

# 時計遺伝子 PER2 の概日時計機能に関する研究

2016

田井中 元美

# 目次

要旨	1
諸言	2
第一章 マウス胚性線維芽細胞内 PER2 タンパク質動態の解析	3
1.1 結果	4
1.2 考察	8
第二章 組織特異的 <i>Per2</i> 欠損マウスの作製による PER2 生理機能の解明	9
2.1 <i>Per2</i> コンディショナルノックアウト (CKO) マウスの作製	11
2.2 <i>Per2</i> CKO マウスの行動解析	14
2.3 <i>Per2</i> CKO マウスの脂肪組織における解析	16
2.4 考察	21
結論	23
実験材料と方法	24
第一章 実験材料と方法	24
第二章 実験材料と方法	26
引用文献	29
謝辞	35

# 要旨

地球上の多くの生物は内因性の概日時計を持ち、行動やホルモン分泌などの様々な生理現象が 24 時間のリズムに調律されている。この概日時計の振動は、全身の個々の細胞において時計遺伝子 *Period (Per)* を中心とした転写・翻訳のフィードバックループにより生み出される。哺乳類の *Per* 遺伝子には 3 種類のサブタイプ (*Per1*、*Per2*、*Per3*) が知られているが、中でも *Per2* が最も重要な役割を担うと考えられている。そこで本研究では、*Per2* 遺伝子とその翻訳産物である時計タンパク質 **PER2** に着目して研究を行った。まず、マウス胚性線維芽細胞を用いて、タンパク質合成阻害剤シクロヘキシミド存在下で **PER2** の発現を追跡した。これにより、哺乳類細胞内において時計タンパク質 **PER2** の概日振動維持にはその翻訳が必要であることが明らかになった。また、*Per2* コンディショナルノックアウトマウスを作製し、視交叉上核の **PER2** がマウスの概日行動周期長の決定に寄与していることを示した。さらに、**PER2** は肥満病態とも関わる重要な分子であることを明らかにした。

## 諸言

地球上の多くの生物は内因性の約 24 時間周期のリズムを刻む時計 (概日時計) を持つ<sup>1</sup>。この概日時計の振動は、個々の細胞において時計遺伝子 *Period* (*Per*) を中心とした転写・翻訳のフィードバックループ (Transcription Translation Feedback Loop; TTFL) によって生み出されている<sup>1-3</sup>。*Per* 遺伝子を中心に TTFL を説明すると、まず転写促進因子の CLOCK:BMAL1 複合体が *Per* 遺伝子の転写を誘導し、転写された *Per* mRNA はタンパク質へと翻訳される。翻訳後の PER タンパク質は速やかにリン酸化を受けてプロテアソームにより分解されるが、時間が経過して転写が増大するにつれ、PER タンパク質が細胞質に蓄積する。蓄積した PER タンパク質は、核内にて CRY と転写抑制複合体を形成し、CLOCK:BMAL1 複合体と結合して自身の転写を抑制する。これにより PER タンパク質が減少すると、その転写抑制効果が弱まり、再び *Per* 遺伝子の転写が開始される。

哺乳類の *Per* 遺伝子には 3 種類のサブタイプが知られており<sup>4</sup>、中でも *Per2* が最も重要な役割を担うと考えられている。これまでの研究で、*Per1*、*Per2*、*Per3* のうち、*Per2* 変異マウスのみにおいて *Per1*、*Cry1*、*Bmal1* といった時計遺伝子の発現が低下している<sup>5-8</sup> ことが報告されており、PER2 が時計遺伝子の転写制御に密接に関わると考えられる。また重要なことに、PER2 タンパク質にはその量だけでなくリン酸化にもリズムがあり<sup>9</sup>、PER2 のリン酸化は概日時計のペース決定に不可欠であると考えられている<sup>10-16</sup>。さらに、ヒトのリズム異常の一つである家族性睡眠相前進症候群 (Familial Advanced Sleep-Phase Syndrome; FASPS)<sup>17</sup> において、PER2 の安定性や細胞内の局在に関わるリン酸化部位に変異がある家系<sup>11</sup> や、PER2 をリン酸化し機能調整を行う CK1δ の変異を持つ家系<sup>18</sup> が報告されており、ヒトにおいても PER2 が時計機構の中心を担っていると考えられる。

そこで本研究では、*Per2* 遺伝子とその翻訳産物である時計タンパク質 PER2 に着目し実験を行った。第一章では、マウス胚性線維芽細胞を用いて、翻訳阻害条件下における PER2 の時間変動プロファイルを追跡した。また第二章では、*Per2* コンディショナルノックアウトマウスを作製し、組織特異的な PER2 生理機能の解明を試みた。

# 第一章

## マウス胚性線維芽細胞内 PER2 タンパク質動態の解析

バクテリアからヒトに至るまでの多くの生物に共通した特徴として、概日時計の中心的な時計タンパク質の量およびリン酸化にリズムがある<sup>1</sup>。従来の TTFL モデルにおいては、タンパク質の翻訳が概日振動を生み出すのに必要不可欠であると考えられているが、驚くべきことに、シアノバクテリアでは、タンパク質の翻訳を阻害した場合でも中心的な時計タンパク質である KaiC がリン酸化のリズムを継続することが示された<sup>19</sup>。Tomita らは KaiC に対する特異的な抗体を用いることにより、シアノバクテリア細胞内の内在性 KaiC タンパク質の振動を追跡することに成功し、その結果、KaiC タンパク質の翻訳非依存的なリン酸化リズムを明らかにした。本章では、このシアノバクテリアにおける研究に基づき、哺乳類においても翻訳に依存しない時計タンパク質の修飾リズムが同様に観察されるのかを検証するために、翻訳が阻害された哺乳類細胞内での中心的な時計タンパク質を追跡した。概日性に発現する時計遺伝子の転写物およびタンパク質の発現を追跡する場合には、*Bmal1-luc* や *Per2::luc* といったレポーター遺伝子を利用した研究が多い。しかし、上述したシアノバクテリアの研究と同様の課題に取り組むためには、細胞内に本来発現する内在性の時計タンパク質を追跡する必要がある。これまでのところ、適した抗体がなかったことが大きな障壁となり、薬理的に処理可能な培養細胞を用いて複数の概日周期にわたり、内在性の時計タンパク質を直接追跡した研究は報告されていない。そこで本章では、哺乳類の中心的な時計タンパク質であり、シアノバクテリア KaiC と同様に発現量だけでなくリン酸化にも顕著な概日リズムを有する PER2 を解析した。独自に作製したマウス PER2 に対する抗体を用いて、翻訳阻害剤の存在下でマウス胚性線維芽細胞内の内在性 PER2 タンパク質を数日にわたって追跡した。その結果、タンパク質合成を阻害した場合には、PER2 の概日振動が維持されないことを見出した。

## 1.1 結果

本章の実験では、標準的な 24-well プレートにて培養したマウス胚性線維芽細胞 (MEF 細胞) を用いた。細胞を直接 Laemmli バッファーへ溶解し、24-well プレートの各ウェルから回収したサンプルをウエスタンブロットにより解析した。新たに作製した PER2 抗体は、過剰発現させたリコンビナント PER2 だけでなく、細胞が本来発現している内在性 PER2 も検出可能であった (図 1 A,B)。また、*Per2* を欠損した MEF 細胞のライセートの場合には PER2 が検出されなかったことから、PER2 に対する抗体の特異性が確認された (図 1B)。細胞内 PER2 の概日振動を解析するために、MEF 細胞をデキサメタゾン (DEX) 処理により同調させたところ、内在性 PER2 タンパク質は量および移動度において特徴的な振動を示した。一定の培養条件下で MEF 細胞内の PER2 は少なくとも 52 時間にわたって振動を継続し (図 2)、過去に報告されたマウス肝臓内の PER2 振動パターン<sup>9</sup>とも合致していた。以上より、*in vitro* 培養細胞を用いたシンプルなウエスタンブロットによって PER2 タンパク質の自律振動が追跡可能であることが確認された。

続いて、タンパク質合成阻害剤シクロヘキシミド (CHX) の存在下で、複数の概日周期にわたって PER2 タンパク質プロファイルを追跡した (図 2)。DEX 処理して同調した細胞に対して、1 周期目の PER2 リズムの上昇相または下降相のいずれかにおいて CHX 処理を行った。その結果、CHX 処理のタイミングにかかわらず、PER2 は半減期約 2 時間の非常に速い減衰を示し (図 1C)、その後も検出されないことがわかった (図 2)。この結果は、概日性の PER2 増加が *de novo* タンパク質合成を必要とすることを示している。

さらに、細胞を 26S プロテアソーム阻害剤 MG-132 で処理すると、PER2 の分解が遅延した<sup>12,20-22</sup>。MG-132 を CHX と同時に処理した場合には、分子量の大きな PER2 タンパク質が処理後 44 時間まで検出されたにもかかわらず、PER2 のリズムは観測されなかった (図 2)。これは、タンパク質の分解を減弱させた場合においても、PER2 の振動にはタンパク質合成が必要であることを意味している。

全ての実験において、ウエスタンブロットの内部標準として用いた  $\beta$ -アクチンにはほぼ一定の発現が観察された。さらに、トリパンブルー染色による細胞生存試験を実施し、CHX 処理 48 時間後でも細胞が死滅していないことを確認した (図 2C)<sup>23,24</sup>。そして、CHX 付加 24、36、48 時間後に CHX 無添加の培地へ交換すると、細胞は DEX に反応して PER2 の合成を開始した (図 2C)。これらのことから、実験を通してかなりの部分の細胞が生存していると考えられる。

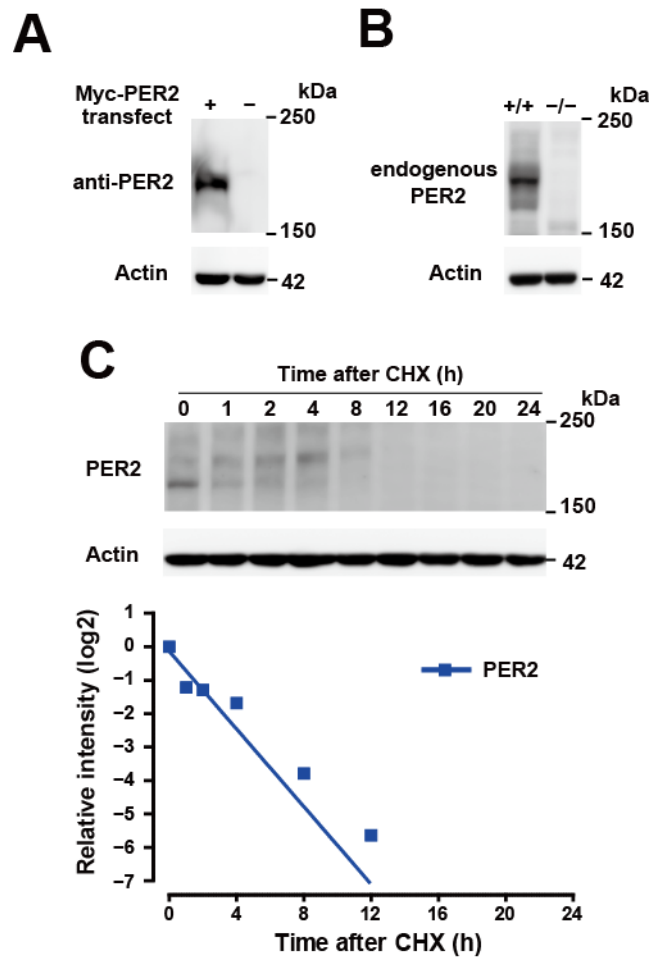
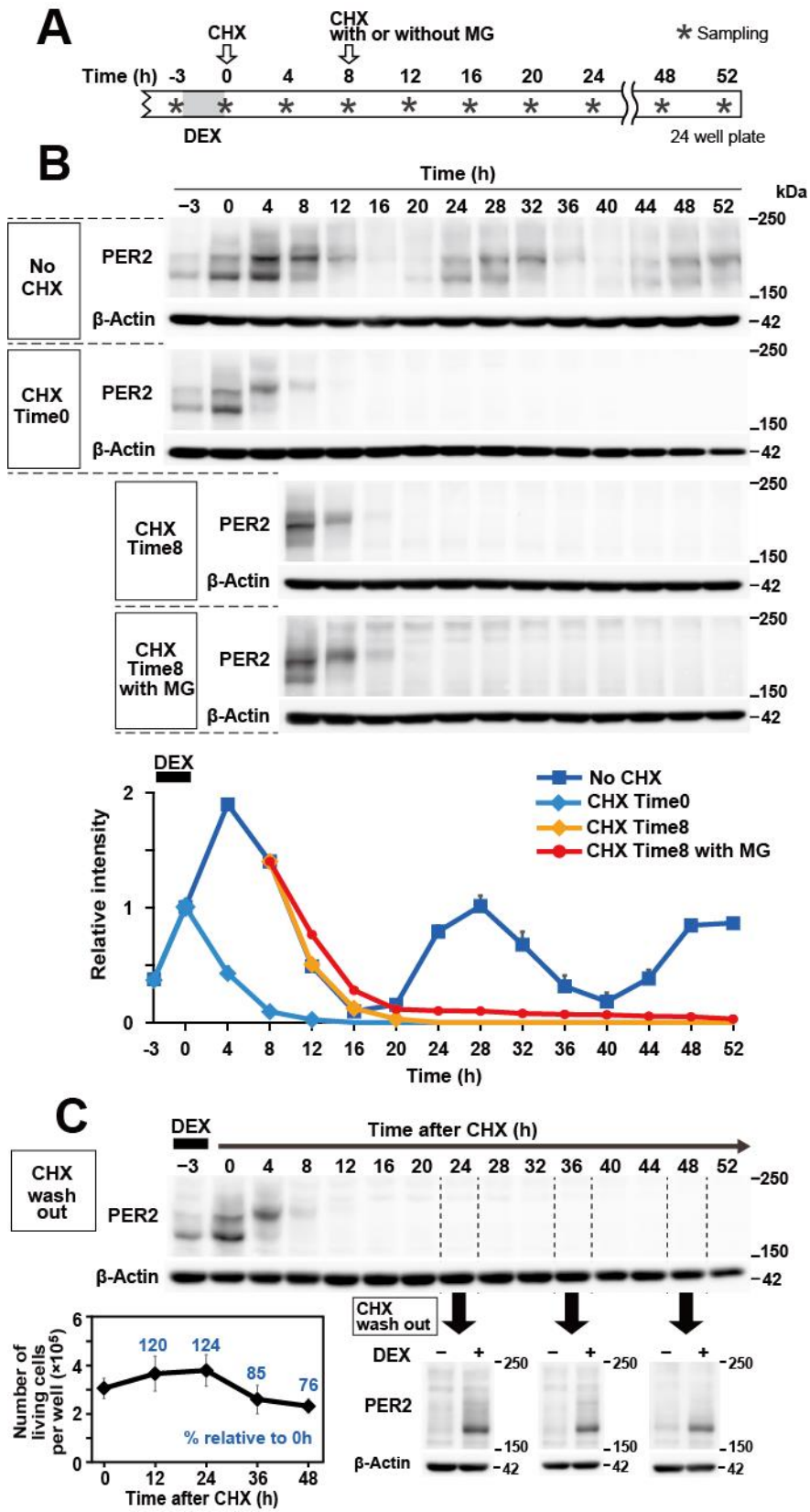


図1 作製した抗PER2抗体の特徴。(A) COS7細胞へトランスフェクションしたMyc-PER2のウエスタンブロットによる検出。(B) 野生型および*Per2*欠損MEF細胞を用いたウエスタンブロットの結果。(C) 野生型MEF細胞内の内在性PER2の半減期。3時間のDEX処理により同調した細胞をCHX処理し、CHX処理の0、1、2、4、8、12、16、20、24時間後に回収した。定量結果は0hの値を1として示す。計算により算出された半減期は1.72時間であった。β-アクチンの結果はそれぞれのローディングコントロールとして示した。





**図 2 MEF 細胞内 PER2 のウエスタンブロットによる追跡.** (A) 実験スケジュールの模式図。DEX 処理により同調した MEF 細胞を 4 時間おきにサンプリングした。PER2 の発現リズムの上昇相 (Time0) または下降相 (Time8) に CHX (100  $\mu\text{g/ml}$ ) を培養液中へ加えた。MG-132 (20  $\mu\text{M}$ ) は Time8 において CHX と同時に添加した。(B) PER2 の代表的なウエスタンブロットの結果。定量結果は Time0 の値を 1 とし、3-4 組の異なるサンプルセットの実験結果を平均値 $\pm$ S.D.で表示する。それぞれの実験のローディングコントロールとして  $\beta$ -アクチンを示す。(C) CHX 処理後の生細胞数と CHX 除去後の DEX による PER2 発現誘導。CHX 処理開始から 12 時間ごとにトリパンプルー染色法により生細胞数を計測した。結果は独立した 3-4 ウェルの平均値 $\pm$ S.D.で表示する。また、CHX 添加 24、36、48 時間後に CHX 無しの培地に交換し、3 時間 DEX で処理した。ウエスタンブロットの結果は DEX により誘導された PER2 を示す。

## 1.2 考察

本章では、翻訳を阻害した細胞内で内在性 PER2 タンパク質がどのように挙動するのかを調べた。そのために、アフィニティー精製した PER2 抗体を新たに作製し、MEF 細胞を用いて内在性の PER2 タンパク質振動をウエスタンブロットにより追跡した。その結果、MEF 細胞内の内在性 PER2 タンパク質の量およびリン酸化が 2 周期以上にわたってリズムを示すことが明らかになった。さらに、翻訳を阻害した場合には、PER2 タンパク質の概日振動は継続しないことを明らかにした。

タンパク質の翻訳を薬理的に阻害した場合でも、シアノバクテリア細胞は KaiC の正常なリン酸化リズムを継続する<sup>19,25</sup>。したがって、タンパク質合成を阻害した環境では、シアノバクテリア KaiC とマウス PER2 の挙動は本質的に異なると考えられる。すなわち、哺乳類においては毎日のタンパク質合成が概日振動形成に必要であるが、シアノバクテリアでは、タンパク質合成がない場合には、翻訳後修飾のみで概日振動を維持可能であることが明らかになった。KaiC と PER2 の違いを説明する詳細なメカニズムの解明は待たれるが、例えば、哺乳類では PER2 のリン酸化とその後の分解が密接に関わっているため、KaiC と PER2 の分解速度の差が寄与しているのかもしれない。そこで本章では、MG-132 を用いて PER2 タンパク質の分解を遅らせたが、MG-132 が多量に存在していても PER2 のリズム性は観察されなかった。しかし、細胞内での PER2 の急速な分解による消失が PER2 のリン酸化リズムの検出を妨げている可能性については、PER2 のユビキチン化を阻害することで強力に PER2 の分解を抑制するなどの検討が必要である。

本章のデータは、転写と翻訳に基づく発振機構である従来の TTFL モデルと、近年活発に議論されている TTFL に依存せずに概日振動する non-TTFL モデルのいずれかを支持するものではないことは述べておく。翻訳（や転写）のリズムが時計機構の不可欠な部分ではなく単に必要であるという主張が確かにあり、*Per2* の転写を一定にした場合でも概日リズムが継続することが報告されている<sup>26,27</sup>。本章の結果は、CHX でタンパク質合成を阻害した MEF 細胞内の PER2 に限定しており、他の組織や細胞における他のタンパク質の翻訳非依存的なリズムの可能性を否定するものではない。また、一定量の PER2 タンパク質が存在する場合に PER2 のリン酸化リズムが検出できるのかを評価するために、PER2 の翻訳を一定にし得る条件を探索する必要があるだろう。

本章では、MEF 細胞内の内在性 PER2 振動の維持にはタンパク質の翻訳が必要条件であることを示した。薬理的に処理可能な細胞培養系を利用し、細胞内の内在性 PER2 タンパク質の時間変動プロファイルを探索するのに有用な抗体を創出することによって、PER2 のリズム形成に対するタンパク質合成の必要性を実験により確認することに成功した。

## 第二章

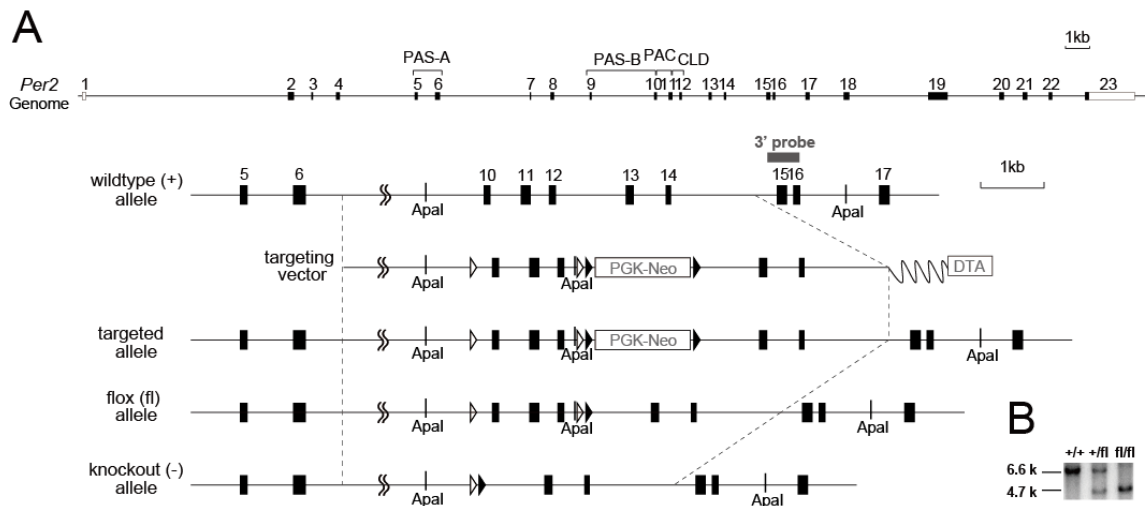
### 組織特異的 *Per2* 欠損マウスの作製による PER2 生理機能の解明

概日時計により様々な生理機能が 24 時間リズムを示すが、このリズムの重要性はリズム異常が病態と密接に関連することから明らかである。例えば、慢性的な時差環境下におかれ概日時計が乱れているシフトワーカーにおいては、癌<sup>28,29</sup>や肥満<sup>30</sup>などの疾病のリスクが高いことが疫学研究により報告されてきた。また、リズム異常のマウスにおいても、癌<sup>28,31,32</sup>や、当研究室が見出した *Cry* 欠損マウスの食塩感受性高血圧<sup>33</sup>をはじめ、*Clock* 変異マウスの肥満<sup>34</sup>、および *Bmal1* 欠損マウスの糖尿病<sup>35</sup>や、*Per2* 変異マウスの心筋梗塞<sup>36</sup>など、全身の時計遺伝子を欠損したマウスが、行動リズムだけでなく種々の代謝の異常を引き起こし、ひいては疾病に至ることが報告されている。しかし、概日時計は全身のほぼ全ての細胞に存在するため<sup>37-39</sup>、この病態が全身のどの組織の時計の異常により引き起こされるのかは不明である。そこで本章では、*Per2* コンディショナルノックアウト (CKO) マウスを作製し (図 3)、組織特異的に *Per2* を欠損させることで組織ごとの PER2 の役割を評価した。

*Per2* を欠損させる組織として、まず概日時計の中枢である脳内視床下部の視交叉上核 (suprachiasmatic nucleus; SCN) を標的とした。SCN はおよそ 2 万個の細胞から構成されるが、その 1 つ 1 つの細胞は TTFL に基づく概日振動を示す。末梢の細胞も同様の機構により概日振動を示すとされるが、SCN において特徴的なのは、SCN の各細胞が細胞-細胞間コミュニケーションにより密接に結びつき、SCN 全体として安定した強力な振動体となることである<sup>40</sup>。これにより、SCN は全身の 60 兆個もの細胞が別々の時を刻むことがないように統括・調律している<sup>39,41</sup>。すなわち、SCN の時計が生体としての時計にまで反映されると考えられているが、遺伝学を用いた検討は実際にはあまり行われていない。そこで本章では、SCN 特異的な *Per2* ノックアウト (SCN-CKO) マウスを作製した。SCN-CKO マウスを用いた概日行動測定の結果、SCN の PER2 が恒暗条件下でのマウスの概日行動周期長の決定に深く関与していることを見出した。

また、時計遺伝子の中でも PER2 に特有の機能として、様々な核内受容体と結合することがある<sup>42</sup>。核内受容体は代謝機能調節と密接に関わるので<sup>43</sup>、時計機構と代謝機能を結ぶ分子として PER2 が重要な役割を担うと考えられる。そこで全身 *Per2* ノックアウト (全身-KO) マウスに対して高脂肪食負荷実験を行ったところ、全身-KO マウスは高脂肪食負荷による肥満症状を示さなかった。肥満症状は、特に脂肪組織における形態変化や遺伝子発現変動を伴う。そこで本章では、PER2 が脂肪組織において核内受容体の PPAR $\gamma$  と直接結合し、その転写活性を調節すること<sup>44</sup>に着目し、脂肪組織における遺伝子発現を解析した。その結果、*Angptl2* などのアディポカインの発現が全身-KO マウスで低下していることがわかった。続いて、脂肪組織における PER2 の役割について検討するため、脂肪組織特異

的な *Per2* ノックアウト (AT-CKO) マウスを作製した。AT-CKO マウスの脂肪組織におけるアディポカイン発現量を測定したところ、脂肪組織の PER2 が *Agnptl2* の発現制御に寄与していることがわかった。



**図3 *Per2* コンディショナルノックアウトマウスの作製.** (A) マウス *Per2* 遺伝子のゲノム構造、ターゲティングベクターおよび組み換え後の構造。エクソンはボックスで示し、黒塗りの領域はタンパク質コード領域を表す。白三角は loxP recombination sites、黒三角は FRT recombination sites を表す。PAS, Per-Arntl-Sim; CLD, cytoplasmic localization domains; PGK-Neo, neomycin resistance gene; DTA, diphtheria toxin alpha gene (B) サザンブロット法による遺伝子組み換えの確認。0.5 kb の 3'プローブを用いて、野生型配列 (+) では 6.6 kb、fl では 4.7 kb の *ApaI* 消化断片を検出した。

## 2.1 *Per2* CKO マウスの作製

*Per2* CKO マウスの設計は *Per2* 遺伝子のエクソン 10 の上流およびエクソン 12 の下流に loxP が導入され、Cre リコンビナーゼによってエクソン 10、11、12 を含む 1.5 kb が除去されるようにした (図 3A)。この領域は、PER2 の機能ドメインである PAS ドメインおよび細胞質局在ドメイン (CLD) をコードしている<sup>45-47</sup>。PAS ドメインは様々な生物の時計遺伝子の中で高度に保存されている重要なドメインである<sup>48-50</sup>。標的とした 3 つのエクソンは、ショウジョウバエの *Period* 遺伝子と比較して最も保存されている領域を含んでおり、この欠損は、PAS-B ドメインの半分と PAC サブドメインの全領域を取り除くものである<sup>45-47</sup> ので、PAS ドメインの機能を失うと予想される。さらに、この欠損は以降に翻訳フレームシフトを引き起こす。したがって、ノックアウト配列を持つ場合には、N 末端側の最初の 320 アミノ酸に PER2 とは無関係の 49 アミノ酸が付加されたタンパク質が産生する可能性があるが、PER2 は本来全長 1257 アミノ酸からなるタンパク質なので、この小さな変異タンパク質が PER2 の機能を代替することや、他の何らかの機能を示す可能性は低いと考えられる。遺伝子改変が *Per2* 遺伝子のゲノム配列上で起こっていることは、サザンブロット法により確認した (図 3B)。SCN-CKO マウスおよび AT-CKO マウスは、それぞれ SCN 特異的遺伝子あるいはアディポネクチン *Adipoq* 遺伝子のプロモーターの制御下で Cre リコンビナーゼを発現するマウス (それぞれ *SCN-cre* マウス、*Adipoq-cre* マウス) と、loxP が挿入された flox マウスとを交配することにより得た。

まず PER2 の SCN における発現を確認するために、脳切片の免疫染色を行った (図 4)。野生型マウスおよび flox マウスの SCN において、PER2 は CT12 に強く CT20 に弱い、リズム的な発現パターンを示した。一方、全身-KO マウスの SCN においては、いずれの時刻にも PER2 のシグナルは検出されなかった。また、SCN-CKO マウスの SCN においても、CT12、CT20 のいずれの時刻にも PER2 のシグナルは検出されなかった。全身-KO マウスの大脳皮質においては PER2 のシグナルは検出されなかったが、SCN-CKO マウスの大脳皮質においては、flox マウスと同様に PER2 のシグナルが確認された。このことから、SCN-CKO マウスは SCN 特異的に PER2 を欠損していると考えられる。一方で、*SCN-cre* マウスおよび AT-CKO マウスの SCN においては、CT12 に野生型マウスおよび flox マウスと同程度の PER2 シグナルが確認された。

次に、末梢組織における *Per2* mRNA を定量的リアルタイム PCR 法により測定した (図 5)。末梢組織としては、精巣上体周囲脂肪 (epididymal white adipose tissue; eWAT)、鼠径部脂肪 (inguinal white adipose tissue; iWAT)、褐色脂肪 (brown adipose tissue; BAT) の 3 箇所の脂肪組織、および肝臓を用いた。いずれの組織においても、flox マウスでは野生型マウスと同等の *Per2* の発現が確認されたのに対して、全身-KO マウスでは *Per2* mRNA は検出されなかった。また、AT-CKO マウスの *Per2* mRNA の発現は、野生型マウスに対して eWAT では 38 %、iWAT では 30 %、BAT では 23 %と有意に低下していた。

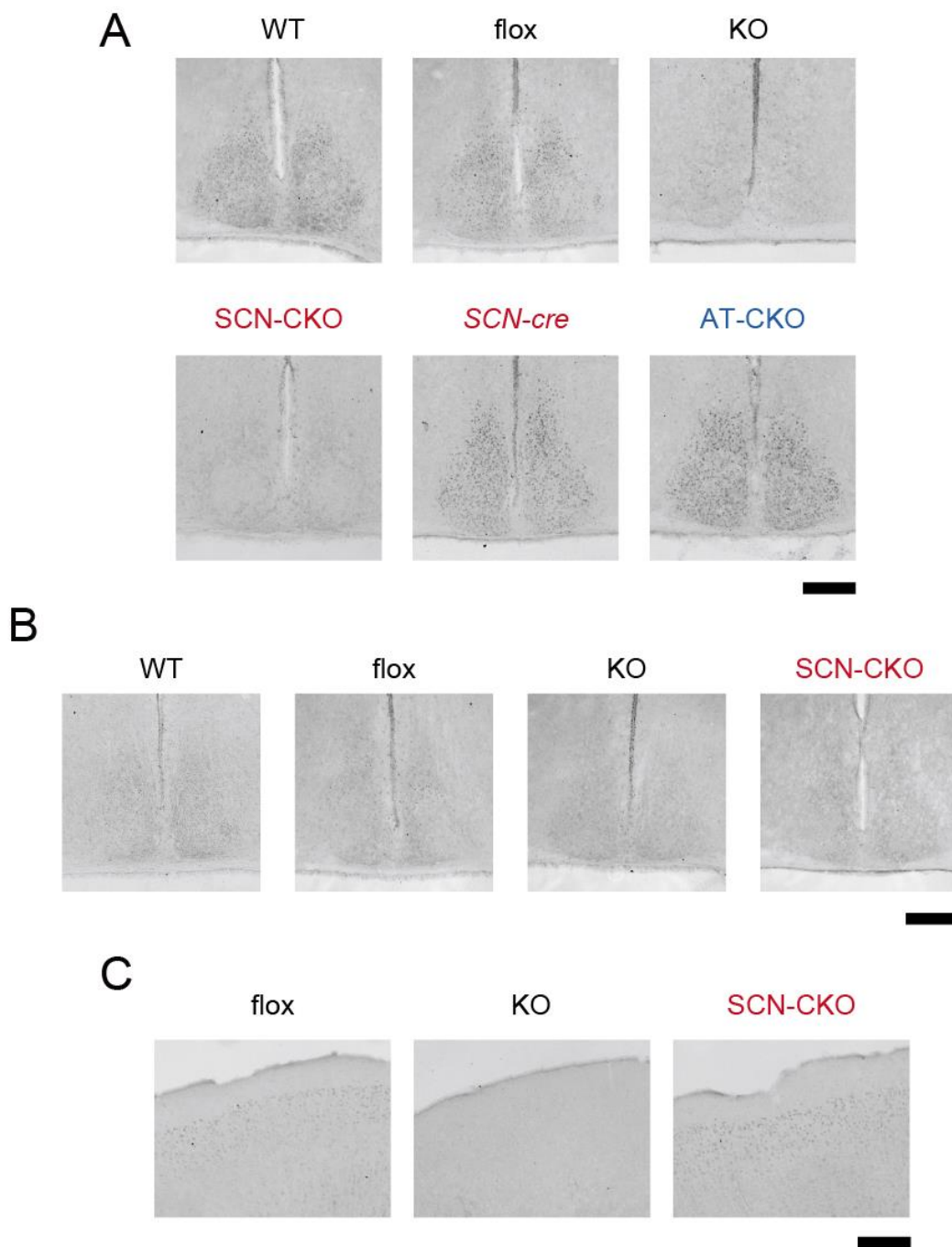


図 4 免疫染色による *Per2* CKO マウス脳 の PER2 タンパク質の発現解析. (A) CT12 (Circadian Time; 行動開始点を CT12 と定義) における、野生型 (WT) マウス、flox マウス、全身-KO マウス、SCN-CKO マウス、*SCN-cre* マウス、AT-CKO マウスの SCN の代表的な PER2 免疫染色像。(B) CT20 おける、WT マウス、flox マウス、全身-KO マウス、SCN-CKO マウスの SCN の代表的な PER2 免疫染色像。(C) CT12 おける、flox マウス、全身-KO マウス、SCN-CKO マウスの大脳皮質の代表的な PER2 免疫染色像。Bars = 200 μm

一方、AT-CKO マウスの肝臓では、*Per2* の発現は野生型マウスと比較して低下していなかったことから、AT-CKO マウスは脂肪組織特異的に *Per2* を欠損していると考えられる。

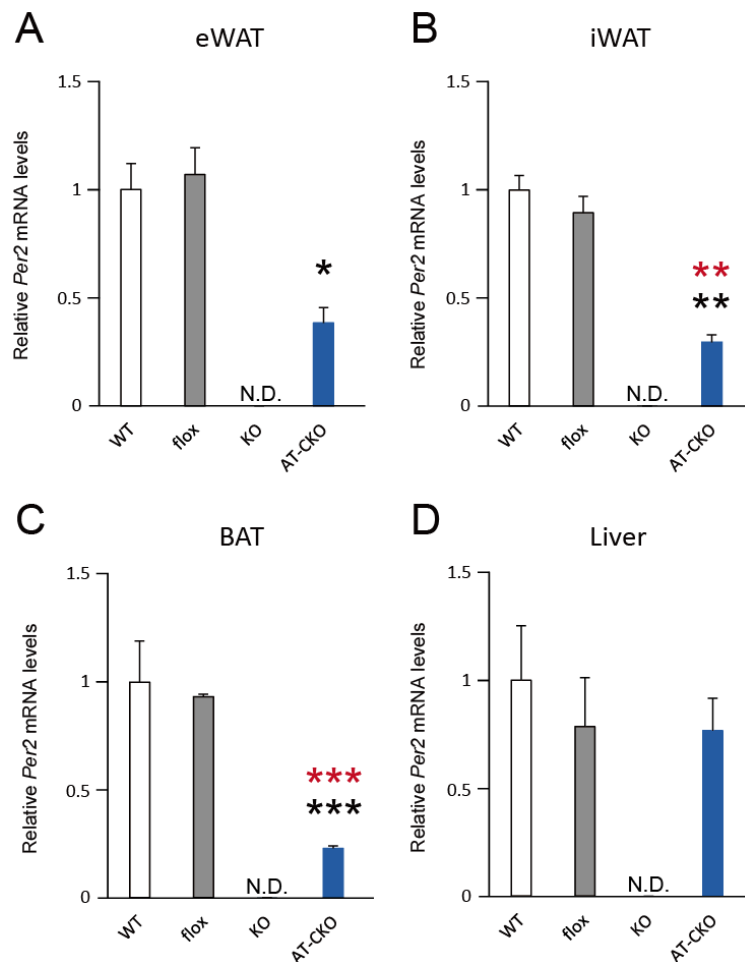


図 5 定量的リアルタイム PCR 法による *Per2* CKO マウス脂肪組織および肝臓の *Per2* mRNA の発現量解析. 野生型 (WT) マウス、flox マウス、全身-KO マウス、AT-CKO マウスの (A) eWAT、(B) iWAT、(C) BAT、(D) 肝臓における *Per2* mRNA 発現量。結果は、WT マウスの平均値を 1 とし、それぞれの平均値±S.E.M.で表示する。(eWAT は WT・AT-CKO・全身-KO は n=4、flox は n=2、iWAT は WT・AT-CKO は n=4、flox は n=2、全身-KO は n=3、BAT は WT・AT-CKO は n=4、flox・全身-KO は n=2、肝臓は n=2) One-way ANOVA with Tukey *post hoc* test により統計解析を行った。\*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001、黒の星印 (\*), vs. WT ; 赤の星印 (\*\*), vs. flox

## 2.2 *Per2* CKO マウスの行動解析

*Per2* 遺伝子を全身で欠損するマウスは、概日行動に異常をきたすこと<sup>8,51,52</sup>が報告されている。この概日行動異常において、概日時計の中枢である SCN および末梢組織の PER2 が寄与しているのかを検討するために、*Per2* CKO マウスの概日行動を測定した (図 6)。マウスを 12 時間明期・12 時間暗期 (LD) 条件で 10 日以上飼育して同調させた後、恒暗条件へ移行して概日行動周期長を測定した。野生型マウスおよび flox マウスは、恒暗条件下でそれぞれ  $23.83 \pm 0.04$  h (平均値  $\pm$  S.E.M.)、 $23.81 \pm 0.02$  h の行動周期長を示した。一方、全身-KO マウスは、 $22.02 \pm 0.15$  h の有意に短い行動周期長を示した。また、6 個体中 3 個体の全身-KO マウスは、3 週間の恒暗条件下で概日リズムを持続できず、アリズムックとなった。これらの全身-KO マウスの表現型は、以前の報告と合致するものである<sup>51,52</sup>。また、全身-KO マウスは行動の開始点が安定せず、LD 条件においても行動は明暗周期と同調こそするが、暗期の開始と行動の開始が揃わない傾向がみられた。次に、SCN-CKO マウスの行動を測定したところ、その概日行動周期長は  $23.00 \pm 0.13$  h であり、野生型マウス、flox マウスおよび *SCN-cre* マウス (行動周期長  $23.88 \pm 0.07$  h) などの対照群と比較して有意に短かった。一方、AT-CKO マウスおよび *Adipoq-cre* マウスの行動周期長は、それぞれ  $23.73 \pm 0.04$  h、 $23.77 \pm 0.04$  h であり、野生型マウスと同程度であった。したがって、SCN の PER2 が欠損するとマウスの概日行動周期長が短縮されることがわかった。



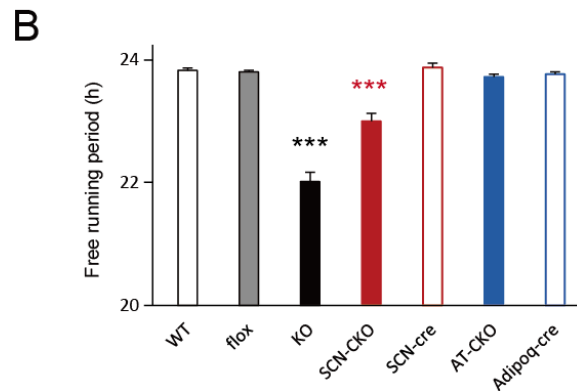
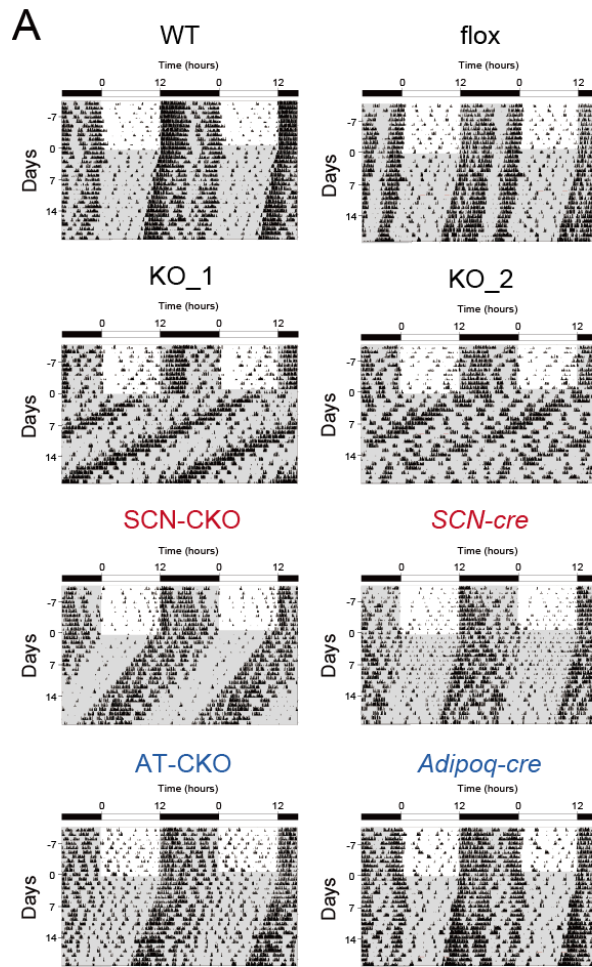
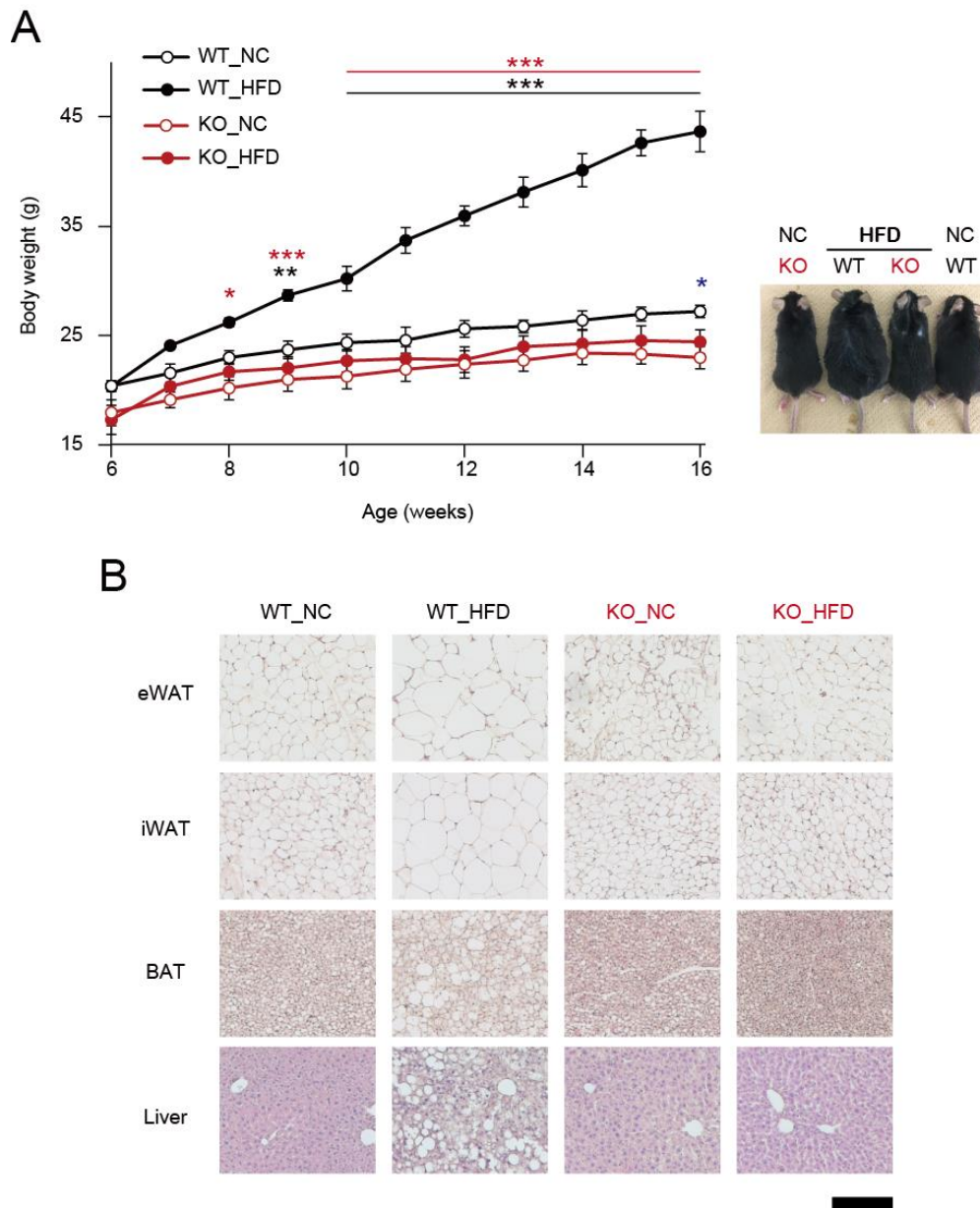


図6 *Per2*CKO マウスの概日行動. 野生型 (WT) マウス、flox マウス、全身-KO マウス、SCN-CKO マウス、*SCN-cre* マウス、AT-CKO マウス、*Adipoq-cre* マウスの、(A) 代表的な行動測定結果。行動記録の灰色の影は暗期を表し、記録の上のバーは明暗周期を示す。KO\_2 は恒暗条件下で概日リズムを失った。(B) 行動周期長のグラフ。WT・SCN-CKO は 5 個体、flox は 7 個体、全身-KO・*SCN-cre*・AT-CKO・*Adipoq-cre* は 4 個体の測定結果を平均値 ± S.E.M. で表す。One-way ANOVA with Tukey *post hoc* test により統計解析を行った。\*\*\* $P < 0.001$  vs. all the other genotypes

### 2.3 *Per2* CKO マウスの脂肪組織における解析

*Per2* 遺伝子を全身で欠損したマウスが、野生型マウスと比較して脂肪組織の減少を伴う体重低下を示すことが報告されている<sup>44</sup>。そこで、脂肪組織の *PER2* が高脂肪食 (High Fat Diet; HFD) 負荷により誘導される肥満に関与しているのかについて検討するために、HFD 負荷時の野生型マウスと全身-KO マウスの体重を測定した (図 7A)。以前の報告<sup>44</sup>に合致して、全身-KO マウスは野生型マウスに比べて低体重であった。また、野生型マウスに HFD を与えると体重は有意に増加したが、全身-KO マウスでは体重増加は見られなかった。さらに、HFD 負荷開始時に全身-KO マウスの体重が軽いことが HFD による体重増加を抑制する可能性について検討するために、全身-KO マウスが 6 週齢の野生型マウスの平均体重に相当する約 20 g になった時点から HFD 負荷実験を開始した。この場合でも、全身-KO マウスでは体重の顕著な増加は認められなかった (data not shown)。以上のことから、HFD 負荷による肥満に *PER2* が寄与することが明らかになった。次に、このマウスの eWAT、iWAT、BAT、および肝臓の切片をヘマトキシリン・エオジン染色により観察したところ、体重変動の結果と一致して、HFD 負荷した野生型マウスのいずれの脂肪組織においても細胞の肥大化が観察された (図 7B)。また、肝臓においては脂肪の蓄積が見られた (図 7B)。一方、HFD 負荷した全身-KO マウスの脂肪組織や肝臓においては、そのような変化は観察されなかった (図 7B)。

次に、これらのマウスの脂肪組織におけるアディポカインの発現を定量的リアルタイム PCR 法により測定した (図 8)。アディポカインは主に脂肪組織から分泌されて炎症やインスリン抵抗性などの機構に関わる重要な分子であり<sup>53-55</sup>、肥満などにより発現量や血中濃度が変動する。本章では、代表的なアディポカインであるアディポネクチン (*Adipoq*)、および飽食シグナルのレプチン (*Lep*)<sup>54</sup>、肝臓において時計との関わりが報告されているビスファチン (*Nampt*)<sup>56</sup>、血管炎症に関わるアンギオポエチンライク 2 (*Angptl2*)<sup>54,57</sup> について発現量を調べた。通常食の野生型マウスと比較すると、HFD 負荷の野生型マウスにおいて、eWAT の *Angptl2*、iWAT の *Adipoq*、*Nampt*、*Angptl2*、BAT の *Angptl2* の発現量は有意に低下していた。これに対して、BAT の *Adipoq* や *Nampt* の発現については通常食と HFD の間で差は認められなかった。また、通常食と HFD 負荷間での変化を、野生型マウスと全身-KO マウスのそれぞれにおいて比較すると、eWAT の *Lep* が全身-KO マウスでは HFD 負荷により有意に増加しており、野生型マウスとは逆であったが、他のほとんどのアディポカイン発現量の HFD 負荷による増減パターンについては、野生型マウスと全身-KO マウスで大きな差は認められなかった。さらに、通常食の野生型マウスと全身-KO マウスを比較すると、eWAT の *Lep* および *Angptl2*、iWAT の *Angptl2*、BAT の *Nampt* および *Angptl2* の発現が全身-KO マウスにおいて有意に低下していた。



**図7 高脂肪食 (HFD) 負荷実験.** 通常食 (NC) または HFD を与えた野生型 (WT) マウスおよび全身-KO マウスの (A) 体重推移と代表的なマウスの写真。実験結果は各条件 4 個体の体重測定の結果を、平均値±S.E.M.で表示する。Two-way ANOVA with Bonferroni *post hoc* test により統計解析を行った。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ 、黒の星印 (\*), WT\_HFD vs. WT\_NC ; 赤の星印 (\*), WT\_HFD vs. KO\_HFD ; 青の星印 (\*), WT\_NC vs. KO\_NC (B) eWAT、iWAT、BAT および肝臓の代表的なヘマトキシリン・エオジン染色像。Bar = 200  $\mu$ m

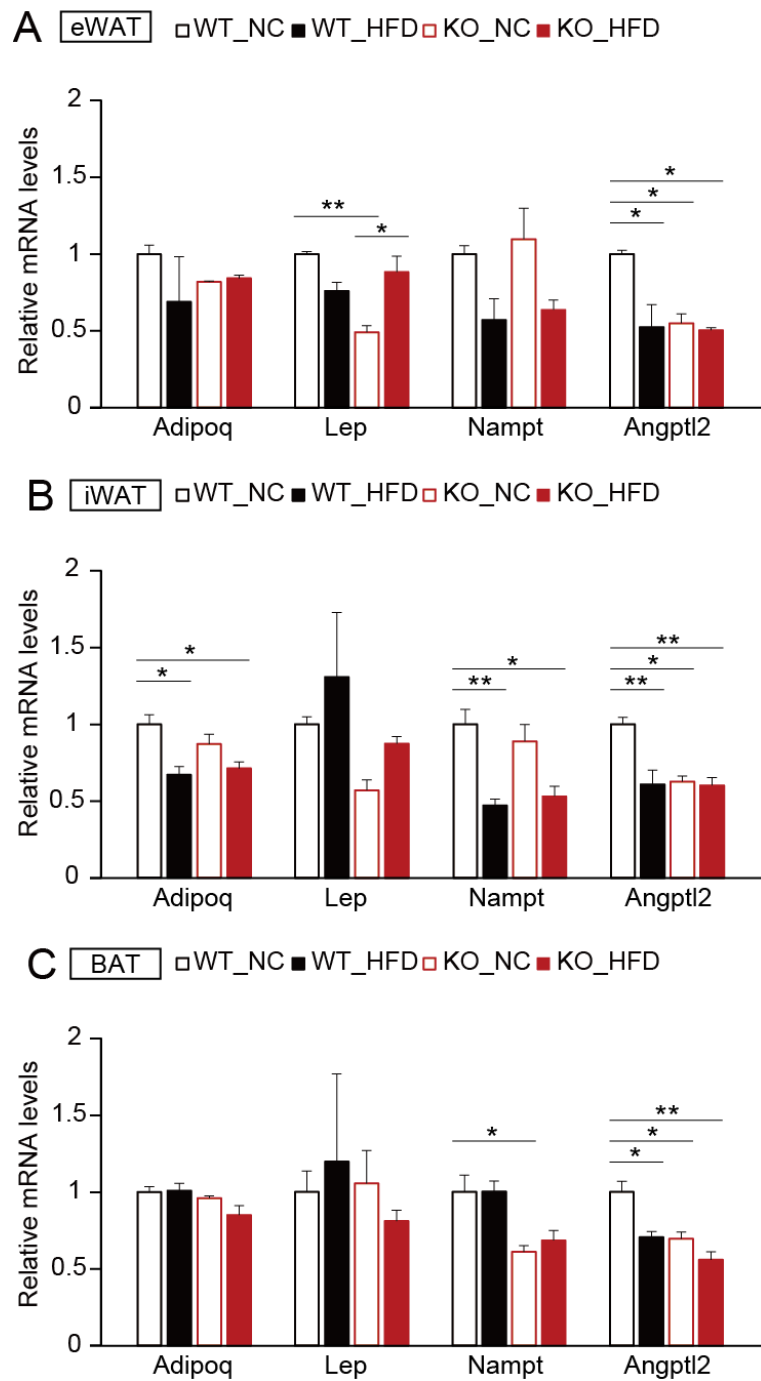


図 8 定量的リアルタイム PCR 法による高脂肪食負荷マウスの脂肪組織におけるアディポカイン mRNA の発現量解析. 通常食 (NC) または HFD を与えた野生型 (WT) マウスおよび全身-KO マウスの (A) eWAT、(B) iWAT、(C) BAT におけるアディポネクチン (*Adipoq*)、レプチン (*Lep*)、ビスファチン (*Nampt*)、アンギオポエチンライク 2 (*Angptl2*) の mRNA 発現量. 結果はそれぞれ WT\_NC の平均値を 1 とし、3 個体の平均値±S.E.M.で表示する. One-way ANOVA with Tukey *post hoc* test により統計解析を行った. \*P<0.05, \*\*P<0.01

そこで、野生型マウスと全身-KO マウスの脂肪組織におけるアディポカイン発現量の変動に、脂肪組織の PER2 が関与しているのかについて検討するため、AT-CKO マウスの脂肪組織におけるアディポカインの発現量を比較した (図 9)。まず、野生型マウスと全身-KO マウスを比較すると、先述の結果と合致して、eWAT の *Lep* および *Angptl2*、iWAT の *Angptl2*、BAT の *Nampt* および *Angptl2* の発現は全身-KO マウスにおいて有意に低下していた。また、eWAT の *Adipoq* についても、全身-KO マウスにおいて有意な低下が確認された。しかし、AT-CKO マウスの eWAT においては、いずれのアディポカインについても野生型マウスと比べて有意な発現変動は確認されず、全身-KO マウスと比較して発現量が多かった。一方、iWAT の *Angptl2*mRNA は、全身-KO マウスだけでなく AT-CKO マウスにおいても野生型マウスに比べて有意に低下していた。このことは、脂肪組織の PER2 が iWAT における *Angptl2* の発現を制御することを示唆する。また、BAT の *Nampt* および *Angptl2* の発現についても、AT-CKO マウスにおいて全身-KO マウスと同様に低下する傾向があったことから、脂肪組織の PER2 が BAT における *Nampt* および *Angptl2* の発現を制御する可能性がある。

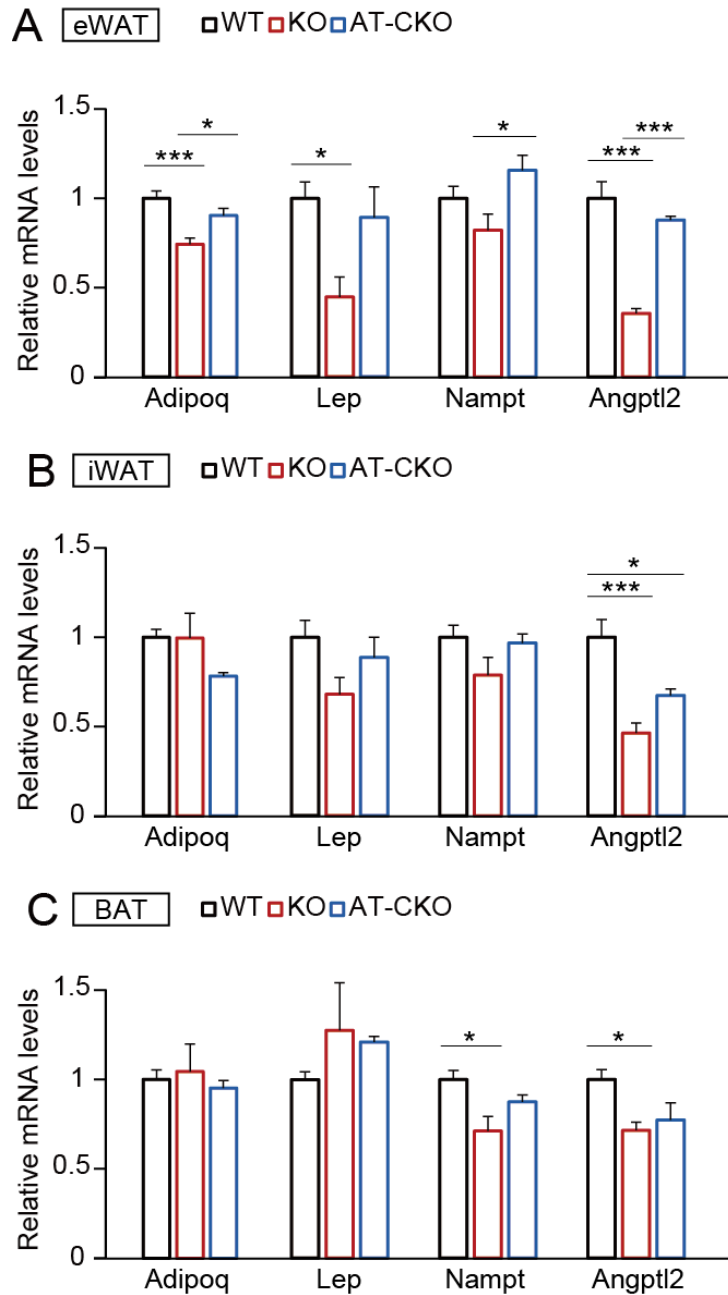


図 9 定量的リアルタイム PCR 法による *Per2* CKO マウス脂肪組織のアディポカイン mRNA の発現量解析. 野生型(WT)マウス、全身-KO マウス、AT-CKO マウスの (A) eWAT、(B) iWAT、(C) BAT におけるアディポネクチン (*Adipoq*)、レプチン (*Lep*)、ビスファチン (*Nampt*)、アンギオポエチンライク 2 (*Angptl2*) の mRNA 発現量。結果は WT の平均値を 1 とし平均値±S.E.M.で表示する。(WT は n=4、ただし BAT の *Nampt* は n=3、全身-KO の eWAT・BAT は n=4、iWAT は n=5、AT-CKO は n=4、ただし eWAT の *Lep* は n=3) One-way ANOVA with Tukey *post hoc* test により統計解析を行った。\*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001

## 2.4 考察

本章では、組織特異的な PER2 の生理機能を解明することを目的として、SCN-CKO マウスおよび AT-CKO マウスを作製した。SCN-CKO マウスの行動測定実験により、SCN の PER2 が概日行動周期長の決定に関与していることがわかった。また、AT-CKO マウスを用いたアディポカイン発現量の測定実験により、脂肪組織の PER2 が iWAT における *Angptl2* の発現を制御する可能性を見出した。

全身で *Per2* を欠損したマウスは、概日行動周期長が野生型マウスなどの対照群のマウスよりも 2 時間程度短く、およそ 22 時間であった (図 6)。SCN-CKO マウスも対照群よりも有意に短い行動周期長を示したが、それはおよそ 23 時間であり、全身-KO マウスほど短くなかった (図 6)。また、全身-KO マウスの恒暗条件下での概日行動リズム (特に行動開始点) は不安定であり、概日行動リズムを消失したマウスもいたが、SCN-CKO マウスでは行動開始点は全身-KO マウスほど不安定ではなく、3 週間の恒暗条件下で概日行動リズムを失う個体は確認されなかった。このように、SCN-CKO マウスの表現型は全身-KO マウスほど顕著ではなかった。これは、SCN-CKO マウスの SCN の全ての細胞において PER2 が完全には欠損されておらず、細胞によっては残存している PER2 が機能するために、SCN-CKO マウスの表現型は野生型マウスと全身-KO マウスの中間の概日行動周期長になるという可能性が考えられる。しかし、脳切片の PER2 免疫染色を行ったところでは、全身-KO マウスと同様に、SCN-CKO マウスの SCN において PER2 のシグナルは一切検出されなかった (図 4) ので、本章の実験結果は SCN 以外の組織の PER2 が概日行動周期長の決定に関与する可能性を示唆する。この可能性について検証する一つの方法は、SCN のみを取り出してその固有の振動周期を測定可能な SCN スライス培養の手法である<sup>40</sup>。具体的には、全身-KO マウスおよび SCN-CKO マウスを *Per1* プロモーター駆動でルシフェラーゼを発現するレポーターマウス<sup>58</sup> と掛け合わせ、そこから作製した SCN スライス培養を用いて、ルシフェラーゼ発光によりそれぞれの SCN の固有の概日振動周期長を測定するという実験である。SCN 以外の組織が SCN の概日振動周期長に寄与しているとすれば、全身-KO マウスの SCN と SCN-CKO マウスの SCN は同じ概日振動周期長を示すことが期待される。

全身-KO マウスは野生型マウスと比較して低体重であり、HFD を与えても野生型マウスのような体重増加は認められなかった (図 7A)。全身-KO マウスが肥満症状を示さなかった原因を探索するためには、摂食量や行動量、呼吸商の測定などを行ってエネルギーの摂取量や消費量を評価するとともに、野生型マウスとは異なる振る舞いを示す臓器や組織を同定する必要があるだろう。本章においては、野生型マウスでは HFD 負荷による脂肪細胞の肥大化や肝臓における脂肪蓄積が認められたのに対して、全身-KO マウスではそのような変化が見られないことを述べた (図 7B)。また、野生型マウスと全身-KO マウスの脂肪組織において、アディポカインの発現量に差があることを示した (図 8, 9)。したがって、野生型マウスと全身-KO マウスの脂肪組織における違いが、全身-KO マウスにおける HFD

負荷による肥満の抑制に関与しているかもしれない。今後は、AT-CKO マウスに対して HFD を負荷した場合に体重増加が抑えられるのかを検討する価値があるだろう。また、AT-CKO マウスは正常な概日行動リズムを持つと考えられるが（図 6）、SCN-CKO マウスのような概日行動リズム異常マウスでは HFD 負荷に対して体重がどのように変動するのかについても極めて興味深い。

*Angptl2* は、通常食の野生型マウスに比べて HFD 負荷した野生型マウスにおいて発現が低下しており、全身-KO マウスにおいては食事に関わらず野生型マウスと比較して発現が低下していた（図 8）。*Angptl2* 遺伝子の産物であるアンギオポエチンライク 2 は、肥満に関連するインスリン抵抗性、脂質異常症、アテローム形成に関わる重要な炎症性メディエータである<sup>54,57,59,60</sup>。野生型マウスでは、HFD 負荷による肥満によって *Angptl2* の発現変動が起こると考えられるが、全身-KO マウスでは肥満にならなくても *Angptl2* の発現が変動し、野生型マウスの肥満状態と同様の状態になることで、肥満に続く局所・血管炎症などの病態が現れるかもしれない。このことは、*Per2* を全身で欠損したマウスが心血管系の異常を示すという過去の報告<sup>36,61,62</sup>との関連からも興味深い。しかし、アディポカインは主に脂肪組織において産生された後、細胞内や組織内だけでなく、分泌されて血中を循環し全身性にも作用するので<sup>54</sup>、アディポカインの作用を議論するためには血中タンパク質濃度および作用の応答性に関する検討も必要である。したがって、野生型マウスおよび全身-KO マウスにおける組織中および血中アディポカイン濃度やその作用標的の変動についてさらなる検討が必要だろう。

全身-KO マウスだけでなく、AT-CKO マウスの iWAT においても *Angptl2* の発現量が低下していたこと（図 9）は、脂肪組織の PER2 が iWAT の *Angptl2* の発現を制御すると強く示唆されることから極めて興味深い。脂肪組織における *Angptl2* の発現には概日リズムがあること<sup>63</sup>、*Angptl2* のプロモーター上には BMAL1:CLOCK が結合する E-box 配列が存在し、全身 *Cry* 欠損マウスでは脂肪組織における *Angptl2* 発現リズムが失われること<sup>64</sup>から、iWAT の PER2 が *Angptl2* の発現を制御する可能性は極めて高い。一方、E-box 制御型の遺伝子に関しては、PER2 欠損により発現が増加すると予想されるが、全身-KO マウスおよび AT-CKO マウスの iWAT では、ピーク時刻の ZT16 および CT16 に *Angptl2* の発現は低下した。24 時間を通して発現がどのように変動しているのかについても検討する必要があるが、脂肪組織の PER2 が E-box を介した制御以外にも、例えば核内受容体との結合を介して *Angptl2* の発現を促進するメカニズムが存在するのかもしれない。また、eWAT においては、全身-KO マウスで認められた *Angptl2* 発現量低下が AT-CKO マウスでは確認されなかった（図 9）。これは、*Adipoq-cre* による *Per2* の欠損効率が iWAT に比べて eWAT では低かったことにより、eWAT においては PER2 減少による *Angptl2* 発現の低下が緩やかであったことに起因する可能性がある。あるいは、*Angptl2* 発現制御において、iWAT では脂肪組織の PER2 が寄与しているのに対して、eWAT では脂肪組織以外の PER2 が関与している可能性も考えられる。



## 結論

第一章における本研究では、新たに PER2 抗体を作製し、MEF 細胞内の内在性 PER2 のリズムを 2 周期に渡って検出し、追跡することに成功した。これによって、MEF 細胞内の内在性 PER2 の自律振動を維持するためには、タンパク質合成が必要条件であることを実証した。

また、第二章における本研究では、独自に *Per2*CKO マウスを作製し、組織ごとの PER2 の生理機能を明らかにするために、組織特異的な *Per2* 欠損マウスを解析した。SCN-CKO マウスの概日行動解析により、概日時計の中枢である SCN の PER2 がマウスの概日行動周期長の決定に深く関与していることを示した。また、HFD 負荷により引き起こされる肥満に PER2 が寄与することを明らかにした。さらに、AT-CKO マウスの脂肪組織におけるアディポカインの発現解析から、脂肪組織の PER2 がアディポカインの発現に寄与していることを示した。

以上、第一章と第二章を通して、マウス PER2 抗体および *Per2* CKO マウスを作製し、時計遺伝子 PER2 の機能をより詳細に解析した。本研究の成果より、PER2 タンパク質を創薬標的とする研究の進展が期待され、本研究において作製し、タンパク質の追跡に有用な PER2 抗体、および組織特異的な *Per2* 欠損を可能にする *Per2*CKO マウスが、PER2 タンパク質の詳細な機能解析を加速させる重要な手段となるであろう。

# 実験材料と方法

## 第一章 実験材料と方法

### 細胞培養と薬剤処理

*Per2* を欠損した MEF 細胞<sup>65</sup> はテキサス大学 Cheng Chi Lee 先生よりご供与いただいた。マウス胚性線維芽細胞 (MEF 細胞) は 10% 牛胎児血清を添加した Dulbecco modified Eagle medium/Ham's F-12 (Nacalai Tesque) を用いて、37°C の 5% CO<sub>2</sub> 加湿した状態で培養した。定常状態のコンフルエントな細胞をアッセイするため、細胞を 1 ウェルあたり 1 × 10<sup>5</sup> cells となるように 24-well プレートへ均一に撒き、2 日後に実験を開始した。細胞を 3 時間のデキサメタゾン (DEX) 処理 (終濃度 200 nM) により同調させ、その後 DEX 無添加の培地に戻した (Time0)。記載のある場合には、CHX (終濃度 100 µg/ml) を培地に加えてタンパク質の翻訳を薬理的に阻害した。また、プロテアソーム阻害剤 MG-132 (終濃度 20 µM; Sigma-Aldrich; C2211) を CHX と同時に処理することで、プロテアソーム依存的なタンパク質分解を阻害した。サンプリングは 4 時間おきに行った。細胞はウェル毎に 1 × cOmplete Protease Inhibitor cocktail (Roche Diagnostics) を含む Laemmli バッファー (10 mM Tris-HCl, pH6.8, 154 mM NaCl, 2 mM ethylenediaminetetraacetic acid, 50 mM dithiothreitol, 6% glycerol, 2% sodium dodecyl sulfate) に直接溶解し、直ちに 95°C で 10 分加熱した。さらに、細胞生存確認のために、CHX を含む培地を 24、36、48 時間後に CHX 無添加の培地に交換し、6 時間の回復期間を経た後、3 時間の DEX 処理後に回収した。

### PER2 抗体とウェスタンブロット

抗 PER2 ウサギ抗血清は、グルタチオン S-トランスフェラーゼと融合したマウス PER2 タンパク質断片 (アミノ酸 882-1258 残基) に対して産生させた。この抗血清は、マルトース結合タンパク質と融合したマウス PER2 タンパク質断片をブロットしたフッ化ポリビニリデン (PVDF) 膜用いてアフィニティー精製した。PER2 検出のための SDS-PAGE は、7.5% のポリアクリルアミドゲル (E-R7.5L; ATTO) を用いて、15 mA で 45 分の後、30 mA で 75 分行い、タンパク質を十分に分離した。泳動後 PVDF 膜へ転写し、PER2 抗体 (終濃度 2 µg/ml)、β-Actin 抗体 (A5441, Sigma-Aldrich, 1:1000)、または Myc 抗体 (9E10, Santa Cruz Biotechnology, 1:200) を 1 次抗体として反応させた。2 次抗体として西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗ウサギまたはマウス IgG 抗体 (GE Healthcare, 1:5000 または 1:100000) を反応させ、ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) を用いて、LAS4000 (FUJIFILM) で検出した。免疫陽性バンドの化学発光強度の定量は Image Gauge (FUJIFILM) を用いて行った。

### トランスフェクション

PER2 の過剰発現のために、pCS2+MT ベクターへマウス PER2 タンパク質の全長 CDS を挿入した、Myc-PER2 発現コンストラクト (0.5 µg per well) を用いた。24-well プレートで 80%コンフルエントになった COS7 細胞へ、Lipofectamine LTX/PLUS (Life Technologies) を用いてトランスフェクションした。細胞はトランスフェクションの 24 時間後に回収した。

## 第二章 実験材料と方法

### 実験動物

マウスは明期 12 時間、暗期 12 時間の明暗周期に 2 週間以上同調させ、サンプリング前日より恒暗条件とし、組織を採取した。SCN を含む脳切片を用いた免疫染色のために、SCN 内の PER2 タンパク質量がピークとなる CT12 (Circadian Time, 行動開始点を CT12 と定義) および、トラフとなる CT20 において脳を採取した。また、末梢組織の定量的リアルタイム PCR 法のために、末梢組織の *Per2* mRNA 量がピークとなる CT16 において 13-15 週齢マウスの脂肪組織および肝臓を採取した。脂肪組織は、精巣上体周囲脂肪 (epididymal White Adipose Tissue; eWAT)、鼠径部脂肪 (inguinal White Adipose Tissue; iWAT)、褐色脂肪 (Brown Adipose Tissue; BAT) の 3 組織を採取した。対照として、野生型マウス (C57BL/6J, Japan Lab Animals Co.) を用い、実験にはオスマウスを用いた。マウスの取り扱いや実験は、京都大学大学院薬学研究科動物実験委員会の承認を得て行った。

### *Per2* コンディショナルノックアウト (CKO) マウスの作製

*Per2* 遺伝子のエクソン 10、11、12 を挟むように、イントロン中に loxP 配列を、その下流に ES 細胞のセレクションに利用するためにネオマイシン耐性遺伝子 (Neo) を挿入し、5' 側に 8 kb と 3' 側に 3 kb のホモロジーアームを有するターゲティングベクター (TV) を作製した。制限酵素 SalI により線状化した TV をエレクトロポレーション法により ES 細胞 (TT2 細胞(C57BL/6N × CBA)) へ導入し、標的部位への相同組み換えをサザンブロット法により確認した。組み換え陽性クローンから雄のキメラマウスを得て、雌の C57BL/6J マウスとの交配により F1 マウスを得た。さらに Neo を除去するため、F1 マウスと全身で *Flp* を発現するマウスとを交配した。その後近交系への純化のために、C57BL/6J との交配を 6 回以上行った。また、この過程で *Flp* が除かれたことを確認した。

全身ノックアウト (KO) マウスを作製するために、*Flox* 配列を持つマウスを、サイトメガロウイルスエンハンサーとニワトリ  $\beta$ -アクチンプロモーターの制御下で *Cre* リコンビナーゼを発現する (CAG-*cre*) マウスと交配した。またその後、近交系への純化のために、C57BL/6J との交配を 5 回以上行った。また、この過程で CAG-*cre* が除かれたことを確認した。

SCN 特異的に *Per2* を欠損させるため、SCN 特異的遺伝子の下流に *Cre* リコンビナーゼを導入した (*SCN-cre*) マウス (Jackson Laboratory) と *flox* 配列を持つマウスを掛け合わせた。また、脂肪組織特異的に *Per2* を欠損させるため、アディポネクチン *Adipoq* 遺伝子のプロモーター制御下で *Cre* リコンビナーゼを発現する (*Adipoq-cre*) マウス<sup>66</sup> (B6.FVB-Tg(*Adipoq-cre*)1Evdr/J, Jackson Laboratory) と *flox* 配列を持つマウスを掛け合わせた。SCN-CKO マウスおよび AT-CKO マウスは、*flox* 配列をホモで持ち、かつそれぞれ *SCN-cre* または *Adipoq-cre* をヘテロで有する。

作製した *Per2* CKO マウスの遺伝子型は PCR 法により決定した。*Per2* 遺伝子型決定のための PCR 法に用いたプライマーは、F1: 5'-GCTGCCTCCGTCATCTCTAC-3'、R1: 5'-ACACCAGGTCTCAGCCAGGA-3'、R2: 5'-GGAACTTCGGATCCTAGTGAACCTCTTC-3' の 3 本で、WT 配列から 740 bp、Flox 配列から 937 bp、KO 配列から 502 bp の PCR 産物が生成する。

#### 概日行動リズム解析

赤外線センサーを備えた行動測定ボックス内にてマウスを個別に飼育し、行動を測定した。マウスを 12 時間明期・12 時間暗期の条件で 10 日以上飼育して同調させた後、恒暗条件にて 3 週間以上行動を記録した。マウスの行動は、Clocklab ソフトウェア (Actimetrics) を用いて解析し、恒暗条件下の行動について X 二乗法により概日行動周期長を得た。

#### 高脂肪食 (HFD) 負荷実験

マウスを個別のケージにて、12 時間明期・12 時間暗期の条件で飼育した。6 週齢の野生型マウスおよび全身-KO マウスに、10 週間にわたり HFD (60 kcal% Fat, Research Diets Inc., D12492) を *ad lib.* で与え、週に一度体重を測定した。HFD 負荷したマウス組織のヘマトキシリン・エオジン染色のために、20 週間通常食または HFD を与えたマウス (26 週齢) の脂肪組織および肝臓を採取しパラフィンへ包埋した。また、定量的リアルタイム PCR 法のために、12 週間通常食または HFD を与えたマウス (18 週齢) から、ZT16 (Zeitgeber Time, 暗期開始点を ZT12 と定義) において脂肪組織を採取した。

#### サザンブロット法

マウスの尾を 250 µg/ml proteinase K を含む溶解液中にて 50°C で 1 晩溶解し、フェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿によりゲノムを精製した。10 µg のゲノムを 40 U の制限酵素 *ApaI* により 1 晩消化し、その全量を 0.8% アガロースゲルを用いた電気泳動により 1 晩かけて分離した後、ナイロンメンブレン (GeneScreen Plus, Perkin Elmer) へ転写した。<sup>32</sup>P-dCTP 標識したプローブと 60°C で 1 晩ハイブリダイズさせたメンブレンを、イメージングプレートに露光させ、BAS5000 (FUJIFILM) を用いてオートラジオグラムを得た。

#### 免疫染色

マウスを生理食塩水の灌流により脱血後、4% パラホルムアルデヒド含有 0.1 M リン酸緩衝液 (4% PFA) を用いて灌流固定した。脳を摘出し、4% PFA 中にて 4°C で浸漬固定後、凍結保護のために 20% スクロース含有 0.1 M リン酸緩衝液を 4°C で浸透させた。脳を凍結し、クリオスタットを用いて SCN を含む 30 µm の冠状面切片を作製した。切片は、0.1 M リン酸緩衝液 (0.1 M PBS)、続いて 0.3% Triton を含む 0.1 M PBS (PBS-T) により洗浄

および透過処理し、内在性ペルオキシダーゼを不活化するために 0.3% 過酸化水素により処理した。その後、PBS-T により洗浄し、Rabbit polyclonal anti-PER2 抗体 (PER21-A, Alpha Diagnostics, 1:500) を 4°C で 3 晩反応させた。一次抗体を PBS-T で洗浄後、ビオチン標識 goat anti-Rabbit IgG 抗体 (BA-1000, VECTOR LABORATORIES, 1:1000) を 4°C で 1 晩反応させた。二次抗体を PBS-T で洗浄後、VECTASTAIN Elite ABC HRP Kit (PK-6100, VECTOR LABORATORIES) を 90 分反応させた後、DAB により発色させた。

#### ヘマトキシリン・エオジン染色

パラフィンへ包埋した組織から、ミクロトームを用いて 5 μm の切片を作製し、脱パラフィン後水和した。ヘマトキシリン染色液にて 10 分染色後、流水により 10 分間の脱染を行った。その後、エオジン染色液にて 2 分染色後、流水にて 5 分洗浄後、80 %エタノールにより 3 分間の脱染を行った。

#### 定量的リアルタイム PCR 法

精製した RNA を、SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit (Invitrogen) により逆転写し cDNA を合成した。リアルタイム PCR は THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO) を用いて StepOnePlus (Applied Biosystems) にて行った。*Per2* および各種アディポカインの mRNA 量はハウスキーピング遺伝子 *Rplp0* により標準化した。リアルタイム PCR に用いたプライマーは表 1 に示す通りである。

表 1 リアルタイム PCR に使用したプライマーの配列

RefSeq ID	Gene symbol	Primer sequences (5'→3')	Product size (bp)
NM_011066	<i>Per2</i>	F: CCATCCACAAGAAGATCCTAC	128
		R: GCTCCACGGGTTGATGAAGC	
NM_009605	<i>Adipoq</i>	F: TGTACGATTGTCAGTGGATC	104
		R: CAGTTGTAGTAACGTCATC	
NM_008493	<i>Lep</i>	F: AGACCATTGTCACCAGGATC	137
		R: CTTGGACAAACTCAGAATG	
NM_021524	<i>Nampt</i>	F: TTTTGAACACATAGTAACACAGTTCTCATC	101
		R: GGTCTTCACCCCATATTTTCTCA	
NM_011923	<i>Angptl2</i>	F: AGAGTGACCAGAATCTGAAG	113
		R: TTGCAGGCAGTCTCTCCATG	
NM_007475	<i>Rplp0</i>	F: CTCACTGAGATTCGGGATATG	223
		R: CTCCCACCTTGTCTCCAGTC	

## 引用文献

1. Dunlap JC. Molecular bases for circadian clocks. *Cell*. (1999) **96**, 271-290.
2. Okamura H, Yamaguchi S, Yagita K. Molecular machinery of the circadian clock in mammals. *Cell Tissue Res*. (2002) **309**, 47-56.
3. Reppert SM, Weaver DR. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature*. (2002) **418**, 935-941.
4. 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*. (1998) **20**, 1103-10.
5. Zheng B, Larkin DW, Albrecht U, Sun ZS, Sage M, Eichele G, Lee CC, Bradley A. The mPer2 gene encodes a functional component of the mammalian circadian clock. *Nature*. (1999) **400**, 169-173.
6. Shearman LP, Sriram S, Weaver DR, Maywood ES, Chaves I, Zheng B, Kume K, Lee CC, van der Horst GTJ, Hastings MH, Reppert SM. Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. *Science*. (2000) **288**, 1013-1019.
7. Bae K, Jin X, Maywood ES, Hastings MH, Reppert SM, Weaver DR. Differential function of mPer1, mPer2, and mPer3 in the SCN circadian clock. *Neuron*. (2001) **30**, 525-536.
8. Zheng B, Albrecht U, Kaasik K, Sage M, Lu W, Vaishnav S, Li Q, Sun ZS, Eichele G, Bradley A, Lee CC. Nonredundant roles of the mPer1 and mPer2 genes in the mammalian circadian clock. *Cell*. (2001) **105**, 683-694.
9. Lee C, Etchegaray JP, Cagampang FR, Loudon AS, Reppert SM. Posttranslational mechanisms regulate the mammalian circadian clock. *Cell*. (2001) **107**, 855-67.
10. Lowrey PL, Shimomura K, Antoch MP, Yamazaki S, Zemenides PD, Ralph MR, Menaker M, Takahashi JS. Positional syntenic cloning and functional characterization of the mammalian circadian mutation tau. *Science*. (2000) **288**, 483-92.
11. Toh KL, Jones CR, He Y, Eide EJ, Hinze WA, Virshup DM, Ptáček LJ, Fu YH. An hPer2 phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phase syndrome. *Science*. (2001) **291**, 1040-3.
12. Eide EJ, Woolf MF, Kang H, Woolf P, Hurst W, Camacho F, Vielhaber EL, Giovanni A, Virshup DM. Control of mammalian circadian rhythm by CKIepsilon-regulated proteasome-mediated PER2 degradation. *Mol Cell Biol*. (2005) **25**, 2795-807.

13. Meng QJ, Logunova L, Maywood ES, Gallego M, Lebiecki J, Brown TM, Sládek M, Semikhodskii AS, Glossop NR, Piggins HD, Chesham JE, Bechtold DA, Yoo SH, Takahashi JS, Virshup DM, Boot-Handford RP, Hastings MH, Loudon AS. Setting clock speed in mammals: the CK1 epsilon tau mutation in mice accelerates circadian pacemakers by selectively destabilizing PERIOD proteins. *Neuron*. (2008) **58**, 78-88.
14. Etchegaray JP, Machida KK, Noton E, Constance CM, Dallmann R, Di Napoli MN, DeBruyne JP, Lambert CM, Yu EA, Reppert SM, Weaver DR. Casein kinase 1 delta regulates the pace of the mammalian circadian clock. *Mol Cell Biol*. (2009) **29**, 3853-66.
15. Isojima Y, Nakajima M, Ukai H, Fujishima H, Yamada RG, Masumoto KH, Kiuchi R, Ishida M, Ukai-Tadenuma M, Minami Y, Kito R, Nakao K, Kishimoto W, Yoo SH, Shimomura K, Takao T, Takano A, Kojima T, Nagai K, Sakaki Y, Takahashi JS, Ueda HR. CKIepsilon/delta-dependent phosphorylation is a temperature-insensitive, period-determining process in the mammalian circadian clock. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (2009) **106**, 15744-9.
16. Lee H, Chen R, Lee Y, Yoo S, Lee C. Essential roles of CKIdelta and CKIepsilon in the mammalian circadian clock. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (2009) **106**, 21359-64.
17. Jones CR, Campbell SS, Zone SE, Cooper F, DeSano A, Murphy PJ, Jones B, Czajkowski L, Ptacek LJ. Familial advanced sleep-phase syndrome: A short period circadian rhythm variant in humans. *Nat Med*. (1999) **5**, 1062-1065.
18. Xu Y, Padiath QS, Shapiro RE, Jones CR, Wu SC, Saigoh N, Ptacek LJ, Fu YH. Functional consequences of a CKIdelta mutation causing familial advanced sleep phase syndrome. *Nature*. (2005) **434**, 640-644.
19. Tomita J, Nakajima M, Kondo T, Iwasaki H. No transcription-translation feedback in circadian rhythm of KaiC phosphorylation. *Science*. (2005) **307**, 251-4.
20. Akashi M, Tsuchiya Y, Yoshino T, Nishida E. Control of intracellular dynamics of mammalian period proteins by casein kinase I epsilon (CKIepsilon) and CKIdelta in cultured cells. *Mol Cell Biol*. (2002) **22**, 1693-703.
21. Yagita K, Tamanini F, Yasuda M, Hoeijmakers JH, van der Horst GT, Okamura H. Nucleocytoplasmic shuttling and mCRY-dependent inhibition of ubiquitylation of the mPER2 clock protein. *Embo J*. (2002) **21**, 1301-14.
22. Yamamoto Y, Yagita K, Okamura H. Role of cyclic mPer2 expression in the mammalian cellular clock. *Mol Cell Biol*. (2005) **25**, 1912-21.
23. Johnson CH, Stewart PL, Egli M. The cyanobacterial circadian system: from biophysics to bioevolution. *Annu Rev Biophys*. (2011) **40**, 143-67.



24. Khalsa SB, Whitmore D, Block GD. Stopping the circadian pacemaker with inhibitors of protein synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (1992) **89**, 10862-6.
25. Nishide SY, Ono D, Yamada Y, Honma S, Honma K. De novo synthesis of PERIOD initiates circadian oscillation in cultured mouse suprachiasmatic nucleus after prolonged inhibition of protein synthesis by cycloheximide. *Eur J Neurosci.* (2012) **35**, 291-9.
26. Fujimoto Y, Yagita K, Okamura H. Does mPER2 protein oscillate without its coding mRNA cycling?: post-transcriptional regulation by cell clock. *Genes Cells.* (2006) **11**, 525-30.
27. Dibner C, Sage D, Unser M, Bauer C, d'Eysmond T, Naef F, Schibler U. Circadian gene expression is resilient to large fluctuations in overall transcription rates. *Embo J.* (2009) **28**, 123-34.
28. Tainaka M, Hamada S, Okamura H. Circadian clock and Cancer. *IGAKU NO AYUMI.* (2011) **239**, 891-6.
29. Schernhammer ES, Laden F, Speizer FE, Willett WC, Hunter DJ, Kawachi I, Colditz GA. Rotating night shifts and risk of breast cancer in women participating in the nurses' health study. *J Natl Cancer Inst.* (2001) **93**, 1563-8.
30. Kubo T, Oyama I, Nakamura T, Shirane K, Otsuka H, Kunimoto M, Kadowaki K, Maruyama T, Otomo H, Fujino Y, Matsumoto T, Matsuda S. Retrospective cohort study of the risk of obesity among shift workers: findings from the Industry-based Shift Workers' Health study, Japan. *Occup Environ Med.* (2011) **68**, 327-31.
31. Lee S, Donehower LA, Herron AJ, Moore DD, Fu L. Disrupting circadian homeostasis of sympathetic signaling promotes tumor development in mice. *PLoS One.* (2010) **5**, e10995.
32. Sahar S, Sassone-Corsi P. Metabolism and cancer: the circadian clock connection. *Nat Rev Cancer.* (2009) **9**, 886-96.
33. Doi M, Takahashi Y, Komatsu R, Yamazaki F, Yamada H, Haraguchi S, Emoto N, Okuno Y, Tsujimoto G, Kanematsu A, Ogawa O, Todo T, Tsutsui K, van der Horst GTJ, Okamura H. Salt-sensitive hypertension in circadian clock-deficient Cry-null mice involves dysregulated adrenal Hsd3b6. *Nat Med.* (2010) **16**, 67-74.
34. Turek FW, Joshu C, Kohsaka A, Lin E, Ivanova G, McDearmon E, Laposky A, Losee-Olson S, Easton A, Jensen DR, Eckel RH, Takahashi JS, Bass J. Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice. *Science.* (2005) **308**, 1043-5.
35. Marcheva B, Ramsey KM, Buhr ED, Kobayashi Y, Su H, Ko CH, Ivanova G, Omura C, Mo S, Vitaterna MH, Lopez JP, Philipson LH, Bradfield CA, Crosby SD, JeBailey L, Wang X, Takahashi JS, Bass J. Disruption of the clock components CLOCK and

- BMAL1 leads to hypoinsulineamia and diabetes. *Nature*. (2010) **466**, 627-631.
36. Eckle T, Hartman K, Bonney S, Reithel S, Mittelbronn M, Walker LA, Lowes BD, Han J, Borchers CH, Buttrick PM, Kominsky D, Colgan SP, Eltzsching HK. Adora2b-elicited Per2 stabilization promotes a HIF-dependent metabolic switch crucial for myocardial adaptation to ischemia. *Nat Med*. (2012) **18**, 774-782.
  37. Yagita K, Tamanini F, van der Horst GTJ, Okamura H. Molecular mechanisms of the biological clock in cultured fibroblasts. *Science*. (2001) **292**, 278-292.
  38. Brown SA, Fleury-Olela F, Nagoshi E, Hauser C, Juge C, Meier CA, Chicheportiche R, Dayer JM, Albrecht U, Schibler U. The period length of fibroblast circadian gene expression varies widely among human individuals. *PLoS Biol*. (2005) **3**, e338.
  39. Schibler U, Sassone-Corsi P. A web of circadian pacemakers. *Cell*. (2002) **111**, 919-922.
  40. Yamaguchi S, Isejima H, Matsuo T, Okura R, Yagita K, Kobayashi M, Okamura H. Synchronization of cellular clocks in the suprachiasmatic nucleus. *Science*. (2003) **302**, 1408-12.
  41. Okamura H. Clock genes in cell clocks: roles, actions, and mysteries. *J Biol Rhythms*. (2004) **19**, 388-399.
  42. Schmutz I, Ripperger JA, Baeriswyl-Aebischer S, Albrecht U. The mammalian clock component PERIOD2 coordinates circadian output by interaction with nuclear receptors. *Genes Dev*. (2010) **24**, 345-357.
  43. Chawla A, Repa JJ, Evans RM, Mangelsdorf DJ. Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science*. (2001) **294**, 1866-1870.
  44. Grimaldi B, Bellet MM, Katada S, Astarita G, Hirayama J, Amin RH, Granneman JG, Piomelli D, Leff T, Sassone-Corsi P. PER2 controls lipid metabolism by direct regulation of PPARgamma. *Cell Metab*. (2010) **12**, 509-5.
  45. Shearman LP, Zylka MJ, Weaver DR, Kolakowski LF Jr, Reppert SM. Two period homologs: circadian expression and photic regulation in the suprachiasmatic nuclei. *Neuron*. (1997) **19**, 1261-9.
  46. Albrecht U, Sun ZS, Eichele G, Lee CC. A differential response of two putative mammalian circadian regulators, mper1 and mper2, to light. *Cell*. (1997) **91**, 1055-64.
  47. 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*. (1998) **3**, 167-76.
  48. Huang ZJ, Edery I, Rosbash M. PAS is a dimerization domain common to *Drosophila*

- period and several transcription factors. *Nature*. (1993) **364**, 259-62.
49. Crosthwaite SK, Dunlap JC, Loros JJ. Neurospora *wc-1* and *wc-2*: transcription, photoresponses, and the origins of circadian rhythmicity. *Science*. (1997) **276**, 763-9.
  50. 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*. (1997) **389**, 512-6.
  51. Zheng B, Larkin DW, Albrecht U, Sun ZS, Sage M, Eichele G, Lee CC, Bradley A. The *mPer2* gene encodes a functional component of the mammalian circadian clock. *Nature*. (1999) **400**, 169-73.
  52. Bae K, Jin X, Maywood ES, Hastings MH, Reppert SM, Weaver DR. Differential functions of *mPer1*, *mPer2*, and *mPer3* in the SCN circadian clock. *Neuron*. (2001) **30**, 525-36.
  53. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol*. (2011) **11**, 85-97.
  54. Stern JH, Rutkowski JM, Scherer PE. Adiponectin, Leptin, and Fatty Acids in the Maintenance of Metabolic Homeostasis through Adipose Tissue Crosstalk. *Cell Metab*. (2016) **23**, 770-84.
  55. Neumann E, Junker S, Schett G, Frommer K, Müller-Ladner U. Adipokines in bone disease. *Nat Rev Rheumatol*. (2016) **12**, 296-302.
  56. Ramsey KM, Yoshino J, Brace CS, Abrassart D, Kobayashi Y, Marcheva B, Hong HK, Chong JL, Buhr ED, Lee C, Takahashi JS, Imai S, Bass J. Circadian clock feedback cycle through NAMPT-mediated NAD<sup>+</sup> biosynthesis. *Science*. (2009) **324**, 651-4.
  57. Kadomatsu T, Endo M, Miyata K, Oike Y. Diverse roles of ANGPTL2 in physiology and pathophysiology. *Trends Endocrinol Metab*. (2014) **25**, 245-54.
  58. Yamaguchi S, Mitsui S, Miyake S, Yan L, Onishi H, Yagita K, Suzuki M, Shibata S, Kobayashi M, Okamura H. The 5' upstream region of *mPer1* gene contains two promoters and is responsible for circadian oscillation. *Curr Biol*. (2000) **10**, 873-6.
  59. Tabata M, Kadomatsu T, Fukuhara S, Miyata K, Ito Y, Endo M, Urano T, Zhu HJ, Tsukano H, Tazume H, Kaikita K, Miyashita K, Iwawaki T, Shimabukuro M, Sakaguchi K, Ito T, Nakagata N, Yamada T, Katagiri H, Kasuga M, Ando Y, Ogawa H, Mochizuki N, Itoh H, Suda T, Oike Y. Angiopoietin-like protein 2 promotes chronic adipose tissue inflammation and obesity-related systemic insulin resistance. *Cell Metab*. (2009) **10**, 178-88.
  60. Tian Z, Miyata K, Kadomatsu T, Horiguchi H, Fukushima H, Tohyama S, Ujihara Y, Okumura T, Yamaguchi S, Zhao J, Endo M, Morinaga J, Sato M, Sugizaki T, Zhu S, Terada K, Sakaguchi H, Komohara Y, Takeya M, Takeda N, Araki K, Manabe I,

- Fukuda K, Otsu K, Wada J, Murohara T, Mohri S, Yamashita JK, Sano M, Oike Y. ANGPTL2 activity in cardiac pathologies accelerates heart failure by perturbing cardiac function and energy metabolism. *Nat Commun.* (2016) **7**, 13016.
61. Viswambharan H, Carvas JM, Antic V, Marecic A, Jud C, Zaugg CE, Ming XF, Montani JP, Albrecht U, Yang Z. Mutation of the circadian clock gene *Per2* alters vascular endothelial function. *Circulation.* (2007) **115**, 2188-95.
62. Bhatwadekar AD, Yan Y, Qi X, Thinschmidt JS, Neu MB, Li Calzi S, Shaw LC, Dominiguez JM, Busik JV, Lee C, Boulton ME, Grant MB. *Per2* mutation recapitulates the vascular phenotype of diabetes in the retina and bone marrow. *Diabetes.* (2013) **62**, 273-82.
63. Kitazawa M, Nagano M, Masumoto KH, Shigeyoshi Y, Natsume T, Hashimoto S. Angiopoietin-like 2, a circadian gene, improves type 2 diabetes through potentiation of insulin sensitivity in mice adipocytes. *Endocrinology.* (2011) **152**, 2558-67.
64. Kadomatsu T, Uragami S, Akashi M, Tsuchiya Y, Nakajima H, Nakashima Y, Endo M, Miyata K, Terada K, Todo T, Node K, Oike Y. A molecular clock regulates angiopoietin-like protein 2 expression. *PLoS One.* (2013) **8**, e57921.
65. Fu L, Pelicano H, Liu J, Huang P, Lee C. The circadian gene *Period2* plays an important role in tumor suppression and DNA damage response in vivo. *Cell.* (2002) **111**, 41-50.
66. Eguchi J, Wang X, Yu S, Kershaw EE, Chiu PC, Dushay J, Estall JL, Klein U, Maratos-Flier E, Rosen ED. Transcriptional control of adipose lipid handling by IRF4. *Cell Metab.* (2011) **13**, 249-59.

## 謝辞

終わりに臨み、本研究の実施にあたり御鞭撻を賜り、実験環境を提供してくださいました京都大学薬学研究科 岡村 均教授に衷心より深甚なる謝意を表します。

実験手法や実験データ、および論文の作成において具体的な御助言、御指導を賜りました京都大学薬学研究科 土居 雅夫准教授、および山口 賀章助教に深く感謝の意を表します。

*Per2* コンディショナルノックアウトマウス作製において、懇篤なる御協力を賜りました、理化学研究所 発生・再生化学総合研究センター動物資源開発室 変異マウス開発ユニットの皆様へ深謝致します。

様々な御指摘、御支援および激励を頂きました京都大学薬学研究科 フスタ ミシェル 特定講師をはじめとする京都大学薬学研究科 システムバイオロジー分野の諸先輩方、秘書様、後輩の皆様へ、心より感謝致します。

最後に、常に暖かく見守り、研究に専念できる環境を与えてくれた父 誠、母 育美をはじめ、家族一同に深く御礼申し上げます。