

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590223

研究課題名（和文）

時計遺伝子 DEC1 および DEC2 の脂質代謝の日内リズムにおける役割の解析

研究課題名（英文） Study on the roles of DEC1 and DEC2 in the rhythmic regulation of lipid metabolism.

研究代表者

能城 光秀（NOSHIRO MITSUhide）

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・准教授

研究者番号：00144858

研究成果の概要（和文）：研究成果の概要（和文）：動物の概日リズム調節を司る分子時計機構に関与する遺伝子である DEC1 および DEC2 のリズム発現調節機構解明とそれらの生体内での役割を特に脂質代謝関連遺伝子の発現調節を解明することを目的とし、以下の成果を得た。核内受容体 ROR $\alpha$  が DEC1 および DEC2 遺伝子の新たな調節因子であることを見だし、DEC1 遺伝子及び DEC2 遺伝子プロモーターに応答エレメントを同定した。さらに脂肪分化能した 3T3-L1 培養細胞系においてこの調節系が機能していることを見だし、ROR $\alpha$  が DEC1 および DEC2 遺伝子の調節することで脂肪分化に抑制的に作用していることを示した。

研究成果の概要（英文）：DEC1 and DEC2 are involved in various biological phenomena including clock systems, cell differentiation, and metabolism. I identified novel nuclear receptor response elements, ROR-response elements, in *Dec1* and *Dec2* promoters. I also examined expression of *Rora*, *Dec1*, and *Dec2* in differentiating 3T3-L1 adipocytes. The results suggested that ROR $\alpha$  suppresses adipogenic differentiation at a later stage of differentiation by ROR $\alpha$ -mediated stimulation of *Dec1* and *Dec2* expression.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生化学

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：概日リズム、時計遺伝子、脂質代謝、脂肪分化、核内受容体、DEC1, DEC2

## 1. 研究開始当初の背景

動物の概日リズム調節機構の分子レベルでの解析は 20 種類ほどの時計関連遺伝子のクローニングにより、この数年で著しく進展した。申請者らが単離した bHLH 型転写因子 DEC1 と DEC2 は生物時計の中核とされる視交差上核でリズム発現を示し、分子時計機構に関わる構成因子であることを明らかにした。時計遺

伝子は肝臓・筋肉・脂肪組織など各末梢組織にも発現しており、光以外にも食餌条件など影響を受けている。各組織で発現している遺伝子の数-10%程度は有意な概日リズムを持つことが知られている。それらの中には脂質代謝および糖代謝の調節酵素遺伝子が含まれており、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

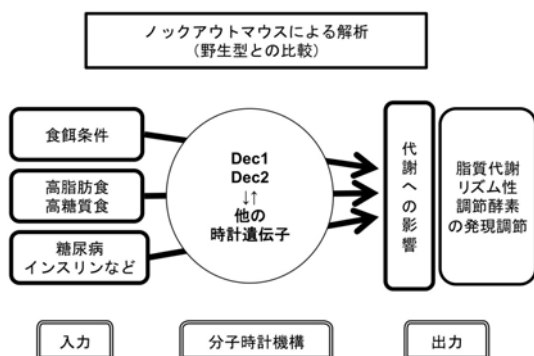
れている。

## 2. 研究の目的

本研究はこれらリズムを伴う代謝酵素の遺伝子転写調節における DEC1、DEC2 などの時計遺伝子の役割を明らかにすることを目的とした。これまでの時計遺伝子の肝臓などにおける標的遺伝子と思われる脂質代謝酵素などの解析からさらにその他の臓器や標的遺伝子へ研究対象を拡張し、脂質代謝酵素の遺伝子などのリズム発現をしている調節酵素の発現制御への DEC およびその他のリズム調節因子の関与を解析し、脂質代謝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的とした。

## 3. 研究の方法

Dec1, Dec2 遺伝子に存在する応答配列を検索するためにマウス *Dec1* プロモーター、*Dec2* プロモーターを組み込んだルシフェラーゼレポーターを構築し、ROR $\alpha$ 、REV-ERB $\alpha$  発現プラスミドと組み合わせて Hepalclc7 へパトーマ細胞に FuGENE HD を用いて導入し、ルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。さらに DEC1 および DEC2 の分子時計機構における調節と役割の解析と標的遺伝子を検索するために、それぞれのノックアウトマウスを用いて末梢組織での発現様式の日内変動について、標的遺伝子候補となる遺伝子の mRNA 発現をリアルタイム PCR 法で解析した。その際、食餌条件を高脂肪食や、高炭水化物食にした。またインスリンや糖尿病状態にする条件などを与えた。さらに DEC1 および DEC2 による発現調節機構を分子レベルで詳細に調べ、時計遺伝子と代謝酵素リズム発現の関連を解析した。

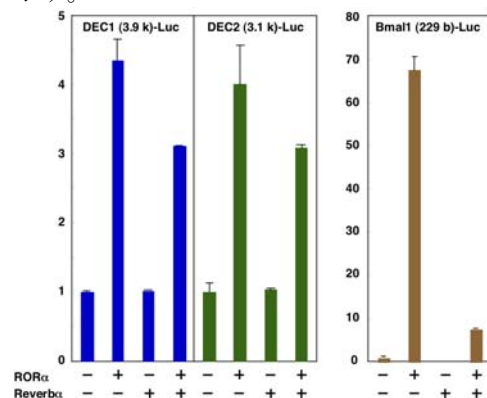


## 4. 研究成果

これまでの研究に基づき、DECの標的遺伝子を脂肪酸代謝関連酵素に広げ、それらの特に脂肪組織でのリズム調節におけるDEC1、DEC2やその他の時計遺伝子の役割をリズム刺激のインプットとアウトプットの両面から明らかに

することを目的とした研究を行い、以下の成果を得た。

① 核内受容体ROR・がDEC1およびDEC2遺伝子の新たな調節因子であることを見だし、DEC1遺伝子プロモーターに一箇所、DEC2遺伝子プロモーターに2箇所のROR・応答エレメントが存在することを明らかにした。プロモーターアッセイにより、脂肪分化能した3T3-L1培養細胞系やHepalclc7へパトーマ細胞においてこの調節系が機能していることを見いだした。それらの結果を合わせて、ROR・がDEC1およびDEC2遺伝子の調節することで脂肪分化に抑制的に作用していることが明らかになった。図はマウス *Dec1* プロモーター、*Dec2* プロモーターと同一化されている2つのROR応答配列A、Bを含むマウス *Bmal1* プロモーターを組み込んだルシフェラーゼレポーターを構築し、ROR $\alpha$ 、REV-ERB $\alpha$  発現プラスミドと組み合わせて Hepalclc7 へパトーマ細胞に FuGENE HD を用いて導入し、ルシフェラーゼレポーターアッセイを行った結果を示す。



② DEC1 ノックアウトマウスの脂肪組織において中性脂肪代謝に関わる一群の遺伝子に加えて、脂肪分化調節に関わる遺伝子も DEC1 の標的遺伝子であることを見いだした。それらはリズム発現をしており、DEC1 が重要な働きをしていることを見いだした。具体的には野生型マウスの脂肪組織では *c-Fos* と *Srebp1a* 以外の 16 遺伝子がリズム発現を示した。特に *c-Jun*, *Cebpa*, *Cebpb*, *Cebpd*, *Klf4*, *Klf15*, *Ppar $\gamma$*  など 7 遺伝子は ZT10 にピークを持つ概日リズム発現を示した。一方、*Dec1* ノックアウトマウスではこれらの遺伝子は夜間 (ZT16, ZT22) で発現が上昇し、リズム性が減少するか位相が移動した。中性脂肪代謝関連遺伝子については、脂肪酸取り込み (*Lpl*, *Cd36*, *Acs11*)、中性脂肪再合成 (*Gpat3*, *Agpat2*, *Lipin1*, *Dgat2*)、油滴のコートタンパク (*Plin*, *Adfp*, *Cidec*,

*S3-12*)、脂肪酸放出 (*Atgl, Lipe, Mgl1*)に関わる 14 遺伝子全てに、野生型マウスで ZT10 にピークを持つ緩やかな概日リズムが観察された。しかし、*Dec1* ノックアウトマウスでは夜間 (ZT16, ZT22) で発現が上昇したため、リズム性が無くなるか位相が移動した。

- ③ 高脂肪食を与えた実験では野生型は体重増加を示したのに対し、*Dec1* ノックアウトマウスでは体重増加が低かった。このことは明らかに DEC1 が脂質代謝系に多大な影響を持つ調節因子であることを示している。

#### 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 8 件)

1. Ozaki, N., Noshiro, M., Kawamoto, T., Nakashima, A., (他6名, 2番目) (2012). Regulation of basic helix-loop-helix transcription factors Dec1 and Dec2 by ROR $\alpha$  and their roles in adipogenesis. *Genes Cells*. 17, 109-121, doi: 10.1111/j.1365-2443.2011.01574.x. (査読あり)
2. Wu, Y., Sato, F., Kawamoto, T., Noshiro, M., (他6名, 6番目) (2012). BHLH transcription factor DEC2 regulates pro-apoptotic factor Bim in human oral cancer HSC-3 cells. *Biomed Res* 33, 75-82. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22572381> (査読あり)
3. Ueshima, T., Kawamoto, T., Noshiro, M., (他5名, 4番目) (2012). Identification of a new clock-related element EL-box involved in circadian regulation by BMAL1/CLOCK and HES1. *Gene*. 510, 118-25. doi: 10.1016/j.gene.2012.08.022. (査読あり)
4. Sato, F., Wu, Y., Noshiro, M., (他9名, 6番目) (2012). Smad3 and Snail show circadian expression in human gingival fibroblasts, human mesenchymal stem cell, and in mouse liver. *Biochem Biophys Res Commun* 419, 441-446. (査読あり) doi:10.1016/j.bbrc.2012.02.076
5. Sato, F., Kawamura, H., Kawamoto, T., Noshiro, M., (他10名, 9番目) (2012). The basic helix-loop-helix transcription factor DEC2 inhibits TGF- $\beta$ -induced tumor progression in human pancreatic cancer BxPC-3 cells. *Int J Mol Med* 30, 495-501. doi: 10.3892/ijmm.2012.1037. (査読あり)
6. Wu, Y., Kawamoto, T., Noshiro, M., *et al.* (他 10 名, 6 番目) (2012). The BHLH transcription factor DEC1 plays an important role in the epithelial-mesenchymal transition of pancreatic cancer. *Int J Oncol*. 41, 1337-1346, doi: 10.3892/ijo.2012.1559. (査読あり)
7. Wu, Y., Sato, F., Kawamoto, T., Fujimoto, K., Noshiro, M., (他 4 名, 6 番目) (2011). Basic helix-loop-helix transcription factors DEC1 and DEC2 regulate the paclitaxel-induced apoptotic pathway of MCF-7 human breast cancer cells. *Int J Mol Med* 27, 491-495. doi: 10.3892/ijmm.2011.617. (査読あり)
8. Liu, Y., Sato, F., Kawamoto, T., Noshiro, M., (他 7 名, 9 番目) (2010). Anti-apoptotic effect of the basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factor DEC2 in human breast cancer cells. *Genes Cells* 15, 315-325. doi: 10.1111/j.1365-2443.2010.01381.x. (査読あり)

[学会発表] (計 10 件)

1. 概日リズムを制御する新規時計エレメント EL-box の同定: 河本健、能城光秀、藤本勝巳、加藤幸夫: 第 54 回歯科基礎医学会学術大会・総会 (郡山) 平成 24 年 9 月 14-16 日
2. DEC 研究の展望: 血圧制御など 加藤幸夫 シンポジウム 「時刻と時間の生理学」札幌 平成 24 年 3 月 10 日
3. 時計遺伝子 DEC1 の発現調節と機能における核内受容体との関連 能城光秀 シンポジウム 「時刻と時間の生理学」札幌 平成 24 年 3 月 10 日
4. 核内受容体 ROR $\alpha$  による時計遺伝子 DEC1, DEC2 の発現調節と脂肪分化: 尾崎徳継、能城光秀、河本健、福崎麗、藤本勝巳、丹根一夫、加藤幸夫: 第 52 回日本生化学会中国・四国支部例会 2011 年 5 月 13~14 日 広島市
5. 間葉系幹細胞の軟骨分化における DEC2 の役割: 笹本智子、藤本勝巳、金輪真佐美、河本健、能城光秀、道田将彦、尾崎徳継、丹根一夫、加藤幸夫: 第 52 回日本生化学会中国・四国支部例会 2011 年 5 月 13~14 日 広島市
6. 核内受容体 (ROR $\cdot$ ) による時計遺伝子 (*Dec1, Dec2*) の制御: 尾崎徳継、能城光

- 秀、河本健、藤本勝巳、丹根一夫、加藤幸夫：第 51 回日本生化学会中国・四国支部例会 平成 22 年 5 月 14-15 日 山口市
7. 核内受容体 (ROR・) と SREBP1c によるベータシク・ヘリックス・ループ・ヘリックス型転写因子 (*Dec1*, *Dec2*) の発現調節と脂肪分化：尾崎徳継, 能城光秀, 福崎麗, 河本健, 藤本勝巳, 丹根一夫, 加藤幸夫：第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会・合同大会 平成 22 年 12 月 7 日-10 日 神戸市

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 2 件)

1. 名称：脂質代謝関連疾患の検査方法、ならびに脂質代謝関連疾患の予防および／または治療剤の評価方法  
発明者：加藤幸夫、河本健、藤本勝巳、能城光秀  
権利者：広島大学  
種類：特許  
番号：特願 2011-22172 号  
出願年月日：平成 23 年 2 月 3 日  
国内外の別：国内
2. 名称：非ヒト動物、細胞、血圧調節物質の評価方法、血圧調節条件の評価方法および血圧の調節方  
発明者：加藤幸夫、河本健、能城光秀、中島歩  
権利者：広島大学  
種類：特許  
番号：特願 2010-236891 号  
出願年月日：平成 22 年 10 月 21 日  
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

(1) 研究代表者

能城 光秀 (NOSHIRO MITSUhide)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・准教授

研究者番号：00144858：

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号：