

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590226
 研究課題名 (和文) 時計遺伝子 DEC1 および DEC2 のコレステロール代謝酵素のリズム発現調節機構

研究課題名 (英文) Regulatory mechanism of rhythmic expression of cholesterol metabolizing enzymes by clock-related gene DEC1 and DEC2

研究代表者

能城 光秀 (NOSHIRO MITSUhide)
 広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授
 研究者番号：00144858

研究成果の概要：時計遺伝子 DEC1, DEC2 は中枢のみでなく、末梢組織でリズムを持つ発現をしていた。これらの発現は時計遺伝子 CLOCK の変異体では大きく影響を受けており、時計機構における CLOCK の重要性を示した。コレステロール代謝に重要な酵素である CYP7A の遺伝子のリズム発現は複数の時計遺伝子などの促進的あるいは抑制的調節によることが明らかとなった。また Dec1 遺伝子の調節機構において、ステロールに結合することで活性化される LXR が促進的に調節していることを見だし、分子時計機構と脂質代謝経路との関わりを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・環境生理学 (含体力医学・栄養生理学)

キーワード：時計遺伝子、概日リズム、コレステロール、Cyp7a, Dec1, Dec2,

1. 研究開始当初の背景

(1) 動物の概日リズム調節機構の分子レベルでの研究は複数の時計遺伝子群 (Clock, Bmal1, Per, Cry, DEC など) の解析により、この数年で著しく進展している。我々が単離

した bHLH 型転写因子 DEC1 と DEC2 は、共に生物時計の中枢とされる視交叉上核でリズム発現を示し、時計遺伝子群により形成される分子時計機構の新たな構成因子であることを明らかにした。

(2) 時計遺伝子は視交叉上核以外にも肝臓など各組織で発現しており、各臓器で発現している遺伝子の 5-10%程度は有意な概日リズムを持つことが知られており、生物のリズム的な生理に寄与しているものと思われる。

(3) その中には脂質代謝酵素や糖代謝酵素などが含まれ、時計遺伝子の末梢臓器での代謝酵素のリズム調節因子としての役割も示唆されている。

2. 研究の目的

(1) 本研究はリズムを伴う代謝酵素の遺伝子転写調節における DEC1、DEC2 やその他の時計遺伝子の調節因子としての役割を明らかにすることを目的とする。

(2) これら時計遺伝子の肝臓などにおける標的遺伝子と思われるコレステロール代謝酵素の遺伝子 (CYP7A, CYP8B, CYP51, HMG CoA reductase) のリズム発現調節機構への DEC およびその他の調節因子の関与を解析することにより、脂質代謝や糖代謝酵素系が関与するメタボリックシンドロームなどにおける時計遺伝子の持つ意義を明らかにすることを目指した。

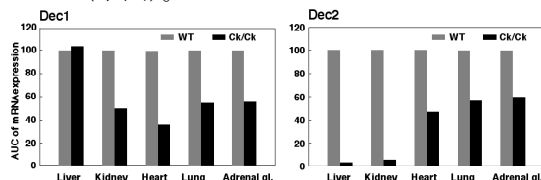
3. 研究の方法

(1) マウスの肝臓などの末梢組織でのDEC1、DEC2発現をmRNAレベルで解析した。標的遺伝子として CYP7A, CYP8B, CYP51, HMG CoA reductaseなどの概日リズムを示すことが知られている代謝酵素遺伝子を取り上げてその発現様式や発現量を解析した。

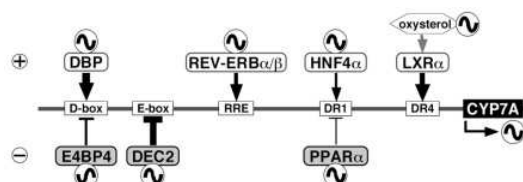
(2) コレステロール代謝酵素遺伝子のプロモーターを用いて、ヒトHepG2またはマウスHepal1c7などの細胞株系でのルシフェラーゼレポーター解析によるDEC1, DEC2及びその他の時計遺伝子の関与を検討した。

4. 研究成果

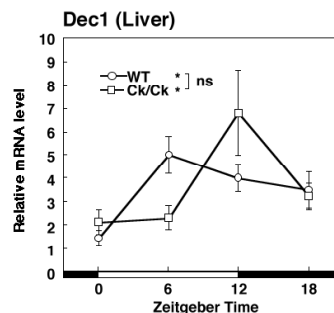
(1) DEC1, DEC2は中枢のみでなく、肝臓やその他の末梢組織においてリズムを持つ発現をしていた。これらの発現様式は時計遺伝子CLOCKの変異体(Ck/Ck)では大きく影響を受けており、時計機構におけるCLOCKの重要性を示した (下図)。



(2) コレステロールからの胆汁酸合成の調節酵素として重要なCYP7AのプロモーターはDBP, REV-ERBa/b, HNF4aなどによって促進的に、DEC2, E4BP4, PPARaなどによって抑制的に調節され、リズム性を持つ発現をすることが明らかとなった。しかし、CLOCK変異体におけるCYP7Aの発現の振幅は小さくなるもののリズムは維持されていた。このリズムはステロールをリガンドとする核内受容体LXRなどによって維持されていることが明らかとなった (下図)。



(3) 肝臓のDec1発現もCLOCK変異体における発現の位相は、ずれながらもリズムは維持されていた (下図)。



この現象を説明するために、Dec1プロモーターに対する核内受容体の調節機構を解析し、CLOCK:BMALヘテロダイマーに加えてLXRが促

進的にDec1を調節していることを見だし、時計機構と脂質代謝経路との関わりを明らかにした。

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 5 件)

- ①. Noshiro, M., Usui, E., Kawamoto, T., Sato, F., Nakashima, A., Ueshima, T., Honda, K., Fujimoto, K., Honma, S., Honma, K., *et al.* (2009). Liver X receptors (LXRalpha and LXRbeta) are potent regulators for hepatic Dec1 expression. *Genes Cells* 14, 29-40. (査読有り)
- ②. Sato, F., Bhawal, U.K., Kawamoto, T., Fujimoto, K., Imaizumi, T., Imanaka, T., Kondo, J., Koyanagi, S., Noshiro, M., Yoshida, H., *et al.* (2008). Basic-helix-loop-helix (bHLH) transcription factor DEC2 negatively regulates vascular endothelial growth factor expression. *Genes Cells* 13, 131-144. (査読有り)
- ③. Nakashima, A., Kawamoto, T., Honda, K.K., Ueshima, T., Noshiro, M., Iwata, T., Fujimoto, K., Kubo, H., Honma, S., Yorioka, N., *et al.* (2008). DEC1 modulates the circadian phase of clock gene expression. *Molecular and cellular biology* 28, 4080-4092 (査読有り)
- ④. Noshiro, M., Usui, E., Kawamoto, T., Kubo, H., Fujimoto, K., Furukawa, M., Honma, S., Makishima, M., Honma, K., and Kato, Y. (2007). Multiple mechanisms regulate circadian

expression of the gene for cholesterol 7alpha-hydroxylase (Cyp7a), a key enzyme in hepatic bile acid biosynthesis. *J Biol Rhythms* 22, 299-311. (査読有り)

- ⑤. Fujimoto, K., Hamaguchi, H., Hashiba, T., Nakamura, T., Kawamoto, T., Sato, F., Noshiro, M., Bhawal, U.K., Suardita, K., and Kato, Y. (2007). Transcriptional repression by the basic helix-loop-helix protein Dec2: Multiple mechanisms through E-box elements. *Int J Mol Med* 19, 925-932. (査読有り)

[学会発表] (計 14 件)

- ①. Ueshima T, Kawamoto K, Honda K, Noshiro M, Fujimoto K, Gotoh O, and Kato Y. Novel clock-responsive elements and transcription factors involved in chondrocyte differentiation. International Workshop on BioDental Education & Research 平成 21 年 2 月 7-8 日 広島市
- ②. bHLH 型転写因子 DEC は概日リズムの位相調節に関与する: 河本健、中島歩、本田清昌、上嶋太一、能城光秀、藤本勝巳、本間さと、加藤幸夫: 第 31 回日本分子生物学会年会 第 81 回日本生化学会合同大会 平成 20 年 12 月 9~12 日 神戸市
- ③. DEC は核内受容体のコリプレッサーとして機能する: 長克武、能城光秀、加藤幸夫、河本健、藤本勝巳、榎島誠: 第 31 回日本分子生物学会年会 第 81 回日本生化学会合同大会 平成 20 年 12 月 9~12 日 神戸市
- ④. bHLH 型転写因子 DEC1 は概日リズム遺伝

- 子の位相を調節する：河本健、中島歩、本田清昌、上島太一、藤本勝巳、能城光秀、加藤幸夫：第 18 回中国・四国骨代謝研究会 平成 20 年 7 月 12 日 岡山市
- ⑤. ラット成長板軟骨における核内受容体の発現様式と機能の解析：尾崎徳継、能城光秀、本田清昌、林原久美子、河本健、藤本勝巳、丹根一夫、加藤幸夫：第 21 回日本軟骨代謝学会 平成 20 年 3 月 21-22 日 京都市
- ⑥. 軟骨細胞分化の概日リズムを制御する新規時間制御配列の探索と、そこに関する転写因子の同定：上嶋太一、河本健、本田清昌、能城光秀、藤本勝巳、後藤修、加藤幸夫：第 21 回日本軟骨代謝学会 平成 20 年 3 月 21-22 日 京都市
- ⑦. 明暗条件は永久軟骨の成長・代謝を制御する：本田清昌、河本健、中島歩、上嶋太一、藤本勝巳、西村正宏、能城光秀、加藤幸夫：第 21 回日本軟骨代謝学会 平成 20 年 3 月 21-22 日 京都市
- ⑧. The liver X receptors (LXRa and LXRb) are potent regulators for hepatic Dec1 expression. Noshiro, M., 2nd World Congress of Chronobiology, 2007, 11, 4, Tokyo
- ⑨. The liver X receptors (LXRa and LXRb) are potent regulators for hepatic Dec1 expression : Noshiro M., Usui E., Kawamoto T., Sato F., Nakashima A., Furukawa M., Ueshima T., Honda K., Fujimoto K., Honma S., Honma K., Kato Y. : 2nd World Congress of Chronobiology 平成 19 年 11 月 4-6 日 東京都
- ⑩. DEC1 modulates circadian phase of clock gene expression : Nakashima A., Kawamoto T., Honda K., Ueshima T., Noshiro M., Fujimoto K., Kubo H., Kato Y. : 2nd World Congress of

Chronobiology 平成 19 年 11 月 4-6 日 東京都

- ⑪. DEC1 による概日リズム調節の機構：河本健、本田清昌、藤本勝巳、能城光秀、加藤幸夫：第 49 回歯科基礎医学会 平成 19 年 8 月 29-31 日 札幌市
- ⑫. 軟骨細胞の分化の概日リズムを制御する数種類の新規制御配列の同定とそこに関する転写因子の探索：上嶋太一、河本健、能城光秀、藤本勝巳、本田清昌、中島歩、加藤幸夫：第 25 回日本骨代謝学会学術集会 平成 19 年 7 月 19-21 日 大阪市
- ⑬. 軟骨細胞分化の概日リズムを制御する新規配列の探索とそこに関する転写因子の同定：上嶋太一、河本健、本田清昌、能城光秀、藤本勝巳、後藤修、加藤幸夫：中四国骨代謝研究会 平成 19 年 7 月 7 日 岡山市
- ⑭. 哺乳類の生物時計と環境適応：能城光秀：広島県環境計量証明事業協会研究会 平成 19 年 4 月 23 日 広島市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

能城 光秀 (NOSHIRO MITSUhide)
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号：00144858

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者