

博士論文審査報告書

末梢組織における体内時計制御機構の解明

Investigation of the regulation of circadian
clock system in mouse peripheral tissues

申請者

田原	優
Yu	TAHARA

電気・情報生命専攻 薬理学研究

2013年 2月

体内時計とは、生物に備わっている時を刻む仕組みであり、単細胞生物から哺乳類まで幅広い生物において現代まで保存されてきた機能である。我々は時計の無い暗室で生活していても、約 24 時間の周期で睡眠—覚醒を繰り返す事が出来る。睡眠—覚醒のリズムだけではなく、我々は体温、ホルモン分泌、代謝など様々な生理現象に 24 時間のリズム性を持っている。また、アレルギー性疾患は夜間に起こりやすく、心筋梗塞は午前中に起こりやすい、など疾患の症状にも時間依存的な変化が見受けられる。これらの生理現象は、哺乳類においては、脳の視床下部にある視交叉上核（Suprachiasmatic nucleus, SCN）が体内時計の中核として制御している事で表出していることが分かっている。つまり、SCN は外界の光情報を、視神経を通して目から受容し、その情報を液性因子や交感・副交感神経系、または摂食リズムなどを制御する事で体全体に伝えている。時を刻むメカニズムは、あらゆる組織に発現する時計遺伝子群が刻む 24 時間周期のリズムによって起こる。哺乳類の時計遺伝子群で中核を担っているのは、*Clock*, *Bmal1*, *Per*, *Cry* である。これらは転写—翻訳のフィードバックループを構成しており、正の転写因子である CLOCK/BMAL1 がプロモーター領域にある E-box に結合し、負の転写因子である *Per*, *Cry* の転写を活性化する。転写された *Per*, *Cry* は細胞質で PER/CRY の複合体を形成し、核内に戻り、CLOCK/BMAL1 を抑制し *Per*, *Cry* の転写を抑制する。結果、*Per*, *Cry* は 24 時間周期で RNA 量、タンパク質量にリズムが生じるのである。同時に、プロモーター領域に E-box を持つ遺伝子もまた CLOCK/BMAL1 によるリズム的な制御を受けており、約 10% の遺伝子の RNA 量に日内変動があることが報告されている。

末梢組織の体内時計（末梢時計）は、光環境に同調した SCN の制御と共に、食事による制御も強く受ける。夜行性のマウスの給餌時刻を昼間の一定時間に制限する事（制限給餌）により、末梢時計（時計遺伝子発現リズム）の位相がその食餌時刻に同調する事が分かっている。また、食餌時刻に同調した時計遺伝子群は、時計遺伝子の下流遺伝子である代謝関連遺伝子の発現リズムを、食餌時間に同調させることで代謝機能を最大限に活用できるように制御する。SCN 以外の脳部位、肝臓、腎臓、心臓などほぼ全ての臓器に発現している時計遺伝子の発現リズムは、制限給餌により給餌時刻に同調する事が分かっている。また、肝臓におけるその同調はとても早く、制限給餌開始 2-3 日後には食餌時間に同調した位相に変化する。しかし食餌による末梢時計の同調メカニズムは不明な部分が多い。光同調を統括する SCN のような食餌同調を統括する脳組織はまだ見つかっておらず、時間制限された食餌情報がいかに末梢時計の時刻を変更するメカニズムは不明なままである。

本論文は四章で構成されており、以下に各章の要約と本論文の評価を記した。第一章は序論であり、体内時計、末梢時計、食餌同調、体内時計と疾患の関連についてこれまでの研究報告に基づいて、本研究の背景と目的について述べ、当該分野における本論文の意義を示した。

第二章では、食餌による末梢時計の入力経路、異なる食餌パターンによる末梢時計発現の位相変化の規則性を調べる事で、末梢時計と食餌の関係のさらなる理解に挑戦した。具体的には、体内時計が昼間の食餌によって位相変化する際の、肝臓時計遺伝子発現を網羅的に調べた。その結果、食餌により *Per2*, *Rev-erba* が食後のインスリン分泌依存的にそれぞれ発現増加、減少することにより、発現リズムの位相を変化させる事が分かった。また、細胞を用いた研究においてもインスリンは直接時計遺伝子に作用し、急激に遺伝子発現を変化させる事がリズムの位相変化に繋がる事を証明できた。

第三章は新しい体内時計測定法の開発と応用について述べた。マウスの体内時計、特に組織の時計遺伝子発現リズムを測定する方法は数種類ある。直接的な測定方法は、時刻別に 3-6 時間間隔で採取した臓器の RNA、タンパク質量を測定し、複数のマウスから一つの発現リズムのデータを作る方法である。間接的な方法としては、時計遺伝子のプロモーター下流にホタルルシフェラーゼ遺伝子をトランスジェニックした、あるいはノックインしたマウスを用いて、臓器を培養・長期発光モニタリングすることで評価することができる。つまり *in vivo* での時計遺伝子発現リズムを *in vitro* で継続させて、それを発光としてモニタリングし、その位相を評価する方法である。しかしそれぞれの方法で欠点はある。直接的な方法は、複数のマウス個体が必要な事、また得られたデータは複数個体を統合したデータであり一個体のデータが得られないことが挙げられる。間接的な方法は *in vitro* という特殊環境において *in vivo* のデータを反映しない可能性がある事が挙げられる。そこで本研究では、新たに *in vivo* で一個体のマウスの末梢時計を観測する方法を開発した。CCD カメラを搭載した *In vivo imaging system* (Caliper 社) と *PER2::LUCIFERASE knock-in* マウスを用いて、麻酔下で 4 時間おきにマウスにルシフェリン (発光基質) を投与し生体内の発光リズムを観測した。発光は腎臓、肝臓、顎下腺から測定出来た。測定結果はとても安定、かつ正確であり、また殺さずに測定できるので動物倫理的にも良い測定法であった。それを用いて、今まで評価出来なかった実験条件で末梢時計を評価する事ができた。SCN 破壊マウスの末梢時計計測、食パターンの変化による末梢時計の変化を測定した。具体的には SCN を破壊した状態での末梢時計を調べた。電極を用いた手術により SCN を破壊したマウスは、行動リズムが無くなり、前述した RNA 発現リズム等での評価は個々のマウスのリズムの位相が違う可能性が有り有効ではないことを示した。また、臓器の培養による測定も、臓器摘出時の刺激が時計をリセットしてしまう恐れがあった。今回開発した手法は生きたマウスを用いて直接末梢時計遺伝子の発現リズムを測定する世

界初の方法であった。この研究手法を応用して食パターンと末梢時計の位相について調べた。先行研究では一般的に昼間に食餌時間を設定しているが、夜間の食餌パターンの変化が末梢時計の位相同調に与える影響については分かっていなかった。そこで、人の食パターンに近づけたスケジュールをマウスに強制した場合の末梢時計の位相を調べた。結果、末梢時計は食餌タイミングの間隔に敏感に反応する事が分かった。つまり長い期間空いた後の食餌に、より強い同調能力がある事が分かった。また、日常の生活を考慮して夕食の時間のみを 19 時から 22 時、23 時とずらしていった結果、末梢時計は昼食と夕食の間隔が大きくなり、夕食に強く同調する事が分かった。また、23 時の食餌を 19 時と 23 時に分食すると、異常が解消できることを見出した。本研究成果は人の社会生活に外挿しやすいということで、高い評価を受けた。

第四章は第二～三章で示した研究結果を総括し、末梢時計の性質、食餌同調のメカニズム、さらには食パターンを考慮した疾患予防・治療について考察し、今後の展望について記述した。

以上、本論文では、食餌性同調におけるインスリンシグナルの重要性を具体的に示すことができた。また、末梢臓器の体内時計のリズム性振動を一個体で連続的に可視化できるという画期的な方法確立した。また、その方法を応用し、人の食パターンに類似したモデルで、遅い夕食が体内時計を異常にする危険性と、それを解除できる方法について実験的に確かめた。これらの研究成果は、末梢臓器の体内時計の同調の仕組みを理解する上で大変価値あるものであり、当該分野でも高い評価を得ている。以上より、本論文は博士（理学）の学位論文として十分に価値のあるものと認める。

2013 年 1 月

審査員

(主査) 早稲田大学教授
早稲田大学教授
早稲田大学教授

薬学博士（九州大学）
博士（理学）京都大学
博士（理学）名古屋大学

柴田 重信
岡野 俊行
岩崎 秀雄