

平成 22 年 3 月 31 日現在

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
 瀧口 正樹（TAKIGUCHI MASAKI）
 千葉大学・大学院医学研究院・教授
 研究者番号：40179578

研究成果の概要（和文）：脂質合成を統御する転写調節因子 sterol regulatory element-binding protein-1（SREBP-1）遺伝子のマウス肝臓における発現は、通常食では一日の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、高炭水化物食、高脂肪食、高タンパク質食では明期（絶食期）にピークを示し、日周リズム形成における栄養組成の重要性が示された。また、アンモニア解毒系のオルニチンサイクル酵素遺伝子群の発現は、高タンパク質食では摂食期を中心に、低タンパク質食（高炭水化物食）では絶食期後期から摂食期初期にかけてピークを有する日周リズムを示し、アミノ酸分解に由来するアンモニアを処理する必要性により摂食期、絶食期ともに活性化されるものと考えられた。

研究成果の概要（英文）：Expression of the gene for sterol regulatory element-binding protein-1 (SREBP-1), a transcription factor pivotal in lipid biosynthesis, achieved a peak in the dark feeding period of the daily light/dark cycle in the liver of mice fed with a standard diet, and a peak in the light fasting period with high-carbohydrate, high-fat, and high-protein diets, underlining the importance of nutrients in shaping the daily rhythm. Expression of genes for the ornithine cycle, an enzyme system for ammonia detoxification, achieved a peak in the feeding period with a high-protein diet, and a peak in the late fasting to early feeding periods with a low-protein (high-carbohydrate) diet, suggesting activation of the expression both in the feeding and fasting periods because of requirement for detoxifying ammonia derived from amino acid degradation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2007年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2008年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2009年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
総計	15,400,000	4,620,000	20,020,000

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. 研究開始当初の背景

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。

近年、概日リズム（約1日〔24時間〕周期の生物内在性リズム）の発振機構として、転写調節因子 Per および Cry の自己抑制性フィードバックループが中心的分子機構をなすことが明らかにされるなど、生物時計の解明が飛躍的に進んだ。従って、日周リズムの変調による生活習慣病発症の機構究明に向けて機が熟したといえるが、その動物実験モデル系は必ずしも多くない。申請者らは、脂質合成系酵素遺伝子群の中心的な転写活性化因子である sterol regulatory element binding protein-1（SREBP-1）の肝臓における発現が強い日周リズムを示すことを初めて明らかにした。さらに、この SREBP-1 に加え、やはり脂質合成系遺伝子群を制御する Spot14 の遺伝子が、明暗サイクルに同調する概日時計、摂食に同調する概日時計と食餌栄養による調節を受けることを明らかにした。12 時間：12 時間の明暗サイクル、自由摂食条件下では、これらの作用は同期し、SREBP-1 と Spot14 の mRNA レベルは、マウスが摂食を開始する暗期の前半に顕著なピークを有する明瞭なリズムを示した。これに対し、明暗サイクル、摂食時期を変化させると、これらのリズムに変調が見られた。最も端的なケースとして、6 時間：18 時間の短日周期条件では SREBP-1 mRNA レベルのリズムが著しく平坦化した。また、12 時間：12 時間の明暗サイクルの暗期の中央 4 時間のみ給餌を行なう制限摂食条件下では、Spot14 のリズムが著しく減衰した。これらの結果は、明暗サイクル、摂食時間帯の変調により、脂質合成等の攪乱を来す可能性を示唆するものであり、今後、その検証を行なう。

2. 研究の目的

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、摂食時間、栄養素等の変調が代謝系遺伝子の発現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。

3. 研究の方法

マウスの飼育条件として、12 時間：12 時間の明暗サイクル下に通常食を自由摂食させた場合に比べ、恒明、恒暗、短日条件、長日条件等種々の明暗サイクルや、明期あるいは暗期に限局した時間制限給餌条件下、さらには各種栄養組成配合食にて飼育し、放出赤外線検出により行動量と餌箱天秤自動連続

計測により摂食量の日周リズムをモニターした。また、4 時間ごとに肝臓を採取し、Rev-erb α 、Dbp 等の時計遺伝子、SREBP-1、Spot14、糖新生律速酵素 PEPCK、アンモニア解毒系のオルニチンサイクル酵素等の mRNA レベルのリズム変化をノザン法により検討した。

4. 研究成果

(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。一方、これらの変異食が Rev-erb α 、Dbp 等の時計遺伝子の日周発現リズムに及ぼす影響は比較的僅少であり、栄養素の SREBP-1 遺伝子発現リズムに対する効果は生物時計よりも代謝調節系の制御をより強く反映するものと考えられた。

(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、糖新生律速酵素 PEPCK mRNA レベルが明期（絶食期）後期に、脂質合成系制御因子 Spot14 ならびに SREBP-1 mRNA レベルが暗期（摂食期）前半にピークを有する日周リズムを示したのに対し、多くのオルニチンサイクル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行動量に 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。同破壊マウス群には他にも行動量の明期/暗期比に増加を示す等, 行動の日周リズムに異常を示す個体が散見され, 今後, その機構の詳細な解析を行う予定である。

5. 主な発表論文等

(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 25 件)

- ① Shinmen, N., Koshida, T., Kumazawa, T., Sato, K., Shimada, H., Matsutani, T., Iwadate, Y., Takiguchi, M., and Hiwasa, T. Activation of NFAT signal by p53-K120R mutant. *FEBS Lett.* **583**, 1916-1922 (2009) 査読有
- ② Sugiyama, H., Kumamoto, T., Suganami, A., Nakanishi, W., Sowa, Y., Takiguchi, M., Ishikawa, T., and Tamura, Y. Insight into estrogenicity of phytoestrogens using in silico simulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **379**, 139-144 (2009) 査読有
- ③ Tomizawa, M., Toyama, Y., Ito, C., Toshimori, K., Iwase, K., Takiguchi, M., Saisho, H., and Yokosuka, O. Hepatoblast-like cells enriched from mouse embryonic stem cells in medium without glucose, pyruvate, arginine, and tyrosine. *Cell Tissue Res.* **333**, 17-27 (2008) 査読有
- ④ Moriya, S., Takiguchi, M., and Seki, N. Expression of the WT1 gene -KTS domain isoforms suppresses the invasive ability of human lung squamous cell carcinoma cells. *Int. J. Oncol.* **32**, 349-356 (2008) 査読有
- ⑤ 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
- ⑥ Kai, N., Iwase, K., Imai, K., Nakahira, E., Soma, M., Ohtsuka, S., Yagi, T., Kobayashi, K., Koga, H., Takiguchi, M., and Yuasa, S. Altered gene expression in the subdivisions of the amygdala of Fyn-deficient mice as revealed by laser capture microdissection and mKIAA cDNA array analysis. *Brain Res.* **1073-1074**, 60-70 (2006) 査読有
- ⑦ 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
- ⑧ Liu, T.L., Shimada, H., Ochiai, T., Shiratori, T., Lin, S.E., Kitagawa, M., Harigaya, K., Maki, M., Oka, M., Abe, T., Takiguchi, M., and Hiwasa, T. Enhancement of chemosensitivity toward peplomycin by calpastatin-stabilized NF-kappaB p65 in esophageal carcinoma cells: possible involvement of Fas/Fas-L synergism. *Apoptosis* **11**, 1025-1037 (2006) 査読有
- ⑨ Osawa, A., Kato, M., Matsumoto, E., Iwase, K., Sugimoto, T., Matsui, T., Ishikura, H., Sugano, S., Kurosawa, H., Takiguchi, M., and Seki, N. Activation of genes for growth factor and cytokine pathways late in chondrogenic differentiation of ATDC5 cells. *Genomics* **88**, 52-64 (2006) 査読有
- ⑩ Tonouchi, A., Ohtsuka, M., Ito, H., Kimura, F., Shimizu, H., Kato, M., Nimura, Y., Iwase, K., Hiwasa, T., Seki, N., Takiguchi, M., and Miyazaki, M. Relationship between pancreatic secretory trypsin inhibitor and early recurrence of intrahepatic

cholangiocarcinoma following surgical resection. *Am. J. Gastroenterol.* **101**, 1601-1610 (2006) 査読有

[学会発表] (計 20 件)

- ① 岩瀬克郎, Ca^{2+} およびcAMPによるセクレトグラニンII遺伝子の協調的発現制御の解析, 第32回日本分子生物学会年会, 2009. 12. 12, 横浜
- ② 松本絵里子, マウス肝臓におけるオルニチンサイクル酵素遺伝子の日周発現リズムの調節機構, 2009. 12. 10, 横浜
- ③ 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
- ④ 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
- ⑤ 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
- ⑥ 吉村俊太郎, cAMP response element binding protein(CREB)Ser133の脱リン酸化機構の解析, 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. 10, 横浜
- ⑦ 根本あや子, マウス視交叉上核において光刺激によって制御される遺伝子の解析, 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
- ⑧ Matsumoto, E. Daily rhythm of SREBP gene expression in the mouse liver. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, 2006. 6. 21, Kyoto
- ⑨ Iwase, K. Regulation of secretoneurin gene expression by neurotransmitter. 20 th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, 2006. 6. 20, Kyoto

[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: 瀧口 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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

瀧口 正樹 (TAKIGUCHI MASAKI)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号: 40179578

(2) 研究分担者

日和佐 隆樹 (HIWASA TAKAKI)

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号: 30260251

田村 裕 (TAMURA YUTAKA)

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号: 50263174

岩瀬 克郎 (IWASE KATURO)

千葉大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号: 80322030

松本 絵里子 (MATUMOTO ERIKO)

千葉大学・大学院医学研究院・技術職員

研究者番号: 20422256