

2004年12月14日

人間科学研究科委員長 殿

## 南 陽一氏 博士学位申請論文審査報告書

南 陽一氏の学位申請論文を下記の審査委員会は、人間科学研究科の委嘱を受け審査をしてきましたが、2004年12月14日に審査をいたしましたので、ここにその結果をご報告します。

### 記

1. 申請者氏名 南 陽一

2. 論文題名 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

3. 本論文の主旨、概要、評価 別紙記載

4. 南 陽一氏 博士学位申請論文審査委員会

主審査委員 早稲田大学教授 薬学博士(九州大) 柴田 重信

査審査員 早稲田大学教授 理学博士(東京大) 木村 一郎

審査委員 早稲田大学教授 理学博士(北海道大) 山元 大輔

以上

## 1. 本論文の主旨

本論文では、末梢組織における時計制御遺伝子の解明を試みた 2 つの研究を展開した。前半では心臓における体内時計に着目し、循環器疾患に係る線溶系の概日リズムを取り扱った。体内時計が線溶系をいかに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により検討した。心臓の時計において *Pai-1* が時計の制御下の遺伝子であることを、時計遺伝子の変異体である *Clock* 変異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。*Clock* 変異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おり、世界初の知見であった。

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行なった。このような方法で見出された振動遺伝子が直接時計の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。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。体内時計の出力遺伝子としては細胞外マトリックスのリモデリングに関与する因子や細胞周期に関与する因子が見出せた。以上の研究は、体内時計の出力遺伝子の機能を調べることが、体内時計の生理学的役割を明らかにする重要な方法であることを強く示唆した。

## 2. 本論文の概要

ほとんどの生物が持つ機能の一つとして、概日リズムと呼ばれる約 24 時間を 1 周期とするリズム変動がある。概日リズムは生物の体内にある時計（体内時計）によって刻まれる内因性リズムで、睡眠や体温などのさまざまな生理現象で観察することができる。体内時計の発振機構は時計遺伝子を中心とした分子機構により動いていることが分かってきた。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。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。ところで時計遺伝子は時計中枢である視交叉上核だけでなく、大脳皮質など他の脳部位や末梢組織、さらには *Rat-1* といった株化細胞にも発現し、概日振動する。したがって体内時計は視交叉上核（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、末梢時計の機能は不明なままである。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関与する遺伝子（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。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、各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った。重要なことに組織間で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。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の出力遺伝子を同定することが重要である。まず第1章では心臓での線溶系に関わる *Pai-1* 遺伝子をいかに体内時計が制御するかについて検討した。

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、明暗条件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。*Bmal1*、*Npas2*の発現ピークは夜間にあったが、*Per1*、*Per2*のピークは昼間にあった。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。*Clock*変異マウスでは、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。さらに、予想されたとおり*Clock*変異マウスでは*Pai-1*遺伝子の発現振動が消失していた。野生型マウスに、明期の4時間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。自由摂食下のマウスに比べ、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。自由摂食下の*Clock*変異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。以上、*Pai-1*遺伝子は体内時計出力遺伝子として機能していることが明らかとなった。

第2章では明暗条件下、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、発現時刻によるクラスター分けと、振動遺伝子の同定を行なった。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。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該当配列が見つかる

った。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。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。以上の結果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。本研究から体内時計の出力に関わる遺伝子発現パターンがわかり、このシステムを利用すれば、肥満・高脂血症の状態の「体内時計と肥満・高脂血症」の両者に関与する遺伝子を網羅的に調べることができ、「規則正しい摂食行動と肥満」の関連性を分子レベルで解き明かせる可能性を示唆している。

### 3 . 本論文の評価

本研究は、体内時計の出力遺伝子である *Pai-1* 遺伝子発現に注目して、生体でも体内時計が *Pai-1* 遺伝子発現制御を行なっていることを見出し、とくに世界に先駆けて *Clock* 変異マウスの積極的使用により、より明確な答えを引き出したことは、注目に値する。また、白色脂肪組織を用いて、トランスクリプトーム解析を行ない、脂肪組織における体内時計発現機構の特徴を見出した。また、機能がわかっているいくつかの遺伝子については、その時計機能発現のプロファイルを調べた。実際の疾患モデル動物を使った実験は行なわれていないものの、後者の研究は脂肪組織に関連した肥満やインスリン抵抗性などの研究に新しい視点を提供する可能性がある。

本論文はこのような未解決問題を残してはいるものの、先に述べてきたように、生命科学分野の研究発展に貢献することから、博士 (人間科学) の学位を授与する事に十分値すると判断される。

2004年12月14日

審査員 (主査)	早稲田大学教授	薬学博士	(九州大学)	柴田重信	印
	早稲田大学教授	理学博士	(東京大学)	木村一郎	印
	早稲田大学教授	理学博士	(北海道大学)	山元大輔	印

