

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2006～2009

課題番号：18300228

研究課題名 (和文) 日周リズムの変調による生活習慣病の発症機構

研究課題名 (英文) Etiological mechanism of lifestyle-related diseases caused by disordered daily rhythms

研究代表者

氏名 (ローマ字)：瀧口 正樹 (TAKIGUCHI MASAKI)

所属機関・部局・職：千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：40179578

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学，応用健康科学

キーワード：生活習慣病

1. 研究計画の概要

糖尿病，循環器疾患，がん等の生活習慣病は我が国を初め先進諸国において，死亡原因の上位を占め，その克服が大きな課題である。生命活動の日周リズムは，一日の明暗サイクルを基盤にして，睡眠-覚醒，食事時間等の基本的な生活習慣の影響によって形成される。従って，生活習慣病の発症にあたっては日周リズムが深く関与しているものと予想され，事実，心筋梗塞の多発時間帯の存在，夜勤による乳がん発症リスクの増加等の例が知られている。日周リズムの変調による生活習慣病の発症機構の研究にあたっては動物実験モデルの確立が急務である。本研究は，マウスにおいて，明暗サイクルおよび摂食時間の変調が肥満等に及ぼす影響を明らかにし，生活習慣病発症のモデル系を確立するとともに，発症機構を解明することを目的とする。

2. 研究の進捗状況

(1) 脂質合成を統御する転写調節因子 SREBP-1 遺伝子の肝臓における発現の日周リズム—SREBP-1 は脂質合成系遺伝子群を統御する転写因子であり，以前，その発現がマウス肝臓において明瞭な日周リズムを示すことを明らかにした。また，その日周リズムの形成，変調においては，明暗サイクルと摂食絶食サイクル (給餌タイミング) の両者の影響を受けること，すなわち，一日 (24 時間明暗サイクル) の中の“何時”摂食するかが，重要であることを明らかにした。今回，高炭水化物食，高脂肪食，高タンパク質食摂取が SREBP-1 mRNA レベルの日周リズムに及ぼす影響を調べたところ，通常食では 12

時間：12 時間明暗サイクルの暗期 (摂食期) 初期にピークを示すのに対し，他の変異食ではいずれも明期 (絶食期) にピークが移動した。すなわち，“何を”摂食するかが SREBP-1 遺伝子発現リズムの形成に重要であるかが明らかになった。

(2) オルニチンサイクル酵素遺伝子発現の日周リズム—肝臓における 3 大栄養素のうち糖質，脂質についての摂食/絶食リズムとの関係は比較的理解しやすく，解糖と脂質合成は摂食時に活性化され，糖新生は絶食時に活性化される。一方，タンパク質については，例えばアミノ酸に由来するアンモニアを尿素に変換して解毒するオルニチンサイクルは，摂食期のみならず，体タンパク質分解の起こる絶食期にも亢進すると予想され，その日周リズムの形成機構は極めて興味深い。今回，オルニチンサイクルの 5 種類の酵素遺伝子群についてその mRNA レベルの日周リズムを調べた。通常食では，多くの酵素遺伝子は明瞭な発現リズムを示さなかった。一方，高タンパク質食では，2，3，4，5 番目の酵素 mRNA レベルは暗期 (摂食期) を中心にピークを有する日周リズムを示した。また，低タンパク質食 (高炭水化物食) では，1，3，4 番目の酵素 mRNA レベルは明期 (絶食期) 後期から暗期 (摂食期) 初期にかけてピークを有する日周リズムを示した。従って，同酵素遺伝子群の発現は日周性の制御下にあることが示され，アミノ酸分解に由来するアンモニアを処理する必要性から，摂食期，絶食期ともに活性化されるものと考えられた。

(3) セクレトグラニン II 遺伝子ノックアウトマウスのリズム異常の解析：セクレトグラニン II 遺伝子はセクレトニューリン等の

生理活性ペプチドの前駆体をコードする遺伝子であり、概日時計の中核である視床下部視交叉上核をはじめ中枢神経系の限局された領域に発現が見られるが、その生物学的役割はほとんど未解明であった。今回、セクレトグラニン II 遺伝子の標的破壊マウスを世界に先駆けて作出した。マウスを 12 時間：12 時間の明暗サイクル条件下にて飼育し活動量に 24 時間周期の日周リズムが見られることを確認した後、恒明条件に移すと、野生型あるいはヘテロ接合型マウスは約 25 時間周期の概日リズムを示すのに対し、セクレトグラニン II 破壊マウスは約 26 時間周期のリズムを示すことを明らかにした。

3. 現在までの達成度

①当初の計画以上に進展している。

(理由)

オルニチンサイクル酵素遺伝子群の発現が日周性の制御下にあり、摂食期、絶食期ともに活性化されることを証明することは困難が予想されたが、これを明瞭に示すことができた。また、幸運にも、セクレトグラニン II 遺伝子ノックアウトマウスの活動量が恒明条件下で 26 時間周期の概日リズムを示すことを発見した。

4. 今後の研究の推進方策

(1) マウス肝臓におけるオルニチンサイクル酵素遺伝子発現の日周リズムの解析：これまでに、オルニチンサイクル酵素遺伝子群の発現が日周性の制御下にあり、特に、高タンパク質食により同酵素群 mRNA レベルが摂食期に著しく上昇することを明らかにした。この遺伝子活性化は、特定の血中アミノ酸レベルの上昇により惹起されている可能性があり、その検討を行う。高タンパク質食摂食 1 週間目の 1 日の 4 時間ごとにマウス下大静脈より採血し、アミノ酸分析により各アミノ酸レベルの日周リズムを調べる。また、マウス初代培養肝細胞に候補アミノ酸を作用させ、オルニチンサイクル酵素 mRNA レベルに対する効果を調べる。

(2) セクレトグラニン II 遺伝子ノックアウトマウスのリズム異常の解析：これまでに、恒明条件下で、野生型あるいはヘテロ接合型マウスの活動量は約 25 時間周期の概日リズムを示すのに対し、セクレトグラニン II 破壊マウスでは約 26 時間周期のリズムが見られることを明らかにした。今後、まず、各遺伝子型間で、恒暗条件下でも行動量の概日リズムに周期長、振幅等の差異が見られるか否かを検討する。さらに、明暗周期を 8 時間ほど前後に移した際に見られる行動リズム位相の再設定 (リセット) に要する日数に差異が見られるか否かを調べ、光同調性の異常を検討する。

5. 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 16 件)

- ① Ishihara, A., Matsumoto, E., Horikawa, K., Kudo, T., Sakao, E., Nemoto, A., Iwase, K., Sugiyama, H., Tamura, Y., Shibata, S., and Takiguchi, M. Multifactorial regulation of daily rhythms in expression of the metabolically responsive gene Spot14 in the mouse liver. *J. Biol. Rhythms* **22**, 324-334 (2007) 査読有
- ② Adachi-Uehara, N., Kato, M., Nimura, Y., Seki, N., Ishihara, A., Matsumoto, E., Iwase, K., Ohtsuka, S., Kodama, H., Mizota, A., Yamamoto, S., Adachi-Usami, E., and Takiguchi, M. Up-regulation of genes for oxidative phosphorylation and protein turnover in diabetic mouse retina. *Exp. Eye Res.* **83**, 849-857 (2006) 査読有

[学会発表] (計 10 件)

- ① 松本絵里子, マウス肝臓における **SREBP-1c** 遺伝子発現の概日時計と栄養要因による制御, 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会, 2008.12.11, 神戸
- ② 玉井咲貴, マウス肝臓におけるオルニチンサイクル酵素遺伝子発現の日周リズム, 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会, 2008.12.11, 神戸
- ③ 松本絵里子, マウス肝臓における代謝応答性 **Spot14** 遺伝子の発現の日周リズムに見られる多因子制御, 第 80 回日本生化学会大会・第 30 回日本分子生物学会年会合同大会, 2007.12.11, 横浜

[産業財産権]

○取得状況 (計 1 件)

名称: 微量 mRNA 及び cDNA の増幅方法

発明者: 滝口正樹

権利者: 独立行政法人科学技術振興機構

種類: 特許

番号: 特許第 3853161 号

取得年月日: 平成 18 年 9 月 15 日

国内外の別: 国内