

学位論文

転写因子 *Dec1* 遺伝子の発現に及ぼす

核内受容体 ROR α の作用及び

DEC1 タンパク質の脂肪分化・脂質代謝における役割

尾崎 徳継

広島大学大学院医歯薬学総合研究科

展開医科学専攻顎口腔頸部講医科学講座歯科矯正学分野

(主指導教官：丹根 一夫 教授)

2011 年度

目次

第1章 緒論	1
第2章 材料および方法	5
1. 細胞培養	5
2. 3T3-L1 細胞の脂肪分化	5
3. <i>Dec1</i> ノックアウトマウス	5
4. RNA 抽出および定量リアルタイム PCR	6
5. ルシフェラーゼレポータープラスミドの作製	7
6. トランスフェクションとルシフェラーゼレポーターアッセイ	8
7. クロマチン免疫沈降法	9
8. ゲルシフトアッセイ	10
9. オイルレッドO染色	11
第3章 結果	12
第1節 核内受容体 ROR α による <i>Dec1</i> 発現調節機構	12
1. ROR α と REV-ERB α の <i>Dec1</i> , <i>Bmal1</i> プロモーターへの影響	12
2. <i>Dec1</i> と <i>Bmal1</i> の RORE エlementへの ROR α , REV-ERB α の影響	12
3. ゲルシフトアッセイによる <i>Dec1</i> -RORE への ROR α の結合の確認	16
4. クロマチン免疫沈降法での <i>Dec1</i> -RORE への ROR α の結合の確認	16
5. <i>Dec1</i> と <i>Bmal1</i> のリズム発現の位相	17

第2節	3T3-L1 細胞の脂肪分化過程での <i>Dec1</i> と関連遺伝子の発現 パターン	19
1.	3T3-L1 細胞における脂肪分化調節因子の発現	19
2.	脂肪分化前後における <i>Dec1</i> に対する ROR α の効果	24
第3節	<i>Dec1</i> ノックアウトマウスを用いた脂肪分化・脂質代謝調節に おける DEC1 の標的遺伝子	25
1.	<i>Dec1</i> ノックアウトマウスの白色脂肪組織での時計遺伝子の発現	25
2.	<i>Dec1</i> ノックアウトマウスの白色脂肪組織での脂肪関連遺伝子の発現	25
第4節	DEC1 の標的遺伝子への作用機構	32
1.	DEC1 の PPRE レポーターへの影響	32
2.	脂質代謝関連遺伝子の PPRE への DEC1 の結合	33
第 4 章	考察	35
第 5 章	総括	41
第 6 章	参考文献	43
	謝辞	51

第 1 章 緒論

地球上の生物には外界の環境に適応するための仕組みが存在し、そのひとつに地球の自転によって生じる 24 時間周期の明暗サイクルに同調した体内リズムがある。哺乳類では、昼夜のシグナルは光刺激として網膜視床下部路を通して、体内時計の中核である視床下部の視交叉上核 (suprachiasmatic nucleus, SCN) に伝えられる。SCN では時計遺伝子からなる分子時計機構による 24 時間周期の概日リズム発振機構が作動する。そして、そのリズムシグナルは神経伝達あるいは液性因子などを介して、脳のその他の部位や末梢組織へ伝えられ、同様の時計遺伝子からなる末梢時計を同調させ、睡眠・覚醒、摂食行動、血圧、ホルモン分泌、免疫応答、及び各組織特有の代謝リズムを支配する。中枢時計に対しては自然光あるいは人工的な光が同調因子となるが、末梢時計には光以外に、食事条件、ストレス、薬物摂取などさまざまな環境因子も影響する。

体内時計の分子機構については近年急速に明らかになりつつある。一番大きなブレークスルーは時計遺伝子の発見であり、ショウジョウバエの変異体の実験からリズム変異体が数種類発見され(1)、そこから時計遺伝子 *Period* 遺伝子がクローニングされた(2, 3)。時計遺伝子が高等動物でも存在するか否かは不明であったが、その後哺乳動物でも *Period1* が発見され(4, 5)、さらに行動リズム変異ミュータントからのポジショナルクローニングにより *Clock* 遺伝子が発見された(6, 7)その後も *Period2* (8, 9)、*Period3* (10, 11)や *Bmal1* (12)、*Cryptochrome1* (13)、*Dec1* (*differentiated embryonic chondrocyte 1*)、*Dec2* (14)などの時計遺伝子が発見され、現在では二十種類の時計遺伝子ファミリーが知られている。

哺乳動物の分子時計系では、ベーシック・ヘリックス・ループ・ヘリックス型(bHLH)

の転写因子である CLOCK と BMAL1 はヘテロ二量体を形成し、*Dec1* などの時計遺伝子に存在する E/E'-box (CACGTG, CACGTT)に結合して転写を促進する(図1)。そして転写、翻訳された DEC1 タンパク質はホモ二量体を形成し、CLOCK-BMAL1 の転写活性を抑制することによりネガティブフィードバックループを構築する(8, 13, 15)。

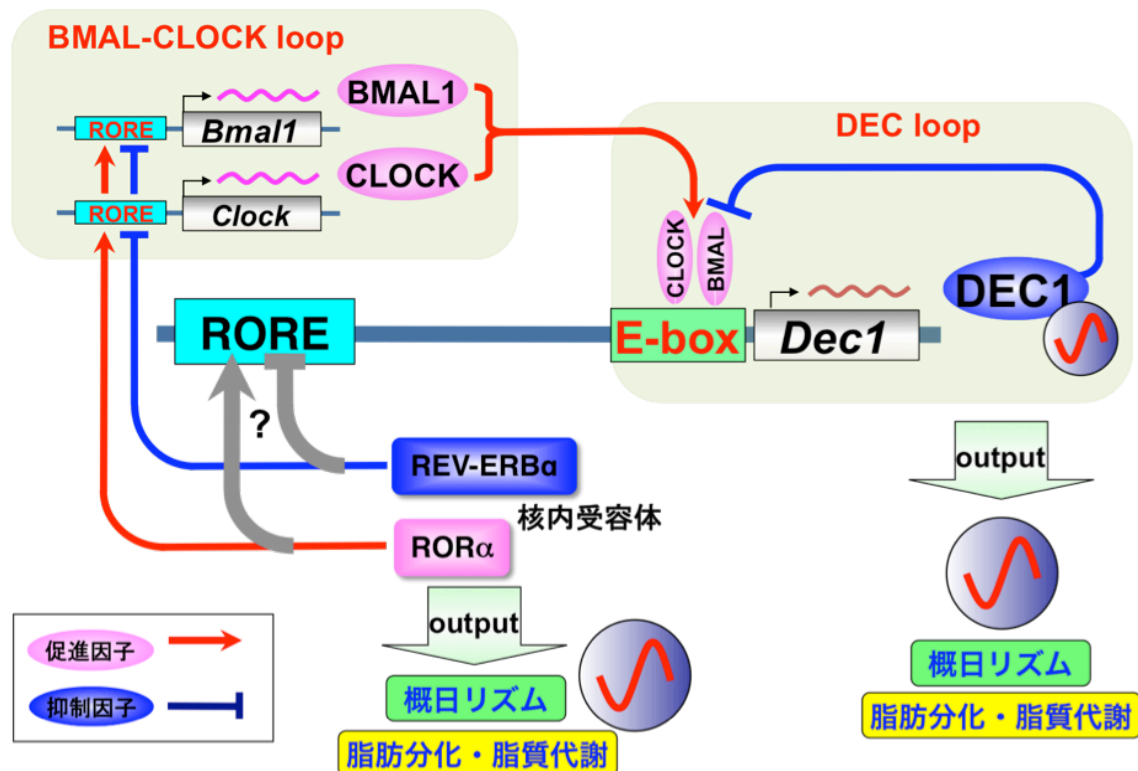


図1. 分子時計機構における *Dec1* の発現調節と核内受容体の役割

Dec1 遺伝子の調節領域にもある E-box (CACGTG)に CLOCK:BMAL1 ヘテロ二量体が結合し、遺伝子発現を活性化する。産物であるタンパク質は抑制因子として、自ら遺伝子発現を抑制し、それによって 24 時間のリズムを作る。また、核内受容体 REV-ERBa や RORα は BMAL1 など RORα と REV-ERBa に対する共通の応答配列 RORE を持つ遺伝子の発現を調節する。この機構により形成された各時計遺伝子のリズムがその他の遺伝子を標的とする形で出力される。DEC1 遺伝子上流には E-box 以外に核内受容体の応答配列 RORE のエレメントの一部となる AGGTCA モチーフがマウスで 5 箇所、ヒトで 4 箇所存在している。

同様に、DEC2 や PER (PER1, PER2, PER3), CRY (CRY1, CRY2) ネガティブフィードバックループを形成し、これらは互いに連動しあっている。複数の時計遺伝子が連動的なネットワーク(主要ループ)を形成することにより、体内時計機構が頑強に維持

されている。一方、核内受容体である ROR (ROR α , ROR β , ROR γ)および REV-ERB (REV-ERB α , REV-ERB β)はそれらの応答配列 (RORE) (図 3A 参照) を介して *Bmal1* と *Clock* 遺伝子の転写をそれぞれ促進及び抑制することにより概日リズムを維持し、主要ループを支持するサブループを形成する(14, 16-19)。

Dec1 は、ヒト軟骨からサブトラクション法でクローニングされた bHLH とオレンジドメインを持つ転写因子である(15)。DEC1 は上に述べた時計機構での役割以外に細胞分化にも関与する。DEC1 は発生過程の成長板、成長軟骨において、内軟骨性骨形成を促進する(20)。また、*Dec1* プロモーター上の低酸素応答エレメント(HRE)に、低酸素応答転写因子 HIF-1 α が結合し DEC1 の発現を誘導することにより、低酸素による軟骨分化の促進が起こる(21, 22)。筋肉分化では、DEC1 は MyoD と結合することにより、分化を抑制する(23)。DEC1 は T 細胞、B 細胞の初期分化、B 細胞の後期活性化と最終分化にも関与している(24)。さらに SP1 や SREBP1 とヘテロ二量体形成により GC-box や SRE を介してアポトーシスを促進する(25)。また、Yun らは DEC1 が PPAR γ を介して 3T3-L1 細胞の脂肪分化を抑制することや(26)、Iwata らも DEC1 過剰発現が間葉系幹細胞の脂肪分化を抑制することを報告しているが(27)、その分子機構は明らかでない。

Dec1 遺伝子の発現調節機構についてはこれまで多くの報告がある。E/E'-box (CACGTG, CACGTT)を介した BMAL1:CLOCKによる転写促進と DEC1 自身による転写抑制(15)によるもの、HRE を介した HIF-1 α による促進(21, 22)に加えて、SMAD を介した TGF- β による促進(28)、LXRE を介したオキシステロールをリガンドとする核内受容体 LXR α (NR1H3)による促進(29)などが報告されている。

Dec1 遺伝子プロモーターの上流には核内受容体の応答エレメントの一部となる AGGTCA モチーフが複数 (マウスでは 5 個、ヒトでは 4 個) 見つかっている(29)。

その一つは LXR α 応答配列 (LXRE)であるが、他の核内受容体の関与も考えられる。予備実験でオーファン受容体 ROR α (NR1F1)は、*Dec1* プロモーター活性を促進した (未発表データ)。ROR α も時計遺伝子であるが、脂肪分化を抑制する(30)。これまでの研究では ROR α は本来促進因子であるにもかかわらず(31)、脂肪分化過程で PPAR γ と C/EBP α の C/EBP β/δ による誘導を抑制すると示唆されている。しかし ROR α による脂肪分化抑制の少なくとも一部は DEC1 経路ではないかと推測された。DEC1 の脂肪分化の抑制機構については十分に解明されておらず、また脂肪分化抑制機構における DEC1 の標的遺伝子に関しても不明な点が多い。

本研究では、ROR α による *Dec1* 発現の制御機構を解析し、さらに *Dec1* ノックアウトマウスを用いて脂肪分化と脂質代謝における DEC1 と ROR α の役割を探究した (図 1)。

第 2 章 材料および方法

細胞培養

マウスの肝臓ガン細胞 Hepa1c1c7, マウス胎仔由来線維芽細胞株 NIH3T3、マウス前駆脂肪細胞 3T3-L1 (理化学研究所バイオリソースセンター, セルバンク, 茨城)を、10% ウシ胎仔血清 (Hyclone, Logan, UT, USA)、100 units/mL ペニシリン、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ストレプトマイシン (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)を用いて、5% CO_2 条件下にて 37 °C で培養した。

3T3-L1 細胞の脂肪分化

3T3-L1 細胞を 10% ウシ胎仔血清 (Hyclone)、100 units/mL ペニシリン、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ストレプトマイシン(P/S)を含む DMEM を用いて、5% CO_2 条件下にて 37 °C で培養した。コンフルエント 2 日後から 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ insulin (和光純薬, 大阪), 1 μM dexamethasone (Sigma Aldrich), 500 μM 3-isobutyl-1-methylxanthine (和光純薬)を含む脂肪分化誘導培地に交換し、その後 2 日ごとに 3 回、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ insulin を含む脂肪分化維持培地に交換した。

Dec1 ノックアウトマウス

Dec1 ノックアウトマウスは、inGenious Targeting LaboratoryでC57BL/6J マウスを用いて作られた(32)。雄性の生後4~6ヶ月の野生型マウスと*Dec1* ノックアウトマウスを12h:12hの明暗条件下で2~3週間飼育し、点灯4時間後から6時間ごとに、各グループ3匹ずつ合計24匹屠殺し、腹腔内鼠径部白色脂肪と肝臓を採取した。

RNA 抽出および定量リアルタイム PCR

RNA は TRIzol reagent (Invitrogen)を用いて抽出し、total RNA は RNeasy mini kit (QIAGEN, 東京)を用いて精製した。Total RNA (0.5 µg)から ReverTraAce (東洋紡, 大阪)を用いて cDNA を合成し、ABI Prism 7900 sequence detection system (Applied Biosystems, Van Allen Way Carlsbad, CA, USA)を用いてリアルタイム PCR 解析を行った。各遺伝子の測定にはそれぞれに特異的な customized Taqman probe と primer の組み合わせ(表 1)、あるいは Universal Probe Library (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)およびプライマーの組み合わせ(表 2)を用いた。また、RNA の量と質の検定のために 260 nm と 280 nm の吸光度比を測定し、さらに 18S rRNA 量を測定した。

表 1. Customized Taqman probe と primer

Genes	Sequences	Accession Number
<i>Dec1</i>		NM_011498
Forward primer	AGCATTCTCCAGCATAGGCAG	
Reverse primer	AGCATTCTCCAGCATAGGCAG	
Probe	5'FAM-TTCTATCTCATCCCACCATCGGCCAC-TAMRA-3'	
<i>Rora</i>		NM_013646
Forward primer	TTCTAAAAGCAGGCTCGCTAGAG	
Reverse primer	AAGTACACGGTGTGTTCTGAGAGTC	
Probe	5'FAM-TGGTGTTTATTAGGATGTGCCGTGCCTT-TAMRA-3'	
<i>Bmal1</i>		NM_007489
Forward primer	CAGTGCCACTGACTACCAAGAAA	
Reverse primer	CCTCCCTTGCATTCTTGATCC	
Probe	5'FAM-TATGGACACAGACAAAGATGACCCTCATGG-TAMRA-3'	
<i>Clock</i>		NM_007715
Forward primer	CGGCGAGAACTTGGCATT	
Reverse primer	ATACGATTGTCAGACCCAGAATCTT	
Probe	5'FAM-CTCTTCTGAGACAGCTGCTGACAAAAGC-TAMRA-3'	
<i>Per1</i>		NM_009032
Forward primer	AAACCTCTGGCTGTTCTACCA	
Reverse primer	GGAATGTTGCAGCTCTCCAAT	
Probe	5'FAM-AGATCAACTGCCTGGACAGCATCCTCAG-TAMRA-3'	
<i>Per2</i>		NM_011066
Forward primer	CCAGAGGAAGTGCCTATAAGAACCA	
Reverse primer	GAAGTGCAGTCTCTTTTCAGG	
Probe	5'FAM-ATCAGCTGCCTGGACAGTGTGCATCAGGTAC-TAMRA-3'	
<i>Dbp</i>		NM_016974
Forward primer	AGGAACTGAAGCCTCAACCAATC	
Reverse primer	CTCCGGCTCCAGTACTTCTCAT	
Probe	5'FAM-TGAAGAAGGCAAGGAAAGTCCAGGTGC-TAMRA-3'	
<i>Npas2</i>		NM_008719
Forward primer	GGCATTAGATGGCTTCGTCATC	
Reverse primer	AAGGAGAGGTGTGATACTGTCGG	
Probe	5'FAM-TGACAACAGACGGCAGCATCATCTATGTG-TAMRA-3'	

表 2. Universal Taqman probe と primer

Genes	forward primer	reverse primer	Probe ID
<i>Pparγ</i>	GAAAGACAACGGACAAATCACC	GGGGGTGATATGTTTGAACCTTG	#7
<i>Fasn</i>	GTCGTCTGCCTCCAGAGC	GCAACTTCCCCGACATACC	#10
<i>Acs11</i>	AAAGATGGCTGGTTACACACG	CGATAATCTTCAAGGTGCCATT	#46
<i>Scd1</i>	TTCCCTCCTGCAAGCTCTAC	CAGAGCGCTGGTCATGTAGT	#34
<i>Dgat2</i>	GGCGCTACTTCCGAGACTAC	TGGTCAGCAGGTTGTGTGTC	#42
<i>Lpl</i>	CTGGTGGGAAATGATGTGG	TGGACGTTGTCTAGGGGGTA	#25
<i>Mgl1</i>	GCTGTCTCGGAACAAGTCG	AGCAGCTGTATGCCAAAGC	#41
<i>Lpin1</i>	CCCTTCTATGCTGCTTTTGG	GGGACACTCCCCTTGTCTT	#40
<i>Adipoq</i>	AGGGAGAGAAAGGAGATGCAG	CTTTCCTGCCAGGGGTTTC	#17
<i>Leptin</i>	CAGGATCAATGACATTTACACA	GCTGGTGAGGACCTGTTGAT	#93
<i>c-Fos</i>	GGCTCTCCTGTCAACACACA	GACCAGAGTGGGCTGCAC	#26
<i>c-Jun</i>	TATTTTGGGAGCATTGGA	GAGATTTGCAAAAGTTCGCTCT	#7
<i>Perilipin</i>	GGATGGAGACCTCCCTGAG	CTCACAGGTCCCGCTCAC	#27
<i>Resistin</i>	TTCCTGTCCCTGAACTGCT	CCAATGTTCTTTATTGCATTGG	#67

ルシフェラーゼレポータープラスミドの作製

Dec1 上流の遠位側の ROR 応答配列 (RORE) を含むサイト (GTAAATTCAAGGTCAAAAT) を 3 つ連結した 2 本鎖 DNA 断片を表 3 に示すオリゴヌクレオチドより作製し *Dec1*-RORE とした。同様に GTAAATTCAAGACAAAAT (下線部に変異) を 3 つ連結した *Dec1*-RORE (mutated) と RORE のコア配列中の 5 番目の塩基 A を T に変えたもの GTAAATTCTAGGTCAAAAT (下線部に変異) を 3 つ連結した *Dec1*-RORE (mutated A→T) を作製した。また、*Bmal1* 遺伝子上流の遠位側の RORE サイトを 3 つ連結した 2 本鎖 DNA 断片を表 3 に示すオリゴヌクレオチドより作製して、*Bmal1*-RORE-B とした。さらに PPAR γ 応答配列 (PPRE) のコンセンサス配列 (AGGACAAAGGTCA) を含む配列を 3 つ連結した 2 本鎖 DNA 断片と *Lpl* のプロモーター領域で同定されている PPRE の配列 (TGCCCTTTCCCCT) を含む配列を 3 つ連結した 2 本鎖 DNA 断片を表 3 に示すオリゴヌクレオチドより作成した。それぞれの upper strand と lower strand のオリゴヌクレオチドを 100 μ M に TE buffer に溶解し、同量混合後、85 $^{\circ}$ C に熱し、徐々に室温に下げることによってアニーリングさせ、2 本鎖 DNA を調製した。それらの 2 本鎖 DNA 断片を pGL4.26

(Invirogen)ベクターの Nhe1 site と Xho1 site に Ligation High (東洋紡)を用いて組み込んだ。これらのベクターで大腸菌 DH5 α を形質転換し、LB 寒天培地に播種し多数のコロニーを得た。各クローンを LB 液体培地で 37 °C、一晚振盪培養し、プラスミドを Hispeed Plasmid Midi kit (QIAGEN)を用いて精製した。得られたプラスミドに目的の配列が挿入されていることを Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems)を用いて確認した。

Dec1 (4 kb)-luciferase reporter プラスミドと DEC1 発現プラスミドは Kawamoto ら(15)のものを用いた。核内受容体応答配列を含む図 2C に示す *Dec1* プロモーター断片を組み込んだ luciferase reporter プラスミドと REV-ERB α 発現プラスミドは、Noshiro らによって作製されたものを用いた(29)。*Bmal1* (229 b)-luciferase reporter プラスミドは大西芳秋博士 (産業技術総合研究所)より、ROR α 発現プラスミドは池田正明博士 (埼玉医科大学ゲノム医学研究センター)より、PPAR γ および RXR α は槇島誠博士 (日本大学医学部生化学講座)より供与された。

表 3. 各応答配列のクローニング用オリゴヌクレオチド

Genes	Sequences
<i>Dec1</i>-RORE	
Upper strand	CTAGGTAATTC AAGGTCAAATG TAAATTC AAGGTCAAATG TAAATTC AAGGTCAAAT
Lower strand	TCGAATTTGACCTTGAATTTACATTTGACCTTGAATTTACATTTGACCTTGAATTTAC
<i>Dec1</i>-RORE (mutated)	
Upper strand	CTAGGTAATTC AAGAACA AATG TAAATTC AAGAACA AATG TAAATTC AAGAACA AAT
Lower strand	TCGAATTTGTTCTTGAATTTACATTTGTTCTTGAATTTACATTTGTTCTTGAATTTAC
<i>Dec1</i>-RORE (mutated A→T)	
Upper strand	CTAGTGTAAATTC TAGGTCAAATG TAAATTC TAGGTCAAATG TAAATTC TAGGTCAAAT
Lower strand	TCGAATTTGACCTAGATTTACATTTGACCTAGATTTACATTTGACCTAGATTTAC
<i>Bmal1</i>-RORE B	
Upper strand	CTAGGGCAGAAAGTAGGT CAGGGAGGCAGAAAGTAGGT CAGGGAGGCAGAAAGTAGGT CAGGG
Lower strand	TCGATCCCTGACCTACTTTCTGCCTCCCTGACCTACTTTCTGCCTCCCTGACCTACTTTCTGCC
Consensus-PPREx3	
Upper strand	CTAGCAGGGGACCAGGACAAAGGTCACGTTCCGGAGTCGACAGGGGACCAGGACAAAGGTCACGTTCCGGAGTCGACAGGGGACCAGGACAAAGGTCACGTTCCGGG
Lower strand	TCGATCCCGAACGTGACCTTTGCTGCTCCCTGCGACTCCCGAACGTGACCTTTGCTGCTCCCTGCTGACTCCCGAACGTGACCTTTGCTGCTCCCTG
<i>Lpl</i>-PPREx3	
Upper strand	CTAGAGCGAAGAAGGGGAAAGGGCAGGAAGGAAGAGCGAGAAGAAGGGGAAAGGGCAGGAAGGAAGAGCGAGAAGAAGGGGAAAGGGCAGGAAGGAAG
Lower strand	TCGACTTCTCTGCTCCCTTTCCCTTCTCTGCTCTTCTCTGCTCCCTTTCCCTTCTCTGCTCTTCTCTGCTCCCTTTCCCTTCTCTGCT

トランスフェクションとルシフェラーゼレポーターアッセイ

96-well プレートに、Hepa1c1c7 細胞、NIH3T3 細胞、あるいは 3T3-L1 細胞を 1 well あたり 1x10⁴ 個播種し、翌日にルシフェラーゼレポーターと、発現プラスミドを組み合わせて、phRL-TK (0.5 ng)とともに FuGENE HD Transfection Reagent (Roche

Diagnostics) または Lipofectamine™ LTX 試薬 (Invitrogen)を用いてトランスフェクションした。1 well あたりの DNA の総量は、pcDNA3.1 プラスミドを添加して同量に揃えた。トランスフェクションから 48 時間後に細胞を回収し、Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega, Madison, WI, USA)と TriStar LB941 (Berthold Technologies, Calmbacher Str, Germany) を用いて発光量を測定した。

クロマチン免疫沈降法

3T3-L1 細胞 2×10^6 個を 10 cm ディッシュに播種し、一晩培養した。37% ホルムアルデヒド(和光純薬)を 270 μ L ディッシュに添加し、30 分、37 °C で静置し固定した。その後 PBS で洗浄し、Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) Assay Kit (Upstate, Chicago, IL, USA)中の buffer で細胞を回収後、氷中で超音波処理を行い、DNA を断片化した。そこに ROR α 抗体 (H-65; Santa Cruz Biotechnology, Inc,Santa Cruz, CA, USA)、REV-ERB α 抗体 (#2124; Cell Signaling Technology Japan)、または抗マウス DEC1 ウサギ抗体 (32)を加え、4 °Cで一晩転倒攪拌した。その後、Dynabeads ProteinA (Invitrogen)を用いて免疫沈降を行い、ビーズを洗浄し、DNA を回収した。これを鋳型とし、*Dec1*、*Bmal1* 遺伝子の RORE をはさむプライマーまたは *Lpl*, *Perilipin*, *Resistin*, 遺伝子の PPRE をはさむプライマー(表 4)および PrimeStar GXL (タカラバイオ, 滋賀)を用いて PCR 解析を行い、アガロース電気泳動で検出した。

表 4. クロマチン免疫沈降法に用いた primer

Genes	Sequences
<i>Dec1-RORE</i>	
Forward primer	CTGTTAGAAGGTCAAAGAGAC
Reverse primer	GTTCACTGAGCCCTTTACCC
<i>Bmal1-RORE B</i>	
Forward primer	GCGAATTGGTTTGGGTTGTC
Reverse primer	GGTAAACAGGCACCTCCGTC
<i>Pparγ2</i>	
Forward primer	GTTAGCAGTTTGGCACAGCTAGGT
Reverse primer	AAAATTGGAGCCCTCCCTGAGA
<i>LPL</i>	
Forward primer	CGGTAGGCAAACCTGGAGTCTAAAC
Reverse primer	GCAGAACAGTTACAAGGGGCAGAA
<i>Perilipin</i>	
Forward primer	ATCATAGTCCCCGGCTGTTAAGCA
Reverse primer	TGGGTGAAAGGTGACAAGGGAAAG
<i>Resistin</i>	
Forward primer	AGGGAATCATAGGCAGTGGGCTTT
Reverse primer	AAGAGCTTCCACCTAGCTTTGCAC

ゲルシフトアッセイ

マウス ROR α と REV-ERB α のタンパク質を TNT Coupled Reticulocyte Lysate System (Promega)とそれぞれの発現プラスミドを用いて in vitro で合成した。コントロール標品はベクターのみを用いて調製した。プローブとして用いた *Dec1-RORE*、*Dec1-RORE* (mutated)、*Bmal1-RORE-B*、*Bmal1-RORE-B* (mutated)の2本鎖 DNA は表5のオリゴヌクレオチドを用いて上に述べた方法でアニーリングして作製した。各プローブは DNA polymerase 1 Klenow fragment (タカラバイオ)と [³²P]-dCTP で標識した。³²P 標識プローブ(10,000 c.p.m)を、10 mM Tris/HCl (pH 8.0), 50 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0.5 mM dithiothreitol, 10%(v/v) glycerol, 0.1 μ g/ μ l poly (dI-dC)含有バッファー内で合成タンパク質とともに、室温で20分間インキュベートした。競合実験では、プローブを加える前に合成タンパク質とプローブの100倍過量の非標識 DNA を15分間インキュベートした。タンパク質-DNA複合体を6% (w/v) polyacrylamide/TBE (Tris/borate/EDTA)ゲル電気泳動で分離後、オートラジオグラ

フィーで検出した。

表 5. ゲルシフトアッセイに用いた RORE 応答配列のオリゴヌクレオチド

Upper strand オリゴヌクレオチドと lower strand オリゴヌクレオチドをアニールし、2 本鎖 DNA とし、³²P でラベルして実験 (図 4) に用いた。

Genes	Sequences
<i>Dec1</i>-RORE	
Upper strand	CTAGTGTAATTCAAGGTCAAAAT
Lower strand	TCGAATTTTGACCTTGAATTTACA
<i>Dec1</i>-RORE (mutated)	
Upper strand	CTAGTGTAATTCAAGAACAAAAT
Lower strand	TCGAATTTTGTTCTTGAATTTACA
<i>Bmal1</i>-RORE-B	
Upper strand	GGAAGGCAGAAAGTAGGTCAGGGA
Lower strand	TCCGTCCCTGACCTACTTTCTGCC
<i>Bmal1</i>-RORE-B (mutated)	
Upper strand	GGAAGGCAGAAAGTAGAACAGGGA
Lower strand	TCCGTCCCTGTTCTACTTTCTGCC

オイルレッドO染色

イソプロパノール 100 mL に、オイルレッドO (和光純薬) 0.3 g を加え、ポリエチレン容器中で 24 時間、70 °C にして保存液を調製した。保存液 : 水 = 6 : 4 に混合して激しく攪拌後 10 分間室温で静置し、上清をフィルター濾過 ($\phi 0.45 \mu\text{m}$) した。培地を吸引除去し、PBS で 2 回洗浄した。PBS を完全に吸引し、使用液を加えた後に水で 3 回洗浄を行った後に光学顕微鏡 (IX70, オリンパス, 東京) にて撮影した。

第3章 結果

第1節 核内受容体 ROR α による *Dec1* 発現調節機構

ROR α と REV-ERB α の *Dec1*, *Bmal1* プロモーターへの影響

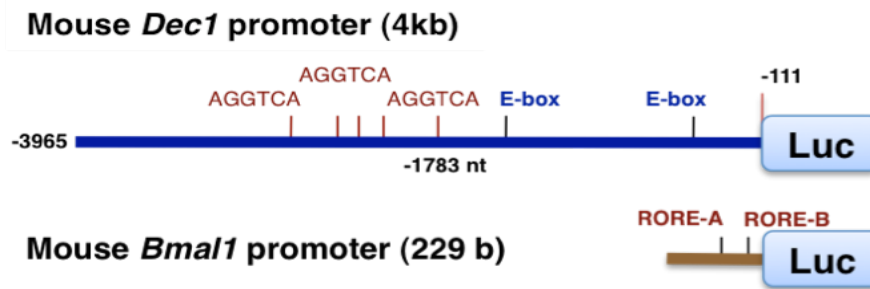
Dec1 遺伝子上流領域には、核内受容体の応答配列 RORE のエレメントの一部となる AGGTCA モチーフが複数存在したので (図 2A)、ROR α と REV-ERB α へ応答するか否かをレポーターアッセイで検討した。また、*Bmal1* (229b)プロモーターをポジティブコントロールとした。

Dec1 (4 kb)プロモーター活性と *Bmal1* (229 b)プロモーター活性の ROR α は強く促進した(図 2B)。しかし、REV-ERB α は *Bmal1* プロモーターを抑制したが、*Dec1* プロモーター活性には有意な抑制を示さなかった。次に、様々なサイズの *Dec1* プロモーター断片を組み込んだレポータープラスミド (図 2C) を検討したところ、複数の AGGTCA モチーフのうち最も下流のモチーフ(-1783 nt)のみを含む領域でも ROR α への強い応答性を示した(図 2D)。

Dec1 と *Bmal1* の RORE エレメントへの ROR α , REV-ERB α の影響

最下流のモチーフ(-1783 nt)とその周辺配列は ROR 応答配列のコンセンサス配列 (図 3A)と一致していたので、これを RORE 候補配列 (*Dec1*-RORE)とした(図 3A)。そして *Dec1*-RORE 含むレポータープラスミドを構築し、レポーターアッセイにて ROR α と REV-ERB α への応答性を検討した。その結果 *Dec1*-RORE 応答配列は ROR α によって促進されたが、REV-ERB α によっては抑制されなかった。また、*Dec1*-RORE (mutated)は、ROR α および REV-ERB α によってほとんど影響されなかった。一方、*Bmal1*-RORE-B は ROR α によって強く促進され、REV-ERB α によって有意に抑制された。

(A)



(B)

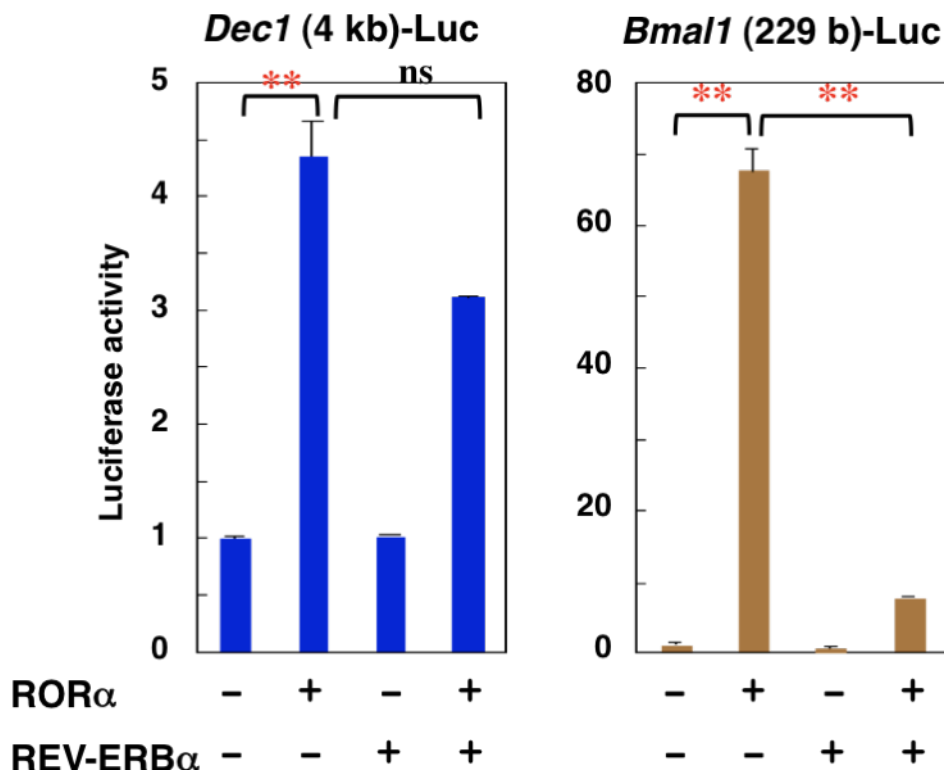
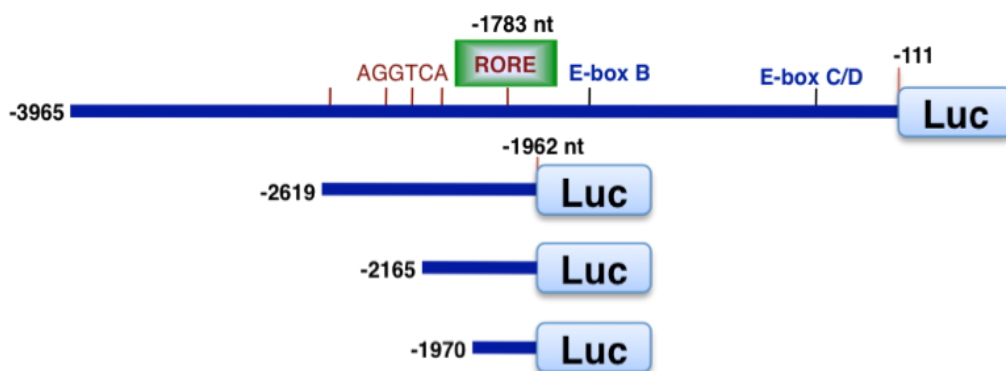


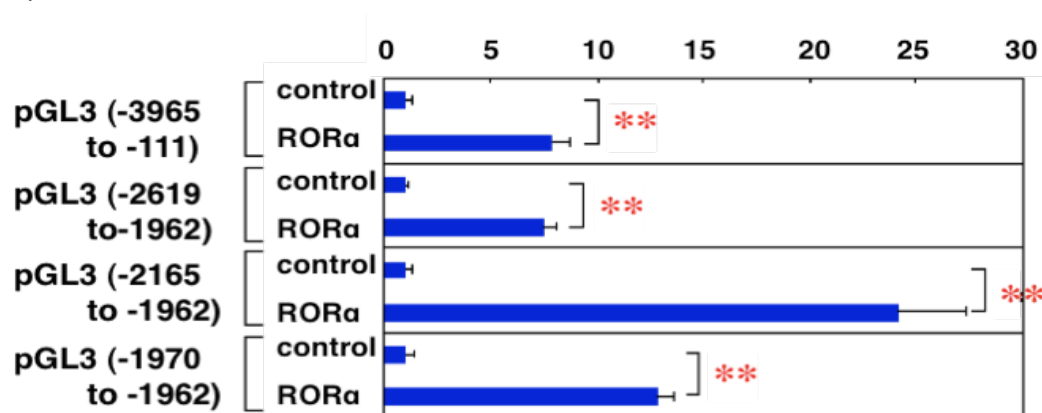
図 2. ROR α と REV-ERB α の *Dec1*, *Bmal1* プロモーターへの影響

マウス *Dec1* プロモーター (4 kb) と、同定されている 2 つの ROR 応答配列 A、B を含むマウス *Bmal1* プロモーター (229 b) を組み込んだルシフェラーゼレポーターを構築し (A)、ROR α 、REV-ERB α 発現プラスミドと組み合わせて Hepa1c1c7 へパトーマ細胞に FuGENE HD を用いて導入し、ルシフェラーゼレポーターアッセイを行った (B)。 *Dec1* プロモーター上流にある (C) に示す AGGTCA モチーフを含む DNA 断片をルシフェラーゼレポーターに組み込み、ROR α 発現プラスミドの添加効果を調べた (D)。 n=3; ** p <0.01; ns, not significant. 同様の実験を繰り返し行い、再現性を確認した。

(C)



(D)



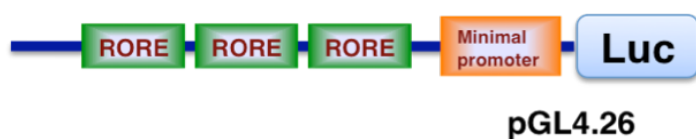
REV-ERB α の応答配列は RORE コンセンサス配列と少し異なっている(図 3A, (33, 34))。REV-ERB α 応答配列の 2 番目の塩基は A のみで、5 番目の塩基は T のみであるのに対し、ROR 応答配列では何れも A または T である。*Dec1*-RORE は 5 番目の塩基が A であり、REV-ERB α 応答配列と異なる。この一塩基の違いが REV-ERB α への応答に関係しているかもしれないので、*Dec1*-RORE の配列の 5 番目の塩基 A (ATTCAAGGTCA) を REV-ERB α 応答配列(ATTCTAGGTCA)と同じ塩基に変えた *Dec1*-RORE (mutated A \rightarrow T: ATTCTAGGTCA) を作製し、レポーターアッセイに用いた。その結果、*Bmal1*-RORE-B と同様に REV-ERB α に応答した (図 3B)。また、ROR α による促進も増大した。すなわち *Dec1*-RORE は ROR α への応答性はあるが、一塩基の違いにより REV-ERB α へは応答しない配列であることが判明した。

(A)

Dec1-RORE: GTAA**ATTCAAGGTC**AAAAT x3
Dec1-RORE (mutated): GTAA**ATTCAAGAAC**AAAAT x3
Dec1-RORE (mutated A→T): GTAA**ATTCTAGGTC**AAAAT x3
Bmal1-RORE-B: AGGCAG**AAAGTAGGTC**AGGG x3

ROR-responsive element: **TATNAAGGTC**
ATA TG

REV-ERB-responsive element: **AAANTAGGTC**
T T G



(B)

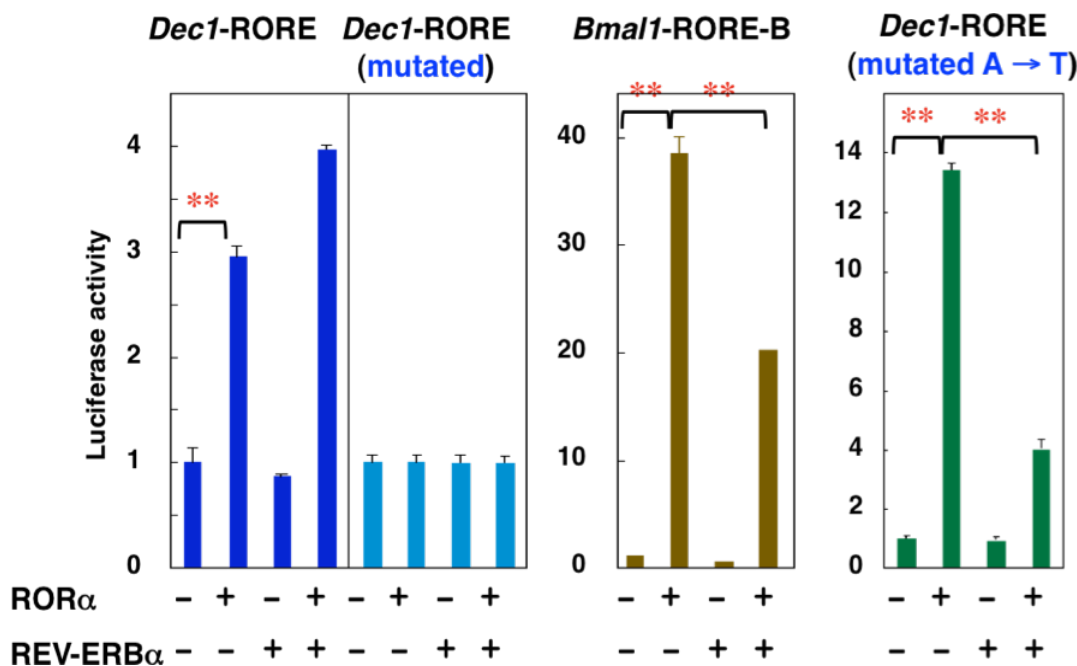


図 3. *Dec1* と *Bmal1* の RORE エレメントへの RORα, REV-ERBα の影響

Dec1-RORE, *Dec1*-RORE (mutated), *Dec1*-RORE (mutated A→T), *Bmal1*-RORE-B の 4 エレメント (赤字) を含む配列を 3 個繋いでレポータープラスミドを構築した(A)。青字は変異を入れた箇所を示す。ROR 応答配列と REV-ERB 応答配列を下に示す(33, 34)。各配列の下段は置換可能な塩基を示し、下線は ROR 応答配列と REV-ERB 応答配列で選択性のある塩基を示す。レポータープラスミドと発現プラスミド RORα, REV-ERBα を組み合わせて Hepa1c1c7 へパトーマ細胞に FuGENE HD を用いて導入し、ルシフェラーゼレポーターアッセイを行なった(B)。n=3; **p<0.01. 同様の実験を繰り返して行い、再現性を確認した。

ゲルシフトアッセイによる *Dec1*-RORE への ROR α の結合の確認

核内受容体の *Dec1* 遺伝子 RORE への結合を確認するためにゲルシフトアッセイを行った。*Dec1*-RORE には ROR α が結合したが REV-ERB α は結合しなかった。一方 *Bmal1*-RORE-B へは ROR α と REV-ERB α の両方が結合した。*Dec1*-RORE の ROR α の結合と *Bmal1*-RORE-B の ROR α の結合を比較すると、*Bmal1*-RORE-B のほうが強かった。また競合実験において、ラベルしていない RORE は *Dec1*-RORE と *Bmal1*-RORE-B に対して強く競合したが、Mutated RORE はほとんど競合しなかった。

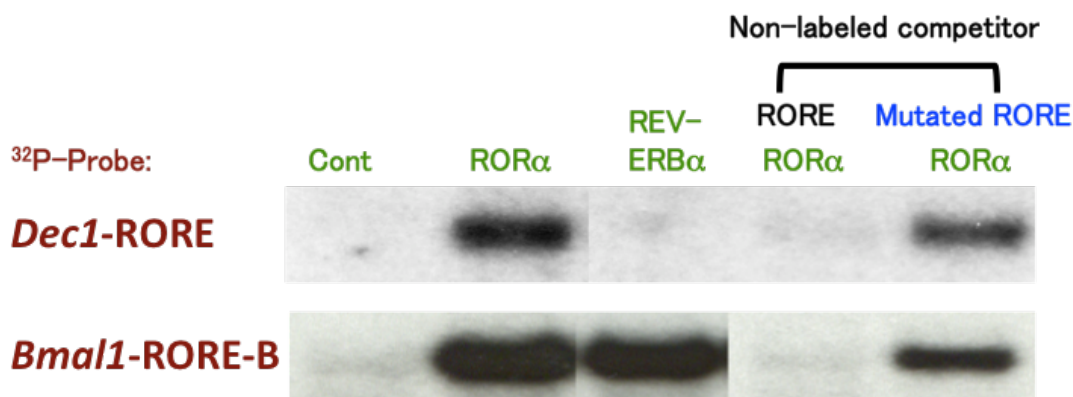


図 4. ゲルシフトアッセイ

ROR α と REV-ERB α タンパク質を *in vitro* Transcription and Translation System を用いて調製し、DEC1, BMAL1 の RORE プローブに対しゲルシフトアッセイを行なった。また、競合実験では、100 倍量の非放射性ラベルのオリゴヌクレオチドを用いた。

クロマチン免疫沈降法での *Dec1*-RORE への ROR α の結合の確認

核内染色体上の *Dec1* 遺伝子 RORE に ROR α が結合しているか否かを確認するために、脂肪分化後の 3T3-L1 細胞を用いてクロマチン免疫沈降法を行った。*Dec1* の RORE 領域では ROR α は結合したが (図 5 上)、REV-ERB α は結合しなかった (図 5 下)。一方 *Bmal1* の RORE 領域では ROR α と REV-ERB α の両方が結合した。

以上の結果より、ルシフェラーゼレポーターアッセイ、ゲルシフトアッセイ、クロ

マチン免疫沈降法の何れの実験結果も一致して、*Dec1*-ROREへROR α は結合するが、REV-ERB α は結合しないことが明らかとなった。

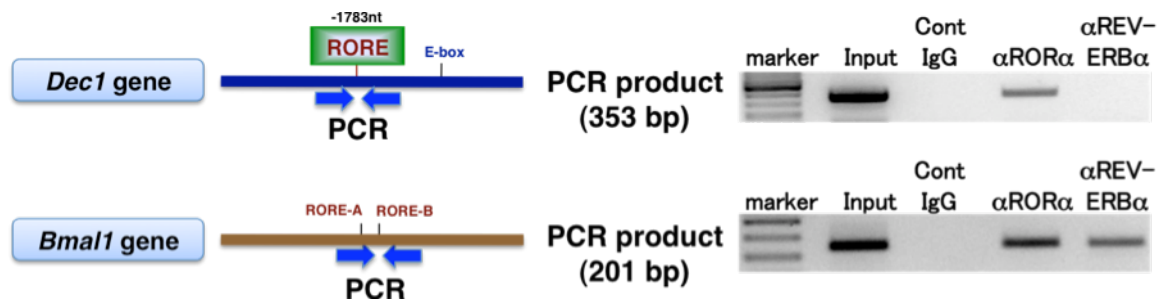


図 5. クロマチン免疫沈降法 (ChIP assay)

3T3-L1 細胞を脂肪分化誘導後 6 日目にサンプリングを行い、レポーターアッセイの結果から同定された *Dec1* の RORE 領域と *Bmal1* の RORE 領域に対し、ROR α 、REV-ERB α 抗体を用いて共沈してくる DNA 断片について表 4 に示すプライマーを用いて PCR を行なった。

Dec1 と *Bmal1* のリズム発現の位相

多くの報告にあるように *Bmal1* と *Dec1* のリズム発現のピークは図 6 に示すように互いに半日ずれている。*Bmal1* 発現は本研究でも確認されたように ROR α で促進され、REV-ERB α で抑制されるが、ZT10 に谷を持つ *Bmal1* のリズム発現は逆位相の REV-ERB α による抑制によって形成されていると考えられている(35)。しかし、*Dec1* 発現は REV-ERB α が抑制しないために、図 6 に示すよう ZT10-16 にピークを持つリズムを示すと考えられる。つまり *Dec1* 発現のリズム形成には *Per1*, *Dbp*, *Rev-erba*と同様に BMAL1-CLOCK-E-box 経路が主要であり(15)、リズム性の低い ROR α は *Dec1* 発現を位相に関係なく促進すると考えられた。このことは図 6 や図 10A の *Dec1* 発現リズムの谷に当たる ZT4, ZT22 での *Dec1* の発現レベルが比較的高いこととも一致する。*Bmal1* とリズム発現の位相が同じ遺伝子として他に図 6 に示した *Clock*, *Npas2*などがある。これらの遺伝子の RORE は *Bmal1*-RORE と同じく ROR α , REV-ERB α の両方へ結合性を持つ配列であった。

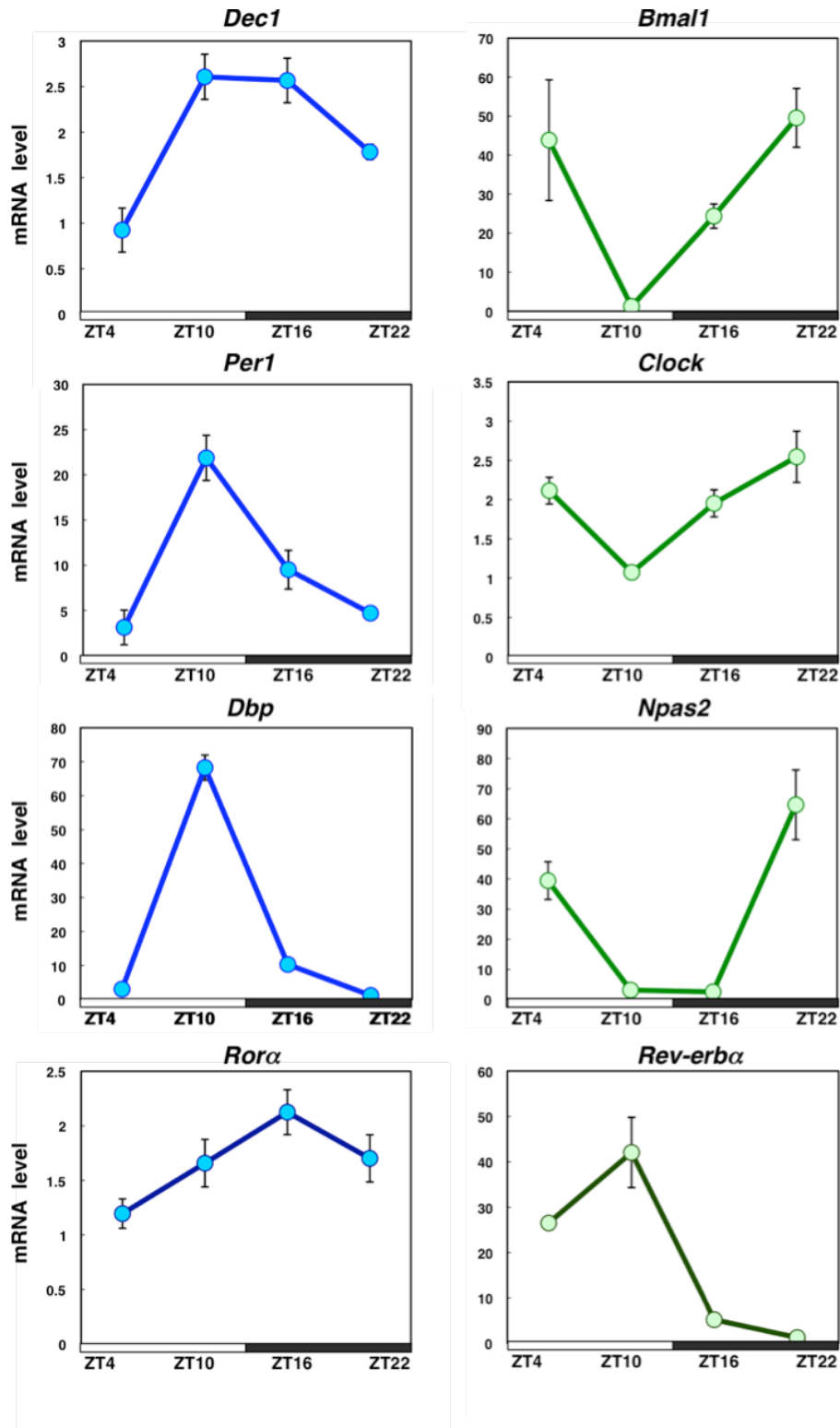


図 6. マウス肝臓での各時計遺伝子の発現様式

マウス肝臓から 6 時間毎 (ZT4, 10, 16, 22) に調製した RNA について遺伝子の発現レベルをリアルタイム PCR 法にて解析した。ZT0 は点灯時刻、ZT12 は消灯時刻とする zeitgeber time (ZT) で表現した。E-box が優位に働く遺伝子は ZT10 付近にピークを示し、RORE が働く遺伝子は ZT22 にピーク、ZT10 が谷となるパターンを示す。

第 2 節 3T3-L1 細胞の脂肪分化過程での *Dec1* と関連遺伝子の発現パターン

3T3-L1 細胞における脂肪分化調節因子の発現

3T3-L1 細胞を脂肪分化誘導培地で処理し、誘導前 2 日から誘導後 8 日まで経時的に RNA 回収をした。また脂肪分化はオイルレッド O 染色にて確認した(図 7)。脂肪分化関連転写因子である *c-Fos*, *c-Jun*, *Klf4* の発現レベルが誘導直後に上昇し、ついで *Cebp β* などが上昇し、さらに *Cebp α* や *Ppar γ* 発現レベルが上昇した (図 8A) (36)。また、*Ppar γ* と同じ時期に時計遺伝子である *Rora*の発現が上昇した (図 8B) (37)。

一方、時計遺伝子 *Bmal1*, *Clock*, *Per1*, *Per2*は初期に発現が上昇した。*Dec1*も初期 (0-2 日) にリズム性を持った小さな変動を示した (図 8B)。*Per1*, *Per2*, *Dec1* のリズム性変動は BMAL1/CLOCK-の影響と考えられた。しかし他の時計遺伝子と比べて、*Dec1*は分化後半に *Rora*発現にやや遅れて分化後半に発現上昇した。これらの発現様式から、分化後期における *Dec1* の発現上昇は BMAL1 と CLOCK による E-box 経路よりも、ROR α による制御が優位であると思われた。

脂肪細胞に特徴的であり、中性脂肪代謝に重要な *Lipoprotein lipase (LpL)*, *Adipose triglyceride lipase (Atgl)*, *Diacylglycerol O-acyltransferase 2 (Dgat2)*、油滴のコートタンパクである *Adipophilin*などの遺伝子はいずれも脂肪分化の中期から後期に向かって発現が顕著に上昇した (図 8C)。*Fabp4* や図 10C の中性脂肪代謝関連遺伝子 *Mgl1*, *Perilipin*,などを含む 12 種の遺伝子発現も脂肪分化伴って上昇する発現パターンを示した (データ示さず)。*Adiponectin*, *Resistin*などの成熟脂肪細胞が分泌するアディポサイトカインもほぼ同じようなパターンを示した (図 8C)。また、分化後期に上昇する遺伝子である、*Cebp α* や *Ppar γ* および図 8C に示す遺伝子群は分化 8 日目に低下した。

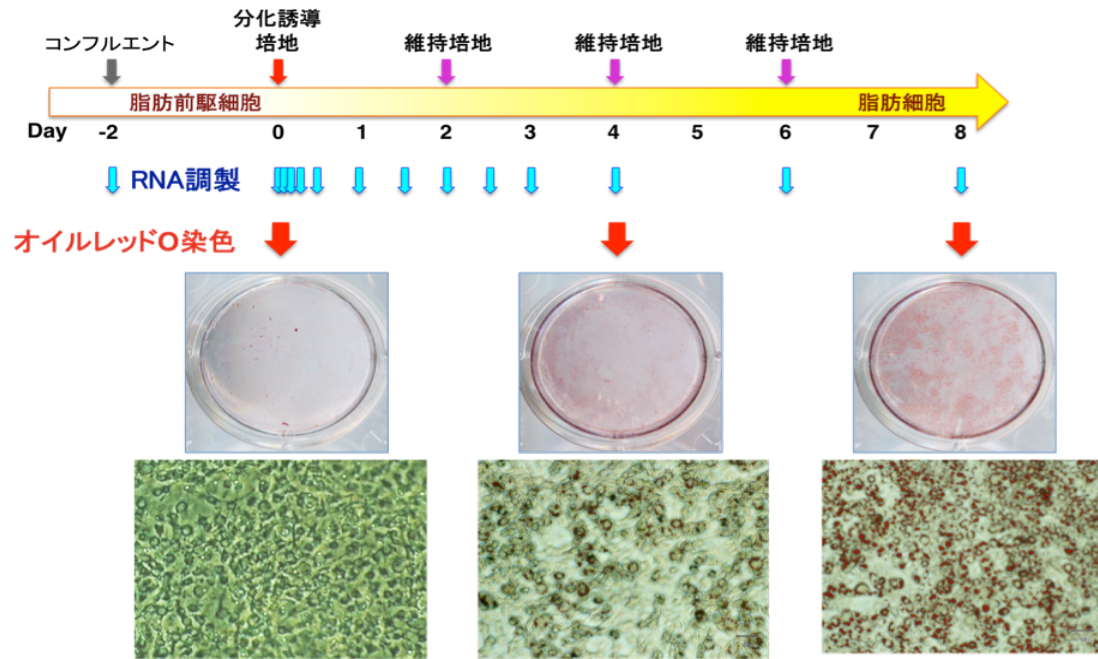


図 7. 3T3-L1 細胞の脂肪分化における経時的変化

3T3-L1 細胞を培養し、インスリン、イソブチルメチルキサンチン、デキサメタゾンを含む培地で分化誘導をし、2日後ごとに分化維持培地に交換した。誘導前2日から誘導後8日まで経時的に RNA を回収し、リアルタイム PCR 解析に用いた。脂肪分化をオイルレッド O 染色により確認した。

(A)

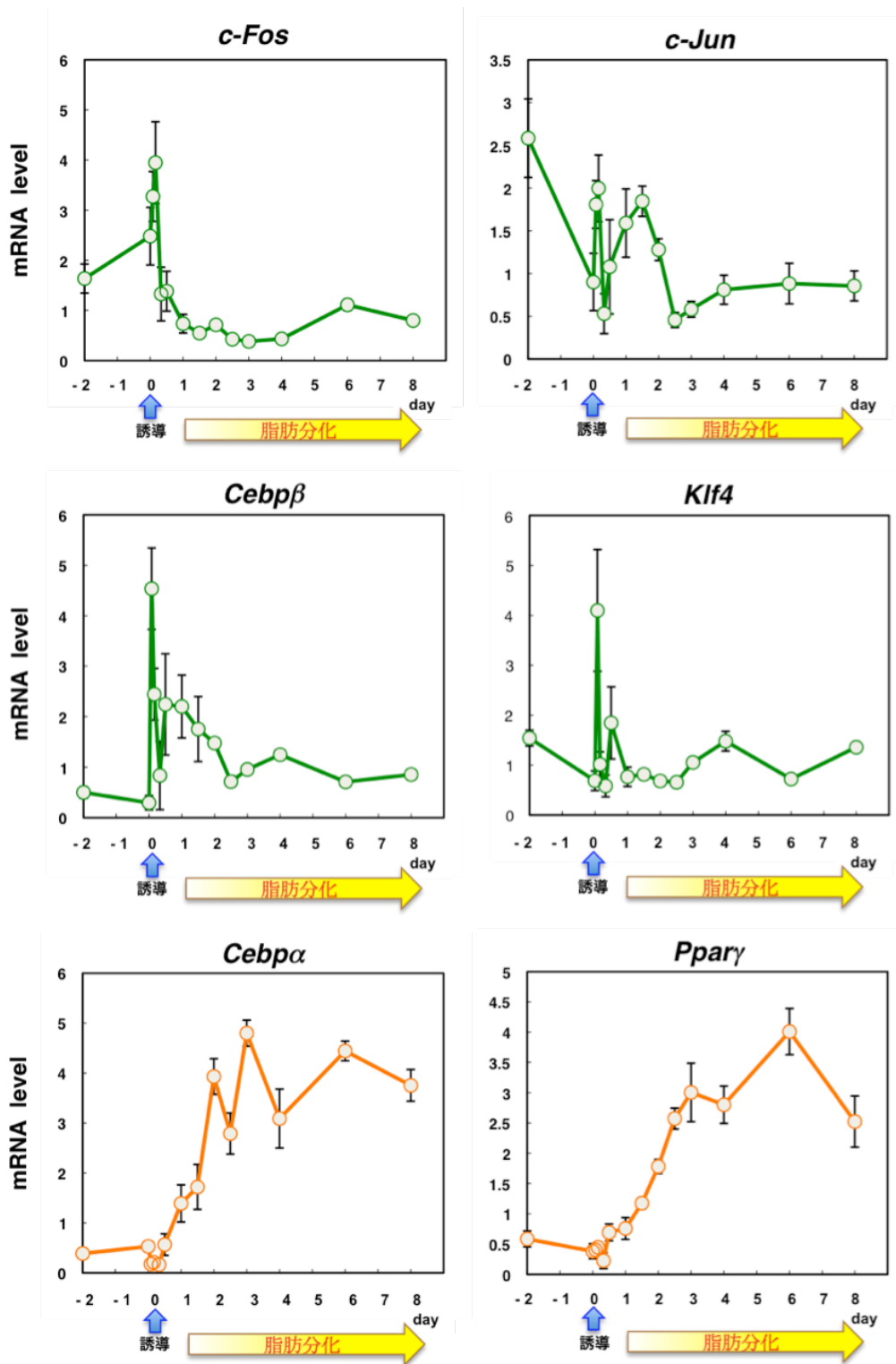
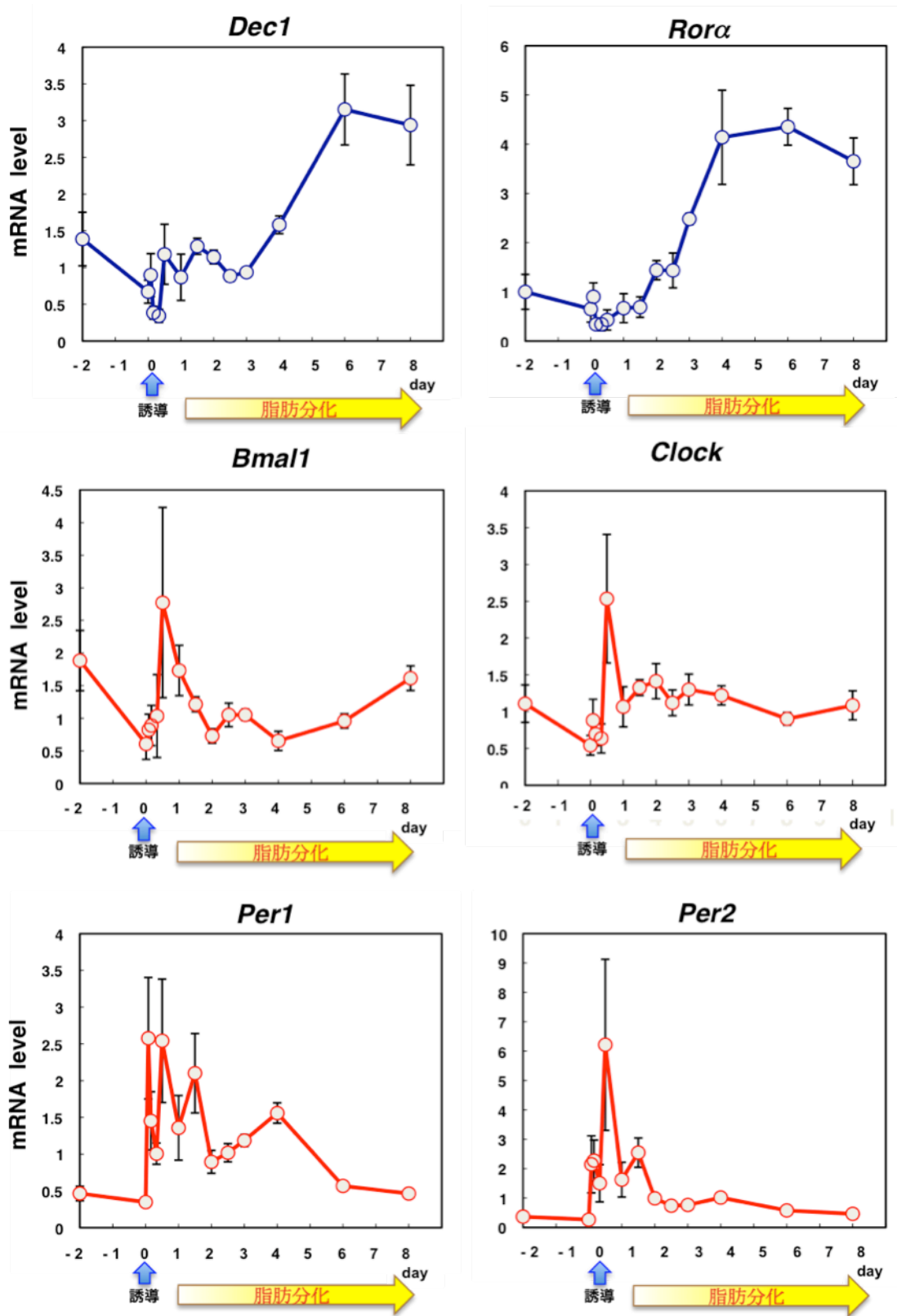


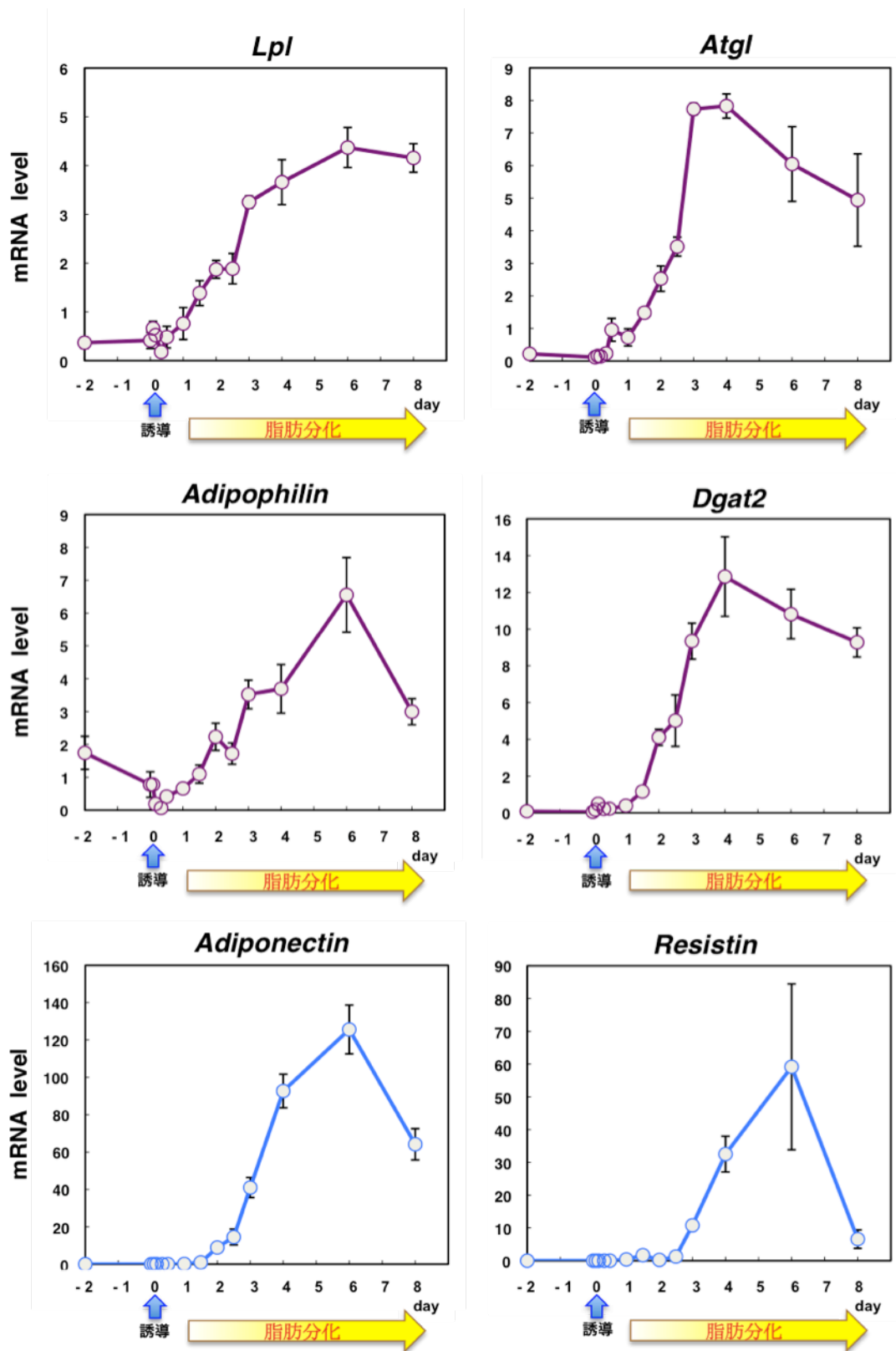
図 8. 3T3-L1 細胞の分化誘導時の遺伝子発現の経時的変化

(A) 脂肪分化調節因子, (B), 時計遺伝子 (C) 脂肪代謝酵素・アディポサイトカイン。3T3-L1 細胞脂肪分化過程の各遺伝子発現を経時的に定量的リアルタイム PCR 法により解析した。

(B)



(C)



脂肪分化前後での ROR α の効果の検討

本研究の第 1 節で、ROR α による *Dec1* 発現の上昇が示されたが、3T3-L1 細胞においては *Rora* の発現にやや遅れて *Dec1* が上昇した。すなわち、本細胞でも ROR α による *Dec1* 発現促進が分化後期に起こることを示唆している。第 1 節でのレポーターアッセイはヘパトーマ細胞系を用いたので、3T3-L1 細胞の脂肪分化前後での *Dec1* プロモーター活性への ROR α の作用を検討した。

3T3-L1 細胞の脂肪分化誘導前 0 日と、分化誘導後 6 日目の細胞を用いて、レポーターアッセイを行った結果、*Dec1* レポーターと *Bmal1* レポーターに対して、脂肪分化誘導後には ROR α の促進が見られたが、分化誘導前には全く見られなかった (図 9)。このことは脂肪分化前後での ROR α の *Dec1* 発現促進に正または負に作用する他の制御因子が存在することを示唆する。

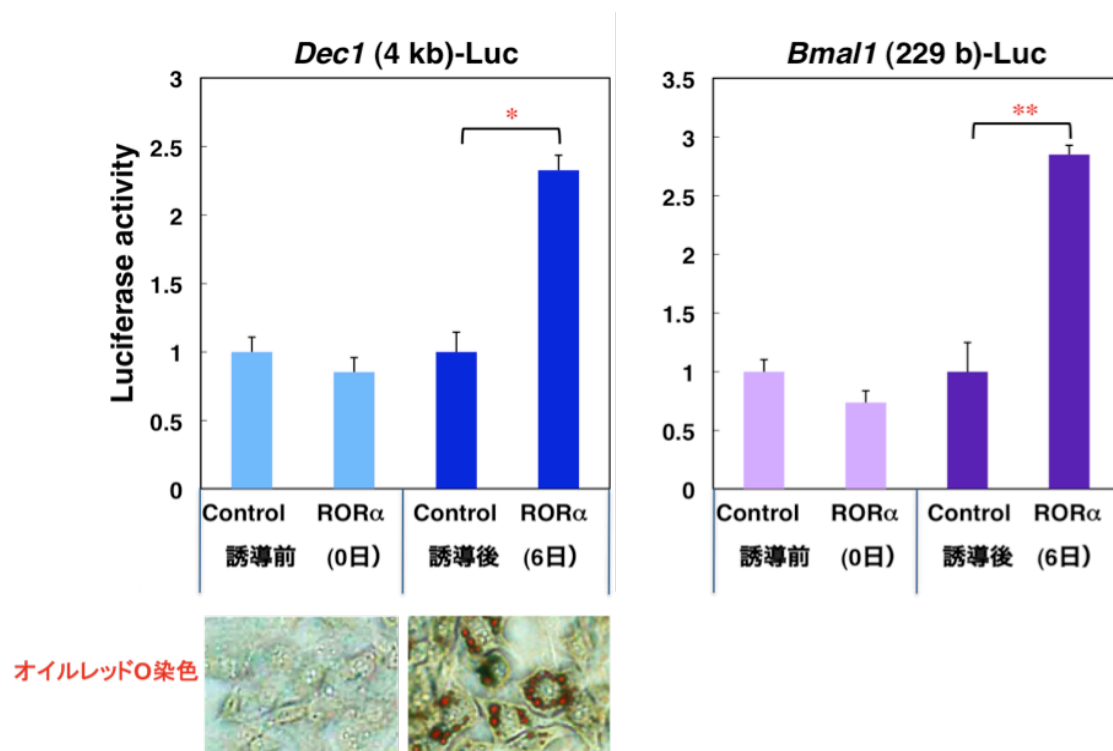


図 9. 3T3-L1 細胞の脂肪分化前後でのレポーターアッセイ

分化誘導前 0 日と、分化誘導後 6 日目の 3T3-L1 細胞に、*Dec1* (4 kb)-Luc レポーターと *Bmal1* (229 b)-Luc レポーターと発現プラスミド ROR α を組み合わせて、Lipofectamine™ LTX を用いて導入し、ルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。n=3; * p <0.05; ** p <0.01. 同様の実験を繰り返し行い、再現性を確認した。

第 3 節 *Dec1* ノックアウトマウスを用いた脂肪分化・脂質代謝調節における DEC1 の標的遺伝子

Dec1 ノックアウトマウスの白色脂肪組織での時計遺伝子の発現

まず、*Dec1* ノックアウトマウスが、時計遺伝子に及ぼす影響を検討した(図 10A)。野生型マウスでは 12 種の時計遺伝子に振幅は様々であるが概日リズム発現が見られた(表 6A)。しかし、*Dec1* ノックアウトマウスでは *Dec2* 発現が、ZT10 と ZT16 で低下を示した。また、*Rora*, *Dbp*, *Bmal1*, *Per2*, *Npas2* など 5 種の遺伝子に、*Dec1* ノックアウトの影響が観察された。

Dec1 ノックアウトマウスの白色脂肪組織での脂肪関連遺伝子の発現

DEC1 は脂肪分化抑制因子として知られているが、その分子機構や標的遺伝子についてはいまだ明らかではない。3T3-L1 細胞の脂肪分化過程で *Dec1* 発現が最大となった後で、脂肪関連遺伝子の発現が減少した。それらの遺伝子の発現に及ぼす DEC1 の影響を、*Dec1* ノックアウトマウスを用いて検討した。

野生型マウスの脂肪組織では *c-Fos* と *Srebp1a* 以外の 16 遺伝子がリズム発現を示した(表 6B)。特に *c-Jun*, *Cebpa*, *Cebpb*, *Cebpδ*, *Klf4*, *Klf15*, *Pparγ* など 7 遺伝子は ZT10 にピークを持つ概日リズム発現を示した(図 10)。一方、*Dec1* ノックアウトマウスではこれらの遺伝子は夜間 (ZT16, ZT22) で発現が上昇し、リズム性が減少するか位相が移動した(図 10B, 表 6B)。それ以外にも *Tc10-like* は、*Dec1* ノックアウトマウスで夜間に発現上昇する時刻があり、*Klf5*, *Cebpγ*, *Rgs2*, *Srebp2* などは逆に発現が減少し、*Ppara*, *Srebp1c* は時刻により発現が上昇または減少した(表 6B)。

中性脂肪代謝関連遺伝子については、脂肪酸取り込み (*Lpl*, *Cd36*, *Acs11*)、中性脂肪再合成 (*Gpat3*, *Agpat2*, *Lipin1*, *Dgat2*)、油滴のコートタンパク (*Plin*, *Adfp*, *Cidec*, *S3-12*)、脂肪酸放出 (*Atgl*, *Lipe*, *Mgl1*)に関わる 14 遺伝子全てに(図 10C, 図

11)、野生型マウスで ZT10 にピークを持つ緩やかな概日リズムが観察された。しかし、*Dec1* ノックアウトマウスでは夜間 (ZT16, ZT22) で発現が上昇したため、リズム性が無くなるか位相が移動した (図 10C, 表 6C)。

その他の脂質代謝酵素 *Abca1*, *Fabp4*, *Fasn*, *Ugcg* については、野生型マウスで概日リズムを示し、*Dec1* ノックアウトマウスでは夜間に上昇した (図 10D, 表 6D)。それ以外の代謝酵素遺伝子の中には、*Dec1* ノックアウトマウスにおいて一部の時刻で発現上昇が見られたり、*Acat2* のように有意に発現が低下した (図 10D, 表 6D)。

アディポサイトカインについても、*Adiponectin*, *Leptin*, *Resistin* は ZT10 にピークを持つ概日リズム発現を示し、と *Dec1* ノックアウトでは夜間で発現が増加した (図 10E, 表 6E)。

以上をまとめると、野生型マウスでは脂質代謝関連遺伝子や時計遺伝子群に関して調べた遺伝子総数 66 の内、38 遺伝子が同じ位相の概日リズムを持ち、*Dec1* ノックアウトマウスにより夜間に発現レベルが上昇するパターンを示した。これらの遺伝子は *Dec1* の標的遺伝子として抑制的に制御され、リズム発現を示すことが示唆された。

(A)

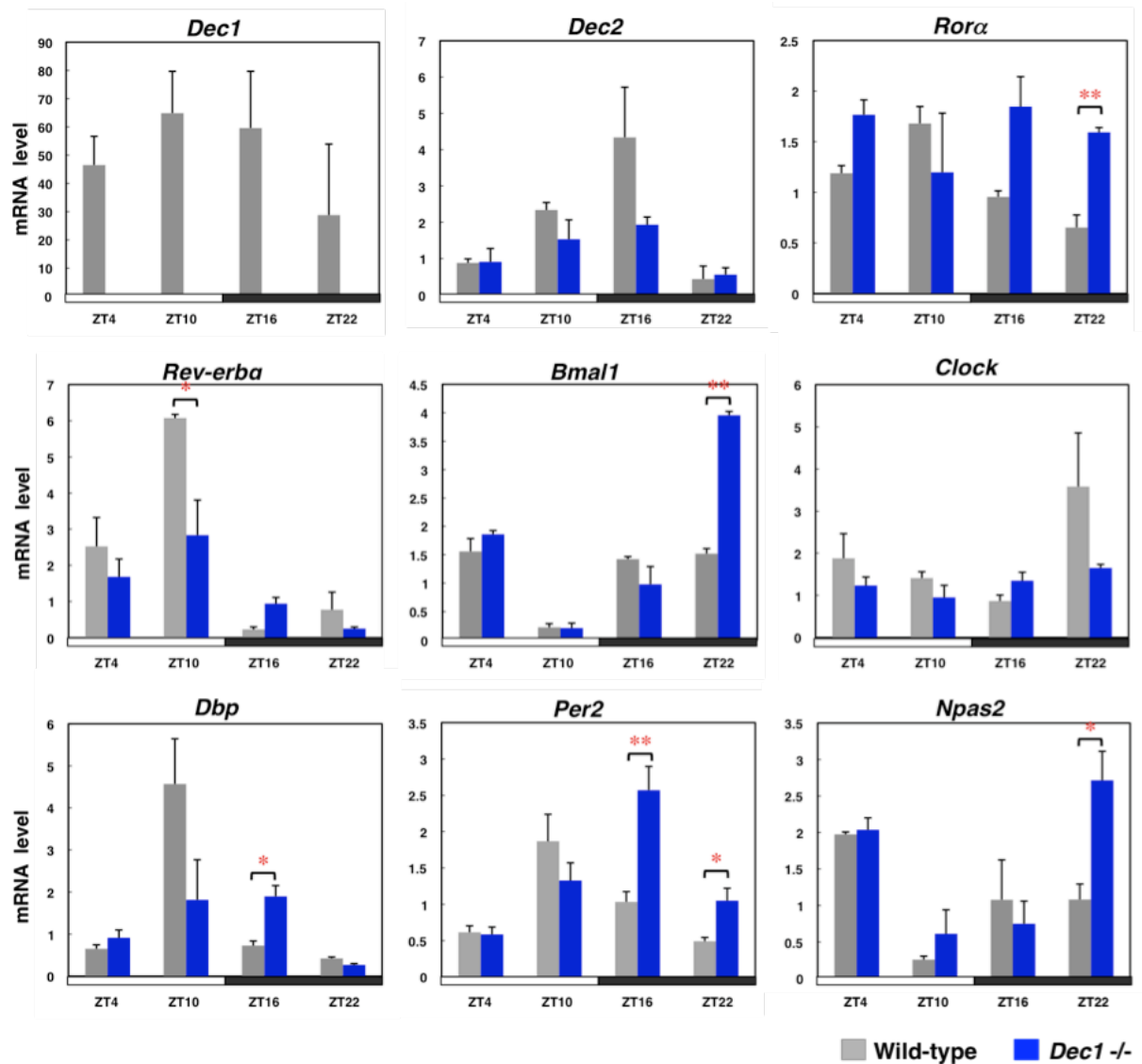
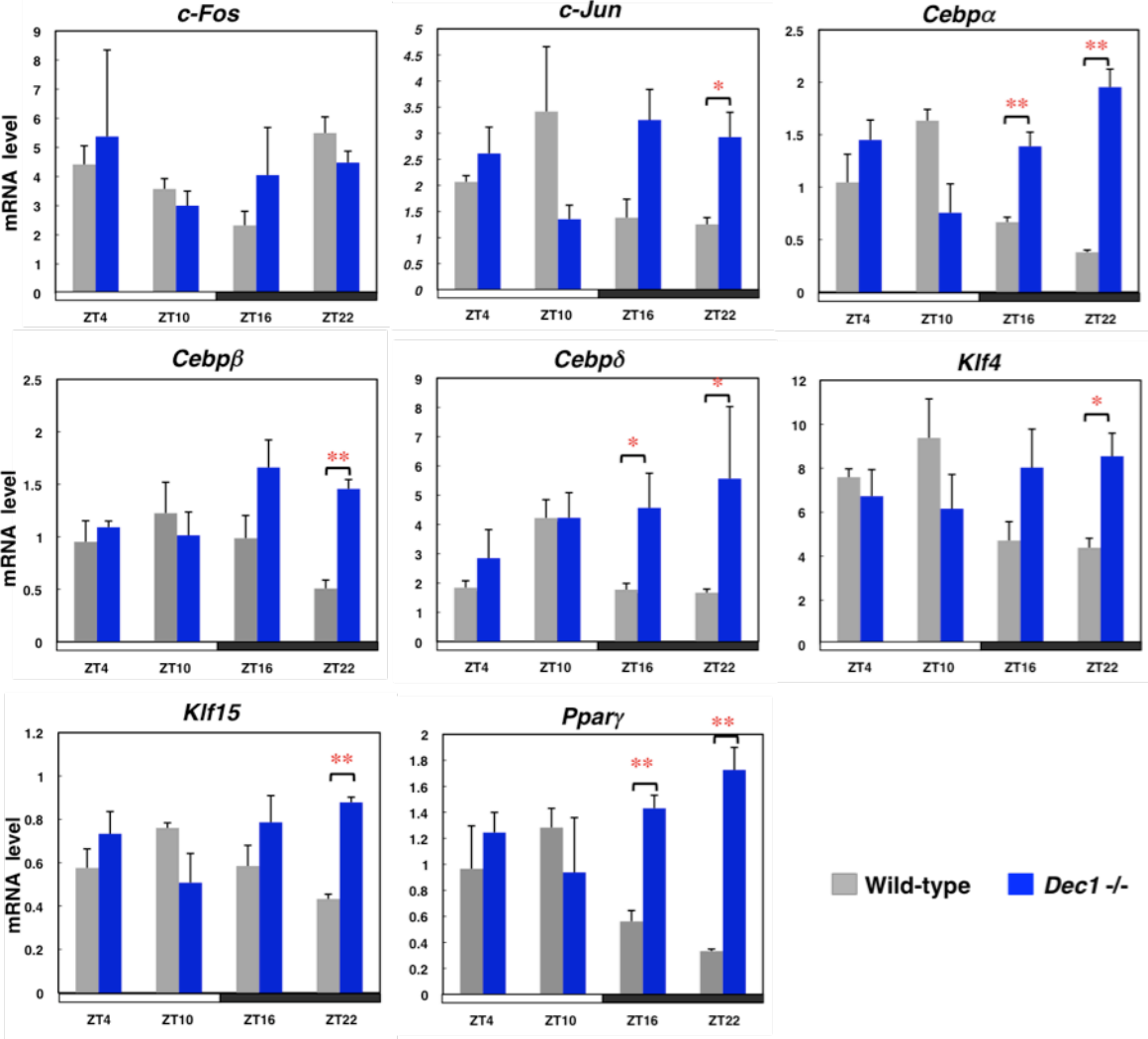


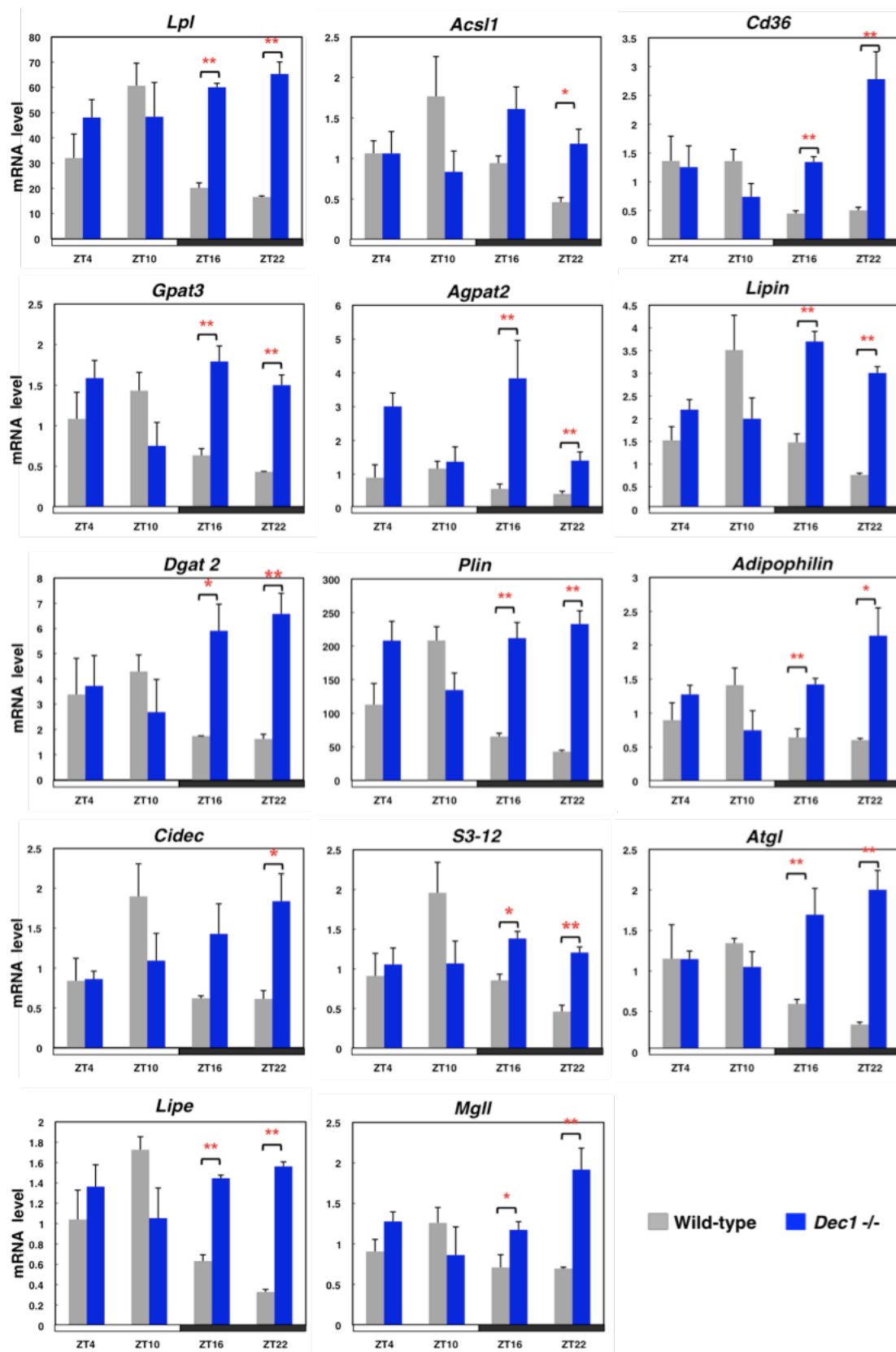
図 10. 野生型および、*Dec1* ノックアウトマウスの白色脂肪細胞における遺伝子発現

雄性の野生型マウスと *Dec1* ノックアウトマウスを12h:12hの明暗条件下で2~3週間飼育し6時間ごとに屠殺した後に、腹腔内鼠径部白色脂肪のRNAサンプルを調製した。ZT0は点灯時刻、ZT12は消灯時刻とするzeitgeber time (ZT)で表現した。時計遺伝子(A)、脂肪分化調節因子(B)、中性脂肪代謝関連遺伝子(C)、その他の脂質代謝酵素遺伝子(D)、アディポサイトカイン(E)について定量的リアルタイムPCR法にて解析した。n=3; *p<0.05; **p<0.01.

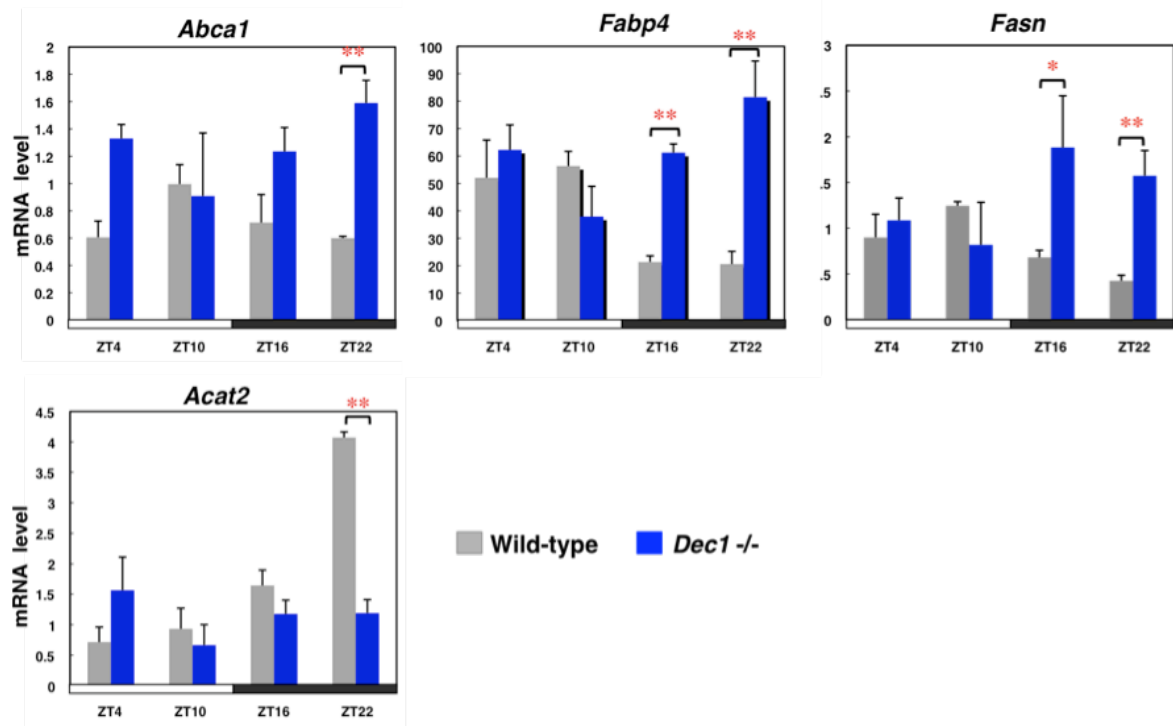
(B)



(C)



(D)



(E)

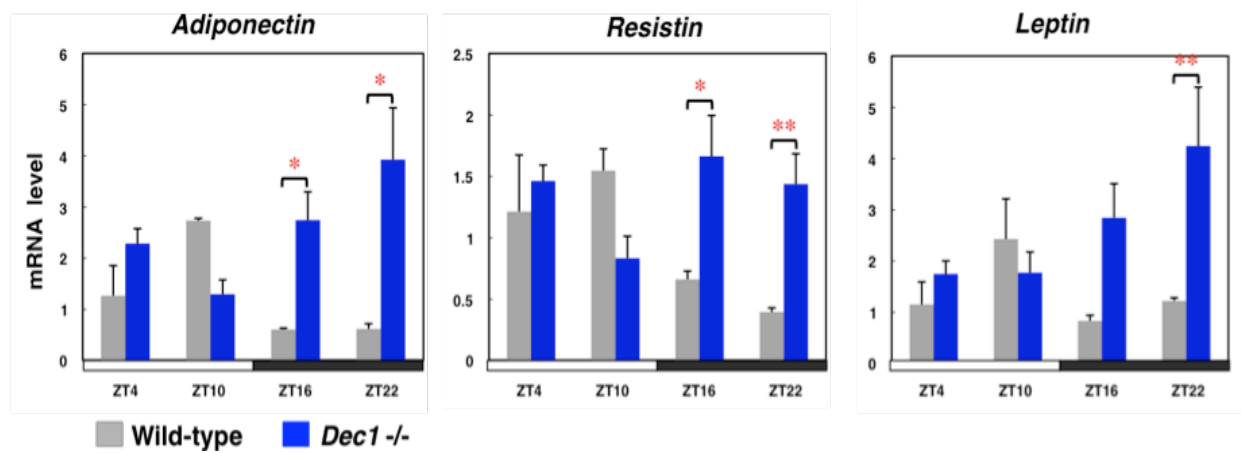


表 6. 野生型および、*Dec1* ノックアウトマウスの白色脂肪細胞での各遺伝子の発現パターンのまとめ

野生型 (WT)マウスでの日内変動の有無、*Dec1*^{-/-}での発現の変動を表示した。

(A) 時計遺伝子の発現

遺伝子	時計遺伝子	Rhythm in WT	Up by Dec1 KO	Down by Dec1 KO	図
<i>Dec1</i>	basic helix-loop-helix family, member e40	Rhythmic	—	—	図10A
<i>Dec2</i>	basic helix-loop-helix family, member e41	Rhythmic	—	Down at ZT10& ZT16	図10A
<i>Rora</i>	RAR-related orphan receptor A		Up at ZT16 & ZT22		図10A
<i>Rev-erbα</i>	nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1	Rhythmic		Down at ZT10	図10A
<i>Rev-erbβ</i>	nuclear receptor subfamily 1, group D, member 2	Rhythmic			
<i>Bmal1</i>	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like	Rhythmic	Up at ZT22		図10A
<i>Clock</i>	Circadian Locomotor Output Cycles Kaput,	Rhythmic		Down at ZT10	図10A
<i>Npas2</i>	neuronal PAS domain protein 2	Rhythmic	Up at ZT22		
<i>Dbp</i>	D site of albumin promoter (albumin D-box) binding protein	Rhythmic	Up at ZT16	Down at ZT10	図10A
<i>E4bp4</i>	nuclear factor, interleukin 3 regulated (NFIL3)	Rhythmic			
<i>Per2</i>	period homolog 2	Rhythmic	Up at ZT16	Down at ZT10	図10A
<i>Cry1</i>	cryptochrome 1 (photolyase-like)	Rhythmic			

(B) 脂肪代謝調節因子の発現

遺伝子	脂肪代謝調節因子	Rhythm in WT	Up by Dec1 KO	Down by Dec1 KO	図
<i>Cebpa</i>	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), α	Rhythmic	Up at ZT16 & ZT22		図10B
<i>Cebpb</i>	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), β	Rhythmic	Up at ZT16 & ZT22		図10B
<i>Cebpd</i>	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), δ	Rhythmic	Up at ZT16 & ZT22		図10B
<i>c-Jun</i>	jun oncogene	Rhythmic	Up at ZT16 & ZT22		図10B
<i>Klf4</i>	Kruppel-like factor 4	Rhythmic	Up at ZT16 & ZT22		図10B
<i>Klf15</i>	Kruppel-like factor 15	Rhythmic	Up at ZT16 & ZT22		図10B
<i>Pparγ</i>	peroxisome proliferative activated receptor, γ	Rhythmic	Up at ZT16 & ZT22		図10B
<i>Pgc-1α</i>	peroxisome proliferative activated receptor, gamma, coactivator 1 α	Rhythmic	Up at ZT16		
<i>Tc10-like</i>	ras homolog gene family, member J (Rhoj)	Rhythmic	Up by Dec1 KO		
<i>Pparaα</i>	peroxisome proliferative activated receptor, α	Rhythmic	Up at ZT16	Down at ZT22	
<i>Srebp1c</i>	sterol regulatory element binding transcription factor 1c	Rhythmic	Up by Dec1 KO	Down by Dec1 KO	
<i>Cebpγ</i>	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), γ	Rhythmic		Down at ZT10	
<i>Klf5</i>	Kruppel-like factor 5	Rhythmic		Down at ZT22	
<i>Rgs2</i>	regulator of G-protein signaling 2	Rhythmic		Down at ZT22	
<i>Srebp2</i>	sterol regulatory element binding transcription factor 2	Rhythmic		Down by Dec1 KO	
<i>Rxrα</i>	retinoid X receptor, α	Rhythmic			
<i>c-Fos</i>	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog				図10B
<i>Srebp1a</i>	sterol regulatory element binding transcription factor 1a				

(C) 中性脂肪代謝関連遺伝子の発現

遺伝子	中性脂肪代謝関連遺伝子	Rhythm in WT	Up by Dec1 KO	図
	脂肪酸取り込み			
<i>Lpl</i>	lipoprotein lipase	Rhythmic	Up at ZT16 & 22	図10C
<i>Cd36</i>	CD36 antigen, thrombospondin receptor	Rhythmic	Up at ZT16 & 22	図10C
<i>Acs1</i>	acyl-CoA synthetase long-chain family member 1	Rhythmic	Up at ZT16 & 22	図10C
	中性脂肪再合成			
<i>Gpat3</i>	acyl-coa:glycerol 3- phosphate acyltransferase 3	Rhythmic	Up at ZT16 & 22	図10C
<i>Agpat2</i>	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 2	Rhythmic	Up at ZT16 & 22	図10C
<i>Lpin1</i>	lipin 1 phosphatidate phosphatase activity	Rhythmic	Up at ZT16 & 22	図10C
<i>Dgat2</i>	diacylglycerol O-acyltransferase 2	Rhythmic	Up at ZT16 & 22	図10C
	油滴のコートタンパク			
<i>Plin</i>	perilipin 1, lipid droplet-associated protein	Rhythmic	Up at ZT16 & 22	図10C
<i>Adfp</i>	adipophilin	Rhythmic	Up at ZT16 & 22	図10C
<i>Cidec</i>	cell death-inducing DFFA-like effector c	Rhythmic	Up at ZT16 & 22	図10C
<i>S3-12</i>	Perilipin 4	Rhythmic	Up at ZT16 & 22	図10C
	脂肪酸放出			
<i>Atgl</i>	adipose triglyceride lipase, <i>Pnpla2</i>	Rhythmic	Up at ZT16 & 22	図10C
<i>Lipe</i>	hormone sensitive lipase, HSL	Rhythmic	Up at ZT16 & 22	図10C
<i>Mgl1</i>	monoglyceride lipase	Rhythmic	Up at ZT16 & 22	図10C

(D) その他の脂質代謝酵素遺伝子の発現

遺伝子	その他の脂質代謝酵素遺伝子	Rhythm in WT	Up by Dec1 KO	Down by Dec1 KO	図
<i>Abca1</i>	ATP-binding cassette, sub-family A, member 1	Rhythmic	Up at ZT4, 16 & 22		図10D
<i>Fabp4</i>	fatty acid binding protein 4, adipocyte	Rhythmic	Up at ZT16 & 22		図10D
<i>Fasn</i>	fatty acid synthase	Rhythmic	Up at ZT16 & 22		図10D
<i>Ugcg</i>	UDP-glucose ceramide glucosyltransferase	Rhythmic	Up at ZT16 & 22		図10D
<i>Chkα</i>	choline kinase α	Rhythmic	Up at ZT4	Down at ZT16 & 22	
<i>Scd1</i>	stearoyl-Coenzyme A desaturase 1	Rhythmic	Up at ZT10		
<i>Elov13</i>	elongation of very long chain fatty acids	Rhythmic		Down at ZT4	
<i>Acat2</i>	acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 2	Rhythmic		Down at ZT22	図10D
<i>Hmgcr</i>	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase	Rhythmic		Down at ZT16 & 22	
<i>Ldlr</i>	low density lipoprotein receptor	Rhythmic			
<i>Ptdss2</i>	phosphatidylserine synthase 2		Up at ZT4		
<i>Hmgcs1</i>	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1		Up at ZT22		
<i>Acot2</i>	acyl-CoA thioesterase 2				
<i>Scd2</i>	stearoyl-Coenzyme A desaturase 2				
<i>Tmem23</i>	Sqms1: sphingomyelin synthase 1				

(E) アディポサイトカインの発現

遺伝子	アディポサイトカイン	Rhythm in WT	Up by Dec1 KO	Down by Dec1 KO	図
<i>Adipoq</i>	adiponectin, C1Q and collagen domain containing	Rhythmic	Up at night		図10E
<i>IL-6</i>	interleukin 6	Rhythmic		Down at ZT4 & ZT10	
<i>Leptin</i>	energy reserve metabolic process	Rhythmic	Up at night		図10E
<i>Rbp4</i>	retinol binding protein 4, plasma	Rhythmic		Down at ZT4 & ZT10	
<i>Retn</i>	resistin, response to insulin stimulus	Rhythmic	Up at night		図10E
<i>TNFα</i>	tumor necrosis factor, α			Down by Dec1 KO	
<i>Nampt</i>	nicotinamide phosphoribosyltransferase (Visfatin)				

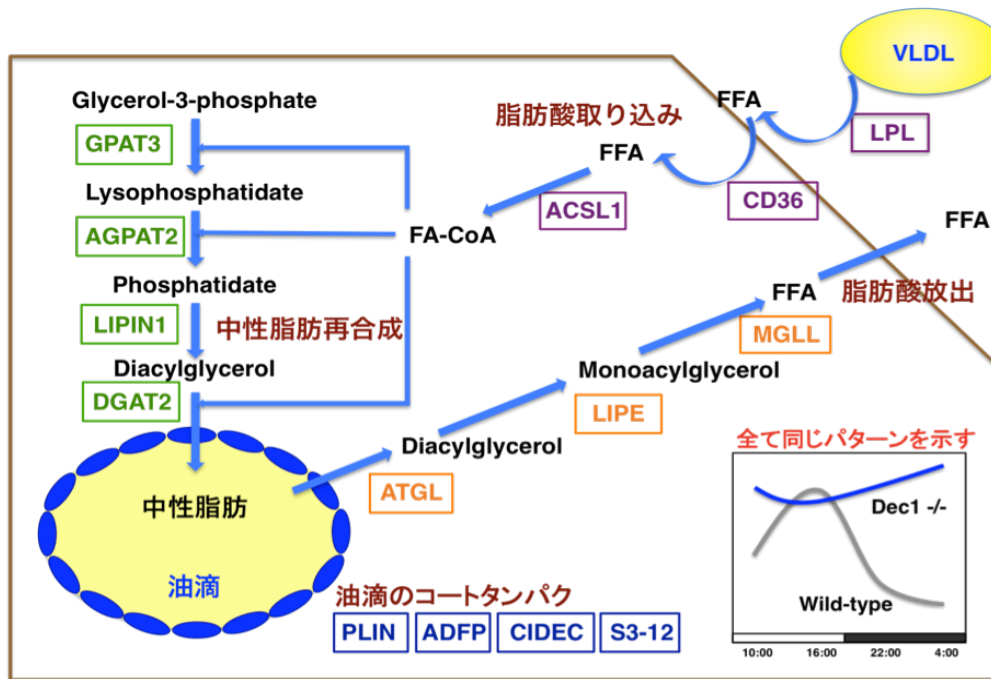


表 11. 脂肪細胞における中性脂肪代謝経路

Very low density lipoprotein (VLDL)などから遊離脂肪酸 (FFA, free fatty acid)を取り込み、中性脂肪を再合成し油滴として蓄積するとともに、必要に応じて遊離脂肪酸を放出する。調べた 14 遺伝子全ての mRNA 発現レベルが野生型でリズムを持ち、*Dec1* ノックアウトで夜間に上昇し、リズム性を減少させた。

第 4 節 DEC1 の標的遺伝子への作用機構

DEC1 の PPRE レポーターへの影響

Dec1 ノックアウトマウスの脂肪組織における脂質関連遺伝子の解析から、多くの遺伝子が *Dec1* により発現抑制されていることが明らかとなった。これらの遺伝子は PPAR γ のターゲットであると示唆されている(38)。

このことを検証するために、表 3 に示す PPRE コンセンサス配列 (AGGACAAAGGTCA) (39)を含む領域を 3 個繋いだ Consensus PPRE-Luc と *Lpl* の PPRE (TGCCCTTTCCCT) (40)を含む領域を 3 個繋いだ DNA を組み込んだ *Lpl*-PPRE-Luc ルシフェラーゼレポーター作製し、DEC1, PPAR γ , および PPAR γ とヘテロ二量体を形成する RXR α の発現プラスミドとともに NIH 3T3細胞に導入して、

ルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。PPAR γ と RXR α は Consensus PPRE-Luc と *Lpl*-PPRE-Luc のプロモーター活性を促進した (図 12)。一方 DEC1 は、両プロモーターに対する PPAR γ -RXR α ヘテロ二量体による促進効果を抑制した。DEC1 単独ではほとんど影響しなかった。同様の結果が、脂肪分化した 3T3-L1 細胞系でも得られた(データ示さず)。これらの結果より、PPAR γ -RXR α ヘテロ二量体の PPRE への作用を抑制することが明らかになった。

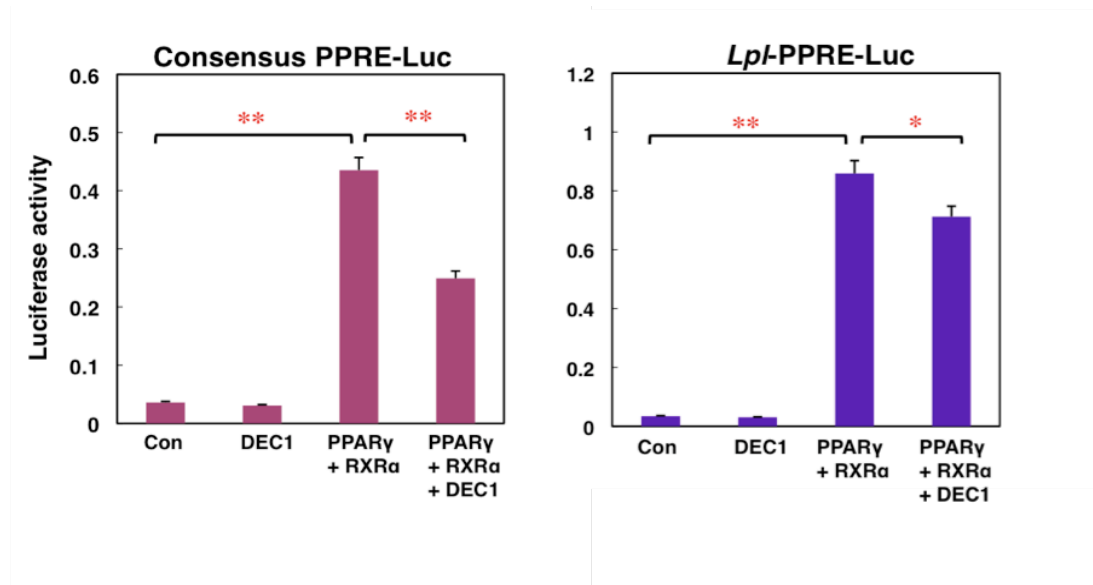


図 12. PPRE のコンセンサス配列に対するレポーターアッセイ

同定されているコンセンサス PPRE と *Lpl* の同定されている PPRE のエレメントをそれぞれ 3 個繋いだものに (表 3)、PGL-4 Minimal promoter に組み込んだルシフェラーゼレポーターを構築し、各発現プラスミドを添加して、それぞれを脂肪分化後の NIH3T3 細胞に FuGENE HD Transfection Reagent を用いて導入し、ルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。RXR α と PPAR γ のそれぞれのリガンドとして 9-cis retinoic acid ($5 \times 10^{-7}M$), troglitazone ($5 \times 10^{-6}M$)を培養液に加えた。n=3; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. 同様の実験を繰り返し行い、再現性を確認した。

脂質代謝関連遺伝子の PPRE への DEC1 の結合

Dec1 ノックアウトマウスで発現レベルが上昇した脂質代謝関連遺伝子の中で *Lpl*, *Perilipin*, *Resistin*などは PPAR γ の標的として PPRE サイトが同定されている(31, 40, 41)。また、マウス、ヒトの *Ppar γ* 遺伝子にはエクソンの使い分けで生じるアイソフォーム PPAR γ 1と PPAR γ 2が知られており (註 1)、それぞれのプロモーターも異

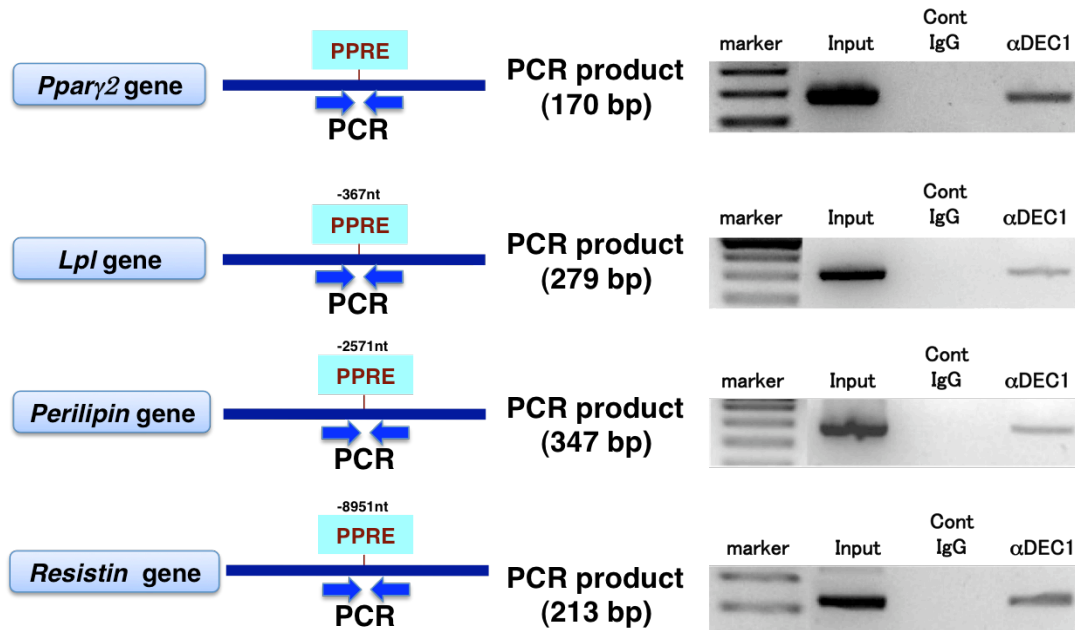


図 13. クロマチン免疫沈降法 (ChIP assay)

3T3-L1 細胞を脂肪分化誘導後 6 日目にサンプリングを行い、*Pparγ2*, *Lpl*, *Perilipin*, *Resistin* の PPARE 領域に対し、DEC1 抗体を用いて共沈してくる DNA 断片について PCR 解析を行なった。

なる(42)。後者の *Pparγ2* 遺伝子は PPAR γ 自身の標的となり、そのおおよその結合サイトが解析されている(41, 43, 44)。そこでこれらの情報に基づいて4つの遺伝子 *Pparγ2*, *Lpl*, *Perilipin*, *Resistin* に対する DEC1 の結合をクロマチン免疫沈降法にて検討した。これらの PPARE を含むプロモーター領域には E-box は存在しない。脂肪分化誘導後 6 日目の 3T3-L1 細胞から DEC1 抗体を用いて共沈してくる DNA 断片について、各遺伝子の PPARE 領域を増幅するプライマーを設計し PCR 解析を行なった。その結果、*Pparγ2*, *Lpl*, *Perilipin*, *Resistin* のいずれの遺伝子においても、DEC1 が結合している結果を得た (図 13)。

註 1 : 本論文では PPAR γ 1 と PPAR γ 2 を区別している場合のみアイソフォーム番号を付した。

第 4 章 考察

転写因子 *Dec1* 遺伝子発現調節機構に関しては始めに述べたように多くの研究がある(15, 20-29)。*Dec1* プロモーターには核内受容体応答配列のモチーフである AGGTCA が複数存在しており、その一つが核内受容体 LXR α :RXR α ヘテロダイマーへの応答配列として同定されている(29)。本研究でのレポーターアッセイ、ゲルシフトアッセイ、クロマチン免疫沈降によって *Dec1* のプロモーター領域に新たな核内受容体応答配列として ROR 応答配列 (RORE) が翻訳開始点から 1.8 kb 上流付近に同定された。その ROR 応答配列にオーファン受容体 ROR α が作用し、その ROR 応答配列にオーファン受容体 ROR α が作用し、促進的に転写調節することが判明した。また、REV-ERB α は *Dec1* 発現に影響せず、ROR α と REV-ERB α がともに強く作用する *Bmal1* 発現とは異なっていた。この違いは *Dec1*-RORE 配列の 5 番目の塩基が A であることに起因した。ROR 応答配列と REV-ERB 応答配列はほぼ共通であるが(図 3)、ROR α は 5 番目の塩基が A であっても T であっても同様に作用すると報告されている(33)。一方、REV-ERB α は 5 番目の塩基が T でない RORE を持つ標的遺伝子は知られていない(34)。*Dec1*-RORE の ATTCAAGGTCA の A の部分を T に変えると REV-ERB α への応答性が出現した。一方、*Bmal1* は両因子が作用する応答配列を 2 つ持つ遺伝子である。同様に ROR α と REV-ERB α の両方に応答する RORE 配列を持つリズム性遺伝子は他に *Npas2*, *E4bp4*, *Clock* などがあるが何れの遺伝子も 5 番目の塩基が T である応答配列をそれぞれ 4, 3, 1 箇所持ち(45)、*Bmal1* とよく似た位相のリズム発現を示す(図 6) (35)。*Bmal1* 遺伝子のリズムは抑制因子である REV-ERB α の強いリズムによって形成されると報告されている(17)。*Bmal1* と逆位相の *Dec1* 遺伝子は ROR α のみが作用する応答配列を持つことが明らかとなり

REV-ERB α の影響をほとんど受けていなかった。*Dec1*のリズム発現には既に提唱されているように BMAL:CLOCK-E-Box 経路が主として機能しており (14)、リズム性の低い ROR α は位相に影響することなく全体の発現レベルを上昇させることが示唆された。

脂肪細胞分化の初期過程において、いくつかの因子が機能していることが明らかになっている(36, 46)。本研究では、3T3-L1 細胞の脂肪分化過程で、時計遺伝子や脂肪代謝関連遺伝子の発現変動を解析した。*Bmal1*, *Clock* は初期に発現が上昇し、それらによって制御されている *Per1*, *Per2* も初期に発現が上昇した。しかし、同じく E-box を有する *Dec1* は分化後期に発現が上昇した。後期での *Dec1* 発現の上昇はそれにやや先行して発現が上昇する ROR α によるものと推察された。また、脂肪分化初期に、*Dec1* 発現に小さな律動がみられ、これが BMAL1, CLOCK による影響を反映していると考えられるが、脂肪分化後期の ROR α による *Dec1* の発現上昇と比較すると低レベルであった。このことから、脂肪分化過程においては、BMAL1: CLOCK よりも ROR α の方が *Dec1* 発現に対して優位に制御すると考えられる。また、ROR α による *Dec1* への促進効果は、脂肪分化後により顕著となったことから、ROR α の作用や *Dec1* 遺伝子制御に関与する共役因子が分化によって変化すると推測される。

DNA マクロアレイ解析により、マウスの白色脂肪細胞で、650 個の遺伝子に概日リズムがあることが報告されており(47)、その中には *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Cry1* などの時計遺伝子や、転写因子である *Ppara*, *Cebpa*, *Cebpb*, 中性脂質代謝に関連する *Lpl*, *Alas1*, *Dgat2*, やアディポサイトカインである *Lipin* など本研究で解析した遺伝子が含まれていた。それらの遺伝子に加えて、本研究では、野生型マウス脂肪組織で、脂肪分化に重要な多くの制御因子、脂質代謝酵素、アディポサイトカイン遺伝子など調べた 65 の関連遺伝子の内、55 遺伝子が概日リズムを示した。脂肪組織に発現するリ

リズム性脂質代謝関連遺伝子が DEC1 の標的遺伝子であるかどうかを、*Dec1* ノックアウトマウスで検討した結果、調べた遺伝子の内、38 遺伝子が野生型で ZT10 にピークを持つ概日リズムを示し、*Dec1* ノックアウトマウスでは夜間に発現が上昇した。特に、中性脂肪代謝に関与する 14 遺伝子全てが概日リズム発現を示し、DEC1 の抑制的制御下にあることが判明した。これらのリズムは、食事によるエネルギー源の供給や生体のエネルギー要求性を機能的に同調させるために必要であると考えられる。抗動脈硬化作用とインスリン感受性を増強する *Adiponectin* や、視床下部の満腹中枢に作用して食欲を抑制するとともに、交感神経を活性化させエネルギー代謝を亢進させることで肥満を抑制する *Leptin*、逆にインシュリン抵抗性を増強する *Resistin* などのアディポサイトカインは生体の代謝に重要であり、メタボリックシンドロームを理解する上でも重要である。これらの制御にも DEC1 が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。また DEC1 と DEC2 は互いに補償しあうと考えられるが、脂肪組織では *Dec1* ノックアウトによって *Dec2* 発現が低下した。したがって、*Dec1* ノックアウトマウスの脂肪組織で顕著な表現型が出現したと推察される。

DEC1 の標的遺伝子は、脂肪分化調節因子の中にも多く見られた。特に、PPAR γ は脂肪分化の最も重要なマスター遺伝子である(38)。解析した中性脂肪代謝に関与する 14 遺伝子全て(38)、アディポサイトカインである *Adiponectin* (48)および *Resistin* (41)、さらに *Ppar γ 2*自身を含む遺伝子群は PPAR γ の標的であり(43)、同様に DEC1 の標的でもあることが本研究で判明した。*Dagt2* (未発表データ)、*Mgl1* (45)以外に、これらの遺伝子のプロモーター領域に機能的な E-box は見つからず、これらの遺伝子に対する DEC1 の作用点は E-box 以外のところにあると考えられた。本研究で *Ppar γ* , *Lpl*, *Perilipin*, *Resistin* などの遺伝子の E-box を持たない PPRE 領域に対して、DEC1 が結合することが示された。その DEC1 の作用機構は以下に述べるように、

RXR α を介して DEC1 が PPAR γ の標的遺伝子の PPRE に間接的に結合し、抑制効果を及ぼすものであると考えられた。以上述べたように、肥満に関わる中性脂肪代謝関連遺伝子や糖尿病を含むメタボリックシンドロームに深く関与するアディポサイトカイン(*Adiponectin, Leptin, Resistin*)などが DEC1 の標的遺伝子群に含まれており、DEC1 はそれらの標的遺伝子発現に対しリズム発現制御を行うと思われた。これらの結果は DEC1 による PPAR γ -RXR α 作用を介した抑制機構に関連した、メタボリックシンドローム発症機構の解明や新しい治療薬開発に繋がるものと思われる。

Cho らの最近の報告によると、DEC1 は核内受容体 VDR, LXR α , FXR α などとヘテロ二量体をつくる RXR α と相互作用し、抑制因子として機能する(49)。本研究でも、コンセンサス PPRE と *Lpl*-PPRE に対するレポーターアッセイで、DEC1 は PPAR γ -RXR α が促進した活性を抑制した。また、クロマチン免疫沈降法により *Ppar γ 2*, *Lpl*, *Resistin*, *Perilipin* プロモーターの PPRE 領域に DEC1 が結合していることが判明した。二つのアイソフォーム PPAR γ 1 と PPAR γ 2 の内、後者は脂肪組織に多く発現しているとされるので脂肪では PPAR γ によって促進的に制御されている *Ppar γ 2* 遺伝子発現が優勢であると考えられる。DEC1 の PPAR γ 標的遺伝子への作用機構を図 14 に示す。*Ppar γ 2*は PPAR 応答配列 (PPRE) を介して自身の遺伝子産物 PPAR γ タンパクによって促進的に制御される。PPAR γ の標的遺伝子も同様に PPAR γ による制御を受ける。RXR α ヘテロ二量体を形成する VDR, LXR α , FXR α などと同様に DEC1 が PPAR γ -RXR α ヘテロ二量体の抑制因子として作用するならば、PPAR γ 標的遺伝子も DEC1 による抑制受けると考えられる。それに加えて自己制御機構を持つ *Ppar γ 2* 遺伝子自身の転写抑制の結果、PPAR γ 2タンパク質発現量が低下し、さらに標的遺伝子への抑制が強まると考えられる。

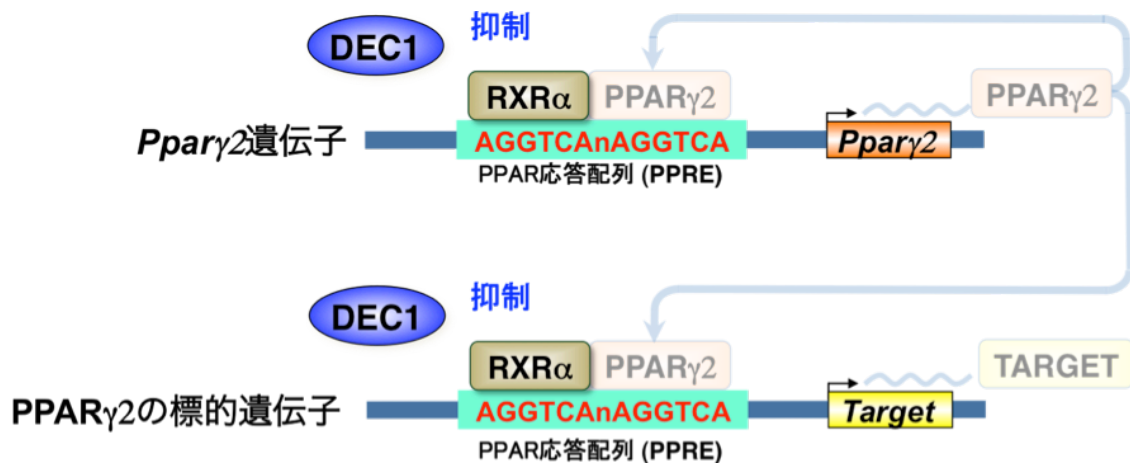


図 14. DEC1 による PPAR γ 2 の標的遺伝子発現抑制の二重の機構

Pparγ2 遺伝子は PPAR 応答配列 PPRE を持っており、自身の遺伝子産物 PPAR γ 2 タンパクによって正に制御されている。PPAR γ 2 の標的遺伝子も同様の制御を受ける。DEC1 は核内受容体のパートナーである RXR α に結合しその標的遺伝子発現を抑制する。DEC1 が RXR α への結合することによる PPAR γ 2 の標的遺伝子に対する抑制に加えて、同じ機構による *Pparγ2* 遺伝子自身の転写抑制の結果、PPAR γ 2 タンパク質発現量が低下し、さらに標的遺伝子の発現量低下が強まると考えられる。

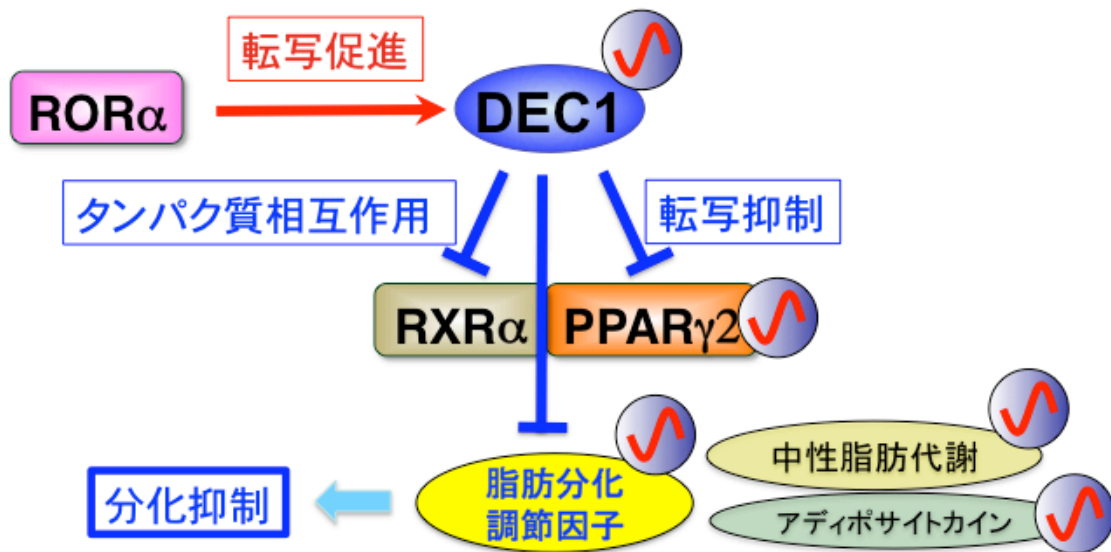


図 15. DEC1 による PPAR γ 2:RXR α を介した新しい脂肪分化抑制機構

ROR α は *Dec1* 発現を促進する。さらに DEC1 は図 14 の機構によって PPAR γ 2:RXR α 作用を抑制することによって、PPAR γ 2 とその標的遺伝子群の発現を抑制する。その結果、脂肪代謝抑制や制脂肪分化抑制にいたる。

本研究で、ROR α が *Dec1* 遺伝子発現を促進することが明らかとなった。さらに、DEC1 は PPAR γ -RXR α 作用を抑制することによって、脂肪組織で PPAR γ とその多くの標的遺伝子群の発現を抑制することが示された。また 3T3-L1 細胞の分化最終期で多くの遺伝子の発現が低下したことからも DEC1 による抑制が関係していると推察される。一方、以前より骨分化が DEC1 により促進されると知られているが(18)、PPAR γ が骨分化を抑制するという報告(50)と考え合わせれば、図 14 の機構で骨分化の DEC1 による促進効果が説明できる。骨分化における PPAR γ の標的がどのように抑制されるかの解析が今後の課題である。

第 5 章 総括

Dec1 遺伝子の核内受容体 ROR α を介する新たな制御機構と、脂肪分化、脂質代謝における DEC1 の役割の解明を目的とし一連の研究から、以下の結果を得た。

1. 核内受容体 ROR α は RORE を介して *Dec1* の転写を促進することが明らかとなった。
2. *Dec1* の RORE は REV-ERB α に対する応答性を持たないため *Dec1* 発現のリズム位相は *Bmal1* とは異なることが示された。
3. DEC1 は多くの脂肪分化調節因子、中性脂肪代謝関連遺伝子およびアディポサイトカインなど広範な標的遺伝子群のリズム発現制御因子であることが判明した。
4. DEC1 は PPAR γ のパートナーである RXR α に結合して PPAR γ 自身を含む標的遺伝子の転写抑制をする一方で、PPAR γ の発現を低下させたことによっても、その標的である、脂肪分化、脂肪代謝に関与する広範な遺伝子群の概日リズム発現制御をしている重要な制御因子であることが明らかになった。

これらの結果から、核内受容体 ROR α は *Dec1* の発現レベルを上げ、上方制御された DEC1 が脂肪分化を抑制するという *Dec1* 遺伝子の発現と役割に関する新しい機構が明らかとなり、また多くの脂肪関連遺伝子の位相が同調した概日リズム発現制御に DEC1 が関与しているという重要な知見が得られた。DEC1 の標的遺伝子群には、肥満に関わる中性脂肪代謝関連遺伝子や糖尿病を含むメタボリックシンドロームに深

く関与するアディポサイトカイン(*Adiponectin, Leptin, Resistin*)が含まれていた。一方、DEC1 の作用機構として PPAR γ -RXR α 作用を抑制することによってそれらの標的遺伝子発現に対し、リズム性を持った発現制御を行うことが示された。これらの知見は今後、DEC1 による PPAR γ -RXR α 作用を介した抑制機構に関連した、メタボリックシンドローム発症機構の解明や新しい治療薬開発に繋がるものと期待できる。

第 6 章 参考文献

1. Konopka RJ, Benzer S. Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68(9): 2112-2116, 1971.
2. Bargiello TA, Jackson FR, Young MW. Restoration of circadian behavioural rhythms by gene transfer in *Drosophila*. *Nature* 312(5996): 752-754, 1984.
3. Zehring WA, Wheeler DA, Reddy P, Konopka RJ, Kyriacou CP, Rosbash M, Hall JC. P-element transformation with period locus DNA restores rhythmicity to mutant, arrhythmic *Drosophila melanogaster*. *Cell* 39(2 Pt 1): 369-376, 1984.
4. Sun ZS, Albrecht U, Zhuchenko O, Bailey J, Eichele G, Lee CC. RIGUI, a putative mammalian ortholog of the *Drosophila* period gene. *Cell* 90(6): 1003-1011, 1997.
5. Tei H, Okamura H, Shigeyoshi Y, Fukuhara C, Ozawa R, Hirose M, Sakaki Y. Circadian oscillation of a mammalian homologue of the *Drosophila* period gene. *Nature* 389(6650): 512-516, 1997.
6. Antoch MP, Song EJ, Chang AM, Vitaterna MH, Zhao Y, Wilsbacher LD, Sangoram AM, King DP, Pinto LH, Takahashi JS. Functional identification of the mouse circadian Clock gene by transgenic BAC rescue. *Cell* 89(4): 655-667, 1997.
7. King DP, Zhao Y, Sangoram AM, Wilsbacher LD, Tanaka M, Antoch MP, Steeves TD, Vitaterna MH, Kornhauser JM, Lowrey PL, Turek FW, Takahashi JS. Positional cloning of the mouse circadian clock gene. *Cell* 89(4):

- 641-653, 1997.
8. Shearman LP, Zylka MJ, Weaver DR, Kolakowski LF, Jr., Reppert SM. Two period homologs: circadian expression and photic regulation in the suprachiasmatic nuclei. *Neuron* 19(6): 1261-1269, 1997.
 9. Takumi T, Matsubara C, Shigeyoshi Y, Taguchi K, Yagita K, Maebayashi Y, Sakakida Y, Okumura K, Takashima N, Okamura H. A new mammalian period gene predominantly expressed in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Cells* 3(3): 167-176, 1998.
 10. Takumi T, Taguchi K, Miyake S, Sakakida Y, Takashima N, Matsubara C, Maebayashi Y, Okumura K, Takekida S, Yamamoto S, Yagita K, Yan L, Young MW, Okamura H. A light-independent oscillatory gene mPer3 in mouse SCN and OVLT. *EMBO J* 17(16): 4753-4759, 1998.
 11. Zylka MJ, Shearman LP, Weaver DR, Reppert SM. Three period homologs in mammals: differential light responses in the suprachiasmatic circadian clock and oscillating transcripts outside of brain. *Neuron* 20(6): 1103-1110, 1998.
 12. Hogenesch JB, Chan WK, Jackiw VH, Brown RC, Gu YZ, Pray-Grant M, Perdew GH, Bradfield CA. Characterization of a subset of the basic-helix-loop-helix-PAS superfamily that interacts with components of the dioxin signaling pathway. *J Biol Chem* 272(13): 8581-8593, 1997.
 13. Kume K, Zylka MJ, Sriram S, Shearman LP, Weaver DR, Jin X, Maywood ES, Hastings MH, Reppert SM. mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell* 98(2): 193-205, 1999.

14. Honma S, Kawamoto T, Takagi Y, Fujimoto K, Sato F, Noshiro M, Kato Y, Honma K. Dec1 and Dec2 are regulators of the mammalian molecular clock. *Nature* 419(6909): 841-844, 2002.
15. Kawamoto T, Noshiro M, Sato F, Maemura K, Takeda N, Nagai R, Iwata T, Fujimoto K, Furukawa M, Miyazaki K, Honma S, Honma K, Kato Y. A novel autofeedback loop of Dec1 transcription involved in circadian rhythm regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 313(1): 117-124, 2004.
16. Sato TK, Panda S, Miraglia LJ, Reyes TM, Rudic RD, McNamara P, Naik KA, FitzGerald GA, Kay SA, Hogenesch JB. A functional genomics strategy reveals Rora as a component of the mammalian circadian clock. *Neuron* 43(4): 527-537, 2004.
17. Preitner N, Damiola F, Lopez-Molina L, Zakany J, Duboule D, Albrecht U, Schibler U. The orphan nuclear receptor REV-ERB α controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell* 110(2): 251-260, 2002.
18. Kato Y, Kawamoto T, Honda KK. [Circadian rhythms in cartilage]. *Clin Calcium* 16(5): 838-845, 2006.
19. 能城光秀, 時計遺伝子, *日本臨床* 67:1454-1457, 2009.
20. Shen M, Yoshida E, Yan W, Kawamoto T, Suardita K, Koyano Y, Fujimoto K, Noshiro M, Kato Y. Basic helix-loop-helix protein DEC1 promotes chondrocyte differentiation at the early and terminal stages. *J Biol Chem* 277(51): 50112-50120, 2002.
21. Miyazaki K, Kawamoto T, Tanimoto K, Nishiyama M, Honda H, Kato Y.

- Identification of functional hypoxia response elements in the promoter region of the DEC1 and DEC2 genes. *J Biol Chem* 277(49): 47014-47021, 2002.
22. Zheng Y, Jia Y, Wang Y, Wang M, Li B, Shi X, Ma X, Xiao D, Sun Y. The hypoxia-regulated transcription factor DEC1 (Stra13, SHARP-2) and its expression in gastric cancer. *OMICS* 13(4): 301-306, 2009.
 23. Fujimoto K, Hamaguchi H, Hashiba T, Nakamura T, Kawamoto T, Sato F, Noshiro M, Bhawal UK, Suardita K, Kato Y. Transcriptional repression by the basic helix-loop-helix protein Dec2: multiple mechanisms through E-box elements. *Int J Mol Med* 19(6): 925-932, 2007.
 24. Sun H, Lu B, Li RQ, Flavell RA, Taneja R. Defective T cell activation and autoimmune disorder in Stra13-deficient mice. *Nat Immunol* 2(11): 1040-1047, 2001.
 25. Li Y, Xie M, Yang J, Yang D, Deng R, Wan Y, Yan B. The expression of antiapoptotic protein survivin is transcriptionally upregulated by DEC1 primarily through multiple sp1 binding sites in the proximal promoter. *Oncogene* 25(23): 3296-3306, 2006.
 26. Yun Z, Maecker HL, Johnson RS, Giaccia AJ. Inhibition of PPAR gamma 2 gene expression by the HIF-1-regulated gene DEC1/Stra13: a mechanism for regulation of adipogenesis by hypoxia. *Dev Cell* 2(3): 331-341, 2002.
 27. Iwata T, Kawamoto T, Sasabe E, Miyazaki K, Fujimoto K, Noshiro M, Kurihara H, Kato Y. Effects of overexpression of basic helix-loop-helix transcription factor Dec1 on osteogenic and adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Eur J Cell Biol* 85(5): 423-431, 2006.

28. Zawel L, Yu J, Torrance CJ, Markowitz S, Kinzler KW, Vogelstein B, Zhou S. DEC1 is a downstream target of TGF-beta with sequence-specific transcriptional repressor activities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(5): 2848-2853, 2002.
29. Noshiro M, Usui E, Kawamoto T, Sato F, Nakashima A, Ueshima T, Honda K, Fujimoto K, Honma S, Honma K, Makishima M, Kato Y. Liver X receptors (LXRalpha and LXRbeta) are potent regulators for hepatic Dec1 expression. *Genes Cells* 14(1): 29-40, 2009.
30. Lau P, Fitzsimmons RL, Raichur S, Wang SC, Lechtken A, Muscat GE. The orphan nuclear receptor, RORalpha, regulates gene expression that controls lipid metabolism: staggerer (SG/SG) mice are resistant to diet-induced obesity. *J Biol Chem* 283(26): 18411-18421, 2008.
31. Arimura N, Horiba T, Imagawa M, Shimizu M, Sato R. The peroxisome proliferator-activated receptor gamma regulates expression of the perilipin gene in adipocytes. *J Biol Chem* 279(11): 10070-10076, 2004.
32. Nakashima A, Kawamoto T, Honda KK, Ueshima T, Noshiro M, Iwata T, Fujimoto K, Kubo H, Honma S, Yorioka N, Kohno N, Kato Y. DEC1 modulates the circadian phase of clock gene expression. *Mol Cell Biol* 28(12): 4080-4092, 2008.
33. Giguere V, Tini M, Flock G, Ong E, Evans RM, Otulakowski G. Isoform-specific amino-terminal domains dictate DNA-binding properties of ROR alpha, a novel family of orphan hormone nuclear receptors. *Genes Dev* 8(5): 538-553, 1994.

34. Harding HP, Lazar MA. The orphan receptor Rev-ErbA alpha activates transcription via a novel response element. *Mol Cell Biol* 13(5): 3113-3121, 1993.
35. Akashi M, Takumi T. The orphan nuclear receptor RORalpha regulates circadian transcription of the mammalian core-clock Bmal1. *Nat Struct Mol Biol* 12(5): 441-448, 2005.
36. Ntambi JM, Young-Cheul K. Adipocyte differentiation and gene expression. *J Nutr* 130(12): 3122S-3126S, 2000.
37. Ohoka N, Kato S, Takahashi Y, Hayashi H, Sato R. The orphan nuclear receptor RORalpha restrains adipocyte differentiation through a reduction of C/EBPbeta activity and perilipin gene expression. *Mol Endocrinol* 23(6): 759-771, 2009.
38. Nielsen R, Pedersen TA, Hagenbeek D, Moulos P, Siersbaek R, Megens E, Denissov S, Borgesen M, Francoijs KJ, Mandrup S, Stunnenberg HG. Genome-wide profiling of PPARgamma:RXR and RNA polymerase II occupancy reveals temporal activation of distinct metabolic pathways and changes in RXR dimer composition during adipogenesis. *Genes Dev* 22(21): 2953-2967, 2008.
39. A IJ, Jeannin E, Wahli W, Desvergne B. Polarity and specific sequence requirements of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)/retinoid X receptor heterodimer binding to DNA. A functional analysis of the malic enzyme gene PPAR response element. *J Biol Chem* 272(32): 20108-20117, 1997.

40. Schoonjans K, Peinado-Onsurbe J, Lefebvre AM, Heyman RA, Briggs M, Deeb S, Staels B, Auwerx J. PPARalpha and PPARgamma activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. *EMBO J* 15(19): 5336-5348, 1996.
41. Tomaru T, Steger DJ, Lefterova MI, Schupp M, Lazar MA. Adipocyte-specific expression of murine resistin is mediated by synergism between peroxisome proliferator-activated receptor gamma and CCAAT/enhancer-binding proteins. *J Biol Chem* 284(10): 6116-6125, 2009.
42. Medina-Gomez G, Gray SL, Yetukuri L, Shimomura K, Virtue S, Campbell M, Curtis RK, Jimenez-Linan M, Blount M, Yeo GS, Lopez M, Seppanen-Laakso T, Ashcroft FM, Oresic M, Vidal-Puig A. PPAR gamma 2 prevents lipotoxicity by controlling adipose tissue expandability and peripheral lipid metabolism. *PLoS Genet* 3(4): e64, 2007.
43. Wakabayashi K, Okamura M, Tsutsumi S, Nishikawa NS, Tanaka T, Sakakibara I, Kitakami J, Ihara S, Hashimoto Y, Hamakubo T, Kodama T, Aburatani H, Sakai J. The peroxisome proliferator-activated receptor gamma/retinoid X receptor alpha heterodimer targets the histone modification enzyme PR-Set7/Setd8 gene and regulates adipogenesis through a positive feedback loop. *Mol Cell Biol* 29(13): 3544-3555, 2009.
44. Zhu Y, Qi C, Korenberg JR, Chen XN, Noya D, Rao MS, Reddy JK. Structural organization of mouse peroxisome proliferator-activated receptor gamma (mPPAR gamma) gene: alternative promoter use and different splicing yield two mPPAR gamma isoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(17): 7921-7925,

- 1995.
45. Kumaki Y, Ukai-Tadenuma M, Uno KD, Nishio J, Masumoto KH, Nagano M, Komori T, Shigeyoshi Y, Hogenesch JB, Ueda HR. Analysis and synthesis of high-amplitude Cis-elements in the mammalian circadian clock. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(39): 14946-14951, 2008.
 46. Uto-Kondo H, Ohmori R, Kiyose C, Kishimoto Y, Saito H, Igarashi O, Kondo K. Tocotrienol suppresses adipocyte differentiation and Akt phosphorylation in 3T3-L1 preadipocytes. *J Nutr* 139(1): 51-57, 2009.
 47. Zvonic S, Ptitsyn AA, Conrad SA, Scott LK, Floyd ZE, Kilroy G, Wu X, Goh BC, Mynatt RL, Gimble JM. Characterization of peripheral circadian clocks in adipose tissues. *Diabetes* 55(4): 962-970, 2006.
 48. Iwaki M, Matsuda M, Maeda N, Funahashi T, Matsuzawa Y, Makishima M, Shimomura I. Induction of adiponectin, a fat-derived antidiabetic and antiatherogenic factor, by nuclear receptors. *Diabetes* 52(7): 1655-1663, 2003.
 49. Cho Y, Noshiro M, Choi M, Morita K, Kawamoto T, Fujimoto K, Kato Y, Makishima M. The basic helix-loop-helix proteins differentiated embryo chondrocyte (DEC) 1 and DEC2 function as corepressors of retinoid X receptors. *Mol Pharmacol* 76(6): 1360-1369, 2009.
 50. Wan Y. PPARgamma in bone homeostasis. *Trends Endocrinol Metab* 21(12): 722-728, 2010.

謝辞

稿を終えるにあたり、終始御懇篤なる御指導ならびに御校閲を賜りました広島大学大学院医歯薬学総合研究科展開医科学専攻顎口腔頸部医科学講座（歯科矯正学）丹根一夫教授に謹んで感謝の意を表します。また、本論文作成にあたり、御助言、御校閲を賜りました同研究科創生医科学専攻探索医科学講座（口腔生化学）加藤 幸夫教授、同研究科展開医科学専攻顎口腔頸部医科学講座（小児歯科学）香西 克之教授、同研究科創生医科学専攻探索医科学講座（口腔細胞生物学）内田 隆教授、同研究科創生医科学専攻探索医科学講座（歯科薬理学）兼松 隆教授、ならびに同研究科創生医科学専攻探索医科学講座（口腔生化学）能城 光秀准教授に深謝申し上げます。

本研究の遂行において貴重な御助言を頂いた、広島大学病院矯正歯科 谷本 幸太郎講師、探索医科学講座（口腔生化学）河本 健博士、藤本 勝己博士、本田 清昌博士、中島 歩博士、および本研究の遂行に御理解、御協力を頂いた顎口腔頸部医科学講座（歯科矯正学）、ならびに探索医科学講座（口腔生化学）の皆様は厚く御礼申し上げます。

最後に本学での勉学において長年にわたり支えて頂いた両親や友人に心より感謝いたします。