

66. 食事の時間による肥満予防の遺伝子ネットワーク

小池 宣也

Key words: 概日リズム, 時計遺伝子, 制限給餌, *Bmal1*

京都府立医科大学
大学院医学系研究科 統合生理学部門

緒言

概日リズムは、外部環境（主に明暗サイクル）に合わせて睡眠覚醒などの行動やホルモン分泌や体温調節といった生理活動を約 24 時間周期で制御している^{1,2)}。哺乳類の概日リズムは、時計遺伝子の転写翻訳フィードバックループによって構成されており、そこでは転写活性化因子 CLOCK 及び BMAL1 タンパク質が転写抑制因子である *Period* 及び *Cryptochrome* 遺伝子発現を活性化し、それによって作り出された *Period* (PER1, PER2) 及び *Cryptochrome* (CRY1, CRY2) タンパク質が CLOCK / BMAL1 との相互作用によって自らの転写を抑制するというネガティブフィードバックを形成している。その後、PER, CRY タンパク質は次第にリン酸化およびユビキチン化修飾を受けた後、プロテアソームで分解されるため、転写抑制が解除されて、CLOCK/BMAL1 による次のサイクルが開始される。このサイクルの 1 周に約 24 時間を要することが、概日リズム形成の分子メカニズムである。哺乳類概日時計の中核は脳視床下部の視交叉上核に存在しているが、体のほとんどすべての細胞が分子時計を備えており、それぞれの組織の生理活動の概日リズムを作り出している。つまり視交叉上核がペースメーカーとなり末梢組織にある時計を神経連絡又は液性因子によって支配することによって、カラダ全体で調和のとれたリズムを形成している。海外旅行などで感じる時差ぼけは、中核と末梢時計の位相関係が乱れた状態である。概日リズムの乱れは、睡眠障害だけでなく、肥満や糖尿病といったメタボリックシンドロームと関連することが明らかになってきた。現代社会においては昼夜交代勤務（シフトワーク）に従事する労働者の割合が増加傾向にあり、シフトワークと肥満、メタボリックシンドロームとの関連も指摘されている³⁾。シフトワークでは睡眠障害とともに不規則な食生活となることが一因としてあげられている。食事の時間は肝臓の時計位相を変えることが知られており、マウスでは高脂肪食を与えると昼夜の摂食バランスがみだれるとともに過食になり肥満となる。また、非活動期にあたる昼間のみ高脂肪食を与えると肥満になるのに対して、活動期の暗期のみ制限すると肥満、メタボリックシンドロームの形成が抑制される^{4,5)}。このように食事のタイミングと肥満、糖尿病などとの関連が指摘されているが、その分子メカニズムは明らかになっていない。そこで、本研究では、制限給餌によって生じる遺伝子発現及びエピジェネティックな変化を解析し、摂食タイミングに起因する肥満抑制の分子メカニズムの解明を目指す。

方法、結果および考察

我々は、これまでにクロマチン免疫沈降と次世代シーケンサーをもちいた ChIP-seq によるシストローム解析および RNA-seq によるトランスクリプトーム解析によって、マウス肝臓の概日転写サイクルにおけるクロマチンランドスケープを明らかにしてきた⁶⁾。マウス肝臓では、発現している遺伝子約 13,000 のうち約 10% が概日振動しており、その中にはメタボリックパスウェイに属する遺伝子群が最も有意に濃縮されていた。また、BMAL1 が結合する遺伝子のパスウェイ解析においても、メタボリックパスウェイが最も有意に濃縮されていた⁶⁾。そこで、我々はまず、自由摂食下のマウス肝臓の RNA-seq と ChIP-seq のデータから、BMAL1 結合と RNA 発現レベルとの相関を調べたところ、正の相関がみられた（図 1 A）。また、BMAL1 の結合する遺伝子を KEGG metabolic pathway で表示したところ、多くの代謝関連遺伝子に BMAL1 が結合していた（図 1 B）。これらのことは概日リズムが肝臓における代謝活動を転写レベルで直接制御していることを示していた。

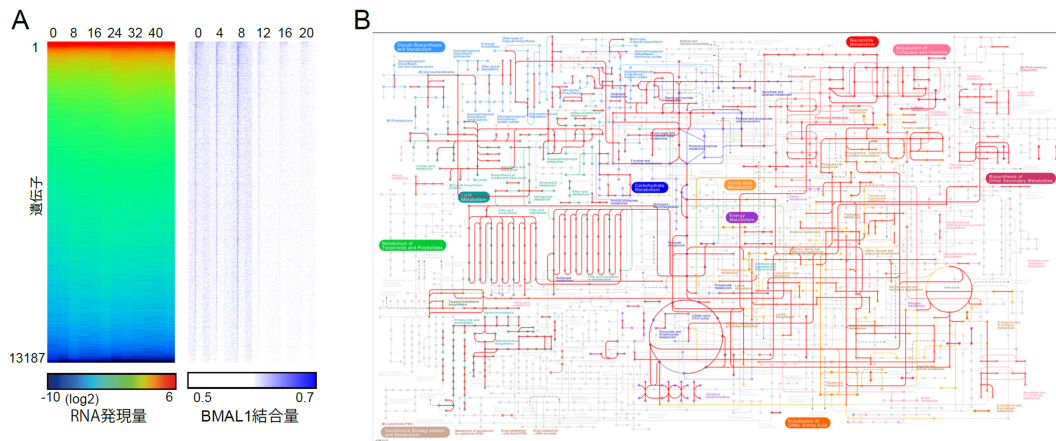


図1. BMAL1による遺伝子発現制御.

A) RNA 発現量と BMAL1 結合量のヒートマップ. 肝臓で発現していた 13,187 遺伝子の CT0 から CT44 まで 4 時間毎の RNA 発現量を上から発現量が多い遺伝子順に青～赤のヒートマップで (左), 対応する遺伝子の転写開始点周辺における CT0 から CT20 まで 4 時間毎の BMAL1 の結合量を白青のヒートマップで示した (右). CT0 が明期の開始, CT12 が暗期の開始に相当する. BMAL1 の結合と RNA 転写量には正の相関がみられた. B) KEGG metabolic pathways における BMAL1 の結合遺伝子の分布. BMAL1 が結合する遺伝子を赤で示した.

次に, 制限給餌による遺伝子発現の変化と BMAL1 のクロマチン結合リズムを調べるため, マウスに昼間 4 時間 (明期の開始 4 時間後から暗期の開始 4 時間前まで) の制限給餌を 1 週間行い, 肝臓の時計遺伝子の発現を RT-q PCR 法で測定した. これまでの報告と同様に^{7,8)}, 時計遺伝子 *Bmal1*, *Clock*, *Per1*, *Per2*, *Cry1*, *Cry2*はいずれも自由摂食下のマウス肝臓で約 24 時間周期の発現リズムを示し, *Per1*, *Per2*, *Cry2*が CT8~12 (夕方) にピークを迎え, *Bmal1*, *Clock*, *Cry1* は CT20 から CT0 (明け方) にピークとなった. 制限給餌でも同様に約 24 時間周期の発現リズムが観察された. しかし, その発現位相はいずれも約 4~8 時間前進していた. また, 肝臓で RNA 発現が強く振動することが知られている *Dbp* 遺伝子についても, 自由摂食下では CT8 をピークとする発現の概日リズムを示し, 制限給餌では 4 時間位相前進していた (図 2).

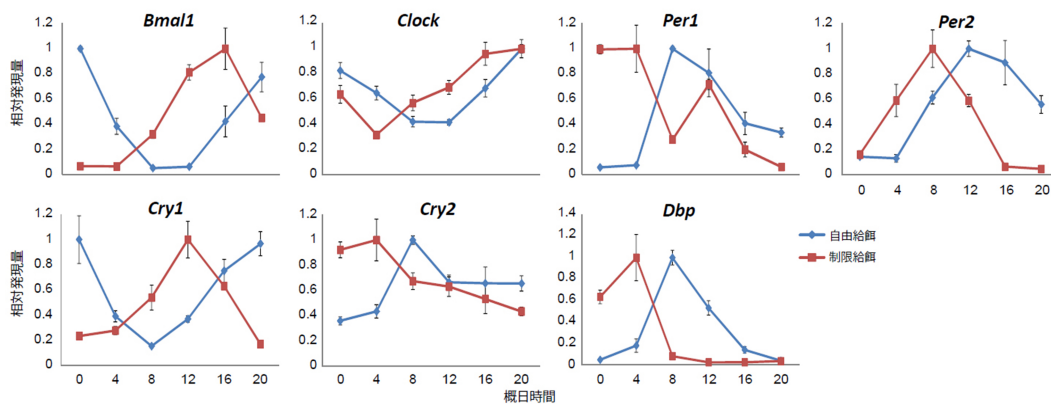


図2. 肝臓の時計遺伝子の発現リズム.

自由摂食 (青) 制限給餌 (赤) における 4 時間毎のマウス肝臓の時計遺伝子の発現量はいずれも概日振動していた. 制限給餌では自由摂食に比べて 4~8 時間位相前進していた. マウスは自由摂食又は明期 4 時間の制限給餌 (ZT4-8) を 1 週間行った後, 恒暗条件に移し 2 日目の肝臓の RNA を抽出し解析に用いた.

続いて、マウス肝臓における BMAL1 タンパク質の DNA 結合リズムをクロマチン免疫沈降で調べたところ、自由摂食下では、*Dbp* 遺伝子のプロモーター、イントロン 1、イントロン 2 において CT8 をピークとする結合リズムが観察された。また、*Per1* 及び *Per2* 遺伝子のプロモーターにおいても CT8 をピークとする結合リズムが見られた (図 3 A)。制限給餌においても *Dbp* 遺伝子のプロモーター、イントロン 1、イントロン 2、*Per1* 及び *Per2* 遺伝子のプロモーターにおいて BMAL1 結合の概日リズムが観察されたが、その位相は RNA 発現と同様に 4~8 時間前進していた (図 3 B)。

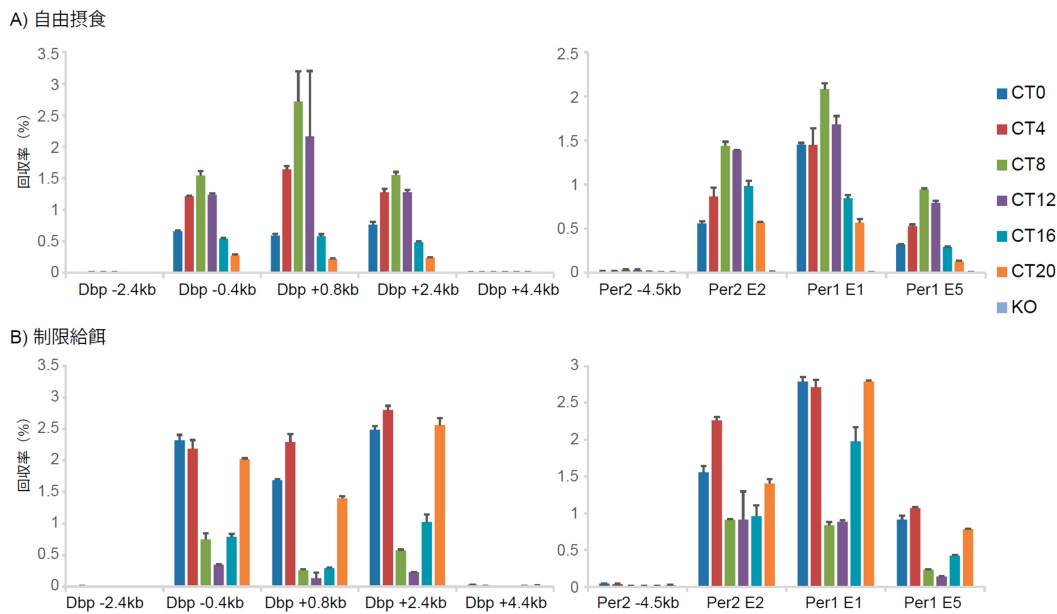


図 3. BMAL1 のクロマチン結合リズム。

自由摂食下 (A) 及び制限給餌下 (B) のマウス肝臓の BMAL1 のクロマチン結合量を 4 時間毎に調べた。BMAL1 は *Dbp* 遺伝子のプロモーター (-0.4 kb), イントロン 1 (+0.8 kb), イントロン 2 (+2.4 kb) に強く結合していた。また、*Per2* 遺伝子のプロモーター (Per2 E2) 及び *Per1* 遺伝子のプロモーター (Per1 E1, Per1 E5) においても結合の概日リズムが観察され、制限給餌下では、その位相が 4~8 時間前進していた。(A は文献 6 より転載)

マウスは通常、暗期の初めに一番大きな食事をする。今回、昼間の制限給餌により食事のタイミングを 8 時間前に前進することで、肝臓における BMAL1 タンパク質のクロマチン結合リズムの位相が変化することが明らかになった。*Per1*, *Per2*, *Cry1*, *Cry2* 及び *Dbp* 遺伝子は BMAL1 に発現が制御されており、その発現リズムが 4~8 時間前進したのは BMAL1 のクロマチン結合が早まったためと考えられる。肝臓では BMAL1 はこれらの遺伝子以外にも約 3,000 遺伝子座に結合しており、制限給餌による肝臓全体の遺伝子発現ネットワークの変化が予想される。今後は、RNA-seq 及び ChIP-seq によって食事のタイミングで変化する遺伝子発現やクロマチン修飾などを網羅的に解析するとともに、高脂肪食制限給餌との比較によって、摂食タイミングに起因する肥満形成と抑制の分子メカニズムの解明を進めていく。

共同研究者

本研究の共同研究者は、Department of Neuroscience, The University of Texas Southwestern Medical Center の Joseph S. Takahashi 教授である。本研究を御支援いただきました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Mohawk, J. A., Green, C. B. & Takahashi, J. S. : Central and Peripheral Circadian Clocks in Mammals. *Annu. Rev. Neurosci.*, **35** : 445-462, 2012.
- 2) Bass, J. & Takahashi, J. S. : Circadian integration of metabolism and energetics. *Science*, **330** : 1349-1354, 2010.
- 3) Antunes, L. C., Levandovski, R., Dantas, G., Caumo, W. & Hidalgo, M. P. : Obesity and shift work: chronobiological aspects. *Nutr. Res. Rev.*, **23** : 155-168, 2010.
- 4) Arble, D. M., Bass, J., Laposky, A. D., Vitaterna, M. H. & Turek, F. W. : Circadian timing of food intake contributes to weight gain. *Obesity (Silver Spring)*, **17** : 2100-2102, 2009.
- 5) Hatori, M., Vollmers, C., Zarrinpar, A., DiTacchio, L., Bushong, E. A., Gill, S., Leblanc, M., Chaix, A., Joens, M., Fitzpatrick, J. A., Ellisman, M. H. & Panda, S. : Time-restricted feeding without reducing caloric intake prevents metabolic diseases in mice fed a high-fat diet. *Cell Metab.*, **15** : 848-860, 2012.
- 6) Koike, N., Yoo, S. H., Huang, H. C., Kumar, V., Lee, C., Kim, T. K. & Takahashi, J. S. : Transcriptional architecture and chromatin landscape of the core circadian clock in mammals. *Science*, **338** : 349-354, 2012.
- 7) Damiola, F., Le Minh, N., Preitner, N., Kornmann, B., Fleury-Olela, F. & Schibler, U. : Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev.*, **14**, 2950-2961, 2000.
- 8) Stokkan, K. A., Yamazaki, S., Tei, H., Sakaki, Y. & Menaker, M. : Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding. *Science*, **291** : 490-493, 2001.