測定したところ、共に”夜”高く”昼”に低い摂食行動の概日リズムが見られ、糖尿病時においても摂食行動のリズムに変化が無いことが分かった (Fig. 25B)。このことから、糖尿病時の中枢時計は正常であることが示唆された。

肝臓以外の末梢時計への影響を検証する目的で、糖尿病ラットの肺、脳、筋肉および脂肪組織における *Per2* の発現変動を測定した。組織の採取は、ZT4 と ZT16 に実施した。ZT とは、Zeitgeber time の略で、明暗の時刻情報のある環境下での時間を表す。ZT0 で点灯し、ZT12 で消灯する。正常ラットの肝臓においては、時計遺伝子 *Per2* は、“昼”間 (ZT4) に低く、“夜”間 (ZT16) に高い発現リズムを示した (Fig. 26)。肺、脳、筋肉および脂肪組織においても、*Per2* の発現量は“昼”“夜”で変動するリズムを示した (Fig. 26)。糖尿病ラットの肺と脳における *Per2* の発現量は正常ラットと比較して変化しなかった (Fig. 26)。糖尿病ラットの肝臓と脂肪組織においては、*Per2* は“夜”の発現量が低くなり、筋肉では逆に発現量が高くなるという異常が認められた (Fig. 26)。次に、インスリンによる *Per2* の急性発現誘導作用を、糖尿病ラットを用いて検証した。糖尿病ラットにインスリンを注射し 2 時間後に各組織を摘出して、遺伝子発現を測定した。その結果、インスリンは、肝臓、筋肉および脂肪組織において、*Per2* の急性発現誘導を引き起こした (Fig. 26)。しかし、肺、脳においては、このような作用は認められなかった (Fig. 26)。

以上の結果から、インスリン欠乏による糖尿病時には、インスリン感受性組織(肝臓、筋肉および脂肪)において、時計の異常が起こることが分かった。対照的にインスリンの感受性が低い組織(肺、脳)の時計は正常であることも示された。

インスリン投与が肝臓時計の位相へ与える影響を検討した。休息期(“昼”)のインスリン投与は肝臓時計の位相を早め、活動期(“夜”)のインスリン投与は位相を後退させた(Fig. 27)。糖尿病の肝臓時計は位相が前進しているが、活動期のインスリン投与は、リズムの位相を正常化させるが、“昼”に注射するとむしろ逆効果になることが分かった。

以上の結果から、動物個体においても位相反応曲線が示され、インスリンが肝臓時計の同調因子であることが証明された。

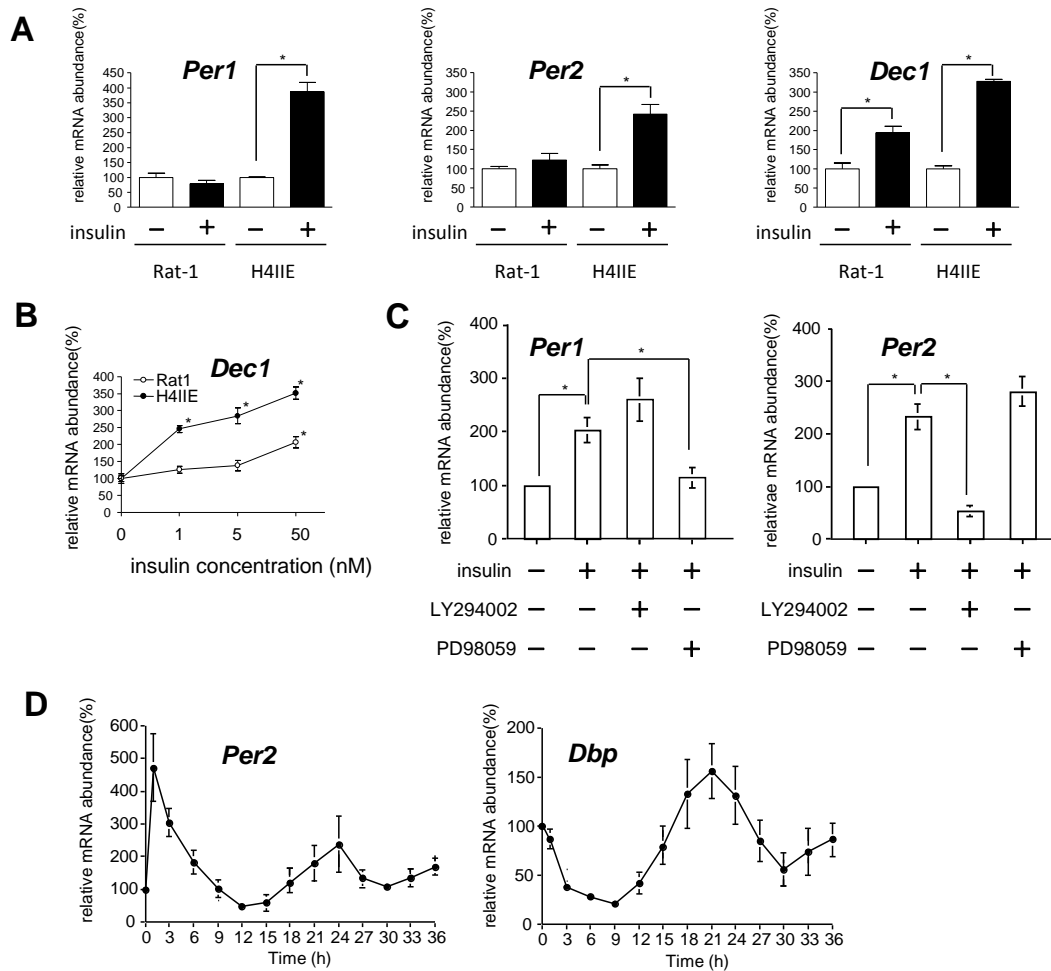


Figure 18. Insulin acts as an acute entrainment signal in the cell-autonomous hepatic clock. (A) Relative *Per1*, *Per2*, and *Dec1* mRNA levels were determined by RT-PCR following addition of 50 nM insulin to the H4IIE and Rat-1 cell culture medium for 2 h. Each value was normalized to *Gapdh*. \* $p < 0.05$  versus PBS-treated cells (Student's *t*-test). (B) Dose-dependent induction of *Dec1* mRNA following 2-h insulin treatment of H4IIE and Rat-1 cells as determined by real-time RT-PCR. Each value was normalized to *Gapdh*. \* $p < 0.05$  versus PBS-treated cells (Dunnett's test). (C) Relative *Per1* and *Per2* mRNA levels were determined by northern blotting in H4IIE cells for 30 min with inhibitors of proteins mediating the insulin signaling pathway (LY294002 and PD98059), followed by a 1-h treatment with 50 nM insulin. *ApoE* mRNA was used as an internal control. \* $p < 0.05$  versus PBS- or insulin-treated cells (Student's *t*-test). (D) Temporal mRNA expression levels of *Per2* and *Dbp* were determined by northern blotting following a shift of H4IIE cells to medium containing 50 nM insulin for 1 h at T 0, washing with PBS, and incubation in serum-free medium. Three time independent experiments were performed.

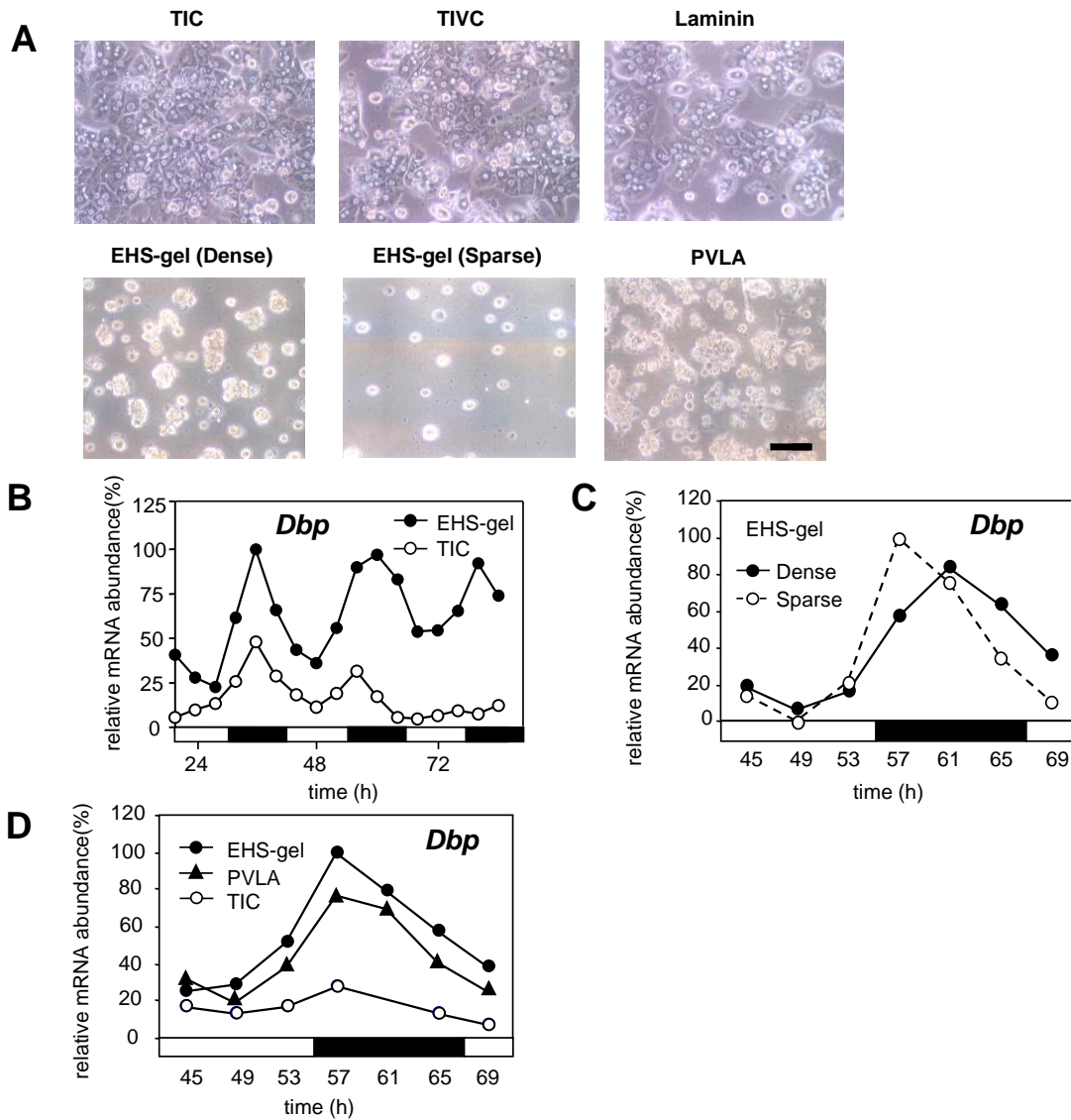


Figure 19. Spatial configuration of hepatocytes controls circadian time of the cells.

(A) Hepatocytes were cultured on dishes coated with TIC, TIVC, laminin, and PVLA at a high density ( $1 \times 10^7$  cells/dish). Hepatocytes were also cultured on dishes coated with EHS gel at both high and low densities ( $2.5 \times 10^6$  cells/dish). The morphological appearance of cultured hepatocytes at 48 h is shown. The scale bar indicates 100  $\mu\text{m}$ . (B) Hepatocytes were plated on TIC- and EHS gel-coated dishes at a high density. Northern blotting was used to determine the *Dbp* mRNA level. The open and solid bars indicate light and dark conditions where the animals were kept before the preparation of hepatocytes. (C) Hepatocytes were cultured on an EHS gel-coated dish at high and low densities. Northern blotting was used to determine the *Dbp* mRNA level in rat primary hepatocytes cultured on EHS gel at high and low densities. (D) Hepatocytes were cultured on dishes coated with TIC, PVLA, and EHS gel at a high density. Northern blotting was used to determine the *Dbp* mRNA level.

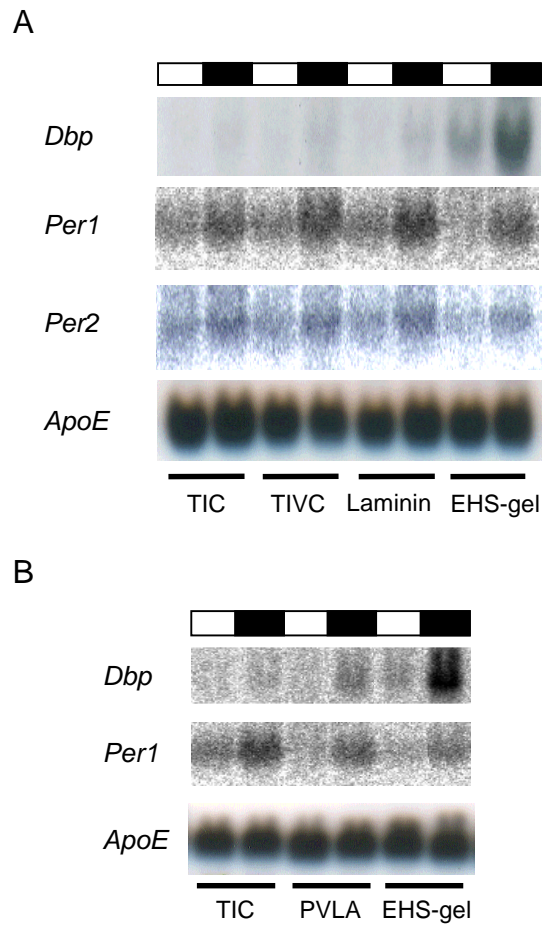


Figure 20. The effects of extracellular matrix and cell shape on circadian gene expression in rat primary hepatocytes.

(A) Hepatocytes were cultured for 48 h (1400) and 56 h (2200) on dishes coated with TIC, TIVC, laminin, and EHS-gel at a high density. Northern blotting was used to determine the *Dbp*, *Per1*, *Per2*, and *Apo E* mRNA levels. (B) Hepatocytes were cultured for 48 h (1400) and 56 h (2200) on dishes coated with TIC, PVLA, and EHS-gel at a high density. Northern blotting was used to determine the *Dbp*, *Per1*, and *Apo E* mRNA levels.

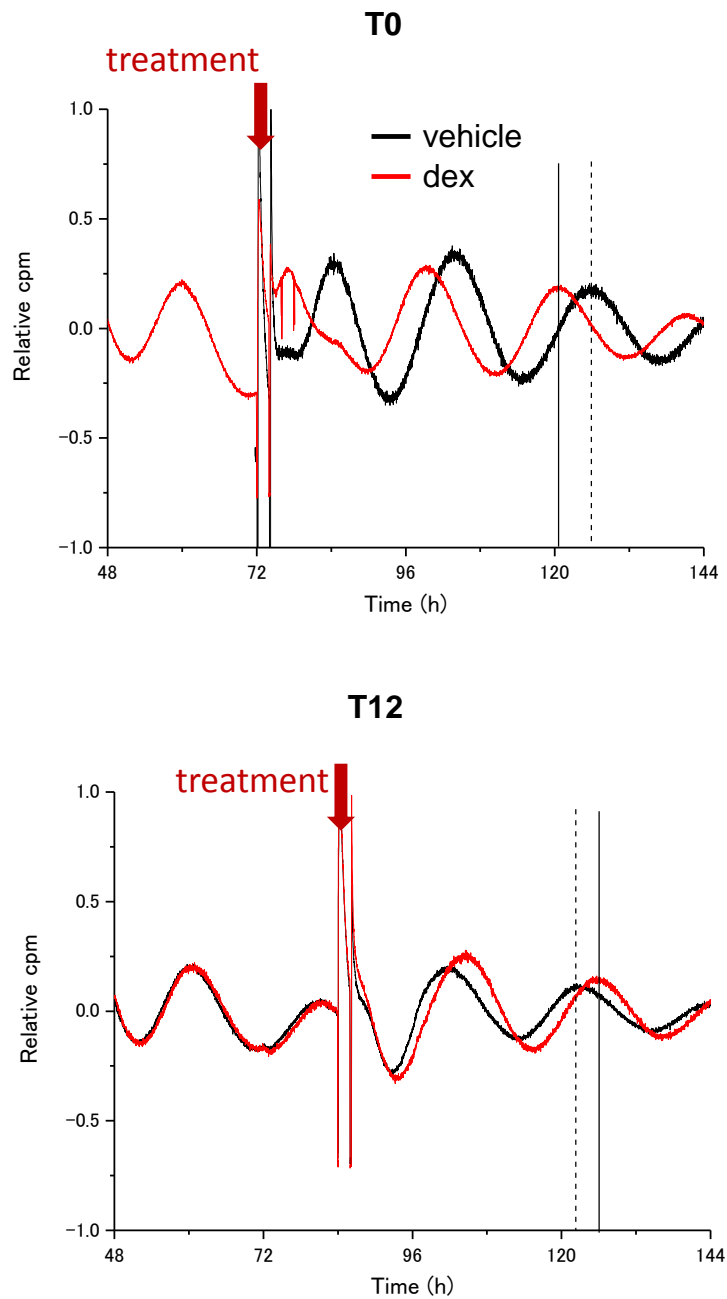


Figure 21. Phase shift induced by dexamethasone in rat primary hepatocytes. Hepatocytes derived from Per2-dLuc transgenic rats were isolated and plated on an EHS-gel coated dish in serum- and hormone-free medium. At the indicated circadian time, hepatocytes were treated for 2 h with 100 nM dexamethasone (red curves) or with vehicle (black curves) and bioluminescence levels measured. Dotted and black lines indicate peaks after vehicle and dexamethasone treatment, respectively.

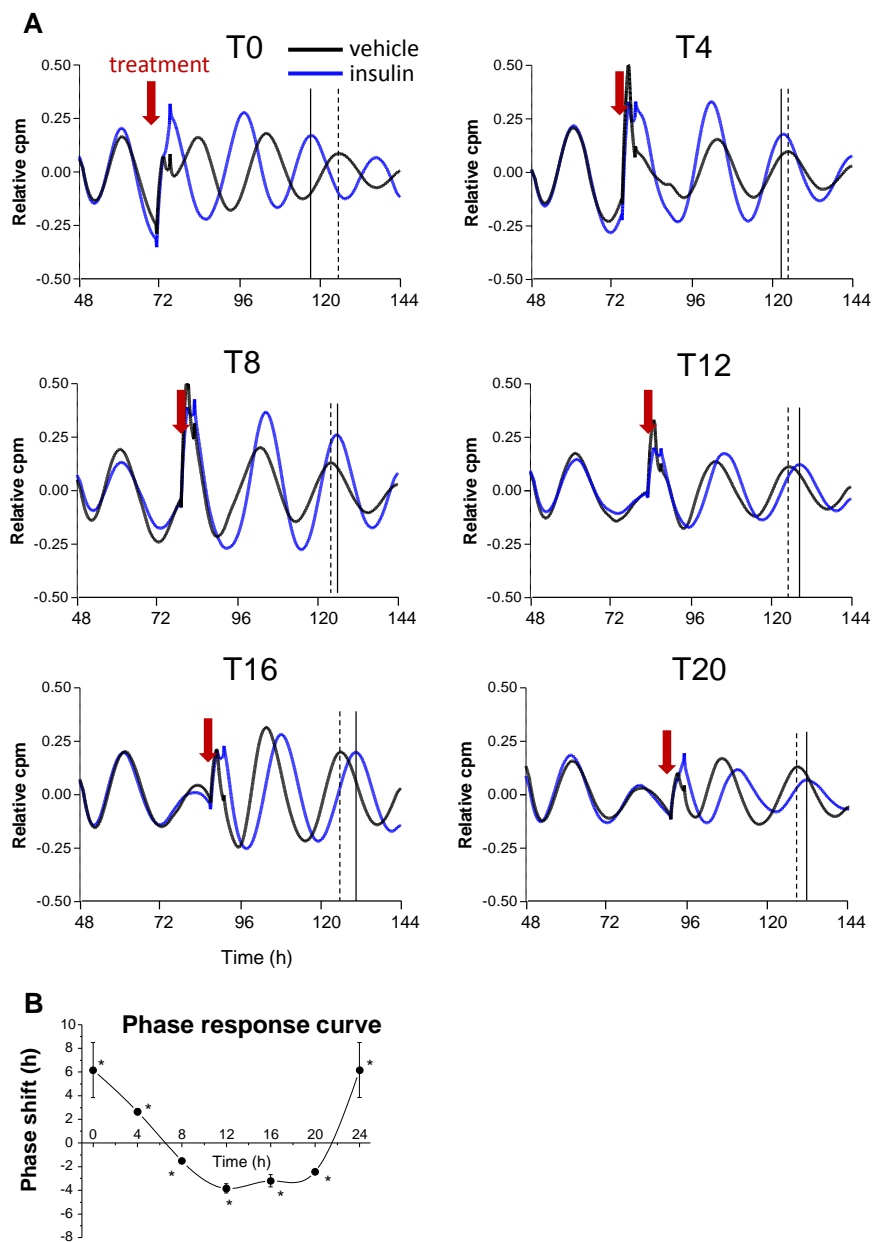


Figure 22. Insulin directly regulates the phase entrainment of hepatocyte circadian oscillators throughout the 24-h day.

(A) Hepatocytes derived from Per2-dLuc transgenic rats were isolated and plated onto an EHS gel-coated dish in serum- and hormone-free medium. At the indicated circadian time, hepatocytes were treated for 2 h with 50 nM insulin (blue curves), or with vehicle (black curves), and bioluminescence levels were measured. Black and dotted lines indicate peaks after insulin and vehicle treatment, respectively. (B) The phase response curve associated with insulin treatment at each circadian time point (T0, T4, T8, T12, T16, and T20). \* $p < 0.05$  versus vehicle-treated cells (Student's t-test). Three time independent experiments were performed.



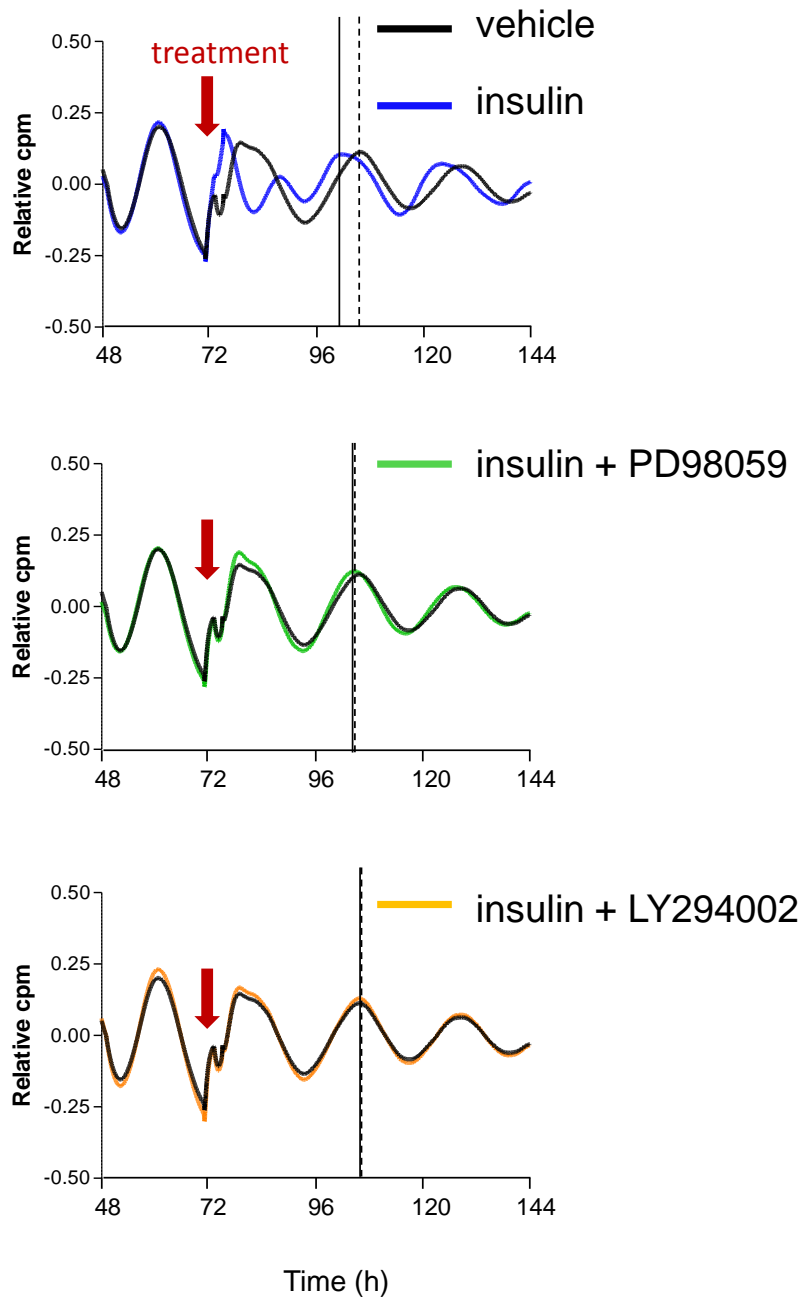


Figure 23. Effects of kinase inhibitors on insulin induced resetting of the rhythm in rat primary hepatocytes.

Hepatocytes derived from Per2-dLuc transgenic rats were isolated and plated on an EHS-gel coated dish in serum- and hormone-free medium. At the indicated circadian time, hepatocytes were treated for 2 h with 50 nM insulin or with vehicle or insulin + kinase inhibitor and bioluminescence levels measured.

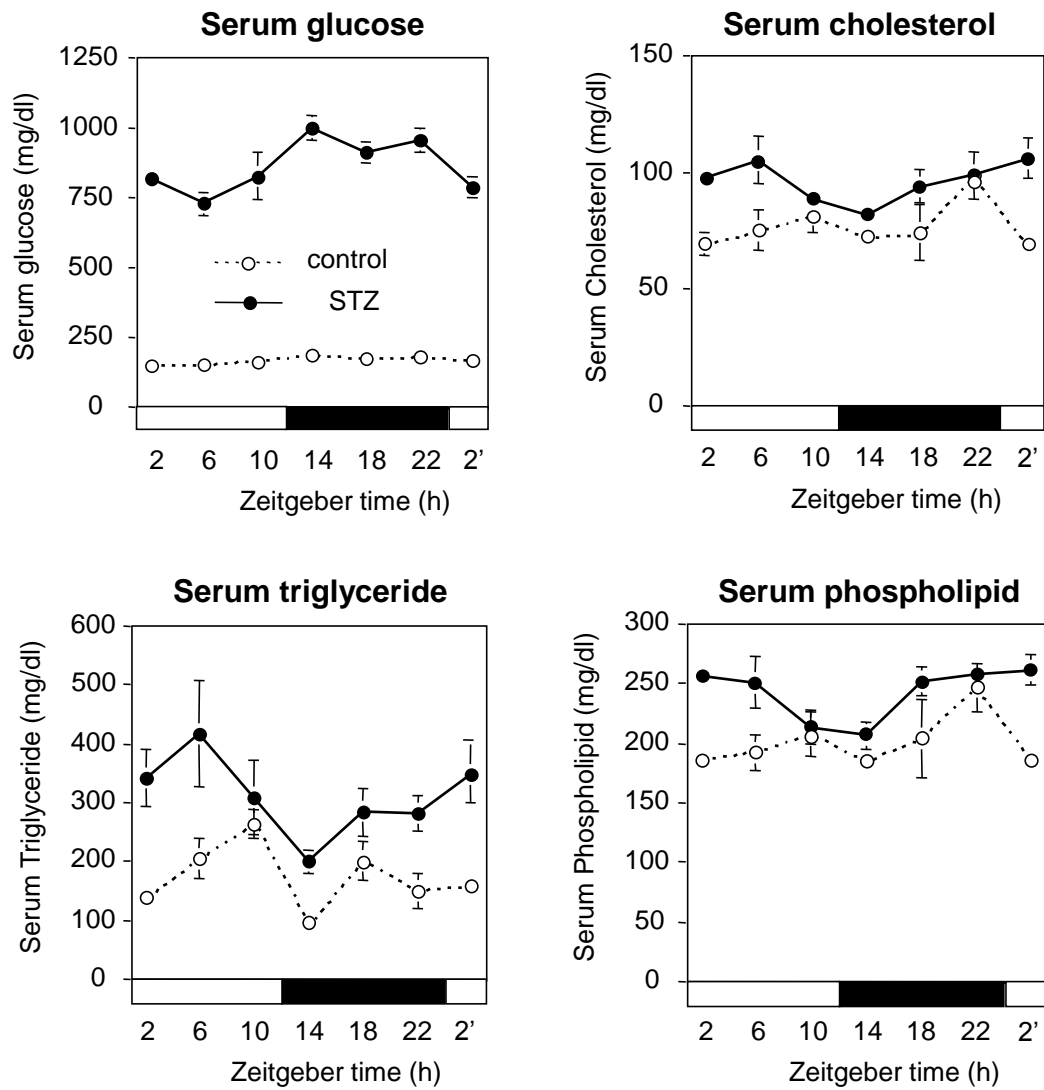


Figure 24. Circadian profiles of serum glucose, total cholesterol, triglyceride, and phospholipids. Values and bars represent means  $\pm$  SEMs of 3-4 control (open circles) or STZ (filled circles) rats. Open and solid horizontal bars indicate light and dark periods, respectively.

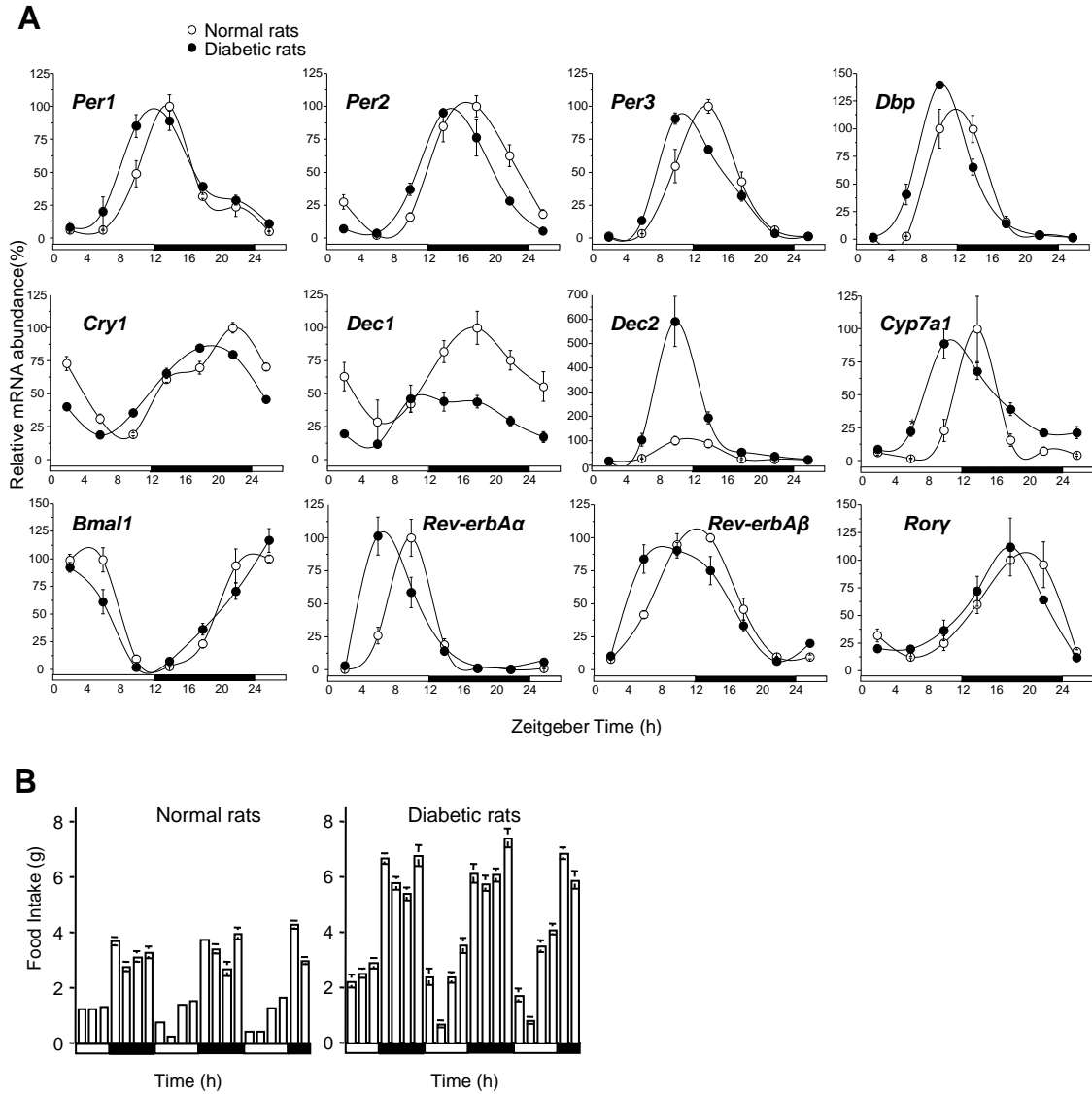


Figure 25. STZ-induced diabetic rats have a pronounced phase advance in their hepatic clock. (A) Hepatic circadian gene expression profiles in STZ-induced diabetic rats. Livers were harvested every 4 h from control and STZ-induced rats. Transcripts of clock-related genes in the liver were analyzed using real-time PCR after normalization to  $\beta$ -actin expression levels. Values and bars represent mean  $\pm$  SEM of 3–4 control (open circles) or STZ (filled circles) rats. Open and solid horizontal bars indicate light and dark periods, respectively. (B) Food intake of control (left panel) and STZ (right panel) rats was measured at 3-h intervals.

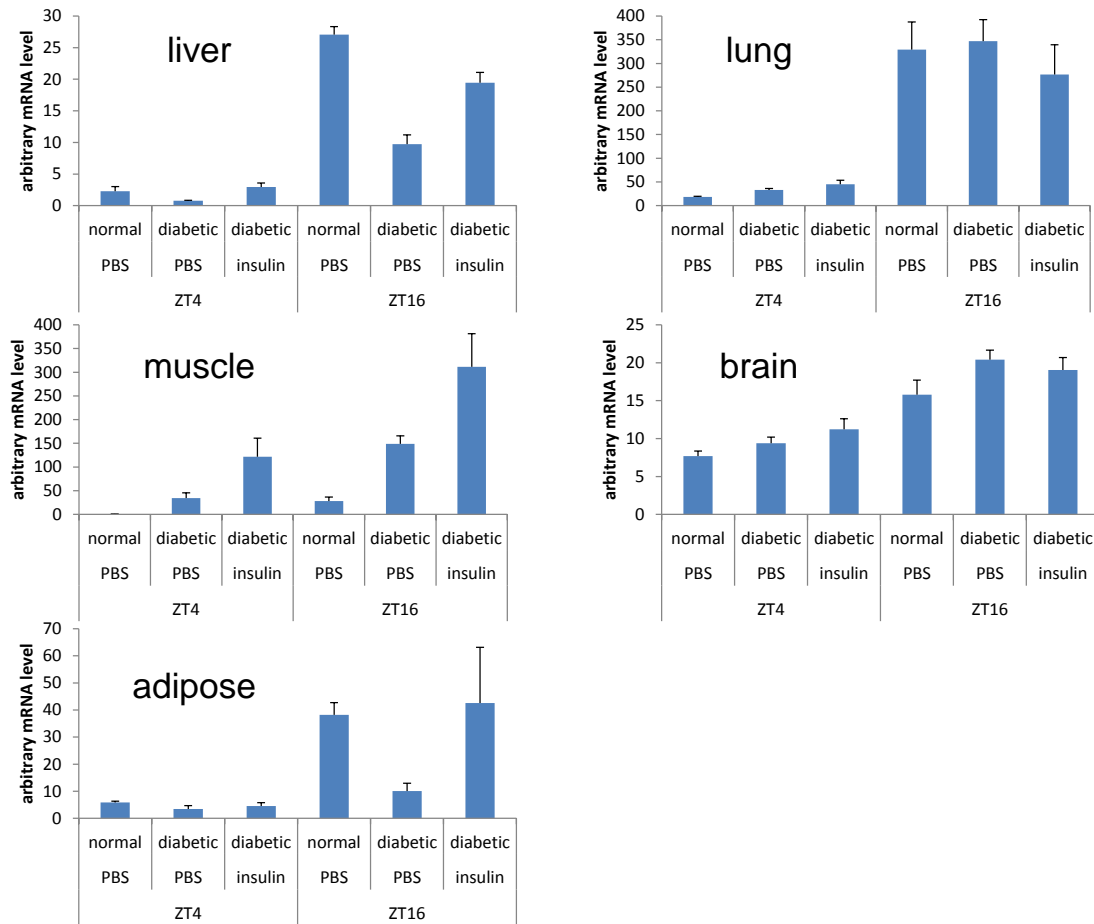


Figure 26. Diabetic mellitus is a disorder with disintegrated body clocks occurring through the lack of insulin sensitivity.

The liver, muscle, adipose tissue, brain, and lung were harvested at ZT4: 16 each from control and STZ-induced rats. STZ-induced rats were injected with insulin ( $50 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) and killed 2 h after the injection for measurement of mRNA levels. *Per2* mRNA levels were determined by RT-PCR. Values and bars represent mean  $\pm$  SEM of 6 control or STZ-induced rats.

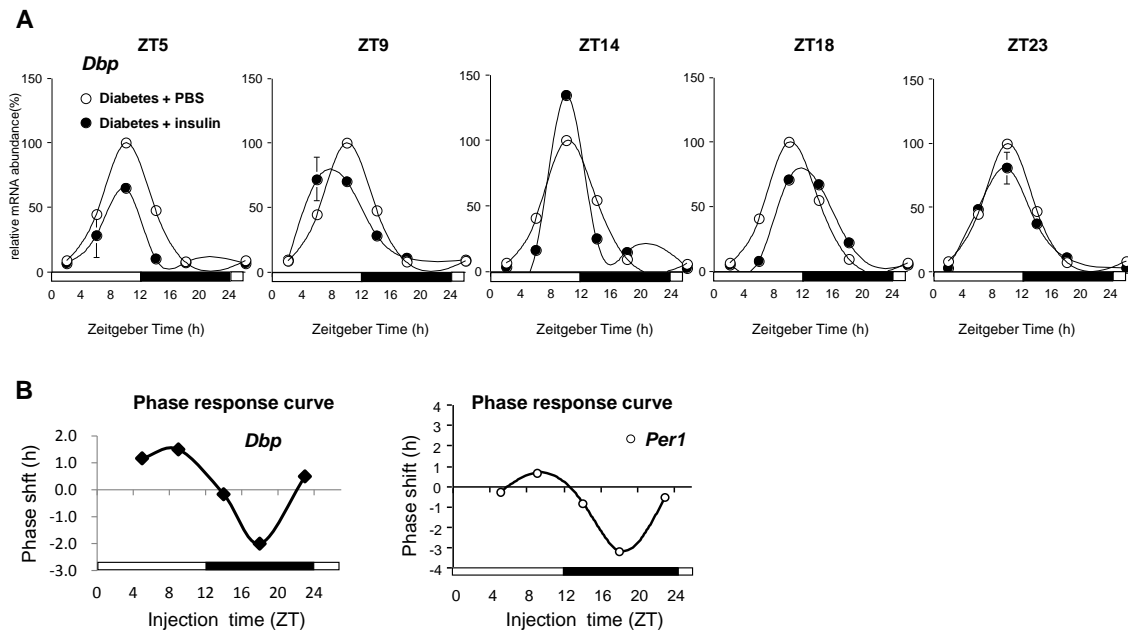


Figure 27. A single administration of insulin induces phase-dependent bi-directional phase shifts in diabetic rat livers.

(A) Temporal *Dbp* mRNA expression levels were determined by northern blot analysis of the livers from control or STZ-induced rats harvested over a 24-h period. Rats were maintained under light-dark conditions and injected intraperitoneally at the indicated times with insulin ( $50 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) dissolved in PBS or in PBS alone. Values represent mean  $\pm$  SEM of 2–3 PBS- (open circles) or insulin-administered (filled circles) rats. (B) The phase response curve of circadian liver gene expression was obtained by recording the circadian *Dbp* and *Per1* mRNA after injecting insulin into STZ-induced rats at the indicated times.

## 考察

本章では、肝臓の概日リズムを制御する液性因子を、培養肝細胞を用いた解析により探索した。培養肝細胞を用いることにより、動物個体で考えなければならない2次的な影響を排除し、肝細胞特有の応答性を検討できると考えた。肝細胞ではインスリンによる *Per1*、*Per2* の遺伝子発現誘導が起こるのに対して、繊維芽細胞ではこのような作用は観察されなかった。*Per1* の一過性発現が、光照射による行動リズムのリセットに必要であることが示されている。すなわち、マウスの SCN に *Per1* のアンチセンスオリゴヌクレオチドを導入しておくこと、光刺激によるマウスの行動リズムのリセットが阻害される[Akiyama, 1999]。SCN において光照射後に *Per1*、*Per2* 遺伝子が急性誘導される現象と、肝細胞におけるインスリンの作用がよく似ていることから、インスリンが肝細胞の同調因子として働く可能性を強く示唆するものであった。ニワトリにおいては、光刺激により *E4bp4* 遺伝子が急性誘導され、*Per2* が抑制して概日時計の時刻合わせをすることが知られている[Hatori, 2011]。この時、*SREBP1* が分子内のペプチド切断を受けて核移行し、標的遺伝子である *E4bp4* の転写が促進される。肝細胞に対するインスリン刺激では、全時計遺伝子の急性作用を調べているが、*E4bp4* 遺伝子発現の変動は認められていない(data not shown)。ニワトリとは、急性誘導される時計遺伝子自体が異なっているため、時計のリセット機構が異なるものと思われる。

代謝調節にかかわる遺伝子が、時計遺伝子の発現に影響を及ぼすことが次第に明らかになってきた。たとえば、脂肪酸の代謝に関わる *PPAR $\alpha$*  は、時計遺伝子 *Rev-erba* および *Bmal1* のプロモーター領域に結合することで、それらの発現を調節している[Canaple, 2006]。また、*PPAR $\alpha$*  自体も E-box を介して CLOCK/BMAL1 による発現調節を受ける[Oishi, 2005]。さらに、脂肪細胞の分化に重要な *PPAR $\gamma$*  も *PPAR $\alpha$*  と同様に *Rev-erba* の発現調節を行う[Fontaine, 2003]。

代謝調節にかかわる遺伝子が、時計遺伝子による発現調節を受け、また逆に時計遺伝子

を制御するという事は、代謝調節に変化が生じると、生体リズムに異常が起きる可能性を示唆している。実際、肥満モデル動物では、末梢組織の時計遺伝子の発現リズムの振幅が減少することが知られている[Kudo, 2004] [Ando, 2005] [Kohsaka, 2007]。代謝異常が分子レベルでどのようにして、分子時計に影響を与えるかは未解明のまま、まして、末梢時計を制御する同調因子はわかっていなかった。肥満モデル動物において、末梢組織の時計遺伝子の発現リズムの振幅が減少する報告があるにも関わらずインスリンが同調因子であるとする報告はなかった。その理由は、肝細胞のようなインスリン標的細胞を用いて、同調因子の探索が行われなかったからである。実際、末梢時計のモデル系として汎用されてきた繊維芽細胞では、インスリンは同調因子としての機能を持たなかった。

本研究では、ラット初代肝細胞の培養方法を検討し、肝細胞の時計が、3次元培養することによりシャーレ上で長く維持されることを見出した。I型コラーゲン上の培養では脱分化が進み、リズム消失が起こった。一細胞イメージング技術を使用できれば、個々の細胞のリズム消失か、リズム脱同調か判定できると思われる。あるいは、病態の進行具合と末梢組織の時計遺伝子の発現パターンを、比較解析することによって、細胞機能の破綻と、リズム維持との関連性が検証できるかもしれない。細胞外マトリックスが転写因子を制御するメカニズムとして、細胞骨格であるアクチンフィラメントが HNF4 の遺伝子発現を制御するとの報告がある [Kimata, 2006]。プレリミナリーな結果ではあるが、アクチンフィラメント、中間径フィラメント及び微小管の影響を検証し、微小管が肝細胞の時計の維持に重要であることを確認している。ここでは、*Per2* 遺伝子プロモーターに易分解性のルシフェラーゼを導入したトランスジェニックラットを作製し、このラットから調製した肝細胞を3次元的構造を保持するように培養させ、レポーター活性をリアルタイムで観察した。その結果、インスリンが、肝細胞のリズムの位相を移動させることが分かった。

もう一つ重要な点は、これまで代謝異常を示す動物モデルにおいて、末梢時計の位相に異常が起こっているか否か結論されていなかったことである。高脂肪食負荷マウスやI型糖尿

病マウスの肝臓リズムは正常であるとの報告がある[Yanagihara, 2006] [Oishi, 2004]。これまでの研究では、時計遺伝子の発現解析が、6~7 時間間隔のサンプリングによりなされており、位相を前進させる、もしくは後退させるといった、リズムの同調作用は評価されていなかった。本研究においては、4 時間間隔のサンプリングをすることによって、糖尿病ラットの肝臓の時計遺伝子全体のリズム位相が前進していることを示した。さらに、インスリンを行動期の“夜”に注射すると位相を正常化するものの、“昼”に注射するとむしろ逆効果になることが分かった(位相反応曲線を示す)。これは、睡眠障害がある時に、日光(強い光)を“朝”に浴びると正常化に向かうが、“夜”に強い光を浴びると逆効果であるのと同様の効果である。同調因子として働く因子は、一般に処理する時間帯によりその作用が異なることが分かっている。インスリンの場合も動物個体において、この作用を持っており、肝臓時計の同調因子として働いていることが証明された。この研究は、培養細胞を用いて得られた結果が生体での末梢臓器の同調因子の同定へと一般化できた例といえる。

今後の課題として、夜行性ラットの結果解釈を、昼行性のヒトへ繋げるためには、給餌方法を昼夜逆転させて、インスリンを投与して同じ結果が得られるか否かを検証することは意義深いと思われる。また、肝臓特異的インスリン受容体ノックアウトマウスに、インスリンを投与して位相変化が起こらなくなることを確認する実験は、よりダイレクトな証明になると思われる。さらに、糖尿病の肝臓時計の位相前進が、どのように病態の悪化に寄与するかを検証していくことは、概日時計の創薬としての適応疾患の選定に繋がるものと期待される。インスリン自体に、時計遺伝子の制御とは無関係で、強い血糖低下作用があるので、位相変化が病態に寄与するところは検証できない。時計遺伝子であり、オーファンレセプターである Rev-erba の合成リガンドが GlaxoSmithKline 社より報告された[Meng, 2008]。Rev-erba は全身で発現している遺伝子ではあるが、肝臓中の薬剤濃度が高くなるような、投与量が決定できれば、肝臓の位相変化が病態の改善に寄与するところが、検証できるかもしれないと考えている。



## 第四章 摂食タイミングによる肝臓時計の制御

### 序

本章では摂食タイミングが肝臓の概日リズムに与える影響を検討することで、肝臓における概日リズムの持つ生理的な役割、特にコレステロール代謝における役割について検討した。第三章では、食餌によって変動するインスリンが肝臓の概日リズムの位相を制御する同調因子であることを示した。先に述べたように、夜行性のマウスに“昼”にのみ餌を与える時間的給餌制限によって時計遺伝子の発現のリズムが逆転することが知られている[Damiola, 2000]。こうしたことから摂食リズムそのものが肝臓の概日リズムを形成させていると考えられる。即ち、摂食リズムを人為的に消失させることによって、肝臓の概日リズムが変調を来すのではないかと推測される。そうであるならば、摂食リズムの消失によって起こる身体への影響と、その分子機構を解明することで、肝臓の概日リズムが持つ生理的な意義を明らかにできると考えた。

肝臓の主な機能の一つに脂質代謝を挙げることができるが、*DBP* や *DEC2* はそうした脂質の一つであるコレステロールの異化代謝経路の律速酵素である *CYP7A1* の遺伝子発現を制御している[Lavery, 1993] [Noshiro, 2004]。*CYP7A1* はコレステロールを胆汁酸へと変換し体外へ排出するほぼ唯一の経路であるため、その働きは血中コレステロール濃度の制御に非常に重要であると考えられる[Lavery, 1993]。このため、肝臓の概日リズムの脱同調が起こると、コレステロール代謝に異常を来すのではないかと考えた。

時計遺伝子の変異マウスでは、代謝的な異常を生じることが示されてきている。例えば、C57BL/6系をバックグラウンドにもつ *CLOCK* 変異マウスは、摂食量の顕著な増加を伴い、肥満となり、メタリックシンドロームに近い異常を生じることが分かってきた[Turek, 2005]。ところが、ICR バックグラウンドをもつ *CLOCK* 変異マウスでは腸管で脂肪吸収が抑制され、高脂

肪食負荷に対して抵抗性を示した[Oishi, 2006]。このように、相反する報告がなされており、摂餌リズムの変調が代謝異常を引き起こすかどうかは不明であった。さらに、時計遺伝子の変異マウスでみられた代謝異常が、摂食リズムなどの行動学的な異常からくる二次的なものなのか、それとも、時計遺伝子が直接的に分子レベルで脂肪細胞の分化や糖、脂質代謝に影響を及ぼしていたためなのかは今後の研究で明らかにしていかななくてはならない。

そこで、筆者は、遺伝的には正常な動物(ラット)を用い、エネルギー摂取量は変化させず、摂食リズムを消失させる実験系を開発した。夜行性であるラットは自由摂食時には、“夜”に1日の摂食量の約80%を摂取する[Brown, 2002]。ラットの1日の摂食量は変えずに、それを均等に4分の1量ずつ1日4回に分けて与えることで、摂食リズムを消失させることに成功した。こうして引き起こされた摂食リズムの崩壊は、肝臓の概日リズムを崩すことにより、コレステロールの代謝異常を誘導して、血中コレステロール濃度を増加させることを示した。

## 結果

ラットの6時間毎の摂食量を測定したところ、自由摂食をさせたラット(Control群: C群)では“夜”に1日の摂食量の約80%を摂取しており、摂食の概日リズムが見られた(Fig. 28A)。ラットの1日の摂食量は変えずに、それを均等に4分の1量ずつ6時間おきに与えた群(Suppression群: S群)では“昼”“夜”均等に餌を摂取しており、摂食の概日リズムが失われていた(Fig. 28A)。自由摂食させたラットでは、体重が鋸の歯のような線を描いて増加するのに対して、摂食リズムを崩壊させたラットでは、直線的に増加した(Fig. 28B)。この時、ラットには高コレステロール食を与えてあり、食事性高コレステロール血症を示している。この外因性高コレステロール血症は、VLDL(超低密度リポタンパク質)コレステロールが増加する実験的高コレステロール血症モデルである。ラットでは、通常、血中コレステロールのほとんどはHDL(高密度リポタンパク質)にあり、LDL(低密度リポタンパク質)がほとんどないため、動脈硬化症にかかることはほとんどないとされている。

この実験スケジュールにより、摂食リズムを崩壊させると、すでに増加していた血中コレステロール濃度はさらに増加することが明らかとなった(Fig. 28C)。血中コレステロール濃度は1日を通じて、S群で有意に上昇していた(Fig. 28D)。血中のHDLコレステロール濃度は、S群で上昇したが(Fig. 29A)、総コレステロールに対するHDLコレステロールの割合はS群で減少していた(Fig. 29B)。血中の中性脂肪濃度やリン脂質濃度は、S群で有意に上昇した(Fig. 29C, D)。血中のグルコース濃度については、顕著な差は認められなかった(Fig. 29E)。血清サンプルをアガロースゲル電気泳動によってリポタンパク質を分離し、コレステロール染色を行い血中コレステロールの動態を視覚化したところ、S群の血中コレステロール濃度の上昇はVLDL画分で起こっていることが分かった(Fig. 30)。これらの結果は、同じ食事を同じ量食べても、摂食リズムが崩壊すると血中コレステロール濃度が上昇することを示している。

摂食リズムの崩壊による血中VLDLコレステロール増加のメカニズムを検討するため、ま

ず肝臓からの血液中への VLDL コレステロール、VLDL 中性脂質の放出速度を調べた。肝臓からの血中への VLDL コレステロールの放出速度は、摂食リズムを崩壊させたラットで増加しており (Fig. 31A)、VLDL 中性脂質の放出速度も増加していたことより (Fig. 31B)、VLDL 全体の放出が亢進したことを示している。次に、体全体のステロールバランスを考える目的で糞中への胆汁酸の排泄量に注目した。自由摂食群の胆汁酸排泄量は、 $260.39 \pm 12.49 \mu\text{moles}/2 \text{ days}$  であった (Fig. 32)。摂食リズム崩壊ラットでは、 $223.93 \pm 11.33 \mu\text{moles}/2 \text{ days}$  となり、糞中への胆汁酸排泄量が減少していることが分かった (Fig. 32)。以上の結果より、摂食リズムを崩壊させることにより胆汁酸の体外への排泄が減少し、コレステロールが体内に貯留されるようになり、肝臓中のコレステロールはより血中へ VLDL として移動するため、VLDL コレステロールが血中に蓄積したものと考えられる。

摂食リズムを崩壊させることによりコレステロール代謝に異常が生じることが分かったので、コレステロール代謝の中心的臓器である肝臓で何が起きているか検討した。高コレステロール食を与えているので、コレステロール合成は抑制されており [Jurevics, 2000]、コレステロール異化代謝、胆汁酸の合成に注目した。胆汁酸合成の律速段階であるコレステロール  $7\alpha$  水酸化酵素 (*CYP7A1*) の遺伝子発現を調べたところ、ラットでは通常“夜”にその発現のピークがあることが分かっているが、摂食リズム崩壊ラットでは *CYP7A1* mRNA のピークが“昼”に前進していた (Fig. 33)。実験前は *CYP7A1* の遺伝子発現リズムの振幅が抑制されるのではないかと推測していたが、そのようなことはなく、位相がずれるという形で異常が見られた。*SREBP2*、*HMGCoA* および *LDLR* の遺伝子発現に変動がないことから、コレステロール合成系の異常は認められなかった (Fig. 34)。

*CYP7A1* 遺伝子発現リズムの異常が、時計遺伝子の異常により起きているかを検討する目的で、多くの時計遺伝子の発現リズムを検証した。*DBP* は *CYP7A1* と同様に位相のずれを示し、*PER1*、*PER2*、*DEC2* はその振幅が小さくなり、*DEC1* は二つのピークを持つようになるなどの時計遺伝子のリズム発現に異常が見られた (Fig. 33)。*DEC1* はインスリン感受性の高

い遺伝子であることを報告した(第三章)。摂食リズムの乱れにより、食事を一日中摂取している状態が続くことでインスリンの分泌リズムが異常になり、*DEC1* が異常な制御を受けた結果、二相性のリズムが生まれたのではないかと推測できる。*CYP7A1* 遺伝子発現を制御する転写因子群(*LXRα*、*FXR* および *SHP*)ではほとんど変化は見られなかった(Fig. 34)。このことから、*CYP7A1* 遺伝子発現リズムの異常が、時計遺伝子の異常により起こっていることが強く示唆された。

脂質合成に関連する *SREBP1* と *FAS* 遺伝子は、二相性のリズム発現を示し、*DEC1* の影響可能性が示唆された(Fig. 33)。脂質代謝に関連する *PGC1α* と *CPT1α* 遺伝子発現も振幅が低下する傾向があった(Fig. 34)。これらの遺伝子発現の変動が、血中中性脂質濃度の上昇に寄与している可能性が示唆された。

以上の結果は、摂食リズムの崩壊は、肝臓の概日リズムを崩すことにより、コレステロールの代謝異常を誘導して、血中コレステロール濃度を増加させることを示した。規則正しい食生活は健康には欠かせないことは昔から言われているが、今回初めて、遺伝子改変でなく、正常動物でそのことが分子レベルで示された。

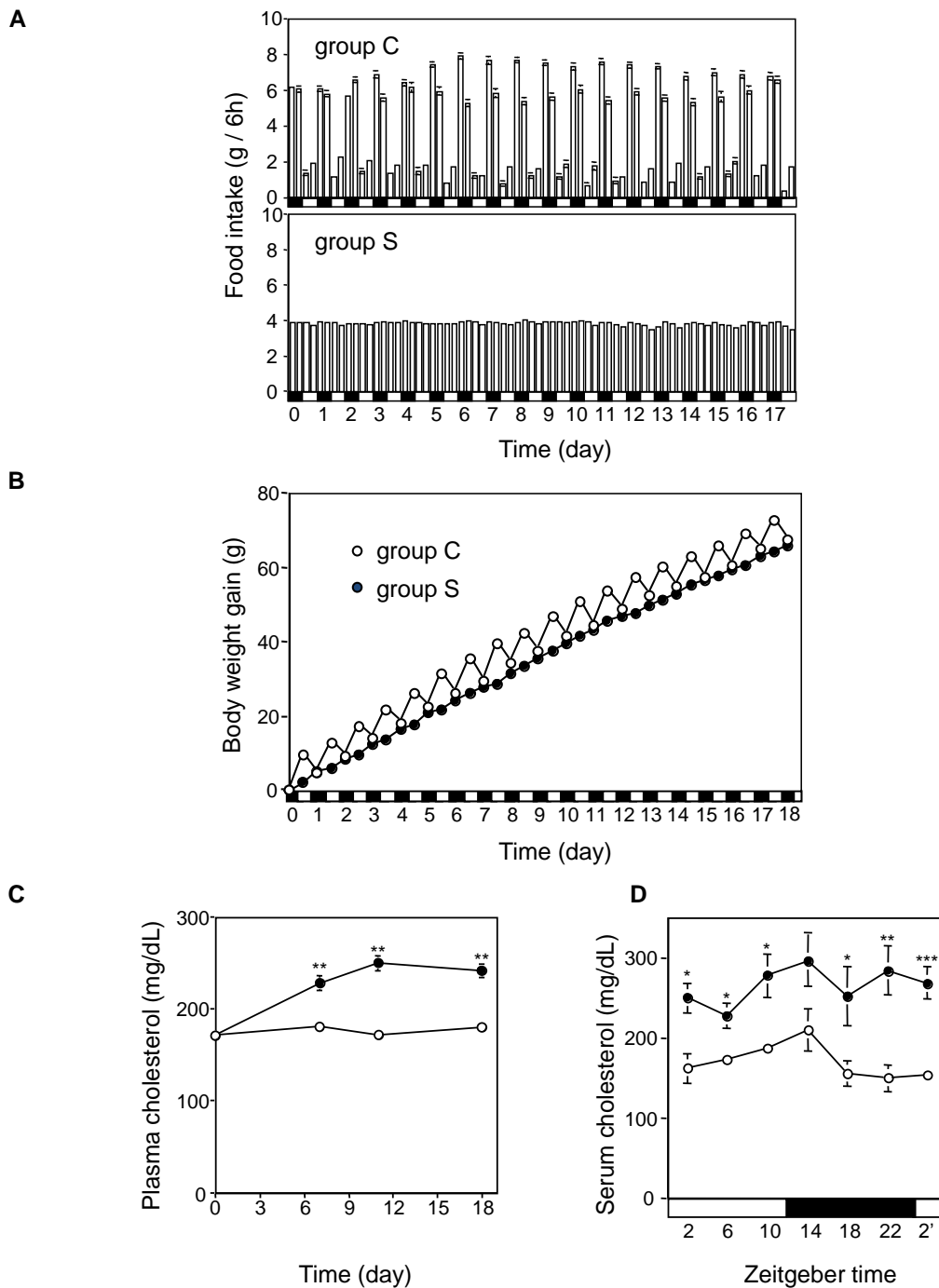


Figure 28. Suppression of the regular feeding rhythm deteriorates hypercholesteremia in rats. (A) Food intake of the control group (upper panel) and suppressed group (lower panel). (B) Body weight gain. (C) Plasma total cholesterol concentration profiles on days 7, 11, and 18. On day 19, the circadian profiles of serum total cholesterol (D) are shown. The values for groups C (○) and S (●) are mean  $\pm$  SEM of 4 rats, respectively. The open and solid horizontal bars indicate the light and dark periods, respectively.

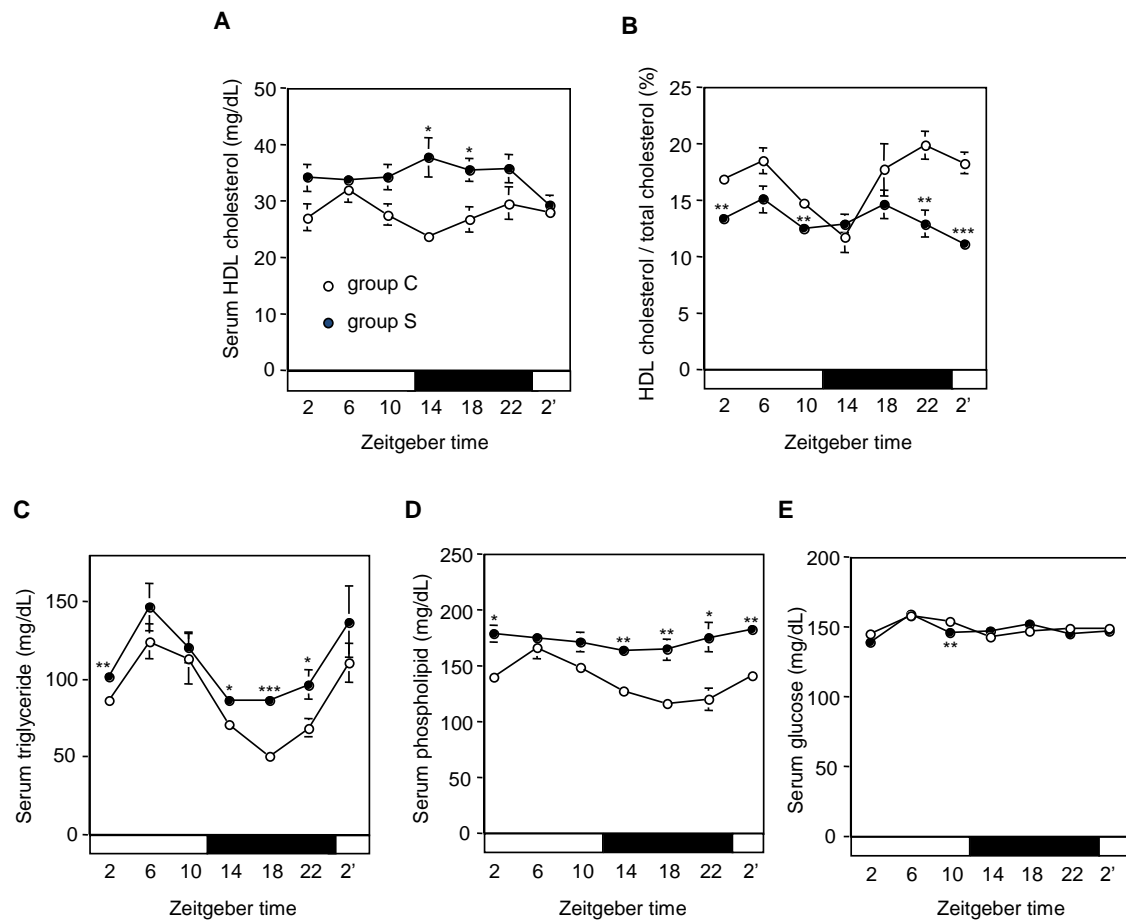


Figure 29. Circadian metabolic parameters in rats suppressed a regular feeding regimen. On day 19, the circadian profiles of serum HDL cholesterol (A), the ratio of HDL cholesterol to total cholesterol (B), triglyceride (C), phospholipids (D), and glucose (E) are shown. The values for groups C (open circles) and S (filled circles) are mean  $\pm$  SEM of 4 rats, respectively.

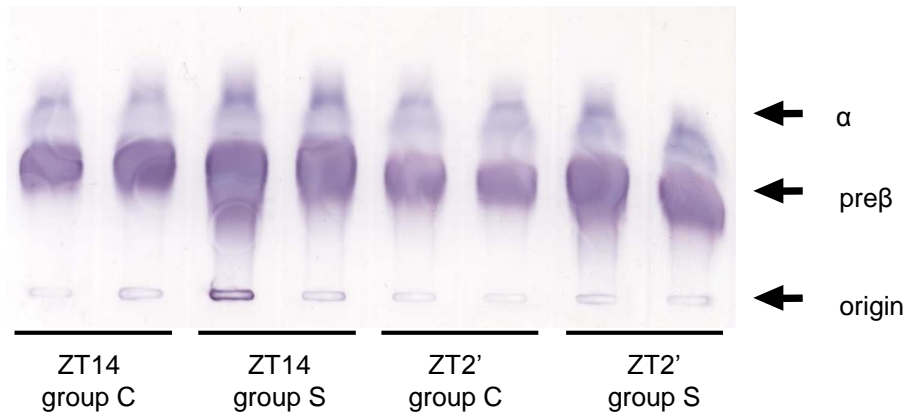


Figure 30. Agarose gel electrophoresis of serum lipoproteins from groups C and S at ZT14 and ZT 2'. Lipoprotein-cholesterol was stained enzymatically by using Co-Cholest-A.  $\alpha$ ; HDL; pre  $\beta$ ; VLDL.



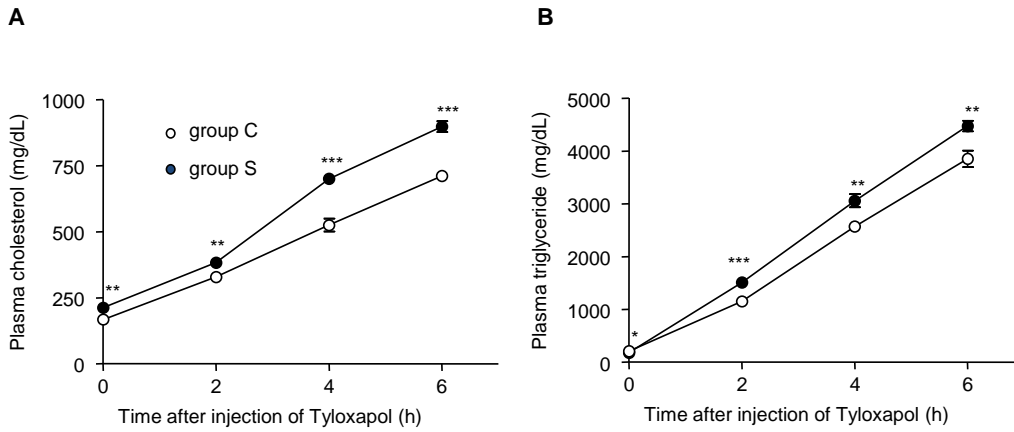


Figure 31. The suppression of a regular feeding rhythm increases the secretion rate of VLDL cholesterol from the liver.

On day 17, tyloxapol was injected at a dose of 400 mg/kg of body weight. Accumulation of plasma cholesterol (A) and triglyceride (B) after the injection of tyloxapol. The values for group C (open circles) and S (filled circles) are the mean  $\pm$  SEM of 7 and 8 rats, respectively.

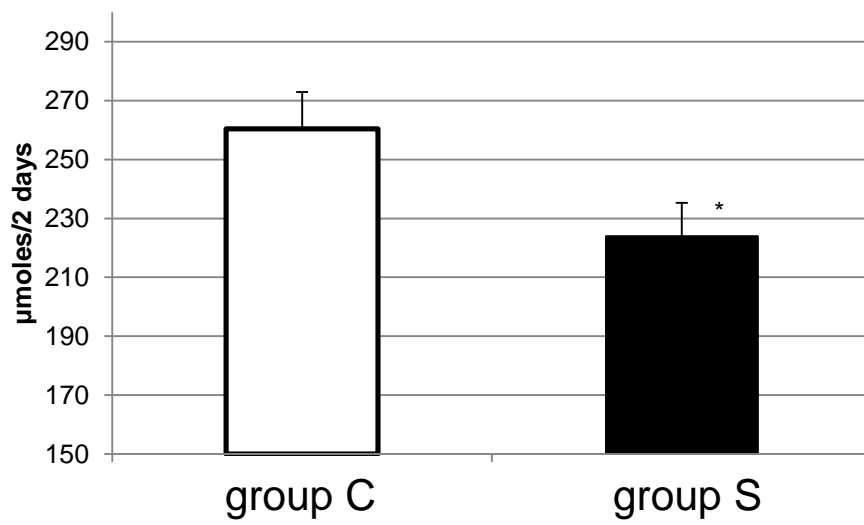


Figure 32. The excretion of fecal bile acids decreased in group S compared to that in group C. On day 19, Fecal bile acids were determined enzymatically by the method of Sheltawy and Losowsky [Sheltawy, 1975].

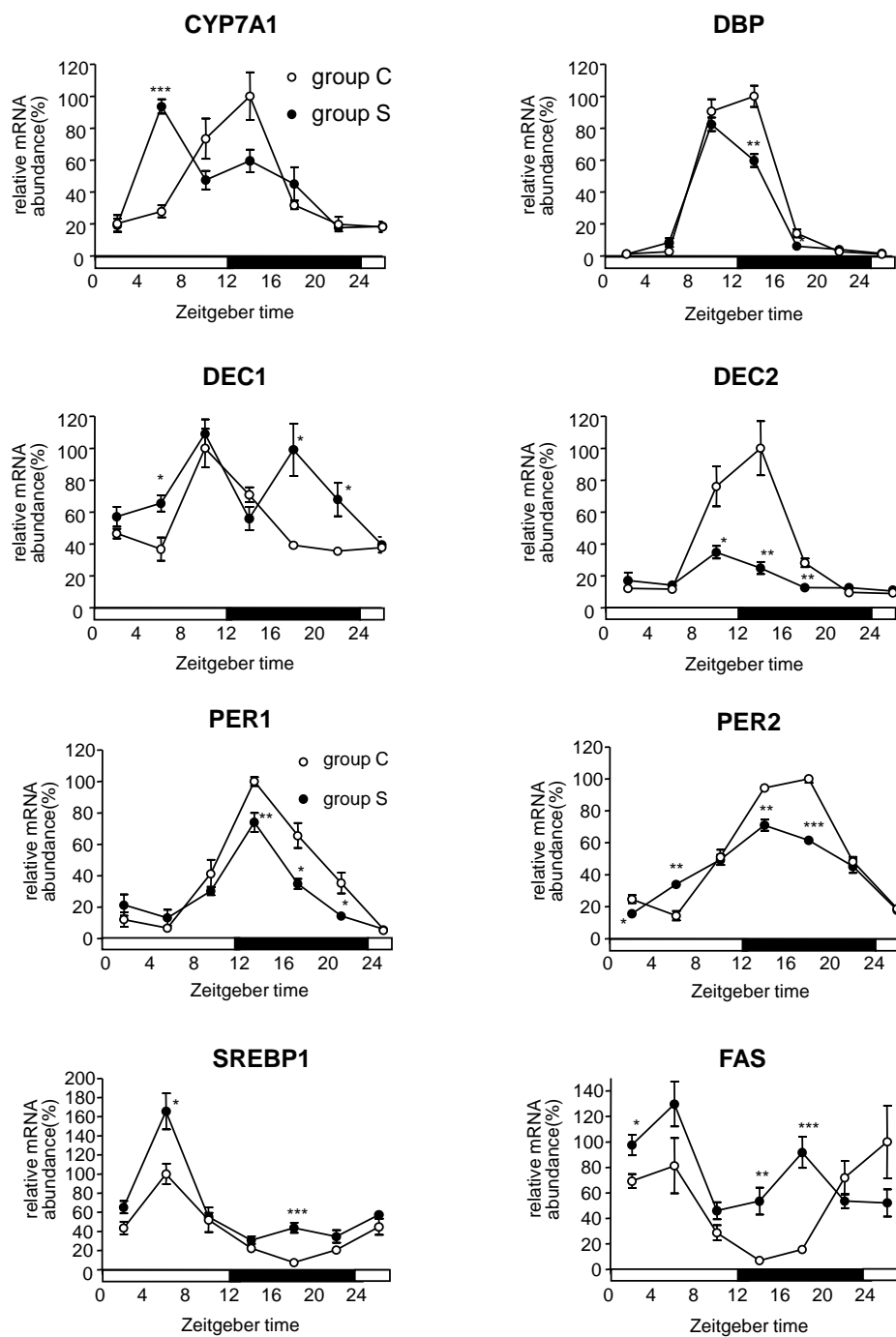


Figure 33. Suppression of the regular feeding rhythm disorders circadian gene expression in rat liver.

Real-time PCR was used to determine mRNA levels of CYP7A1, DBP, DEC1, DEC2, PER1, PER2, SREBP1, and FAS. The values for group C (○) and S (●) are displayed as relative abundance (mean ± SEM of 4 rats).

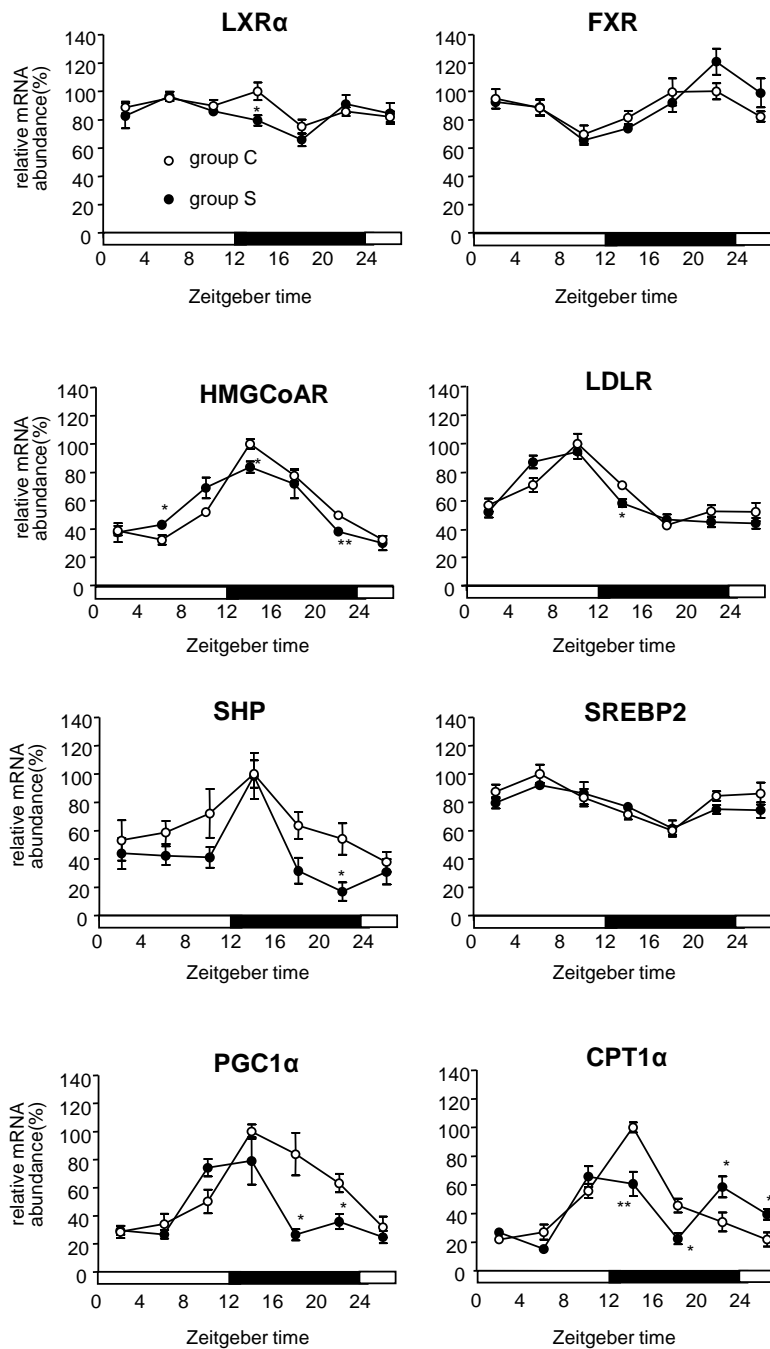


Figure 34. Hepatic circadian gene expression profiles in rats suppressed a regular feeding regimen. On day 19, the livers of the rats in groups C and S were collected at 4 h intervals. Real-time PCR was used to determine mRNA levels of LXR $\alpha$ , FXR, SHP, SREBP2, HMGCoA, LDLR, PGC1 $\alpha$ , and CPT1 $\alpha$ . The open and solid horizontal bars indicate the light and dark periods, respectively. The values for group C (open circles) and S (filled circles) are displayed as relative abundance (mean  $\pm$  SEM of 4 rats).

## 考察

生体リズムに異常が生じると生体にとって何らかの不具合が起きるのではないかということとは容易に想像できる。事実、*CLOCK* 変異マウスの報告により、時計遺伝子 *CLOCK* がエネルギー代謝調節に関連していることが示された[Turek, 2005] [Oishi, 2006]。 *BMAL1* は脂肪細胞の分化および脂質代謝を制御していることが報告された[Shimba, 2005]。すべての時計遺伝子において、その機能異常が代謝異常に発展することが証明されたわけではない。しかし、これまでの研究成果からは、少なくとも bHLH 型転写因子である *CLOCK* および *BMAL1* が、糖脂質代謝や脂肪細胞への分化をはじめとしたエネルギー代謝調節に密接に関与することは間違いのないと思われる。

時計遺伝子の異常がなくても、不規則な生活環境によってもリズム異常は引き起こされる。時計遺伝子異常による疾病を論じる場合、実際の遺伝子異常に起因する分子レベルでの異常と、システムレベルでのリズムの異常による 2 次的な異常の統合したものであることを念頭においておかねばならない。これは、*CLOCK* 変異マウスによる肥満などを論じるときに忘れてはならない視点である。発癌においても、Levi らのグループは、全く遺伝子異常のない正常マウスにおいても、SCN を破壊した後や慢性的に時差を起こして体のリズム発振能を低下させた動物において、移植された癌細胞の成育が早くなると報告している[Filipski, 2004]。疫学調査では、シフトワークの労働者では発がんリスクが高いことが知られている[Kubo, 2006]。これらは、システムのリズム機構の不具合が疾病の病因もしくは増悪因子となりうる具体例と考えられる。このように、リズムに随伴する疾病の解明には、遺伝子の視点とシステムレベルの視点の両方からのアプローチが重要である。

そこで、筆者は、遺伝的には正常な動物(ラット)を用い、摂食リズムを消失させる実験系を開発した。ヒトは時差のある所へ旅行してもしばらくすれば適応するように、夜行性のラットに“昼”間だけ食餌を与えるようにしても、すぐに慣れてしまう。動物実験で用いられるペア・フィ

ーディングはこれを利用した実験手法である。これでは、摂食リズムを異常にしたことにはならない。ラットの1日の摂食量は変えずに、それを均等に4分の1量ずつ1日4回に分けて与えることで、摂食リズムを消失させることに成功した。今回のようにエネルギー摂取量には変化なく、遺伝的改変のない動物において、摂食リズムが消失している時に現われてくる現象こそが、リズムの生理的意義を考える場合には重要ではないだろうか。

高コレステロール食を自由摂食させても、肝臓の時計は変化ないという報告がある[Kudo, 2004]。本研究の予備検討では、通常食を用いて、摂食リズムを崩壊させた場合でも、高コレステロール血症が悪化することを認めている。したがって、エサの質に関わらず、摂食リズムの崩壊自体が、血中コレステロール濃度の上昇を引き起こしたと考えている。本研究において、食事内容やエネルギー摂取量が同じでも摂食リズムが消失すると、血中コレステロール濃度が上昇し、高コレステロール血症が悪化することが示された。分子メカニズムを明らかにするために、コレステロール代謝の中心的臓器である肝臓を詳細に解析したところ、*CYP7A1* のリズム異常に原因があることが分かった。VLDL を構成するアポリポタンパク質の変動は未検証であるものの、摂食リズムが崩壊すると、食事のタイミングと*CYP7A1* のリズムのタイミングにズレが生じて、コレステロール異化代謝能が低下したと考えている。実際に、糞中への胆汁酸排泄量が低下していることを確認した。*CYP7A1* の遺伝子発現を制御する転写因子群を調べたところ、*DBP* や *DEC2* をはじめとする時計遺伝子のリズム異常が観察された。以上のことから、肝臓の概日リズムの生理的意義がコレステロール代謝をはじめとする脂質代謝等の概日リズムを持った肝機能の維持にあることが示された。

体内時計の生理学的意義として、未来予測性が考えられる。肝臓であれば、これから食事が来るはずであるとして、代謝系の備えをしている。昔から、健康のためには規則正しい食生活が重要だといわれてきた。時間栄養学的アプローチは、その経験則を栄養学的に解明する糸口は示してくれた。「何を食べるか」と同時に「いつ食べるか」を考えることで、ライフスタイルと健康を分子レベルで解明することにつながると期待される。

## 総括

概日リズムは生物の進化の中で獲得されてきた生理機能の一つであり、重要な意味を持つと推測される。哺乳類においても、睡眠、行動リズムなど様々な生体现象に約 24 時間のリズムが存在することが知られている。また、薬物代謝、薬物効果にも概日リズムがあり、医療の面からも大きな注目を集めている。本研究は、哺乳類における時計遺伝子の転写制御機構を解析することで、概日リズムの生理的意義の解明を目指した。

哺乳類における概日時計の中核は、視床下部の視交叉上核 (suprachiasmatic nucleus; SCN) に存在している。SCN の破壊によって睡眠覚醒や活動といった行動リズムが完全に消失することから中枢時計と呼ばれる。哺乳類では長年この SCN のみが概日時計を発振することができる唯一無二の器官であると考えられてきた。しかし、時計遺伝子の発見以降、分子レベルでの研究が進むにつれ、実際にはほとんどの臓器や組織に概日時計振動体が備わっており、それぞれの組織において時刻を刻んでいることが分かってきた。

概日時計の振動を生み出すメカニズムの中核は時計遺伝子と呼ばれる一連の遺伝子群の転写と翻訳を介したフィードバックループであると考えられている。哺乳類では bHLH 型転写因子である CLOCK と BMAL1 がヘテロ二量体を形成し、*Per* や *Cry* などネガティブ因子と呼ばれる遺伝子のプロモーター領域にある E-box に結合することで *Per* や *Cry* などの遺伝子発現を正に調節する。PER/CRY 複合体が CLOCK/BMAL1 による転写の活性化を解除し、自分自身の転写を抑制する。この繰り返しが約 24 時間の周期を作り出す。

このフィードバックループに加えて、時計遺伝子の応答配列、RREとD-boxを介した副次的ループも機能している。これらの配列が、個々の遺伝子の発現ピーク時刻を決定していると提唱された。*Per1* と *Per2* 遺伝子プロモーターには、E-box (“朝”配列) と D-box (“昼”配列) がある。一方、*Per3* 遺伝子プロモーターには E-box (“朝”配列) はなく、D-box (“昼”配列) のみが存在し、これまでの設計原理においては、*Per* 遺伝子の中では、*Per3* のピーク時刻が最も

遅れるとされていた。筆者は、マウス個体の中枢および末梢組織における時計遺伝子の発現解析を実施し、*Per* 遺伝子の中では、*Per2* のピーク時刻が最も遅いことを確認した。このことは、*Per2* 遺伝子プロモーターには、これまで明らかにされてこなかった位相を後退させる配列が存在する可能性を示唆していた。従来は、ゲノム情報から探索した時計応答配列を取り出しSV40などのプロモーターで駆動させたレポーターでリズム発現を確認する手法が採用されていた。本研究では、*Per1*、*Per2* 遺伝子の転写開始点上流の約-5,000bp まで含めてプロモーター解析を実施した。株化された培養細胞は、高濃度血清等で、概日リズムを惹起できることが知られている。それゆえ時計遺伝子のプロモーターにレポーター遺伝子を連結し、細胞に導入後、適切な刺激をすることで、時計遺伝子の動的な変動をリアルタイムで観察できる。レポーター遺伝子に易分解性の改変型ホタルルシフェラーゼを採用し、細胞と概日リズムを惹起する刺激薬剤の組み合わせを検討することで、僅か1時間程の位相差を検出できるまで実験精度を向上させた。*Per2* 遺伝子プロモーター解析においては、ピーク時刻の遅れに関与する新規配列 E<sup>2</sup>-box を同定した。従来は機能的でないと言われていた D-box が振幅の増大に寄与していることも示した。このように、様々な時計応答配列の組み合わせによって、遺伝子発現の正確な時間的調節がなされていることを実験的に証明した(第一章)。

時計の分子機構の中心となるのが、E-box を介した転写調節である。一方、細胞自律的な概日時計振動体における D-box 制御因子の役割は検証されていなかった。*DBP* に代表される PAR 型転写因子は D-box に結合して転写を促進する。同じ配列を介して抑制的に制御する転写因子が *E4BP4* である。リアルタイムモニタリングシステムにおいて、*DBP* を siRNA によりノックダウンすると、周期が短くなった。*DBP* の過剰発現では、周期が長くなった。*E4BP4* の制御は、*DBP* とは正反対の周期変動を引き起こした。以上の結果より、D-box 制御因子による D-box を介したシグナルの大きさが、周期の長さの決定に重要な役割を果たしていることが明らかになった(第二章)。

哺乳類の体内時計における次なる大きな課題は、如何にして肝臓などの末梢時計が制御



されているのかということと、末梢時計の生理的意義や疾患との関連性を明らかにすることである。これらの課題を解決するために、代謝の中樞を担う肝臓の時計に着目した。食事のタイミングが肝臓時計を制御することは知られていたが、その同調因子は不明であった。今回の研究では、肝細胞の時計が、3次元培養することによりシャーレ上で長く維持されることも見出している。加えて、バイオイメージング技術を用いて、リアルタイムに肝細胞時計を観察することで、インスリンが同調因子として働いていることを証明した。実際には、時計遺伝子に易分解性の改変型ホタルルシフェラーゼレポーターをつないだ遺伝子を導入したラットから肝細胞を調製し、肝細胞を3次元培養させ、その光をリアルタイムで観察することにより、インスリンの同調作用を証明した。具体的には、「位相反応曲線」を示したため、同調因子であることが証明された。生物が持つ約24時間周期の概日時計の同調因子には二面性があり、例えば睡眠障害を強い光で治療する場合に、“朝”に強い光に当たると時計は早まるが、“夜”に強い光に当たると時計は遅れてしまう。つまり、同じ刺激でも時間帯によって逆の効果が出ることになる。このことを位相反応曲線が示されたという。これがあると同調因子であることがわかる。さらに、動物個体においても、インスリンを欠乏させた糖尿病ラットを用いてインスリンの効果を検討したところ、やはり位相反応曲線が示され、動物個体でもインスリンが肝臓時計の同調因子であることが確認された(第三章)。

インスリンが肝臓の時計の強力な同調因子であることを考えると、摂食のリズムを壊すことにより、肝臓の時計が変調して、健康に対して何らかの影響が現れてくるのではないかと考えた。ラットの1日のエネルギー摂取量は変化させず、摂食リズムを壊して常に一定量ずつ摂食する条件下で、高コレステロール食を与えたところ、血中コレステロール濃度が増加することが明らかとなった。肝臓において、コレステロール異化代謝の律速段階の酵素、*CYP7A1*の遺伝子発現ピークが変動し、時計遺伝子についても異常なリズムを形成するようになった。摂食リズムが崩壊すると、食事のタイミングと肝臓時計のズレが生じて、代謝異常が引き起こされることが明らかとなった。(第四章)。

概日リズムを示す生理的意義として二つの考えがある。一つは未来予測性である。この作用により食物を効果的に獲得し、外敵から身を守ることができる。加えて、肝臓であれば、これから食事が来るはずであるとして肝臓の代謝系を備えておくことができる。この未来予測性により、タイムリーな効率的代謝を図っている。もう一つは、細胞はあらゆることを同時に行うことができないため、「時間的分業」を可能にしている。行動時は摂食、代謝を亢進させて、安静時には細胞増殖を盛んにするなどの時間的分業である。また、解糖系と糖新生などのように「代謝的矛盾を回避」することの意味もある。

実際、時差ぼけに見られるように、リズムが崩れることは体に大きな影響を与えることを多くの人が実感している。一方、古くから、また世界中のどこでも、「規則正しい生活と、規則正しい食生活は健康に欠かせない」と言われてきているが、その分子メカニズムはあまり理解されてこなかった。筆者は、この人類の英知を、分子レベルで解明したいと考えて研究を進めてきた。今回の研究から、肝臓の概日リズムは、脂質、糖質代謝にとって重要であることを分子レベルで示すことができた。肝臓の概日リズムは、薬物代謝にとっても重要であり、時間薬理学的アプローチは投与時間を制御することにより、薬効を上げて副作用を低下させることに成功してきている。不規則な生活、食生活を続けることで肝臓の概日時計のベースが崩れている状態では、適切な投薬などの時間薬理学が成立しなくなる可能性が考えられる。したがって、時間薬理学の土台として時間栄養学があると考えられる。

今回の時間栄養学的研究から、同じ食事を同じ量食べても、タイミングが崩れると代謝異常を引き起こすことを示した。栄養学や、栄養指導の現場では、主に「何を」食べるかに注目してきたが、栄養素の不足がほとんどない現在、「いつ」食べるかという方が「何を」食べるか以上に重要であるかもしれない。咀嚼など「どのように」食べるかも大きな生理的意味をもつことが分かってきている。このような「食の5WIH」を理解する総合的な栄養学が、今後ますます重要になると考えている。

最後に、体内時計の分子機構を基盤にした創薬への取り組みについて、筆者らの研究が

ループの展望を中心に述べておきたい。体内時計の示す時刻がわかれば、より効果的なタイミングで投薬をするといった「時間治療」が可能になると考えられる。たとえば、適切な時刻を知り、投薬量を適切に調節することで、インターフェロンによる有害反応(うつ病)を回避できる[Ohdo, 2001]。時間治療を実際に行うためには、ヒトの体が「何時か」を知ることが重要であるが、従来から用いられてきた血中のメラトニン量、深部体温を基にした測定では、体内時刻を測定するために長期間の拘束と連続した組織採取が必要であるなど、大きな負担がかかってしまう。筆者らのグループは、これを回避する方法を提案している[Ueda, 2004]。あらかじめ体内で概日周期で増減する遺伝子(時刻指示物質)が多くなる時刻と少なくなる時刻を調べて、指標となる「分子時刻表」を作成しておく。そして、ある時刻に採取した組織や血液中の遺伝子発現量を測定して、分子時刻表と比較することで体内時刻を調べる仕組みである。この方法論を発展させ、血液の代謝産物から、ヒトの体内時刻を簡便に判定することに成功している[Kasukawa, 2012]。現状では新薬開発には通常短くとも10年前後の歳月がかかる。これに対して、既に承認され、市場で販売されている既存薬の効き目を高め、副作用を減らすテーラーメイド医療の方が、先に実現することになると思われる。

高照度光療法は、睡眠相後退症候群などの概日リズム睡眠障害を改善する治療法として知られている。具体的には、例えば起床直後に2,500ルクス以上の人工光を2~3時間浴びることで入眠時間が徐々に早まり数日後には通常の睡眠時間帯に眠れるようになるという治療法である。光照射で目から入った光のシグナルは、主に網膜-視床下部路を経て視交叉上核の腹外側部に入力し、時計遺伝子 *Per1* および *Per2* の発現を誘導して覚醒レベルを向上し、また、リズム位相を調整することにより概日リズム障害を改善することが示唆されている。この高照度光療法は、患者を光照射装置の前に2~3時間拘束する必要があることから、これに代わる治療薬の創製が求められている。高照度光療法に代わる低分子治療薬を探索するために、視交叉上核の光反応細胞の機能を保持する細胞株を樹立した[Matsushita, 2006]。時計遺伝子 *Per1* および *Per2* の発現上昇を指標とする、低分子のスクリーニング系の構築

が可能になると期待している。GPCR、イオンチャネル等の解析を進め、中枢時計に特異的に作用する創薬標的候補分子も探索する予定である。

本研究では、肝細胞の3次元培養と *in vitro* 概日振動測定系を組み合わせ、インスリンによる肝細胞時計の同調作用を証明した。本評価系は、ハイスループットスクリーニングアッセイ系へと応用できる見通しがあり、肝細胞の時計を制御する薬剤の探索が可能になる。また、インスリンが欠乏したI型糖尿病ラットにおいて、肝臓をはじめとするインスリン感受性組織における時計遺伝子のリズム異常を明らかにした。II型糖尿病やインスリン抵抗性モデルにおける各種末梢組織の時計遺伝子の発現解析は進行中であるが、いずれのモデルにおいても、肝臓時計が早まる現象が認められている(投稿準備中)。肝臓時計を正常化させるような薬剤を探索し、メタボリックシンドロームや生活習慣病の改善につながるか否かを検証する。視交叉上核、肝臓及び脂肪組織における24時間を通じての発現データベースも構築する予定である。病態における発現変動の解析は、創薬標的の選定に重要な位置を占めるが、これまでは、一日の中の一点のデータしか存在していなかった。この発現データベースが、標的と疾患との関連性を検証するための、確度の高いツールになると考えている。今後は、本研究により得られた成果を、概日リズム障害改善薬の創製を目指した、創薬研究へ発展させていきたいと考えている。

## 実験材料と方法

### Per2-dLuc 遺伝子導入ラットの作製

概日振動を惹起するのに必要なmPer2プロモーター部位(chr1: 91667305-91663790 on Mouse Genome UCSC Genome Browser, Feb. 2003)を、改変型ホタルルシフェラーゼベクター(pGL3-dLuc vector)に挿入したものを準備した(Per2-dLuc vector:[ Ueda, 2002 ] )。

pGL3-dLuc ベクターはpGL3-basic ベクター(Promega, Madison, WI)を改変したもので、オルニチン脱炭酸酵素のPEST配列(自身の分解を促進させるモチーフ)をルシフェラーゼ(Luc)のカルボキシル末端側に挿入し、半減期を約30分にしてシグナルの時間的な検出感度をよくしたものである(destabilized Luc; dLuc)。Per2-dLucベクターからPer2プロモーターとdLucをコードする領域(約5.4kb)を制限酵素(MluI, SalI)で切り出して精製し、トランスジェニックラットを作製した(Y.S. New Technology Institute, Utsunomiya, Japan)。トランスジェニックラットはWistar 系ラットと交配して維持し、導入遺伝子の有無はルシフェラーゼを認識するプライマーを用いたPCR 法によって判定した(Forward Primer; 5'-TTT ATA ATG AAC GTG AAT TGC TC-3', Reverse Primer; 5'-CGT ATT TGT CAA TCA GAG TGC-3', PCR Products: 539bp)。ラットは12時間ごとの明暗サイクル(light on: 8:00-20:00)で飼育しエサと水は自由に与えた。

### マウスの中枢および末梢組織のサンプリング

10 週齢の雄性C57BL/6 マウス(CLEA Japan, Tokyo, Japan)を購入し、2 週間12 時間ごとの明暗サイクル(LD、light on: 8:00-20:00)で飼育して馴化した。この間エサと水は自由に与えた。一部のマウスについては光変化のない状態での遺伝子発現プロファイルを得るために、サンプリングの2 日前に恒暗条件(DD)に移した。LD条件における消灯時刻(=20:00)をZeitgeber Time (ZT)12、DD条件における行動の開始時刻(=20:00)をCircadian Time (CT)12 と定め、サンプリングを行った。サンプリングは、ZT/CT12から4時間ごとに48時間にわた

って12点行った。マウスをエーテルで深麻酔した後開腹し、視交叉上核、肝臓および副睪丸脂肪を採取して直ちに液体窒素で凍結し、 $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。ISOGEN Reagent (Nippon Gene, Tokyo, Japan)を用いて精製し、DNaseI (Nippon Gene, Tokyo, Japan)で処理してtotal RNAを得た。

### ピーク時刻の解析

振動遺伝子の発現ピークを推定するために、各プローブの12時点の発現データと、ピークを10分間刻みで変更した24時間周期の余弦波との相関係数を求めた。この解析から、もっとも相関係数の高かった余弦波のピーク時刻を、振動遺伝子のピーク時刻とした。

### 定量的PCR法

定量的PCR法は、PCR によってDNAの二本鎖が合成されたときにのみ結合する試薬(インターキレート)を反応液にいれて二本鎖の総数を定量することで、遺伝子のコピー数をリアルタイムに測定することが出来る方法であり、規定量のゲノムDNAを鋳型としてスタートのコピー数を定めることで、サンプルに含まれていたRNAのコピー数を決定できる定量性の良い方法である。今回は、PRISM7900システム (Applied Biosystems, Forster City, CA)を用いた。

0.5mgのtotal RNAからSuperScriptII 逆転写酵素 (Invitrogen, Carlsbad, CA)を用いてcDNAを合成した。1 x SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Forster City, CA)を用いて以下に示す反応条件で実験を行った。① $95^{\circ}\text{C}$  (10分)→② $94^{\circ}\text{C}$  (15秒)→③ $60^{\circ}\text{C}$  (30秒)→④ $72^{\circ}\text{C}$  (1分)。ただし②を40サイクル繰り返す。エクソン内に設計したプローブを用い、ゲノムDNAを用いた標準線を求めて、遺伝子発現の絶対量を求めた。また、内部標準としてGAPDHの発現量を調べた。プライマーはTable.1に記載した。

Table 1. Primer sequences for quantitative PCR

Gene	Forward primer	Reverse primer
<i>rCYP7A1</i>	TGTGTGAGGGACCAGGTCTCT	AGCTCCAAAAGGTTGCAGGA
<i>rDBP</i>	CTCTAGGGACACACCCAGTCCT	AGGCTTCAATTCCTCCTCTGAGA
<i>rPER1</i>	ACCAGCTCAAGGCTTAGGAGCT	TGGGATTTGGAGAGACCACTTC
<i>rPER2</i>	CAACCTTTGTCTGCCATATGAGG	CGTTAGAAACACAAGCTCTTCCAC
<i>rPer3</i>	CAGAAGGATTCAAGCCCGTG	TACTTGGCATGGTTCCTGCC
<i>rDEC1</i>	GGGAAAACTGTGTGCCAGTC	CGTGATCGCTCTTGAAGTAGGG
<i>rDEC2</i>	AACCCCTTTGTCCCATGTCTC	GCCCAGAGCACTTTAACACCC
<i>rRev-erbA<math>\alpha</math></i>	GTCATTGTTCAACGTGAAGGACC	CTCCTCAGTAAGCGCCAGAGAG
<i>rRev-erbA<math>\beta</math></i>	CCAATGCATAGTTTTTCTTCTATGGG	ACATATTTCCAAAGACGCAAACCTG
<i>rROR<math>\gamma</math></i>	GGAGACAAGAGTAATAGGATGCTGG	ACAGGCTTGCAAAAACACTTTG
<i>rCry1</i>	GCTTCCCTGCAAAATATATCTACGA	GCTGCTGATAGATCTGCTTCATTCT
<i>rClock</i>	CCTATCCTACCTTTGCCACACAA	TCCTGGGAACTCTGCTGTGACT
<i>rBmal1</i>	GCCATGGCCACTGTAGACACTA	CAATGGCTCTGAGATGGCTTTTAT
<i>rLXR<math>\alpha</math></i>	TCCGAGATCTGGGATGTCCA	TGCCATGCAAGGGTCTCTTT
<i>rFXR</i>	AGCCACAGATCTCCTCCTCG	ACAGGCATCTCGGATACCTCA
<i>rSHP</i>	CAGCTTGGATTTCTCGGTTT	GTCTGGAGGAATTCTGCCCTG
<i>rSREBP2</i>	CTGCCAACCTACAGACCTGCTT	GCGCTGGAAGACCTTTTTGAG
<i>rHMGCoAR</i>	TGCACAGACTCCTCAGACGTG	TTCGTCAAAACACCAGCTTCC
<i>rLDLR</i>	GGTCAGCCTGGAGGATGATGT	GCTTTGAGCAACACAGAGACCA
<i>rSREBP1</i>	GGAGCCATGGATTGCACATT	AGGAAGGCTTCCAGAGAGGA
<i>rFAS</i>	TTCTCAGGCCGTGATAAGTGC	GTAGGCCGGTGGTGTAGACAACA
<i>rPGC1<math>\alpha</math></i>	CATTTGTCAACAGCAAAAGCCA	GCGGTTGTGTATGGGACTTCTT
<i>rCPT1<math>\alpha</math></i>	CTGTGAAGCCTTTGGGTGGAT	GGAAGTGGCAGGCAATGAGA
<i>rGAPDH</i>	GATACTGAGAGCAAGAGAGAGGCC	GATGGTATTCGAGAGAAGGGAGG
<i>r<math>\beta</math>-ACTIN</i>	GGTCGTACCACTGGCATTGTG	GCTCGGTCAGGATCTTCATGAG
<i>mPer1</i>	CGTCCTACCTCCTTTATCCAGA	TGTTTGCATCAGTGTTCATCAGC
<i>mPer2</i>	CATTGAACTTGAGACTGAGGT	AAGGGAACACACTGAGAGGAT
<i>mPer3</i>	GAAGCGAGAGGCAGAAGCACAA	GAAAAGAGGGGAGGAGATAAGG
<i>mGapdh</i>	CAAAATGGTGAAGGTCGGTGTG	ATTTGATGTTAGTGGGGTCTCG

### レポーターアッセイ

NIH3T3細胞をDMEM(Invitrogen, Carlsbad, CA)／10%FBS 培地で37℃、5%CO<sub>2</sub> に維持されたインキュベータで培養した。Lucアッセイのために、トランスフェクション前日に24穴培養用プレートにNIH3T3細胞を $4 \times 10^4$  細胞播種した。LipofectAMINE2000(Invitrogen, Carlsbad, CA)を用い、内標準としてRenilla Lucをチミジンキナーゼプロモータに導入したpRL-TK(2ng, Promega, Madison, WI)とSV40-dLucに時計遺伝子応答領域該当配列を導入したもの(W/M, 10ng)を細胞にトランスフェクトした。このときpCI-*Bmal1* (100ng)、pCI-*Clock* (100ng)、pCI-*Cry1* (100ng)、pDNA3.1-*Dec1* (100 ng)を組み合わせで導入した。導入したDNA量が412ngになるようにpCI-neo(Promega, Madison, WI)もしくはpCMV-Sport6 を加えて調節した。トランスフェクションの24時間後に細胞を回収し、Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega, Madison, WI)を用いて解析した。

### 転写のダイナミクスのモニタリング

Rat-1 細胞を DMEM(Invitrogen, Carlsbad, CA)／10%FBS 培地で 37℃、5%CO<sub>2</sub> に維持されたインキュベータで培養した。トランスフェクション前日に 35mm 細胞培養用ディッシュに Rat-1 細胞を  $3 \times 10^5$  個播いた。LipofectAMINE(Invitrogen, Carlsbad, CA)を用いてレポーターベクター(*Per1*-dLuc、*Per2*-dLuc、SV40-dLuc、または SV40-dLuc に時計遺伝子応答領域該当配列を導入したもの)を 1μg トランスフェクトした。cDNA を過剰発現させる場合は、発現ベクター(pCMV-*DBP* または pCMV-*E4BP4*)を 0.1μg、0.3μg または 1.0 μg トランスフェクトした。導入した DNA 量が 2.0 μg になるように pCI-neo もしくは pCMV-Sport6 を加えて調節した。siRNA は、Ambion (Austin, TX) と Qiagen (Valencia, CA) から購入し、50nM にてトランスフェクトした。トランスフェクション 24 時間後、dibutyryl cyclic AMP (dbcAMP; Wako Pure Chemical Industries, Ltd. )を 1mM で刺激した。ラット初代培養肝細胞は EHS-gel を塗布しておいた 35mm 細胞培養用ディッシュに  $3 \times 10^5$  個播いた。10mM HEPES (pH7.2)、0.1mM



ルシフェリン (Promega, Madison, WI)、抗生物質 (25U/ml ペニシリン、25mg/ml ストレプトマイシン) を加えた 2ml の培養用メディウムに置換して、30°C に保った保温庫内で PMT により発光量を測定した。解析には、計測データ (生データ) から 24 時間分の移動平均値を引くディトレンド処理を行い、その後 2 時間分の移動平均値で平滑化する平滑化処理を行った。この波形データの発光値の peak 値を算出し、データを比較した。peak3 の値が前進したか後退したかを位相評価の基準とした。周期は peak3 ~ peak8 の値から算出した。

#### H4IIE細胞におけるインスリンの評価

H4IIE 細胞を DME/F12 (Sigma, D8062) 5% FBS 培地で 37°C、5% CO<sub>2</sub> に維持されたインキュベータで培養した。60mm 細胞培養用ディッシュに H4IIE 細胞を  $1.5 \times 10^6$  個播いた。2 日後にコンフルエントに達し培地交換した。さらに 1 日培養し、実験開始とした。インスリン (1、5 または 50 μM) を処理して経時的に細胞から RNA を抽出した。LY2940020 (50 μM) と PD98059 (50 μM) はインスリン処理 30 分前から処理した。

#### 糖尿病ラット

初体重 90g 前後の 5 週令 Wistar 系雄ラット (日本エスエルシー) を固形飼料 (日本農産工業株式会社 ラボ MR) で 2 日間飼育し環境に慣れさせた。基本食として 25% カゼイン食を 5 日間与えた後に、体重を基準として 2 群に群分けを行ない、各々の群に生理食塩水またはストレプトゾトシン溶液 (60mg/kg) を腹腔内投与した。投与後 9 日後、4 時間絶食後に尾静脈より採血し、血中のグルコース濃度を測定することで糖尿病の発症を確認し、実験開始とした。実験開始 2 日目から 5 日目まで、3 時間毎の摂食量を 63 時間に渡って測定した。また 7 日目の ZT2、ZT6、ZT10、ZT14、ZT18、ZT22 から 8 日目の ZT2 にかけて、4 時間絶食後断頭により屠殺し、肝臓と血清を採取した。ストレプトゾトシン投与 11 日目にインスリン (Humalin R、50U/kg) を 4 時間おきに腹腔内投与した。翌日の ZT2、ZT6、ZT10、ZT14、ZT18 から翌々日

の ZT2 にかけて、4 時間絶食後断頭により屠殺し、肝臓と血清を採取した。ZT2、ZT14 にインスリン (Humalin R、50U/kg) を腹腔内投与して、2 時間後に屠殺し、脳、肺、筋肉および副睾丸脂肪を採取した。屠殺時の血液中のコレステロール濃度、トリグリセリド濃度、リン脂質濃度、グルコース濃度を測定した。

### 摂食リズム崩壊ラット

初体重 90g 前後の 5 週令 Wistar 系雄ラット (日本エスエルシー) 12 匹を固形飼料 (日本農産工業株式会社 ラボ MR) で 2 日間飼育し環境に慣れさせた。基本食として 20% カゼイン食を 3 日間与えた後に、1% コレステロール、0.25% コール酸ナトリウムを含む高コレステロール食を 11 日間与え高コレステロール血症ラットを作成し実験を開始した。血漿コレステロール濃度、体重が等しくなるように Control 群 (C 群)、Suppression 群 (S 群) の 2 群に分けた。C 群、S 群ともに高コレステロール食を与えた。C 群は自由摂食させ、S 群は前日に C 群の 1 日の摂食量を測定し、それを体重当たり換算して 1/4 量ずつ 1 日 4 回 (ZT0、ZT6、ZT12、ZT18) にして与えた。摂食量は 6 時間毎 (ZT0、ZT6、ZT12、ZT18) に測定した。体重は 12 時間毎 (ZT0、ZT12) に測定した。実験開始から 0、7、11、18 日目に尾静脈より採血し、血漿コレステロール濃度を測定した。実験開始から 6 日目の血漿サンプルをアガロースゲル電気泳動によってリポタンパク質を分離し、コレステロール染色を行い血中コレステロールの動態を視覚化した。実験開始 17 日目に、VLDL 異化代謝を阻害するチロキサポールを 400mg/kg 体重となるように頸静脈より投与した。投与後 6 時間まで 2 時間おきに尾静脈から採血し、血漿中性脂質とコレステロールを測定した。実験開始 19 日目の ZT2 から 20 日目の ZT2 まで 4 時間毎に 4 時間の絶食後断頭によって屠殺し、血液と肝臓を採取した。屠殺時の血液中の総コレステロール濃度、HDL コレステロール濃度、中性脂肪濃度、リン脂質濃度、グルコース濃度 (Glucose CII-test) を測定した。胆汁酸は 3 $\alpha$ -ヒドロキシステロイド脱水素酵素を使用する酵素法により測定した [Sheltawy, 1975]。

## ラット初代培養肝細胞実験法

### (1) 試薬

#### 前灌流液

Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) (SIGMA Cat. No. H2387)、HEPES 2.38g、EGTA 0.19g、NaHCO<sub>3</sub> 0.35g を蒸留水約 900mL に溶解し、1N NaOH で pH を 7.2 に調整し、全量を 1000mL とし、0.2 $\mu$ m のメンブレンフィルター (ADVANTECCat. No. A020A047A) を用いて濾過滅菌をし、滅菌済みのメディウム瓶に入れて 4°C で保存した。

#### コラゲナーゼ溶液

Hanks (ハンクス液「ニッスイ」<sup>①</sup>) 9.8g、HEPES 2.38g、CaCl<sub>2</sub> 0.41g、NaHCO<sub>3</sub> 0.35g を蒸留水 900mL に添加し、溶けるまで攪拌し、pH を 7.5 に調製した後、全量 1000mL とした。これを 200mL 分注し、Collagenase (和光純薬工業株式会社 034-10533) 0.16g、Trypsin Inhibitor (Sigma T-9128) 0.004g を添加し溶けるまで攪拌し、0.20  $\mu$ m のメンブレンフィルター (ADVANTECCat. No. A020A047A) を用いて濾過滅菌をし、滅菌済みのメディウム瓶に入れて 4°C で保存した。

#### 細胞洗浄用 MEM 培地

Minimum Essential Medium (S-MEM) (SIGMA Cat. No. M4767)、コハク酸 75mg、コハク酸ナトリウム 100mg、NaHCO<sub>3</sub> 4.9g を蒸留水 900mL に添加し、溶けるまで攪拌し、溶解後全量を 1000mL とする。これを 0.2 $\mu$ m のメンブレンフィルター (ADVANTECCat. No. A020A047A) を用いて濾過滅菌をし、滅菌済みのメディウム瓶 3 本に分注して、4°C で保存した。

#### Waymouth's MB752/1 培地

Waymouth's MB752/1 Medium (SIGMA Cat. No. W1625 with L-glutamine, without sodium

bicarbonate)、NaHCO<sub>3</sub> 2.24g を蒸留水約 900mL に溶解させた。1N NaOH で pH7.4 に調製した後全量を 1000mL とし、0.20mm のメンブレンフィルター (ADVANTECCat. No. A020A047A) で濾過滅菌した。この液にペニシリン・ストレプトマイシン液 (SIGMA Cat. No. P4333 ) 5mL 加え攪拌した。その後 4°C で保存した。

## (2) 肝細胞の分離

ネンブタール (ダイナボット株式会社 No.3778) 麻酔下のラットを温めた 0.02% ヒビテン液 (住友製薬株式会社) で全身を消毒し、ラットを開腹し門脈を露出する。門脈に縫合糸のループをかけた後、門脈に切れ目を入れる。切開部から溢れ出る血液をカニユーレの先端から滴下する前灌流液で洗い流しながら素早く門脈の切開面からカニユーレを挿入し縫合糸で結紮する。同時に肝臓下の下大静脈を切断し流速を 20mL/min で灌流し、脱血及び灌流液を放出させる。

次に胸部を開き心臓を露出させ、横隔膜下の下大静脈に縫合糸のループをかけた後、切断した肝臓下の下大静脈を鉗子で結紮し、右心房を切開して別のカニユーレを右心房から下大静脈に挿入し結紮する。この状態で前灌流液がなくなるまで灌流を続ける。前灌流液がなくなりそうになったらポンプを止め、前灌流液をコラゲナーゼ溶液に交換し、再び灌流を始める。始めの 30 秒は流速を 30mL/min で灌流し、その後 20mL/min でコラゲナーゼ溶液がなくなるまで灌流する。灌流が終わったら、肝臓をシャーレにとりメスで軽く細分し、20mL 程の細胞洗浄用 MEM を加え、先太駒込ピペットで軽くピペッティング後、細胞濾過器で濾過する。

得られた粗分散細胞浮遊液をスイングローター遠心機 (SAKUMA R90-23) で 500~600rpm、1 分 30 秒間遠心分離する。上清は吸引して除き、新たに細胞洗浄用 MEM を加え再び遠心分離する。この操作を合計 3 回繰り返すことによりほぼ均一な肝実質細胞を得ることができる。

得られた肝実質細胞懸濁液から 0.2mL とり、0.03g/2mL トリパンプルー (WAKO207-03252)

PBS 溶液 0.2mL、細胞洗浄用 MEM 1.6mL と懸濁し、生存率と細胞濃度を計測した。生存率 80% 以上の細胞を実験に用いた。細胞を  $1.0 \times 10^7$  cells/8mL になるように培地で懸濁する。この細胞懸濁液を 100mm 径のディッシュに 8mL プレーティングする。なお、死細胞を除くためプレーティング 4 時間後に 1×PBS で 2 度洗浄後培地交換を行う。この後は毎日培地交換を行う。全ての実験で無血清培地を用いた。

#### 使用したディッシュ

- ・ I 型コラーゲンディッシュ

I 型コラーゲン液 (3.0mg/mL、新田ゼラチン Type I-P : Lot No. 941215) を滅菌した 1mM HCl により希釈し、濃度を 100 $\mu$ g/ml に調整した。この溶液を 100mm ディッシュ (FALCON 1029) に 8mL 加え、37°C で 2 時間放置した。その後コラーゲン溶液を取り除き、滅菌済みの PBS で 2 回洗浄した。乾燥を防ぐため PBS を満たした。

- ・ IV 型コラーゲンディッシュ

BIOCOAT CELLWARE MOUSE Collagen IV 100mm dish を使用した。

- ・ ラミニンディッシュ

BIOCOAT CELLWARE MOUSE LAMININ 100mm dish を使用した。

- ・ PVLA ディッシュ

PVLA 10mg に蒸留水 100mL を加え、一晚攪拌し溶解させた。この 100 $\mu$ g/mL の溶液を 0.45 $\mu$ m のフィルターでろ過滅菌し、100mm dish (FALCON 1029) に 10mL 加え 37°C で 2 時間放置した。その後 PVLA 溶液を取り除き、滅菌済みの PBS で 2 回洗浄した。乾燥を防ぐため PBS を満たした。

- ・ EHS-gel ディッシュ

100mm dish (FALCON 3003) に前日に EHS-gel を塗布しておいたものを使用した。

## EHS-gel の調製

### マウス EHS 肉腫の継代

EHS 肉腫を保持したマウスを断頭で屠殺した。マウスの体全体を流水で洗った後、70%エタノールの順に数秒間マウスを浸した。肉腫で膨らんだマウスの後ろ足の皮膚をはさみとピンセットで剥し、肉腫をとりまく結合織を除いた。冷 PBS の中に、0.5cm から 1.0cm 角の肉腫を入れた。この時血液で赤く染まってなく、かつ白すぎない肉腫を選んだ。針を付けない 10mL のシリンジに肉腫の入った 1×PBS10mL を入れ、シリンジから押し出す力で肉腫を細かく壊した。次にシリンジに 19G の針を付け同様の操作を行いさらに細かく磨砕した。さらに 21G の針を使って同様のことを 2 回繰り返した。この肉腫懸濁液をマウスの後ろ足筋肉に一本の足に 0.5mL を目安にして注射した。通常 1 ヶ月毎に継代した。残りの肉腫は-80℃で保存した。

### マウス EHS 肉腫からの EHS-gel の調製

#### 試薬

High Salt Buffer (pH7.4)

3.4M NaCl

0.05M Tris

4mM EDTA (ethylene diamine tetraacetate)

NaCl 198.6g、Tris 6.0g、EDTA 1.48g を蒸留水で溶解し、12N HCl で pH7.4 に調整後全量を 1L にした。121℃、20 分間オートクレーブ滅菌し、4℃で保存した。使用当日、1/100 容の 200mM NEM(下記参照)を添加して用いた。

200mM N-ethylmaleimide (NEM) (当日調製)

0.3g NEM を 12mL の蒸留水で溶解し、0.20mm のメンブレンフィルター(ADVANTEC Cat. No. 13CP020AS )でろ過滅菌した。

Extraction buffer (pH7.4)

0.05M Tris

2.0M Urea

0.15M NaCl

Tris 0.9g、Urea(米山薬品 特級)18g、NaCl 1.32g を蒸留水に溶解し、12NHCl で pH7.4 に調整後全量を 150mL とした。0.20mm のニトロセルロースフィルター(ADVANTEC Cat. No. A020A047A)でろ過滅菌し、4°Cで保存した。

実験に用いた器具はすべてオートクレーブし、すべての操作はできる限り滅菌状態で行った。-80°Cで保存していた EHS 肉腫約 30g を滅菌済みのスパーテルを用いて 50mL 遠心管 (FALCON 2070)6 本に移し 5 倍容 (25mL) の High Salt Buffer でポリトロンを用いてホモジナイズした。ポリトロンの刃はクリーンベンチ内で 70%エタノールにしばらくつけて滅菌し乾燥させた後用いた。アングルローター遠心機(HITACHI himac CR21、ローター 50F6A)で 4°C、5000rpm、10 分間の遠心をして、不溶性沈殿物を集めた。この操作を 3 回ぐらい繰り返すことにより、不溶性物質を洗った。その後不溶性沈殿物と等量 (30mL) の Extraction Buffer を加え、100mL メディウム瓶に移し 4°Cでスターラーを用いて一晩攪拌した。次にこれをアングルローター遠心機で 9500rpm、30 分間の遠心を行った。以下の操作はクリーンベンチ内で行った。尿素可溶性の上清画分を集め 4°Cの滅菌済み 1×TBS 5L で透析した。不溶性沈殿物には再度等量 (30mL) の Extraction Buffer を加え、1 回目と同様に 4°Cで一晩攪拌し、上清画分を集め滅菌済み 1×TBS 5L で透析した。透析はそれぞれの上清画分につき 4 回繰り返し、最後に抗生物質を含まない Waymouth's Medium 1L で透析した。透析後の溶液をアングルローター遠心機で 9500rpm、30 分間の遠心を行い、2 回分の上清画分を混合して得られたものを EHS-gel とした。EHS-gel に含まれるタンパク質量を protein assay kit (BIO-RAD 500-0006) を用いて Bradford dye-binding 法[Bradford, 1976]により測定した。

### 統計処理

結果は平均値±標準誤差で示した。2群間の比較はStudentのt検定を用いて、 $P<0.05$ を有意差ありとした。多群の比較は対照群との比較をDunnettの多重比較検定を用い、 $P<0.05$ を有意差ありとした。



## 参考文献

- Akashi M, Ichise T, Mamine T, Takumi T (2006). Molecular mechanism of cell-autonomous circadian gene expression of Period2, a crucial regulator of the mammalian circadian clock. *Mol Biol Cell*, 17, 555–565.
- Akiyama M, Kouzu Y, Takahashi S, Wakamatsu H, Moriya T, Maetani M, Watanabe S, Tei H, Sakaki Y, Shibata S (1999). Inhibition of light- or glutamate-induced mPer1 expression represses the phase shifts into the mouse circadian locomotor and suprachiasmatic firing rhythms. *J Neurosci*, 19, 1115–1121.
- Ando H, Yanagihara H, Hayashi Y, Obi Y, Tsuruoka S, Takamura T, Kaneko S, Fujimura A (2005). Rhythmic messenger ribonucleic acid expression of clock genes and adipocytokines in mouse visceral adipose tissue. *Endocrinology*, 146, 5631–5636.
- 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, Brown SA, Marcacci L, Tronche F, Kellendonk C, Reichardt HM, Schütz G, Schibler U (2000). Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. *Science*, 289, 2344–2347.
- Biggi N, Consonni D, Galluzzo V, Sogliani M, Costa G (2008). Metabolic syndrome in permanent night workers. *Chronobiol Int*, 25, 443–454.
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248–254.
- Bunger MK, Wilsbacher LD, Moran SM, Clendenin C, Radcliffe LA, Hogenesch JB, Simon MC, Takahashi JS, Bradfield CA (2000). Mop3 is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals. *Cell*, 103, 1009–1017.
- Canaple L, Rambaud J, Dkhissi-Benyahya O, Rayet B, Tan NS, Michalik L, Delaunay F, Wahli W, Laudet V (2006). Reciprocal regulation of brain and muscle Arnt-like protein 1 and peroxisome proliferator-activated receptor alpha defines a novel positive feedback loop in the rodent liver circadian clock. *Mol Endocrinol*, 20, 1715–1727.

Daan S, Pittendrigh CS (1976). A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents III. Heavy water and constant light: homeostasis of frequency? *J Comp Physiol*, 106, 267–290.

Damiola F, Le Minh N, Preitner N, Kornmann B, Fleury-Olela F, Schibler U (2000). Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev*, 14, 2950–2961.

DeBruyne JP, Noton E, Lambert CM, Maywood ES, Weaver DR, Reppert SM (2006). A clock shock: mouse CLOCK is not required for circadian oscillator function. *Neuron*, 50, 465–477.

DeBruyne JP, Weaver DR, Reppert SM (2007). Peripheral circadian oscillators require CLOCK. *Curr Biol*, 17, R538–539.

Dudley CA, Erbel-Sieler C, Estill SJ, Reick M, Franken P, Pitts S, McKnight SL (2003). Altered patterns of sleep and behavioral adaptability in NPAS2-deficient mice. *Science*, 301, 379–83.

Dunlap JC (1999). Molecular bases for circadian clocks. *Cell*, 96, 271–290.

Ebisawa T, Uchiyama M, Kajimura N, Mishima K, Kamei Y, Katoh M, Watanabe T, Sekimoto M, Shibui K, Kim K, Kudo Y, Ozeki Y, Sugishita M, Toyoshima R, Inoue Y, Yamada N, Nagase T, Ozaki N, Ohara O, Ishida N, Okawa M, Takahashi K, Yamauchi T (2001). Association of structural polymorphisms in the human period3 gene with delayed sleep phase syndrome. *EMBO Rep*, 2, 342–346.

Filipski E, Delaunay F, King VM, Wu MW, Claustrat B, Gréchez-Cassiau A, Guettier C, Hastings MH, Francis L (2004). Effects of chronic jet lag on tumor progression in mice. *Cancer Res*, 64, 7879–7885.

Fontaine C, Dubois G, Duguay Y, Helledie T, Vu-Dac N, Gervois P, Soncin F, Mandrup S, Fruchart JC, Fruchart-Najib J, Staels B (2003). The orphan nuclear receptor Rev-Erbalpha is a peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma target gene and promotes PPARgamma-induced adipocyte differentiation. *J Biol Chem*, 278, 37672–37680.

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.

Grechez-Cassiau A, Panda S, Lacoche S, Teboul M, Azmi S, Laudet V, Hogenesch JB, Taneja R, Delaunay F (2004). The transcriptional repressor STRA13 regulates a subset of peripheral circadian outputs. *J Biol Chem*, 279, 1141–1150.

Guillaumond F, Boyer B, Becquet D, Guillen S, Kuhn L, Garin J, Belghazi M, Bosler O, Franc JL, François-Bellan AM (2011). Chromatin remodeling as a mechanism for circadian prolactin transcription: rhythmic NONO and SFPQ recruitment to HLTF. *FASEB J*, 25, 2740–2756.

Harmer SL, Panda S, Kay SA (2001). MOLECULAR BASES OF CIRCADIAN RHYTHMS. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 17:215–253

Hatori M, Hirota T, Iitsuka M, Kurabayashi N, Haraguchi S, Kokame K, Sato R, Nakai A, Miyata T, Tsutsui K, Fukada Y (2011). Light-dependent and circadian clock-regulated activation of sterol regulatory element-binding protein, X-box-binding protein 1, and heat shock factor pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 4864–4869

He PJ, Hirata M, Yamauchi N, Hashimoto S, Hattori MA (2007). The disruption of circadian clockwork in differentiating cells from rat reproductive tissues as identified by in vitro real-time monitoring system. *J Endocrinol*, 193, 413–420.

Hida A, Koike N, Hirose M, Hattori M, Sakaki Y, Tei H (2000). The human and mouse Period1 genes: five well-conserved E-boxes additively contribute to the enhancement of mPer1 transcription. *Genomics*, 65, 224–233.

Honma S, Kawamoto T, Takagi Y, Fujimoto K, Sato F, Noshiro M, Kato Y, Honma K (2002). Dec1 and Dec2 are regulators of the mammalian molecular clock. *Nature*, 419, 841–844.

Jurevics H, Hostettler J, Barrett C, Morell P, Toews AD (2000). Diurnal and dietary-induced changes in cholesterol synthesis correlate with levels of mRNA for HMG-CoA reductase. *J Lipid Res*, 41, 1048–1054.

Kasukawa T, Sugimoto M, Hida A, Minami Y, Mori M, Honma S, Honma K, Mishima K, Soga T, Ueda HR (2012). Human blood metabolite timetable indicates internal body time. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 15036–15041.

Kimata T, Nagaki M, Ogiso T, Naiki T, Kato T, Moriwaki H (2006). Actin organization and hepatocyte differentiation are regulated by extracellular matrix via PI-4,5-bisphosphate in the rat. *Hepatology*, 44, 140–151.

Kleinman HK, McGarvey ML, Hassell JR, Star VL, Cannon FB, Laurie GW, Martin GR (1986). Basement membrane complexes with biological activity. *Biochemistry*, 25, 312–318.

Kobayashi A, Goto M, Kobayashi K, Akaike T (1994). Receptor-mediated regulation of differentiation and proliferation of hepatocytes by synthetic polymer model of asialoglycoprotein. *J Biomater Sci Polym Ed*, 6, 325–342.

Kohsaka A, Laposky AD, Ramsey KM, Estrada C, Joshu C, Kobayashi Y, Turek FW, Bass J (2007). High-fat diet disrupts behavioral and molecular circadian rhythms in mice. *Cell Metab*, 6, 414–421

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

Kudo T, Akiyama M, Kuriyama K, Sudo M, Moriya T, Shibata S (2004). Night-time restricted feeding normalises clock genes and *Pai-1* gene expression in the *db/db* mouse liver. *Diabetologia*, 47, 1425–1436.

Kudo T, Nakayama E, Suzuki S, Akiyama M, Shibata S (2004). Cholesterol diet enhances daily rhythm of *Pai-1* mRNA in the mouse liver. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 287, E644–651.

Kubo T, Ozasa K, Mikami K, Wakai K, Fujino Y, Watanabe Y, Miki T, Nakao M, Hayashi K, Suzuki K, Mori M, Washio M, Sakauchi F, Ito Y, Yoshimura T, Tamakoshi A (2006). Prospective cohort study of the risk of prostate cancer among rotating-shift workers: findings from the Japan collaborative cohort study. *Am J Epidemiol*, 164, 549–555.

Kumaki Y, Ukai-Tadenuma M, Uno KD, Nishio J, Masumoto KH, Nagano M, Komori T, Shigeyoshi Y, Hogenesch JB, Ueda HR (2008). Analysis and synthesis of high-amplitude *Cis*-elements in the mammalian circadian clock. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A*, 105, 14946–14951.

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.

Lavery DJ, Schibler U (1993). Circadian transcription of the cholesterol 7 alpha hydroxylase gene may involve the liver-enriched bZIP protein DBP. *Genes Dev*, 7, 1871–1884.

Lehman MN, Silver R, Gladstone WR, Kahn RM, Gibson M, Bittman EL (1987). Circadian rhythmicity restored by neural transplant. Immunocytochemical characterization of the graft and its integration with the host brain. *J Neurosci*, 7, 1626–1638.

Le Minh N, Damiola F, Tronche F, Schütz G, Schibler U (2001). Glucocorticoid hormones inhibit food-induced phase-shifting of peripheral circadian oscillators. *EMBO J*, 20, 7128–7136.

Liu AC, Welsh DK, Ko CH, Tran HG, Zhang EE, Priest AA, Buhr ED, Singer O, Meeker K, Verma IM, Doyle FJ 3rd, Takahashi JS, Kay SA (2007). Intercellular coupling confers robustness against mutations in the SCN circadian clock network. *Cell*, 129, 605–616.

Liu AC, Tran HG, Zhang EE, Priest AA, Welsh DK, Kay SA (2008). Redundant function of REV-ERBalpha and beta and non-essential role for Bmal1 cycling in transcriptional regulation of intracellular circadian rhythms. *PLoS Genet*, 4, e1000023.

Lopez-Molina, L., Conquet, F., Dubois-Dauphin, M. and Schibler, U (1997). The DBP gene is expressed according to a circadian rhythm in the suprachiasmatic nucleus and influences circadian behavior. *EMBO J*, 16, 6762–6771.

Lowrey PL, Shimomura K, Antoch MP, Yamazaki S, Zemenides PD, Ralph MR, Menaker M, Takahashi JS (2000). Positional syntenic cloning and functional characterization of the mammalian circadian mutation tau. *Science*, 288, 483–492.

Matsushita T, Amagai Y, Terai K, Kojima T, Obinata M, Hashimoto S (2006). A novel neuronal cell line derived from the ventrolateral region of the suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience*, 140, 849–856.

Meng QJ, McMaster A, Beesley S, Lu WQ, Gibbs J, Parks D, Collins J, Farrow S, Donn R, Ray D, Loudon A (2008). Ligand modulation of REV-ERBalpha function resets the peripheral

circadian clock in a phasic manner. *J Cell Sci*, 121, 3629–3635.

Mistlberger RE (1994). Circadian food-anticipatory activity: formal models and physiological mechanisms. *Neurosci Biobehav Rev*, 18, 171–195.

Mitsui S, Yamaguchi S, Matsuo T, Ishida Y, Okamura H (2001). Antagonistic role of E4BP4 and PAR proteins in the circadian oscillatory mechanism. *Genes Dev*, 15, 995–1006.

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

Nakashima A, Kawamoto T, Honda KK, Ueshima T, Noshiro M, Iwata T, Fujimoto K, Kubo H, Honma S, Yorioka N, Kohno N, Kato Y (2008). DEC1 modulates the circadian phase of clock gene expression. *Mol Cell Biol*, 28, 4080–4092.

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.

Noshiro M, Kawamoto T, Furukawa M, Fujimoto K, Yoshida Y, Sasabe E, Tsutsumi S, Hamada T, Honma S, Honma K, Kato Y (2004). Rhythmic expression of DEC1 and DEC2 in peripheral tissues: DEC2 is a potent suppressor for hepatic cytochrome P450s opposing DBP. *Genes to Cell*, 9, 317–329.

Oda H (2001). Molecular mechanism of maintenance of differentiation function in cultured hepatocytes and application of the hepatocytes to molecular nutritional study. *Nippon Noeikagaku Kaishi*, 75, 1267–1274.

Oda H, Nozawa K, Hitomi Y, Kakinuma A (1995). Laminin-rich extracellular matrix maintains high level of hepatocyte nuclear factor 4 in rat hepatocyte culture. *Biochem Biophys Res Commun*, 212, 800–805.

Oda H, Yoshida Y, Kawamura A, Kakinuma A (2008). Cell shape, cell-cell contact, cell-extracellular matrix contact and cell polarity are all required for the maximum induction of CYP2B1 and CYP2B2 gene expression by phenobarbital in adult rat cultured hepatocytes. *Biochem. Pharmacol*, 75, 1209–1217.

Ohdo S, Koyanagi S, Suyama H, Higuchi S, Aramaki H (2001). Changing the dosing schedule minimizes the disruptive effects of interferon on clock function. *Nat Med*, 7, 356–360.

Ohno T, Onishi Y, Ishida N (2007). A novel E4BP4 element drives circadian expression of mPeriod2. *Nucleic Acids Res*, 35, 648–655.

Ohno T, Onishi Y, Ishida N (2007). The negative transcription factor E4BP4 is associated with circadian clock protein PERIOD2. *Biochem Biophys Res Commun*, 354, 1010–1015.

Oishi K, Kasamatsu M, Ishida N (2004). Gene- and tissue-specific alterations of circadian clock gene expression in streptozotocin-induced diabetic mice under restricted feeding. *Biochem Biophys Res Commun*, 317, 330–334.

Oishi K, Shirai H, Ishida N (2005). CLOCK is involved in the circadian transactivation of peroxisome-proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in mice. *Biochem J*, 386, 575–581.

Oishi K, Atsumi G, Sugiyama S, Kodomari I, Kasamatsu M, Machida K, Ishida N (2006). Disrupted fat absorption attenuates obesity induced by a high-fat diet in Clock mutant mice. *FEBS Lett*, 580, 127–130.

Pando MP, Morse D, Cermakian N, Sassone-Corsi P (2002). Phenotypic rescue of a peripheral clock genetic defect via SCN hierarchical dominance. *Cell*, 110, 107–117.

Paschos GK, Baggs JE, Hogenesch JB, FitzGerald GA (2010). The role of clock genes in pharmacology. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 50, 187–214

Reppert SM, Weaver DR (2002). Coordination of circadian timing in mammals. *Nature*, 418, 935–941.

Sakakida Y, Miyamoto Y, Nagoshi E, Akashi M, Nakamura TJ, Mamine T, Kasahara M, Minami Y, Yoneda Y, Takumi T (2005). Importin alpha/beta mediates nuclear transport of a mammalian circadian clock component, mCRY2, together with mPER2, through a bipartite nuclear localization signal. *J Biol Chem*, 280, 13272–13278.

Sakamoto K, Nagase T, Fukui H, Horikawa K, Okada T, Tanaka H, Sato K, Miyake Y, Ohara O,

Kako K, Ishida N (1998). Multitissue circadian expression of rat period homolog (rPer2) mRNA is governed by the mammalian circadian clock, the suprachiasmatic nucleus in the brain. *J Biol Chem*, 273, 27039–27042.

Sheltawy MJ, Losowsky MS (1975). Determination of faecal bile acids by an enzymic method. *Clin Chim Acta*, 64, 127–132.

Shigeyoshi Y, Taguchi K, Yamamoto S, Takekida S, Yan L, Tei H, Moriya T, Shibata S, Loros JJ, Dunlap JC, Okamura H (1997). Light-induced resetting of a mammalian circadian clock is associated with rapid induction of the mPer1 transcript. *Cell*, 91, 1043–1053.

Shimba S, Ishii N, Ohta Y, Ohno T, Watabe Y, Hayashi M, Wada T, Aoyagi T, Tezuka M (2005). Brain and muscle Arnt-like protein-1 (BMAL1), a component of the molecular clock, regulates adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 12071–12076.

Singhvi R, Kumar A, Lopez GP, Stephanopoulos GN, Wang DI, Whitesides GM, Ingber DE (1994). Engineering cell shape and function. *Science*, 264, 696–698.

Takumi T, Matsubara C, Shigeyoshi Y, Taguchi K, Yagita K, Maebayashi Y, Sakakida Y, Okumura K, Takashima N, Okamura H (1998). A new mammalian period gene predominantly expressed in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Cells*, 3, 167–176.

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.

Toh KL, Jones CR, He Y, Eide EJ, Hinz WA, Virshup DM, Ptáček LJ, Fu YH (2001). An hPer2 phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phase syndrome. *Science*, 291, 1040–1043.

Turek FW, Joshu C, Kohsaka A, Lin E, Ivanova G, McDearmon E, Laposky A, Losee-Olson S, Easton A, Jensen DR, Eckel RH, Takahashi JS, Bass J (2005). Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice. *Science*, 308, 1043–1045.

Ueda HR, Chen W, Adachi A, Wakamatsu H, Hayashi S, Takasugi T, Nagano M, Nakahama K, Suzuki Y, Sugano S, Iino M, Shigeyoshi Y, Hashimoto S (2002). A transcription factor response element for gene expression during circadian night. *Nature*, 418, 534–539.



- Ueda HR, Chen W, Minami Y, Honma S, Honma K, Iino M, Hashimoto S (2004). Molecular-timetable methods for detection of body time and rhythm disorders from single-time-point genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 11227–11232.
- Ueda HR, 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.
- Ukai-Tadenuma M, Kasukawa T, Ueda HR (2008). Proof-by-synthesis of the transcriptional logic of mammalian circadian clocks. *Nat Cell Biol*, 10, 1154–63.
- van der Horst GT, Muijtjens M, Kobayashi K, Takano R, Kanno S, Takao M, de Wit J, Verkerk A, Eker AP, van Leenen D, Buijs R, Bootsma D, Hoeijmakers JH, Yasui A (1999). Mammalian *Cry1* and *Cry2* are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature*, 398, 627–630.
- 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.
- Wuarin J, Schibler U. (1990). Expression of the liver-enriched transcriptional activator protein DBP follows a stringent circadian rhythm. *Cell*, 63, 1257–1266.
- Xu Y, Padiath QS, Shapiro RE, Jones CR, Wu SC, Saigoh N, Saigoh K, Ptáček LJ, Fu YH (2005). Functional consequences of a *CK1delta* mutation causing familial advanced sleep phase syndrome. *Nature*, 434, 640–644.
- Yagita K, Okamura H (2000). Forskolin induces circadian gene expression of *rPer1*, *rPer2* and *dbp* in mammalian rat-1 fibroblasts. *FEBS Lett*, 465, 79–82.
- Yagita K, Tamanini F, van Der Horst GT, Okamura H (2001). Molecular mechanisms of the biological clock in cultured fibroblasts. *Science*, 292, 278–281.
- Yagita K, Yamanaka I, Koinuma S, Shigeyoshi Y, Uchiyama Y (2009). Mini screening of kinase inhibitors affecting period-length of mammalian cellular circadian clock. *Acta Histochem Cytochem*, 42, 89–93.

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.

Yamamoto T, Nakahata Y, Soma H, Akashi M, Mamine T, Takumi T (2004). Transcriptional oscillation of canonical clock genes in mouse peripheral tissues. *BMC Mol Biol*, 5, 18.

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.

Yanagihara H, Ando H, Hayashi Y, Obi Y, Fujimura A (2006). High-fat feeding exerts minimal effects on rhythmic mRNA expression of clock genes in mouse peripheral tissues. *Chronobiol Int*, 23, 905–914.

Yoshida Y, Kimura N, Oda H, Kakinuma A (1996). Insulin suppresses the induction of CYP2B1 and CYP2B2 gene expression by phenobarbital in adult rat cultured hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 229, 182–188

Yoo SH, Yamazaki S, Lowrey PL, Shimomura K, Ko CH, Buhr ED, Siepkas SM, Hong HK, Oh WJ, Yoo OJ, Menaker M, Takahashi JS (2004). PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 101, 5339–5346.

Yoo SH, Ko CH, Lowrey PL, Buhr ED, Song EJ, Chang S, Yoo OJ, Yamazaki S, Lee C, Takahashi JS (2005). A noncanonical E-box enhancer drives mouse Period2 circadian oscillations in vivo. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 102, 2608–2613.

Zylka MJ, Shearman LP, Weaver DR, Reppert SM (1998). Three period homologs in mammals: different light responses in the suprachiasmatic circadian clock and oscillating transcripts outside of brain. *Neuron*, 20, 1103–1110.

## 謝辞

本論文の発表に際し、終始懇切丁寧なご指導、御鞭撻を賜り、かつ本論文の御校閲をいただきました東京大学 大学院農学生命科学研究科 応用生命工学専攻 分子生命工学研究室教授 依田 幸司博士に深く感謝申し上げます。

この研究は、アステラス製薬株式会社 分子医学研究所 NEDO プロジェクトおよび名古屋大学 大学院生命農学研究科 栄養生化学研究室で行われたものです。本研究の機会を賜るとともに、過分の御便宜及びご支援を賜りましたアステラス製薬株式会社 分子医学研究所 橋本 誠一博士に、深甚なる謝意を表します。常に適切なご指導、ご助言を賜わった名古屋大学 大学院生命農学研究科 栄養生化学研究室准教授 小田 裕昭博士に心から感謝いたします。

本論文の発表の機会を賜り、御校閲をいただきましたアステラス製薬株式会社 分子医学研究所 バイオ創薬第二研究室室長 山地 昇 博士に深甚なる敬意を表します。

また、本研究の機会を与えていただくと共に、過分の御配慮を賜りましたアステラス製薬株式会社 分子医学研究所所長 河畑 茂樹 博士ならびに研究推進部 柴崎 雅之 博士に心より感謝申し上げます。

共同研究者として実験にご協力いただきましたアステラス製薬株式会社 NEDO プロジェクトおよび名古屋大学 栄養生化学研究室の皆様にも深く感謝申し上げます。

## 論文目録

本学位論文は下記の掲載論文を再編集して作成した。

(1) 2009年9月 *Circulation Research* Vol. 105, No.6, pp545–548

“Regular feeding plays an important role in cholesterol homeostasis through the liver circadian clock.”

(Yamajuku D, Okubo S, Haruma T, Inagaki T, Okuda Y, Kojima T, Noutomi K, Hashimoto S, Oda H.)

(2) 2010年12月 *Nucleic Acids Research* Vol. 38, No.22, pp7964–7973

“Identification of functional clock-controlled elements involved in differential timing of *Per1* and *Per2* transcription.”

(Yamajuku D, Shibata Y, Kitazawa M, Katakura T, Urata H, Kojima T, Nakata O, Hashimoto S.)

(3) 2011年7月 *FEBS Letters* Vol. 585, No.14, pp2217–22220

“Cellular DBP and E4BP4 proteins are critical for determining the period length of the circadian oscillator.”

(Yamajuku D, Shibata Y, Kitazawa M, Katakura T, Urata H, Kojima T, Takayasu S, Nakata O, Hashimoto S.)

(4) 2012年6月 *Scientific Reports* Vol. 2, No.439, pp1–10

“Real-time monitoring in three-dimensional hepatocytes reveals that insulin acts as a synchronizer for liver clock.”

(Yamajuku D, Inagaki T, Haruma T, Okubo S, Kataoka Y, Kobayashi S, Ikegami K, Laurent T, Kojima T, Noutomi K, Hashimoto S, Oda H.)