

博士（人間科学）学位論文

トランスクリプトーム解析に基づくマウス体内
時計出力機構の解明

Identification of circadian clock output
mechanism based on transcriptome analysis
in mouse

2005年1月

早稲田大学大学院 人間科学研究科

南 陽一

Minami, Yoichi

研究指導教員： 柴田 重信 教授

目次

序論

- 生理現象にみられるリズム ----- 1
- 体内時計の振動体 ----- 1
- 体内時計の分子機構 ----- 2
 - E-box を介した制御
 - RRE を介した制御
 - D-box を介した制御
- 時計の階層構造と時計制御下遺伝子 ----- 3
- 研究内容 ----- 4

第一章 出力遺伝子としての *Pai-1*

- 序 ----- 6
 - 線溶系
 - 線溶系と体内時計
 - *Clock* 点突然変異体マウス
 - 制限給餌性リズム
 - 実験の目的
- 方法 ----- 9
 - 実験動物
 - 制限給餌法
 - サンプルの準備、RNA 抽出および RT-PCR 法
 - 統計処理
- 結果 ----- 11
 - 心臓における *Bmal1*、*Npas2*、*Per1*、*Per2*、*Pai-1* 遺伝子発現の日周期性
 - 時計遺伝子発現と *Pai-1* 遺伝子発現における制限給餌性リズム形成
- 考察 ----- 12
 - 時計制御下遺伝子 *Pai-1*
 - 給餌時刻制限による *Pai-1* 遺伝子発現の位相変化と時間治療
 - 心臓における時計遺伝子
 - 制限給餌性リズム形成と *Clock* 遺伝子
- まとめ ----- 15

第二章 白色脂肪組織における出力遺伝子の包括的探索

- 序 ----- 16

- 白色脂肪組織
- DNA マイクロアレイ法
- 体内時計とトランスクリプトーム解析
- 実験の目的

方法 ----- 19

- *Per2-dLuc* 遺伝子導入ラットの作成と培養組織の発光量の PMT による検出
- 遺伝子発現解析用のサンプルの準備と DNA チップ解析
- データ解析
 - 振動遺伝子の抽出
 - ピーク時刻の解析
 - 階層的クラスタリング法
- 定量的 PCR 法
- 進化的保存領域における包括的時計遺伝子結合領域候補配列の探索
- SV40 ベーシックプロモータでドライブされる *dLuc* レポーターベクターの構築
- 細胞培養、Luc アッセイ及び体内時計による転写のダイナミクスのモニタリング
- タンパク質合成と EMSA
- 動物福祉
- Web-Site

結果 ----- 25

- 培養白色脂肪組織片における時計遺伝子の振動
- 白色脂肪組織におけるゲノムワイドな遺伝子発現解析
- 体内時計による生理機構調節遺伝子の制御
 - 線溶系と細胞外マトリクスリモデリング機構
 - 細胞周期
- ゲノム情報を用いた振動遺伝子の遺伝子発現調節領域の探索
 - E-box
 - D-box
 - RRE

考察 ----- 30

- 白色脂肪組織には体内時計が内在する
- 白色脂肪組織の振動遺伝子
- 線溶系因子の概日振動
- 細胞外マトリクスリモデリング機構の概日振動
- 細胞周期の概日振動
- 新たな時計の分子ネットワークの可能性
- 研究の展望

まとめ	35
総括	
時間生物学の展望	36
概日リズムの詳細な解析	
概日リズム研究のさまざまなリズム現象への応用	
時計研究の臨床への応用	
謝辞	39
引用・参考文献	
序	40
第一章	43
第二章	46
総括	49
図表	
図説	51
図表	59

序論

生理現象にみられるリズム

生命現象には様々な周期性が観察され、外界の周期的な変化に惹起されて生じる外因性リズムもあるが、生体内に振動を惹起するメカニズムを備え内因性に生じるリズムもある（例えば概日リズム）。時間生物学の用語では、1日を基準としてそれより短い周期のものをウルトラディアンリズム（ultradian rhythm）、長い周期のものをインフラディアンリズム（infradian rhythm）、1日周期のものを日周リズム（diurnal rhythm）と呼ぶ。ウルトラディアンリズムの例としてはニューロンの自律発火リズムが挙げられる。心拍や呼吸、ヒトの睡眠パターンにもウルトラディアンリズムが見られる。また、体節形成時に見られる2時間周期の遺伝子の振動も、ウルトラディアンリズムの例である。他方インフラディアンリズムには、げっ歯類の性周期に見られる約4日の周期をはじめ、月の満ち欠けに対応した約15日の半月周リズム（semilunar rhythm）や約30日の月周リズム（lunar rhythm）、鳥の渡りに見られる年周リズム（annual rhythm）などが含まれる。

生体に見られるリズム現象のうち、もっとも研究されているのが日周リズムである。日周リズムのうち、外界からの時刻情報（Zeitgeber）のない状態でも周期性が観察されるような内在性リズムを、概日リズム（Circadian rhythm; Circa（約）+Dien（1日））と呼ぶ（24±4時間周期と定義される）。概日リズムは植物の葉の開閉、アカパンカビの分生子形成、シアノバクテリアの窒素固定などに、またゴキブリやコオロギの活動リズム、カイコの羽化リズム、ショウジョウバエの活動リズムや羽化リズムに観察できることが知られている。哺乳類でも概日リズムは観察でき、例えばマウスやラットの行動リズムや血中副腎皮質ホルモン濃度などに見られる。このように概日リズムは、真核・原核生物を問わず単細胞生物から多細胞生物まで種々の生物の様々な現象で観察される現象である（Dunlap, 1999; Hastings et al., 2003）。

体内時計の振動体

生物におけるリズム現象を司る機構の総称を体内時計と呼ぶ。この言葉は狭義では概日リズムを駆動する機構のことを指すので、以後本稿では後者の意味で「体内時計」を使う。体内時計は 内在性の24時間周期を作り出す振動体、 外界から時刻情報（例えば光）を振動体に伝える同調機構、 振動体のリズムを生理機構に反映する出力機構、の3つから構成される（図1-1）。

振動体の存在する場所（時計中枢）の探索は精力的に行われており、哺乳類では1960年代後半から重要な発見が相次いだ。先駆的な業績として、Richterは視床下部内側底部を破壊すると概日リズムが消失することを報告した（Richter, 1967）。また Moore と Eichler は、視神経の一部（網膜からの視神経繊維の1%以内）が視交叉の後から視床下部に入り視交叉上核（suprachiasmatic nucleus; SCN）と呼ばれる神経核に終わっていることを発見し、

SCN 破壊ラットでは副腎皮質ホルモンに見られるリズムが消失することを報告した (Moore and Eichler, 1972)。Moore らとは独立に Stephan と Zucker も、視交叉上核の破壊により飲水と輪回しの概日リズムが消失することを報告している (Stephan and Zucker, 1972)。

神経核の破壊実験は SCN が概日リズム形成に重要であることを示唆していたが、SCN が振動体本体ではなく振動体から出力機構への情報伝達の経路である可能性を否定できなかった。Inouye らは、頭頂から挿入した Halász ナイフで SCN を含む視床下部の切離手術を行い、視床下部アイランドを作成して神経連絡を絶った状態の SCN の神経活動を記録した。この結果 intact の動物では脳内の様々な場所で昼夜差が確認されたのに対し、視床下部アイランドを作成した動物では島内のみに昼夜差が確認され、それ以外の部位のリズムは消失した (Inouye and Kawamura, 1979)。さらに、視交叉上核のスライス培養系を用いて SCN の自律発火に概日リズムが観察されたことで、SCN が時刻情報の経路ではなく振動体そのものである可能性が強く示唆された (Shibata et al., 1982)。SCN が振動体である決定的な証拠とされるのが、神経核の移植実験である。ハムスターの新生仔から SCN を含む組織片を摘出し SCN を破壊して無周期になった個体の第 3 脳室に移植したところ、行動リズムが回復した (Lehman et al., 1987)。

SCN はマウスやラット、ハムスターのほかにヒツジ、サルやヒトでも存在していて、現在では哺乳類の体内時計の中核は SCN に存在すると考えられている。

体内時計の分子機構

時計遺伝子は体内時計を分子レベルで構成する遺伝子であり、時計遺伝子に変異があると、例えば行動リズムに異常（無周期になる / 長周期になる / 短周期になる）が生じる。分子機構の解析から時計機構に関与することがわかっているが、変異によって行動リズムには異常が見られず、見かけ上体内時計が正常に機能しているような遺伝子もある。このような遺伝子は時計関連遺伝子と呼ばれるが、区別は明確ではない。時計遺伝子は相互に複雑に絡み合った動的な転写のネットワークを構成している (Roenneberg and Merrow, 2003)。

E-box を介した制御

時計の分子機構の中心となるのが、時計型 E-box (CACGTG) を介した転写調節である (図 1-2A)。BMAL1-CLOCK のヘテロダイマーは促進性に E-box を介した転写を制御する。E-box で制御される時計遺伝子は *Per* (*Per1*, *Per2*) や *Cry* (*Cry1*) であり、*Rev-erba*, *Dbp* である。翻訳された PER や CRY は複合体を形成し、E-box を介した遺伝子発現を抑制的に制御する。すなわち自分自身の転写を抑制するネガティブフィードバックループを形成している。一方で PER タンパク質は CKIε (及び CKIδ) によってリン酸化され、分解される。*Per* の転写が少ない時期には分解の速度のほうがまさっているが、十分に *Per* が転写されると分解は追いつかず PER-CRY が蓄積する。*Per*mRNA と PER タンパク質のピー

クには約 6 時間のずれがあることが知られているが、転写活性と分解速度との差がピークの差を作るメカニズムのひとつだと考えられる(Reppert and Weaver, 2002)。

この他、CLOCK と同じファミリーのタンパク質である NPAS2 (MOP4) が BMAL1 (MOP3、ARNTL) とダイマーを形成して E-box を介した転写を活性化できること (McNamara et al., 2001)、BMAL1 と同じファミリーのタンパク質である BMAL2 (CLIF) が CLOCK とダイマー形成して E-box を介した転写を活性化できることが (Maemura et al., 2000)、それぞれ報告されている。また、bHLH (basic helix loop helix) 型転写因子である DEC1、DEC2 は、E-box を介した転写を抑制することでこのループに参加している (Honma et al., 2002)。

RRE を介した制御

E-box を中心としたループと反対の位相で振動するリズムを作るのが、REV-ERB / ROR 応答領域 (REV-ERB / ROR response element, RRE ; [A/T]A[A/T]nT[A/G]GGTCA) を介した調節である (図 1-2B)。Per とほぼ逆位相に振動する *Bmal1* は、RRE を介した転写制御下にある (Preitner et al., 2002; Ueda et al., 2002)。RRE に結合する REV-ERB α は抑制性の転写因子であり、その発現は E-box に制御されている。つまり *Bmal1* は E-box を介して自分の転写を抑制する因子の転写活性を制御していることになる。REV-ERB α は抑制性に機能するが、促進性の転写因子 ROR α もこのループに参加している (Sato et al., 2004)。ファミリーの他のメンバー (*Rev-erbb* 及び *Rorb*, *Rory*) も振動しており、時計のループに参加していると思われる (Emery and Reppert, 2004)。

D-box を介した制御

E-box、RRE を介した制御の他に、PAR (proline and acidic amino acid-rich basic leucine zipper) 型転写因子を介したループも存在する (図 1-2C)。E-box 制御によって概日振動する遺伝子である *Dbp* (Ripperger et al., 2000) に代表される PAR 型転写因子 (*Dbp*, *Tef*, *Hlf*) は DBP 応答領域 (D-box ; TTA[C/T]GTAA) に結合して転写を促進する。抑制的な制御を担うのは *E4bp4* (Mitsui et al., 2001) で、発現位相は *Dbp* と反対である。D-box は *Per1* の転写制御領域に見出だされており (Yamaguchi et al., 2000)、E-box による発現振動を修飾すると考えられている。D-box を介したループはどちらかといえば付加的であり、時計遺伝子の発現振動を高めるためにあると認識されている。実際 PAR 型転写因子 3 つすべてを欠損したマウスでも、行動リズムがほぼ正常であることが報告されている (Gachon et al., 2004)。

時計の階層構造と時計制御下遺伝子

時計の振動体である SCN は神経細胞の集まりであるが、電気生理学的解析から神経核を構成する細胞個々に時計 (振動体) が存在していることが知られている (Welsh et al., 1995)。このことから、細胞ごとに存在する時計遺伝子の分子機構が振動体として機能していると解釈できる。時計遺伝子は時計中枢である SCN だけでなく、大脳皮質など他の脳部位や末

梢組織(Albrecht et al., 1997; Shearman et al., 1997; Sun et al., 1997; Takumi et al., 1998; Tei et al., 1997; Zylka et al., 1998)、さらには Rat-1(Balsalobre et al., 1998)や NIH/3T3(Akashi and Nishida, 2000)といった株化細胞にも発現し、概日振動する。驚くべきことに、SCN と Rat-1 細胞を比較しても時計機構の基本的なメカニズムは共通である(Yagita et al., 2001)。ただし SCN の時計と末梢組織の時計は等価ではなく、SCN 破壊マウスでは末梢組織での時計遺伝子の発現は平坦化することが知られている(Sakamoto et al., 1998)。このことから体内時計は SCN (主時計) を頂点として各臓器の時計 (末梢時計) が支配されるような階層構造をとっていると考えられている。

主時計の機能は身体全体の時計を統御することだと理解できるが、末梢時計の機能はどうだろうか？ 生体ではさまざまな組織がさまざまな役割を持って機能している。分子レベルの振動が生理レベルでの概日振動として表出するために、時計遺伝子はさまざまな生理機構に参与する遺伝子 (出力遺伝子; output genes) の転写を調節して、これらの遺伝子発現に概日振動を引き起こす。こうした、時計の分子機構によって転写活性が直接制御される遺伝子を、時計制御下遺伝子 (clock controlled genes; CCGs) と呼ぶ。ポストゲノム時代に入り、「全」遺伝子を対象とした研究が可能となる中で、SCN や肝臓(Panda et al., 2002; Ueda et al., 2002)、心臓(Storch et al., 2002)といった組織で概日リズムによって制御される遺伝子を包括的に探索した研究が報告されるようになった。その結果、実に発現遺伝子の 1-9% が概日振動を示すことがわかり、振動遺伝子の機能が多岐にわたっていることが示された。重要なことに共通に振動する遺伝子はわずかであり、大部分の振動遺伝子が各臓器間で異なっていた。このことは、末梢時計が生理機構の調節役として組織ごとに特有の役割を果たしていることを示唆している(Delaunay and Laudet, 2002)。

注記 研究者間で揺らぎがあるが、本稿では言葉を下記のように定義した (図 1-3)。
時計制御下遺伝子 (CCGs): 時計遺伝子によって直接発現制御される遺伝子
出力遺伝子 (out-put gene): 体内時計の概日振動を生理機能に反映する遺伝子
振動遺伝子 (cycling gene): 概日振動を示す遺伝子

研究内容

時計遺伝子の同定とそれに引き続く時計機構の分子ネットワークの解明が、時間生物学の一時代を築いた。時計振動体の基本的な構成因子がほぼ解明された今、研究者は「なぜ生理機構に 24 時間周期が見られるか」という疑問に、分子レベルで回答を与えようとしている。24 時間周期で変化する生理現象は多岐に渡り、それを司る組織もまた多様である。こうした場合に、標的組織で時計がどのように機能するかという問いに答えるために、時計の分子機構の振動を生理レベルに反映するキーモレキュール、すなわち出力遺伝子を同定することが重要である。

本稿では、末梢組織における時計制御下遺伝子の解明を試みた 2 つの研究を展開する。

前半では心臓における時計に着目し、循環器疾患に関係する線溶系の概日リズムを扱う。線溶系をいかに体内時計が制御するかについて、時計制御下にある遺伝子の発現パターンを検討した。後半では、体内のエネルギーバランスの制御を司る重要な組織である白色脂肪組織に着目し、振動遺伝子の包括的取得を目指した検討を扱う。見出された振動遺伝子が直接時計制御下にあるかについて、ゲノムワイドな転写因子調節配列の探索と、いくつかの因子については実験的な検証を行った。

第一章 出力遺伝子としての *Pai-1*

序

線溶系

線溶系は線維素（フィブリン）を溶解するメカニズムである。フィブリノゲンからフィブリノペプチドが分離したフィブリンモノマーは、重合を繰り返してフィブリンポリマーとなることで溶解性が低下して析出する（血液凝固）。不要なフィブリンは血流を障害し、血管を閉塞して血栓症を導く可能性があるため、フィブリンを溶解するメカニズム（線溶系）が重要である。線溶系のキーモレキュールは組織型プラスミノゲンアクチベータ（tissue-type plasminogen activator; tPA）それによって活性化されるプラスミノゲン、t-PA の活性を抑制する PAI-1（plasminogen activator inhibitor 1）である。

線溶機序はセリンプロテアーゼである tPA の生成から始まる。tPA は主に静脈内皮で形成され、細胞表面へと移動し血中へと遊離する。tPA はフィブリンに対する親和性が高いため、フィブリンに選択的に吸着される。一方で非活性型セリンプロテアーゼであるプラスミノゲンもフィブリンに対する親和性が高いためフィブリンに吸着される。フィブリン表面に濃縮された状態で、tPA はプラスミノゲンを限定分解して活性型のプラスミンとし、プラスミンはフィブリンを分解するのである。分解されたフィブリンは可溶性のフィブリン分解産物（fibrin degradation products; FDP）となるため血栓が溶解していく。tPA の他に腎臓傍系球体でつくられるウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベータ（uPA）もまたプラスミノゲンの活性化能を有することが知られている。

血液凝固反応は出血を抑えるなど重要な働きがあるため、過度の線溶は有害である。このため生体には線溶を阻止する機序も備わっていて、その鍵となる因子がセリンプロテアーゼインヒビター（Serpine）の 1 つである PAI-1 である。PAI-1 は血管内皮等で産出され、tPA（uPA）を不活化することで線溶系の活性を抑制する。PAI-1 活性は非常に不安定であるが、血漿タンパク質であるビトロネクチンと結合することで活性が安定することが知られている（Hekman, 1988）。

線溶系と体内時計

一日のうちで循環器系疾患の発症しやすい時間帯があることが知られている。例えば心筋梗塞の発症は午前中（6-12 時）におきやすい（Muller et al., 1987）。この原因としては交感神経系と副交感神経系のバランスの不安定化、血圧の変動（朝方の急激な上昇（morning surge））、線溶系活性の変化などが考えられている。実際ヒトの線溶系の活性には日内変動が知られており、朝に低く夜に高いパターンを示す（Andreotti et al., 1988）。また、t-PA 活性、血中 t-PA 量や PAI-1 活性にも日内変動が知られている（Andreotti and Kluft, 1991）。

2000 年に線溶系の日内変動を分子レベルで解明しようとする報告がなされた（Maemura et al., 2000）。この報告で Maemura らは、マウスの心臓と腎臓から抽出した RNA を用

いたノーザンブロット法による解析で *Pai-1* の発現自体が概日リズムを刻むこと、Luciferase assay 法によって時計遺伝子がヒト *Pai-1* 遺伝子のプロモータ領域にある時計型 E-box 配列 (CACGTG) を介して *Pai-1* の発現を調節していること、を示した。そしてこれらを根拠として、*Pai-1* が時計制御下遺伝子であると主張した。Maemura らが E-box に対する結合能を示したのは、BMAL1-CLOCK のヘテロダイマーではなく、彼らが単離した *Bmal1* と同じファミリーに属する BMAL2 (CLIF) と CLOCK のダイマーであったが、後に BMAL1-CLOCK も *Pai-1* の E-box に結合できることが示されている (Schoenhard et al., 2003)。

Clock 点突然変異体マウス

体内時計の遺伝子機構の解析には、遺伝子改変マウスや突然変異体マウスが重要な役割を果たしてきた。*Clock* 点突然変異体マウス (*Clock* マウス) は、点突然変異を誘発する変異原 (ethyl-nitrosourea; ENU) を用いたスクリーニングから見出だされてきた点突然変異体であり、恒暗条件下の行動の自由継続リズムの周期が長い変異体である (26-29 時間周期)。また、14 日間以上恒暗条件で飼育するとリズムが消失すると報告されている (Vitaterna et al., 1994)。ポジショナルクローニングによって突き止められた原因遺伝子 *Clock* (circadian locomoter output cycles kaput) は哺乳類で始めて同定された時計遺伝子である (Antoch et al., 1997; King et al., 1997)。

Clock マウスは点突然変異によって 51 アミノ酸を欠いた優性阻害型の CLOCK タンパク質をもつ (King et al., 1997)。優性阻害型 CLOCK タンパク質は E-box を介した転写活性能を欠くので (Gekakis et al., 1998)、*Clock* マウスにおける時計遺伝子発現は振幅が平坦化してしまう。

制限給餌性リズム

マウスやラットは夜行性であって一日の摂食のほとんどを暗期に行う。摂食時間帯を明期の一時期のみに設定してこれを続ける (制限給餌) と、自発行動の位相が給餌時間帯に移ることが知られている。この際、単に行動が給餌時刻に集中するのではなく、給餌時刻の数時間前に自発行動の開始位相が前倒しになる (予知行動)。重要なことに、制限給餌をやめてもこの給餌時刻に依存した行動パターンは残るため、外界からの時刻情報 (定刻に提示されるエサ) に依存した外因性リズムではなく、内因性リズムであることがわかる。哺乳類において時計中枢は SCN に存在し、行動の概日リズムを司っていることが SCN の破壊実験から明らかにされている。しかし、制限給餌性リズムは SCN の破壊によってなお表出されるリズムであることから、SCN 非依存的なリズムの代表例として知られている (Mistlberger, 1994)。

制限給餌性リズムが形成された個体では SCN の時計遺伝子は位相を変化させないが、その他の脳部位 (海馬や大脳皮質など)、肝臓、心臓など末梢臓器の時計遺伝子の発現位相が

変化することが報告されている(Damiola et al., 2000; Hara et al., 2001; Stokkan et al., 2001; Wakamatsu et al., 2001)。

実験の目的

生体内で *Pai-1* が体内時計によって駆動されていることを確認する実験を計画した。もしも *Pai-1* 遺伝子が時計機構の出力遺伝子であるならば、時計遺伝子が振動しない場合には、*Pai-1* の振動も消失すると予測した。そこで、*Pai-1* の振動を時計遺伝子発現の平坦化する *Clock* マウスで検討した。検討には心臓から得た RNA を用いたが、これは Maemura らが *Pai-1*mRNA が心臓で振動することを示していたためである(Maemura et al., 2000)。

この検討に次いで、制限給餌法によって時計遺伝子の発現パターンを変化させた場合に *Pai-1* の発現が位相変位するか検討した。制限給餌性リズム形成によって、末梢の時計は SCN 非依存的に時計遺伝子の位相を変位させる。もしも *Pai-1* が時計遺伝子の制御下にあるのならば、時計遺伝子の位相変位に依存して発現位相を変化させるものと考えた。

方法

実験動物

Clock マウスは Jackson Laboratory から導入し (Stock No. 002923) 研究室で繁殖維持した。遺伝子型の同定は polymerase chain reaction (PCR) 法によって行った (Jin et al., 1999)。マウスは室温 23 °C の飼育室内で、明暗サイクル下に飼育した (明期 12 時間 (8:30-20:30)、暗期 12 時間 (20:30-8:30))。全ての飼育条件で自由摂水とし、給餌時刻を制限しない場合には自由摂食とした。自由摂食下のマウスのサンプリングは ZT5 から 6 時間おきに 4 点行った。マウスの一部は外光の影響を避けて遺伝子発現の振動を検討するために、光の消える時刻 (Zeitgeber Time (ZT) 12; ZT0 を光の点灯時間と定めた) に恒暗条件に移し、24 時間後にサンプリングを開始した (図 2-1A-B)。

マウスの飼育・維持、実験上の取り扱いについては、早稲田大学人間科学部実験動物委員会の承認を得て行なった。

制限給餌法

Wakamatsu らの方法 (Wakamatsu et al., 2001) に従い、以下のようなスケジュールで給餌時刻を制限した。明暗サイクル、自由摂食下に飼育したマウスのエサを、暗期に切り替わる前に取り出した。通常マウスの摂食の殆どは暗期に集中するため、この操作で 1 日絶食させたことになる (絶食した日を Day0 と定義した)。翌日からエサを明期の ZT5-ZT11 の間のみ提示してそれ以外の時間帯はエサをケージからとりだした。この操作を Day1-Day6 まで継続した。サンプリングは Day6 の ZT5 から 6 時間おきに Day7 の ZT5 まで計 5 点行った。Day7 については、エサは与えなかった (図 2-1C)。

サンプルの準備、RNA 抽出および RT-PCR 法

実験には各点 3-6 匹のマウスを用いた。マウスはエーテルで深麻酔し、氷冷生理食塩水 (0.9% NaCl) を心臓から還流した。直後に心臓を摘出して直ちに液体窒素で凍結し、RNA を抽出するまで -80 °C で保存した。

Total RNA の抽出は ISOGEN Reagent (Nippon Gene, Tokyo, Japan) を用いて仕様書どおりに行った。得られた Total RNA のうち 100ng を逆転写反応に用いた。逆転写反応と続く PCR 法は Superscript One-Step RT-PCR System (Invitrogen, CA, USA) を用いてサーマルサイクラー (GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems, CA, USA)) で行った。解析対象は時計遺伝子である *Per1*, *Per2*, *Bmal1*、今回のターゲットである *Pai-1* と、CLOCK の代わりに BMAL1 とダイマーを形成できることが報告されていた (Reick et al., 2001) *Npas2* とした。また、内標準として β -actin の発現量を検討し、半定量的な解析を行った。用いたプライマーは公開されている遺伝子配列から設計した。プライマーの配列と期待される PCR 産物の大きさを表 2-1 に示した。事前検討により、PCR 産物は増幅を 26-30 サイクル行った場合では対数増幅するが 32 サイクルでは飽和状態に達したため、28

サイクルでの増幅産物の差分を比較することとした。PCR 条件は下記の通りである。

cDNA 合成	94	, 2min	50	, 30min
PCR 増幅 (28 サイクル)				
Denaturation	94	, 15sec		
Annealing	55	, 30sec		
Extension	68	, 1min		

PCR 産物は 3%アガロースゲルを用いて電気泳動により展開し、エチジウムブロマイドで染色した後 EDAS-290 システム (Kodak, NY, USA) で解析した。標的遺伝子発現量は β -actin の発現量で相対化した。 β -actin は細胞骨格を形成するタンパク質をコードし、一日を通じて一定量の発現が見込まれるハウスキーピング遺伝子の 1 つで、遺伝子発現量の相対化に用いられる遺伝子である。肝臓のデータではあるが、*Per1*、*Per2* の発現量の日内変動のパターンが、RT-PCR によって遺伝子発現量を β -actin の発現量で相対化して評価した場合と、ノーザンブロット法で解析した場合とで一致していたことから、今回の検討結果には妥当性があると考えられる。

統計処理

データは平均値 \pm 標準誤差で示した。統計処理は一元分散分析によって行い、有意差が見られた場合には Dunnett's two-tailed test によって更なる検討を行った。

結果

心臓における *Bmal1*、*Npas2*、*Per1*、*Per2*、*Pai-1* 遺伝子発現の日周期性

心臓における時計遺伝子、*Pai-1* 遺伝子発現を検討するために、明暗サイクル下でマウスの心臓を 6 時間ごと 4 点採取し、遺伝子発現量を RT-PCR 法で確認した。この結果、調べた時計遺伝子 (*Per1*、*Per2*、*Bmal1*、*Npas2*) すべてに明瞭な日内変動が確認された (図 2-2 及び表 2-2)。 *Bmal1*、*Npas2* の発現ピークは夜間に観られたが (図 2-2B-C)、*Per1*、*Per2* のピークは昼間に観察された (図 2D-E)。 E-box を介して発現制御されるならば、*Pai-1* は *Per1* に似た発現パターンを示すと期待された。実際に *Pai-1* は昼間にピークを示す日内変動を示した (図 2-2F)。 なお Maemura らが報告したとおり (Maemura et al., 2000)、*Bmal2* (*Clif*) は日内変動を示さなかった (data not shown)。

優性阻害型の CLOCK をホモに持つ個体 (*Clock* マウス) では、心臓の時計遺伝子発現の日内変動が減弱もしくは消失していた (図 2-2 及び表 2-2)。 Oishi らが報告したとおり (Oishi et al., 2000)、*Clock* マウスでは *Bmal1* 発現の日内変動が消失し、発現量は野生型のピークに近い値で高止まりしていた (図 2-2B)。 *Npas2* については有意な日内変動が観察されたものの振幅は減弱した (図 2-2C)。 *Per1* 遺伝子の発現も変動しなかったが、発現量は低い値に留まった (図 2-2D)。 *Per2* は有意な振動を示したものの、振幅は減弱し発現量は低い値に留まった (図 2-2E)。 また、有意な振動を検出した *Npas2*、*Per2* とともに位相が前進していた。さらに、予想されたとおり *Clock* マウスでは *Pai-1* 遺伝子の発現振動が消失していた (図 2-2F)。

光の影響を除外するために、同様の実験を恒暗条件下で採取した組織を用いて行った。明暗条件下で行った場合と同様に、時計遺伝子発現、*Pai-1* 遺伝子発現ともに野生型の心臓では振動しており、ピークもほぼ明暗条件で検討した場合と同じであった (表 2-2)。 これに対し *Clock* マウスでは時計遺伝子の振幅が減弱しており (特に *Per1*)、*Pai-1* 発現の振動も消失していた。

時計遺伝子発現と *Pai-1* 遺伝子発現における制限給餌性リズム形成

野生型マウスに、明期の 4 時間 (ZT5-ZT11) のみエサを与える制限給餌を施して 6 日目に心臓を採取して遺伝子発現量を検討したところ、時計遺伝子発現が給餌時刻にあわせて位相を変化させていた (図 2-3B 下)。 自由摂食下のマウス (図 2-3B 上) に比べ、制限給餌群では 6-12 時間の発現位相の前進が観察された。*Pai-1* 発現にも、約 12 時間の位相前進が観察された (図 2-3 及び表 2-2)。

Clock 変異体マウスでも同様の実験を行った。自由摂食下の *Clock* マウスでも有意な振動を示した *Per2*、*Npas2* 遺伝子発現は制限給餌によって位相を前進させた。驚いたことに、自由摂食下では有意な振動を示さなかった *Per1*、*Pai-1* 遺伝子発現に有意な振動が見られた (図 2-4)。 制限給餌下の *Clock* マウス心臓に見られた時計遺伝子、*Pai-1* 遺伝子発現のピークは、同条件下の野生型心臓で見られた発現ピークに似ていた。

考察

時計制御下遺伝子 *Pai-1*

今回の実験で、野生型マウスの心臓での *Pai-1* 遺伝子発現に周期性が見られた。また *Clock* マウスでは時計遺伝子の発現振動が減弱もしくは消失しており、*Pai-1* 遺伝子の発現振動も消失した。これらの結果は、*Pai-1* が時計遺伝子によって制御される遺伝子（時計制御下遺伝子）であることを示している。また、野生型心臓で時計遺伝子発現が給餌時刻に依存して位相を変化させた場合に、*Pai-1* 遺伝子発現も平行して位相を変化させた。このこともまた、時計遺伝子によって *Pai-1* が発現制御されている可能性を支持する。時計遺伝子の変異体で *Pai-1* のリズムが消失したという今回の結果は Maemura らの報告を支持した (Maemura et al., 2000)。

時計機構による *Pai-1* の発現制御については、詳細な検討結果が報告されている (Schoenhard et al., 2003)。Schoenhard らは *hPai-1* の転写開始点から 806bp 上流と 5' 非翻訳領域 72bp を含む 878bp 長の断片をホタルルシフェラーゼに導入したコンストラクトを用いた Luc アッセイを行った。これにより BMAL1-CLOCK、BMAL2-CLOCK のいずれもが *Pai-1* の転写を活性化させることを示した。また、この領域に含まれる 2 つの E-box のうち、転写開始点近位の E-box を変異させた場合には転写活性は少ししか減少しないが、遠位の E-box を変異させた場合には有意に減少すること、さらに両方を変異させた場合には転写が完全に抑制されることを示した。また、BMAL1-CLOCK、BMAL2-CLOCK の影響が E-box を直接介していることを、EMSA (Electromobility shift assay) 法によって示した。これらの結果から、彼らは時計機構による *Pai-1* の転写活性化には上流域にある 2 つの E-box が重要であると結論している。

ヒト *Pai-1* に見られる遺伝子多型である 4G/5G 多型 (5G が少数) は、循環 PAI-1 レベルや虚血性疾患との関連性が指摘されていた (Eriksson et al., 1995; Roest et al., 2000)。Maemura らは 4G/5G 多型が *Pai-1* プロモータ領域の転写開始点に遠位の E-box と一部重なることを示し (Maemura et al., 2000)、これが時計機構が心筋梗塞発症の頻度を支配することと関係するのではないかと考えられたが、Schoenhard らが 4G/5G 多型が *Pai-1* の発現には影響しないことを示したことで 4G/5G 多型と時計機能の間には関係がないものと受け止められている (Schoenhard et al., 2003)。

給餌時刻制限による *Pai-1* 遺伝子発現の位相変化と時間治療

Pai-1 の発現位相が給餌時刻を制限することによって変化したことは、PAI-1 が線溶系活性の調節因子であることから興味深い。このことは *Pai-1* の発現位相を変化させることで、線溶系の活性のピークを変位させられる可能性を示唆しているためである。適切な時刻に適切な医療を施すことで最良の治療効果を得ようとする時間治療の視点から、循環器疾患における重要な治療標的である線溶系の活性を、任意の時刻に動かすことができる可能性が示唆できたことは大きな意味を持つと考える。例えばある種の Ca^{2+} チャンネルのプロック

ーや(Mulcahy et al., 1988)、 アドレナリン受容体の拮抗薬(Fujimura and Ebihara, 1988)で投与時刻依存的な影響があることが期待されていることから、食事時刻を調節することでこれらを用いた場合の治療効果をあげることができるかもしれない。

制限給餌性リズムは主時計 (SCN) のリズムを変えずに、末梢時計だけを位相変位させるため、食事時刻のコントロールによって時間治療に取り組もうという方法について、否定的な意見もある。Yamazaki らは外界からの時刻情報である光が体内時計に影響を及ぼす際には、SCN の時計をまずリセットして次に末梢組織の時計をリセットすることを示し、この末梢と中枢の時計の同調していない状態が「時差ぼけ」の原因である可能性を示した(Yamazaki et al., 2000)。時差ぼけの原因についてはその後議論が続いているが、中枢と末梢の時計を脱同調したときに生じる現象については未知の部分が多いため、今回のような中枢時計と末梢時計とを積極的に脱同調させることは、治療中の患者の生活の質(quality of life; QOL)を低下させることにも結びつきかねない。また今回の知見をそのまま応用するとなると、ヒトでは真夜中のみ食事を与えるということになる。すなわち、食事時刻を変えることそのものがQOLを低下させる原因となってしまう。末梢時計の意義が検討される中で、時間治療の標的となる因子が発見されることは予想に易しい。今後の時間治療を考えていく上で末梢時計のみを位相変位させる意味(主作用)と、中枢と末梢の時計を乖離することで生じる影響(副作用)について検討することが重要である。

心臓における時計遺伝子

野生型心臓で時計遺伝子が明瞭な振動を示したことは、心臓に時計の分子機構が備わっていることを支持していた。新しい知見として、*Npas2* 発現が明瞭な概日振動を示した。NPAS2はCLOCKと高い相同性を示し、NPAS2とBMAL1の共発現により*Per1*、*Per2*、*Cry1* 遺伝子の転写が活性化することが知られていて、SCN以外でNPAS2がCLOCKの代わりにBMAL1のパートナーになりうると考えられている(Reick et al., 2001)。このことから、心臓で*Per1*や他のE-box制御の遺伝子がCLOCK-BMAL1以外にもNPAS2-BMAL1(あるいはMaemuraらの示すようにCLOCK-BMAL2)によって発現調節されている可能性がある。例えば*Clock* マウスでも時計遺伝子の発現振動が完全に消失しなかったのは、NPAS2-BMAL1を介した概日性の遺伝子発現制御が残っていたためだと考えられる。マウス心臓における*Npas2*の機能についてはCurtisらがクロマチンリモデリングとの関係で報告をしている(Curtis et al., 2004)。彼らはNPAS2が心臓で時計機構を担っていることを示唆しており、そのメカニズムはNPAS2-BMAL1ヘテロダイマーに転写のコアクチベータであるp300/CBPが共役してE-boxを介した時計遺伝子発現を正に制御するものであるとした。

今回の*Clock* マウス心臓で見られた時計遺伝子発現リズムの減弱は、次のように説明できるだろう。*Per1*: E-boxを介した転写活性が低下したために、昼間における転写活性の上昇が見られなかった。このため、低い発現レベルで留まるように遺伝子発現リズムが

減弱したと考えられる。*Per2*に関しては時計型の E-box が同定されていないが、E-box に似た配列が転写制御に重要だという学会報告もあり、同様のメカニズムで振動が減弱したものと考えられる。*Bmal1*：抑制性の転写因子である *Rev-erba* が *Bmal1* の転写制御を担うことが知られている (Preitner et al., 2002)。*Rev-erba* の発現は時計型 E-box によって制御されていて、*Clock* マウスでは E-box を介した転写活性が低下したために、肝臓で見られるように (Oishi et al., 2003) 心臓でも *Rev-erba* の発現量が低下したものである。その結果周期的な抑制が外れ、*Bmal1* は終日発現量が高い状態でリズムを失ったと考えられる。*Npas2* については発現調節部位が特定されておらず、現時点で考察が難しい。

制限給餌性リズム形成と *Clock* 遺伝子

給餌時刻制限は SCN の時計遺伝子リズムには影響しないので、末梢時計の制限給餌性リズム形成には時計中枢の振動は関係ないと考えられる (Damiola et al., 2000)。SCN 破壊マウスの肝臓でも時計遺伝子の位相変位が生じたことは、これを支持する結果である (Hara et al., 2001)。このことは、末梢時計それ自体が給餌時刻にあわせて位相を変位させたと解釈できるが、末梢時計を構成する遺伝子 (例えば *Clock*) の制限給餌性リズム形成に果たす役割については、解析がなされていない。

今回の実験で、自由摂食下の *Clock* マウスでは失われていた時計遺伝子リズムが、給餌時刻を制限することで回復することが示された。このことは、正常な CLOCK が制限給餌性リズム形成に必須でないことを示している。この結果は、Oishi らによって独立に確認された (Oishi et al., 2002)。制限給餌性リズムは末梢遺伝子発現だけではなく、行動リズムにも現れる。今回は、*Clock* マウスで行動リズムにも制限給餌性の日内変動が生まれるかについては触れていないが、Pitts らが行動リズムに給餌時刻制限が与える影響を検討した実験を行い、自由摂食下では乱れている *Clock* マウスの行動リズムが、給餌時刻制限により明瞭な概日周期を示す制限給餌性リズムを形成することを報告している (Pitts et al., 2003)。

SCN 非依存性リズムの代表に、一定時刻に覚醒剤であるメタンフェタミン (MAP) を与え続けたときに観察される MAP 依存性リズムがある。Masbuchi らは *Clock* マウスでも輪回し行動に見られる MAP 依存性リズムが観察できることを示した (Masubuchi et al., 2001)。正常な CLOCK がない場合にリズムを生み出すメカニズムについては、NPAS2 が CLOCK の機能を代償している可能性が示唆できる。事実 NPAS2 は SCN では発現がないが前脳ではリズムに発現していて時計機構の一員として機能するという報告があり (Reick et al., 2001)、SCN 非依存性リズム形成に関与する可能性がある。興味深いことに *Npas2* 遺伝子欠損マウスでは、制限給餌性リズム形成が遅いことが報告されていて、*Npas2* が制限給餌性リズム形成に関与することが示唆されている (Dudley et al., 2003)。

まとめ

- 1 . 心臓の時計において *Pai-1* が時計制御下遺伝子であることを、時計遺伝子の変異体である *Clock* マウスを用いることで示した。またこれを支持する結果として、給餌時刻制限によって形成された時計遺伝子発現位相の変化に平行して *Pai-1* 遺伝子発現の位相が変位することを確認した。
- 2 . *Clock* マウスにおいても制限給餌性リズムが形成されることを示した。これは制限給餌性リズム形成に *Clock* 遺伝子が関与しないことを示唆していて、報告時点では世界初の知見であった。

第二章 白色脂肪組織における出力遺伝子の包括的探索

序

白色脂肪組織

動物の体内には、褐色脂肪組織と白色脂肪組織の二種類の脂肪組織がある。褐色脂肪組織の中心はミトコンドリアを多く含む褐色脂肪細胞であり、脂肪を燃やして熱を産生し体温を維持するのに寄与する組織である。組織分布は限局していて、腋窩部、肩甲骨周囲のみ少量見られる。他方白色脂肪組織は、大部分を油滴によって占められる白色脂肪細胞に加え自律神経や繊維などから成る組織で、腸間膜間、精巣周囲など内臓周囲、腹部、腰部、大腿部の皮下に特に顕著である。

白色脂肪組織は、単にエネルギー源としての脂肪を貯蔵する組織だととらえられてきたが、近年の研究により生体の恒常性を維持する重要な役割を持つ組織であることがわかってきた。肥満（脂肪が蓄積した状態）がインスリン非依存性の II 型糖尿病のリスクファクターとなることが示されてきたが、脂肪を蓄積できない患者にも重篤な糖尿病が発症することが知られており、マウスモデルでも示されている(Moitra et al., 1998)。これは脂肪組織が生体の糖代謝などのエネルギーバランスを整えるのに重要な役割を果たしていることを示唆する一例である。近年の研究から、白色脂肪組織は貯蔵庫のような静的な組織ではなく、内分泌器官として働く動的な組織であることがわかってきた。例えば Body Map プロジェクトの一環としてヒト脂肪組織で発現する遺伝子の約 30%が分泌性タンパク質をコードしていることが示されている(Maeda et al., 1997)。白色脂肪組織の分泌する生理活性物質を総称して、アディポサイトカインと呼ぶ。アディポサイトカインには、レプチンやアディポネクチン、レジスチン、TNF α 、PAI-1などが含まれる。例えばレプチンは摂食を抑制的に支配するホルモンであるが、血中レプチン濃度には日内変動があることが知られている(Ahima et al., 1996; Licinio et al., 1997)。ラットを使った実験で視交叉上核を破壊するとレプチンの血中リズムが消失すると報告されていることから、レプチンのリズムは体内時計の制御下にあるものと考えられる(Kalsbeek et al., 2001)。また前章で議論したとおり、線溶系の制御因子 PAI-1 には概日リズムが知られている。血中 PAI-1 レベルは肥満と相関して増大することから、体内の PAI-1 循環量に対する脂肪組織の役割は大きいかもしれない(Shimomura et al., 1996)。

DNA マイクロアレイ法

ヒトゲノム計画に代表されるような種々の生物のゲノム解読計画が進展した結果、これまでのように標的をしばりこんで行う候補絞り込み型研究 (candidate study) ではなく、全遺伝子を対象とした包括的研究 (Comprehensive Study) が可能な時代が到来した。後者の代表的な研究手法として、DNA マイクロアレイ法を用いた発現解析研究 (Transcriptome Analysis) があげられる。DNA マイクロアレイ法は、ガラス板に検出し

たい遺伝子とハイブリダイズするようなプローブを高密度に付着させ、標識したサンプルがプローブにハイブリダイズした場合に得られるシグナル強度によって、遺伝子発現量を調べる方法である。

DNA マイクロアレイは作成法により大きく二つに分けられる。一つは Stanford 大の Brown や Davis のグループが開発したタイプ（いわゆる「DNA マイクロアレイ」）で、プローブとして cDNA をガラス表面に高密度にスポットして付着させ、これに対するハイブリダイズ強度を調べるものである。DNA マイクロアレイの応用として二蛍光標識法があり、原理は実験群とコントロール群のサンプルを二色の蛍光色素で別に標識しておき、同一マイクロアレイ上で競合的ハイブリダイゼーションを行って、両方の傾向を測定・比較することで遺伝子発現の差を検出しようというものである。よく用いられるのが Cy3（赤）と Cy5（緑）という蛍光色素で、二つのサンプルで差があれば赤あるいは緑に、同等であれば黄色に混色した像が得られ、どちらも結合しなければシグナルがでない。利点は比較したいサンプルを同じアレイ上で処理することが出来る点だが、欠点はスポットが不均一になりやすいことである。

もう一つのタイプは Gene Chip（DNA チップ）と呼ばれる。これは光リソグラフィという半導体チップの作成に用いられる技術を応用し、直接ガラス表面にヌクレオチドを合成して標的遺伝子に対するプローブを作成するものである。特徴はチップ上に 1 遺伝子に対するプローブが複数組（2004.9.時点の最新のもので 11 組）存在すること、またプローブに perfect match（PM）と mismatch（MM）の二種類があることである。プローブは 25 塩基長であるが、MM では 13 番目のヌクレオチドの配列を A（T）ならば G（C）というようにプリン（ピリミジン）同士で変えてあり、非特異的に結合したシグナルについて検討できるように工夫されている。予めサンプルをビオチンラベルしておいてチップ上にハイブリダイズさせ、蛍光色素（フィコエリスリン）標識したストレプトアビジンを結合させて画像をスキャナーで読み込み、Affymetrix 社のソフトウェアで解析するという方法である。このタイプの利点は、複数のプローブから遺伝子発現を検出することによって偽陽性を減らすことが期待できることである。欠点は発色に一種類の蛍光色素しか用いないので、サンプル間の比較を別々のチップで行わなければならない点である。このため比較に際しては、個々のチップの差（実験誤差）を標準化するような作業を行う必要がある。

体内時計とトランスクリプトーム解析

分子レベルで見た場合、体内時計は転写因子の複雑なネットワークによって構成されている。この時計機構の分子ネットワークは時計機構の中核 SCN の他にも、肝臓や心臓、筋肉などの様々な臓器にも存在するし、Rat-1 ラット由来繊維芽細胞や NIH/3T3 マウス由来繊維芽細胞などにも存在が確認されている（序論参照）。時計遺伝子は転写因子として、時計機構の中心を形成する遺伝子群（時計（関連）遺伝子群）だけではなく、様々な生理機構を制御する因子として同定されているような遺伝子の発現をも制御する。

体内時計は24時間という比較的長い時間幅で、一定の状態を繰り返す安定した系である。転写因子のネットワークがその基本にあるため、転写単位でおきる現象をすべて検討しようというトランスクリプトーム解析には好適であった。DNA マイクロアレイでは、プローブごとにハイブリダイズの条件が異なるので遺伝子発現量の多寡を異なった遺伝子間で比較することは出来ないが、同じプローブの間ならば可能である。それゆえ48時間分のサンプルを4時間ごと12点にわけて採取すれば、24時間の周期を持って振動するような遺伝子を、再現性をもって選択してることが出来る。言い換えれば、DNA マイクロアレイを用いることで、一度に標的組織での24時間周期で振動する特定の生理機能を担う遺伝子(出力遺伝子)を探索することが可能になった。すでに、実験を行いやすい細胞株(Rat-1)はもちろん(Duffield et al., 2002; Grundschober et al., 2001)、時計中枢であるSCN(Panda et al., 2002; Ueda et al., 2002)、肝臓(Akhtar et al., 2002; Kita et al., 2002; Panda et al., 2002; Storch et al., 2002; Ueda et al., 2002)、心臓(Storch et al., 2002)、松果体(Humphries et al., 2002)と様々な組織で概日リズムを刻む遺伝子(一部では昼夜差のある遺伝子)の同定が試みられており、調べられた遺伝子のうち1-9%が変化していることが判明した(Delaunay and Laudet, 2002)。驚くべきことに、時計遺伝子など一部の遺伝子を除いて多くの振動遺伝子は臓器ごとに異なっており、末梢臓器の時計がそれぞれ特有の生理機構を制御している様子が浮かび上がってきた。

実験の目的

白色脂肪組織における時計機構の役割を検討した。まず、白色脂肪組織に内在性の時計の分子機構が存在することを確認した。白色脂肪の過剰な蓄積によって起きる肥満は多くの疾患のリスクファクターであり、今後時間治療を考える上で、白色脂肪組織における時計の出力遺伝子の同定はきわめて意義があることである。この目的でDNAチップを用いたトランスクリプトーム解析を行い、ゲノムワイドに振動遺伝子を同定した。また、ゲノムプロジェクトの成果であるマウスドラフトゲノム配列が公開されているので、振動遺伝子が既存の時計遺伝子が結合する転写因子結合領域(E-box、D-box、RRE)をもつか検討することが可能である。そこで公開されているデータベースを利用し、DNAチップで同定された振動遺伝子が、機能する時計制御配列をもつ時計制御下遺伝子が検討した。

方法

Per2-dLuc 遺伝子導入ラットの作成と培養組織の発光量の PMT による検出

概日振動を惹起するのに必要な *mPer2* プロモータ部位 (chr1: 91667305-91663790 on Mouse Genome UCSC Genome Browser, Feb. 2003) を、改変型ホタルルシフェラーゼベクター (pGL3-*dLuc* vector) に挿入したものを準備した (*Per2-dLuc* vector:(Ueda et al., 2002))。pGL3-*dLuc* ベクターは pGL3-basic ベクター (Promega, Madison, WI) を改変したもので、オルニチン脱炭酸酵素の PEST 配列 (自身の分解を促進させるモチーフ) をルシフェラーゼ (*Luc*) のカルボキシル末端側に挿入し、半減期を約 30 分にしてシグナルの時間的な検出感度をよくしたものである (destabilized *Luc*: *dLuc*)。 *Per2-dLuc* ベクターから *Per2* プロモータと *dLuc* をコードする領域 (約 5.4kb) を制限酵素 (*Mlu*I, *Sa*I) で切り出して精製し、トランスジェニック (Tg) ラットを作成した (Y.S. New Technology Institute, Utsunomiya, Japan)。 Tg ラットは Wister 系ラットと交配して維持し、導入遺伝子の有無はルシフェラーゼを認識するプライマーを用いた PCR 法によって判定した (Forward Primer: 5'-TTT ATA ATG AAC GTG AAT TGC TC-3', Reverse Primer: 5'-CGT ATT TGT CAA TCA GAG TGC-3', PCR Products: 539bp)。 ラットは 12 時間ごとの明暗サイクル (light on: 8:30-20:30) で飼育し、エサと水は自由に与えた。

サンプリングは、ラットをエーテルで深麻酔にかけて行った。迅速に脳を摘出し、400 μ m 厚の冠状切片を作成して SCN を含む組織片を切り出した。白色脂肪組織 (副睾丸脂肪) を摘出し、約 3 x 3 mm のブロックを得た。肺を摘出し、同様に約 3 x 3 mm のブロックを得た。松果体は頭蓋骨をはずして採取し、カットしたりせずにそのまま測定に用いた。組織片は培養用のメンブレン (Millicell-CM, PICM030-50; Millipore, Billerica, MA) に載せてフタをグリース (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) で密閉した 35mm 培養用ディッシュ (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ) に入れて微弱発光計測装置 (Photomultiplier tube (PMT); Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan) にかけた。培地にはフェノールレッドフリーの DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium; Invitrogen, Carlsbad, CA) に抗生物質 (25U/ml ペニシリン、25mg/ml ストレプトマイシン) と B27 サプリメント (Invitrogen, Carlsbad, CA) を加えて HEPES 緩衝液で ~pH7 に調整したものをを用いた。組織片を 7 日以上連続して静置培養し、37 $^{\circ}$ C に保った保温庫内で発光量を連続的にモニターした。

遺伝子発現解析用のサンプルの準備と DNA チップ解析

10 週齢の雄性 C57Bl/6 マウス (CLEA Japan, Tokyo, Japan) を購入し、2 週間 12 時間ごとの明暗サイクル (LD, light on: 8:30-20:30) で飼育して馴化した。この間エサと水は自由に与えた。一部のマウスについては光変化のない状態での遺伝子発現プロファイルを得るために、サンプリングの 2 日前に恒暗条件 (DD) に移した。LD 条件における消灯時刻 (=20:30) を Zeitgeber Time (ZT)12、DD 条件における行動の開始時刻 (=20:30) を

Circadian Time (CT)₁₂ と定め、サンプリングを行った。サンプリングは、ZT/CT₁₂ から 4 時間ごとに 48 時間にわたって 12 点行った。

マウスをエーテルで深麻酔した後開腹し、副睾丸脂肪を採取して直ちに液体窒素で凍結し、-80℃ で保存した。ISOGEN Reagent (Nippon Gene, Tokyo, Japan) を用いて精製し、DNaseI (Nippon Gene, Tokyo, Japan) で処理して total RNA を得た。DNA チップ解析には、一時点につき 3-4 匹分の RNA をプールしたものをを用いた。DNA チップ解析に用いた cRNA は既報の通りに調整した (Ueda et al., 2002)。SuperscriptII 逆転写酵素 (Invitrogen, Carlsbad, CA) を用いて 10 μ g の total RNA から T7 プロモータを持った相補的 (complementary) DNA (cDNA) を合成し、これを鋳型として *in vitro* translation によりビオチン化 cRNA を合成した (ENZO BioArray High Yield RNA transcript labeling kit; Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY)。得られた cRNA を断片化し、Affymetrix high-density oligonucleotide arrays for *Mus musculus* (Murine Genome Array U74A; Affymetrix, Santa Clara, CA) にハイブリダイズした。蛍光物質をつけたストレプトアビジンを用いて染色し、スキャナーで画像を取り込んで蛍光強度を測定した。

データ解析

振動遺伝子の抽出

白色脂肪組織において、LD と DD の両条件下で振動する遺伝子を抽出するために、LD のタイムコースと DD のタイムコースの 2 つに対するフィルターを通した。LD 条件下で振動する遺伝子を抽出するために、それぞれのプローブセットの 12 時点の発現変化と 20 時間周期から 28 時間周期まで 1 時間おきに周期を変えた余弦波との相関係数を求めて、統計的に有意なものを抽出した。それぞれの試行周期における位相を 60 用意した (= 同じ周期で刻む等間隔に並ぶピークが 60 ある) ので、合計 540 の試行余弦波を用意したことになる。540 の余弦波によるフィルターを通すことで、プローブセットの総数約 12,600 に対する 95% のランダム発現パターンが除外されるようにカットオフ値を設定した。同様にして DD でも同じフィルターを通して振動遺伝子を抽出した。

ピーク時刻の解析

振動遺伝子の発現ピークを推定するために、各プローブの 12 時点の発現データと、ピークを 10 分間刻みで変更した 24 時間周期の余弦波との相関係数を求めた。この解析から、もっとも相関係数の高かった余弦波のピーク時刻を、振動遺伝子のピーク時刻とした。

階層的クラスタリング法

白色脂肪組織で振動を示したプローブについて階層的クラスタリングを行った。ここでは 4 日分 (LD2 日間 + DD2 日間) のデータを用いて、pair-wise average linkage クラスタ解析を行った。クラスタ解析の前に、データを 2 日分の平均が 0.0、標準偏差が 1.0 になるように標準化した。類似性を見るためには相関係数を用いた。遺伝子間の関係を樹状に示し、枝の長さに遺伝子間の類似性の度合いを反映させた。

定量的 PCR 法

定量的 PCR 法は、PCR によって DNA の二本鎖が合成されたときにのみ結合する試薬(インターキレート) を反応液にいれて二本鎖の総数を定量することで、遺伝子のコピー数をリアルタイムに測定することが出来る方法であり、規定量のゲノム DNA を鋳型としてスタートのコピー数を定めることで、サンプルに含まれていた RNA のコピー数を決定できる定量性の良い方法である。今回は、PRISM7900 システム(Applied Biosystems, Forster City, CA)を用いた。0.5mg の total RNA から SuperScriptII 逆転写酵素(Invitrogen, Carlsbad, CA)を用いて cDNA を合成した。1 x SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Forster City, CA) を用いて以下に示す反応条件で実験を行った。

95 (10分) 94 (15秒) 60 (30秒) 72 (1分)
ただし を 40 サイクル繰り返す

エクソン内に設計したプローブを用い、マウスゲノム DNA を用いた標準線を求めて、遺伝子発現の絶対量を求めた。また、内標準として *GAPDH* の発現量を調べた(Ueda et al., 2002)。

サンプルは DNA チップ解析に用いたのと同じ total RNA を使った。データの検証のためには、DD 条件のプールしたサンプル(各点 n=1)を用いた。振動遺伝子の同定のためには LD、DD 両条件のサンプル(各点 n=3~4)を用いた。後者については一元分散分析(1-way ANOVA)によって振動しているかどうかを検討した。

進化的保存領域における包括的時計遺伝子結合領域候補配列の探索

マウスとヒトの標的遺伝子のイントロンを含む全長配列及び 10kb 上流までの配列を UCSC Genome Browser から取得した。進化的な保存領域で時計遺伝子結合領域候補配列を探索するために、マウスとヒトとの配列を NCBI の BLAST2 プログラムにより比較し、次に示す時計遺伝子結合領域候補配列を検索した。

時計型 E-box	CACGTG
DBP 結合領域 (D-box)	TTA[C/T]GTAA
Rev-erb/ROR 応答領域 (RRE)	[A/T]A[A/T]nT[A/G]GGTCA

RRE については太字で示した 5 塩基のうち 1 塩基のミスマッチを許した。

SV40 ベーシックプロモータでドライブされる dLuc レポーターベクターの構築

SV40 ベーシックプロモータでドライブされる *dLuc* レポーターベクターは、pGL3-promoter ベクター (Promega, Madison, WI) より改変して作成した(Ueda et al.,

2002)。時計遺伝子結合領域候補配列を中央に含むマウスゲノム配列 (E-box; 18bp, D-box 及び RRE; 23bp) を 3 回直列に繰り返したものを SV40-*dLuc* ベクターの *Mlu*I サイトと *Bgl*II サイトに挿入した (wild-type; W)。これに対し、時計遺伝子結合領域候補配列を以下のように置換したのも作成した (mutant; M)。

E-box (M)	ACCGGT
D-box (M)	CACCCGGC
RRE (M)	[A/T]A[A/T] _n TCCTACG

細胞培養、Luc アッセイ及び体内時計による転写のダイナミクスのモニタリング

Luc アッセイには NIH/3T3 細胞を、転写のダイナミクスのモニタリングには Rat-1 細胞を、それぞれ用いた。NIH/3T3 細胞、Rat-1 細胞とも DMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA) / 10% FBS 培地で 37 °C、5%CO₂ に維持されたインキュベータで培養した。

Luc アッセイのために、トランスフェクション前日に 24 穴培養用プレートに NIH/3T3 細胞を 1.2×10^5 細胞播種した。LipofectAMINE2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) を用い、内標準として *Renilla Luc* をチミジンキナーゼプロモータに導入した pRL-TK (2ng, Promega, Madison, WI) と SV40-*dLuc* に時計遺伝子応答領域該当配列を導入したもの (W/M, 10ng) を細胞にトランスフェクトした。このとき pCI-*Bmal1* (100ng)、pCI-*Clock* (100ng)、pCI-*Cry1* (100ng)、pCMV-*Dbp* (100ng)、pCMV-*E4bp4* (300ng)、pCI-*Rora* (100ng)、pCI-*Rev-erba* (100ng) を組み合わせて導入した。導入した DNA 量が 412ng になるように pCI-neo (Promega, Madison, WI) もしくは pCMV-Sport6 を加えて調節した。トランスフェクションの 24 時間後に細胞を回収し、Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega, Madison, WI) を用いて解析した。

体内時計による転写のダイナミクスをリアルタイムモニタリングするために、トランスフェクション前日に 35mm 細胞培養用ディッシュに Rat-1 細胞を 3.0×10^5 個播いた。LipofectAMINE (Invitrogen, Carlsbad, CA) を用いて SV40-*dLuc* に時計遺伝子応答領域該当配列を導入したもの (W/M, 1 μ g) をトランスフェクトした。約 68 時間後、デキサメタゾン (Sigma, St.Louis, MO) で 1.5 時間刺激し、10mM HEPES (pH7.2)、0.1mM ルシフェリン (Promega, Madison, WI)、抗生物質 (25U/ml ペニシリン、25mg/ml ストレプトマイシン) を加えた 2ml の培養用メEDIUM に置換して、30 °C に保った保温庫内で PMT により発光量を測定した。

タンパク質合成と EMSA

N 末端 GST タグと Gateway cassette をもつ断片を、pDEST15 ベクター (Invitrogen, Carlsbad, CA) から *Nde*I、*Nhe*I で切り出して平滑末端化し、pEU3-NIK (Wakenyaku, Kyoto, Japan) ベクターの *Eco*RV サイトに導入した (pEUGW-5'G)。PCR によってマウス *Dbp*

(739-978bp from start codon)、ヒト *E4bp4* (193-432bp)、マウス *Rev-erba* (370-651bp)、マウス *Rora* (25-300bp)を増幅し、pDONR221 ベクター (Invitrogen, Carlsbad, CA) にサブクローニングした。これを Gateway™テクノロジーによって pEUGW-5'G に挿入した。

GST 融合タンパク質の *in vitro* transcription / translation は小麦胚芽抽出物による cell-free translation system (PROTEIOS; Wakenyaku, Kyoto, Japan) によってマニュアルどおりに行った。タンパク質の精製は、Glutathione Sepharose4B (Amersham Bioscience, Piscataway, NJ) によって行い、精製したタンパク質はウェスタンブロット法により確認した。

IRDye800 ラベルによる Electromobility shift assay (EMSA) は Sano らの報告したとおりに行った(Sano et al., 2001)。相補的な IRDye800 ラベル化オリゴ (Aloka, Tokyo, Japan) と非標識ヌクレオチド (Proligo, Coast Blvd, CA) をアニールして、E-box、D-box または RRE を中心に持ち両サイドに 5-7bp の付加配列をもつプローブを作成した。8fmol のラベル化プローブを 10mM Tris-HCl、50mM NaCl、0.5mM EDTA、2mM MgCl₂、4% glycerol、0.5mM DTT、0.5mg/ml BSA、0.5μM poly(dIdC) (Amersham Bioscience, Piscataway, NJ) 存在下で約 100ng の精製 GST タグ付きタンパク質と 15 分間室温でインキュベートした (final vol. 10μl)。125 倍量の非ラベル化プローブ (配列そのまま (W) および時計遺伝子結合領域候補配列を変化させたもの (M)) を competitor として用いた。ローディングバッファー (0.015% BPB, 3% glycerol, 3mM DTT) を加えた後、反応液を 10mM MgCl₂、2.5% Glycerol を含む 8% ポリアクリルアミドネイティブゲル (79:1) で LI-COR 4000L DNA sequencer (LI-COR Biosciences-Biotechnology, Lincoln, NE) を改造したもので展開して (0.5 x TBE) 画像を取得した。

動物福祉

組織の採取は全て深麻酔下にすばやく行い、動物に与える苦痛を低減するように心がけた。動物実験は山之内製薬 (株) 動物実験委員会の承認を得て行った。

Web-Site

DNA チップのアノテーションは以下のサイトの情報に従って行った。

Affymetrix <http://www.affymetrix.com/index.affx>
LocusLink* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink/>
Ref-seq* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/>
UniGene* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=unigene>
OMIM program* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM>

マウスの振動遺伝子のヒトホモログは HomoloGene から同定した。

HomoloGene* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=homologene>
マウスとヒトの標的遺伝子及び 10kb 上流の配列は UCSC のサイトより取得した。

UCSC Genome Browser <http://www.genome.ucsc.edu/>

Mus musculus: Feb. 2003, NCBI Build 30 に基づく

Homo sapience: April. 2003, NCBI Build 33 に基づく

マウスとヒトの標的遺伝子及び 10kb 上流の配列の比較は、BLAST2 によって行った。

Paired-BLAST search* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html>

なお、*を付したものは National Center for Biotechnology Information が公開している
サイトである。

結果

培養白色脂肪組織片における時計遺伝子の振動

はじめに白色脂肪組織に時計の分子機構が内在するか、遺伝子導入ラット (Tg ラット) を作成して検討した。導入遺伝子には、*mPer2* 遺伝子のプロモータ領域に、易分解性の改変型ホタルルシフェラーゼ (destabilized luciferase; dLuc) をつないだもの (*Per2-dLuc*) を用いた (図 3-1A)。

LD サイクル (明期 12 時間 / 暗期 12 時間) で飼育した Tg ラットから採取した時計中枢 SCN を含む脳組織片を、基質 (ルシフェリン) 入りの培地で培養して微弱発光計測装置 (photomultiplier; PMT) で発光量を経時的に検出したところ、明瞭な概日振動を示した (図 3-1B 左上)。同じように、時計と関係が深い組織である松果体を摘出して培養したところ、きれいな発光の概日振動を検出した (図 3-1B 左下)。末梢組織でも振動が捉えられるか検討するために、肺の組織片を培養して観察したところ、きれいな概日振動を得た (図 3-1B 右下)。また、白色脂肪組織である副睾丸脂肪組織を採取して PMT で観察したところ、発光量の概日振動を確認した (図 3-1B 右上)。SCN では比較的安定した発光の振動パターンを示し、白色脂肪組織では肺や松果体に似てリズムが不明瞭化していくパターンを示した。

白色脂肪組織に内在性の時計の存在が確認されたことから、DNA チップを用いたトランスクリプトーム解析を行った。以降の検討では遺伝学的検討の進んでいるマウスを用いた。

白色脂肪組織におけるゲノムワイドな遺伝子発現解析

白色脂肪組織における振動遺伝子を同定するために、トランスクリプトーム解析を行った。

LD 条件下および DD 条件下で飼育したマウスの副睾丸脂肪を 2 日間にわたって Zeitgeber Time (ZT)/Circadian Time (CT)12 から 4 時間ごと 12 点採取した。Total RNA を抽出し、各点 3-4 匹分をプールしてサンプルとし、ビオチン化 cRNA を合成して Affymetrix マウス高密度オリゴヌクレオチドアレイ (DNA チップ) にかき、得られたデータをコサインフィルターに通し、両方の条件で振動する遺伝子を特定した。この結果、白色脂肪組織では、202 遺伝子 (206 プローブ) が統計的に有意な概日振動を示す遺伝子 (振動遺伝子) として同定され、この中には既知の時計遺伝子が含まれていた (図 3-2A)。

図 3-2B には LD と DD のピーク時刻の平均に沿って振動遺伝子を並べたものを示した。各振動遺伝子のピーク時刻は 24 時間にわたって分布しており、ZT/CT0 から 4 時間ごとにクラス分けした場合には次のようであった。ZT/CT0-4: 15 遺伝子、ZT/CT4-8: 31 遺伝子、ZT/CT8-12: 55 遺伝子、ZT/CT12-16: 33 遺伝子、ZT/CT16-20: 36 遺伝子、ZT/CT20-24(0): 32 遺伝子。さらに階層的クラスタリング解析によって、図 3-2C に示すように大きく 5 つのクラスターを見出すことができ、各クラスターに含まれる時計 (関連) 遺伝子で代表させた場合次のようになった。*Rev-erb 1/Per1* クラスター (50 遺伝子、平均ピーク位相

ZT/CT10.8) *Per2* クラスター (32 遺伝子、ZT/CT14.9) *Cry1* クラスター (32 遺伝子、ZT/CT19.2) *Bmal1* クラスター (21 遺伝子、ZT/CT21.2) *X* クラスター (37 遺伝子、ZT/CT6.8) 35 遺伝子が主要 5 クラスターに含まれなかった。各クラスターに含まれる遺伝子の詳細については表 3-1-3-6 に示した。

DNA チップ法で得られた結果を確認するために、各クラスターから 3 遺伝子ずつを選び、計 15 遺伝子の発現パターンを調べた。検討は、DNA チップに用いた DD 条件で採取した RNA (プールしたもの) を用い、定量的 PCR 法によって行った。この結果、図 3-3 に示したとおり DNA チップ法で見られた発現パターンと定量的 PCR 法で見られた発現パターンは発現位相、振幅とも非常に似ており、DNA チップによる測定結果は妥当だと考えられた。

体内時計による生理機構調節遺伝子の制御

白色脂肪組織で振動した 202 遺伝子について、振動遺伝子と生理機能とを結び付ける試みを行った。

線溶系と細胞外マトリクスリモデリング機構

前章に詳述したとおり、PAI-1 や tPA など線溶系 (図 3-4A) の因子は概日振動を示すことが知られている。今回の解析で、白色脂肪組織での発現が知られている *Pai-1* 発現の明瞭な概日振動をとらえることができた。*Pai-1* の振動は、定量的 PCR 法によっても確認された (図 3-4B)。その他の線溶系の因子については、DNA チップでは振動が確認されなかったが、定量的 PCR 法による解析で、*tPa* に明瞭な概日振動を捉えることができた。他に、*in vitro* ではウロキナーゼ前駆体と結合して活性化型 (ウロキナーゼ; uPA) にすることが知られているウロキナーゼ受容体 (*uPar*) の発現も、統計的に有意な変動を示した (図 3-4B)。しかし、uPA、tPA /uPA によって活性化されるプラスミンの前駆体 (プラスミノゲン) や uPA、また PAI-1 活性を安定化させるビトロネクチンの発現レベルは振動を示さなかった (data not shown)。

線溶系のキーモレキュールであるプラスミンはまた、細胞外マトリクス (ECM; extracellular matrix) の構成因子を分解するマトリクスメタロプロテアーゼ (MMP; matrix metalloproteinase) の一部、たとえば MMP9 を活性化することが知られている (Davis et al., 2001)。MMP は ECM を構成する IV 型コラーゲンやエラスチンを分解する (ECM リモデリング) 因子であって、MMP の内在性の阻害因子は TIMP (tissue inhibitor of matrix metalloproteinase) と呼ばれる (図 3-4A)。DNA チップ法で見出された振動遺伝子に、*Mmp9* (ゲラチナーゼ B)、*Mt1-Mmp* (膜透過型 *Mmp1*、*Mmp14*) が見出された。また内因性阻害因子 *Timp3* にも振動が検出された。さらに、ECM 構成因子である IV 型コラーゲン (*Col4a1*)、エラスチン (*Eln*) にも振動が認められた。これらの振動は定量的 PCR 法で確認され、ECM 構成因子の振動のピークや *Mmp* の振動のピークが阻害因子である *Timp3* のピークより早いことが判明した (図 3-4C)。

細胞周期

細胞周期は G1 期、S 期、G2 期、M 期の 4 つに大別されるフェーズを繰り返す機構であり、フェーズの切り替えにはサイクリンとサイクリンによって活性化されるサイクリン依存性キナーゼ (CDK) が重要な働きを示すことが知られている (図 3-5A)。CDK の活性化を抑制するのが P21CIP1 (CDKN1A) であり DNA チップで振動が検出された遺伝子であった。この *p21Cip1* の振動は定量的 PCR によっても確認された (図 3-5B)。

CDC25B によって活性化される CDC2 (CDK1) は、抑制因子 WEE1 によって抑制される (図 3-5A)。定量的 PCR によって *p21Cip1* 以外にも *Wee1*、*Cdc25b* に振動が確認された (図 3-5B)。しかし、他のサイクリンや Cdk には振動が確認できなかった (data not shown)。重要なことに活性因子 *Cdc25b* は抑制因子 *Wee1* よりも早いピークを迎えており、遺伝子ごとにピーク位相を整える時間的な制御が見られた (図 3-5B)。

ゲノム情報を用いた振動遺伝子の遺伝子発現調節領域の探索

DNA チップで見出されてきた 202 遺伝子と定量的 PCR によって日内発現に統計的有意差の見られた *tPa*、*uPar*、*Wee1*、*Cdc25b* が、どのようにして振動するのか検討した。遺伝子発現領域が重要であれば進化的に保存されていると考え、標的遺伝子のコード領域と転写開始点 (Ref-Seq に登録された RNA の先端を転写開始点と仮定した) から 10kb 上流までのゲノム上で、マウスとヒトで保存された領域に既知の時計遺伝子の結合領域があるか検討した (表 3-7-3-12)。

E-box

時計型 E-box (CACGTG) は一番よく知られた時計遺伝子の結合サイトである。E-box を介して BMAL1-CLOCK のヘテロダイマーにより転写が促進され、PER-CRY により転写が抑制される。調べた遺伝子のうち 95 遺伝子に E-box に該当する配列が見出された (表 3-7-3-12)。E-box 該当配列を持つ遺伝子には *Per1*、*Rev-erba* などが含まれていた。

見出された E-box 該当配列が機能するか検討した。これまで転写因子の結合サイト該当配列を見つけた場合に、機能するか確認するために一時点でのみ行うアッセイ法が行われてきた。しかし概日リズムは動的な現象であって、候補配列の機能を確認するならば転写活性の動的な変化も観察すべきだと考えた。Rat-1 細胞は高血清処理やデキサメタゾン刺激等により簡単に概日振動を惹起できる細胞株であり (Balsalobre et al., 1998; Damiola et al., 2000)、SCN とほぼ同等の時計機構を内在している (Yagita et al., 2001)。このことは Rat-1 細胞には少なくとも既知の時計関連の転写因子が備わっていることを意味している。それゆえ時計遺伝子の結合サイト該当配列に改変型ホタルルシフェラーゼをつないだレポーター遺伝子を Rat-1 に導入して適切な刺激をすることで、振動が捉えられるか否かで、配列が機能するかについて評価できる (Ueda et al., 2002)。

見出された E-box 該当配列を持つ遺伝子のうち、肝臓でも振動していて (Ueda et al., 2002)、振動のパターンが *Per1* など E-box 制御下にある時計遺伝子に似た *Tm4sf7* に注目した。この遺伝子は、4 回膜貫通型のタンパク質でテトラスパニンファミリーに属するが、

機能の詳細はわかっていない。まず、マウスとヒトの *Tm4sf7* 保存領域に見出された E-box 該当配列 (図 3-6A、3-7A) が機能するかについて、従来よく用いられてきた細胞株に対する一過性発現 (transient transfection) による Luc アッセイ法で確認した。このために、SV40 ベーシックプロモータで dLuc のベーシック転写活性をドライブさせるようなコンストラクトに、E-box 該当領域を含む 16bp の配列を 3 回直列に繰り返したものを組み込んだレポーター遺伝子 (図 3-7B) を準備した。BMAL1-CLOCK (転写のアクチベーター) と共発現させたとき、発光量は単独に導入した場合の約 3 倍に増加した。これに加えて CRY1 (リプレッサー) を共発現させた場合には、発現はほぼ基本レベルに戻った (図 3-7C)。E-box 該当配列を置換した場合には共発現による転写活性の変化が確認できなかったことから、*Tm4sf7* の E-box は機能していると考えられた。

見出された E-box 該当配列が機能するならば、時間を追ってモニターすることで発光の概日リズムを検出できると思われるので、これを検証した。まず Rat-1 細胞で転写活性をリアルタイムにモニターできることを確認するために、*Per2-dLuc* を導入してデキサメタゾンで刺激し、PMT で観察したところきれいな概日振動を観察した (図 3-7D 上)。時計機構には関係しない SV40 ベーシックプロモータを *dLuc* につないだコンストラクトを導入した場合には概日振動は確認されなかった (図 3-7D 中央)。この Rat-1 を使った系に一過性発現に用いたと同じコンストラクトを導入し PMT で観察したところ、4 日以上続く概日振動を観察することができた (図 3-7D 下)。ピークのタイミングは *Per2-dLuc* に似ており、時計機構による振動を検出しているものと思われる。E-box 該当配列を置換した場合には、SV40-*dLuc* に似たパターンで概日振動は示さなかった (data not shown)。

D-box

DBP に代表される PAR 型転写因子は DBP 応答領域 (D-box ; TTA[C/T]GTAA) に結合して転写を促進する。同じ配列を介して抑制的に制御するのが E4BP4 である。D-box は 27 遺伝子に見出されたが、この中には *Per2* や *E4bp4* が含まれていた (表 3-7 - 3-12)。同定された遺伝子の中で、*Timp3* と *Wee1* に注目した (図 3-6B, E)。前者は ECM リモデリングの調節を (図 3-4)、後者は細胞周期の調節を担っている遺伝子である (図 3-5)。

Timp3 の D-box 該当配列、*Wee1* の D-box 該当配列を含む 23bp の配列を 3 回直列につないだ配列を組み込んだ SV40 ベーシックプロモータでドライブされる改変型ルシフェラーゼを用いて Luc アッセイを行ったところ、DBP で転写活性が促進され、この転写活性誘導が E4BP4 により抑制された (図 3-8A, D 左)。D-box 該当配列を置換した変異体では共発現による転写活性の変化は観察されなかった。

Luc アッセイで観察されるのは、転写制御されたルシフェラーゼが翻訳されて基質 (ルシフェリン) を分解した際の発光である。このため、Luc アッセイだけでは、想定するものとは別の転写因子が二次的に動員されてルシフェラーゼの発現を誘導している可能性は否定できない。そこで、DBP および E4BP4 と D-box 該当配列との直接の結合を確認するために、*Timp3* の D-box 該当配列及び *Wee1* の D-box 該当配列 (プローブ) を合成して標識し、

in vitro で DBP または E4BP4 と結合させてゲル上で展開して、転写因子と結合していないものとの移動度の差をみる EMSA(electromobility shift assay)法を行った。この結果、DBP または E4BP4 を入れた場合に特異的なバンドが形成されたことから、直接結合していると考えられた(図 3-8A, D 中央)。プローブの配列を変化させるとバンドが形成されなかったこともこれを支持した。Luc アッセイで用いたのと同じコンストラクトを、Rat-1 細胞に導入してデキサメタゾン刺激し PMT で観察したところ、概日振動を確認した(図 3-8A, D 右)。D-box に由来する振動は E-box に由来する振動よりもピークがやや遅く、振動は 4 日以上観察された。以上の結果から、*Timp3*、*Wee1* の D-box が機能すると結論した。

RRE

RRE ([A/T]A[A/T]NT[A/G]GGTCA) 配列には促進性の ROR α と抑制性の REV-ERB α が結合する。RRE 該当配列は *Clock*、*E4bp4*、*Bmal1* など 33 遺伝子にみつかった(表 3-7 - 3-12)。その中で、*Col4a1*、*p21Cip1* に注目した。前者は細胞外マトリクスを構成する遺伝子であり(図 3-4)、後者は細胞周期を調節する遺伝子である(図 3-5)。

Col4a1、*p21Cip1* の RRE 該当配列を 3 回直列につないだ配列を組み込んだ SV40 ベーシックプロモータでドライブされる改変型ルシフェラーゼを用いて Luc アッセイを行ったところ、ROR α による転写活性の促進が観察された。この ROR α による転写活性誘導は REV-ERB α により抑制された(図 3-8B, C 左)。RRE 該当配列を置換した変異体では、共発現による転写活性の変化は観察されなかった。次いで EMSA によって、*Col4a1* の RRE 該当配列及び *p21Cip1* の RRE 該当配列に REV-ERB α が直接結合するか、EMSA 法で検討した。REV-ERB α 、ROR α とも RRE 該当配列に結合したが、配列を置換した変異体には結合できなかった(図 3-8B, C 中央)。Luc アッセイで用いたのと同じコンストラクトを Rat-1 細胞に導入し、デキサメタゾン刺激して PMT で観察したところ、4 日以上続く概日振動を確認した(図 3-8B, C 右)。RRE に由来する振動は E-box に由来する振動のほぼ反対のタイミングでピークを迎えており、*Per1* と *Bmal1* の位相関係に合致していた。以上の結果から、*Col4a1*、*p21Cip1* の RRE が機能すると結論した。

考察

白色脂肪組織には体内時計が内在する

本研究では、*Per2-dLuc* ラットから採取した SCN、松果体、末梢組織である肺できれいな概日振動が得られた。これは、*Per1* プロモータ領域にホタルルシフェラーゼ (Luc) をつないだ *Per1-Luc* Tg ラットで報告されたと同じ結果であり(Yamazaki et al., 2002)、*Per2-dLuc* Tg ラット組織培養系を用いて時計機構の存在を確認する戦略が機能することを支持した。*Per2-dLuc* ラットから採取した白色脂肪組織を採取して PMT で観察したところ、発光量の概日振動を確認した。SCN では比較的安定した発光の振動パターンを示したが、白色脂肪組織では肺や松果体に似てリズムが不明瞭化していくパターンを示した。また、ピークの位相も SCN よりは抹消組織と似たパターンを示した。このことから、白色脂肪組織に内在する時計は末梢組織型であると考えられた。

Per2-dLuc ラットで見られた SCN 型の時計と末梢組織型の時計の違いは、これまでの *Per1-Luc* ラット(Abe et al., 2002; Yamazaki et al., 2000; Yamazaki et al., 2002)での報告を支持するものであった。一方で、Yoo らは PER2 タンパク質に Luc が融合したものを発現する遺伝子導入マウスを作成して生物発光を観察したところ、末梢組織でも SCN と同じような長期持続型のリズムが観察できると報告している(Yoo et al., 2004)。この差が生じた原因は明らかではないが、末梢組織ではタンパク質レベルでの制御によって時計の振動の安定化が図られていて、プロモータによって駆動される発光では捉えられなかったのが、融合タンパク質では捉えられたのかもしれない。

白色脂肪組織の振動遺伝子

今回の研究により、明暗条件下、恒暗条件下で採取した白色脂肪組織を用いたゲノムワイドな遺伝子発現解析により、発現時刻によって 5 つの主要なクラスターからなる 202 遺伝子 (206 プローブ) の振動遺伝子が見出された (図 3-2、表 3-1 - 3-6)。この中に既知の時計遺伝子が含まれていたこと、DNA チップ法によるデータが定量的 PCR 法でも確認されたことから、今回のデータは確実性の高いものだと考えられる。ただし解析に用いた統計的フィルターを変えることで LD および DD で統計的有意な振動を示す遺伝子数が上下することに留意すべきである。

振動が見られた遺伝子の中には、脂肪特異的に発現するものも見られた。ホルモン感受性リパーゼは脂質代謝の律速酵素であるが、明瞭な振動を示した (図 3-9A)。一方で従来振動が知られていた(Saladin et al., 1995; Xu et al., 1999)レプチンは、DNA チップでは振動が確認できなかった。定量的 PCR 法によって、レプチン発現量には明暗条件では振動が見られたが、恒暗条件では確認できなかった (図 3-9B)。従来の報告例では明暗条件下に組織を採取しており、その意味でデータの質を議論するものではないが、恒暗条件で振動が確認できなかった原因は不明である。レプチンは摂食を抑制する作用を持つ生理活性物質であり、マウスの摂食が夜間に集中することを考えれば食餌時刻が発現量に影響を与えると

考えられるが、今回は明暗条件、恒暗条件ともに自由摂食下に飼育しており、摂食の差がリズムの強弱の原因ではないと考えられる。

日周変動の見られたホルモン感受性リパーゼも、従来振動するといわれているレプチンも、エネルギー調節に関係する遺伝子である。生体外からエネルギー源を補給する「摂食」行為が体内時計に制御されていることを考えれば、生体内でエネルギーを効率よく使えるようにエネルギー調節のシステムが構築されている（タイミングを整えるために体内時計の調節が関与している）ことは理にかなっている。脂肪組織がエネルギー代謝を司る重要な器官であることを考え、この視点から白色脂肪組織における体内時計の役割を検討することは、重要な意義があるだろう。

線溶系因子の概日振動

白色脂肪組織での振動遺伝子について、振動遺伝子と生理システムとを結び付ける試みを行った結果、いくつかの生理機構が転写レベルで概日時計によって制御されている様子が浮かび上がってきた。線溶系の因子の振動は既に別の臓器でも知られていたが、白色脂肪組織においても振動が確認された。白色脂肪組織は体中に分布しているため「最大の内分泌組織」とも表現され、脂肪組織からの PAI-1 分泌が体内の PAI-1 循環量に大きく影響していると考えられていることから(Shimomura et al., 1996)、白色脂肪組織で見られた *Pa1-1* の振動が生体全体の PAI-1 の日内変動の原因となっているのかもしれない。このほか、*tPa* の振動も確認できた。*tPA* は血管内皮細胞で産生されると考えられており、今回採取した脂肪組織には脂肪細胞のほか繊維芽細胞などの充間組織、毛細血管等が含まれていたことから、*tPa* の振動は血管由来のものであった可能性がある。このことは体内時計が、細胞種ごとに異なる出力遺伝子の発現を調節することで、組織レベルの生理システムの制御をしているという、精巧なメカニズムの一端を示すものかもしれない。また、メカニズムの構成因子の結びつきを考えたときに、ひとつのシステムについて体内時計が複数の介在点を通じて制御をしていることは、リズム的な制御を維持する上での頑強さを保障しているものと考えられる。

細胞外マトリクスリモデリング機構の概日振動

線溶系はプラスミンを介し、細胞外マトリクス (ECM) のリモデリング機構と結びついているが、ECM リモデリング機構の構成因子にも振動が見出されたことは、非常に興味深いことであった。基質であるエラスチンや IV 型コラーゲンが振動していたこと、分解者である *Mmp* が振動していたこと、さらに MMP の阻害者 (*Timp*) が振動していたことは、ECM リモデリング機構が動的なシステムとして概日変動を繰り返していることを示していた。注目すべきことに、*Mmp* と *Timp* の位相にはずれがあり、一定量の合成・分解を繰り返すような機構を体内時計が作り出していることをうかがわせた。線溶系の活性が日内リズムによって制御されている（体内時計による制御が複数の因子を介している）ことと

合わせて考えれば、ECM リモデリング機構は生体内で体内時計によって精緻かつ頑強に制御されているものと考えられる。

ECM リモデリング機構は腫瘍の湿潤転移に関係するとして注目を集めている。がん化した細胞が転移するためには、元の位置から細胞が切り離されて移動できる必要があり、転移の背景に ECM リモデリングシステムの過剰な働きがあると考えられている。面白いことに、*Per2* 欠損マウスでは腫瘍が生じやすいことが報告されている(Fu et al., 2002)。今回のデータから、時計遺伝子欠損による腫瘍産生は直接的には細胞周期に対する時計遺伝子制御(次節参照)の消失が原因であり、腫瘍の広まりやすさという点で進行を支えているのが ECM リモデリングの時間的制御機構の破綻であるという可能性を提示したい。

細胞周期の概日振動

細胞分裂が夜明けにおきやすいことが知られており、細胞周期が体内時計に影響されていることは従来示唆されていたが、分子レベルでの理解はなされていなかった。この点で重要な報告が 2003 年に部分切除肝の再生をモニターする系でなされた(Matsuo et al., 2003)。彼らは肝再生時の細胞分裂が概日リズムを示すこと、このリズムが時計遺伝子に依存していることを示した。そして時計機構による細胞周期の制御機構として、M 期の制御因子 *Wee1* が E-box を介して時計機構の制御下にあることを示した。

今回の DNA チップのデータから、新たな細胞周期の制御因子で時計機構の制御下にある因子として *p21Cip1* が同定された。*p21Cip1* は原癌遺伝子 *p53* に制御される遺伝子であり、細胞周期エンジンのキーモレキュールであるサイクリン依存性キナーゼの活性を抑制する重要な因子である。また、*p21Cip1* は RRE によって駆動される時計制御下遺伝子であったが、RRE による時計制御下遺伝子は存在がいわれてきた(Ueda et al., 2002)もののこれが明確に証明された初めての遺伝子であった。このことは、時計遺伝子の転写ネットワークの裾野を拡張する重要な知見であると考えられた。*Wee1* も白色脂肪組織における時計制御下遺伝子であることが示された。確かに Matsuo らの示したとおり *Wee1* は E-box を持っていたが(マウスで示されていた 3 つの E-box のうち 2 つがヒトでも保存されていた) Rat-1 による機能検証では保存された E-box のどちらも機能しているとはいえなかった(**data not shown**)。代わりに DBP の結合領域が機能しているために、振動が惹起されていることが示された。

脂肪細胞は成熟してからは細胞内の油滴を大きくすることで、余剰エネルギーの増大に対処すると理解されており、成熟脂肪細胞は通常分裂しないものとされている。培養した脂肪細胞で分裂が起きたとする論文も知られるが(Shigematsu et al., 1999)、組織レベルで普通に見られる現象とは考えにくい。これに対し前駆脂肪細胞などからなる間質系細胞は分裂能を有しており、成熟脂肪細胞のみで脂肪の増加に対処できなくなった場合の新たな余剰エネルギーの貯蔵先として脂肪細胞に分化すると考えられている。このことから、今回検出された細胞周期関連因子の振動は、間質系細胞由来のものであった可能性が高い。

新たな時計の分子ネットワークの可能性

今回の検討により、既知の時計遺伝子に従来知られていた以外にも時計遺伝子の結合サイト該当配列が見出された。例えば *E4bp4* に見出された D-box 該当配列は、*E4bp4* がオートフィードバックループを形成している可能性を示唆している。PAR 型転写因子のトリプルノックアウトマウスでは *E4bp4* の発現が低下している (Gachon et al., 2004) ことから、*E4bp4* が PAR 型転写因子によって制御されていることが示唆される。また、*Clock* や *Bmal1* といった白色脂肪組織で *Dbp* および *DBP* による制御がいわゆる *Per1* と逆位相に振動する遺伝子に D-box 該当配列が見出されたことは興味深い。時刻的には RRE によって発現調節されると考えられる遺伝子が、逆の位相を生み出すと思われる転写調節領域によっても制御されるメカニズムは、時間的に正確な制御を創るために重要である可能性が考えられる。ここで議論した配列については機能検討を行っていないので慎重に議論すべきではあるが、支配する発現ピーク位相が異なる配列の組み合わせで、遺伝子発現の正確な時間的調節がなされている可能性が提起されるだろう。今後複数の転写因子のネットワーク構造による時間支配の解明が進展していくものと期待される。

研究の展望

本研究はゲノムワイドな発現遺伝子の解析、ゲノムプロジェクトの成果を利用したマウス - ヒトの比較ゲノムによる進化的な保存領域の取得と時計遺伝子制御配列のシステムティックな探索、正確な計測システムに依拠した転写制御領域の同定を展開したものである。このアプローチにより従来知られていたよりはるかに多くの E-box、D-box、RRE 制御を受けると思われる振動遺伝子を示すことができ、実際にいくつかの生理機構の制御を担う遺伝子で時計関連遺伝子産物による調節領域が機能することを示すことができた。注目すべきは、時計によって制御されるような生命システムが複数の因子によって時間的に精緻に制御されていることである。このことは、ひとつの因子に対する時間的な制御が失われた際の生命システムの振動能を保障すると同時に、必要なときに必要な因子（例えば基質と破壊因子と阻害因子の発現時刻に変化をつけてバランスさせることで系の安定性を図るメカニズム）を準備するという生命システムの合理性を示す知見であった。体内各部の時計でそれぞれに出力因子が異なることを考えれば、まさに体内時計は生理機構の TPO（Time; 一日の適切な時刻、Place; 適切な臓器、Object; 生理機能の合理的な運用）を司るメカニズムであるといえる。

今回示したのは転写による制御のみであるが、現実にはこれに生理レベルや代謝レベルの転写後調節が加わって生体内での概日リズム性の現象が生じていることは間違いない。それゆえ次のチャレンジは、代謝などの生理レベルでの概日時計の調節機構をシステムティックに明らかにしていくことであり、概日時計による調節機構の生体維持に対する重要性を明らかにしていくことである。時間生物学に留まらず生物学全体に、遺伝子レベルで

の議論からシステムレベルでの議論へと向かうパラダイムシフトが確実に起きている。このことにより環境によって刻々と変化するシステム間の相互作用を明らかにするといった、より動的でより複雑な生命現象へと研究が展開していくことだろう。

まとめ

1. *Per2-dLuc*を導入した Tg ラットを用いて白色脂肪組織に末梢組織型の時計機構が内在していることを示した。
2. 明暗条件下、恒暗条件下で採取した白色脂肪組織を用いたトランスクリプトーム解析により、発現時刻によって 5 つの主要なクラスターからなる 202 遺伝子 (206 プローブ) の振動遺伝子を見出した。このことは、白色脂肪組織が動的な組織であることを改めて示すとともに、従来の定点のみで検討した脂肪組織における遺伝子発現プロファイルを補完するデータを供したものとイえた。
3. 包括的な振動遺伝子の時計遺伝子結合領域候補配列の探索により、95 遺伝子に E-box 該当配列が、27 遺伝子に D-box 該当配列が、33 遺伝子に RRE 該当配列が見出された (表 7-12)。これらのうちのいくつかは、Rat-1 繊維芽細胞を用いた生物発光のリアルタイムモニタリングシステムによって、機能することが確かめられた。
4. 細胞外マトリクス (ECM) リモデリングに関与するような因子 (ECM を構成する *Col4a1*、ECM の分解酵素である MMP を抑制する *Timp3*) に時計に直接支配されて生じる概日振動が見られたこと、細胞周期に関与する因子 (細胞周期の調節を担う *p21Cip1*、*Wee1*) に時計に直接支配されて生じる概日振動が見られたことを確認した。これらは時計の分子機構が、転写制御を介し特定の生理機構を調節している例であると考えられた。

総括

時間生物学の展望

時間生物学は、はじめ観察に基づいた 24 時間周期の現象の記述に始まった。次いで生理現象の 24 時間周期が内因性の現象か外因性の現象かの検討、そして体内時計中枢の探索と進んだ。時間生物学研究に参加する研究者数を爆発的に増やしたきっかけは分子機構の同定であった。さらに、ポストゲノム時代に突入したことで可能になった「全部」を対象とした遺伝子発現解析は時計の出力遺伝子を明らかにし、時計遺伝子の閉じたループの解明に留まらず、動を生理機構へと伝えるネットワーク構造の解明に迫ろうとしている。それでは今後の時間生物学の方向性はこういったものだろうか。

概日リズムの詳細な解析

細胞レベルで見た場合、今後体内時計研究は「真の」体内時計ネットワークの同定と再構築という課題に挑むだろう。体内時計システムの同定が「完了した」というには、時計機構のネットワーク構造が時間によってどのように変化しているのかまで、詳らかにしなくてはならない。現在各国で進行中のマウス ENU プロジェクトなどによる新規時計遺伝子の同定、ゲノムプロジェクトや高密度ヌクレオチドアレイの進化による転写後修飾研究の展開、プロテオミクス研究の隆盛に伴ったタンパク質間相互作用の検証といった研究が、今後時計機構の繊細かつ巧妙な仕掛けを明らかにしてくれるのではないかと期待される。可能な限り「全て」が同定された暁には、時計因子の役割検討のための *in silico* (計算機内) での再構築とモデルの検証、タイミング制御のツールとして利用するための大腸菌や酵母などへの哺乳類時計機構の再構築といった展開、すなわち分子生物学の次を担うと期待されるシステム生物学の目指す方向性(Kitano, 2002)への進展が期待される。

個体レベルに目を転じれば、いまだ遺伝子レベルで説明のなされていないいくつかの疑問に答えようという努力がなされるだろう。具体的には、体内時計の 3 つの特性 (自律振動 : 振動体が安定して 24 時間の周期を刻み続ける、同調機能 : 外部の情報によって振動体の位相を変化させる、温度補償性 : さまざまな温度で周期を一定させる) についての解析が今後もなされていくだろう。たとえば同調機構を考えると、主時計である SCN と末梢組織の時計の関係は、これまでに十分な説明がされていない重要な課題である。ホルモン性の支配 (PK2(Cheng et al., 2002)、TGF (Kramer et al., 2001)) や交感神経系の支配 (Terazono et al., 2003) が言われるものの、まだまだ解明は不十分である。他にもなぜ昼行性動物と夜行性動物がいるのかのような根本的なテーマが、未解決のまま残されている。

概日リズム研究のさまざまなリズム現象への応用

概日リズムと別の周期との関係を示すような研究が今後さかんとなるだろう。たとえば第二章でも見たとおり、体内時計と細胞周期の関係が注目を集めているが、きっかけは Matsuo らの細胞周期の調節因子 *Wee1* が体内時計の制御下にあるという報告であった (Matsuo et al., 2003)。これは概日リズムの因子が別の周期を生む機構と相互作用する例で

あるが、今後このような形の研究が進むだろう。他に日長による季節性の周期現象（繁殖期など）の解析が、Yoshimura らの報告により注目を集めている(Yoshimura et al., 2003)。

また、概日リズムの解析方法は、周期現象に対する研究の成功例として、今後さまざまな周期現象へと応用されていくだろう。包括的に時系列を追って取得した遺伝子発現のデータから、一定のパターンを示すもののみを選択してくる方法は、時間幅を変更することでさまざまな周期現象に応用ができる。実際に、酵母における細胞周期のゲノムワイドな転写解析が試みられている(Kluevecz et al., 2004)。また、微弱発光計測装置を用いてリアルタイムに転写活性を調べる方法も、生体における種々の周期的な現象への有用なアプローチとなるだろう。

時計研究の臨床への応用

24 時間稼働の工場労働者や救急医療現場など、シフトワーカーの健康問題は、古くから時間生物学が扱ってきたテーマである。時計機構の全体像が明らかになり出力となる生理機構が明らかになることで、時計機構が乱れると具体的に何が問題になるのかを提示できるようになると期待される。改善策を検討することができれば勤労者の QOL の向上に寄与できるかもしれない。また、経済のグローバル化により 24 時間を通して世界が連動して動く現代社会で、空路を移動して短期間で移動先の時刻に体を調節することに対するニーズが高まりつつある。先般否定された報告ではあるが(Wright and Czeisler, 2002)、ヒトの膝裏に光受容体があり(Campbell and Murphy, 1998)飛行中の適切な時刻に膝裏に光を当てれば「時差ぼけ」が解消できるという奇抜なアイデアが、紹介記事(Oren and Terman, 1998)つきで米国の一流科学誌である Science に掲載されたのも、簡単に時差ぼけが解消できる可能性に魅力があったためだろう(Barinaga, 2002)。

遺伝性疾患として、時計遺伝子の変異が原因で生活リズムの不全を抱える症例も確認されている。たとえば時計機構のコアループを構成する PER2 の CKI によるリン酸化部位を欠いた家系 (S662G 多型) では、睡眠時間帯が社会的に望ましい時刻に比べ前進していて、早朝に覚醒し夕方早い時刻に眠気をきたす (睡眠相前進症候群) (Toh et al., 2001)。また、Per3 遺伝子の V647G 多型では睡眠時間帯が社会的に望ましい時刻に比べ後退している (朝起きられずに夜眠れない) ことがわかっている(Ebisawa et al., 2001)。その他、活動の朝型・夜型傾向に Clock 遺伝子多型が影響するという報告や、高緯度で日照時間の少ない地域に見られる季節性うつ病に Npas2 遺伝子多型が相関するという報告がある (Johansson et al., 2003)。ヒトでも時計の分子機構が機能することで正常なリズムが生み出されている証拠であると同時に、時計機構が今後 QOL の向上を図るための有用な治療標的であることを示唆している。

今後体内時計のメカニズムの解析が進むことで、時計遺伝子を標的とする薬物の開発や、中枢と末梢の時計のバランスを調整するような薬物など、時計そのものを標的とした薬物の開発が進むことが見込まれ、リズム疾患に対処できるようになるかもしれない。

生理機構の日内変動を上手に利用しようとする立場から、時間薬理学的、時間治療的ア

アプローチが重要であることは、第一章に既述のとおりである。直接に体内時計を標的にしなくても、施療に適切な時刻を知り投薬量を適切に調節することで副作用を減じ（たとえば抗がん剤インターフェロンによるうつ病(Ohdo et al., 2001)）、主作用を高めることができると期待できる。従来、時間治療は振動する現象を利用しようというアプローチであり、病院など個人のスケジュールを管理できる現場においては非常に有効だと思われるが、個々の家庭で厳密な管理は非常に困難であることを考えれば、逆に時間にとらわれず服用時に一定効果が得られる薬剤のほうが便利ではないだろうか。出力遺伝子がある程度わかっているからには、概日振動するような標的をはずすことで「いつ飲んでも均等な効果を得られる」薬剤を開発することもできるようになるだろう。

なお、時間治療を実際に行うためには、ヒトの体が「何時か」を知ることが重要であるが、従来のメラトニンリズムの測定や深部体温の連続測定といった長期拘束型の測定法では、QOL の低下を導く危険があった。これを回避する方法として、Ueda らは振動遺伝子が複数個あることを利用し、一検体から抽出した RNA で約 100 遺伝子の発現量を調べてその人の時刻を測る方法を提案している(Ueda et al., 2004)。

論文報告

第一章で報告した研究成果は、*FEBS Lett.*誌に掲載された。また、第二章で報告した研究成果は、2005 年 1 月現在で専門誌に投稿中である。

Minami, Y., Horikawa, K., Akiyama, M. and Shibata, S. (2002) **Restricted feeding induces daily expression of clock genes and *Pai-1* mRNA in the heart of Clock mutant mice**, *FEBS Lett.* **526**, 115-118.

謝辞

ここに報告した研究は、柴田重信教授のご指導のもと、早稲田大学神経薬理学研究室および山之内製薬株式会社分子医学研究所（NEDO プロジェクト）で行われたものです。常に適切なご指導、ご助言を賜った柴田重信教授に心から感謝いたします。また、山之内製薬（株）で上長としてご指導を賜り、また研究成果の発表を許可してくださいました橋本誠一主席研究員に、深甚なる謝意を表します。

学生時代を通して実験のご指導を頂きました秋山正志博士、守屋孝洋博士、論文の共著者である堀川和正博士を始め、時に厳しく時に暖かく見守ってくださった早稲田大学神経薬理学研究室のメンバーに、現役生、卒業生を問わず心からの謝意を表します。とりわけ、山之内製薬との橋渡し役であり、絶えず有用な議論の相手となってくださっている若松永憲博士に感謝します。また、副査を務めてくださった木村一郎教授、山本大輔教授をはじめ、人間科学部生物学系の先生方の親身なご指導に感謝いたします。

山之内製薬（株）には研究の機会と場所を与えていただきました。特に同時期に NEDO グループに在籍した皆さんに感謝をいたします。DNA チップや定量的 PCR での測定という一番の要を担い手伝ってくださった小島知子さん、*Luc* アッセイを手伝ってくださった片倉利恵さん、浦田ひろみさん。共著者であり分子生物学的アプローチを支え指導してくださった林聡子研究員、有用な議論をしてくださった天貝裕地研究員、伊藤静香研究員、松下智子研究員に謝意を表します。誰より日本学会の若手ホープであり多忙に多忙を重ねているにもかかわらず、貴重な時間を割いて有意義な議論をしてくれ、論文をまとめるのに尽力し、さらなる研究の機会を用意してくれた上田泰己研究員（現・理化学研究所発生再生総合研究センターチームリーダー）に感謝します。

ラットやマウスを飼育するにあたっては、松田直彦さんをはじめとする山之内製薬（株）の動物室の皆さんにお世話になりました。所属したゲノム創薬研究室の皆さんにも、多岐に渡りご指導いただきました。近畿大学の重吉康史教授、長野護講師をはじめ第二解剖学教室の皆さんには、大変重要な議論を頂きました。また、論文をまとめている私を支えてくださった山田陸祐君、木籐良沢君をはじめとする理研システムバイオロジー研究チームの皆さんにも感謝します。

最後に、生物学の道を歩むきっかけとなった祖父であり解剖学者であった中井準之助元浜松医大学長に心から感謝します。

Reference

序論

- Akashi, M. and Nishida, E. (2000) Involvement of the MAP kinase cascade in resetting of the mammalian circadian clock. *Genes Dev*, **14**, 645-649.
- Albrecht, U., Sun, Z.S., Eichele, G. and Lee, C.C. (1997) A differential response of two putative mammalian circadian regulators, mper1 and mper2, to light. *Cell*, **91**, 1055-1064.
- Balsalobre, A., Damiola, F. and Schibler, U. (1998) A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell*, **93**, 929-937.
- Delaunay, F. and Laudet, V. (2002) Circadian clock and microarrays: mammalian genome gets rhythm. *Trends Genet*, **18**, 595-597.
- Dunlap, J.C. (1999) Molecular bases for circadian clocks. *Cell*, **96**, 271-290.
- Emery, P. and Reppert, S.M. (2004) A rhythmic core. *Neuron*, **43**, 443-446.
- Gachon, F., Fonjallaz, P., Damiola, F., Gos, P., Kodama, T., Zakany, J., Duboule, D., Petit, B., Tafti, M. and Schibler, U. (2004) The loss of circadian PAR bZip transcription factors results in epilepsy. *Genes Dev*, **18**, 1397-1412.
- Hardin, P.E., Hall, J.C. and Rosbash, M. (1992) Circadian oscillations in period gene mRNA levels are transcriptionally regulated. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 11711-11715.
- Hastings, M.H., Reddy, A.B. and Maywood, E.S. (2003) A clockwork web: circadian timing in brain and periphery, in health and disease. *Nat Rev Neurosci*, **4**, 649-661.
- Honma, S., Kawamoto, T., Takagi, Y., Fujimoto, K., Sato, F., Noshiro, M., Kato, Y. and Honma, K. (2002) Dec1 and Dec2 are regulators of the mammalian molecular clock. *Nature*, **419**, 841-844.
- Inouye, S.T. and Kawamura, H. (1979) Persistence of circadian rhythmicity in a mammalian hypothalamic "island" containing the suprachiasmatic nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 5962-5966.
- Lehman, M.N., Silver, R., Gladstone, W.R., Kahn, R.M., Gibson, M. and Bittman, E.L. (1987) Circadian rhythmicity restored by neural transplant. Immunocytochemical characterization of the graft and its integration with the host brain. *J Neurosci*, **7**, 1626-1638.
- Maemura, K., de la Monte, S.M., Chin, M.T., Layne, M.D., Hsieh, C.M., Yet, S.F., Perrella, M.A. and Lee, M.E. (2000) CLIF, a novel cycle-like factor, regulates the circadian oscillation of plasminogen activator inhibitor-1 gene expression. *J Biol Chem*, **275**, 36847-36851.
- McNamara, P., Seo, S.P., Rudic, R.D., Sehgal, A., Chakravarti, D. and FitzGerald, G.A. (2001) Regulation of CLOCK and MOP4 by nuclear hormone receptors in the

- vasculature: a humoral mechanism to reset a peripheral clock. *Cell*, **105**, 877-889.
- Mitsui, S., Yamaguchi, S., Matsuo, T., Ishida, Y. and Okamura, H. (2001) Antagonistic role of E4BP4 and PAR proteins in the circadian oscillatory mechanism. *Genes Dev*, **15**, 995-1006.
- Moore, R.Y. and Eichler, V.B. (1972) Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res*, **42**, 201-206.
- Panda, S., Antoch, M.P., Miller, B.H., Su, A.I., Schook, A.B., Straume, M., Schultz, P.G., Kay, S.A., Takahashi, J.S. and Hogenesch, J.B. (2002) Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. *Cell*, **109**, 307-320.
- Preitner, N., Damiola, F., Lopez-Molina, L., Zakany, J., Duboule, D., Albrecht, U. and Schibler, U. (2002) The orphan nuclear receptor REV-ERB α controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell*, **110**, 251-260.
- Reppert, S.M. and Weaver, D.R. (2002) Coordination of circadian timing in mammals. *Nature*, **418**, 935-941.
- Richter, C.P. (1967) Sleep and activity: their relation to the 24-hour clock. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis*, **45**, 8-29.
- Ripperger, J.A., Shearman, L.P., Reppert, S.M. and Schibler, U. (2000) CLOCK, an essential pacemaker component, controls expression of the circadian transcription factor DBP. *Genes Dev*, **14**, 679-689.
- Roenneberg, T. and Merrow, M. (2003) The network of time: understanding the molecular circadian system. *Curr Biol*, **13**, R198-207.
- Sakamoto, K., Nagase, T., Fukui, H., Horikawa, K., Okada, T., Tanaka, H., Sato, K., Miyake, Y., Ohara, O., Kako, K. and Ishida, N. (1998) Multitissue circadian expression of rat period homolog (rPer2) mRNA is governed by the mammalian circadian clock, the suprachiasmatic nucleus in the brain. *J Biol Chem*, **273**, 27039-27042.
- Sato, T.K., Panda, S., Miraglia, L.J., Reyes, T.M., Rudic, R.D., McNamara, P., Naik, K.A., FitzGerald, G.A., Kay, S.A. and Hogenesch, J.B. (2004) A functional genomics strategy reveals rora as a component of the Mammalian circadian clock. *Neuron*, **43**, 527-537.
- Shearman, L.P., Zylka, M.J., Weaver, D.R., Kolakowski, L.F., Jr. and Reppert, S.M. (1997) Two period homologs: circadian expression and photic regulation in the suprachiasmatic nuclei. *Neuron*, **19**, 1261-1269.
- Shibata, S., Oomura, Y., Kita, H. and Hattori, K. (1982) Circadian rhythmic changes of neuronal activity in the suprachiasmatic nucleus of the rat hypothalamic slice. *Brain Res*, **247**, 154-158.

- Stephan, F.K. and Zucker, I. (1972) Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **69**, 1583-1586.
- Storch, K.F., Lipan, O., Leykin, I., Viswanathan, N., Davis, F.C., Wong, W.H. and Weitz, C.J. (2002) Extensive and divergent circadian gene expression in liver and heart. *Nature*, **417**, 78-83.
- Sun, Z.S., Albrecht, U., Zhuchenko, O., Bailey, J., Eichele, G. and Lee, C.C. (1997) RIGUI, a putative mammalian ortholog of the Drosophila period gene. *Cell*, **90**, 1003-1011.
- Takumi, T., Matsubara, C., Shigeyoshi, Y., Taguchi, K., Yagita, K., Maebayashi, Y., Sakakida, Y., Okumura, K., Takashima, N. and Okamura, H. (1998) A new mammalian period gene predominantly expressed in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Cells*, **3**, 167-176.
- Tei, H., Okamura, H., Shigeyoshi, Y., Fukuhara, C., Ozawa, R., Hirose, M. and Sakaki, Y. (1997) Circadian oscillation of a mammalian homologue of the Drosophila period gene. *Nature*, **389**, 512-516.
- Ueda, H.R., Chen, W., Adachi, A., Wakamatsu, H., Hayashi, S., Takasugi, T., Nagano, M., Nakahama, K., Suzuki, Y., Sugano, S., Iino, M., Shigeyoshi, Y. and Hashimoto, S. (2002) A transcription factor response element for gene expression during circadian night. *Nature*, **418**, 534-539.
- Welsh, D.K., Logothetis, D.E., Meister, M. and Reppert, S.M. (1995) Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron*, **14**, 697-706.
- Yagita, K., Tamanini, F., van Der Horst, G.T. and Okamura, H. (2001) Molecular mechanisms of the biological clock in cultured fibroblasts. *Science*, **292**, 278-281.
- Yamaguchi, S., Mitsui, S., Yan, L., Yagita, K., Miyake, S. and Okamura, H. (2000) Role of DBP in the circadian oscillatory mechanism. *Mol Cell Biol*, **20**, 4773-4781.
- Zylka, M.J., Shearman, L.P., Weaver, D.R. and Reppert, S.M. (1998) Three period homologs in mammals: differential light responses in the suprachiasmatic circadian clock and oscillating transcripts outside of brain. *Neuron*, **20**, 1103-1110.

富岡 憲治, 井上 慎一, 沼田 英治 (2003), 「時間生物学の基礎」, 裳華房
川上 正澄, 高坂 睦年 (編) (1984), 「生体リズムの発現機構 : 体内時計の医療への応用」, 理工学社

第一章

- Andreotti, F., Davies, G.J., Hackett, D.R., Khan, M.I., De Bart, A.C., Aber, V.R., Maseri, A. and Kluft, C. (1988) Major circadian fluctuations in fibrinolytic factors and possible relevance to time of onset of myocardial infarction, sudden cardiac death and stroke. *Am J Cardiol*, **62**, 635-637.
- Andreotti, F. and Kluft, C. (1991) Circadian variation of fibrinolytic activity in blood. *Chronobiol Int*, **8**, 336-351.
- Antoch, M.P., Song, E.J., Chang, A.M., Vitaterna, M.H., Zhao, Y., Wilsbacher, L.D., Sangoram, A.M., King, D.P., Pinto, L.H. and Takahashi, J.S. (1997) Functional identification of the mouse circadian Clock gene by transgenic BAC rescue. *Cell*, **89**, 655-667.
- Curtis, A.M., Seo, S.B., Westgate, E.J., Rudic, R.D., Smyth, E.M., Chakravarti, D., FitzGerald, G.A. and McNamara, P. (2004) Histone acetyltransferase-dependent chromatin remodeling and the vascular clock. *J Biol Chem*, **279**, 7091-7097.
- Damiola, F., Le Minh, N., Preitner, N., Kornmann, B., Fleury-Olela, F. and Schibler, U. (2000) Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev*, **14**, 2950-2961.
- Dudley, C.A., Erbel-Sieler, C., Estill, S.J., Reick, M., Franken, P., Pitts, S. and McKnight, S.L. (2003) Altered patterns of sleep and behavioral adaptability in NPAS2-deficient mice. *Science*, **301**, 379-383.
- Eriksson, P., Kallin, B., van 't Hooft, F.M., Bavenholm, P. and Hamsten, A. (1995) Allele-specific increase in basal transcription of the plasminogen-activator inhibitor 1 gene is associated with myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci USA*, **92**, 1851-1855.
- Fujimura, A. and Ebihara, A. (1988) Chronopharmacological study of furosemide in rats: (II). Influence of beta-adrenoceptor blockade. *Life Sci*, **42**, 1431-1437.
- Gekakis, N., Staknis, D., Nguyen, H.B., Davis, F.C., Wilsbacher, L.D., King, D.P., Takahashi, J.S. and Weitz, C.J. (1998) Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science*, **280**, 1564-1569.
- Hara, R., Wan, K., Wakamatsu, H., Aida, R., Moriya, T., Akiyama, M. and Shibata, S. (2001) Restricted feeding entrains liver clock without participation of the suprachiasmatic nucleus. *Genes Cells*, **6**, 269-278.
- Hekman, C.M.L., D. J. (1988) Bovine plasminogen activator inhibitor 1: specificity determinations and comparison of the active, latent, and guanidine-activated forms. *Biochemistry*, **27**, 2911-2918.
- Jin, X., Shearman, L.P., Weaver, D.R., Zylka, M.J., de Vries, G.J. and Reppert, S.M. (1999) A

- molecular mechanism regulating rhythmic output from the suprachiasmatic circadian clock. *Cell*, **96**, 57-68.
- King, D.P., Zhao, Y., Sangoram, A.M., Wilsbacher, L.D., Tanaka, M., Antoch, M.P., Steeves, T.D., Vitaterna, M.H., Kornhauser, J.M., Lowrey, P.L., Turek, F.W. and Takahashi, J.S. (1997) Positional cloning of the mouse circadian clock gene. *Cell*, **89**, 641-653.
- Maemura, K., de la Monte, S.M., Chin, M.T., Layne, M.D., Hsieh, C.M., Yet, S.F., Perrella, M.A. and Lee, M.E. (2000) CLIF, a novel cycle-like factor, regulates the circadian oscillation of plasminogen activator inhibitor-1 gene expression. *J Biol Chem*, **275**, 36847-36851.
- Masubuchi, S., Honma, S., Abe, H., Nakamura, W. and Honma, K. (2001) Circadian activity rhythm in methamphetamine-treated Clock mutant mice. *Eur J Neurosci*, **14**, 1177-1180.
- Mistlberger, R.E. (1994) Circadian food-anticipatory activity: formal models and physiological mechanisms. *Neurosci Biobehav Rev*, **18**, 171-195.
- Mulcahy, D., Keegan, J., Cunningham, D., Quyyumi, A., Crean, P., Park, A., Wright, C. and Fox, K. (1988) Circadian variation of total ischaemic burden and its alteration with anti-anginal agents. *Lancet*, **2**, 755-759.
- Muller, J.E., Ludmer, P.L., Willich, S.N., Tofler, G.H., Aylmer, G., Klangos, I. and Stone, P.H. (1987) Circadian variation in the frequency of sudden cardiac death. *Circulation*, **75**, 131-138.
- Oishi, K., Fukui, H. and Ishida, N. (2000) Rhythmic expression of BMAL1 mRNA is altered in Clock mutant mice: differential regulation in the suprachiasmatic nucleus and peripheral tissues. *Biochem Biophys Res Commun*, **268**, 164-171.
- Oishi, K., Miyazaki, K. and Ishida, N. (2002) Functional CLOCK is not involved in the entrainment of peripheral clocks to the restricted feeding: entrainable expression of mPer2 and BMAL1 mRNAs in the heart of Clock mutant mice on Jcl:ICR background. *Biochem Biophys Res Commun*, **298**, 198-202.
- Oishi, K., Miyazaki, K., Kadota, K., Kikuno, R., Nagase, T., Atsumi, G., Ohkura, N., Azama, T., Mesaki, M., Yukimasa, S., Kobayashi, H., Iitaka, C., Umehara, T., Horikoshi, M., Kudo, T., Shimizu, Y., Yano, M., Monden, M., Machida, K., Matsuda, J., Horie, S., Todo, T. and Ishida, N. (2003) Genome-wide expression analysis of mouse liver reveals CLOCK-regulated circadian output genes. *J Biol Chem*, **278**, 41519-41527.
- Pitts, S., Perone, E. and Silver, R. (2003) Food-entrained circadian rhythms are sustained in arrhythmic Clk/Clk mutant mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **285**, R57-67.
- Preitner, N., Damiola, F., Lopez-Molina, L., Zakany, J., Duboule, D., Albrecht, U. and

- Schibler, U. (2002) The orphan nuclear receptor REV-ERB α controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell*, **110**, 251-260.
- Reick, M., Garcia, J.A., Dudley, C. and McKnight, S.L. (2001) NPAS2: an analog of clock operative in the mammalian forebrain. *Science*, **293**, 506-509.
- Roest, M., van der Schouw, Y.T., Banga, J.D., Tempelman, M.J., de Groot, P.G., Sixma, J.J. and Grobbee, D.E. (2000) Plasminogen activator inhibitor 4G polymorphism is associated with decreased risk of cerebrovascular mortality in older women. *Circulation*, **101**, 67-70.
- Schoenhard, J.A., Smith, L.H., Painter, C.A., Eren, M., Johnson, C.H. and Vaughan, D.E. (2003) Regulation of the PAI-1 promoter by circadian clock components: differential activation by BMAL1 and BMAL2. *J Mol Cell Cardiol*, **35**, 473-481.
- Stokkan, K.A., Yamazaki, S., Tei, H., Sakaki, Y. and Menaker, M. (2001) Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding. *Science*, **291**, 490-493.
- Vitaterna, M.H., King, D.P., Chang, A.M., Kornhauser, J.M., Lowrey, P.L., McDonald, J.D., Dove, W.F., Pinto, L.H., Turek, F.W. and Takahashi, J.S. (1994) Mutagenesis and mapping of a mouse gene, Clock, essential for circadian behavior. *Science*, **264**, 719-725.
- Wakamatsu, H., Yoshinobu, Y., Aida, R., Moriya, T., Akiyama, M. and Shibata, S. (2001) Restricted-feeding-induced anticipatory activity rhythm is associated with a phase-shift of the expression of mPer1 and mPer2 mRNA in the cerebral cortex and hippocampus but not in the suprachiasmatic nucleus of mice. *Eur J Neurosci*, **13**, 1190-1196.
- Yamazaki, S., Numano, R., Abe, M., Hida, A., Takahashi, R., Ueda, M., Block, G.D., Sakaki, Y., Menaker, M. and Tei, H. (2000) Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science*, **288**, 682-685.

松田 保 (1996), 「止血・血栓の臨床」, 新興医学出版

藤村 昭夫 (2000), 「時間治療学: 投薬のタイミングと効果」, 日本医事新報社

小川 暢也 (編) (2001), 「時間薬理学」, 朝倉書店

大塚 邦明 (1998), 「時間(chronome)医学とヤヌス(Janus)医学: 時間生物学とエコロジーの立場からみた心拍変動と血圧変動」, メディカルレビュー社

第二章

- Abe, M., Herzog, E.D., Yamazaki, S., Straume, M., Tei, H., Sakaki, Y., Menaker, M. and Block, G.D. (2002) Circadian rhythms in isolated brain regions. *J Neurosci*, **22**, 350-356.
- Ahima, R.S., Prabakaran, D., Mantzoros, C., Qu, D., Lowell, B., Maratos-Flier, E. and Flier, J.S. (1996) Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature*, **382**, 250-252.
- Akhtar, R.A., Reddy, A.B., Maywood, E.S., Clayton, J.D., King, V.M., Smith, A.G., Gant, T.W., Hastings, M.H. and Kyriacou, C.P. (2002) Circadian cycling of the mouse liver transcriptome, as revealed by cDNA microarray, is driven by the suprachiasmatic nucleus. *Curr Biol*, **12**, 540-550.
- Balsalobre, A., Damiola, F. and Schibler, U. (1998) A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell*, **93**, 929-937.
- Damiola, F., Le Minh, N., Preitner, N., Kornmann, B., Fleury-Olela, F. and Schibler, U. (2000) Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev*, **14**, 2950-2961.
- Davis, G.E., Pintar Allen, K.A., Salazar, R. and Maxwell, S.A. (2001) Matrix metalloproteinase-1 and -9 activation by plasmin regulates a novel endothelial cell-mediated mechanism of collagen gel contraction and capillary tube regression in three-dimensional collagen matrices. *J Cell Sci*, **114**, 917-930.
- Delaunay, F. and Laudet, V. (2002) Circadian clock and microarrays: mammalian genome gets rhythm. *Trends Genet*, **18**, 595-597.
- Duffield, G.E., Best, J.D., Meurers, B.H., Bittner, A., Loros, J.J. and Dunlap, J.C. (2002) Circadian programs of transcriptional activation, signaling, and protein turnover revealed by microarray analysis of mammalian cells. *Curr Biol*, **12**, 551-557.
- Fu, L., Pelicano, H., Liu, J., Huang, P. and Lee, C. (2002) The circadian gene *Period2* plays an important role in tumor suppression and DNA damage response in vivo. *Cell*, **111**, 41-50.
- Gachon, F., Fonjallaz, P., Damiola, F., Gos, P., Kodama, T., Zakany, J., Duboule, D., Petit, B., Tafti, M. and Schibler, U. (2004) The loss of circadian PAR bZip transcription factors results in epilepsy. *Genes Dev*, **18**, 1397-1412.
- Grundschober, C., Delaunay, F., Puhlhofer, A., Triqueneaux, G., Laudet, V., Bartfai, T. and Nef, P. (2001) Circadian regulation of diverse gene products revealed by mRNA expression profiling of synchronized fibroblasts. *J Biol Chem*, **276**, 46751-46758.
- Humphries, A., Klein, D., Baler, R. and Carter, D.A. (2002) cDNA array analysis of pineal gene expression reveals circadian rhythmicity of the dominant negative

- helix-loop-helix protein-encoding gene, Id-1. *J Neuroendocrinol*, **14**, 101-108.
- Kalsbeek, A., Fliers, E., Romijn, J.A., La Fleur, S.E., Wortel, J., Bakker, O., Endert, E. and Buijs, R.M. (2001) The suprachiasmatic nucleus generates the diurnal changes in plasma leptin levels. *Endocrinology*, **142**, 2677-2685.
- Kita, Y., Shiozawa, M., Jin, W., Majewski, R.R., Besharse, J.C., Greene, A.S. and Jacob, H.J. (2002) Implications of circadian gene expression in kidney, liver and the effects of fasting on pharmacogenomic studies. *Pharmacogenetics*, **12**, 55-65.
- Licinio, J., Mantzoros, C., Negrao, A.B., Cizza, G., Wong, M.L., Bongiorno, P.B., Chrousos, G.P., Karp, B., Allen, C., Flier, J.S. and Gold, P.W. (1997) Human leptin levels are pulsatile and inversely related to pituitary-adrenal function. *Nat Med*, **3**, 575-579.
- Maeda, K., Okubo, K., Shimomura, I., Mizuno, K., Matsuzawa, Y. and Matsubara, K. (1997) Analysis of an expression profile of genes in the human adipose tissue. *Gene*, **190**, 227-235.
- Matsuo, T., Yamaguchi, S., Mitsui, S., Emi, A., Shimoda, F. and Okamura, H. (2003) Control mechanism of the circadian clock for timing of cell division in vivo. *Science*, **302**, 255-259.
- Moitra, J., Mason, M.M., Olive, M., Krylov, D., Gavrilova, O., Marcus-Samuels, B., Feigenbaum, L., Lee, E., Aoyama, T., Eckhaus, M., Reitman, M.L. and Vinson, C. (1998) Life without white fat: a transgenic mouse. *Genes Dev*, **12**, 3168-3181.
- Panda, S., Antoch, M.P., Miller, B.H., Su, A.I., Schook, A.B., Straume, M., Schultz, P.G., Kay, S.A., Takahashi, J.S. and Hogenesch, J.B. (2002) Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. *Cell*, **109**, 307-320.
- Saladin, R., De Vos, P., Guerre-Millo, M., Leturque, A., Girard, J., Staels, B. and Auwerx, J. (1995) Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration. *Nature*, **377**, 527-529.
- Sano, M., Ohyama, A., Takase, K., Yamamoto, M. and Machida, M. (2001) Electrophoretic mobility shift scanning using an automated infrared DNA sequencer. *Biotechniques*, **31**, 1056-1058, 1060, 1062.
- Shigematsu, M., Watanabe, H. and Sugihara, H. (1999) Proliferation and differentiation of unilocular fat cells in the bone marrow. *Cell Struct Funct*, **24**, 89-100.
- Shimomura, I., Funahashi, T., Takahashi, M., Maeda, K., Kotani, K., Nakamura, T., Yamashita, S., Miura, M., Fukuda, Y., Takemura, K., Tokunaga, K. and Matsuzawa, Y. (1996) Enhanced expression of PAI-1 in visceral fat: possible contributor to vascular disease in obesity. *Nat Med*, **2**, 800-803.
- Storch, K.F., Lipan, O., Leykin, I., Viswanathan, N., Davis, F.C., Wong, W.H. and Weitz, C.J. (2002) Extensive and divergent circadian gene expression in liver and heart. *Nature*,

417, 78-83.

- Ueda, H.R., Chen, W., Adachi, A., Wakamatsu, H., Hayashi, S., Takasugi, T., Nagano, M., Nakahama, K., Suzuki, Y., Sugano, S., Iino, M., Shigeyoshi, Y. and Hashimoto, S. (2002) A transcription factor response element for gene expression during circadian night. *Nature*, **418**, 534-539.
- Xu, B., Kalra, P.S., Farmerie, W.G. and Kalra, S.P. (1999) Daily changes in hypothalamic gene expression of neuropeptide Y, galanin, proopiomelanocortin, and adipocyte leptin gene expression and secretion: effects of food restriction. *Endocrinology*, **140**, 2868-2875.
- Yagita, K., Tamanini, F., van Der Horst, G.T. and Okamura, H. (2001) Molecular mechanisms of the biological clock in cultured fibroblasts. *Science*, **292**, 278-281.
- Yamazaki, S., Numano, R., Abe, M., Hida, A., Takahashi, R., Ueda, M., Block, G.D., Sakaki, Y., Menaker, M. and Tei, H. (2000) Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science*, **288**, 682-685.
- Yamazaki, S., Straume, M., Tei, H., Sakaki, Y., Menaker, M. and Block, G.D. (2002) Effects of aging on central and peripheral mammalian clocks. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 10801-10806.
- Yoo, S.H., Yamazaki, S., Lowrey, P.L., Shimomura, K., Ko, C.H., Buhr, E.D., Siepkka, S.M., Hong, H.K., Oh, W.J., Yoo, O.J., Menaker, M. and Takahashi, J.S. (2004) PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 5339-5346.

中尾 一和, 門脇 孝 (編)(1999), 「脂肪細胞の驚異と肥満 生活習慣病の解明に向けて (財)加藤記念バイオサイエンス研究振興財団シンポジウムシリーズ (15)」, 講談社

総括

- Barinaga, M. (2002) Physiology. Setting the human clock: technique challenged. *Science*, **297**, 505.
- Campbell, S.S. and Murphy, P.J. (1998) Extraocular circadian phototransduction in humans. *Science*, **279**, 396-399.
- Cheng, M.Y., Bullock, C.M., Li, C., Lee, A.G., Bermak, J.C., Belluzzi, J., Weaver, D.R., Leslie, F.M. and Zhou, Q.Y. (2002) Prokineticin 2 transmits the behavioural circadian rhythm of the suprachiasmatic nucleus. *Nature*, **417**, 405-410.
- Ebisawa, T., Uchiyama, M., Kajimura, N., Mishima, K., Kamei, Y., Katoh, M., Watanabe, T., Sekimoto, M., Shibui, K., Kim, K., Kudo, Y., Ozeki, Y., Sugishita, M., Toyoshima, R., Inoue, Y., Yamada, N., Nagase, T., Ozaki, N., Ohara, O., Ishida, N., Okawa, M., Takahashi, K. and Yamauchi, T. (2001) Association of structural polymorphisms in the human period3 gene with delayed sleep phase syndrome. *EMBO Rep*, **2**, 342-346.
- Johansson, C., Willeit, M., Smedh, C., Ekholm, J., Paunio, T., Kieseppa, T., Lichtermann, D., Praschak-Rieder, N., Neumeister, A., Nilsson, L.G., Kasper, S., Peltonen, L., Adolfsson, R., Schalling, M. and Partonen, T. (2003) Circadian clock-related polymorphisms in seasonal affective disorder and their relevance to diurnal preference. *Neuropsychopharmacology*, **28**, 734-739.
- Kitano, H. (2002) Systems biology: a brief overview. *Science*, **295**, 1662-1664.
- Klevecz, R.R., Bolen, J., Forrest, G. and Murray, D.B. (2004) A genomewide oscillation in transcription gates DNA replication and cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 1200-1205.
- Kramer, A., Yang, F.C., Snodgrass, P., Li, X., Scammell, T.E., Davis, F.C. and Weitz, C.J. (2001) Regulation of daily locomotor activity and sleep by hypothalamic EGF receptor signaling. *Science*, **294**, 2511-2515.
- Matsuo, T., Yamaguchi, S., Mitsui, S., Emi, A., Shimoda, F. and Okamura, H. (2003) Control mechanism of the circadian clock for timing of cell division in vivo. *Science*, **302**, 255-259.
- Ohdo, S., Koyanagi, S., Suyama, H., Higuchi, S. and Aramaki, H. (2001) Changing the dosing schedule minimizes the disruptive effects of interferon on clock function. *Nat Med*, **7**, 356-360.
- Oren, D.A. and Terman, M. (1998) Tweaking the human circadian clock with light. *Science*, **279**, 333-334.
- Terazono, H., Mutoh, T., Yamaguchi, S., Kobayashi, M., Akiyama, M., Udo, R., Ohdo, S., Okamura, H. and Shibata, S. (2003) Adrenergic regulation of clock gene expression in mouse liver. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 6795-6800.

- Toh, K.L., Jones, C.R., He, Y., Eide, E.J., Hinz, W.A., Virshup, D.M., Ptacek, L.J. and Fu, Y.H. (2001) An hPer2 phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phase syndrome. *Science*, **291**, 1040-1043.
- Ueda, H.R., Chen, W., Minami, Y., Honma, S., Honma, K., Iino, M. and Hashimoto, S. (2004) Molecular-timetable methods for detection of body time and rhythm disorders from single-time-point genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 11227-11232.
- Wright, K.P., Jr. and Czeisler, C.A. (2002) Absence of circadian phase resetting in response to bright light behind the knees. *Science*, **297**, 571.
- Yoshimura, T., Yasuo, S., Watanabe, M., Iigo, M., Yamamura, T., Hirunagi, K. and Ebihara, S. (2003) Light-induced hormone conversion of T4 to T3 regulates photoperiodic response of gonads in birds. *Nature*, **426**, 178-181.

図表

序論

図 1-1 . 体内時計の構成要素

(A)体内時計は 内在性の 24 時間周期を作り出す振動体、 外界から時刻情報を振動体に伝える同調機構、 振動体のリズムを生理機構に反映する出力機構、 の 3 つから構成される。(B)哺乳類における体内時計。振動体は視交叉の直上、第 3 脳室底部に位置する SCN に存在し、振動体からの出力としては行動リズムなどが観察される。一方で内在性のサイクルを外界のサイクルにあわせるための同調因子としての光情報が網膜を介して SCN に伝えられる。

図 1-2 . 体内時計の分子機構

(A)時計型 E-box を介した転写調節。BMAL1-CLOCK のヘテロダイマーは促進性に E-box を介した転写を制御する。E-box で制御される時計遺伝子である *Per* (*Per1*, *Per2*) や *Cry* (*Cry1*) は翻訳されて複合体を形成し、E-box を介した遺伝子発現を抑制的に制御する (ネガティブフィードバックループ)。 *Dec* (*Dec1*, *Dec2*) もこのループに参加している。(B) RRE を介した転写調節。E-box による振動とほぼ逆位相の振動を生み出すメカニズムで、*Bmal1* の転写制御に見られる。RRE に結合する *Rev-erb* は抑制性の転写因子であり、その発現は E-box で制御されている。(C) D-box を介した転写調節。*Dbp* に代表される PAR 型転写因子 (*Dbp*, *Tef*, *Hlf*) が転写の促進を担い、*E4bp4* が抑制的な制御を担う。*Dbp* と *E4bp4* の発現位相はほぼ反対である。時計振動体のメカニズムとしてはどちらかといえば付加的だと考えられている。桃色：促進性の転写因子、水色：抑制性の転写因子

図 1-3 . 概日振動する遺伝子

(A) 時計遺伝子によって直接発現制御される遺伝子を時計制御下遺伝子 (CCG; clock controlled gene) と呼ぶ。時計遺伝子によって直接に制御される遺伝子 (機能する時計遺伝子結合領域を持つ遺伝子) がこれに該当する。(B) 体内時計の概日振動を生理機能に反映する遺伝子を出力遺伝子 (out-put gene) と呼ぶ。時計の分子機構の中枢を構成する遺伝子ではないが概日振動する遺伝子で、特異的な生理機能の調節を担うことで生理レベルの概日振動をひきおこすような遺伝子が該当する。(C) 広く概日振動を示す遺伝子を振動遺伝子 (cycling gene) と呼ぶ。一番大きなカテゴリーで、時計 (関連) 遺伝子や時計制御下遺伝子を含み、二次的、三次的に時計機構の制御下にあるような遺伝子、また日周変動を示す様々な要因により発現が振動するような遺伝子がこれに該当する。

第一章

図 2-1 . マウスの飼育条件と、心臓のサンプリングスケジュール

(A) 自由摂食、明暗条件下で維持したマウスを用い、ZT5 から 6 時間おきに 4 点の時刻で心臓を採取した (矢頭)。(B) 自由摂食、明暗条件下で維持したマウスをサンプリング二日前に自由摂食のまま恒暗条件に移し、CT5 から 6 時間おきに 4 点の時刻で心臓を採取した (矢頭)。(C) 自由摂食、明暗条件下で維持したマウスを暗期の間 (ZT12-24) 絶食し (Day0)、翌日 (Day1) から Day6 まで明期である ZT5-ZT9 のみにエサを与えた (斜線)。Day6 から Day7 にかけて ZT5 から 6 時間おきに 5 点の時刻で心臓を採取した (矢頭)。なお Day7 は給餌しなかった。

ZT: Zeitgeber Time、ZT12 が暗期の始まり

CT: Circadian Time、CT12 が行動の開始時刻

*CT とは本来固有のリズムを確認して得られた周期から産出されたものであり、ここで用いられているような実験スキームの場合 projected ZT とするのが正確だが、暗期でのサンプリングであることを明らかにするために CT の語を用いた

図 2-2 . 明暗条件における心臓の時計遺伝子発現と *Pai-1* 遺伝子発現

(A) 代表的な PCR 産物のアガロースゲル泳動像。左側に野生型、右側に *Clock* マウスのパターンを示した。(B-F): 時計遺伝子 (B-E) および *Pai-1* (F) の アクチンで相対化した場合の発現量 (n=4~6)。黒丸の実線が野生型のデータを、白丸の点線が *Clock* マウスのデータを示す。

図 2-3 . 野生型マウスにおける給餌時刻制限の遺伝子発現に与える影響

(A) 制限給餌下のマウスにおける PCR 産物の代表的なアガロースゲル泳動像。(B) 給餌時刻制限による時計遺伝子と *Pai-1* 遺伝子の発現パターンの変化 (下)。灰色の網掛けで示した時刻 (ZT5-9) にのみエサを与えた。データは アクチンの発現量で相対化し、頂値を 100% として表示した (n=3-6)。比較のため図 2-2 で示したデータを再度示した (ZT5 のデータはリプロットした) (上)。

図 2-4 . *Clock* マウスにおける給餌時刻制限の遺伝子発現に与える影響

(A) 制限給餌下のマウスにおける PCR 産物の代表的なアガロースゲル泳動像。(B) 給餌時刻制限による時計遺伝子と *Pai-1* 遺伝子の発現パターンの変化 (下)。灰色の網掛けで示した時刻 (ZT5-9) にのみエサを与えた。データは アクチンの発現量で相対化し、頂値を 100% として表示した (n=3-6)。比較のため図 2-2 で示したデータを再度示した (ZT5 のデータはリプロットした) (上)。

表 2-1 . 実験に用いたプライマーの配列及び想定される PCR 産物の大きさ

F; forward primer, R; reverse primer

表 2-2 . 時計遺伝子と *Pai-1* 遺伝子の発現の日内変動とピーク時刻

Ad lib; 自由摂食 (4 点)、RF; 給餌時刻制限 (5 点)、LD; 明暗条件、DD; 恒暗条件

*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $P < 0.05$, - : 有意差なし

第二章

図 3-1 . PMT による内在性の時計に依存した生物発光の検出

(A) *Per2*-dLuc 導入遺伝子の構造。(B) 培養下における *Per2*-dLuc から採取した中枢時計 (SCN) と末梢時計 (白色脂肪組織、松果体、肺) から検出された発光の概日リズムの代表例。黒いバーと白いバーはサンプリング前の飼育環境 (明暗サイクル) を示している。ラットのサンプリング時刻 (明期) から発光プロットを開始した。

図 3-2 . マウス白色脂肪組織における時間的な発現プロファイル

(A) DNA チップによって得られた白色脂肪組織での明暗条件及び恒暗条件における、既知の時計 (関連) 遺伝子の発現パターン。12 サンプリングポイント (ZT/CT12-ZT/CT56) が示した値の平均を 1.0 にあわせた。(B-C): 白色脂肪組織における頂値時刻による発現プロファイルの構造 (B) と階層的クラスタリング法による解析結果 (C)。いずれのダイアグラムも横軸がサンプリングした点 (時間) を、縦軸が遺伝子発現を示している。各タイルの色 (赤-黒-緑) はノーマライズした場合の発現量を表現している (12 点の平均を 0.0 に、12 点の標準偏差を 1.0 にあわせた)。

図 3-3 . DNA チップによる解析結果の定量的 PCR 法による確認

(A-E): 恒暗条件で採取したサンプルを用いた振動遺伝子の解析。定量的 PCR 法によるデータ (橙) と DNA チップによるデータ (薄青) を同じグラフ上に示した。異なる方法によるデータを比較するために、定量的 PCR によるデータ (左軸) および DNA チップによる 12 点のデータ (右軸) をノーマライズして表示した (平均値を 1.0 にあわせた)。それぞれのクラスターから 3 遺伝子ずつを選択した。クラスターは以下に示すとおりであった。

(A) *Rev-erb 1/Per1*, (B) *Per2*, (C) *Cry1*, (D) *Bmal1*, (E) X。DNA チップには *p21Cip1* 及び *1810044O22Rik* に 2 つのプロープが存在した。(D) に示したグラフ内の実線は *94881_at* (*p21Cip1*) もしくは *10319_at* (*1810044O22Rik*) を示し、点線は *98067_at* (*p21Cip1*) もしくは *96878_at* (*1810044O22Rik*) を示す。グラフの下に示した灰色のラインは主観的明期を、黒いラインは主観的暗期を示す。

主観的明期：時刻情報のない状態で明期に相当する期間 (マウスの休息期)
主観的暗期：時刻情報のない状態で暗期に相当する期間 (マウスの活動期)

図 3-4 . 線溶系と細胞外マトリクスリモデリングシステムのキーレギュレーターの概日振動

(A) 線溶系と細胞外マトリクスリモデリングシステムの概観。(B-C): 線溶系 (B) と細胞外マトリクスリモデリングシステム (C) のキーレギュレーターの経時的発現パターン。定量的 PCR 法によって得られた遺伝子発現量の相対量 ($n=3-4/\text{time point}$) を示した。青が

明暗条件下でサンプリングした場合、緑が恒暗条件下でサンプリングした場合であり、グラフの下の黒と灰色のバーは、(主観的)暗期と(主観的)明期を示す。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (1-way ANOVA)

図 3-5 . 細胞周期のキーレギュレーターの概日振動

(A) 細胞周期の概観。(B) 細胞周期のキーレギュレーターの経時的発現パターン。定量的 PCR 法によって得られた遺伝子発現量の相対量 ($n=3-4/\text{time point}$) を示した。青が明暗条件下でサンプリングした場合、緑が恒暗条件下でサンプリングした場合であり、グラフの下の黒と灰色のバーは、(主観的)暗期と(主観的)明期を示す。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (1-way ANOVA)

図 3-6 . 振動遺伝子の時計制御該当配列を含む進化的に保存されたゲノム領域

(A) *Tm4sf7* の E-box 該当配列を含むマウス (NM_053082) とヒト (NM_003271) で保存された領域。(B) *Timp3* の D-box 該当配列を含むマウス (NM_011596) とヒト (NM_000362) で保存された領域。(C) *Col4a1* の RRE 該当配列を含むマウス (NM_009931) とヒト (NM_000389) で保存された領域。(D) *p21Cip1* の RRE 該当配列を含むマウス (NM_007669) とヒト (NM_000389) で保存された領域。(E) *Wee1* の D-box 該当配列を含むマウス (NM_009516) とヒト (NM_003390) で保存された領域。時計遺伝子該当配列は赤字で、マウスとヒトでのミスマッチもしくはギャップ配列は青字で示した。配列情報は全て UCSC Genome Browser に拠った (方法参照)。Mm; マウス、Hs; ヒト

図 3-7 . *Tm4sf7* の機能する時計型 E-box の同定

(A) マウス (Mm) とヒト (Hs) のゲノム配列で保存された時計型 E-box (囲みで示した) と周囲の配列。(B) 3 回直列に野生型 (WT) もしくは変異型 (MT) の時計型 E-box を含む領域をつないだ SV40 ベーシックプロモータで誘導される *dLuc* プロモータ (SV40-*dLuc*) の構造。(C) *Tm4sf7* の E-box を介した転写活性に対する BMAL1/CLOCK と CRY1 の影響。*Renilla* ルシフェラーゼの活性を内在性コントロールとして用いた。データは WT の基本転写活性が 1.0 となるようにノーマライズした。黒カラムが WT で、白カラムが MT で検出された転写活性で、発現プラスミドの有 (+) 無 (-) はグラフ下に示してある。値は実験を 3 回繰り返した際の平均値 \pm 標準誤差である。(D) Rat-1 繊維芽細胞に *Per2* プロモータ(上)、SV40 ベーシックプロモータ(中央) 野生型 *Tm4sf7* の E-box を組み込んだ SV40 ベーシックプロモータ(下) に、それぞれ発現誘導された *dLuc* レポーター遺伝子を導入した場合の発光リズムの代表例。

図 3-8 . 振動遺伝子における機能する D-box もしくは RRE 配列の同定

(A-D): 振動遺伝子 *Timp3* (A)、*Col4a1* (B)、*p21Cip1* (C)、*Wee1* (D) における機能

的 D-box (A, D) 機能的 RRE (B, C) の検討結果。(左上) マウス (*Mm*) とヒト (*Hs*) ゲノム配列で保存された D-box もしくは RRE と周囲の配列。(左下) D-box もしくは RRE を介した転写活性。Renilla ルシフェラーゼの活性を内在性コントロールとして用いた。データは WT の基本転写活性が 1.0 となるようにノーマライズした。黒カラムが WT で、白カラムが MT で検出された転写活性で、発現プラスミドの有 (+) 無 (-) をグラフ下に示した。値は実験を 3 回繰り返した際の平均値±標準誤差である。(中央) 転写因子の D-box もしくは RRE を含むゲノム領域に対する結合活性。結合領域の特異性は野生型 (WT) もしくは変異型 (MT) 配列の非標識オリゴヌクレオチドを加えて競合させて判断した。アッセイには GST を融合させた転写因子の部分配列を用いた。矢頭は標識プローブと転写因子の結合したバンドを示し、シャープ (#) はフリープローブを示す。(右) Rat-1 繊維芽細胞に、野生型 D-box もしくは RRE を組み込んだ SV40 ベーシックプロモータに発現誘導された *dLuc* レポーター遺伝子を導入した場合の、発光リズムの代表例。

図 3-9 . 白色脂肪組織特異的な遺伝子の経時的な発現パターン

(A-B): ホルモン感受性リパーゼ (A) とレプチン (B) の明暗サイクル (左) 及び恒暗条件 (右) における遺伝子発現パターン。シグナル強度 (DNA チップ)(上) もしくは相対 mRNA 発現量 (定量的 PCR (n=3-4 / time point))(下) を示した。グラフ内に Affymetrix プローブ ID 及び最もよく適合した余弦波との相関係数 (DNA チップ) もしくは 1-way ANOVA による p-value (定量的 PCR) を示した。グラフ下に示した白または灰色のバーは明期又は主観的明期を、黒は暗期又は主観的暗期を示す。

表 3-1. *Per1/Rev-erb* クラスターの振動遺伝子

50 遺伝子 (50 プローブ) が *Per1/Rev-erb* クラスターに含まれ、平均ピーク時刻は ZT/CT 10.8 であった。標準偏差を平均で割った値 (SD/Average) は振幅の強さを示す。定量的 PCR によって発現解析を行った遺伝子はアスタリスク (*) で示した (図 3-3 を参照)。

表 3-2. *Per2* クラスターの振動遺伝子

32 遺伝子 (34 プローブ) が *Per2* クラスターに含まれ、平均ピーク時刻は ZT/CT 14.9 であった。プローブ ID 92820_at 及び 92821_at はどちらも *Usp2* を、93314_g_at 及び 93315_at はどちらも *Map2k3* をコードする。標準偏差を平均で割った値 (SD/Average) は振幅の強さを示す。定量的 PCR によって発現解析を行った遺伝子はアスタリスク (*) で示した (図 3-3 を参照)。

表 3-3. *Cry1* クラスターの振動遺伝子

32 遺伝子 (32 プローブ) が *Cry1* クラスターに含まれ、平均ピーク時刻は ZT/CT 19.2 であった。標準偏差を平均で割った値 (SD/Average) は振幅の強さを示す。定量的 PCR によって発現解析を行った遺伝子はアスタリスク (*) で示した (図 3-3 を参照)。

表 3-4. *Bmal1* クラスターの振動遺伝子

21 遺伝子 (23 プローブ) が *Bmal1* クラスターに含まれ、平均ピーク時刻は ZT/CT 21.2 であった。プローブ ID 94881_at 及び 998067_at はどちらも *p21Cip1(Cdkn1a)* を、103619_at 及び 96878_at はどちらも *1810044O22Rik* をコードする。標準偏差を平均で割った値 (SD/Average) は振幅の強さを示す。定量的 PCR によって発現解析を行った遺伝子はアスタリスク (*) で示した (図 3-3 を参照)。

表 3-5. *X* クラスターの振動遺伝子

37 遺伝子 (37 プローブ) が *Per2* クラスターに含まれ、平均ピーク時刻は ZT/CT 6.8 であった。標準偏差を平均で割った値 (SD/Average) は振幅の強さを示す。定量的 PCR によって発現解析を行った遺伝子はアスタリスク (*) で示した (図 3-3 を参照)。

表 3-6. 主要 5 クラスターに属さなかった振動遺伝子

30 遺伝子 (30 プローブ) が主要 5 クラスターに分類されなかった。

表 3-7. *Per1/Rev-erb* クラスターにおけるマウス (*Mm.*) とヒト (*Hs.*) の保存領域における時計遺伝子の結合領域候補配列

時計型 E-box (CACGTG)、D-box (TTA[C/T]GTAA)、RRE ([A/T]A[A/T]nT[A/G]GGTCA)。RRE の場合は青字で示した AT-rich な領域における 1b のミスマッチヌクレオチドを許した。これらの配列はプロモーター領域から翻訳領域を含み、3'-非翻訳領域まで散っていることに注意する。また、これらの配列が機能しない可能性にも注意する。

表 3-8. *Per2* クラスターにおけるマウス (*Mm.*) とヒト (*Hs.*) の保存領域における時計遺伝子の結合領域候補配列

時計型 E-box (CACGTG)、D-box (TTA[C/T]GTAA)、RRE ([A/T]A[A/T]nT[A/G]GGTCA)。RRE の場合は青字で示した AT-rich な領域における 1b のミスマッチヌクレオチドを許した。これらの配列はプロモーター領域から翻訳領域を含み、3'-非翻訳領域まで散っていることに注意する。また、これらの配列が機能しない可能性にも注意する。

表 3-9. *Cry1* クラスターにおけるマウス (*Mm.*) とヒト (*Hs.*) の保存領域における時計遺伝子の結合領域候補配列

時計型 E-box (CACGTG)、D-box (TTA[C/T]GTAA)、RRE ([A/T]A[A/T]nT[A/G]GGTCA)。RRE の場合は青字で示した AT-rich な領域における 1b のミスマッチヌクレオチドを許した。これらの配列はプロモーター領域から翻訳領域を含み、3'-非翻訳領域まで散っていることに注意する。また、これらの配列が機能しない可能性にも注意する。

表 3-10. *Bmal1* クラスターにおけるマウス (*Mm.*) とヒト (*Hs.*) の保存領域における時計遺伝子の結合領域候補配列

時計型 E-box (CACGTG)、D-box (TTA[C/T]GTAA)、RRE ([A/T]A[A/T]nT[A/G]GGTCA)。RRE の場合は青字で示した AT-rich な領域における 1b のミスマッチヌクレオチドを許した。これらの配列はプロモータ領域から翻訳領域を含み、3'-非翻訳領域まで散っていることに注意する。また、これらの配列が機能しない可能性にも注意する。

表 3-11. *X* クラスターにおけるマウス (*Mm.*) とヒト (*Hs.*) の保存領域における時計遺伝子の結合領域候補配列

時計型 E-box (CACGTG)、D-box (TTA[C/T]GTAA)、RRE ([A/T]A[A/T]nT[A/G]GGTCA)。RRE の場合は青字で示した AT-rich な領域における 1b のミスマッチヌクレオチドを許した。これらの配列はプロモータ領域から翻訳領域を含み、3'-非翻訳領域まで散っていることに注意する。また、これらの配列が機能しない可能性にも注意する。

表 3-12. 主要 5 クラスターに属さない振動遺伝子と定量的 PCR で統計的に有意な振動の見られた遺伝子 (*tPa*, *Wee1*) におけるマウス (*Mm.*) とヒト (*Hs.*) の保存領域における時計遺伝子の結合領域候補配列

時計型 E-box (CACGTG)、D-box (TTA[C/T]GTAA)、RRE ([A/T]A[A/T]nT[A/G]GGTCA)。RRE の場合は青字で示した AT-rich な領域における 1b のミスマッチヌクレオチドを許した。これらの配列はプロモータ領域から翻訳領域を含み、3'-非翻訳領域まで散っていることに注意する。また、これらの配列が機能しない可能性にも注意する。

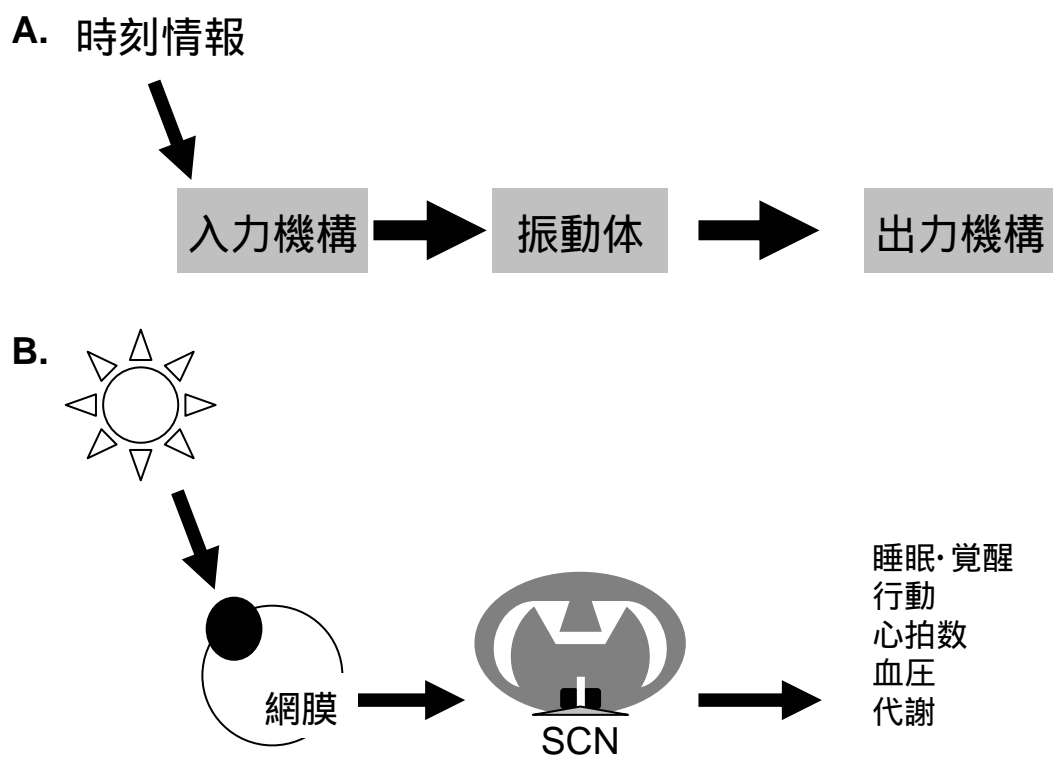


図1-1 . 体内時計の構成要素

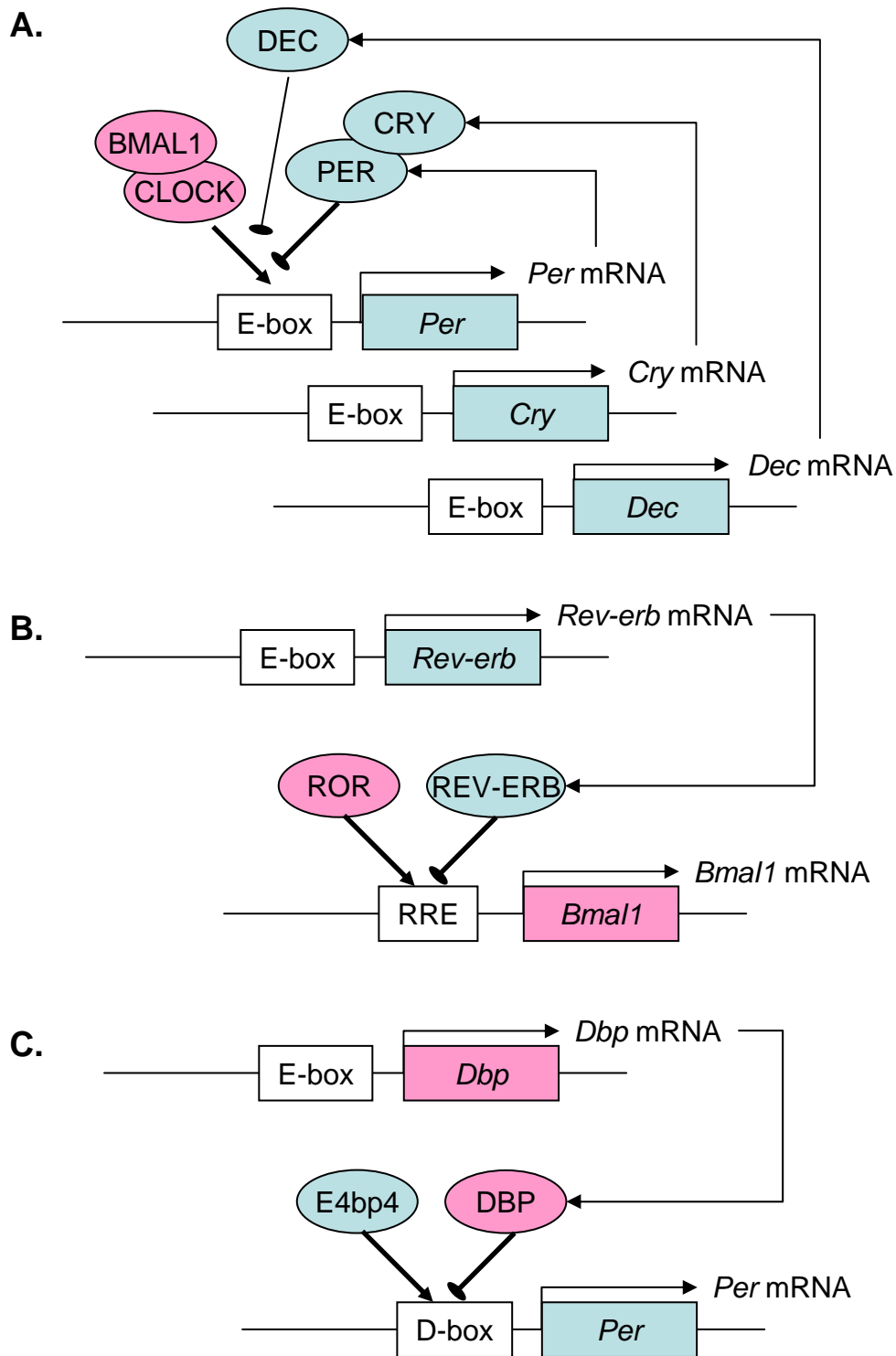
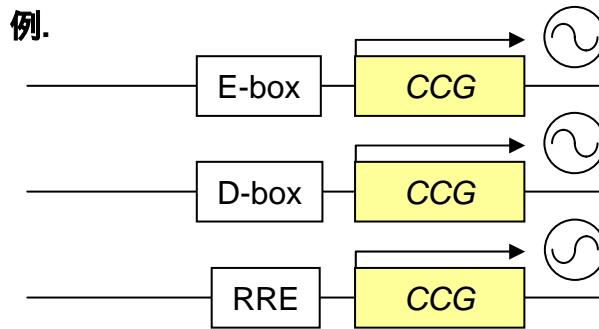
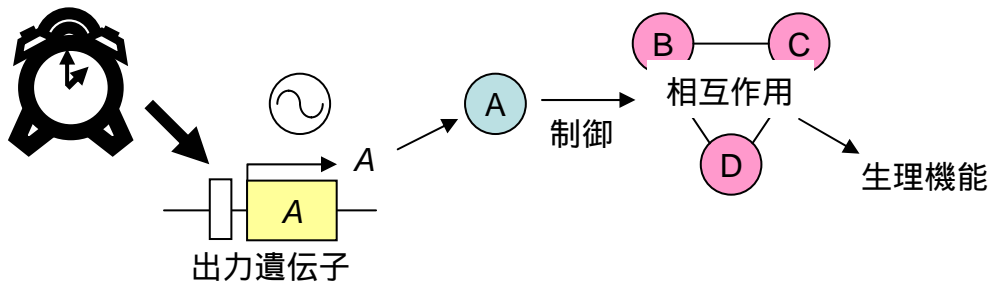


図1-2. 体内時計の分子機構

A. 時計(関連)遺伝子 → 時計制御遺伝子



B. 時計(関連)遺伝子 → 出力遺伝子



C. 振動遺伝子

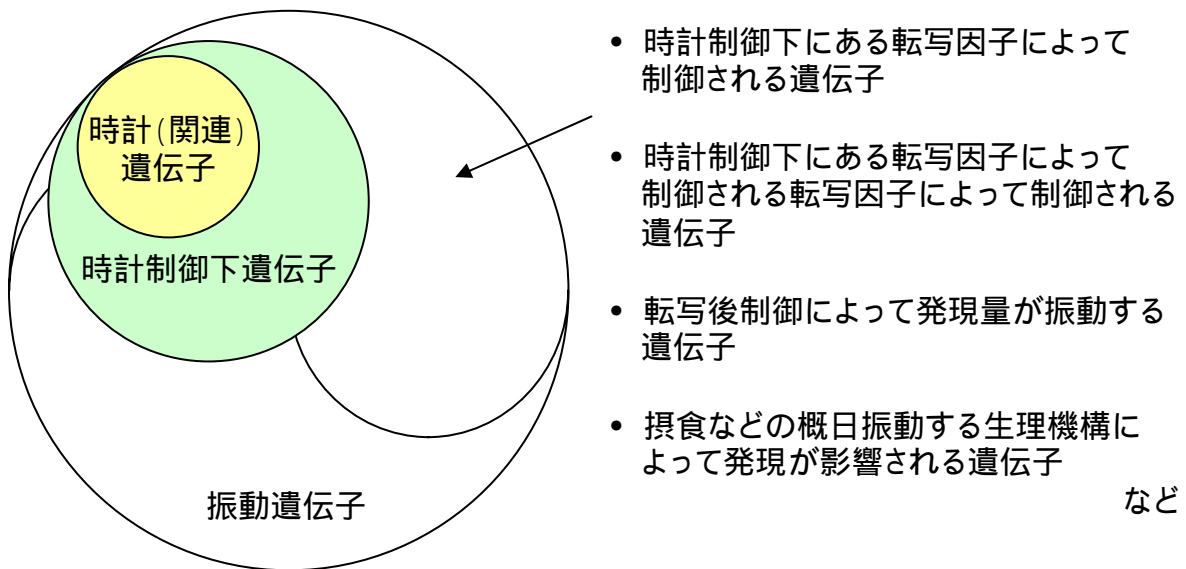


図1-3. 概日振動する遺伝子

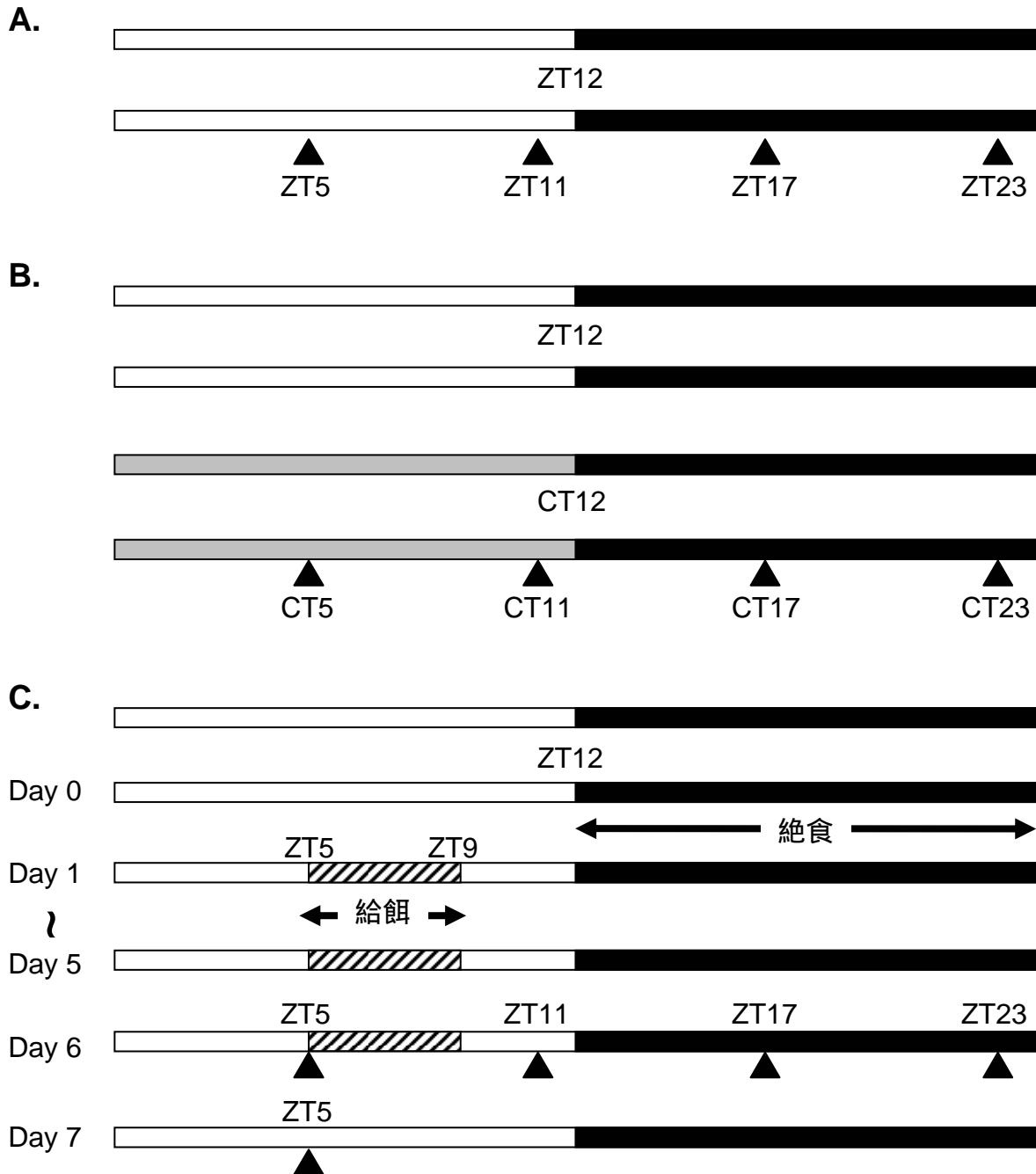


図2-1. マウスの飼育条件と、心臓のサンプリングスケジュール

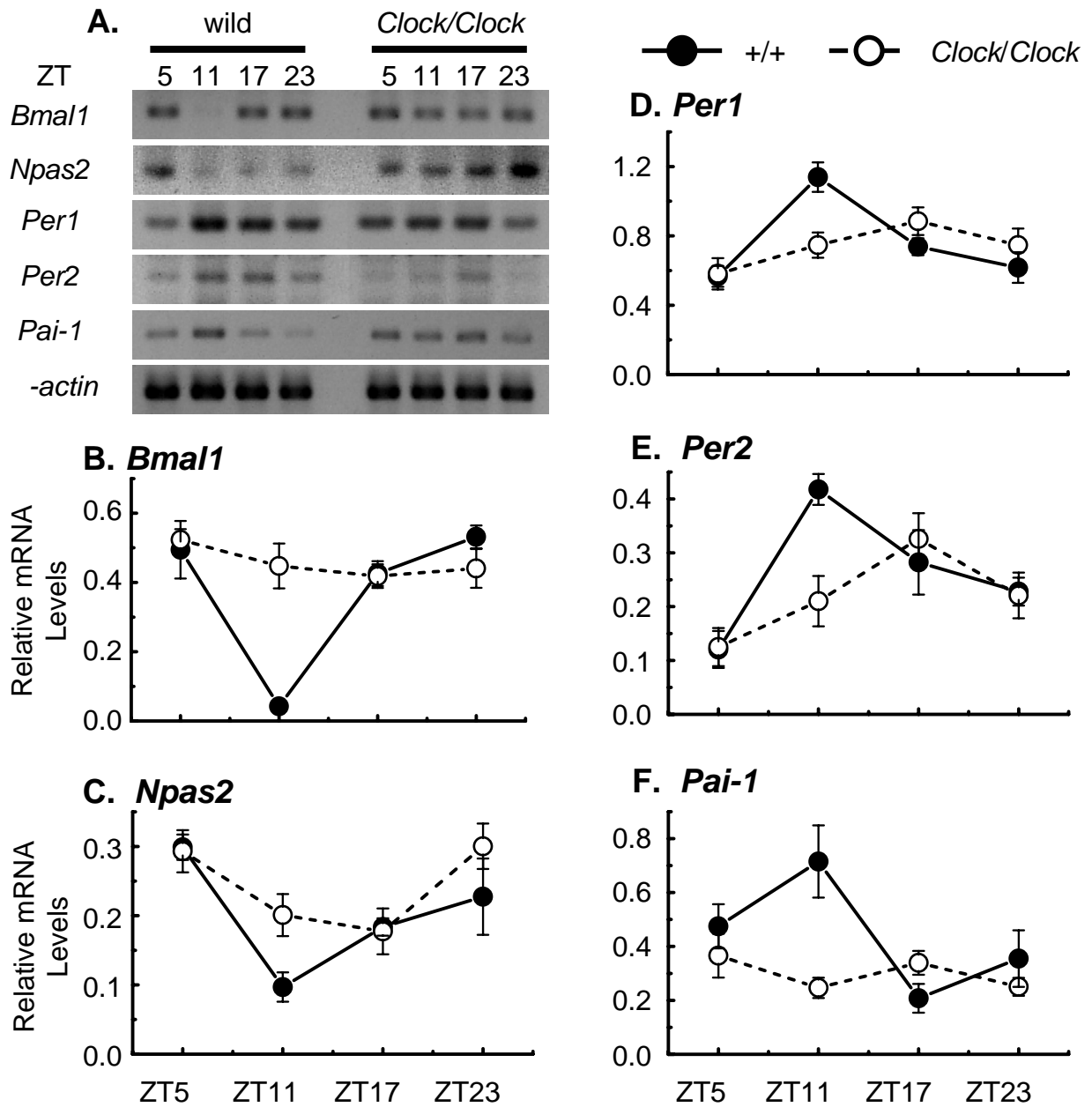


図2-2. 明暗条件における心臓の時計遺伝子発現と*Pai-1*遺伝子発現

表 2-1. 実験に用いたプライマーの配列及び想定される PCR 産物の大きさ

Gene Name	Product	F/R	Sequence
<i>mPer1</i>	289bp	F	5'-CAAGTGGCAATGAGTCCAACG-3'
		R	5'-CGAAGTTTGAGCTCCCGAAGT-3'
<i>mPer2</i>	381bp	F	5'-CAGACTCATGATGACAGAGG-3'
		R	5'-GAGATGTACAGGATCTTCCC-3'
<i>mBmal1</i>	344bp	F	5'-CACTGACTACCAAGAAAGTATG-3'
		R	5'-ATCCATCTGCTGCCCTGAGA-3'
<i>mNpas2</i>	243bp	F	5'-CTCAGTGGTCAGTTACGCAG-3'
		R	5'-TGGAGGTGGGTTCTGACATG-3'
<i>mPai-1</i>	539bp	F	5'-TCAGAGCAACAAGTTCAACTACTGAG-3'
		R	5'-CCCCTGTCAAGGCTCCATCACTTGCCCCA-3'
<i>mβ-actin</i>	452bp	F	5'-GAGGGAAATCGTGCGTGACAT-3'
		R	5'-ACATCTGCTGGAAGGTGGACA-3'

表 2-2. 時計遺伝子と *Pai-1* 遺伝子の発現の日内変動とピーク時刻

genotype	Feeding Conditions	Lighting Conditions	Positive Regulators		Negative Regulators		Out-put
			<i>Bmal1</i>	<i>Npas2</i>	<i>Per1</i>	<i>Per2</i>	<i>Pai-1</i>
wild type	<i>Ad lib</i>	DD	CT23 ^{***}	CT23 ^{***}	CT11 ^{***}	CT11 ^{***}	CT17 ^{**}
	<i>Ad lib</i>	LD	ZT23 ^{***}	ZT5 ^{***}	ZT11 ^{***}	ZT11 ^{***}	ZT11 [*]
	RF	LD	ZT17 ^{***}	ZT17 ^{***}	ZT5 ^{***}	ZT5 ^{***}	ZT23 [*]
<i>Clk/Clk</i>	<i>Ad lib</i>	DD	CT5 ^{***}	CT5 [*]	-	-	-
	<i>Ad lib</i>	LD	-	ZT23 [*]	-	ZT17 [*]	-
	RF	LD	ZT11-17 ^{***}	ZT17 [*]	ZT5 ^{***}	ZT5 ^{***}	ZT23 [*]

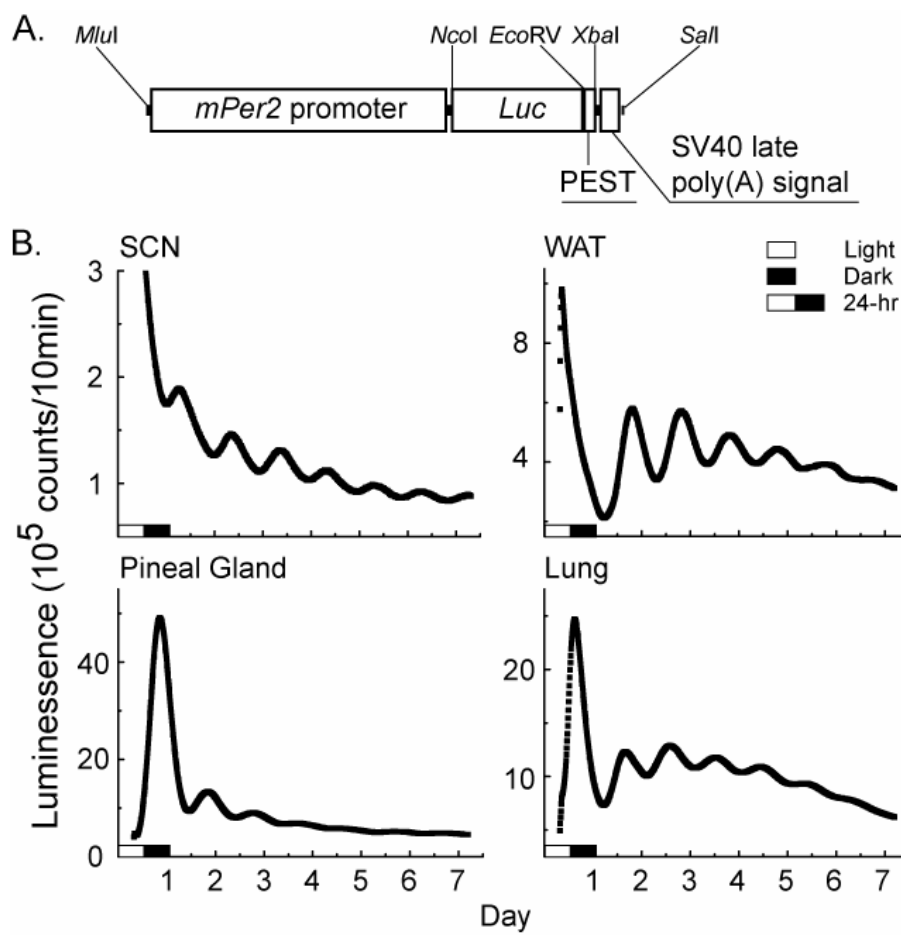


図3-1 . PMTによる内在性の時計に依存した生物発光の検出

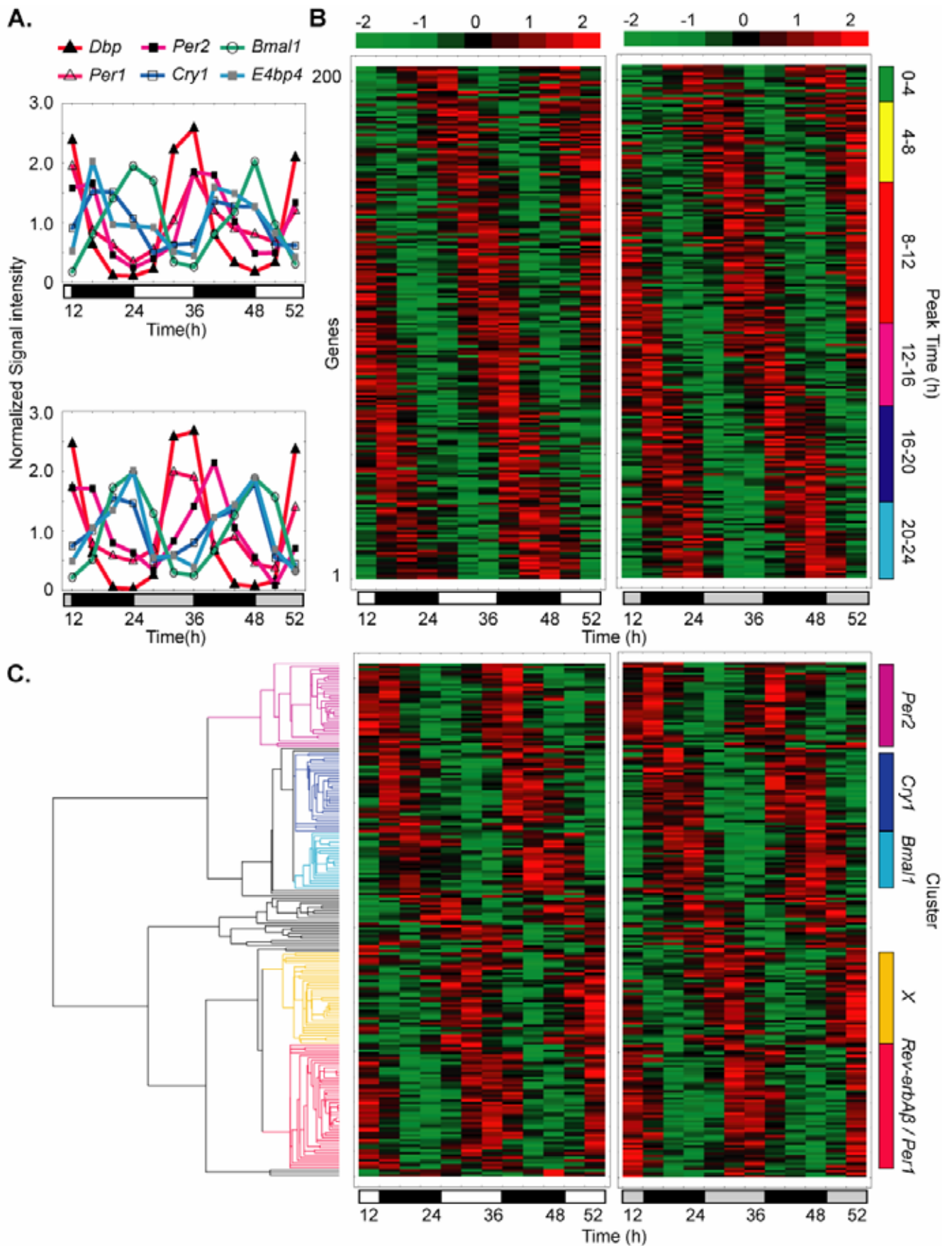


図3-2. マウス白色脂肪組織における時間的な発現プロファイル

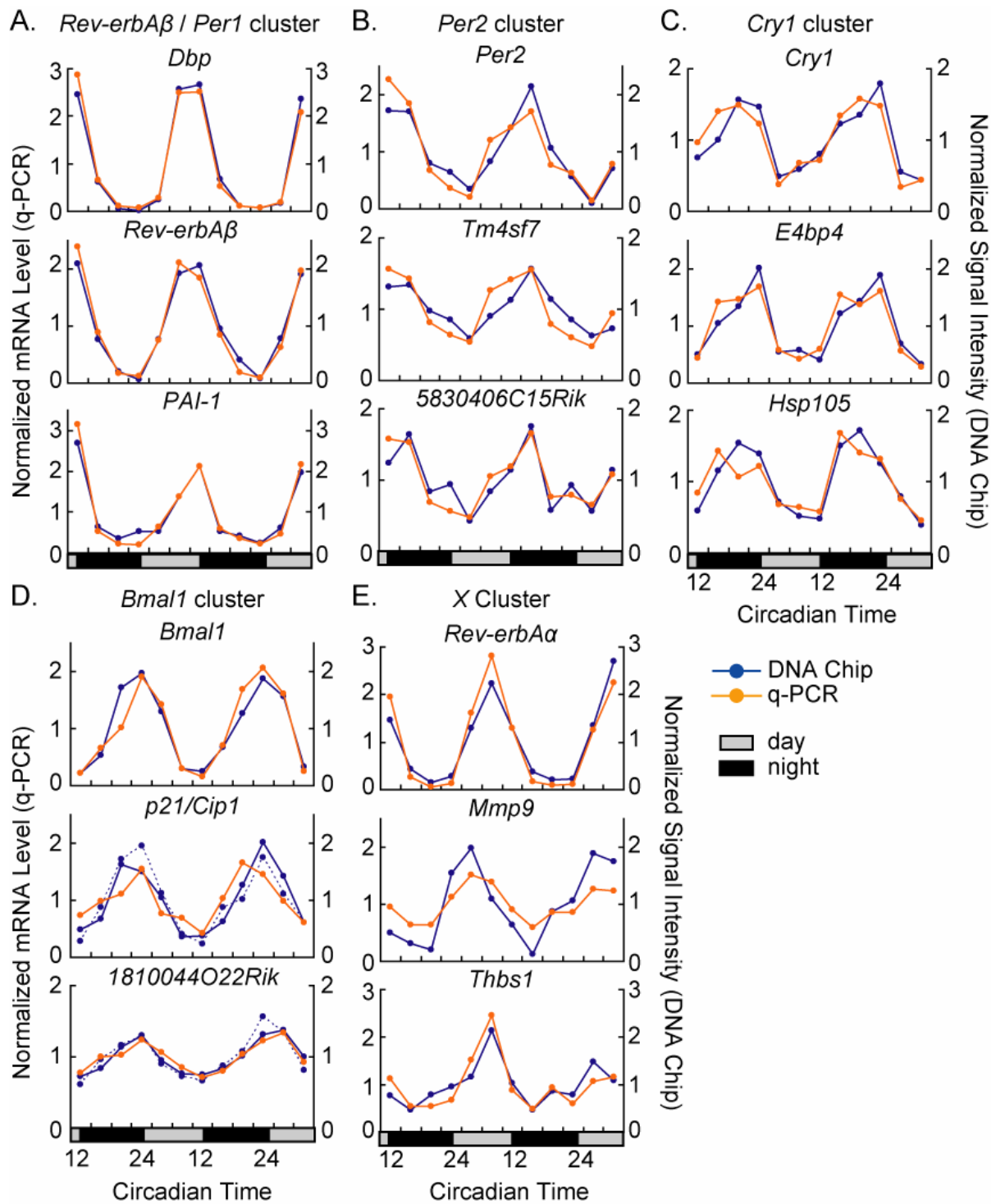


図3-3. DNAチップによる解析結果の定量的PCR法による確認

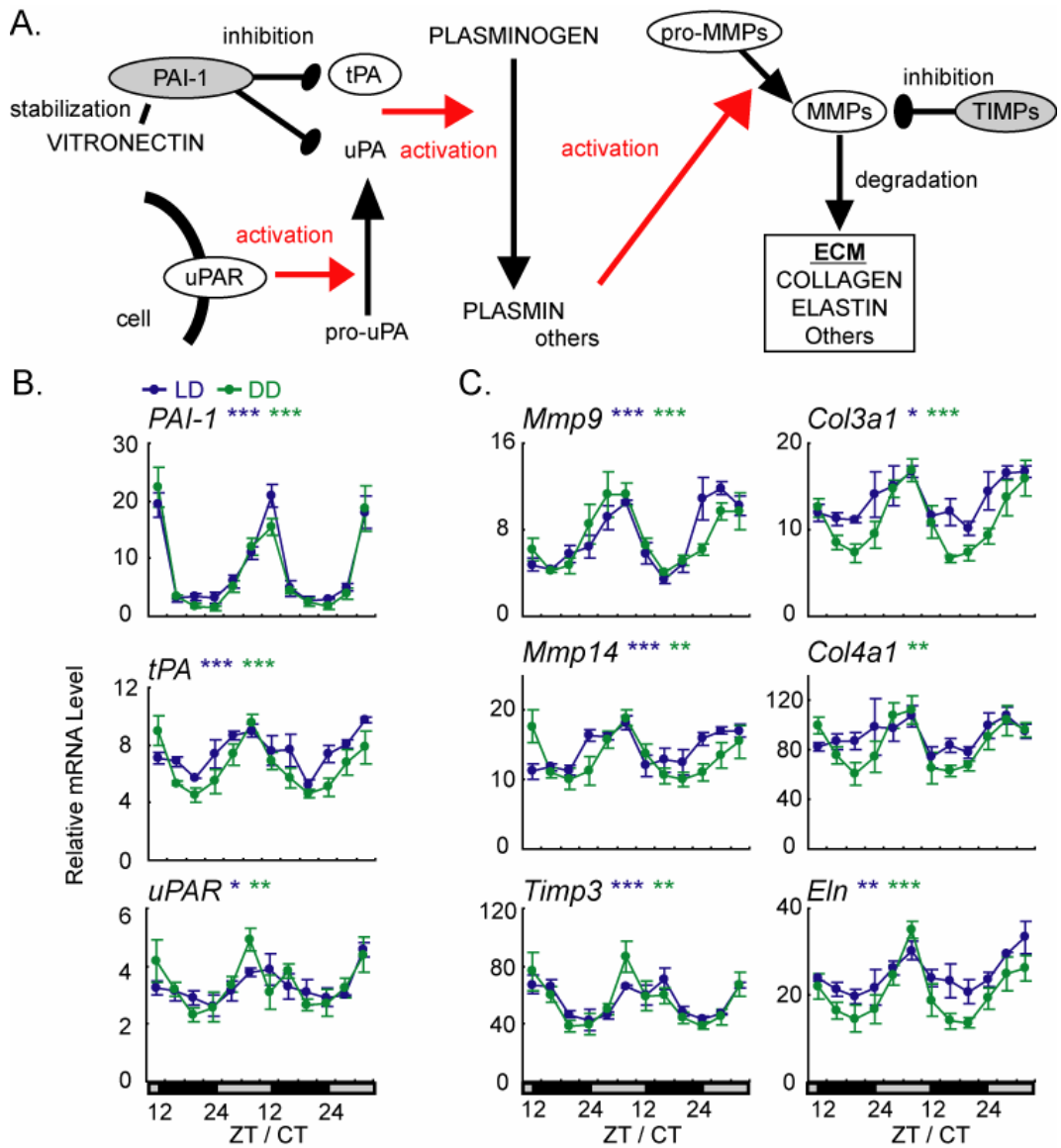


図3-4. 線溶系と細胞外マトリクスリモデリングシステムのキーレギュレーターの概日振動

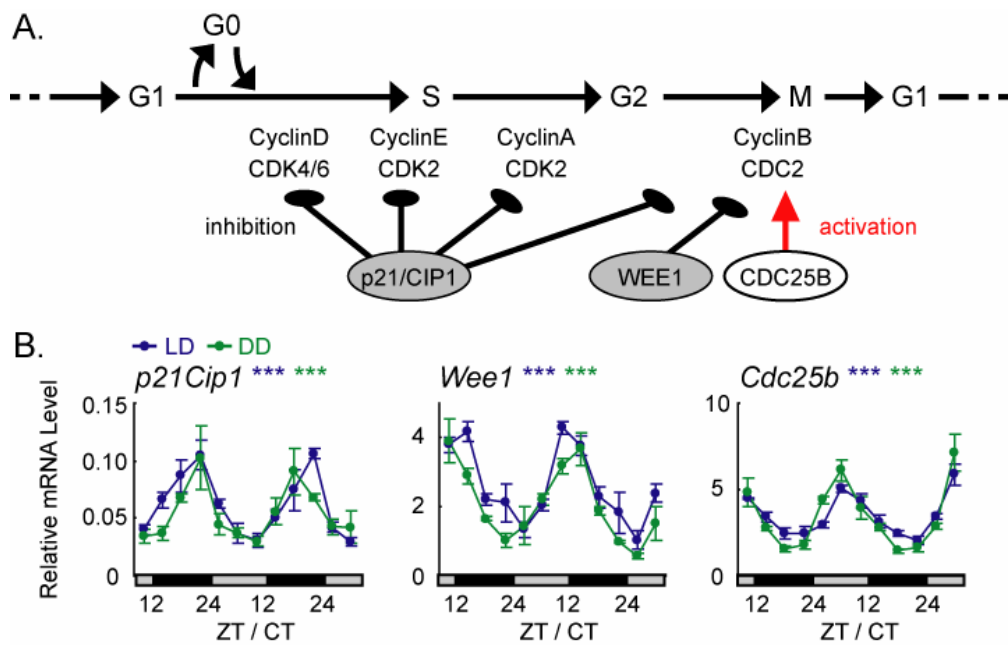


図3-5. 細胞周期のキーレギュレーターの概日振動

A.	<i>mTm4sf7</i> : Chr.17 (+)	1st intron	E-box	
	<i>hTm4sf7</i> : Chr.11 (-)	putative 5' -UTR	E-box	
	<i>Mm.</i> 130498167	ccctggacagcctccctggcagcttttggccatcccccatggagccacgctgcaagagccacg		130498225
	<i>Hs.</i> 354415	cctgggagcagcttcccagtggtgcatattggccataccccaagcagcagctgcaagagccacg		354474
<i>Mm.</i> 130498226	agc		130498229	
<i>Hs.</i> 354475	agc		354477	
B.	<i>mTimp3</i> : Chr.10 (+)	2nd intron	D-box	
	<i>hTimp3</i> : Chr.22 (+)	2nd intron	D-box	
	<i>Mm.</i> 85872512	ctgtggctagatgcactaattctgtggaacctggtgctctggcttcaattctggaaacag		85872571
	<i>Hs.</i> 31571481	ctgaggctggatgtactaatttctgtggaacctggtgcttggattcaatttgcacaacat		31571540
	<i>Mm.</i> 85872572	tcccaggtcttggttatgtaatggttcagagtcagccctggccaattgccccttggctgcc		85872631
	<i>Hs.</i> 31571541	ccacagccttctggttatgtaatggttcagagtcagccctggccaattgccccttggctgcc		31571610
<i>Mm.</i> 85872632	tgagcttgggtcatgagagcagctcatgtcttcagacagcc		85872671	
<i>Hs.</i> 31571611	taagcttgggtcatgagaccagcttatgtcttcagacagcc		31571640	
C.	<i>mCol4a1</i> : Chr.8 (-)	1st intron	RRE	
	<i>hCol4a1</i> : Chr.13 (-)	1st intron	RRE	
	<i>Mm.</i> 11317334	ccaaaaccatttctctggagattaaagaccatttgggggttagtggtttaaataactccta		11317275
	<i>Hs.</i> 109787625	ccaaaaccggttctagagataaaagacggttgaagggttagtggtttaaataactccta		109787566
	<i>Mm.</i> 11317274	aattttggtcaggaaatggcctataaaattaaagaggagattgccaggcaggcaggaaaa		11317215
	<i>Hs.</i> 109787565	aattttggtcaggaaatggcctatacaatgaagataaaacttacca----aagcaggaaaa		109787510
<i>Mm.</i> 11317214	tgggtcagtgctggggg		11317198	
<i>Hs.</i> 109787509	tgggtcagtgatggggg		109787493	
D.	<i>mP21/Cip1</i> : Chr.17 (+)	1st intron	RRE	
	<i>hP21/Cip1</i> : Chr.6 (+)	1st intron	RRE	
	<i>Mm.</i> 27808365	cggcacagtgaacctatttggcgggacagtatgttcccagggaaccgggacacggggag		27808424
	<i>Hs.</i> 36648753	cggcacagtgaacctatttggcgtggaacagatttgttcccagggaagccggg-cac-tggag		36648810
<i>Mm.</i> 27808425	gtccaggacgcggtgtccggtccccgctcggcggcgccctcggggacaggagtc		27808481	
<i>Hs.</i> 36648811	gtccgggacacgcgctcgggtccccgctcggcggcgcgctgtaggggctcggggagtc		36648867	
E.	<i>mWee1</i> : Chr.7 (+)	1st intron	D-box	
	<i>hWee1</i> : Chr.11 (+)	1st intron	D-box	
	<i>Mm.</i> 98356400	aaagttggcagcccccttttggctctgccatagaagttgtcggttaaagattatgtaact		98356459
	<i>Hs.</i> 9635336	aaagttggcagccccctgtgttggcctctgccccagaggtgtcggttgagattatgtaact		9635395
<i>Mm.</i> 98356460	gaacaatgggcctggctctgtaact		98356483	
<i>Hs.</i> 9635396	gaacaatgggcctcgtctggaact		9635419	

図3-6. 振動遺伝子の時計制御該当配列を含む進化的に保存されたゲノム領域

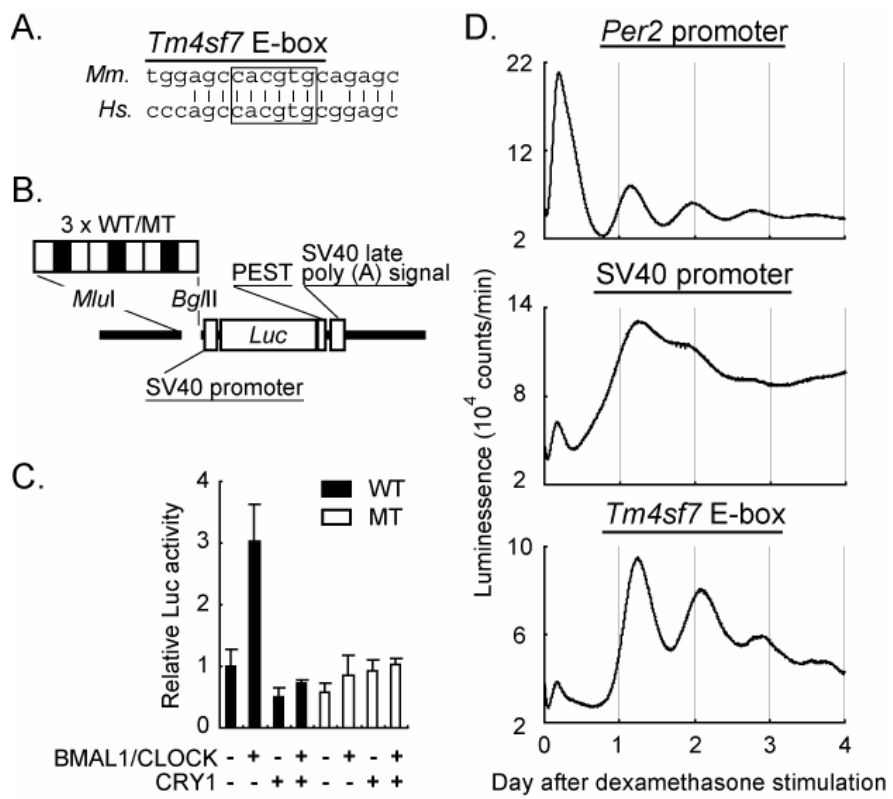
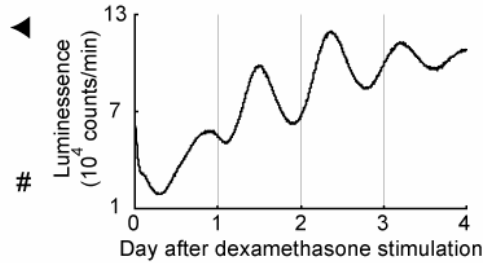
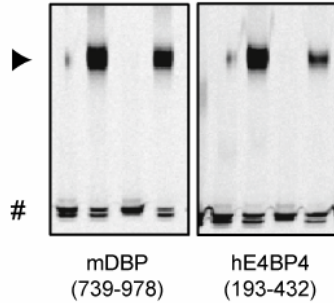
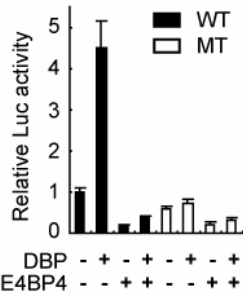


図3-7. *Tm4sf7*の機能する時計型E-boxの同定

A. *Timp3* D-box

Mm. gctcttggcttatgtaactgttcag
Hs. ccttctggcttatgtaactgtccag

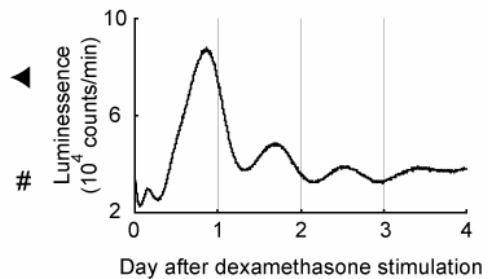
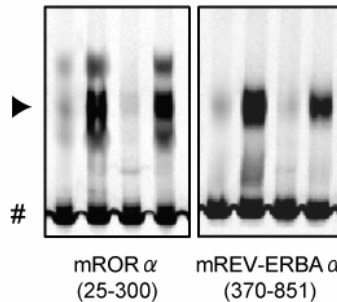
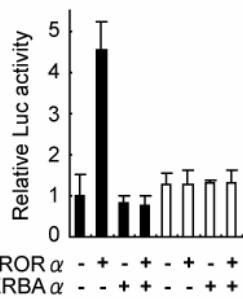
GST-Protein - + + + - + + +
 competitor - - W M - - W M



B. *Col4a1* RRE

Mm. ggcaggaaaatgggtcagtgtctg
Hs. agcaggaaaatgggtcagtgtctg

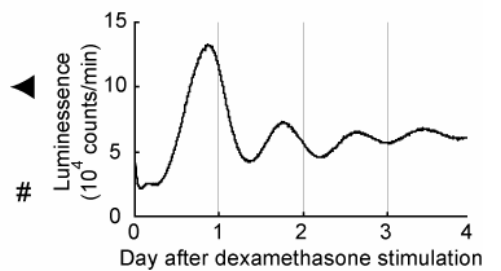
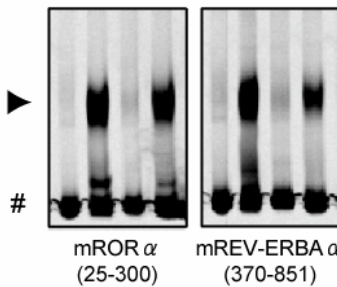
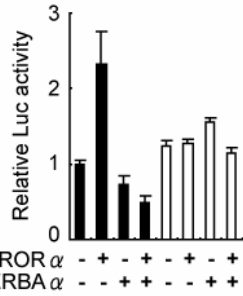
GST-Protein - + + + - + + +
 competitor - - W M - - W M



C. *p21Cip1* RRE

Mm. gcacagtgacctatttggcgggc
Hs. gcacagtgacctatttggctgga

GST-Protein - + + + - + + +
 competitor - - W M - - W M



D. *Wee1* D-box

Mm. ggtaagaattatgtaactgaaca
Hs. cgttgagaattatgtaactgaaca

GST-Protein - + + + - + + +
 competitor - - W M - - W M

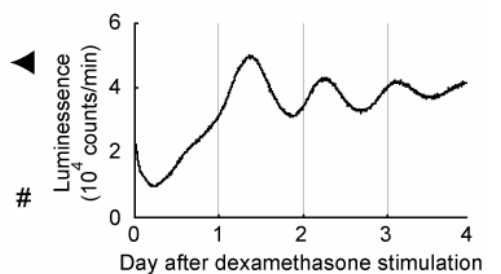
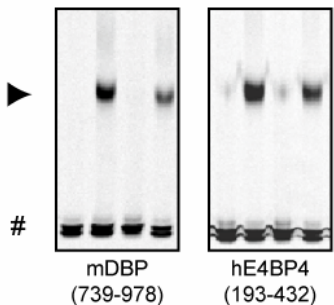
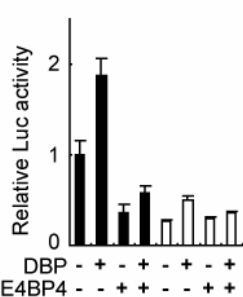
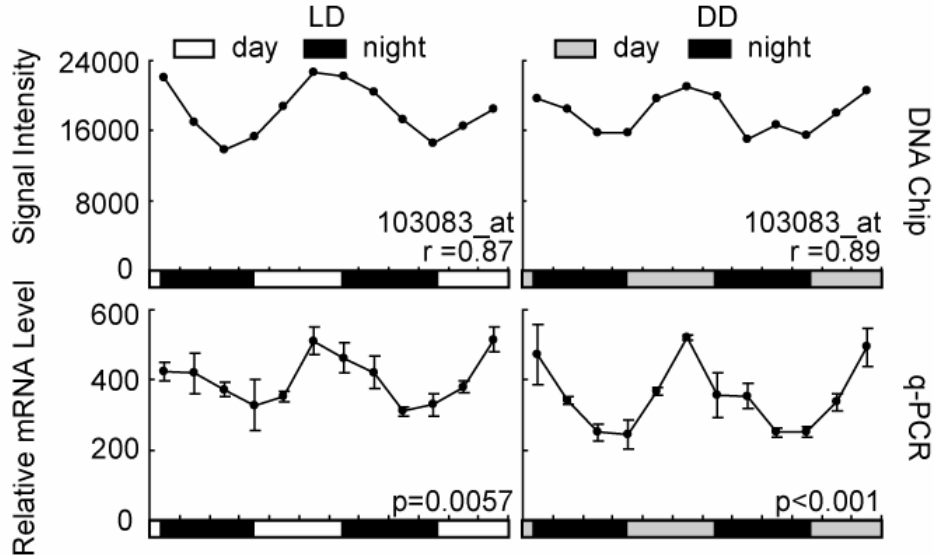


図3-8. 振動遺伝子における機能するD-boxもしくはRRE配列の同定

A. Hormone sensitive lipase



B. Leptin

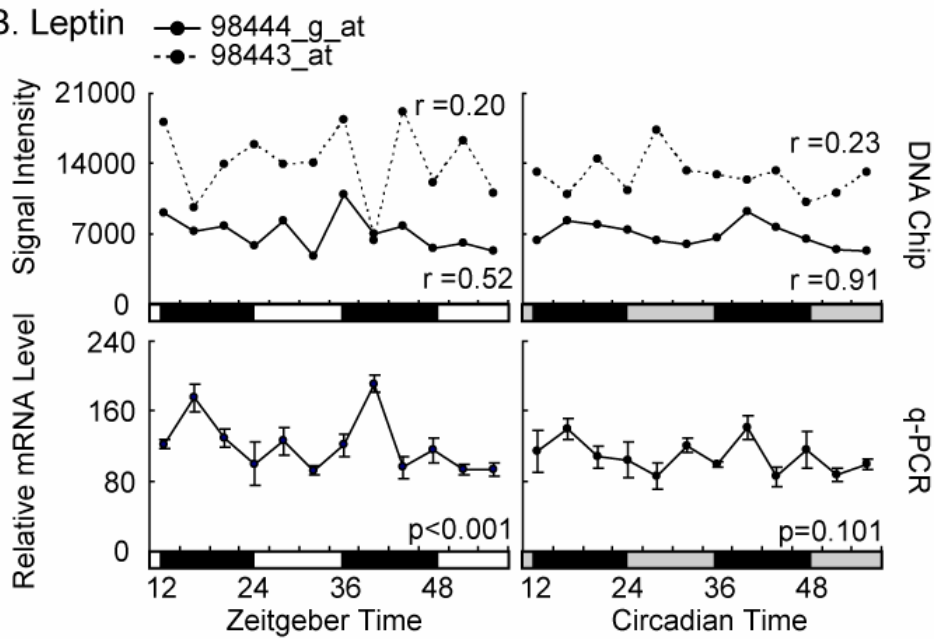


図3-9. 白色脂肪組織特異的な遺伝子の経時的な発現パターン

表 3-1. *Per1/Rev-erb* クラスターの振動遺伝子

Affymetrix Probe ID	Ref-seq ID	UniGene ID	Gene Symbol	Correlation (Best Fit Period (hrs))				Average		SD/Average		Peak Time (ZT/CT)		
				LD	DD	LD	DD	LD	DD	LD	DD	LD	DD	LD&DD
101836_at	NM_011151	Mm.849	Ppm1b	0.77	25	0.77	24	100.3	96.0	0.31	0.29	7.6	10.4	9.0
103035_at	NM_013683	Mm.16122	Tap1	0.84	27	0.78	27	803.3	824.5	0.14	0.19	7.2	10.0	8.6
102134_f_at	NM_026468	Mm.10314	Atp5g2	0.74	28	0.76	26	1087.9	1115.0	0.08	0.10	6.0	12.4	9.2
98031_at	NM_016778	Mm.3295	Bok	0.77	25	0.80	24	1128.5	1445.8	0.26	0.27	8.4	14.8	11.6
101520_at	NM_026470	Mm.8540	Spata6	0.77	24	0.75	26	684.1	798.1	0.25	0.16	10.4	9.2	9.8
98928_at	NM_011778	Mm.28652	Coro1b	0.80	26	0.78	26	3046.3	3088.6	0.15	0.11	12.0	12.8	12.4
104541_at	NM_011178	Mm.2364	Prtn3	0.88	24	0.86	25	760.4	611.1	0.28	0.33	9.2	13.2	11.2
98114_at	NM_008720	Mm.3484	Npc1	0.77	25	0.82	27	1378.0	1155.4	0.13	0.16	12.0	10.0	11.0
98624_at	NM_019547	Mm.3865	Rnpc1	0.88	27	0.78	25	627.3	691.0	0.33	0.27	12.0	9.6	10.8
160320_at	NM_009166	Mm.29030	Sorbs1	0.86	26	0.93	24	7640.0	6631.7	0.18	0.20	9.6	9.2	9.4
96825_at	NM_153533	Mm.29389	Tenc1	0.86	25	0.87	24	1650.0	1784.3	0.40	0.54	9.2	9.6	9.4
103563_at	-	Mm.19126	4930534K13Rik	0.79	26	0.94	26	905.8	908.2	0.21	0.31	8.8	9.6	9.2
98055_at	NM_016916	Mm.34330	Blcap	0.87	25	0.86	26	2167.4	2008.7	0.17	0.19	9.2	9.6	9.4
96596_at	NM_008681	Mm.30837	Ndr1	0.96	26	0.89	25	3429.9	3147.7	0.20	0.22	9.2	10.4	9.8
103083_at	NM_010719	Mm.333679	Lipe	0.87	27	0.89	24	18230.8	17985.4	0.17	0.12	10.8	8.8	9.8
93528_s_at	NM_010638	Mm.19788	Bteb1	0.91	25	0.76	24	3886.5	3792.5	0.21	0.17	11.2	9.6	10.4
160362_at	NM_145569	Mm.29815	Mat2a	0.89	24	0.75	26	3042.9	3262.0	0.21	0.16	10.0	10.4	10.2
104621_at	NM_172606	Mm.24236	F830029L24Rik	0.78	24	0.84	25	2639.7	2666.7	0.13	0.11	10.8	10.0	10.4

104603_at	NM_010361	Mm.24118	Gstt2	0.89	23	0.90	26	1650.4	1670.6	0.28	0.37	12.8	13.2	13.0
160519_at	NM_011595	Mm.4871	Timp3	0.83	23	0.85	28	4041.9	4168.4	0.20	0.20	12.4	12.4	12.4
99444_at	NM_019444	Mm.218611	Ramp2	0.91	23	0.89	26	2368.2	2487.4	0.16	0.21	13.2	12.8	13.0
104674_s_at	NM_008793	Mm.299916	Pcsk4	0.86	25	0.90	24	407.6	497.2	0.43	0.39	12.4	12.8	12.6
95910_f_at	NM_144917	Mm.24440	C330008I15Rik	0.85	25	0.93	25	1774.3	1621.4	0.25	0.27	10.8	11.2	11.0
160117_at	NM_017376	Mm.19258	Tef	0.86	25	0.95	24	3070.8	3012.1	0.58	0.50	12.0	12.0	12.0
99019_at	NM_008898	Mm.3863	Por	0.91	26	0.94	23	4412.7	4176.0	0.29	0.28	12.0	11.6	11.8
103556_at	NM_011923	Mm.19081	Angptl2	0.98	25	0.97	24	4786.1	5100.7	0.37	0.35	12.4	12.4	12.4
100508_at	NM_008595	Mm.517	Mfng	0.92	26	0.94	23	1491.2	1617.6	0.34	0.22	12.0	11.6	11.8
103404_at	-	Mm.200885	1110033A15Rik	0.90	25	0.82	25	2698.0	2766.7	0.18	0.20	12.0	10.8	11.4
104200_at	NM_177870	Mm.205463	Slc5a6	0.89	24	0.90	22	1400.9	1334.8	0.40	0.37	12.0	11.6	11.8
104109_at	NM_145564	Mm.21912	Fbxo21	0.93	25	0.96	25	1579.9	1349.6	0.28	0.38	10.4	11.2	10.8
160841_at	NM_016974	Mm.3459	Dbp *	0.92	25	0.93	25	885.7	947.6	1.00	1.14	10.8	10.4	10.6
99076_at	NM_011584	Mm.26587	Rev-erb (Nr1d2) *	0.91	24	0.98	24	363.8	339.0	0.67	0.79	10.4	10.4	10.4
97383_at	NM_009320	Mm.200518	Slc6a6	0.87	26	0.94	24	1832.5	1894.1	0.36	0.28	10.4	10.0	10.2
100482_at	NM_183149	Mm.219581	Zfp598	0.93	23	0.97	24	1829.9	1658.9	0.22	0.22	10.8	11.6	11.2
93619_at	NM_011065	Mm.7373	Per1	0.86	25	0.85	26	505.8	419.6	0.49	0.58	12.0	10.8	11.4
104371_at	NM_010046	Mm.22633	Dgat1	0.82	25	0.80	22	5466.7	6001.1	0.19	0.15	12.0	11.2	11.6
94507_at	NM_007981	Mm.28962	FacI2	0.82	22	0.74	22	3030.8	3042.8	0.24	0.20	12.0	12.0	12.0
104760_at	NM_025903	Mm.181740	lfrd2	0.80	26	0.71	22	997.3	1058.6	0.20	0.15	12.0	12.0	12.0
94147_at	NM_008871	Mm.1263	PAI-1 (Serpine1) *	0.85	24	0.86	24	289.2	264.5	0.68	0.83	10.0	10.4	10.2
93320_at	NM_013495	Mm.18522	Cpt1a	0.84	24	0.90	24	3173.3	2840.1	0.16	0.23	8.8	10.8	9.8

92487_at	NM_011446	Mm.42162	Sox7	0.76	26	0.86	24	789.6	706.3	0.29	0.23	8.8	10.4	9.6
92384_at	NM_011728	Mm.227318	Xpa	0.73	28	0.90	23	268.6	236.1	0.22	0.23	8.8	10.0	9.4
97353_at	-	Mm.29629	2310011D08Rik	0.80	23	0.80	22	852.3	819.6	0.21	0.22	9.6	10.0	9.8
99013_f_at	NM_016963	Mm.38445	Tmod3	0.74	20	0.79	23	8940.4	9114.9	0.09	0.07	8.4	10.0	9.2
97593_f_at	NM_022009	Mm.25044	Fliih	0.75	21	0.79	24	4320.2	3848.0	0.17	0.11	10.4	12.4	11.4
101995_at	NM_011018	Mm.40828	Sqstm1	0.80	27	0.77	24	4995.9	4856.2	0.12	0.10	12.8	10.0	11.4
100011_at	NM_008453	Mm.28787	Klf3	0.67	20	0.80	23	940.5	910.7	0.16	0.15	9.6	12.0	10.8
103460_at	NM_029083	Mm.21697	5830413E08Rik	0.83	25	0.76	25	776.9	741.3	0.26	0.42	13.2	12.0	12.6
103446_at	NM_027835	Mm.21551	9130009C22Rik	0.81	23	0.72	21	592.7	664.4	0.19	0.13	12.4	8.8	10.6
93693_at	NM_177338	Mm.844	F830020C16Rik	0.76	22	0.76	24	877.1	974.5	0.19	0.17	11.2	8.0	9.6

表 3-2. *Per2* クラスターの振動遺伝子

Affymetrix Probe ID	Ref-seq ID	UniGene ID	Gene Symbol	Correlation (Best Fit Period (hrs))				Average		SD/Average		Peak Time (ZT/CT)		
				LD	DD	LD	DD	LD	DD	LD	DD	LD	DD	LD&DD
97776_at	NM_010077	Mm.41970	Drd2	0.66	20	0.74	26	113.8	105.7	0.38	0.44	15.2	17.6	16.4
92374_at	NM_016749	Mm.200230	Mybph	0.75	28	0.76	23	303.8	318.8	0.19	0.18	14.4	13.6	14.0
94161_at	NM_011104	Mm.12808	Prkce	0.75	21	0.74	22	206.9	216.2	0.38	0.24	13.2	15.2	14.2
103600_at	NM_013514	Mm.20046	Epb4.9	0.84	25	0.67	21	1371.1	1608.2	0.29	0.12	12.4	14.8	13.6
100596_at	NM_009150	Mm.196558	Selenbp1	0.83	25	0.68	28	3293.3	3470.0	0.12	0.08	13.6	16.0	14.8
98056_at	NM_013750	Mm.34346	Phlda3	0.91	27	0.77	25	7800.0	8622.4	0.33	0.21	13.6	17.6	15.6
93264_at	NM_011480	Mm.214958	Srebf1	0.84	26	0.77	24	10128.9	11970.9	0.21	0.16	14.0	17.6	15.8
160195_at	NM_029090	Mm.24821	1200013P24Rik	0.97	24	0.94	24	2271.4	2408.0	0.16	0.17	15.2	18.4	16.8
92276_at	NM_016693	Mm.36640	Map3k6	0.85	26	0.82	25	950.1	882.9	0.29	0.30	16.8	16.4	16.6
93956_at	NM_010501	Mm.271850	Ifit3	0.89	22	0.75	22	280.1	380.4	0.32	0.32	15.6	16.0	15.8
96120_at	NM_011847	Mm.2701	Dnajb6	0.76	28	0.79	24	3379.2	3360.1	0.17	0.17	17.2	16.4	16.8
94461_at	NM_021524	Mm.28830	Pbef-pending	0.93	24	0.86	25	1270.1	1258.4	0.21	0.30	16.0	16.0	16.0
104320_at	-	Mm.258945	2310036D04Rik	0.93	26	0.94	26	3868.0	3952.3	0.21	0.23	16.0	17.2	16.6
98088_at	NM_009841	Mm.3460	Cd14	0.75	26	0.88	25	3289.7	3202.2	0.24	0.22	16.0	17.6	16.8
93500_at	NM_020559	Mm.19143	Alas1	0.66	28	0.86	25	11211.6	10413.0	0.27	0.25	16.8	16.4	16.6
98633_at	NM_028766	Mm.38801	1200015A22Rik	0.86	25	0.86	24	7611.8	7517.7	0.17	0.09	12.0	14.8	13.4
93314_g_at	NM_008928	Mm.18494	Map2k3	0.91	24	0.82	24	2139.6	2307.9	0.18	0.13	13.6	15.6	14.6
92820_at	-	Mm.253535	B930035K21Rik	0.85	26	0.91	24	1275.0	1284.8	0.39	0.35	13.6	14.8	14.2

103223_at	-	Mm.2013	5830406C15Rik *	0.94	24	0.77	23	351.7	413.3	0.49	0.41	13.6	14.4	14.0
93694_at	NM_011066	Mm.8471	Per2 *	0.92	24	0.94	25	143.7	158.3	0.61	0.62	13.6	14.8	14.2
93315_at	NM_008928	Mm.18494	Map2k3	0.93	25	0.93	25	1753.0	2119.9	0.25	0.19	14.0	14.4	14.2
97473_at	NM_053082	Mm.195498	Tm4sf7 *	0.92	25	0.94	26	3914.4	3910.8	0.36	0.30	14.8	15.6	15.2
98036_at	-	Mm.206250	C030005I21Rik	0.83	24	0.93	25	2816.6	2873.5	0.31	0.17	13.6	14.8	14.2
92821_at	NM_016808	Mm.12914	Usp2	0.92	25	0.76	25	610.3	602.9	0.48	0.40	14.0	14.4	14.2
161436_s_at	NM_130895	Mm.63881	Adarb1	0.81	24	0.82	25	504.2	502.5	0.19	0.19	12.4	14.0	13.2
103369_at	-	Mm.18538	9430029L20Rik	0.84	24	0.77	25	1533.1	1546.9	0.23	0.13	13.6	14.4	14.0
92582_at	NM_146255	Mm.1056	Slc1a7	0.82	28	0.85	25	8388.9	7506.9	0.16	0.14	13.6	13.6	13.6
102763_at	NM_020568	Mm.12966	S3-12-pending	0.90	25	0.91	23	15310.8	13935.9	0.14	0.11	13.2	12.4	12.8
160522_at	NM_053078	Mm.4919	D0H4S114	0.82	25	0.89	23	1526.4	1294.6	0.25	0.25	14.8	13.6	14.2
95465_s_at	NM_019432	Mm.24750	Pr1	0.84	22	0.79	25	1037.6	941.6	0.17	0.20	15.2	16.0	15.6
97358_at	-	Mm.29638	2900070I05Rik	0.81	21	0.76	23	708.8	755.2	0.13	0.16	15.2	14.8	15.0
94491_at	NM_023651	Mm.28912	Pex13	0.74	26	0.75	26	389.5	446.0	0.15	0.12	16.0	18.4	17.2
96481_at	-	Mm.25081	A330078N12Rik	0.76	22	0.70	21	73.1	77.1	0.41	0.55	16.8	10.4	13.6
94734_at	NM_011016	Mm.14173	Orm2	0.82	22	0.47	20	150.5	185.1	0.58	0.51	16.0	10.4	13.2

表 3-3. *Cry1* クラスターの振動遺伝子

Affymetrix Probe ID	Ref-seq ID	UniGene ID	Gene Symbol	Correlation (Best Fit Period (hrs))				Average		SD/Average		Peak Time (ZT/CT)		
				LD	DD	LD	DD	LD	DD	LD	DD	LD	DD	LD&DD
162249_f_at	NM_025998	Mm.46513	2610200G18Rik	0.79	27	0.84	22	145.4	129.0	0.32	0.34	14.8	18.4	16.6
103934_at	NM_144512	Mm.25180	Slc6a13	0.86	24	0.78	24	2922.3	3000.3	0.23	0.21	15.2	19.6	17.4
101044_at	NM_008525	Mm.6988	Alad	0.82	28	0.75	28	3425.8	3525.7	0.16	0.12	20.0	19.2	19.6
104343_f_at	NM_023196	Mm.22526	2310004B05Rik	0.79	27	0.91	25	11941.6	13031.3	0.11	0.12	20.0	19.2	19.6
160275_at	NM_013759	Mm.28212	Sepr	0.70	28	0.80	21	9050.7	8394.6	0.12	0.17	19.6	20.4	20.0
99535_at	NM_009834	Mm.86541	Nocturnin (Ccrn4l)	0.75	26	0.88	23	979.0	1037.7	0.24	0.38	22.0	20.4	21.2
99816_at	NM_008301	Mm.296181	Hspa2	0.81	24	0.75	23	147.8	131.0	0.33	0.36	18.4	18.4	18.4
103493_at	NM_026523	Mm.22246	Nmb	0.91	25	0.76	25	288.3	256.0	0.28	0.30	18.4	17.2	17.8
95133_at	NM_012055	Mm.2942	Asns	0.84	22	0.90	23	5598.7	6334.0	0.20	0.21	18.4	20.4	19.4
101489_at	NM_009665	Mm.7880	Amd1	0.77	26	0.80	24	1296.8	1338.5	0.25	0.28	18.0	19.2	18.6
96718_at	NM_020491	Mm.27657	Sssca1	0.79	24	0.78	24	3727.4	3851.4	0.14	0.16	16.4	19.6	18.0
96588_at	NM_011196	Mm.30424	Ptger3	0.85	26	0.77	26	250.0	290.0	0.45	0.43	16.4	18.8	17.6
160248_at	NM_057172	Mm.26469	9530027K12Rik	0.70	28	0.84	24	453.7	451.2	0.26	0.35	17.2	18.8	18.0
160376_at	NM_178111	Mm.30000	1110029F20Rik	0.88	25	0.88	24	8079.4	7375.8	0.30	0.31	18.0	19.2	18.6
102295_at	NM_145983	Mm.222831	Kcna5	0.91	24	0.82	22	323.6	360.2	0.31	0.24	17.6	20.0	18.8
160330_at	NM_025844	Mm.29138	Chordc1	0.71	28	0.89	25	979.5	1238.6	0.21	0.26	17.6	20.0	18.8
94420_f_at	NM_007771	Mm.26237	<i>Cry1</i> *	0.94	25	0.89	24	822.1	1021.2	0.38	0.46	18.8	20.4	19.6
94906_at	NM_007409	Mm.2409	Adh1	0.95	25	0.95	25	4384.2	4834.1	0.18	0.24	18.8	19.2	19.0

98111_at	NM_013559	Mm.34828	Hsp105 *	0.83	25	0.97	23	915.2	1145.4	0.38	0.48	19.6	20.4	20.0
101991_at	NM_010231	Mm.976	Fmo1	0.76	25	0.88	25	5430.0	5867.5	0.20	0.22	19.6	20.4	20.0
102955_at	NM_017373	Mm.136604	E4bp4 (Nfil3) *	0.76	25	0.90	24	246.9	361.7	0.51	0.58	19.2	21.6	20.4
97261_at	NM_008298	Mm.27897	Dnaja1	0.88	24	0.79	26	3920.7	4452.8	0.17	0.18	18.4	20.4	19.4
101091_at	NM_009460	Mm.7353	Ubl1	0.79	28	0.81	25	3659.9	3691.3	0.11	0.13	18.4	18.8	18.6
94048_at	NM_177613	Mm.21981	Cdc34	0.68	28	0.84	26	1530.8	1738.5	0.14	0.18	18.4	21.2	19.8
94264_at	NM_029780	Mm.184163	Raf1	0.63	28	0.88	25	1902.9	1919.9	0.13	0.20	16.0	22.0	19.0
160333_at	NM_026124	Mm.29264	1110008F13Rik	0.80	26	0.76	22	4272.5	4344.1	0.09	0.10	18.4	21.2	19.8
96564_at	NM_031165	Mm.290774	Hspa8	0.82	23	0.85	24	4098.0	4428.5	0.30	0.27	20.4	21.2	20.8
98532_at	NM_013812	Mm.196624	Cdkap1	0.78	27	0.78	23	1643.3	1720.2	0.16	0.13	21.6	20.4	21.0
160998_at	NM_028053	Mm.27184	D4ErtD89e	0.74	22	0.74	28	915.1	1035.9	0.16	0.18	18.4	22.0	20.2
97410_at	-	Mm.257701	D130005A03	0.76	22	0.56	28	905.7	1223.1	0.19	0.18	17.2	22.4	19.8
97987_at	NM_008340	Mm.3135	Igfals	0.81	24	0.60	28	1870.5	1906.2	0.21	0.13	16.4	21.2	18.8
104301_at	NM_029354	Mm.22351	2410018G20Rik	0.80	24	0.68	28	1555.7	1738.6	0.08	0.12	16.4	22.0	19.2

表 3-4. *Bmal1* クラスターの振動遺伝子

Affymetrix Probe ID	Ref-seq ID	UniGene ID	Gene Symbol	Correlation (Best Fit Period (hrs))				Average		SD/Average		Peak Time (ZT/CT)		
				LD	DD	LD	DD	LD	DD	LD	DD	LD	DD	LD&DD
92257_at	NM_007715	Mm.3552	Clock	0.79	26	0.93	26	458.1	454.9	0.20	0.30	0.4	23.6	0.0
102033_at	NM_011571	Mm.10154	Tesk1	0.80	26	0.85	27	1333.3	1370.5	0.12	0.13	20.4	23.2	21.8
160314_at	NM_026438	Mm.28897	2010317E03Rik	0.78	26	0.88	26	5468.3	5364.4	0.13	0.12	21.2	23.2	22.2
94881_at	NM_007669	Mm.34446	p21Cip1 (Cdkn1a) *	0.93	24	0.94	25	651.1	768.2	0.52	0.55	22.8	23.6	23.2
102382_at	NM_007489	Mm.12177	Bmal1 (Arntl) *	0.94	23	0.97	24	367.5	399.2	0.66	0.68	23.6	23.6	23.6
98067_at	NM_007669	Mm.34446	p21Cip1 (Cdkn1a) *	0.85	27	0.94	25	297.9	311.0	0.50	0.58	23.6	23.2	23.4
102343_at	NM_019421	Mm.11175	425O18-1	0.86	27	0.78	27	1934.1	1886.6	0.12	0.14	20.4	21.2	20.8
94807_at	NM_153150	Mm.229291	Slc25a1	0.78	25	0.82	26	5209.1	6541.8	0.19	0.24	19.6	0.0	21.8
92637_at	NM_008826	Mm.1166	Pfkl	0.82	24	0.96	24	2675.1	2835.7	0.17	0.14	20.8	23.6	22.2
96352_at	NM_025605	Mm.30003	2400001E08Rik	0.80	27	0.69	28	2367.7	2506.1	0.14	0.14	22.0	0.0	23.0
101254_at	NM_009391	Mm.7521	Ran	0.80	26	0.86	26	9037.9	9764.3	0.05	0.12	22.0	23.2	22.6
103619_at	NM_025558	Mm.20242	1810044O22Rik *	0.90	24	0.88	27	3543.2	4219.1	0.19	0.23	22.4	0.4	23.4
96353_at	NM_025387	Mm.30005	1110021D01Rik	0.81	25	0.75	27	2555.1	2564.4	0.16	0.13	22.4	23.2	22.8
96878_at	NM_025558	Mm.20242	1810044O22Rik *	0.76	25	0.90	26	1173.7	1314.7	0.31	0.30	22.4	23.6	23.0
93496_at	NM_134255	Mm.19130	Elovl5	0.78	24	0.93	25	4152.7	3912.2	0.14	0.12	22.0	22.0	22.0
103861_s_at	NM_138589	Mm.21103	D7Wsu128e	0.76	25	0.87	27	803.8	896.9	0.16	0.14	22.4	22.0	22.2
94875_at	NM_025570	Mm.23825	Mrpl20	0.86	24	0.73	26	1351.6	1335.7	0.09	0.15	20.0	22.8	21.4
94322_at	NM_009270	Mm.22663	Sqle	0.83	24	0.69	28	573.6	694.2	0.23	0.31	21.6	23.2	22.4

96594_at	NM_008300	Mm.1032	Hspa4	0.69	28	0.88	26	1657.8	1875.5	0.14	0.18	21.6	22.4	22.0
93015_at	NM_010356	Mm.14719	Gsta3	0.80	26	0.83	25	1022.5	1290.5	0.13	0.31	19.6	22.4	21.0
94522_at	NM_016890	Mm.29025	Dctn3	0.88	23	0.81	26	4366.1	4635.4	0.09	0.13	20.8	21.2	21.0
92809_r_at	NM_010219	Mm.12758	Fkbp4	0.77	28	0.79	22	732.1	735.0	0.20	0.11	20.4	22.0	21.2
160391_at	NM_146094	Mm.30158	0710001O03Rik	0.79	28	0.77	27	1893.3	1891.1	0.15	0.11	21.6	20.0	20.8

表 3-5. X クラスターの振動遺伝子

Affymetrix Probe ID	Ref-seq ID	UniGene ID	Gene Symbol	Correlation (Best Fit Period (hrs))				Average		SD/Average		Peak Time (ZT/CT)		
				LD		DD		LD	DD	LD	DD	LD	DD	LD&DD
161914_s_at	NM_019391	Mm.2183	Lsp1	0.74	22	0.69	28	1198.0	1284.5	0.16	0.14	7.6	10.0	8.8
98590_at	NM_011521	Mm.3815	Sdc4	0.62	20	0.76	28	1535.4	1660.1	0.18	0.10	6.4	9.2	7.8
102670_at	NM_139061	Mm.204682	Vps54	0.64	20	0.62	28	2103.3	1939.6	0.14	0.10	9.6	7.6	8.6
160664_at	NM_026169	Mm.21230	1200004M23Rik	0.71	21	0.73	27	890.1	927.5	0.14	0.11	10.8	5.6	8.2
93677_at	NM_010654	Mm.8186	Klrd1	0.84	22	0.74	28	79.2	82.9	0.30	0.42	10.0	7.2	8.6
98314_g_at	NM_011858	Mm.10696	Odz4	0.65	28	0.82	28	715.4	849.2	0.17	0.21	8.8	6.0	7.4
96195_at	NM_010112	Mm.28543	Efs	0.56	28	0.68	28	562.1	679.9	0.26	0.22	8.8	6.8	7.8
101093_at	NM_009931	Mm.738	Col4a1	0.88	25	0.85	25	8331.2	9054.3	0.09	0.12	6.4	4.0	5.2
93174_at	NM_133983	Mm.5356	6030411F23Rik	0.80	22	0.71	28	260.9	259.2	0.25	0.23	7.6	3.6	5.6
161491_r_at	NM_020593	Mm.143768	Fbxo3	0.76	28	0.60	28	71.3	92.2	0.45	0.43	4.0	4.4	4.2
160118_at	NM_008608	Mm.280175	Mmp14	0.70	28	0.71	28	1877.8	1799.3	0.23	0.13	4.8	7.6	6.2
104118_at	NM_026034	Mm.21972	2810037C14Rik	0.81	25	0.82	25	584.4	607.8	0.15	0.15	7.2	9.6	8.4
160469_at	NM_011580	Mm.4159	Thbs1 *	0.86	27	0.77	25	631.3	563.6	0.62	0.46	4.8	6.0	5.4
92502_at	NM_009538	Mm.220978	Plagl1	0.75	27	0.74	26	143.6	148.5	0.45	0.36	4.8	7.2	6.0
92836_at	NM_007925	Mm.111845	Eln	0.91	24	0.92	25	4804.3	4597.9	0.15	0.16	6.4	4.4	5.4
96288_at	NM_028447	Mm.29889	3110038B19Rik	0.78	24	0.93	23	623.6	656.2	0.17	0.20	6.0	7.2	6.6
102058_at	NM_030116	Mm.218515	Mrpl9	0.85	22	0.71	27	618.7	729.5	0.12	0.10	6.4	6.0	6.2
104464_s_at	NM_134090	Mm.29644	Kdelr3	0.83	23	0.86	25	466.7	485.9	0.27	0.28	6.4	7.2	6.8

103901_at	NM_026254	Mm.21331	4930451A13Rik	0.74	27	0.77	24	269.6	279.7	0.11	0.19	5.2	7.2	6.2
99441_at	NM_172952	Mm.40282	Gphn	0.77	28	0.81	25	659.0	673.0	0.15	0.14	5.6	6.0	5.8
100459_at	NM_009012	Mm.4888	Rad50	0.80	25	0.94	25	930.5	1076.9	0.26	0.28	8.4	7.6	8.0
92272_at	-	Mm.3609	E430024N19Rik	0.85	24	0.89	24	148.4	155.2	0.24	0.34	6.8	6.8	6.8
96841_at	NM_145478	Mm.30018	Pim3	0.86	27	0.91	23	2440.6	2264.8	0.40	0.37	6.4	7.2	6.8
98507_at	NM_145434	Mm.193097	Rev-erb *(Nr1d1)	0.92	25	0.95	24	1140.5	1261.2	0.78	0.86	7.6	8.4	8.0
92708_at	NM_030242	Mm.4614	4921519L13Rik	0.80	25	0.81	24	559.2	601.4	0.24	0.14	8.4	8.0	8.2
104220_at	NM_008542	Mm.27935	Madh6	0.85	26	0.91	24	569.2	637.3	0.28	0.22	9.2	8.0	8.6
160458_at	NM_023061	Mm.39103	Mcam	0.83	24	0.80	24	4482.0	4728.6	0.15	0.13	8.8	6.8	7.8
96765_at	NM_008817	Mm.257474	Peg3	0.80	26	0.87	23	1304.5	994.5	0.35	0.27	6.4	8.0	7.2
93284_at	NM_007705	Mm.17898	Cirbp	0.88	27	0.84	23	1599.5	1566.4	0.19	0.27	5.2	8.0	6.6
102990_at	NM_009930	Mm.147387	Col3a1	0.79	23	0.78	25	471.2	449.0	0.23	0.23	5.6	7.2	6.4
96207_at	-	Mm.256909	2600014B10Rik	0.78	23	0.78	23	2336.4	2275.3	0.14	0.12	9.6	7.6	8.6
92205_at	-	-	Irs2	0.80	24	0.82	22	605.5	515.3	0.44	0.48	7.6	9.6	8.6
103029_at	NM_011050	Mm.1605	Pdcd4	0.74	22	0.93	24	1892.8	1995.8	0.20	0.22	7.6	10.0	8.8
92786_at	NM_028889	Mm.12454	4931430I01Rik	0.74	28	0.65	28	175.9	178.4	0.29	0.22	5.2	4.0	4.6
99957_at	NM_013599	Mm.4406	Mmp9 *	0.94	23	0.93	25	194.6	230.4	0.74	0.67	3.6	4.0	3.8
104412_at	-	Mm.28859	Gnai1	0.84	24	0.85	23	5971.6	6581.7	0.14	0.16	4.4	4.4	4.4
160215_at	NM_010347	Mm.2626	Aes	0.68	21	0.67	21	5157.5	4852.4	0.10	0.09	4.8	4.0	4.4

表 3-6. 主要 5 クラスターに属さなかった振動遺伝子

Affymetrix Probe ID	Ref-seq ID	UniGene ID	Gene Symbol	Correlation (Best Fit Period (hrs))				Average		SD/Average		Peak Time (ZT/CT)		
				LD	DD	LD	DD	LD	DD	LD	DD	LD	DD	LD&DD
102114_f_at	NM_020581	Mm.196189	Angptl4	0.79	27	0.71	20	1660.9	1497.5	0.17	0.19	1.2	22.8	0.0
103736_at	NM_175155	Mm.24385	2500002E12Rik	0.76	23	0.82	25	1373.7	1349.4	0.24	0.26	0.4	0.8	0.6
95725_at	NM_027857	Mm.29735	0610006H10Rik	0.93	24	0.87	23	728.0	637.6	0.15	0.10	1.2	0.4	0.8
104516_at	NM_013805	Mm.22768	Cldn5	0.88	24	0.78	23	2766.3	2427.8	0.44	0.31	1.2	1.2	1.2
162206_f_at	NM_007707	Mm.3468	Socs3	0.78	21	0.78	24	240.7	282.8	0.13	0.24	0.8	2.0	1.4
161967_at	NM_146120	Mm.21109	Gsn	0.70	28	0.77	23	436.2	523.8	0.50	0.31	4.0	23.2	1.6
102217_at	NM_018869	Mm.10188	Gprk5	0.85	24	0.82	25	587.9	673.7	0.32	0.23	3.2	0.8	2.0
160312_at	NM_026036	Mm.28858	Cklfsf6	0.78	22	0.83	23	921.0	885.8	0.25	0.20	1.6	2.4	2.0
94917_at	NM_015791	Mm.24156	Fbxo8	0.83	24	0.69	28	147.8	126.9	0.20	0.26	0.8	4.0	2.4
95934_at	-	Mm.24796	D7Ert187e	0.74	27	0.75	22	8.4	8.3	0.37	0.42	7.2	22.0	2.6
98016_at	-	Mm.218494	D3Wsu161e	0.79	25	0.65	28	180.4	198.3	0.23	0.18	1.6	4.4	3.0
92616_at	NM_009457	Mm.1104	Ube1x	0.84	23	0.70	21	2789.7	3033.2	0.07	0.09	21.6	9.6	3.6
104482_at	NM_007941	Mm.3003	Epim	0.62	28	0.75	28	1612.2	1811.5	0.17	0.11	8.0	23.2	3.6
94953_at	NM_012025	Mm.27141	Racgap1	0.79	23	0.71	21	93.9	115.0	0.46	0.24	4.8	3.2	4.0
101904_at	NM_009762	Mm.234274	Smyd1	0.73	28	0.76	22	128.6	150.1	0.38	0.31	9.2	0.8	5.0
99382_at	NM_008172	Mm.56936	Grin2d	0.75	22	0.75	28	183.9	246.4	0.35	0.32	6.8	3.6	5.2
99979_at	NM_009994	Mm.4443	Cyp1b1	0.78	25	0.82	22	941.8	678.6	0.23	0.28	1.6	9.2	5.4
93632_g_at	NM_008487	Mm.7634	Lbcl1	0.74	28	0.60	28	226.2	244.4	0.31	0.32	8.8	2.0	5.4

94834_at	NM_007801	Mm.2277	Ctsh	0.69	28	0.85	26	1758.3	1736.8	0.12	0.10	0.8	11.6	6.2
97147_at	-	Mm.34947	C530030P08Rik	0.74	27	0.48	20	40.8	31.5	0.74	0.59	8.8	4.0	6.4
99355_r_at	-	Mm.5507	C76554	0.74	27	0.74	21	12.6	16.0	0.89	0.54	14.8	4.0	9.4
161857_r_at	NM_153577	Mm.254849	0610012K07Rik	0.58	28	0.60	28	117.2	79.1	0.39	0.49	12.4	6.8	9.6
102832_at	NM_172126	Mm.1453	Adam1a	0.90	25	0.55	28	158.5	193.9	0.51	0.22	13.6	6.0	9.8
94392_f_at	NM_007447	Mm.202665	Ang1	0.68	28	0.79	26	393.5	413.0	0.18	0.13	16.8	19.2	18.0
100009_r_at	NM_011443	Mm.4541	Sox2	0.49	20	0.62	20	27.7	31.9	0.73	0.40	16.0	20.0	18.0
102746_at	NM_007866	Mm.12896	Dll3	0.63	21	0.62	28	42.3	40.1	0.34	0.28	13.6	1.2	19.4
94020_at	NM_011876	Mm.21852	Ptk9l	0.63	28	0.69	28	981.1	911.5	0.24	0.17	20.0	20.8	20.4
99489_at	NM_011020	Mm.4150	Osp94	0.64	20	0.67	28	373.3	388.8	0.23	0.27	21.6	19.2	20.4
100913_at	NM_025590	Mm.210047	Thea	0.57	20	0.87	22	89.4	101.3	0.55	0.64	16.0	3.6	21.8
97250_at	NM_025403	Mm.27858	Nola3	0.73	28	0.78	27	8052.7	7750.6	0.12	0.07	0.0	20.4	22.2

表 3-7. *Per1/Rev-erb* クラスターにおけるマウス (*Mm.*) とヒト (*Hs.*) の保存領域における時計遺伝子の結合領域候補配列

Affymetrix Probe ID	Gene Symbol	Species	RefSeq ID	Chr (+/-)		E-box	D-box	RRE
98031_at	Bok	Mm.	NM_016778	1 (+)	93911311-93911316	ggtac cacgtg tcca		
		Hs.	NM_032515	2 (+)	242519265-242519270	aggag cacgtg tcccg		
160320_at	Sorbs1	Mm.	NM_009166	19 (-)	39663836-39663846			gggaat aaa cagg tca gcagc
		Hs.	NM_015385	10 (-)	97306820-97306830			gggat aaaa aagg tca gcagc
		Mm.	NM_009166	19 (-)	39663761-39663766	tg ttg cacgtg actcg		
		Hs.	NM_015385	10 (-)	97306745-97306750	tg ttg cacgtg accct		
		Mm.	NM_009166	19 (-)	39782402-39782409			agtaat acg ta attaga
		Hs.	NM_015385	10 (-)	97433543-97433550			agtaat acg ta attaga
93528_s_at	Bteb1	Mm.	NM_010638	19 (+)	22427857-22427862	tagct cacgtg ggcgc		
		Hs.	NM_001206	9 (-)	66604396-66604401	tagct cacgtg ggcgt		
		Mm.	NM_010638	19 (+)	22456691-22456696	ccctg cacgtg gccag		
		Hs.	NM_001206	9 (-)	66573016-66573021	ccctg cacgtg gccag		
		Mm.	NM_010638	19 (+)	22428596-22428601	tctga cacgtg atcct		
		Hs.	NM_001206	9 (-)	66603618-66603623	tccaa cacgtg atcct		
		Mm.	NM_010638	19 (+)	22433564-22433571			gccgg ttacg taa agatg
		Hs.	NM_001206	9 (-)	66598585-66598592			gccgg ttacg taa agatg
160362_at	Mat2a	Mm.	NM_145569	6 (-)	72905246-72905251	gctac cacgtg ttcgc		
		Hs.	NM_005911	2 (+)	85724642-85724647	gcgacc cacgtg tttgc		
160519_at	Timp3	Mm.	NM_011595	10(+)	85872586-85872593			cttgg ttatg ta atg ttc

		Hs.	NM_000362	22 (+)	31571546-31571553	tctggttatgtaatgtcc
99444_at	Ramp2	Mm.	NM_019444	11 (+)	102089433-102089438	ccccccacgtggccgc
		Hs.	NM_005854	17 (+)	40821913-40821918	ccccccacgtggccgc
160117_at	Tef	Mm.	NM_153484	15 (+)	82070768-82070773	cccagcacgtgtctac
		Hs.	NM_003216	22 (+)	40020792-40020797	ccccgcacgtgtctat
99019_at	Por	Mm.	NM_008898	5 (+)	133340498-133340503	gagatcacgtggctgt
		Hs.	NM_000941	7 (+)	75211359-75211364	gggaccacgtggctgt
100508_at	Mfng	Mm.	NM_008595	15 (-)	79007350-79007355	ctagacacgtgggtct
		Hs.	NM_002405	22 (-)	36125022-36125027	cttgaacacgtgggtt
		Mm.	NM_008595	15 (-)	79011807-79011812	tcatccacgtggaggt
		Hs.	NM_002405	22 (-)	36130833-36130838	tcatccacgtggaggt
104200_at	Slc5a6	Mm.	NM_177870	5 (-)	29277592-29277597	tggtccacgtggctcg
		Hs.	NM_021095	2 (-)	27398029-27398034	cggtccacgtggctaa
104109_at	Fbxo21	Mm.	NM_145564	5 (+)	115263303-115263308	gccagcacgtgacggc
		Hs.	NM_015002	12 (-)	117387636-117387641	gccagcacgtgactgc
160841_at	Dbp	Mm.	NM_016974	7 (+)	34345779-34345789	ggcccgaagtgggtcacggtc
		Hs.	NM_001352	19 (-)	53817037-53817047	ggcccgaactgggtcacggtc
		Mm.	NM_016974	7 (+)	34345824-34345834	ggccaatatagggtcaggtc
		Hs.	NM_001352	19 (-)	53816991-53817001	gggcaaatgtagggtcaggtc
		Mm.	NM_016974	7 (+)	34348932-34348937	ggccaacacgtgatgcg
		Hs.	NM_001352	19 (-)	53813839-53813844	gtcagcacgtgactcg
99076_at	Rev-erb	Mm.	NM_011584	14 (-)	13588472-13588478	ctggccacgtgcacgg
		Hs.	NM_005126	3 (+)	23837148-23837153	cgagccacgtgcgcgc

		Mm.	NM_011584	14 (-)	13588402-13588409		cagcattacataatgcga
		Hs.	NM_005126	3 (+)	23837218-23837225		cggcattacataatgggc
		Mm.	NM_011584	14 (-)	1358479-13358484	ctggc	cacgtgcacgg
		Hs.	NM_005126	3 (+)	23837148-23837153	cgagc	cacgtgcgcg
		Mm.	NM_011584	14 (-)	13588369-13588374	ggaga	cacgtgaggcc
		Hs.	NM_005126	3 (+)	23837257-23837262	gggga	cacgtgaggcc
		Mm.	NM_011584	14 (-)	13588324-13588329	aggaa	cacgtgggggc
		Hs.	NM_005126	3 (+)	23837307-23837312	aggga	cacgtgggggc
93619_at	Per1	Mm.	NM_011065	11 (+)	69758130-69758135	aagtc	cacgtgcaggg
		Hs.	NM_002616	17 (-)	7998425-7998430	aggtc	cacgtgcgccc
		Mm.	NM_011065	11 (+)	69754230-69754235	gcctg	cacgtgtccc
		Hs.	NM_002616	17 (-)	8002576-8002581	gccgg	cacgtgtacc
		Mm.	NM_011065	11 (+)	69754414-69754419	gccct	cacgtgctct
		Hs.	NM_002616	17 (-)	8002392-8002397	tctct	cacgtgtatct
		Mm.	NM_011065	11 (+)	69757767-69757772	aacga	cacgtggccc
		Hs.	NM_002616	17 (-)	7998860-7998865	ggtca	cacgtgaccc
		Mm.	NM_011065	11 (+)	69757021-69757026	ttagc	cacgtgacagt
		Hs.	NM_002616	17 (-)	7999591-7999596	taggc	cacgtgacagt
104760_at	lfrd2	Mm.	NM_025903	9 (+)	107765386-107765391	gctcg	cacgtgccccca
		Hs.	NM_006764	3 (-)	50183915-50183920	gctgg	cacgtgccccca
		Mm.	NM_025903	9 (+)	107765409-107765414	ttggc	cacgtgtcgc
		Hs.	NM_006764	3 (-)	50183892-50183897	ttggc	cacgtgcgtgc
94147_at	PAI-1	Mm.	NM_008871	5 (-)	134678261-134678266	gtgga	cacgtggggg

	(Serpine1)	Hs.	NM_000602	7 (+)	100328360-100328365	gtgga cacgtg agggg	
93320_at	Cpt1a	Mm.	NM_013495	19 (-)	7366345-7366350	gccgt cacgtg accg	
		Hs.	NM_001876	11 (-)	68856848-68856853	gccgt cacgtg acgcc	
		Mm.	NM_013495	19 (-)	7367780-7367785	ggcgt cacgtg acctg	
		Hs.	NM_001876	11 (-)	68858336-68858341	ggtgt cacgtg gccgt	
		Mm.	NM_013495	19 (-)	7329651-7329658		acaaa ttatgta agtaat
		Hs.	NM_001876	11 (-)	68816683-68816690		acaaa ttacgta agtctg
100011_at	Klf3	Mm.	NM_008453	5 (+)	63840814-63840824		cttaa aatctagg tcagtggg
		Hs.	NM_016531	4 (+)	38521925-38521935		attaa aatctagg tcaggg
		Mm.	NM_008453	5 (+)	63827119-63827129		catga atataggg tcagggag
		Hs.	NM_016531	4 (+)	38503458-38503468		catga atataggg tcagggag
103446_at	9130009C22Rik	Mm.	NM_027835	2 (-)	63454696-63454701	tcg ttcacgtg aagat	
		Hs.	NM_022168	2 (-)	163121762-163121767	tcg ttcacgtg aagat	
		Mm.	NM_027835	2 (-)	63458098-63458108		tgga gttctggg tcaaacga
		Hs.	NM_022168	2 (-)	163125460-163125470		tgga gttctggg tcaaatga

表 3-8. *Per2* クラスターにおけるマウス (*Mm.*) とヒト (*Hs.*) の保存領域における時計遺伝子の結合領域候補配列

Affymetrix Probe ID	Gene Symbol	Species	RefSeq ID	Chr (+/-)		E-box	D-box	RRE
97776_at	Drd2	Mm.	NM_010077	9 (+)	49468912-49468917	caata cacgtg agctg		
		Hs.	NM_000795	11 (-)	113340102-113340107	cagtg cacgtg agctg		
94161_at	Prkce	Mm.	NM_011104	17 (+)	84830101-84830106	cgct cacgtg accag		
		Hs.	NM_005400	2 (+)	45835081-45835086	ctcct cacgtg accag		
		Mm.	NM_011104	17 (+)	84832782-84832787	agaga cacgtg gagct		
		Hs.	NM_005400	2 (+)	45837683-45837688	aaagg cacgtg gagcc		
		Mm.	NM_011104	17 (+)	84939940-84939945	ccaaa cacgtg tttta		
		Hs.	NM_005400	2 (+)	45949171-45949176	tcaaa cacgtg gttta		
		Mm.	NM_011104	17 (+)	84840953-84840960		ctatt ttacataa ataaa	
		Hs.	NM_005400	2 (+)	45845531-45845538		atatt ttacataa ataaa	
		Mm.	NM_011104	17 (+)	84904094-84904101		agagg ttatgtaa cccag	
		Hs.	NM_005400	2 (+)	45906199-45906206		acaag ttacataa cccag	
		Mm.	NM_011104	17 (+)	84869989-84869996		cggac ttatgtaa cagcg	
		Hs.	NM_005400	2 (+)	45873530-45873537		ctgac ttatgtaa cactt	
		Mm.	NM_011104	17 (+)	84855604-84855614			aaggaa aaaacagg tcataaat
		Hs.	NM_005400	2 (+)	45859479-45859489			aaggaa aaaacagg tcataaat
		Mm.	NM_011104	17 (+)	84941738-84941748			aaaa aaaagg tcagtat
		Hs.	NM_005400	2 (+)	45950495-45950505			ttatg aaaagg tcagtaa
Mm.	NM_011104	17 (+)	84874846-84874856			ttcc aaattggg tcacaagt		

		Hs.	NM_005400	2 (+)	45877371-45877381		ttccaaatcaggtcacattc
160195_at	1200013P24Rik	Mm.	NM_029090	16 (+)	3334048-3334055		gccggttacataatctgt
		Hs.	NM_024845	16 (+)	3508359-3508366		gccggttacataactcgt
96120_at	Dnajb6	Mm.	NM_011847	5 (+)	27985266-27985276		cactccattgggtcactagg
		Hs.	XM_370665	11 (-)	127844536-127844546		tacttcattgggtcactagg
98088_at	Cd14	Mm.	NM_009841	5 (-)	37001163-37001170		caggattacataaattt
		Hs.	NM_000591	18 (-)	139995935-139999542		caggattacataaactg
98633_at	1200015A22Rik	Mm.	NM_028766	6 (+)	91928662-91928667	cggctcacgtgtaac	
		Hs.	NM_024334	3 (+)	14168577-14168582	cagctcacgtgtaac	
93315_at	Map2k3	Mm.	NM_008928	11 (+)	61465775-61465780	aaccctcacgtgagtct	
93314_g_at		Hs.	NM_145110	17 (+)	21106309-21106314	aaccctcacgtgagtct	
		Mm.	NM_008928	11 (+)	61457488-61457495		gcatcttacataagtggg
		Hs.	NM_145110	17 (+)	21094311-21094318		atgcccttacataagtggg
92820_at	Usp2	Mm.	NM_198092	9 (+)	44124782-44124787	ctgcccacgtggtccc	
92821_at		Hs.	NM_004205	11 (-)	119272427-119272432	ctgcaacgtggcccc	
		Mm.	NM_198092	9 (+)	44130533-44130540		aggcttatgtaacaggc
		Hs.	NM_004205	11 (-)	119267805-119267812		aggcttatgtaacaggc
		Mm.	NM_198092	9 (+)	44133059-44133069		atataaatataggctattga
		Hs.	NM_004205	11 (-)	119265551-119265561		gtacaaatataggctattga
93694_at	Per2	Mm.	NM_011066	1 (-)	91664133-91664140		gcgtcttatgtaagaga
		Hs.	NM_022817	2 (-)	239213850-239213857		gcgtcttatgtaaaaaga
97473_at	Tm4sf7	Mm.	NM_053082	7 (+)	130495223-130495228	aggctcacgtgtgcta	
		Hs.	NM_003271	11 (-)	358068-358073	aggctcacgtggcca	

		Mm.	NM_053082	7 (+)	130498211-130498216	ggagccacgtgcagag	
		Hs.	NM_003271	11 (-)	354428-354433	ccagccacgtgcggag	
92582_at	Slc1a7	Mm.	NM_146255	4 (+)	105953332-105953337	ccgaccacgtggcctg	
		Hs.	NM_006671	1 (-)	52966899-52966904	tagaccacgtggtctg	
160522_at	D0H4S114	Mm.	NM_053078	18 (-)	33729523-33729530	gaaggttatgtaatgcag	
		Hs.	NM_004772	5 (-)	111122836-111122843	gaaggttatgtaatgcag	
		Mm.	NM_053078	18 (-)	33710657-33710667		atagctgacctaaatctgtgg
		Hs.	NM_004772	5 (-)	111102793-111102803		agagctgacctaaatcttagt

表 3-9. *Cry1* クラスターにおけるマウス (*Mm.*) とヒト (*Hs.*) の保存領域における時計遺伝子の結合領域候補配列

Affymetrix Probe ID	Gene Symbol	Species	RefSeq ID	Chr (+/-)		E-box	D-box	RRE
101044_at	Alad	Mm.	NM_008525	4 (-)	59918459-59918464	tttgtc acgtg agtcc		
		Hs.	NM_000031	9 (-)	109609385-109609390	tttgtc acgtg agtct		
160330_at	Chordc1	Mm.	NM_025844	9 (+)	18157896-18157903		cgaag ttatg taactatg	
		Hs.	NM_012124	11 (-)	90120227-90120234		cgaag ttatg taactatg	
94420_f_at	Cry1	Mm.	NM_007771	10 (-)	84758929-84758939			actag aaagt agg tc attgtg
		Hs.	NM_004075	12 (-)	107354516-107354526			actgg taagt agg tc attgtg
98111_at	Hsp105	Mm.	NM_013559	5 (-)	147595747-147595752	agtgg cacgtg gagggc		
		Hs.	NM_006644	13 (-)	30672776-30672781	agtgg cacgtg gagggg		
102955_at (Nfil3)	E4bp4	Mm.	NM_017373	13 (-)	52041028-52041035		atgc attacataa acttt	
		Hs.	NM_005384	9 (-)	87484893-87484900		attc attacataa acttt	
		Mm.	NM_017373	13 (-)	52040112-52040119		tgagg ttatg taactgcc	
		Hs.	NM_005384	9 (-)	87484009-87484016		ttgc ttatg taactgcc	
		Mm.	NM_017373	13 (-)	52035262-52035272			cagaa aaagt ggg tc agtttg
		Hs.	NM_005384	9 (-)	87479281-87479291			tagaa aaagt agg tc aatttg
97261_at	Dnaja1	Mm.	NM_008298	4 (+)	40621527-40621537			caatg tc tt agg tcagattg
		Hs.	NM_001539	9 (+)	33027007-33027017			caatg tt tt agg tcagattg
101091_at	Ubl1	Mm.	NM_009460	1 (-)	60309006-60309013		cccag ttatg taacggga	
		Hs.	NM_003352	2 (-)	203066778-203066785		cttag ttatg taacggga	
94264_at	Raf1	Mm.	NM_029780	6 (-)	116326815-116326825			atgata aa ta agg tcaccaa

		Hs.	NM_002880	3 (-)	12661992-12662002		atgataaataaggtcaca
160333_at	1110008F13Rik	Mm.	NM_026124	2 (+)	158727604-158727609	ggggg	cacgtgggagc
		Hs.	NM_018840	20 (+)	35876511-35876516	ggtgg	cacgtgggagc
160998_at	D4Ert89e	Mm.	NM_028053	4 (+)	53012791-53012801		cctcgtgacctagttcccag
		Hs.	NM_018112	9 (+)	101941296-101941306		ccgcatgacctagttcccag
162249_f_at	2610200G18Rik	Mm.	NM_025998	4 (+)	128581919-128581924	ctgta	cacgtgggtcc
		Hs.	NM_024522	1 (-)	31081347-31081352	ctgta	cacgtgggtca

表 3-10. *Bmal1* クラスターにおけるマウス (*Mm.*) とヒト (*Hs.*) の保存領域における時計遺伝子の結合領域候補配列

Affymetrix Probe ID	Gene Symbol	Species	RefSeq ID	Chr (+/-)		E-box	D-box	RRE
92257_at	Clock	Mm.	NM_007715	5 (-)	75486953-75486960		cttaattacataatggca	
		Hs.	NM_004898	4 (-)	56257352-56257359		tataattacataatggca	
		Mm.	NM_007715	5 (-)	75428961-75428971			gtggatgacctagaaaatctg
		Hs.	NM_004898	4 (-)	56172011-56172021			gtggatgacctagaaaatttg
		Mm.	NM_007715	5 (-)	75490410-75490420			ccttgtagccactttattcc
		Hs.	NM_004898	4 (-)	56262229-56262239			ccttgtagccactttattcc
94881_at	p21/Cip1	Mm.	NM_007669	17 (+)	27808373-27808383			cacagttagcctattggcggg
98067_at	(Cdkn1a)	Hs.	NM_000389	6 (+)	36648761-36648771			cacagttagcctattggctgg
102382_at	Bmal1	Mm.	NM_007489	7 (+)	101468306-101468313		acctgttacataaaaacg	
		Hs.	NM_001178	11 (+)	13345044-13345051		acctgttacataaaaatg	
	Mm.	NM_007489	7 (+)	101470524-101470531		tatcattatgtaaacac		
	Hs.	NM_001178	11 (+)	13347485-13347492		tataattatgtaattgt		
	Mm.	NM_007489	7 (+)	101461816-101461826			ggcagaaagtaggtcagggac	
	Hs.	NM_001178	11 (+)	13338517-13338527			ggcagaaagtaggtcagggac	
	Mm.	NM_007489	7 (+)	101563235-101563245			caggataagagggtcatcgcc	
	Hs.	NM_001178	11 (+)	13441864-13441874			caggataagagggtcatcgcc	
	Mm.	NM_007489	7 (+)	101497531-101497541			ctgtgtgacccacattggcca	
	Hs.	NM_001178	11 (+)	13378132-13378142			atgtatgacccacattgggtga	
	Mm.	NM_007489	7 (+)	101505573-101505583			ttgttagacctgattgttg	

		Hs.	NM_001178	11 (+)	13390621-13390631		ttggtgacctgattgctc
93496_at	Elov15	Mm.	NM_134255	7 (+)	78232990-78232995	cgagacacgtgaacca	
		Hs.	NM_021814	6 (-)	53215350-53215355	agagacacgtggaacc	
		Mm.	NM_134255	7 (+)	78300059-78300066		gatattatgtaaatacc
		Hs.	NM_021814	6 (-)	53133908-53133915		gatattatgtaaatac
103861_s_at	D7Wsu128e	Mm.	NM_138589	7 (+)	110588840-110588845	acacacacgtgggctc	
		Hs.	NM_019116	16 (+)	23496119-23496124	tagcacacgtgggctt	
		Mm.	NM_138589	7 (+)	110600369-110600379		gagactgacccaagtgaagg
		Hs.	NM_019116	16 (+)	23509378-23509388		gagactgacccaagtgaagg
94522_at	Dctn3	Mm.	NM_016890	4 (-)	41620867-41620877		ctggatgacctattagcttc
		Hs.	NM_007234	9 (-)	34615758-34615768		ctggatgaccttttagcttc

表 3-11. X クラスターにおけるマウス (*Mm.*) とヒト (*Hs.*) の保存領域における時計遺伝子の結合領域候補配列

Affymetrix Probe ID	Gene Symbol	Species	RefSeq ID	Chr (+/-)		E-box	D-box	RRE
101093_at	Col4a1	Mm.	NM_009931	8 (-)	11317208-11317218			gcagg aaaatgggtca gtgct
		Hs.	NM_001845	13 (-)	108648866-108648876			gcagg aaaatgggtca gtgat
		Mm.	NM_009931	8 (-)	11322270-11322280			ggaact gacccagaa gccta
		Hs.	NM_001845	13 (-)	108653568-108653578			ggaact gacccagaa accta
93174_at	6030411F23Rik	Mm.	NM_133983	9 (-)	58706037-58706042	accat cacgtg ctcta		
		Hs.	NM_025240	15 (+)	71572512-71572517	accat cacgtg ctcca		
160118_at	Mmp14	Mm.	NM_008608	14 (+)	45089264-45089274			tgct taagtgggtca tggtc
		Hs.	NM_004995	14 (+)	21297612-21297722			cgtt taatgggtca tgggc
98507_at	Rev-erb (LOC217166)	Mm.	NM_145434	11 (-)	99615437-99615542	ccaat cacgtg aagct		
		Hs.	NM_021724	17 (-)	38167644-38167639	gcaat cacgtg aagcc		
		Mm.	NM_145434	11 (-)	99623384-99623489	aggg ccacgtg cccca		
		Hs.	NM_021724	17 (-)	38174986-38175991	aggg ccacgtg cccca		
		Mm.	NM_145434	11 (-)	99613996-99614001	ggg ccacgtg ctgca		
		Hs.	NM_021724	17 (-)	38166030-38166035	ggg ccacgtg ctgcg		
		Mm.	NM_145434	11 (-)	99613922-99613929		cctcg ttacata atgagc	
		Hs.	NM_021724	17 (-)	38165956-38165963		cctcg ttacata atgagc	
		Mm.	NM_145434	11 (-)	99613716-99613721	ggtgc cacgtg cgagg		
		Hs.	NM_021724	17 (-)	38165749-38165754	ggag ccacgtg cgaga		
		Mm.	NM_145434	11 (-)	99613701-99613706	gggca cacgtg gagtg		

		Hs.	NM_021724	17 (-)	38165734-38165739	aggcacacgtggagca	
		Mm.	NM_145434	11 (-)	99621923-99621930		agtgttatgtaagcctc
		Hs.	NM_021724	17 (-)	38173483-38173490		agtgttatgtaagcctc
104220_at	Madh6	Mm.	NM_008542	9 (-)	64165722-64165827	gctccacgtgcctcg	
		Hs.	NM_005585	15 (+)	64634592-64634597	gccccacgtgcccag	
93284_at	Cirbp	Mm.	NM_007705	10 (+)	79980073-79980078	cgtcgcacgtggaccc	
		Hs.	NM_001280	19 (+)	1201216-1201221	cgccgcacgtggaccc	
103029_at	Pdcd4	Mm.	NM_011050	19 (+)	53678671-53678678		gaatcttatgtaatacct
		Hs.	NM_145341	10 (+)	112780559-112780566		gaatttatgtaatacct
99957_at	Mmp9	Mm.	NM_013599	2 (+)	166804814-166804824		cctggaatgggtcaaaacc
		Hs.	NM_004994	20 (+)	45269115-45269125		tctggaatgggtcaaatgc

表 3-12. 主要 5 クラスターに属さない振動遺伝子と定量的 PCR で統計的に有意な振動の見られた遺伝子 (*tPa*, *Wee1*) におけるマウス (*Mm.*) とヒト (*Hs.*) の保存領域における時計遺伝子の結合領域候補配列

Affymetrix Probe ID	Gene Symbol	Species	RefSeq ID	Chr (+/-)		E-box	D-box	RRE
161967_at	Gsn	Mm.	NM_146120	2 (+)	35674051-35674056	tcaaacacgtggtacc		
		Hs.	NM_000177	9 (+)	117526650-117526655	tcaagcacgtggtacc		
		Mm.	NM_146120	2 (+)	35676386-35676391	aagtaacacgtgtctga		
		Hs.	NM_000177	9 (+)	117528386-117528391	gagtgacacgtgtctga		
94917_at	Fbxo8	Mm.	NM_015791	8 (+)	55280926-55280936			aacacgtgaccagagaatta
		Hs.	NM_012180	4 (-)	175777015-175777025			aacacgtgaccagagatgta
92616_at	Ube1x	Mm.	NM_009457	X (+)	18461678-18461683	cccaccacgtgcacca		
		Hs.	NM_153280	X (+)	45876371-45876376	cccaccacgtgcacca		
		Mm.	NM_009457	X (+)	18481720-18481725	tacctcacgtgagtaa		
		Hs.	NM_153280	X (+)	45895413-45895418	tacctcacgtgagtaa		
99382_at	Grin2d	Mm.	NM_008172	7 (-)	53577824-53577829			acacctgaccctttcctct
		Hs.	NM_000836	19 (+)	34510682-34510692			acacctgaccctttccctc
		Mm.	NM_008172	7 (-)	34510682-34510692			ttccctgacccttactcac
		Hs.	NM_000836	19 (+)	53576585-53576595			ttccctgacccttaccac
100009_r_at	Sox2	Mm.	NM_011443	3 (+)	34509585-34509592			tttcttatgtaatgaaa
		Hs.	NM_003106	3 (+)	182827657-182827664			tttcttacataatgaaa
97250_at	Nola3	Mm.	NM_025403	2 (+)	113794821-113794828			cccacttacataaggaag
		Hs.	NM_018648	15 (-)	32220013-32220020			cccacttacataagaaaa

93981_at	tPA	Mm.	NM_008872	8 (+)	21514386-21514391	agaggcacgtggagca	
	(PLAT)	Hs.	NM_000930	8 (-)	41785986-41785991	aggggcacgtggagca	
101458_at	Wee1	Mm.	NM_009516	7 (+)	98355370-98355375	gccctcacgtgttaa	
		Hs.	NM_003390	11 (+)	9634343-9634348	gcactcacgtgttaa	
	Mm.	NM_009516	7 (+)	98355570-98355575	gatcgcacgtggcgga		
	Hs.	NM_003390	11 (+)	9634547-9634552	agccgcacgtggcgga		
	Mm.	NM_009516	7 (+)	98356450-98356457		taagattatgtaactgaa	
	Hs.	NM_003390	11 (+)	9635386-9635393		tgagattatgtaactgaa	