

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293048

研究課題名(和文)概日リズムによる肥満予防の基盤解析

研究課題名(英文)Circadian transcriptome analysis for protection against obesity development

研究代表者

小池 宣也 (Koike, Nobuya)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：00399685

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類の概日時計形成の分子基盤は時計遺伝子発現の転写翻訳フィードバックループであり、概日リズムの乱れは肥満などのメタボリックシンドローム発症と関連する。本研究では、高脂肪食投与によるマウスの食事誘導性肥満モデルを用いて、概日リズムの転写振動を増強することが代謝疾患改善に有効であることを示した。また、摂食タイミングの変化によって組織特異的な概日遺伝子発現ネットワークの攪乱が起きており、脂肪酸代謝関連遺伝子群の発現変化が肥満形成に関与することが予想された。

研究成果の概要(英文)：In mammals, the circadian clock is cell autonomous and comprised of an autoregulatory transcriptional and translational feedback loop composed of several clock genes and their protein products. A growing body of evidence revealed a close link between the circadian clock and metabolism. In this study, using a mouse model of diet-induced obesity, we revealed that enhancement of circadian clock oscillation renders protection against metabolic syndrome. Daily restricted feeding caused disturbance of circadian transcriptional networks in a tissue specific manner. The genes involved in lipid metabolism were enriched in the differentially expressed genes between daytime and nighttime food restriction, suggesting that they may contribute to obesity.

研究分野：時間生物学、分子生物学

キーワード：概日リズム トランスクリプトーム メタボリズム 時計遺伝子

1. 研究開始当初の背景

概日リズムは一日の時間を予測し、明暗サイクルなどの外部環境に合わせて生体の代謝やホルモン分泌などの生理活動を調整している。哺乳類の概日時計形成の分子基盤は時計遺伝子発現の転写翻訳フィードバックループであり、中心となる遺伝子発現のフィードバックループでは、CLOCK (又は NPAS2) と BMAL1 が転写活性化因子として、*Per* (*Per1* と *Per2*)、*Cry* (*Cry1* と *Cry2*) の発現を誘導し、その後 PER、CRY タンパク質が転写抑制因子として機能し自らの転写を抑制するというネガティブフィードバックループを形成している (図1)。我々は、クロマチン免疫沈降と次世代シーケンサーを用いた ChIP-seq によるシストローム解析および RNA-seq によるトランスクリプトーム解析によって、マウス肝臓の概日転写サイクルにおけるクロマチンリモデリングの詳細を明らかにしてきた (図2)。概日リズムの乱れは肥満などのメタボリックシンドローム発症と関連する。例えば、長周期の行動リズムを持つ *Clock* 変異マウスでは肥満、高脂血症、脂肪肝、糖尿病が観察される。また、無周期性を示す *Bmal1* 欠損マウスでも耐糖能の低下、インスリン感受性の増加などがみられる。さらには、遺伝子変異による概日リズムの障害だけでなく、食事のタイミングが肥満、糖尿病などのメタボリックシンドローム発症に関連することも示されている。高脂肪食をマウスに与えると昼夜関係なく食べるようになり、肥満、高インスリン血症、脂肪肝が観察される。また、マウスの非活動期である明期のみを高脂肪食を与えても肥満となる。一方で、活動期の暗期のみを高脂肪食を給餌した場合には同じ量を食べているにも関わらず肥満、糖尿病などを発症しない。これらの結果は、何を食べるかだけでなく、いつ食べるかも肥満予防に重要であることを示している。

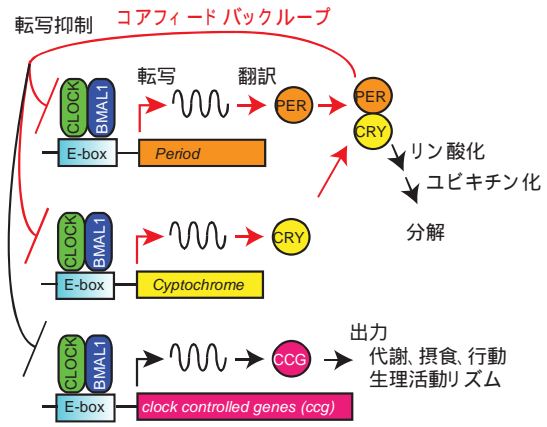


図1 .時計遺伝子による転写翻訳フィードバックループ

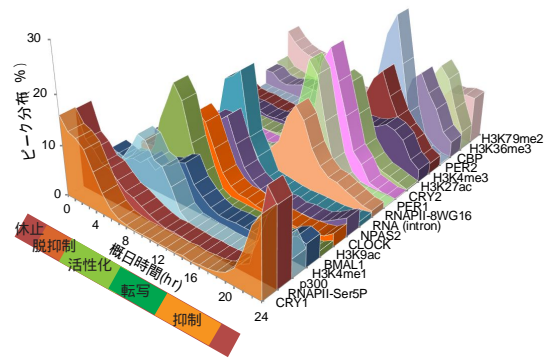


図2 .概日転写のクロマチンランドスケープ

2. 研究の目的

代謝関連遺伝子などを含めて肝臓では発現している遺伝子の約 10% に発現概日リズムがみられるが、概日リズム障害や摂食時間等の概日リズム攪乱とメタボリックシンドローム発症に関連する分子メカニズムは明確になっていない。そこで本研究では、高脂肪食投与によるマウスの食事誘導性肥満モデルを用いて概日リズム障害による代謝、遺伝子発現変化や、摂食時間の違いによっておきる遺伝子発現、エピジェネティック変化を解析し、概日リズムによる肥満形成と予防の分子基盤に迫る。

3. 研究の方法

本研究では、(1)高脂肪食誘導性肥満モデル系を用い概日リズムの障害による体重、耐糖能、行動リズム、遺伝子発現等を解析する。また、摂食タイミングの違いに起因した概日リズムの攪乱による影響を調べるため、制限給餌によりマウスが餌を食べられる時間を限定し、(2)給餌タイミングによる、遺伝子

発現とエピジェネティックな変化を解析する。

4. 研究成果

(1)高脂肪食誘導性肥満モデルを用いた解析

テキサス大学の Zheng Chen 准教授らとの共同研究で以下の点を明らかにした。ヒトでは時計遺伝子のノックアウトマウスのように完全に概日リズムが消失するようなケースは極まれであり、多くは部分的な概日リズムの障害が問題となるため、長周期性と概日リズムの振幅低下を示す *Clock* 変異マウスのヘテロ接合体を部分的な概日リズムの障害モデルとして用いた。*Clock* 変異マウスのヘテロ接合体では高脂肪食給餌による血糖調節能が野生型と比べて改善しており、概日周期延長が抑制され、肝臓の BMAL1 発現の増加がみられた。阻害剤を用いた解析から、CLOCK 変異タンパク質がプロテアソーム及びオートファジーによる BMAL1 の分解を抑制することを明らかにし、その結果増加した BMAL1 がインスリンシグナルを活性化し血糖調節能が改善したと考えられた。トランスクリプトーム解析の結果 *Clock* ヘテロ接合体では代謝関連遺伝子群の転写再構成が起きており、概日リズムと代謝ネットワークの予期せぬ可塑性が明らかになった (Jeong ら 2015)。

また、時計遺伝子 *Per2* の発振動を増強させる作用のある天然フラボノイド、ノビレチンを食事誘導性肥満マウスに投与すると、メタボリックシンドロームが改善しエネルギー消費量活動量が増大した。食事誘導性肥満マウスの肝臓でノビレチンは時計タンパク質の発現量を増加させており、トランスクリプトーム解析の結果、代謝関連遺伝子群の発現ネットワークの再構成が起きていることが明らかになった。さらに、ノビレチンの結合標的としてレチノイン酸受容体関連オーファン受容体を同定し、概日時計の転写振動を増強する薬理的介入が代謝疾患改善に

有効であることを示した(He ら 2016)。ノビレチン給餌では、血中アンモニア濃度の低下も観察され、高脂肪食給餌によって低下した尿素回路の律速酵素である *Cps1* の肝臓での発現が回復していた。プロモーター解析の結果 *Cps1* の発現は *Cebpa*, *Cebpb* 転写因子により制御されており、*Cps1* の発現は概日リズムを示すことを明らかにした(Nohara ら 2015)。

(2)給餌タイミングによる遺伝子発現とエピジェネティック変化の解析

時計遺伝子 *Bmal1*, *Clock*, *Per1*, *Per2*, *Cry1*, *Cry2* はいずれも自由摂食下のマウス肝臓では約 24 時間周期の発現リズムを示しており、*Per1*, *Per2*, *Cry2* が CT8~12 (夕方) にピークを迎え、*Bmal1*, *Clock*, *Cry1* は CT20 から CT0 (明け方) にピークとなる。マウスに昼 4 時間の制限給餌を 1 週間行い肝臓での遺伝子発現を解析したところ、制限給餌下でも同様に時計遺伝子は約 24 時間周期の発現リズムを示したが、その発現位相はいずれも約 4~8 時間前進していた。また、肝臓で RNA 発現が強く振動することが知られている *Dbp* 遺伝子についても、自由摂食下では CT8 をピークとする発現の概日リズムを示し、制限給餌では約 4 時間位相前進していた。クロマチン免疫沈降でマウス肝臓における BMAL1 タンパク質の DNA 結合リズムを調べたところ、自由摂食下では、*Per1*, *Per2*, *Dbp* 遺伝子のプロモーターで CT8 をピークとする結合リズムが観察された。制限給餌下においても BMAL1 結合の概日リズムが観察されたが、その位相は RNA 発現と同様に約 4~8 時間前進していた。これらのことから、昼間の制限給餌により食事のタイミングを約 8 時間前進することで、肝臓における BMAL1 タンパク質のクロマチン結合が RNA 発現リズムの位相と相関して変化することが明らかになった。

また、高脂肪食制限給餌 1 週間後のマウス肝臓、脂肪及び筋肉組織のトランスクリプト

ーム解析から摂食タイミングに起因する肥満形成初期に変動する遺伝子の網羅的スクリーニングを行った。その結果、脂肪細胞分化や脂肪生成に重要な転写因子である *Cebpb* や *Pparg* や褐色脂肪細胞における熱産生に関わる *Ucp1* の発現にはいずれも大きな変化は観察されなかった。*Bmal1*, *Per1*, *Per2* などの時計遺伝子発現は褐色脂肪細胞と骨格筋においてはほとんど変化していなかったが、肝臓及び白色脂肪細胞では発現位相や振幅の変化が観察された。これらのことから、高脂肪食の摂食時間の違いによって組織特異的な遺伝子発現ネットワークの攪乱が起きると考えられた。さらに、明期と暗期の制限給餌によって発現が大きく変化する遺伝子を肝臓及び白色脂肪細胞でそれぞれ約 50 遺伝子同定した。これらの中には脂質消化吸収や脂肪酸代謝に関わる遺伝子が高く濃縮されていたことから、肥満形成に関与していることが予想された。

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 3 件)

1. Baokun He, Kazunari Nohara, Noheon Park, Yong-Sung Park, Bobby Guillory, Zhaoyang Zhao, Jose M. Garcia, Nobuya Koike, Cheng Chi Lee, Joseph S. Takahashi, Seung-Hee Yoo and Zheng Chen. The Small Molecule Nobiletin Targets the Molecular Oscillator to Enhance Circadian Rhythms and Protect against Metabolic Syndrome. *Cell Metab.* 23: 610-621, 2016. 査読有
2. Kwon Jeong, Baokun He, Kazunari Nohara, Noheon Park, Youngmin Shin, Seonghwa Kim, Kazuhiro Shimomura, Nobuya Koike,

Seung-Hee Yoo, and Zheng Chen. Dual attenuation of proteasomal and autophagic BMAL1 degradation in *Clock*^{19/+} mice contributes to improved glucose homeostasis. *Sci Rep.* 5:12801. 2015. 査読有

3. Kazunari Nohara, Youngmin Shin, Noheon Park, Kwon Jeong, Baokun He, Nobuya Koike, Seung-Hee Yoo, and Zheng Chen. Ammonia-lowering activities and carbamoyl phosphate synthetase 1 (Cps1) induction mechanism of a natural flavonoid. *Nutr Metab (Lond).* 12: 23. 2015. 査読有

[学会発表](計 1 件)

1. 小池宣也, 概日転写サイクルとクロマチンランドスケープ、第 38 回日本分子生物学会年会、2015 年 12 月 4 日、神戸

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小池 宣也 (Nobuya Koike)

京都府府立医科大学・医学研究科・講師

研究者番号：00399685

(2) 研究協力者

Zheng Chen

The University of Texas Health Science

Center at Houston, Department of

Biochemistry & Molecular Biology,

Associate Professor