

食習慣と概日リズムによる恒常性維持の関連の理解のための基盤研究

平山 順

東京医科歯科大学難治疾患研究所発生再生生物学分野 准教授

緒 言

概日リズムとは、遺伝子発現や動物の行動といった分子ならび個体レベルの生命現象に観察される約 24 時間の周期変動であり、この生体リズムは多様な生理機能の周期を外環境に適応させることで生物の恒常性を維持している^{1,2)}。概日リズムは、入力系、ペースメーカー、および出力系の 3 つのコンポーネントにより構成される。ペースメーカーは生命現象の日周期を作り出す機構であるが、その実体は生体の全身に存在し細胞自律的に制御される分子時計である。この分子時計に摂食、光刺激などの外界からのシグナルが伝達されその周期を外環境周期に同調させる過程が入力系であり、分子時計が睡眠/覚醒や代謝などの生命現象に日周性を与える過程が出力系である。

分子時計は約 24 時間の周期性を有するフィードバックループであり、特に脊椎動物においては転写活性化因子 CLOCK、BMAL および転写抑制因子 CRY、PER の時計蛋白質により構成される。CLOCK は BMAL と二量体を形成し *Cry* 及び *Per* 遺伝子の転写を活性化し、一方で CRY と PER は CLOCK:BMAL1 二量体に結合しその転写活性を抑制する^{2,3)}。分子時計の転写の活性化と抑制の周期は約 24 時間になるように調節されており、従ってその標的遺伝子の発現および標的遺伝子の制御する生理機能には日周性が与えられる。マウスなどのモデル生物やヒトを対象とした解析により、分子時計の外環境周期への同調機構の異常が、発癌、代謝異常、躁鬱病などの疾患の病態に関連することが報告されている⁴⁾。

現在までに、複数のグループより活性酸素種が分子時計制御においてシグナル分子として機能することを報告されている。この知見より、私は、「摂食による細胞内の酸化還元状態の変化（活性酸素シグナルの変動）が分子時計制御に影響を与える」という可能性を考えた。本研究は、この可能性に関して、活性酸素シグナル応答性の MKK7-JNK シグナル経路による分子時計調節に注目

し解析を行ったので報告する。

実験方法

1 レポーター遺伝子安定発現細胞株の樹立とリアルタイムルシフェラーゼ解析

培養細胞は 10% のウシ胎児血清を添加した Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen) 中で培養した。

線形化した mPER2 promoter (1.8kb)-luciferase-pGL3basic 7ug と pcDNA3.1 1ug を MKK7^{flxed} マウス胚から得た繊維芽細胞 (MEF) に遺伝子導入し、ゲノムにレポーター遺伝子が組み込まれた MEF を複数クローン得た。これらのクローンの中から luciferase 活性の高い 2 つのクローンを選択し、*PER2-Luc Mkk7^{flxed}* MEF #1 及び *PER2-Luc Mkk7^{flxed}* MEF #2 として実験に用いた。

結 果

1 MKK7-JNKシグナルの機能阻害細胞における分子時計の転写制御

Mkk7^{flxed} マウスから樹立したマウス胚性繊維芽細胞 (MEF) に PER2 プロモーター (1.8kb) の下流でルシフェラーゼを発現するレポーター遺伝子を組みこんで複数の細胞クローン得た。これらのレポーター細胞を培養している培地中に JNK の阻害剤である SP600125 を添加した。100nM の dexamethasone 処理を行い培養細胞の分子時計を同調させた後、リアルタイム発光検出器 Kronos (ATTO) を用い 10 分毎に細胞の発光量を測定した。その結果、コントロールの細胞では、時計標的遺伝子の 22.7 時間及び 21.2 時間周期の発現変動がそれぞれ観察された (図 1)。一方、阻害剤処理した群では遺伝子発現の周期が 30.8 時間及び 27.3 時間と顕著に伸長した。また、本研究は、レポーター細胞にレトロウイルス感染により Cre-recombinase を組込んで MKK7 をノックアウトした。先の解析と同様に培養細胞のリズムを同調させた後、リアルタイム発光検出器 Kronos

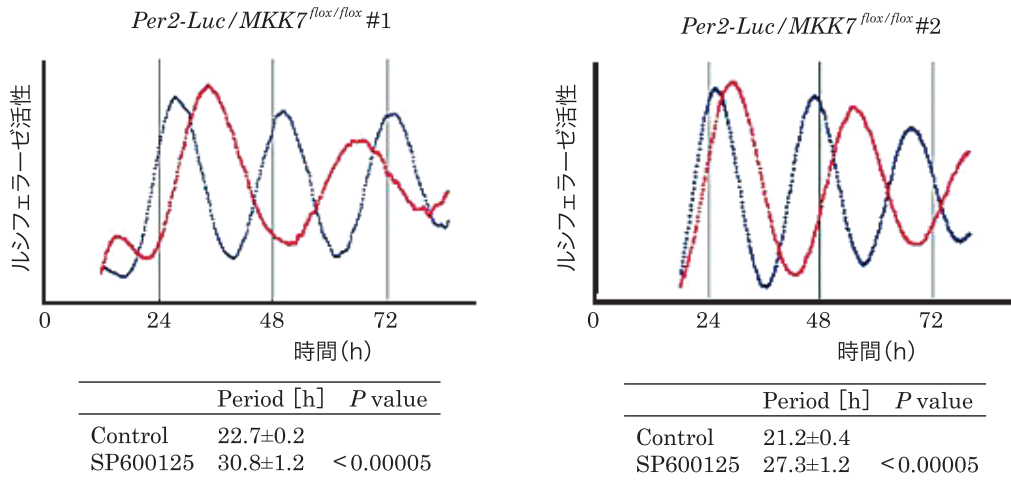


図1 JNK 阻害剤による分子時計の周期伸長

図中の青および赤のプロットはコントロールおよび JNK 阻害剤 (SP600125) 処理群の結果をそれぞれ示す。

(ATTO) を用い 10 分毎に細胞の発光量を測定した。その結果、コントロールの細胞と比較して Mkk7 ノックアウト細胞では遺伝子発現の周期が約 2 時間伸長した (結果は割愛)。以上の結果から、MKK7-JNK シグナルは分子時計の周期性の維持にも関与する可能性が示唆された。

2 過酸化水素処理の分子時計の制御への影響

次に、本研究は、分子時計が細胞内の酸化還元状態の変化に応答するかを検討した。(図 2) 上記のレポーター細胞を 100nM の dexamethasone 処理を行い培養細胞の分子時計を同調させた後、54 時間の時点で、細胞を 100 μM の過酸化水素で処理し、リアルタイム発光検出器 Kronos (ATTO) を用い 10 分毎に細胞の発光量を測定した。その結果、コントロールの細胞に比較して、過酸化水素処理した群で時計標的遺伝子の発現変動の位相が変化するを見出した。特に、過酸化水素の添加により、非処理群に比較して位相が前進することが確認された。

考 察

近代社会では夜になっても人工照明を使うことで日中と同じように活動することが可能である。また現代の生活の中では、夜勤シフト等によりやむをえず夜間に活動する人も多く存在する。特に、昼夜が逆転した生活の増加に伴い夜食などの不規則な時間に食事をすることが増加している。このような生活を送ることは、概日リズムと外環境の明暗周期の脱同調を生じさせるため概日リズ

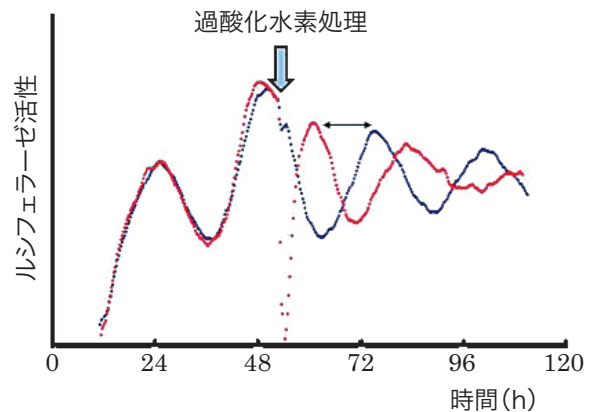


図2 過酸化水素処理による分子時計の位相の変化

図中の青および赤のプロットはコントロールおよび過酸化水素処理群の結果をそれぞれ示す。図中の青い矢印で示す時点 (同調後 54 時間) で処理を行った。図中の黒矢印は位相のずれを示している。

ムによる恒常性維持の破綻を引き起こし、発癌やメタボリック症候群といった現代社会を脅かす疾患を含む多くの病態に関与することが知られている³⁾。本研究は、食習慣と概日リズムによる生体の恒常性維持の相互作用の分子機構の理解を目的に行った。

リン酸化酵素 MKK7 は、下流の別のリン酸化酵素 JNK をリン酸化し活性化する。MKK7-JNK シグナル経路の活性化は、細胞内の酸化還元状態の変化や炎症性サイトカインなどの様々な刺激に応答し細胞死や細胞分化、サイトカイン産生などの細胞機能を制御する細胞応答性シグナルの一つである⁵⁾。また、このシグナルの主要構成因子の変異マウスの解析やヒトの疫学的な解析より、MKK7-JNK シグナル経路と生体の代謝制御や躁鬱

病との関連も示唆されている。本研究は、培養細胞を用いた生化学的な解析より、1) MKK7-JNK シグナル経路が生体の概日リズムを制御する分子時計を調節すること、および 2) 分子時計が細胞内の酸化還元状態の変化に応答し得ることを見出した。これらの知見は、摂食による細胞内の酸化還元状態の変化が MKK7-JNK シグナル経路を介して分子時計を調節する可能性を示唆している。今後は、マウスモデルを用いた解析より、この可能性について検討していきたいと考えている。

要 約

本研究は、「食習慣と概日リズムによる恒常性維持の関連」の理解を目的に行い、この両者の仲介する分子メカニズムの候補として MKK7-JNK シグナル経路による分子時計調節を見出した。今後は、マウスをモデルとした解析を進め、本研究の知見をより生体内に近い条件で検討することを考えている。

謝 辞

本研究は、公益財団法人三島海雲記念財団の平成 24 年度学術研究奨励金により行われたものです。助成していただきました公益財団法人三島海雲記念財団に深謝致します。

また、本研究を遂行するにあたり、多大なるご支援をいただいた東京医科歯科大学 難治疾患研究所 発生再生生物学分野の仁科博史教授並びに浅岡洋一助教に御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Okamura, H.: *J Biol Rhythms*, 19 : 388-399, 2004
- 2) Dunlap JC *Cell* 96 :271-290. 1999
- 3) Sahar S & Sassone-Corsi P. : *Nat Rev Cancer*, 9 : 886-896, 2009.
- 4) Hirayama J and Sassone-Corsi P. *Curr Opin Genet Dev*. 15:548-56. 2005
- 5) Yamasaki Tet al: *J. Signal Trans.* 2012