

ウェブサイト公開用

(様式 10)

(海外特別研究員事業)

令和 2 年 4 月 18 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 2018

受付番号 201860576

氏 名 佐藤 友紀
(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地：カリフォルニア大学アーバイン校（国名：アメリカ）
2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。
末梢臓器の概日リズム形成におけるグリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ 1 の役割
3. 派遣期間：平成 30 年 4 月 1 日 ～ 令和 2 年 3 月 31 日（731 日間）
4. 受入機関名及び部局名
School of medicine (Center for Epigenetics and Metabolism), University of California, Irvine, USA
5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意（A4 判相当 3 ページ以上、英語で記**

入も可）

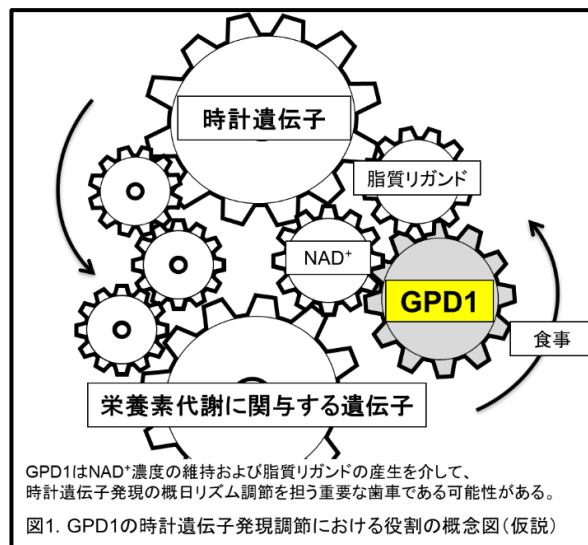
（研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等）

（注）「6. 研究発表」以降については様式 10－別紙 1～4 に記入の上、併せて提出すること。

研究の目的

地球上に住む生物は約 24 時間を周期とした概日リズムを持っており、ホルモン分泌をはじめとした生理現象や糖質・脂質の代謝には概日リズムが認められる。これまでの時計分子（時計遺伝子）研究において NAD^+ およびリン脂質をはじめとした脂質リガンドが時計機能の中心的な役割を担う BMAL1、および、それらの転写に関わる転写因子 PPAR の転写活性化能を変化させることが明らかになっている (Science 324:654-657, 2009、Nature 502:550-554, 2013)。一方で、グリセロール生合成に関わる酵素である Glycerol-3-phosphate

dehydrogenase(GPD1)は NAD^+ 、 NADH を補酵素として利用するため、細胞内の NAD^+/NADH の変動に影響していると考えられる。さらにグリセロールは中性脂肪、リン脂質などの形成に必須の分子である。それらの背景から、 NAD^+/NADH 比および脂質リガンド産生に関わる GPD1 が、生物が保持する概日リズム機能維持に何らかの影響を及ぼしていると考えた。本研究では、GPD1 欠損マウスの時計遺伝子、糖質・脂質代謝関連遺伝子の発現を調べるとともに栄養素代謝物量 (NAD^+ 、脂質リガンドなど) の変化、それら変化を介した時計遺伝子転写因子の活性化機序を調べることで、GPD1 が栄養素代謝による時計遺伝子制御機構の重要な歯車であるかを明らかにする。



1. GPD1 欠損マウスの肝臓における時計遺伝子概日性的変化

GPD1 自然欠損マウス (GPD1 null) およびコントロールマウス (Control) マウスを 2 週間自由摂食状況下で飼育して飼育環境に慣らした(温度:22℃、明暗サイクル:明期 7:00-19:00 暗期 19:00-7:00)。肝臓における継時的な時計遺伝子の発現量の変化を調べるために、4 時間おきに (7:00、11:00、15:00、19:00、23:00、3:00) 肝臓を採取し、遺伝子発現量を real-time qRT-PCR 法にて調べた。多くの時計遺伝子の発現リズムが GPD1 の欠損によって変化が観察された(図 2)。BMAL1 の遺伝子発現パターンはコントロール

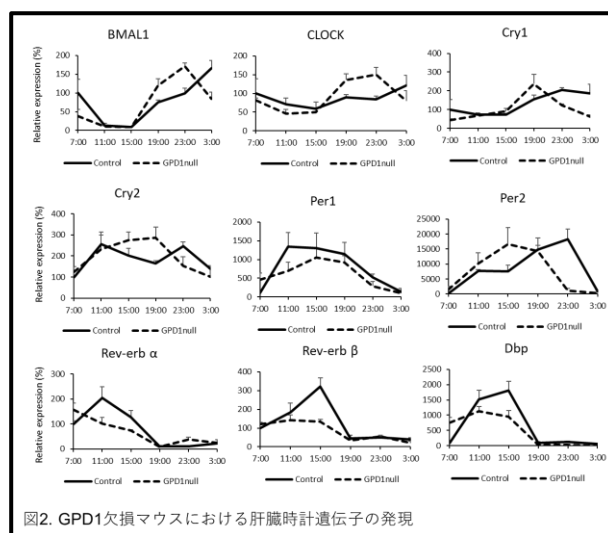
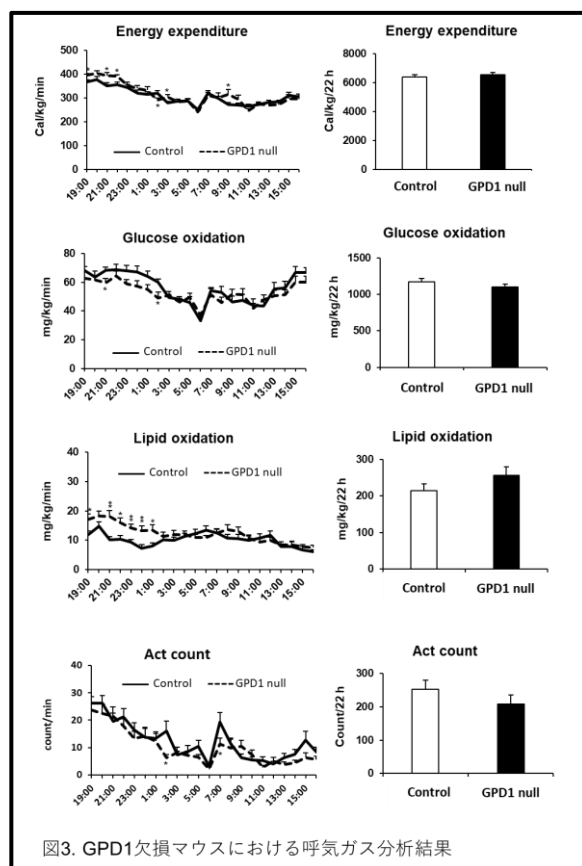


図2. GPD1欠損マウスにおける肝臓時計遺伝子の発現

マウスでは 3:00 にピークが見られたが、GPD1 欠損マウスではピークが 23:00 に観察された。さらに、Per2 および Rev-erb α の発現ピークが観察された時間が GPD1 欠損マウスではコントロールマウスに比して前進した。このように一部の時計遺伝子の発現リズムの推移（ピークの前進）が認められた。また、Rev-erb β 、Dbp など一部の時計遺伝子の発現においてはピークの消失および減弱が確認された。

2. GPD1 欠損マウスにおける安静時エネルギー代謝の変動

いくつかの時計遺伝子は糖質・脂質代謝に関わる遺伝子の転写を調節することで、エネルギー代謝における利用基質を変動させる。GPD1 の欠損が安静時のエネルギー代謝を変動させるか否かを調べるために呼吸ガス分析装置を用いて、エネルギー消費量、糖質、脂質酸化量を計測した。時計遺伝子の変動は行動量および行動パターンの変化を引き起こすため、同時に赤外線センサーを用いて、継続的な行動量モニタリングを行った。実験中のマウスの飼育状況は<1. GPD1 欠損マウスにおける時計遺伝子概日性の変化>で示した条件と同様、温度:22℃、明暗サイクル:明期 7:00-19:00 暗期 19:00-7:00 で実施した。エネルギー消費量は GPD1 欠損マウスで暗期の一部のタイムポイントでコントロールマウスに比して有意に高かった（図 3）。明期においても一部のポイントで有意差が認められたが、多くのポイントでは差が見られなかった。糖質酸化量は GPD1 欠損マウスにおいて暗期では低い傾向があり、一部のタイムポイントでコントロールマウスに比して有意に低い値を示した。一方で、脂質酸化量は糖質酸化量と対照的に GPD1 欠損マウスにおいて暗期において高い傾向を示すことが明らかになった。暗期が開始してから早い時間帯の多くでコントロールマウスに比して有意に高値を示した。活動量に関しては暗期、明期ともに著しい差は認められなかった。それぞれの項目で暗期、明期全ての時間帯を含む AUC（Area Under the Curve）を算出したが、全ての計測項目で有意な差は認められなかった。暗期のみで AUC を算出した際に、脂質酸化量の項目でのみ有意水準に近い傾向が認められた（ $P=0.052$, data not shown）。



3. GPD1 欠損マウスにおける血中 phosphatidyl choline の変動

特定の phosphatidyl choline (PC) が肝臓・骨格筋中の PPAR の活性を介して、脂質酸化量の促進を促していることがこれまでに報告されている(Nature 502:550-554, 2013)。そこで、血中の PC 濃度を LC-MS (Liquid Chromatography-Mass spectrometry) を用いて測定した。いくつかの血中脂質濃度の変動には概日リズムが存在していることが報告され、実際に得られた結果においても、時間ごとに推移が見られる (図 4)。しかし、GPD1 の欠損によって、著しく濃度のリズムが変動するような PC 分子は観察されず、ほとんどの PC 分子においてコントロール群と同様の推移を示した。これら結果は血中由来の PC 分子種であり、PC 分子の作用する標的臓器における変動についても検討をする必要がある。

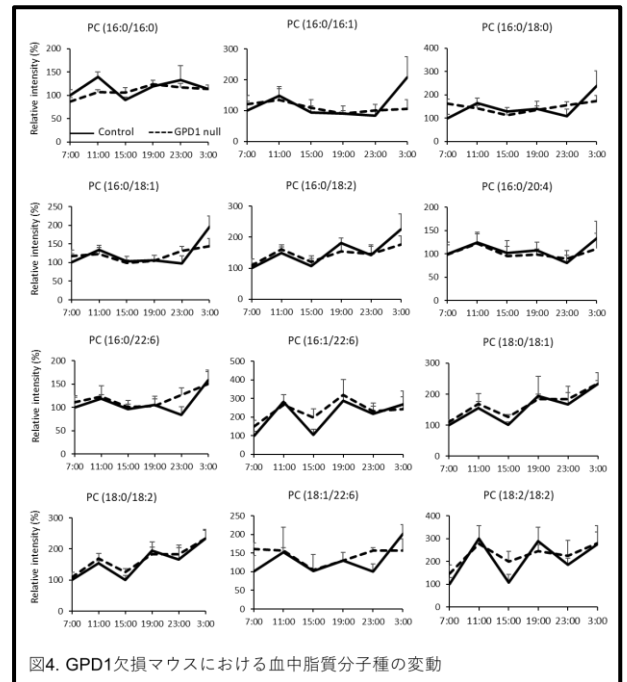


図4. GPD1欠損マウスにおける血中脂質分子種の変動

4. GPD1 欠損マウスにおける絶食時エネルギー代謝の変動

絶食時のエネルギー代謝 (エネルギー消費量、糖質酸化量、脂質酸化量、RQ 比、Act count)を〈2. GPD1 欠損マウスにおける安静時エネルギー代謝の変動〉と同様にメタボリックケージを用いて測定した。絶食時のエネルギー消費量が GPD1 欠損マウスにおいて有意に増加していることを確認した (図 5)。同時に、脂質酸化量が増加していることが明らかになった。糖質酸化量には差がなく、RQ 比にも有意な差は観察されなかった。いくつかのポイントにおいて Act count の値に Control マウスと GPD1 null に差が見られたが、AUC には差がなかった。絶食による体重減少量は GPD1 null マウスで有意ではないが大きい傾向が見られた。

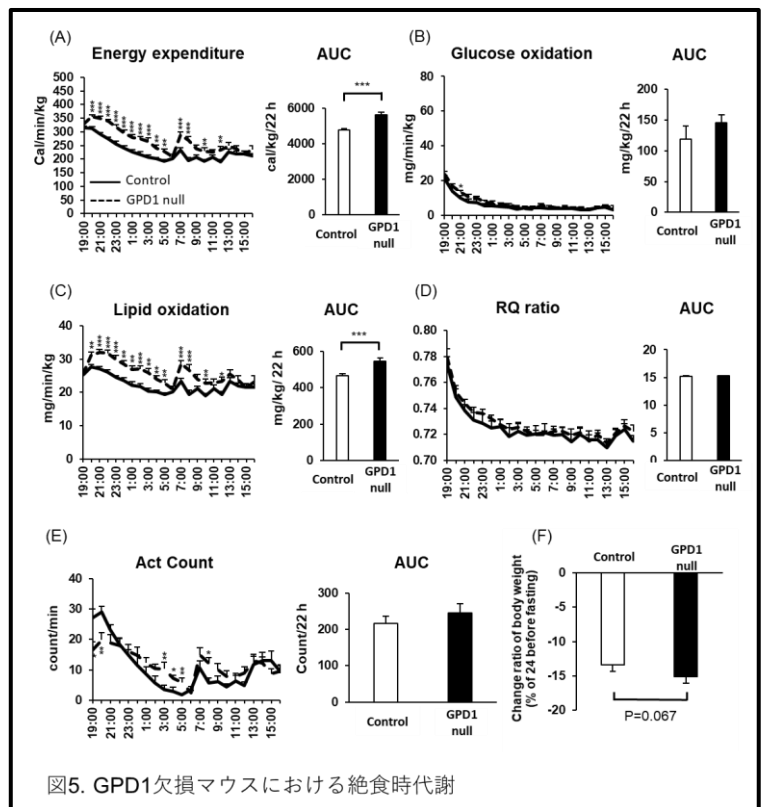


図5. GPD1欠損マウスにおける絶食時代謝

5. GPD1 欠損マウスにおける骨格筋での脂肪酸酸化の増加

〈2. GPD1 欠損マウスにおける安静時エネルギー代謝の変動〉

の結果より、安静時（特に活動期）のエネルギー消費量、脂質酸化量が GPD1 null マウスにおいて増加していることが明らかになった。骨格筋は全体重の 40%を占める臓器であり、安静時代謝量の 30%に寄与している。そこで、骨格筋における脂質代謝量を、 ^{14}C 含有化合物を用いた代謝トレーサー実験を行うことで検討した。活動期(9:00)に gastrocnemius を採取し、 ^{14}C -palmitate とともにインキュ

ベートし、脂質酸化によって生じる CO_2 を採取した。 CO_2 に含まれる ^{14}C 活性を測定することで脂質酸化量を算出した。骨格筋での脂質酸化量は GPD1 null マウスにおいて増加傾向であることが確認された (図 6)。この結果は、メタボリックケージで測定した脂質酸化量の増加とも一致する。

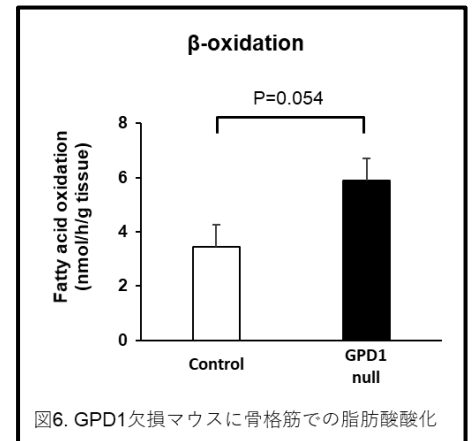


図6. GPD1欠損マウスに骨格筋での脂肪酸酸化

6. GPD1 欠損マウスの骨格筋における時計・脂質代謝遺伝子概日性の変化

骨格筋での時計遺伝子発現の概日性に GPD1 の欠失が影響するかを調べるために、4 時間おきに Control、GPD1 null マウスより骨格筋を採取し、mRNA 発現量を測定した。どちらのマウスにおいても時計遺伝子 (BMAL1、Rev-erb α 、Rev-erb β) の発現量がリズムに変化していた (図 7)。GPD1 null マウスではそれら遺伝子発現のピークとなるタイムポイントに変化が認められた。CLOCK の mRNA 発現量には大きなリズムが認められないものの、GPD1 null マウスにおいて 23:00 において高い値を示していた。〈5. GPD1 欠損マウスにおける骨格筋での脂肪酸酸化の増加〉において GPD1 の欠

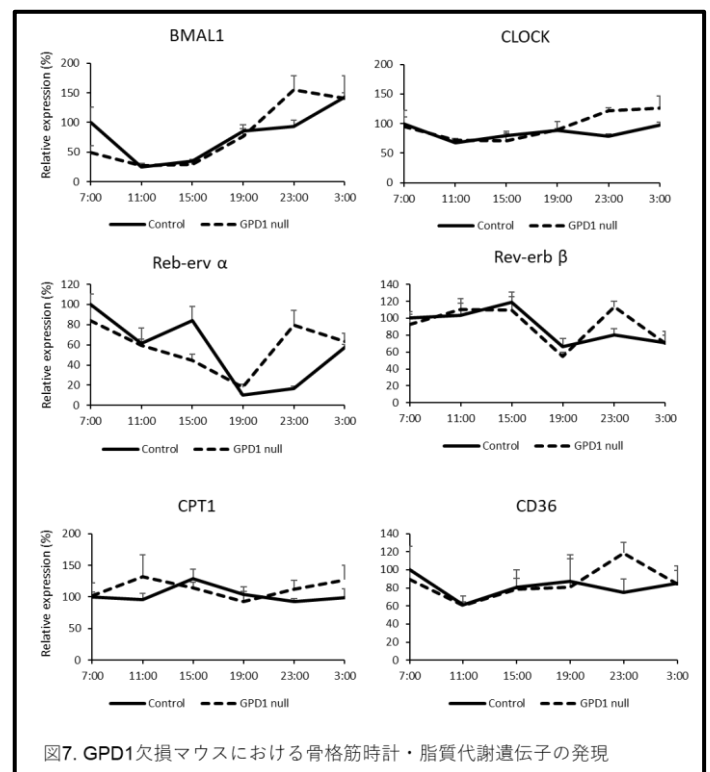


図7. GPD1欠損マウスにおける骨格筋時計・脂質代謝遺伝子の発現

失が脂肪酸酸化を増幅することが明らかになった。そこで脂肪酸酸化に関わる遺伝

子の発現量を測定したところ、脂肪酸の取り込みに関わる遺伝子 CD36 の発現量が 23:00 において GPD1 null マウスの骨格筋で高値を示した。そのほかのタイムポイントでは大きな変化は認められなかった。

結論

本研究結果より、GPD1 が肝臓における時計遺伝子発現のリズム形成に関わる因子の 1 つであることが示唆された。その機序として想定していた PC 分子には変化がなかったため、別の機序によって制御されると想定される。しかし、GPD1 による肝臓時計遺伝子発現量の制御に関わる分子メカニズムは未だ解明されていないため、さらなる研究が必要となる。一方で、本研究派遣期間の間に GPD1 の欠失が 1 日のエネルギー代謝に与える影響を詳細に検討することが出来、安静時の脂質酸化量が GPD1 の欠失によって促進されることが明らかになった。また、その変化には骨格筋における脂質酸化量の増加が寄与していることも明らかになった。これまでに GPD1 は肥満に関与する遺伝子であることが報告されており、体重の増減と正に相關する。今後は GPD1 による脂質代謝促進の分子メカニズムを解明するとともに肥満に対する治療標的になり得るかという方向からも検討を継続する。

研究成果

マウスを用いた検討より GPD1 が時計メカニズムに与える影響について断片的な結果が得られたが、一連の機序を明らかにするためにはさらなる分子メカニズムの解明が必要となる。一方で、脂質代謝に関わる GPD1 の機能が新たに解明され、それらの結果をまとめ、原著論文に投稿予定である。