

機関番号：23803

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590233

研究課題名 (和文) 消化管における遺伝子発現リズム発振の分子基盤に関する研究

研究課題名 (英文) Molecular basis of the rhythmical expression of the genes in the gastrointestinal tract

研究代表者

合田 敏尚 (GODA TOSHINAO)

静岡県立大学・食品栄養科学部・教授

研究者番号：70195923

研究成果の概要 (和文)

マウスの給餌を明期に制限すると、空腸における時計遺伝子 *Per 2* および糖輸送担体 *Sglt1* の遺伝子の発現量は、給餌開始前後に最大となるように位相がシフトすることが明らかになった。これらの遺伝子上への核内因子 BMAL1 およびアセチル化ヒストンの結合は、遺伝子発現の日内リズムと対応して量的に変動していた。この結果は、小腸における糖輸送担体の発現は、食事のリズムに依存して、時計遺伝子の発信機構を介して制御を受けていることを示唆する。

研究成果の概要 (英文) :

Restricted feeding schedule led to a shift of the peak of the expression of clock gene (*per 2*) and a hexose transporter gene (*sglt1*) to just prior to the start of feeding. The binding of BMAL1 and acetylated histone H3 and H4 to the transcribed regions of these genes was associated with changes in their expressions. These results suggest that diurnal changes in expression of hexose transporter genes are regulated by a feedback loop of clock genes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：栄養生理学

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、小腸、日内リズム、転写調節、マイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

(1) 明暗サイクルや温度変化などの地球環境の日周期的な変動に対応して、約 24 時間の周期で自律振動する概日時計が生物学的な日内リズムをもたらすことがよく知られるようになってきた。近年、時計遺伝子とその発振に関わる多くの分子が、視交叉上核で中枢の生物時計システムを構成するだけでな

く、肝臓、腎臓、血管および脂肪細胞など個々の組織でもそれぞれの生理機能に最も適した固有の時計位相を示す末梢の時計システムを形成していることが明らかにされた。すなわち、生体を構成する細胞に共通の時計遺伝子 *Per1*、*Per2*、*Per3*、*Cry1*、*Cry2* の遺伝子転写調節領域には共通の E-box 配列があること、その領域に BMAL1 (brain and muscle

Arnt-like protein) および CLOCK (circadian locomotor output cycles kaput) が結合して時計遺伝子の転写を正に調節すること、転写・翻訳された PER および CRY タンパク質が複合体を形成して BMAL1 および CLOCK の転写活性化を抑制すること、などが明らかとなり、これらを組み合わせた時計遺伝子発現の負のフィードバックループが概日リズム発振の分子機構であることが想定されていた。

(2) 報告者らは、これまで吸収細胞に特異的に発現する膜消化酵素や吸収担体などの消化吸収関連タンパク質群の遺伝子発現調節因子を解析し、小腸吸収細胞は管腔内の栄養素や食品成分に速やかに応答して、消化吸収関連遺伝子を転写レベルで調節することを明らかにしてきた。この管腔内栄養素という食事由来の環境要因に対する遺伝子発現の変動は、吸収細胞の環境適応機構とみなされる。しかしながら、この調節機構が、吸収細胞の内因的な遺伝子発現変動要因である日内リズムとどのように相互作用するかは明らかではなかった。

2. 研究の目的

本研究では、小腸吸収細胞に特異的に発現する消化・吸収関連遺伝子の発現における日内リズムの形成機構に焦点を当て、そのリズムの位相および振幅の決定に関わる時計遺伝子の発振機構が、摂食リズムによってどのような標的因子を介して調節されているかを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 動物および組織の採取：

7週齢の C57BL/6J マウスを、12時間ごとの明暗周期（明期 7:00-19:00）下で、自由摂食および明期の一定時間（9:00-17:00）に食餌時間を制限させた条件で 10 日間飼育した。4 時間ごとにマウスを屠殺し、空腸中部から組織を採取した。

(2) 遺伝子発現量の測定：

空腸組織から総 RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR 法によって、消化吸収関連タンパク質 SGLT1、GLUT5、GLUT2 ならびに

細胞内生物時計システムに関与する遺伝子群 *Per1*、*Per2*、*Per3*、*Cry1*、*Cry2*、*Bmal1*、*Clock*、およびそれらの転写因子 DBP、E4BP4、ROR、REV-ERB の mRNA 発現量を測定した。

(3) クロマチン免疫沈降法 (ChIP アッセイ)：

空腸組織を 1%ホルムアルデヒドで固定し、DNA と核内たんぱく質を結合させた後、超音波破碎機を用いて、DNA を 200-500bp の断片に切断した。標的タンパク質（各種核内因子、RNA-ポリメラーゼ II、アセチル化修飾ヒストン）の抗体を用いて免疫沈降させた後、DNA をタンパク質から解離させて回収し、標的タンパク質と結合していた DNA 断片の量をリアルタイム PCR によって定量的に解析した。

4. 研究成果

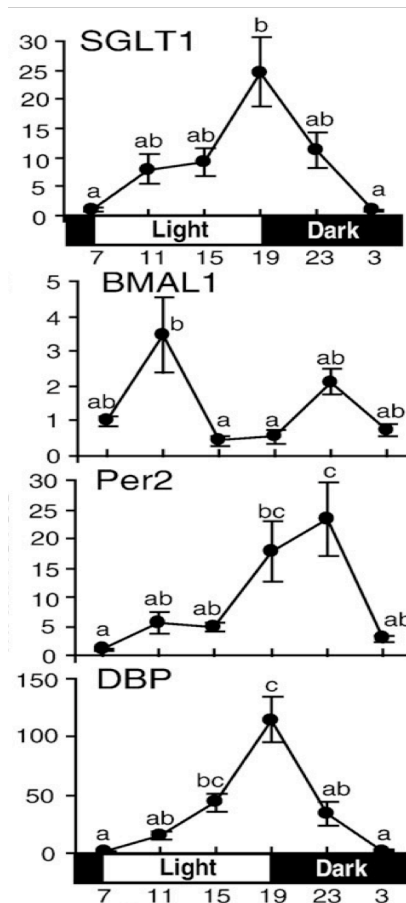


図1 自由摂食下のマウスの空腸における mRNA 発現量の日内変動

(1) 小腸組織における時計遺伝子と消化吸収関連遺伝子発現の日内リズムの同調性

12 時間ごとの明暗サイクルの条件下でマウスに飼料を自由に摂取させると、空腸における時計遺伝子 *Per1* および *Per2* の mRNA 発現量が、糖輸送担体 (SGLT1、GLUT5、GLUT2) およびスクラーゼ・イソマルターゼ (SI) と同様に、暗期開始直後に最大となる日内リズムを示した。また、*Per2* 遺伝子の発現を制御する核内因子のうち、DBP の mRNA 量は、*Per2* 遺伝子発現がピークを示す 4 時間前に最大となり、BMAL1 の mRNA 量は、*Per2* mRNA 量が増大し始める時期に最大となる日内リズムを示した (図 1)。

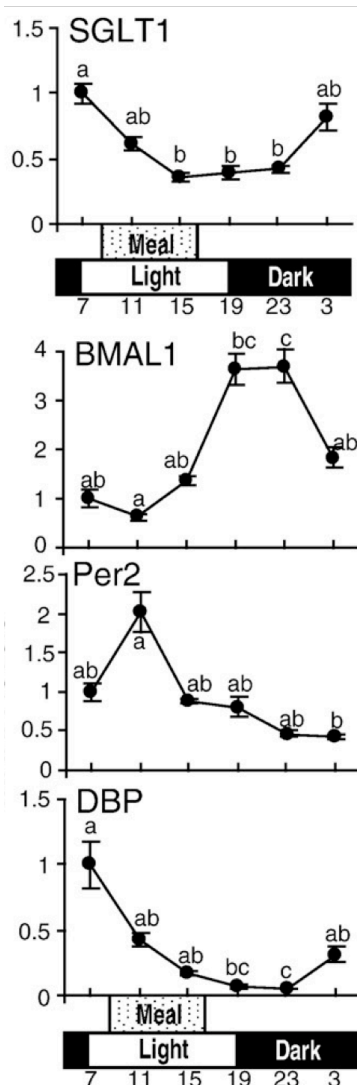


図 2 明期制限給餌条件によるマウス空腸における mRNA 発現量の日内変動

給餌を明期に制限すると、空腸における時計遺伝子 *Per1* および *Per2*、糖輸送担体 (SGLT1、GLUT5、GLUT2) および DBP の mRNA 発現量が、給餌開始前後に最大となり、給餌のタイミングにあわせて日内リズムの位相がシフトした (図 2)。

(2) 転写因子の結合を介した小腸糖輸送担体遺伝子発現の日内変動

クロマチンにおけるタンパク質と DNA の生理的な結合を見る方法であるクロマチン免疫沈降法 (ChIP アッセイ) をおこない、*Sgt1* 遺伝子と *Per2* 遺伝子上に結合する BMAL1 の量的変動を検討したところ、BMAL1 は *Sgt1* 遺伝子と *Per2* 遺伝子の転写領域に強く結合し、その結合の日内リズムは *Sgt1* 遺伝子および *Per2* 遺伝子の発現の日内リズムと対応していた (図 3)。また、*Sgt1* 遺伝子転写領域への RNA ポリメラーゼ II の結合量は、BMAL1 の結合量と対応して日内変動を示した。

それゆえ、小腸における *Per2* 遺伝子と糖質消化吸収関連遺伝子の発現の日内リズムは、時計遺伝子のコアグループを形成する転写因子 BMAL1 を介した転写のフィードバック機構によって、同調して制御されていることが示唆された。

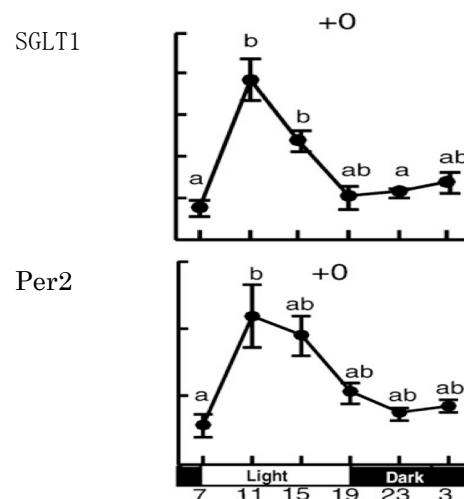


図 3 自由摂食下のマウスの空腸における *Sgt1* 遺伝子および *Per1* 遺伝子転写開始点領域における時計関連転写因子 BMAL1 の結合の日内変動

(3) 小腸における糖輸送担体遺伝子発現の日内リズムにおけるヒストンコードの役割

転写調節を受ける遺伝子近傍ではクロマチンタンパク質（ヒストン）の構造の変化が起こる可能性が考えられるので、ヒストン H3 および H4 のアセチル化の変化を、アセチル化ヒストン H3、H4 抗体を用いて ChIP アッセイによって解析したところ、*Sglt1* 遺伝子上のヒストンのアセチル化レベルの変動は、いずれのヒストンの場合も、プロモータ領域よりもむしろ転写領域に強くみられ、その日内変動は転写開始近傍領域への RNA ポリメラーゼ II および BMAL1 の結合量の日内変動と対応していた。*Sglt1* 遺伝子転写領域におけるヒストンアセチル化酵素集積促進因子 Brd4 ならびに mRNA 伸長因子 P-TEFb (Cdk9) の結合は、いずれもヒストンのアセチル化と対応した日内変動を示した。一方、給餌を明期に制限すると、給餌のタイミングにあわせて、*Sglt1* 遺伝子転写領域におけるヒストン H3 および H4 のアセチル化の日内変動の位相が 12 時間シフトした。それゆえ、小腸における *Sglt1* 遺伝子発現の日内リズムは、食事のリズムに依存しており、そのリズムの発振には、ヒストンコードによるヒストンの化学修飾と mRNA 伸長反応の促進が関与していることが示唆された。

(4) DNA マイクロアレイ解析による小腸に発現する遺伝子群の日内変動の網羅的解析

DNA マイクロアレイ解析により、顕著な日内変動を示す遺伝子のスクリーニングを行ったところ、多くの消化吸収遺伝子の発現は日内リズムを示し、そのピークは自由摂取群では 19:00 付近、制限給餌群では 3:00 であり、およそ 8 時間シフトしていた。一方、ヒストン H1 に関連するヒストン H1fx、H1h1b、H1hle、および転写反応阻害因子 *Hexim1* の遺伝子発現のリズムは、自由摂取群、制限給餌群のいずれでも、位相は大きく変化せず、消化吸収関連遺伝子とは異なる固有のリズムを示した。

本研究によって、小腸における時計遺伝子の時計発振系とそれによって制御される遺伝子群の転写調節機構がヒストンコードによる調節を含めて初めて明らかにされた。

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 13 件)

- ① Iwashina, I., Mochizuki, K., Inamochi, Y., Goda, T.: Clock genes regulate the feeding schedule-dependent diurnal rhythm changes in hexose transporter gene expressions through the binding of BMAL1 to the promoter/enhancer and transcribed regions. *J. Nutr. Biochem.*, Vol. 22, 2011, 334-343.
- ② Inamochi, Y., Mochizuki, K., Osaki, A., Ishii, T., Nakayama, T., Goda, T.: Histone H3 methylation at lysine 4 on the SLC2A5 gene in intestinal Caco-2 cells is involved in SLC2A5 expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Vol. 392, 2010, 16-21.
- ③ Honma, K., Mochizuki, K., Goda, T.: Inductions of histone H3 acetylation at lysine 9 on SGLT1 gene and its expression by feeding mice a high carbohydrate/fat ratio diet. *Nutrition* Vol. 25, 2008, 40-44.

[学会発表] (計 16 件)

- ① 山内浩之、望月和樹、合田敏尚: ヒストンコードと mRNA 伸長因子を介した小腸消化吸収関連遺伝子発現の日内リズム発振機構、第 64 回日本栄養・食糧学会大会、2010 年 5 月 23 日、徳島
- ② 五十嵐信人、望月和樹、合田敏尚: マウス脂肪組織におけるヒストンコードを介した脂肪合成関連遺伝子発現の日内リズム、第 82 回日本生化学会大会、2009 年 10 月 22 日、神戸
- ③ Goda, T., Iwashina, I., Mochizuki, K.: Clock genes regulate circadian rhythmical change of *sglt1* gene expression according to feeding schedule through binding of BMAL1 on the promoter region., *Experimental Biology* 2009, 2009 年 4 月 20 日, New Orleans, USA

[図書] (計 1 件)

- ① 合田敏尚、南山堂、臨床栄養医学、2009、pp. 96-101

6. 研究組織

(1) 研究代表者

合田 敏尚 (GODA TOSHINAO)
静岡県立大学・食品栄養科学部・教授
研究者番号：70195923

(2) 研究分担者

望月 和樹 (MOCHIZUKI KAZUKI)
静岡県立大学・食品栄養科学部・助教
研究者番号：80423838