

核内受容体を介した脂質代謝から 体内時計へのフィードバック制御

大石勝隆*

産業技術総合研究所 生物機能工学研究部門 生物時計研究グループ

地球上の生物にとって、地球の自転周期に合致した約24時間周期の概日時計を獲得することは、生存競争の中で勝ち残るための重要な要素であったと考えられる。哺乳類の時計遺伝子が最初に報告されてから10年余りが経過したが、体内時計の研究は、時計遺伝子を中心とした分子レベルでのリズム発振機構の解明を目指す方向で爆発的な発展を成し遂げてきた。その一方で、脳神経系以外の組織に存在する末梢時計に関する研究により、体内時計の生理的役割についても様々な知見が得られている。本稿では、体内時計と脂質代謝との関連性に焦点を当て、筆者がこれまでにやってきた研究を中心に、個人的観点から論じてみたいと思う。

はじめに

生物は、その長い進化の過程において、捕食者からの攻撃と、餌の不足による飢餓に絶えず苦しめられながら、これらの困難を克服するための様々なシステムを獲得してきた。体内時計のシステムが、環境に適応するように自然淘汰されてきたと考えるならば、エネルギーの代謝制御に時計遺伝子が関わっていることは、非常に合理的であると考えられる。

最近になって、肝臓や脂肪組織を中心とした脂質代謝と体内時計の関連性についての研究が相次いで発表されるようになり、「体内時計→脂質代謝」という制御機構の存在が次第に明らかとなってきた^{1,6,11,12,17,19,21}。偶発的な発見から、我々は、「脂質代謝→体内時計」といった制御機構が存在する可能性を見出すこととなり、今後の新たな研究分野として発展してゆくものと期待される。

1. CLOCK分子と脂質代謝

末梢時計の制御およびその生理的な役割に関心を持って研究を行っていた我々は、2002年当時時間生物学の分野で精力的に行われていたDNAマイクロアレイの手法を用いることによって、時計分子であり転写因子であるCLOCKの肝臓における役割を解明しようと試みた¹²。肝臓などの末梢臓器において

は、CLOCKの転写ターゲットである*Per1*や*Per2*のmRNA発現量が夕刻から夜の前半にかけて最も高くなることから、ZT14（日没後）とZT2（早朝）に、*Clock* 遺伝子変異マウス及び野生型マウスから肝臓をサンプリングし、DNAマイクロアレイによる比較解析を行った。その結果、野生型マウスで日周発現し、*Clock* 変異マウスで発現量が低下する100程度の遺伝子がスクリーニングされ、CLOCKが、肝臓において多様な役割を担っている可能性が示された。ちょうどその頃、肝臓における日周発現遺伝子を網羅的に解析したPandaらの研究成果がCell誌に発表された¹⁶。その論文の中では、*Clock* 変異マウスとの比較もなされており、発現量が*Clock* 変異によって影響を受ける遺伝子の中で、日周発現する遺伝子は、ほんの少数（9遺伝子）であると報告されていた。Pandaらは、*Clock* 変異によって発現量が極端に減少する遺伝子を検索したのに対して、我々は、*Clock* 変異によって発現リズムが減衰する遺伝子を検索していたために、より多くの遺伝子がスクリーニングできたものと考えられる。*Clock* 変異によって日周発現が影響を受ける遺伝子については、最近になってTakahashiらのグループからより詳細に報告されている¹⁰。

Clock 変異マウスを使ったDNAマイクロアレイ

*k-ooishi@aist.go.jp (〒305-8566 茨城県つくば市東1-1-1中央第6)

解析によって、我々は、CLOCK分子が肝臓において脂質代謝に深く関わりがあるものと考え、さらに検討を行った。その結果、脂肪酸の合成や代謝に関わるいくつかの遺伝子の発現が、*Clock* 変異によって影響を受けていることが判明した。脂肪酸合成に関わる遺伝子では、アセチルCoAカルボキシラーゼ (*ACC*) や ATPクエン酸リアーゼ (*ACL*) などの日周発現が¹¹⁾、脂肪酸代謝では、 α 型ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体 (peroxisome proliferator-activated receptor α : *PPAR* α) 遺伝子の日周発現が¹³⁾、*Clock* 変異によって減衰していた。

PPAR α 遺伝子上には、CLOCK/BMAL1の転写結合配列となるE-boxが密に存在している領域があり、ルシフェラーゼレポーターアッセイやゲルシフトアッセイなどにより、CLOCK/BMAL1が*PPAR* α 遺伝子の転写を直接制御している可能性を示した¹⁴⁾。実は、*PPAR* α 遺伝子の日周発現は、当時既に報告されており⁸⁾、肝臓でのmRNA発現量が血中のグルココルチコイド濃度の日内リズムと相関していることや、培養細胞を用いた実験結果から、グルココルチコイドによって日周発現が制御されていると解釈されていた。しかしながら、*PPAR* α 遺伝子の日周発現は、グルココルチコイドの主要な産生臓器である副腎を除去したマウスにおいても正常であり、実際には時計分子によって直接転写調節されているものと考えられる¹⁵⁾。*PPAR* α 分子は、長鎖脂肪酸を内在性リガンドとする核内受容体であり、RXRとヘテロダイマーを形成して標的遺伝子プロモーター上のPPRE配列 (*PPAR* response element) に結合し、リガンド依存的に転写を活性化する。*PPAR* α は、肝臓や心臓、骨格筋や血管内皮などに発現しており、脂肪酸の輸送や代謝に関わる様々な遺伝子の転写制御に関わっている⁷⁾。体内時計は、時計分子によって *PPAR* α 遺伝子の日周発現を直接制御することで、脂肪酸代謝系全般の日内変動を制御しているのかも知れない。

2. *PPAR* α リガンドによる体内時計の制御^{14, 20)}

Clock 変異マウスで *PPAR* α 遺伝子の発現量が低下していたことから¹³⁾、*PPAR* α 下流遺伝子発現への *Clock* 変異の影響を調べる目的で、粉餌に混和する形で *PPAR* α のリガンド (Wy14,643) 投与実験を行った。期待に反し、リガンド投与による *PPAR* α 下流遺伝子の発現誘導については、*Clock* 変異の影響がほとんど認められなかった。しかしながら興味深いことに、*PPAR* α のリガンドを投与したマウス

においては、肝臓における時計遺伝子の発現位相が顕著に前進していることに気がついた。そこで、*PPAR* α のリガンドが体内時計を前進させるのではないかと考え、*PPAR* α のリガンドで高脂血症 (脂質代謝異常症) 治療薬として用いられているフィブラート (ベザフィブラート) をマウスに投与し、活動リズムの測定を行った。その結果、驚くべきことに、明暗環境下での飼育にもかかわらず、フィブラートの投与によって活動開始時刻は徐々に前進し、約2週間後には3~4時間の位相前進を示した²⁰⁾。その一方で、フィブラートは恒暗条件下での活動周期には影響を与えないことから、*PPAR* α は、体内時計の位相調節に関与しているものと考えている。

PPAR α リガンドによる体内時計の調節機構を調べる目的で、フィブラートにより活動位相が前進したマウスの時計遺伝子発現を調べた。ところが、時計中枢である視交叉上核 (SCN) での時計遺伝子 *Per2* の日周発現には全く影響が見られなかった。その一方で、大脳皮質や肝臓、脂肪組織などのSCN以外の組織においては、活動リズムと一致して、*Per2* 遺伝子の日周発現も位相が前進していることがわかった。そこで、このフィブラート投与による活動位相の前進が、制限給餌による活動リズムの制御と同様にSCNに依存していない可能性を考え、早稲田大学の柴田重信先生にお願いしてSCN破壊の実験を行った。その結果、SCNを破壊した個体においても、フィブラート投与による活動位相の前進が確認され、フィブラートによる活動リズムの制御が、SCNに依存していない可能性が考えられた。フィブラートの投与による活動位相の前進は、明暗条件下にて観察される現象であり、夜行性の齧歯類であるマウスを使う限りにおいては、光によるマスキングの影響を無視することはできない。SCNは、光情報が直接反映される領域であり、光によって発現が誘導される *Per2* 遺伝子の発現がSCNにおいてフィブラート投与の影響を受けなかったのは当然なのかも知れない。

ちょうど同時期に、柴田先生の研究室から、*Clock* 変異マウスを恒明条件下にて育仔することにより、睡眠相後退症候群 (DSPS) に似た性質のマウスを作成できるとの発表がなされた²²⁾。*Clock* 変異マウスでは、DSPSと同様に、体温リズムに関しても位相の遅れがみられる¹⁸⁾。DSPSの詳細に関しては他著^{1, 15, 23)}に譲るが、フィブラートが活動位相を前進させることから、活動位相が後退しているDSPSの症状を改善する可能性が考えられた。そこで、DSPS症状を

呈するClock変異マウスにフィブラートを投与したところ、野生型マウスと全く同様に活動位相の前進が認められた。この結果は、PPAR α を介する新規な睡眠障害治療薬の可能性を示す成果として、新聞やテレビ等で広く報道されることとなった。さらにこの実験結果は、フィブラートによる体内時計の制御においては、時計分子CLOCKが必ずしも必要ではない可能性を示しており、今後分子機構を解明してゆく上で重要な知見であると考えている。

その後、フィブラートによる活動位相の前進が光周期依存的であり、LD18:6の長日周期においては、活動開始時刻が7~8時間も前進するのに対して、LD8:16の短日周期では、活動開始時刻の前進が起らないことがわかった¹⁾。理由については現段階では全く不明であるが、フィブラートの作用が明暗環境でのみ観察されることから、光によるマスクングとの複合的な影響が、活動リズムに反映されているのは確かである。

LD8:16の短日周期においては、活動開始時刻の前進は認められなかった一方で、フィブラートの投与直後より暗期後半の活動量が激減し、通常の餌に戻すと同時に、速やかに回復することがわかった。2007年になって、絶食などの飢餓状態では、肝臓でのPPAR α の活性化を介してFGF21が発現誘導されることが報告され²⁾、ヘパリン結合能を有しないFGF21は、速やかに脳内に移行し³⁾、低体温状態(torpor)を惹起することが報告された³⁾。PPAR α のリガンド投与によってもFGF21依存的に低体温が誘導され、興味深いことに、この低体温状態は、時刻依存的に暗期の後半に誘導されることが示された³⁾。我々も、徳島大学の勢井宏義先生にお願いして、フィブラート投与による暗期後半の低体温状態を確認している(近久ら、論文投稿中)。従って、フィブラート投与による暗期後半の活動量の減少は、FGF21の発現誘導を介した低体温によるものだと考えられる。フィブラート投与による体内時計の前進がFGF21を介するものかどうかについては、現在検討を行っている。

最近になって、高脂肪食負荷によって0.2時間活動周期が延長することが報告された⁴⁾。さらに興味深いことに、カロリー制限によって、我々がフィブラートを投与したときと同様の活動位相の前進が、それも明暗環境下において観察されることが報告された⁴⁾。これらの知見は、脂質代謝を中心としたエネルギー代謝が、体内時計によって制御されているのみならず、体内時計に対してフィードバックをか

けている可能性を裏付けるものであり、PPAR α は脂質代謝と体内時計とを結びつける鍵分子であると考えられる。

おわりに

自然界においては、生物が高血糖状態で死に至る可能性は非常に低い。逆に、飢餓による持続的な低血糖状態では、ブドウ糖にエネルギー源を依存する中枢神経系が機能不全となり、意識消失を引き起こして死に至る可能性が考えられる。この危険性を回避するためのシステムとして、血糖値を下げるホルモンがインスリンのみであるのに対し、血糖値を上昇させる内分泌系が優位に発達してきたものと考えられている。メタボリックシンドロームに代表されるような過剰なエネルギー摂取に起因した疾患の発症によって生命の危機に瀕しているのは、地球上の生物の中で、ヒトと、ヒトによって飼慣らされた一部のペットのみである。野生動物においては、「デザートは別腹」などといったエネルギーの過剰摂取はあり得ないことなのではないだろうか。ヒトにおいてさえ、エネルギーの過剰摂取による、脂質代謝異常症や動脈硬化、血栓症などの生活習慣病が社会問題となったのは、ほんの数十年前からであり、それも、世界の中で先進国に限られた問題であった(最近では、発展途上国における生活習慣病も深刻になりつつあるが)。従って、生体システムは、栄養過多というほんの最近の環境変化に適応するために進化してきたと考えるよりは、飢餓を克服するために進化してきたと考える方が正しいように思われる。同様に、体内時計は、過剰な栄養摂取による肥満の誘導というよりは、飢餓などの栄養不足に対する適応機構において重要な役割を担っているものと考えられる。

本稿で述べたように、PPAR α のリガンド投与は、飢餓状態と同様の影響を生体に及ぼし、PPAR α の活性化による体内時計の制御機構は、臨床的な観点からの関心のみならず、体内時計の生理的役割や存在意義を明らかにする上でも、非常に興味深い研究テーマであると思われる。

謝辞

私が生物時計の研究に携わることになったのが1998年でありますから、研究を始めてちょうど10年の節目に、この栄誉ある賞を頂いたこととなります。これまで受賞された諸先輩方とは異なり、華々しい成果とは全く無縁であった私を受賞することになっ

たわけですが、「奨励賞」の主旨を私なりに重く受け止め、今後時間生物学の分野に貢献してゆきたいと考えております。

私はこれまで、生物時計に関するほとんどの研究を産業技術総合研究所の生物時計研究グループで行ってきましたが、研究所の内外を問わず、多くの方々からご指導ご鞭撻、ご支援いただくことにより、今まで研究を続けることができたものと確信しております。今回紹介したPPAR α に関する研究では、筑波大学の大学院生として、汗と涙と涙を流して実験に励んでいただいた白井秀徳氏に感謝しております。また、早稲田大学の柴田重信先生によるご協力により、本研究の可能性が大きく広がったものと深く感謝しております。体温や脳波などの生理学的パラメーターの測定では、徳島大学の勢井宏義先生に大変お世話になりました。最後になりましたが、これまで10年間、常に叱咤激励下さりつつも、個人的興味(趣味?)に向かってしまう私の研究スタイルを温かく見守って下さった石田直理雄グループ長に、心から感謝の意を表します。

参考文献

- 1) Ebisawa T: J Pharmacol Sci 103:150-154(2007)
- 2) Hsuchou H, Pan W and Kastin AJ: Peptides 28:2382-2386(2007)
- 3) Inagaki T, Dutchak P, Zhao G, Ding X, Gautron L, Parameswara V et al.: Cell Metab 5:415-425(2007)
- 4) Kennaway DJ, Owens JA, Voultzios A, Boden MJ and Varcoe TJ: Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 293:R1528-1537(2007)
- 5) Kohsaka A, Laposky AD, Ramsey KM, Estrada C, Joshu C, Kobayashi Y et al.: Cell Metab 6:414-421(2007)
- 6) Kudo T, Tamagawa T, Kawashima M, Mito N and Shibata S: J Biol Rhythms 22:312-323(2007)
- 7) Lefebvre P, Chinetti G, Fruchart JC and Staels B: J Clin Invest 116:571-580(2006)
- 8) Lemberger T, Saladin R, Vazquez M, Assimacopoulos F, Staels B, Desvergne B et al.: J Biol Chem 271:1764-1769(1996)
- 9) Mendoza J, Drevet K, Pevet P and Challet E: J Neuroendocrinol 20:251-260(2008)
- 10) Miller BH, McDearmon EL, Panda S, Hayes KR, Zhang J, Andrews JL et al.: Proc Natl Acad Sci U S A 104:3342-3347(2007)
- 11) Oishi K, Atsumi G, Sugiyama S, Kodomari I, Kasamatsu M, Machida K et al.: FEBS Lett 580:127-130(2006)
- 12) Oishi K, Miyazaki K, Kadota K, Kikuno R, Nagase T, Atsumi G et al.: J Biol Chem 278:41519-41527(2003)
- 13) Oishi K, Shirai H and Ishida N: Biochem J 386:575-581(2005)
- 14) Oishi K, Shirai H and Ishida N: Neuroreport 19:487-489(2008)
- 15) Okawa M and Uchiyama M: Sleep Med Rev 11:485-496(2007)
- 16) Panda S, Antoch MP, Miller BH, Su AI, Schook AB, Straume M et al.: Cell 109:307-320(2002)
- 17) Rudic RD, McNamara P, Curtis AM, Boston RC, Panda S, Hogenesch JB et al.: PLoS Biol 2:e377(2004)
- 18) Sei H, Oishi K, Morita Y and Ishida N: Neuroreport 12:1461-1464(2001)
- 19) Shimba S, Ishii N, Ohta Y, Ohno T, Watabe Y, Hayashi M et al.: Proc Natl Acad Sci U S A 102:12071-12076(2005)
- 20) Shirai H, Oishi K, Kudo T, Shibata S and Ishida N: Biochem Biophys Res Commun 357:679-682(2007)
- 21) Turek FW, Joshu C, Kohsaka A, Lin E, Ivanova G, McDearmon E et al.: Science 308:1043-1045(2005)
- 22) Wakatsuki Y, Kudo T and Shibata S: Eur J Neurosci 25:2413-2424(2007)
- 23) Wyatt JK: Sleep 27:1195-1203(2004)