

膵β細胞における時計遺伝子 *Dbp* と *E4bp4*
による *Arnt* の発現制御に関する研究

氏名 中林 容子

所属 山口大学大学院医学系研究科

応用医工学系専攻 病態制御内科学分野

平成 25 年 6 月

目次

1. 要旨	・ ・ ・ ・ ・ 2
2. 研究の背景	・ ・ ・ ・ ・ 3
3. 目的	・ ・ ・ ・ ・ 4
4. 方法	・ ・ ・ ・ ・ 4
5. 結果	・ ・ ・ ・ ・ 7
6. 考察	・ ・ ・ ・ ・ 12
7. 結語	・ ・ ・ ・ ・ 14
8. 謝辞	・ ・ ・ ・ ・ 14
9. 参考文献	・ ・ ・ ・ ・ 14

1. 要旨

Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocatr (ARNT)/ hypoxia-inducible factor-1 β (HIF-1 β) は 2 型糖尿病患者の膵ラ氏島で 82% 発現が低下し、膵 β 細胞特異的 *Arnt* 欠損マウスでインスリン分泌が低下することが報告されている。このことから、ARNT が膵 β 細胞機能にとって重要な遺伝子の一つであることは明確であるが、その発現制御に関してはまだ十分に解明されていない。一方、時計遺伝子の遺伝子改変マウスである *Clock* ^{Δ 19/ Δ 19} 変異マウス及び膵 β 細胞特異的 *Bmal1* 欠損マウスではインスリン分泌能が低下し、膵 β 細胞量も減少していることが報告され、時計遺伝子が膵 β 細胞機能の制御にも関わっていることがわかってきたがその詳細な分子機構についてもまだ明らかとはなっていない。

今回我々は、*Arnt* の発現が出力系の時計遺伝子である D-element binding protein (DBP) および E4 binding protein 4 (E4BP4) によって制御されることを新たに見出した。我々は、膵 β 細胞アポトーシスにより重度の糖尿病を発症する *Wfs1*^{-/-}*Ar/a* マウスの膵ラ氏島の遺伝子発現の解析を行い、*Wfs1*^{-/-}*Ar/a* マウスの膵ラ氏島においてこれらの時計遺伝子の発現が変化していることに着目した。Zeitgeber Time (ZT) 12 の時点で、*Wfs1*^{-/-}*Ar/a* マウスの膵ラ氏島では *Dbp* の発現が 50% 低下し、*E4bp4* の発現が 50% 増加するのと同時に *Arnt* の発現が 30% 低下していた。時計遺伝子 DBP は転写活性化因子、E4BP4 は転写抑制因子として D-box 配列を介して、下流の遺伝子を競合的に制御している。現在、これらのターゲットは数種類しか同定されておらず、膵 β 細胞におけるターゲットは全く未解明である。我々は、膵 β 細胞における時計遺伝子 DBP と E4BP4 のターゲットの候補として、一つが ARNT であるという仮説を立て検証を行った。膵ラ氏島において、*Arnt* の発現は微弱ながら ZT4 を頂値とした概日リズムを示していた。さらに我々は、in vivo で認められた遺伝子発現の変化が、DBP 及び E4BP4 の直接的な *Arnt* の発現制御によるものか否かを in vitro の系で検討した。HEK293 細胞あるいは MIN6 細胞に DBP を過剰発現させると、内因性 ARNT の蛋白発現および mRNA の発現が各々有意に増加した。MIN6 細胞を用いたレポータージーンアッセイでは、*Arnt* のプロモーターで誘導されるルシフェラーゼ活性は DBP の過剰発現によって 2.5 倍に増加し、E4BP4 過剰発現により、その作用は阻害された。MIN6 細胞を用いた ChIP アッセイでは、D-box 類似配列を有する *Arnt* のプロモーター領域に DBP および E4BP4 が結合することが示された。以上より、マウスの膵ラ氏島では *Arnt* の発現は概日リズムを示し、時計遺伝子により発現制御を受けていると考えられた。さらに糖尿病マウスである *Wfs1*^{-/-}*Ar/a* マウスの膵ラ氏島における *Dbp* の発現低下と *E4bp4* の発現増加は、*Arnt* の発現低下を介してこのマウスの糖尿病の進展に少なくとも部分的には関与していると考えられた。以上の結果より、ARNT が時計遺伝子群と膵 β 細胞機能を関連付ける遺伝子として機能している可能性が示唆された。

2. 研究の背景

時計遺伝子は体内時計を分子レベルで構成する遺伝子であり、その発現は細胞自律的に振動し、生物の生理機能および行動に概日リズムをもたらす。時計遺伝子が構成する転写・翻訳後調節の複雑なループ回路により、生物は環境の変化に対応することができる。哺乳類において、体内時計の中核は視交叉上核にあると考えられており、視交叉上核では時計遺伝子群による転写・翻訳フィードバックループにより概日リズムがコントロールされている。しかしながら、多くの研究により、肝臓、膵臓、腎臓、筋肉などの末梢組織にもそれぞれ体内時計が存在し、それら代謝を司る組織の時計遺伝子は体内時計の中核である視交叉上核よりも、摂食によって優位に支配されていることが明らかとなってきた[1][2][3][4][5]。また最近の研究では、体内時計の乱れが肥満や2型糖尿病などの代謝疾患に関与していることが明らかとなっており[6][7][8]、時計遺伝子機能が障害されたマウスは耐糖能障害をきたすことが報告されている[9][10][11]。最近報告された、膵臓特異的 *Bmal1* 欠損マウスがインスリン分泌不全による耐糖能障害をきたすという解析結果は、時計遺伝子が膵による糖代謝においても重要な役割を果たすことを決定づけるものであった[12][13]。行動リズムが正常であるにも関わらず膵臓特異的 *Bmal1* 欠損マウスは、全身型の時計遺伝子欠損マウスよりも高血糖を呈した。その解析によると、*Bmal1/Clock* はインスリン分泌過程の顆粒輸送や分泌に関与することが示唆されているが、その詳細な分子機構については未だ不明である。

末梢組織において、多くの遺伝子が時計遺伝子によって発現が制御されることが報告されている。時計遺伝子 DBP および E4BP4 は出力系の時計遺伝子であり、DBP は転写活性化因子、E4BP4 は転写抑制因子として機能し、同じ D-box に結合する[14]。現在、DBP/E4BP4 のターゲットは数種類しか同定されておらず、膵β細胞におけるターゲットは全く未解明である。膵β細胞における DBP と E4BP4 の機能解析を行い、ターゲット遺伝子を明らかにすることができれば、時計遺伝子と糖尿病発症の関係の分子機構解明につながると考えられる。

Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocatr (ARNT)は環境汚染物質によって活性化される AhR や低酸素状態で活性化される HIF-1 α などとヘテロダイマーを形成し、種々の遺伝子発現を誘導する転写因子である[15]。2型糖尿病患者においては、ARNT の発現が著明に低下しており、膵β細胞特異的 *Arnt* 欠損マウスや、*Arnt* ノックダウン MIN6 細胞の解析からも、*Arnt* がグルコース刺激性インスリン分泌(GSIS)において重要な役割を果たしていることが明らかになっている[16]。またマウスの膵ラ氏島や INS-1(832/13)細胞の解析から、高血糖が ARNT の発現を低下させることが報告されている。この報告において、Carbohydrate-responsive element-binding protein (ChREBP)がグルコース依存的に *Arnt* プロモーターに直接結合し、*Arnt* の発現を抑制することが示されている[17]。新たな ARNT

の発現を制御する因子を見出すことは、膵β細胞機能障害の新たな分子機構解明において極めて有意義であると考えられる。

本研究で、我々は、ARNTがDBPとE4BP4の直接的なターゲットとなりうることを明らかにした。マウスの膵ラ氏島において、*Dbp*と*E4bp4*のmRNA発現は明確な概日リズムを示し、*Arnt*のmRNAも、振幅は小さいものの有意な概日リズムを示した。*Wfs1^{-A/a}*マウス[18]の膵ラ氏島では、*Dbp*mRNAが減少、*E4bp4*mRNAが増加、同時に*Arnt*mRNAが減少していた。また培養細胞を用いた実験では、DBPの過剰発現により内因性*Arnt*の発現は増加し、*Arnt*のプロモーターが活性化されることを明らかにした。また、膵β細胞株であるMIN6細胞を用いたクロマチン免疫沈降法では、DBPとE4BP4が*Arnt*のプロモーター領域に直接結合することを見出した。これらの結果より、膵β細胞において時計遺伝子であるDBPとE4BP4は直接的にARNTの発現を制御している可能性があり、ARNTは時計遺伝子群と膵β細胞機能を関連付ける遺伝子として機能していることが示唆された。

3. 目的

近年、時計遺伝子と代謝の関連が注目されているが、今回、我々は出力系時計遺伝子であるDBPとE4BP4の膵β細胞における役割を解明することを目的とした研究に着手した。具体的には、膵β細胞において、*Arnt/Hif-1β*がDBPとE4BP4の直接的なターゲットであると考え、この可能性について検証した。

4. 方法

実験動物

すべての実験で、10週齢の雄マウスを使用した。マウスは室温24±1℃の飼育室内で、12時間毎の明暗サイクル下に飼育した(明期の始まりがZeitgeber Time (ZT) 0、暗期の始まりがZT12と定めた)。全ての飼育条件で自由摂水とし、給餌時刻を制限しない場合は自由摂食とした。*Wfs^{-A/a}*マウスの背景やgenotypingなどについては、我々がすでに報告している論文を参照されたい[18]。

時計遺伝子プラスミドおよびレポータープラスミド作製

American Type Culture Collection (ATCC)よりマウスcDNAクローンを購入し、インサートの配列を確認後、実験に使用した(pCMV-SPORT6-*Dbp*, pCMV-SPORT6-*E4bp4*, pCMV-SPORT6-*Rev-erbα*)。MIN6細胞より抽出したtotal RNAを用いてRT-PCRを行うことによってマウス*Rorα*及び*Rorγ*のcDNAフラグメントを得た後、QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen)で精製し、Ligation High (TOYOBO)を用いてpcDNA3ベクターに挿入した。マウス*Arnt*プロモーターでドライブされるルシフェラーゼレポータープラス

ミドは *Arnt* のプロモーター領域 (転写開始部位より約 2kb 上流まで) を pGL3 ベクターのマルチプルクローニングサイトに挿入することにより作製した。

膝ラ氏島単離

C56BL/6J マウスおよび *Wfs1^{-A/a}* マウスからの膝ラ氏島単離は、Ishihara らが報告している方法で行った[19]。

細胞培養

膝β細胞株である MIN6 細胞は DMEM High Glucose with 15%FBS 培地を、HEK293 細胞は DMEM High Glucose with 10% FBS 培地を使用した。いずれも 37℃、5%CO₂ に維持されたインキュベーター内で培養および継代を行った。

RNA の抽出

単離ラ氏島からの RNA は、ISOGEN を用いて一旦 RNA 抽出液を調整したのち、RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて最終的な RNA を抽出した。MIN6 細胞からの RNA は、RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて抽出した。抽出過程において RNase-Free DNase Set (Qiagen) を用いて DNase 処理を行った。

リアルタイム RT-PCR

Total RNA 60ng を用いて、逆転写反応を行った。逆転写反応には Superscript II (Invitrogen) を用いた。プライマーはすべてイントロンを挟むように作製し、PCR 産物が 80-120bp になるように設定した。PCR には SYBER Green Master Mix (Applied Biosystems) を用い、Applied Biosystems 7300 リアルタイム PCR システムを使用した。反応終了後、増幅曲線と融解曲線を確認し、Ct 値を決定した。ハウスキーピング遺伝子である *Gapdh* をコントロールとした ΔCt 法を用いて相対的な遺伝子発現量を算出した。

用いたプライマーの配列を以下に示す。

DBP forward: 5'-CTTTTGACCCCTCGGAGACAC-3'

DBP reverse: 5'-ACCTCCGGCTCCAGTACTTC-3'

E4BP4 forward: 5'-GGAGCAGAACCACGATAACC-3'

E4BP4 reverse: 5'-TTCCCCAGTCTTCTTTCAGG-3'

REV-ERBa forward: 5'-CCCTGGACTCCAATAACAACACA-3'

REV-ERBa reverse: 5'-GCCATTGGAGCTGTCACTGTAG-3'

ARNT forward: 5'-AGATTTACGTCCTCAACC-3'

ARNT reverse: 5'-GGAAGAACGAGTCTTGCTGT-3'

GAPDH forward: 5'-AGTATGACTCCACTCACGGCAA-3'

GAPDH reverse: 5'-TCTCGCTCCTGGAAGATGGT-3'

ルシフェラーゼアッセイ

Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega)のプロトコールに従って行った。MIN6細胞に *Arnt* プロモーター領域を組み込んだルシフェラーゼレポータープラスミドと LacZ あるいは時計遺伝子を発現するプラスミドを Lipofectamin Plus (Invitrogen)を用いてコトランスフェクションし、トランスフェクション後 48 時間で細胞を回収した。PBS で洗浄後、Passive Lysis Buffer で可溶化し、ルシフェラーゼ活性を測定した。ルシフェラーゼ活性は細胞蛋白質質量で補正した。

ウェスタンブロットティング

HEK293細胞に LacZ あるいは時計遺伝子を発現するプラスミドを Lipofectamine 2000 (Invitrogen)を用いてトランスフェクションし、48 時間後に細胞を回収した。細胞は PMSF、DTT 添加 Cell Lysis Buffer (Cell Signal Technology)にて可溶化し、蛋白質資料を調整した。マルチゲルII ミニ 4/20(コスモバイオ)を用いて SDS-PAGE を行い、ブロットティング用緩衝液(25mM トリス-192mM グリシン緩衝液, pH8.3, 20%メタノール)を用いてニトロセルロース膜 (GE Healthcare)に転写した。ブロッキングには 5%スキムミルクを含む TBS-T(10mM トリス緩衝液, pH7.4, 150mM NaCl, 0.1%Tween20)を使用した。免疫染色は、一次抗体として抗 ARNT 抗体(BD bioscience)、抗 DBP 抗体(AVIVA Systems Biology)、抗 E4BP4 抗体(Abcam)、抗 REV-ERB α 抗体(Abnova)、抗 α Tubulin 抗体(Sigma)、二次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG 抗体または抗ウサギ IgG 抗体(Jackson ImmunoReserch)を使用した。ECL Western Blotting Detection Regents (GH Healthcare)を用いて蛋白質を検出した。バンドの定量には Image J(National Institute of Health)を使用した。

クロマチン免疫沈降法(ChIP)

MIN6細胞を用いた ChIP は EZ-ChIP (Upstate)のプロトコールに従って行った。10 cm dish で培養した MIN6 細胞に 1%ホルムアルデヒドで DNA/蛋白質クロスリンクを行い、超音波処理にて DNA を断片化したのち、免疫沈降を行った。抗体は抗 ARNT 抗体(BD bioscience)、抗 DBP 抗体(AVIVA Systems Biology)、抗 E4BP4 抗体(Abcam)、抗 REV-ERB α 抗体(Abnova)を使用した。陰性コントロールとして normal rabbit IgG 抗体(Santa Cruz)、陽性コントロールとして抗アセチル化ヒストン H3 抗体 (Millipore)を使用した。Proteinase K にて消化後、0.2M NaCl, 65°Cにて DNA/蛋白質クロスリンクを外し、DNA を精製した。検出に用いるプライマーは PCR 産物が 400bp 程度になるようにし、*Arnt* のプロモーター上の D-box 類似配列および RORE 類似配列を含むように作製した。

検出に用いたプライマープライマーの配列を以下に示す。

-2052/-1653 forward : 5'- AATTGTGTTCCAATACTCAGGTG-3'
-2052/-1653 reverse : 5'- CCTAACATCCCAAGATCCAATG-3'
-1576/-1187 forward : 5'- CAGACTGACAACAAGCCAAAG-3'
-1576/-1187 reverse : 5'- ACTCAGGAGGCAGAGACTGG-3'
-1021/-604 forward : 5'- GACCTCTGCTTGCTCCAATC-3'
-1021/-604 reverse : 5'- CCTCCAAAAGTGAGGTGTCC-3'
Mouse PCK forward : 5'- GAGTGACACCTCACAGCTGTGG-3'
Mouse PCK reverse : 5'- GGCAGGCCTTTGGATCATAGCC-3'

統計処理

データは平均±標準誤差で示した。2群間の平均の有意差検定には、Studentのt検定を用いた。多重比較検定は、ANOVA法とポストホックテストとしてTukey-Kramer法を用いて検定した。帰無仮説が5%未満の確率で棄却されるとき、有意差ありと判断した。

5. 結果

Wfs1^{-/-}Av/a マウスは全身性にインスリン抵抗性を賦与することにより、膵β細胞における小胞体ストレスが惹起され、8週齢頃より、膵β細胞量の減少とインスリン分泌不全を伴った顕性糖尿病を発症する[18]。我々のグループは、この膵β細胞量減少はアポトーシスによるものであることを合わせて報告してきた[18]。また、*Wfs1^{-/-}*マウスではグルコース応答性のインスリン分泌も障害されている。しかしながら、このインスリン分泌障害の分子機構についてはいまだ明らかとはなっていない。我々は、10週齢の*Wfs1^{-/-}Av/a*マウスの膵ラ氏島を用いてマイクロアレイを行い、*Wfs1^{-/-}Av/a*マウスの膵ラ氏島では、*Wfs1^{+/+}Av/a*マウスの膵ラ氏島と比較し、*Dbp*の発現が減少し、*E4bp4*の発現が増加していることを見出した(data not shown)。我々は、この遺伝子発現の差異が*Wfs1^{-/-}Av/a*マウスで認められる膵β細胞機能障害に関与しているのではないかと考えた。*Dbp*と*E4bp4*は時計遺伝子の出力系として知られている。最初に我々は、これらの時計遺伝子が膵β細胞においても概日リズムを刻んでいるのかを検証した。野生型マウス(C57BL/6J)の単離ラ氏島を用い、リアルタイムRT-PCRを行った。ZT0から4時間ごとに膵ラ氏島を単離し、mRNAを抽出した。ZT0時の値を基準として相対的発現量を算出した。図1Aに示すように、*Dbp*および*E4bp4*は明確な概日リズムを示した。*Dbp*の発現量はZT12で最大、ZT0で最小となり、その比率は35倍であった。一方、*E4bp4*は*Dbp*と逆位相の振動パターンを示し、ZT0時で最大、ZT12時で最小となり、その比率は10倍であった。また、時計関連遺伝子*Rev-erbα*も明確な概日リズムを示しており、ZT8時の発現はZT0時の27倍であった(図1A)。*Rev-erbα*は肝臓、脂肪組織、筋肉、膵臓といった臓器における代謝制御で重要な役割を果たしていることが知られている転写抑制因子で、RORE配列を介して下流の遺伝子発現を制御し

ている。*Arnt* 自体は時計遺伝子とは考えられてはいないものの、*Clock* や *Bmal1* と相同性が高く、同じ bHLH-PAS ファミリーに属する。マウスの胼ラ氏島において、*Arnt* の発現にも微弱ながらも概日リズムが認められた(図 1A)。*Arnt* の発現は ZT4 時で最大、ZT16 時で最小となり、ZT4 時の発現は ZT16 時の 1.5 倍であった。

次に我々は、*Wfs1^{-/-}A^{y/a}* マウスの胼ラ氏島における時計遺伝子 *Dbp* と *E4bp4*、*Rev-erb α* と *Arnt* の発現量を解析するためにリアルタイム RT-PCR を行った。図 1B に示すように、ZT0 時において、*Wfs1^{-/-}A^{y/a}* では *Dbp*、*Rev-erb α* として *Arnt* の発現量がそれぞれ野生型の 0.4 倍、0.3 倍、0.5 倍と有意に減少していたが、ZT0 時において *E4bp4* の発現には有意差を認めなかった(図 1B)。ZT12 時においては、*Wfs1^{-/-}A^{y/a}* で *Dbp*、*Rev-erb α* として *Arnt* の発現量が野生型の 0.4 倍、0.5 倍、0.8 倍と有意に減少していた。また、*E4bp4* の発現量は野生型の 1.6 倍と有意に増加していた(図 1B)。

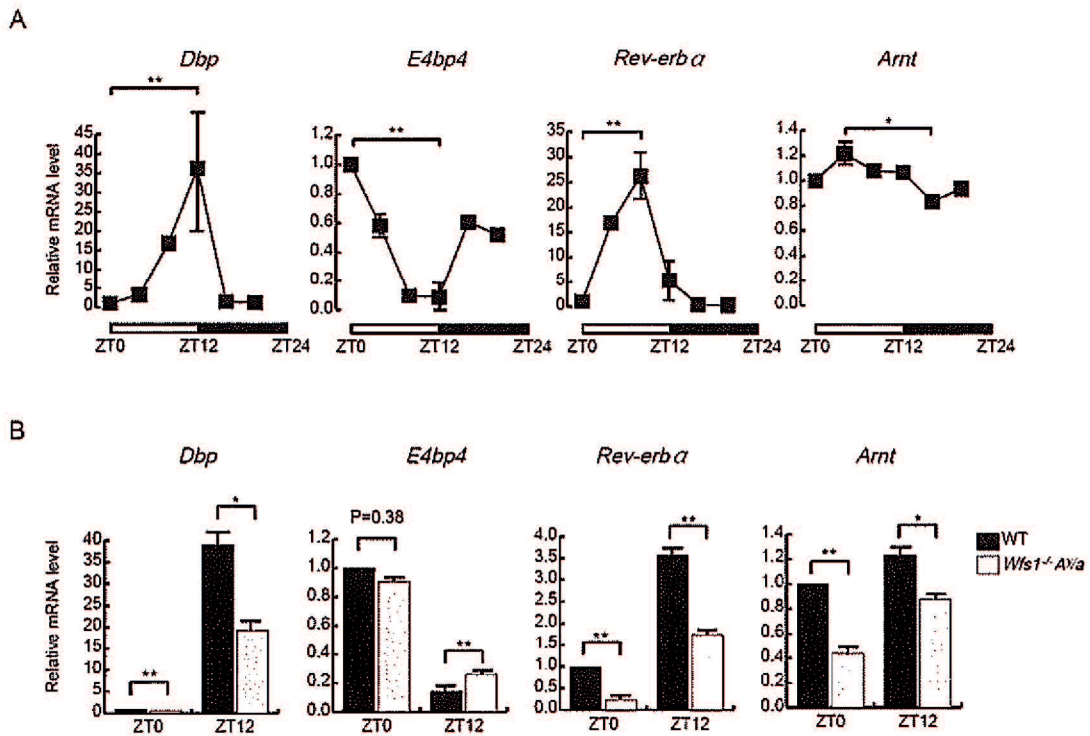


図 1. マウスの単離ラ氏島における *Dbp*、*E4bp4*、*Rev-erb α* 、*Arnt* の mRNA の発現量の解析。

単離ラ氏島における mRNA の発現量をリアルタイム RT-PCR を用いて解析した。ZT0 時における発現量を 1 として mRNA を定量化した(明期の始まりが ZT0、暗期の始まりが ZT12)。(A)野生型マウスにおいて、*Dbp*、*E4bp4*、*Rev-erb α* および *Arnt* の発現は概日リズムを示した(n=3、平均±標準誤差、*P<0.05、**P<0.01)。(B) ZT0 時および ZT12 時に単離した *Wfs1^{-/-}A^{y/a}* マウスの胼ラ氏島では、*Dbp*、*Rev-erb α* 、*Arnt* の発現が有意に低下していた。ZT0 時の *E4bp4* の発現量は、*Wfs1^{-/-}A^{y/a}* マウスと野生型マウスで差は認められなかったが、ZT12 時の *E4bp4* の発現量は、*Wfs1^{-/-}A^{y/a}* マウスにおいて有意に増加していた(n=3-4、平均±標準誤差、*P<0.05、**P<0.01)。

さらに我々は、培養細胞を用いて時計遺伝子の過剰発現が *Arnt* の発現に与える影響について検討した。HEK293 細胞に時計遺伝子発現プラスミドをリポフェクション法により導入し、ウェスタンブロットで内因性 ARNT の蛋白量を定量した。DBP を過剰発現させると、内因性 ARNT の発現量は 2 倍に増加した(図 2A、B)。E4BP4 と REV-ERB α の過剰発現では内因性 ARNT の発現量は変化しなかった(図 2A、B)。また、MIN6 細胞にリポフェクション法で時計遺伝子発現プラスミドを導入し、リアルタイム RT-PCR を用いて内因性 *Arnt* mRNA 発現量を定量した。DBP の過剰発現により、内因性 *Arnt* mRNA は 1.2 倍ではあるが有意に増加していた(図 2C)。E4BP4 と REV-ERB α の過剰発現は内因性 *Arnt* mRNA の発現量に影響しなかった(図 2C)。

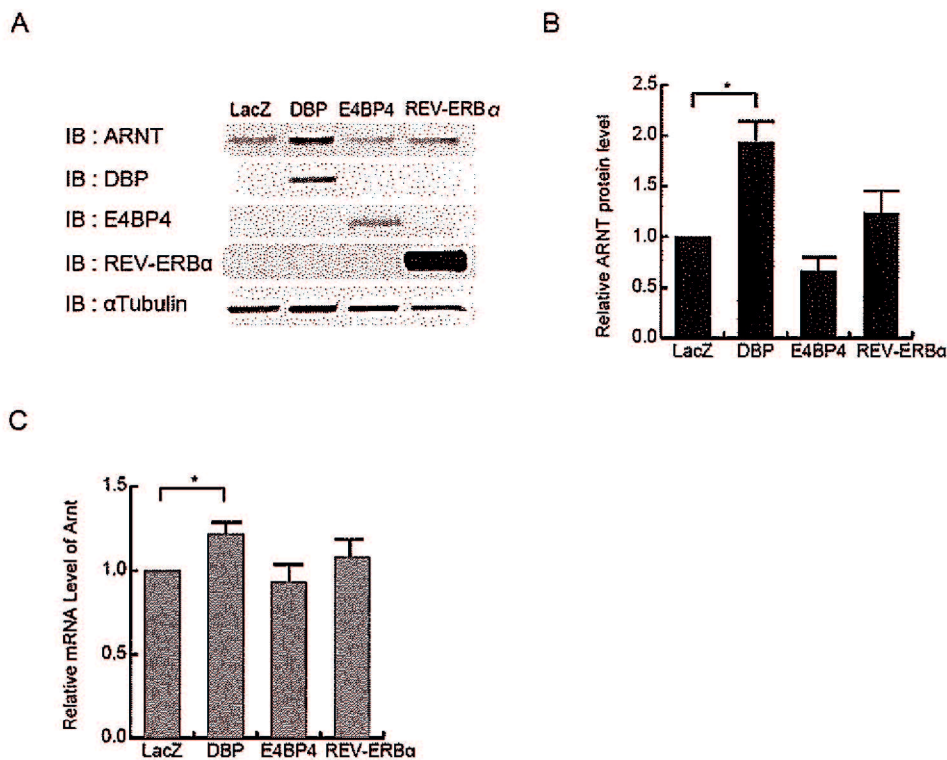


図 2. HEK293 細胞および MIN6 細胞において、DBP を過剰発現させると、内因性 *Arnt* の発現は増加する。(A)(B)HEK293 細胞に時計遺伝子 DBP と E4BP4、REV-ERB α を過剰発現させ、内因性 ARNT の発現量の変化をウェスタンブロットで解析した。DBP の過剰発現により内因性 ARNT の発現は有意に増加した。E4BP4 および REV-ERB α の過剰発現は内因性 ARNT の発現量を変化させなかった(n=4、平均±標準誤差、*P<0.05)。(C) MIN6 細胞に時計遺伝子を過剰発現させ、内因性 *Arnt* の mRNA 量の変化をリアルタイム RT-PCR で解析した。DBP の過剰発現により、内因性 *Arnt* の mRNA は有意に増加した。E4BP4 および REV-ERB α の過剰発現は内因性 *Arnt* mRNA 量を変化させなかった(n=3、平均±標準誤差、*P<0.05)。

時計遺伝子群によって *Arnt* の発現が直接的に制御されている否かを検討するため、我々は *Arnt* プロモーター(~2kb フラグメント)を組み込んだルシフェラーゼレポータープラスミドを用いてコトランスフェクションアッセイを行った。このプロモーター領域は 2 つの D-box 類似配列(-1923 to -1912, -1702 to -1691)と RORE 類似配列(-1519 to -1507)を含んでいる。MIN6 細胞にルシフェラーゼレポータープラスミドと時計遺伝子発現プラスミドをコトランスフェクションし、ルシフェラーゼ活性を測定し、蛋白量で補正した。図 3 に示すように、DBP の過剰発現により、*Arnt* のプロモーター活性は 2.5 倍に有意差をもって増加した。E4BP4 および REV-ERB α の単独の過剰発現は *Arnt* のプロモーター活性を変化させなかったが、DBP とコトランスフェクションしたときには、両者とも DBP によるプロモーター活性増加作用を阻害した(図 3)。時計関連遺伝子 ROR α および ROR γ は RORE 配列を介して下流の遺伝子を制御する転写促進因子である。ROR α および ROR γ についても合わせて解析を行ったが、*Arnt* のプロモーター活性には影響が認められなかった(図 3)。これらの結果から、*Arnt* のプロモーター領域内にある D-box 類似配列および RORE 類似配列は機能的に意味を持ち、DBP と E4BP4 および REV-ERB α により制御されることが確認された。

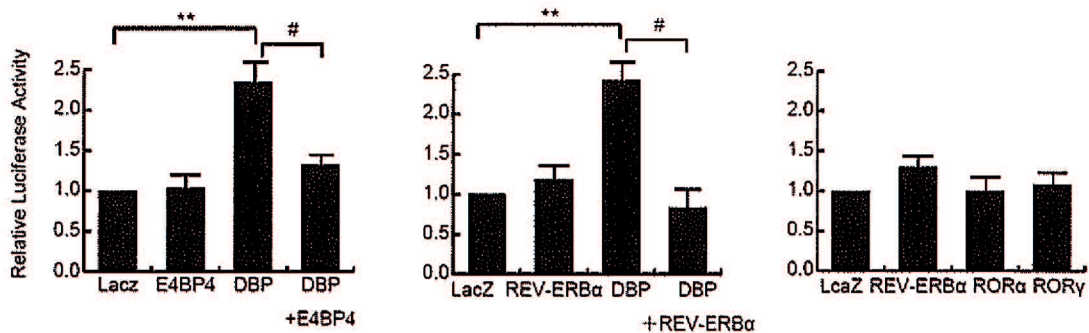


図 3. DBP は *Arnt* のプロモーター活性を増加させ、E4BP4 と REV-ERB α はその活性化を阻害する。MIN6 細胞に *Arnt* プロモーターでドライブされるルシフェラーゼレポータープラスミドと時計遺伝子発現プラスミドとをコトランスフェクションした。DBP の過剰発現により *Arnt* のプロモーター活性は 2.5 倍と有意に増加した。E4BP4 および REV-ERB α の過剰発現は、単独では *Arnt* のプロモーター活性を変化させなかったが、DBP とともに過剰発現させると、DBP による *Arnt* プロモーターの活性化を打ち消す効果が認められた。ROR α と ROR γ の過剰発現は *Arnt* プロモーターの活性を変化させなかった。n=3、平均±標準誤差、**P<0.01、#P<0.05。

膵β細胞において、時計遺伝子群が *Arnt* のプロモーター領域に直接結合することを確認するため、MIN6 細胞を用いて ChIP アッセイを行った。図 4A に示すように、*Arnt* のプロモーター領域には D-box 類似配列と RORE 類似配列がある。ChIP プライマーの位置を図 4A に示す。ChIP アッセイの結果より、D-box 類似配列を含む領域には DBP および E4BP4 が、RORE 類似配列を含む領域には REV-ERB α 、ROR α 、ROR γ が直接結合することが示唆された(図 4B)。

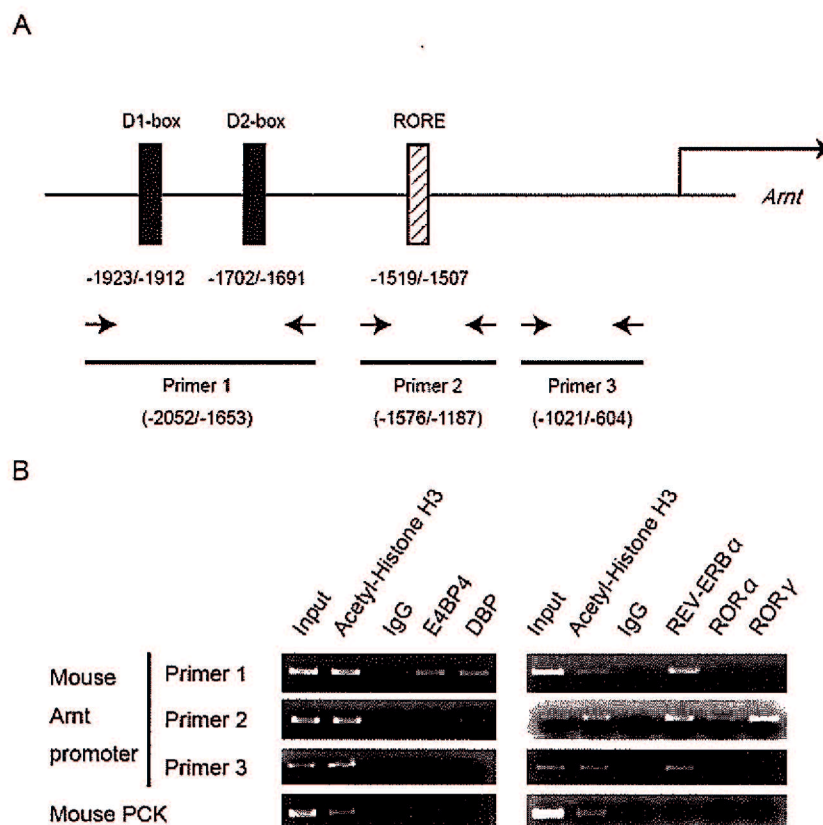


図 4. *Arnt* のプロモーター領域には、DBP、E4BP4、REV-ERB α が直接的に結合する。

MIN6 細胞を用いて ChIP アッセイを行い、時計遺伝子が *Arnt* のプロモーター領域に直接的に結合するか否かを検討した。(A) *Arnt* の転写開始部位から約 2kb 上流までの領域には、2つの近接した D-box 類似配列(D1-box, D2-box)と RORE 類似配列がある。これらの配列と ChIP で用いられたプライマーの位置はシェーマ上に示されている。(B) DBP と E4BP4 は D-box 類似配列を含む領域を中心に、REV-ERB α 、ROR α 、ROR γ は RORE 類似配列を含む領域を中心に *Arnt* のプロモーターに結合した。抗 Acetyl-Histone 3 抗体は陽性コントロールの抗体として、IgG は陰性コントロールの抗体として使用された。マウス phosphoenolpyruvate carboxykinases (PCK) のプロモーター領域の PCR は、陰性コントロールとして行われた。

6. 考察

最近の研究では、ヒトとげっ歯類において、時計遺伝子と肥満および糖尿病は密接な関係があることが示されている[6][7][8][9][10][11]。さらに *Clock* や *Bmal1* の変異マウスの膝ラ氏島は、グルコース応答性インスリン分泌が障害されていることが報告されている[12][13]。本研究のデータは、膝 β 細胞において *Arnt* が DBP の直接的ターゲット分子であり、ARNT が時計遺伝子群と膝 β 細胞機能を関連付ける遺伝子として機能しているという可能性を示唆するものである。

肥満・糖尿病を呈する ob/ob マウスの肝臓や脂肪組織では、*Dbp* mRNA の発現が減少することが報告されている[20]。しかし、このマウスの膝ラ氏島での時計遺伝子の発現は解析されていない。時計遺伝子変異マウス以外の糖尿病マウスで、膝ラ氏島での DBP や E4BP4 の発現が変化しているという報告はこれまでなされていない。つまり、*Wfs1^{-/-}Ar/a* マウスは *Dbp* と *E4bp4* などの時計遺伝子が、膝ラ氏島で有意に変化していることが明らかとなった最初の糖尿病マウスモデルということになる。

Richardson らは Sprague-Dawley ラットの複数の臓器において ARNT の蛋白質発現が 2 峰性に日内変動していることを報告している[21]。この解析では、肝臓と肺において、ARNT の発現には日内変動を認め、ZT5 と ZT22 の 2 時点で発現のピークがあることが示されている。一方で、脾臓では ARNT の発現に日内変動は認められなかったことも示されている。これらの結果から、ARNT 発現の日内変動は臓器によって異なることがわかる。これまで膝臓での ARNT の日内変動を解析したという報告はない。今回の解析によって、我々は、マウスの膝ラ氏島での *Arnt* mRNA の発現には概日リズムを認めることを初めて明らかにし、マウスの膝ラ氏島では *Arnt* の発現が時計遺伝子によって制御されることを明らかにした(図 1A)。*Dbp* と *E4bp4* のみが *Arnt* の発現を制御する時計遺伝子であるとすれば、もっと高振幅で明確な概日リズムを示してもよいはずである。しかし、実際のところ *Arnt* の発現の概日リズムの振幅は微弱であった。そこで我々が注目したのが時計関連遺伝子 *Rev-erb α* である。*Rev-erb α* の発現は膝ラ氏島で明確な日内変動を示し、ZT8 時に発現が最大となっていた(図 1A)。*Dbp* の発現がピークに達する時間帯に *Rev-erb α* の発現もピークとなり、*Rev-erb α* による転写抑制で *Dbp* の転写活性作用が相殺され、*Arnt* mRNA 発現の概日リズムが低振幅になっているという可能性もあると考えられる。

膝 β 細胞における ARNT の主要な制御因子はまだほとんど分かっていない[17][22]。Nordeen らは、INS-1 (321/13) 細胞において高血糖時、Carbohydrate-Responsive Element-Binding Protein (ChREBP) が *Arnt* のプロモーター領域に結合し、ARNT の発現を低下させることを報告している[17]。この in vitro での解析結果は、in vivo でも高血糖時に ARNT の発現が低下する可能性があることを示唆するものである。その一方で、Gunton らは、ob/ob マウス、db/db マウス、そして膝 β 細胞特異的インスリン受容体欠損マウス(β IRKO)の単離ラ氏島における *Arnt* の発現を解析している。 β IRKO マウスでは

Arnt の発現が低下しているが、ob/ob マウスや db/db マウスでは高血糖にも関わらず有意な *Arnt* の発現低下を認めないことを報告しており、in vivo では必ずしも血糖値と膵ラ氏島での *Arnt* の発現量が相関していない[16]。今回我々が使用した糖尿病モデルマウス *Wfs1^{-/-}Ar/a* は 10 週齢で高血糖(随時血糖値 206-363mg/dl)を呈するマウスであるが、高血糖のみで *Arnt* の発現が低下しているわけではないということが考えられ。

Dror らは膵β細胞において、ryanodine receptor (RyR)からの Ca²⁺流入を阻害すると、ARNT と presenelin-1 の発現が増加すること、そして ARNT が presenelin-1 の下流に位置することを報告している[22]。WFS1 は小胞体カルシウムチャネルを構成するかあるいは小胞体カルシウムチャネル活性を調整する蛋白質であると考えられており、*Wfs1* 欠損マウスでは細胞内カルシウム応答障害によるインスリン分泌障害が認められる[19][23]。細胞内 Ca²⁺流入を阻害すると、presenelin-1 を介して ARNT の発現が誘導されるということを考慮すると、WFS1 欠損による小胞体ホメオスタシスの崩壊が *Arnt* の発現を低下させているというメカニズムも想定される。

今回我々は、*Wfs1^{-/-}Ar/a* マウスの膵ラ氏島を用いた in vivo の解析に加え、in vitro で DBP と E4BP4 が ARNT の発現を直接的に制御しているのか否か検討した。HEK293 や MIN6 細胞において、DBP を一過性に過剰発現させると ARNT の発現は増加した(図 2)。*Arnt* のプロモーター領域には D-box 類似配列と RORE 類似配列が存在し(図 4)、レポータージーンアッセイにより DBP は *Arnt* のプロモーターを活性化させることが明らかとなった(図 3)。E4BP4 と REV-ERB α は単独では *Arnt* のプロモーター活性を変化させないものの、それぞれ DBP とコトランスフェクションすると DBP による *Arnt* プロモーターの活性化作用が阻害されることが分かった(図 3)。この解析結果から、膵β細胞機能維持のためには、膵β細胞における *Arnt* の発現がある一定レベル以上に常に保たれる必要があり、そのため生体内には *Arnt* の発現低下を阻止するための様々な代償機構が備わっているということが示唆される。さらに我々は、ChIP アッセイによって、*Arnt* のプロモーター領域に DBP と E4BP4、REV-ERB α が直接的に結合すること、つまり *Arnt* は DBP の直接の下流分子であることを明らかにしている(図 4)。

Clock 変異マウスの膵ラ氏島では、翻訳語修飾や分泌蛋白質のパッケージングに関わる遺伝子の発現が変化していることが示されているが[12][22]、詳細な分子機構は明らかとはなっていない。*Clock* 変異マウスの膵ラ氏島では明期の *Dbp* 発現が低下しており[12]、今回の我々の解析結果を合わせて考えると、*Clock* 変異マウスの膵ラ氏島で認められるインスリン分泌障害の分子機構には DBP と ARNT の発現低下が部分的に関与している可能性もある。

今回我々は、膵β細胞機能にとって重要な ARNT の発現が時計遺伝子 DBP と E4BP4 によって制御されることを新たに発見した(図 5)。今回の発見は、糖尿病治療の創薬において、DBP と ARNT が新たなターゲットとなりうるという可能性を切り開いたのではないかと考えている。

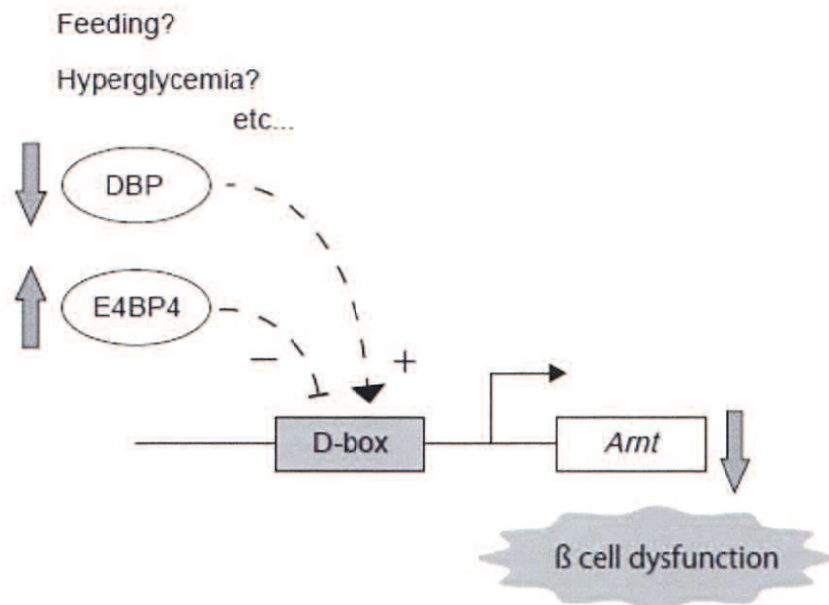


図 5. 膵β細胞において時計遺伝子 DBP と E4BP4 は *Arnt* の発現を制御する。

7. 結語

膵β細胞において時計遺伝子である DBP と E4BP4 は直接的に ARNT の発現を制御しており、ARNT が時計遺伝子群と膵β細胞機能を関連付ける遺伝子として機能している可能性が示唆された。

8. 謝辞

本稿を終わるにあたり、終始懇切なるご指導とご鞭撻を賜りました山口大学大学院医学系研究科応用医工学系病態制御内科学分野研究室の谷澤幸生教授と分子代謝制御学講座太田康晴准教授に深甚なる謝意を表します。

本研究の遂行にあたり数々の有益なるご助言とご協力を頂いた研究室の皆様に深く感謝致します。

9. 参考文献

- [1] Stokkan KA, Yamazaki S, Tei H, Sakai Y, Menaker M (2001) Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding. *Science* 291: 490-493.
- [2] Mühlbauer E, Wolgast S, Finckh U, Peschke D, Peschke E (2004) Indication of

- circadian oscillation in the rat pancreas. *FEBS Lett* 564: 91-96.
- [3] Vieira E, Nilsson EC, Nerstedt A, Ormestad M, Long YC, et al. (2008) Relationship between AMPK and the transcriptional balance of clock-related genes in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295: E1032-1037.
 - [4] Zylka MJ, Shearman LP, Weaver DR, Reppert SM (1998) Three period homologs in mammals: differential light responses in the suprachiasmatic circadian clock and oscillation transcripts outside of brain. *Neuron* 20: 1103-1110.
 - [5] Johnston JD (2012) Adipose circadian rhythms: translating cellular and animal studies to human physiology. *Mol Cell Endocrinol* 349: 45-50.
 - [6] Spiegel K, Tasali E, Leproult R, Van Cauter E (2009) Effect of poor and short sleep on glucose metabolism and obesity risk. *Nat Rev Endocrinol* 5: 253-261.
 - [7] Pan A, Schernhammer ES, Sun Q, Hu FB (2011) Rotating night shift work and risk of type2 diabetes. *PLoS Med* 8: e1001141.
 - [8] Huang W, Ramsey KM, Marcheva B, Bass J (2011) Circadian rhythms, sleep, and metabolism. *J Clin Invest* 121: 2133-2141.
 - [9] Lamia KA, Storch KF, Weitz CJ (2008) Physiological significance of a peripheral tissue circadian clock. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 15172-15177.
 - [10] Turek FW, Joshu C, Kohsaka A, Lin E, Ivanova G, et al. (2005) Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice. *Science* 308: 1043-1045.
 - [11] Rudic RD, McNmara P, Curtis AM, Boston RC, Panda S, et al. (2004) BMAL1 and CLOCK, two essential components of the circadian clock, are involved in glucose homeostasis. *PLoS Biol* 2: e377.
 - [12] Marcheva B, Ramsey KM, Buhr ED, Komayashi Y, Su H, et al. (2010) Disruption of the clock components CLOCK and BMAL1 leads to hypoinsulinemia and diabetes. *Nature* 466: 627-631.
 - [13] Sadacca LA, Lamia KA, deLemos AS, Blum B, Weitz CJ (2011) An intrinsic circadian clock of the pancreas is required for normal insulin release and glucose homeostasis in mice. *Diabetologia* 54: 120-124.
 - [14] Mitui S, Yamaguchi S, Matsuo T, Ishida Y, Okamura H (2001) Antagonistic role of E4BP4 and PAR proteins in the circadian oscillatory mechanism. *Genes* 15: 995-1006.
 - [15] Furness SG, Lees MJ, Whitelaw ML (2007) The dioxin (aryl carbon) receptor as a model for adaptive responses of bHLH/PAS transcription factors. *FEBS Lett.* 581: 3616-3625.
 - [16] Gunton JE, Kulkarni RN, Yim S, Okada T, et al. (2005) Loss of ARNT/HIF1beta mediates altered gene expression and pancreatic-islet dysfunction in human type 2

diabetes. *Cell* 122: 337-349.

- [17] Noordeen NA, Khera TK, Sun G, Longbottom ER, Pullen TJ, et al. (2010) Carbohydrate-responsive element-binding protein (ChREBP) is a negative regulator of ARNT/HIF-1 beta gene expression in pancreatic islet beta-cells. *Diabetes* 59: 153160.
- [18] Akiyama M, Hatanaka M, Ohta Y, et al. (2009) Increased insulin demand promotes while pioglitazone prevents pancreatic beta cell apoptosis in *Wfs1* knockout mice. *Diabetologia* 52: 653-993.
- [19] Ishihara H, Takeda S, Tamura A, et al. (2004) Disruption of the *Wfs1* gene in mice causes progressive beta-cell loss and impaired stimulus-secretion coupling in insulin secretion. *Hum Mol Genet* 13: 1159-1170.
- [20] Ando H, Kumazaki M, Motosugi Y, Ushijima K, Maekawa T, et al. (2011) Impairment of peripheral circadian clocks precedes metabolic abnormalities in *ob/ob* mice. *Endocrinology* 152: 1347-1354.
- [21] Richardson VM, Santostefano MJ, Birnbaum LS (1998) Daily cycle of bHLH-PAS proteins, Ah receptor and Arnt, in multiple tissues of female Sprague-Dawley rats. *Biochem Biophys Res Commun* 252: 225-231.
- [22] Dror V, Kalynyak TB, Bychkivska Y, Frey MH, Tee M, et al. (2008) Glucose and endoplasmic reticulum calcium channels regulate HIF-1beta via presenilin in pancreatic beta-cells. *J Bio Chem* 283: 9909-9916.
- [23] Osman AA, Saito M, Makepeace C, Permutt MA, Schlesinger P, et al. (2003) Wolframin expression induces novel ion channel activity in endoplasmic reticulum membranes and increases intracellular calcium. *J Biol Chem* 278: 52755-52762.