

論文の要約

氏名：齊藤一樹

博士の専攻分野の名称：博士（医学）

論文題名：時計遺伝子 **Chrono** の小胞体ストレスによる発現制御の検討および
Chrono 欠損マウスにおける糖代謝の解析

現在世界の糖尿病患者は 4 億 6,300 万人に上り、今後も増え続けることが予想されている。糖尿病患者のうち約 90% が 2 型糖尿病であり、肥満、高脂肪食、遺伝、生活リズムの乱れなど様々な要因が組み合わさることで発症すると考えられている。地球上の生物はサーカディアンリズムと呼ばれる 24 時間で繰り返される自律的なリズムを有しており、その乱れは糖尿病の発症と関わっている。サーカディアンリズムを維持している遺伝子群は時計遺伝子と呼ばれ、時計促進因子である **Bmal1**、**Clock** と、時計抑制因子である **Per**、**Cry** の転写翻訳のフィードバックループを中心に形成される。これらのコア時計遺伝子の **KO** マウスでは糖尿病の発症や耐糖能の異常を認めることが明らかになっている。

時計遺伝子により調節を受ける遺伝子の中に小胞体ストレス応答関連遺伝子があることが明らかになってきている。小胞体ストレスは不全タンパク質が蓄積することにより生じ、小胞体ストレス応答によりストレスの軽減を試みる。小胞体ストレス応答は **PERK** 経路など 3 つの経路で進行し、タンパク質合成の低下、正常なタンパク質への折りたたみの促進、不全タンパクの分解という方法でストレスに対抗する。この能力を超えるとアポトーシスが誘導され細胞は死に至る。膵 β 細胞は小胞体ストレスに脆弱な細胞であり、慢性的な小胞体ストレスによる β 細胞の機能低下が糖尿病の発症・進展の一因となっている。

今回我々は、時計遺伝子である **Chrono** のプロモーター領域に、小胞体ストレス応答の **PERK** 経路で誘導される転写因子である **ATF4** の結合部位があることを見出し、**Chrono** が小胞体ストレス応答遺伝子であるかを検討し、さらに **Chrono KO** マウスを用い、**Chrono** が糖代謝に役割を持つかを検討した。

まず、インスリン分泌細胞株である MIN6 細胞、野生型マウスの膵島に薬剤性に小胞体ストレスを与え、RT-PCR により Chrono の mRNA が増えるか検討した。次に ATF4 欠損マウス胎児線維芽細胞 (MEF 細胞) を用いて、RT-PCR により Chrono の mRNA が ATF4 欠損時に発現が低下するかを検討した。さらに、Chrono プロモーターの ATF 結合領域を変異させて、ルシフェラーゼレポーターアッセイにより Chrono プロモーターの特性を検討した。

生体レベルでの Chrono の糖代謝への機能を検討するため、ホモ Chrono KO マウスを作製した。野生型 (WT) マウスと KO マウスを、標準飼料か高脂肪食を負荷する 2 群に振り分け、IPGTT、ITT により糖代謝への影響を検討した。さらに、高脂肪食群の膵島を用いたグルコース刺激によるインスリン分泌の検討、免疫染色法による膵臓における膵島面積の比較、膵臓のインスリンコンテンツの測定を行った。

細胞を用いた検討では、MIN6 細胞、膵島に thapsigargin を添加したところ Chrono の発現は 33.29 ± 2.97 倍、 7.3 ± 1.5 倍に増えた。ATF4 欠損 MEF 細胞では野生型細胞と比較し $6.6 \pm 2.0\%$ ($p = 0.0004$) に有意に発現が低下した。ルシフェラーゼアッセイによるプロモーター活性の検討では、対照にした SV40 プロモーター活性に対し、野生型では小胞体ストレスにより $17.7 \pm 3.7\%$ から $39.1 \pm 2.5\%$ に有意に ($p = 0.0007$) 発光率が上昇するのに対し、C/EBP- ATF composite element を変異させると、 $13.5 \pm 2.7\%$ から $16.6 \pm 2.6\%$ と発光率の上昇は認めなかった ($p > 0.05$)。

Chrono KO マウスを用いた検討では、8 週間の高脂肪食飼育により、WT が 35.4 ± 0.6 g、KO は 40.4 ± 0.8 g と有意に KO マウスの体重が大きくなった ($p = 1.95 \times 10^{-5}$)。高脂肪食群の IPGTT の AUC は WT が 45.0 ± 1.3 mg/dl \times min $\times 10^3$ 、KO は 53.7 ± 2.0 mg/dl \times min $\times 10^3$ と有意に KO が高値であった ($p = 0.0067$)。HOMA-IR は WT の 0.05 ± 0.02 に対し、KO は 0.14 ± 0.03 と KO が有意に高かった ($p = 0.0225$) が、ITT では有意な差を認めなかった。インスリン分泌実験、インスリン含有量測定、膵島面積の比較では全て有意な差を認めなかった。

今回の結果から、Chrono は小胞体ストレス応答遺伝子であることが明らかになった。

また、高脂肪食で飼育した場合に Chrono KO マウスは WT マウスと比較し、IPGTT での AUC が高くなることが明らかになった。原因として、インスリン感受性や β 細胞機能低下、ストレス応答を検討したが有意な結果は得られず、軽度のインスリン抵抗性が生じている可能性があると考えられた。