

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21700650

研究課題名(和文) 身体運動による哺乳類生体リズムの再同調促進メカニズムの解明

研究課題名(英文) Acceleration mechanism of re-entrainment of circadian rhythms by physical exercise in mammals

研究代表者

山仲 勇二郎 (YAMANAKA YUJIRO)

北海道大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：20528343

研究成果の概要(和文)：明暗サイクルを位相変位させた際に、特定位相でマウスを新規環境に暴露すると、行動リズムの開始位相の再同調が促進されることを発見した。さらに、行動リズムが新たな明暗周期に再同調するまでの移行期では、生物時計の中核である視交叉上核の遺伝子発現行動リズムは視交叉上核の領域により異なるが、行動リズムの開始と終了との間に強い相関を認めた。これらの結果は、身体運動が視交叉上核内の特定領域に影響する、または、中枢時計と末梢時計間の相互カップリングが強化されることで行動リズムの再同調が促進される、2つの可能性が浮上した。

研究成果の概要(英文)：The aim of present study was to clarify acceleration mechanism of re-entrainment of circadian behavioral and clock gene expression rhythm in peripheral tissues (peripheral clocks) to a large shift of light-dark cycle (e.g. jet-lag travel in humans) by physical exercise in mammals. We could demonstrate that the effect of physical exercise, such as exposure to new cage with a running-wheel, on the re-entrainment of peripheral clock was dependent on the timing of exposure. During the transient days in behavior after shift of light cycle, circadian clock gene expression rhythm in the central clock in the suprachiasmatic nucleus (SCN) showed a regional difference in the waveforms and phases. These finding addresses a new hypothesis that the scheduled physical exercise directly affect on the regional oscillator in the SCN. If so, it leads to increase a coupling strength between the SCN and peripheral clock and to accelerate re-entrainment of peripheral clocks by physical exercise.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：環境生理学

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学

キーワード：スポーツ生理学、生体リズム、

時間の明暗周期環境下において生物が生存するために獲得した生理機能であり、地球上に生息するすべての生物に存在する。ヒトを含め、哺乳類の生物時計は、視床下部視交叉上核に存在し、網膜から受容する外部環境の明暗周期を同調因子としてその内因性周期を補正すると同時に、全身の末梢臓器に適切な時刻情報を発振し、生理機能および行動に 24 時間のリズムを作り出している。

現在までに、視交叉上核におけるリズム同調およびリズム発振機構の分子メカニズムについては、視交叉上核の細胞内における自律振動は複数の時計遺伝子の転写と翻訳からなるネガティブオートフィードバックループであること、末梢臓器(肝臓、肺、骨格筋など)および視交叉上核外の脳部位においても視交叉上核の細胞と同様の時計遺伝子の発現とリズム振動がみられること(末梢時計の存在)が報告されている。近年の生物発光を導入したルシフェラーゼ導入動物の組織培養系が確立されたことで、視交叉上核および末梢組織の時計遺伝子発現リズムの長期測定が可能となった。そして、視交叉上核(中枢時計)の役割は明暗周期への同調と全身に存在する末梢時計へ適切な時刻情報を伝達し、生体内の時間的秩序を維持することにあると考えられている。

研究代表者は、時計遺伝子の 1 つである *mPer1* のプロモーター領域にホタルルシフェラーゼ遺伝子を導入したトランスジェニックマウス(*Per1-luc* マウス)を使用して明暗周期を位相シフトさせた際に、新しい明暗周期の暗期開始時刻より 3 時間、マウスに身体運動(回転運動)を行わせることにより運動を負荷しない対照群にくらべ、自発活動リズムおよび肺と骨格筋における *Per1-luc* リズムの再同調に要する期間を短縮させること、視交叉上核の *Per1-luc* リズムは身体運動の

有無にかかわらず明暗周期位相シフトから 4 日目ではほぼ再同調を完了することを明らかにした (Yamanaka Y *et al. Genes Cells.* 2008). しかし、そのメカニズムは依然不明であり、研究の余地が残されている。明暗周期を位相変位させた際に身体運動が生体リズムの再同調を促進するメカニズムを解明することは、哺乳類生物時計の光同調と非光同調、中枢時計と末梢時計との関係を明らかにするうえで重要である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、明暗周期位相シフト後の回転運動が生体リズムの再同調を促進するメカニズムを解明することである。

3. 研究の方法

動物：視交叉上核および末梢組織の時計遺伝子発現リズムの計測には、時計遺伝子 *Period 1* のプロモーター領域に発光酵素であるルシフェラーゼ遺伝子を導入したトランスジェニック動物 (*Per1-luc* マウス、C57BL6J バックグラウンド) を使用した。自発活動リズムを測定する行動実験では、C57BL6J マウスを使用した。

(1) 身体運動を同調因子とし行動リズムを制御する末梢時計の局在

視交叉上核外の脳部位で時計遺伝子発現リズムが回転運動による行動リズムの変化と相関する脳部位を明らかにする。

(2) 身体運動による末梢時計の制御機構

回転運動による末梢時計の再同調促進作用に位相依存性があるかを明らかにする。

(3) 身体運動による末梢時計の再同調促進効果に關与する伝達物質の同定

回転輪運動により惹起される生体内の変化のうち交感神経系(視床下部-交感神経-副腎髄質系、視床下部-下垂体前葉-副腎皮質系)の関与を薬理学的実験により検討し、末梢時計再同調に關与する伝達物質の同定をめざす。

4. 研究成果

(1) 身体運動に対する末梢時計の位相依存性

*Per1-luc*マウスを使用し、明暗周期を8時間位相前進させた際に、位相シフトした暗期開始から3時間、または明期開始までの3時間、回転輪運動を伴う新奇環境に暴露し、新奇環境を負荷するタイミングにより自発活動リズム、視交叉上核、末梢臓器の時計遺伝子発現リズムの再同調速度にちがいがみられるかを検討した。マウスは位相シフトした明暗周期で3サイクル、4回新奇環境へ暴露された後、視交叉上核、肝臓、肺、骨格筋を採取し *Per1-luc* リズムを計測した。自発活動リズムを測定する際には3サイクル後に恒常暗へ移行した直後の行動開始位相から再同調を評価した。その結果、暗期開始から3時間回転輪運動を伴う新奇環境へ暴露すると自発活動リズム、一部の末梢時計(骨格筋、肺)の再同調が早期に完了したが、明期開始までの3時間新奇環境へ暴露した群では再同調は完了せず移行期にあった。視交叉上核の *Per1-luc* リズムは新奇環境暴露のタイミング、有無に関わらず位相変化し、ほぼ再同調を完了することを見出した。つまり、視交叉上核は明暗周期を同調因子とするのに対し、末梢時計は身体運動のような非光因子を同調因子とすること、非光同調因子に対する位相反応には位相依存性があることを明らかにした。

(2) 末梢時計の再同調に關与する伝達物質の同定

明暗周期を8時間位相前進シフトさせた後、暗期開始より3時間異なる実験条件に4回暴露した後、恒常暗へ移行する。行動リズムに対する再同調効果は、恒常暗開始時の行動開始位相より判定し、視交叉上核、末梢臓器の時計遺伝子発現リズムの再同調効果は、恒常暗1日目に *Per1-luc* マウスの組織を採取し各組織切片から *Per1-luc* リズムを計測した。実験条件は、①回転輪が設置されていない新しいケージ(新奇環境群)、②回転輪付の新しいケージ(回転輪運動群)、③ケージ交換を一切おこなわない対象群の3つである。その結果、新奇環境群では、約50%のマウスが新奇環境暴露により行動リズムの再同調が促進されたが、残りの50%は対象群と同程度の位相反応しか認められなかった。一方、回転輪運動群ではほぼ全ての個体で行動リズムの再同調が完了していた。一方、骨格筋の *Per1-luc* リズムは新奇環境群、回転輪運動群では再同調が完了していたが、対象群は移行期にあった。肺については、新規環境群では対象群と同じく移行期にある個体と回転輪運動群と同様に再同調が促進された個体の2群に分かれた。視交叉上核、肝臓のリズムには実験条件による差は認められなかった。新奇環境暴露群においても行動リズム、骨格筋、肺の *Per1-luc* リズムの再同調が回転輪運動群と同様に認められたことから、交感神経活動を増加させ、コルコステロン分泌を促進することから視床下部-交感神経-副腎髄質系、視床下部-下垂体前葉-副腎皮質系が關与することが示唆された。

(3) 中枢時計と末梢時計による行動リズムの制御機構

一連の研究から、視交叉上核の *Per1-luc*

リズムは回転運動による再同調促進効果は認められず、実験条件によっては行動リズムとの乖離がみられた。しかし、最近の研究から、日長を変化させると視交叉上核の領域特異的に遺伝子発現リズムの位相が変化し、視交叉上核内のダイナミズムが行動リズムの制御に関わることが報告されており。視交叉上核内の領域特異的な解析が、回転運動による行動リズム再同調促進メカニズムを解明する足がかりになると考えた。そこで、まず回転運動を負荷しない条件下で、視交叉上核の Per1 リズムと行動リズムを明暗周期位相シフト前後で経時的に測定する実験を行った。視交叉上核は、冠状断方向に吻側、中間部、尾側の3領域にわけ、各領域の Per1 リズムを測定した。その結果、行動リズムが再同調に達するまでの移行期では、吻側と中間部の Per1 リズムは2縫性となり、尾側では単峰性のリズムがみられ視交叉上核の領域間で Per1 リズムの位相差(脱同調)が生じていた。行動リズムの解析では、位相シフトした明暗周期に対する位相反応は行動終了位相が開始位相に比べて有意な位相前進がみられ2つの位相が異なる反応性を示した。即ち、明暗周期の位相シフトにより視交叉上核の領域間で Per1 発現リズムに位相差が生じることから、各領域のリズムが行動リズムの開始、終了位相間にみられる位相反応の差を説明する手がかりとなることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計6件)

- 1) Yujiro Yamanaka, Yohko Suzuki, Takeshi Todo, Ken-ichi Honma, Sato Honma. Loss

of circadian rhythm and light-induced suppression of pineal melatonin levels in *Cry1* and *Cry2* double-deficient mice. *Genes Cells*. 2010; 15(10): 1063-71. [査読有]

- 2) 山仲勇二郎, 本間さと, 本間研一. 睡眠障害が身体に及ぼすメカニズム. *ねむりと医療*. vol. 3 no. 2: pp. 1-7. (2010) [査読無]
- 3) Yujiro Yamanaka, Satoko Hashimoto, Yusuke Tanahashi, Shin-ya Nishide, Sato Honma, and Ken-ichi Honma. Physical exercise accelerates re-entrainment of human sleep-wake cycle but not of plasma melatonin rhythm to 8 h phase-advanced sleep schedule. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2010; 298(3): R681-91. [査読有]
- 4) 山仲勇二郎, 本間さと, 本間研一. 睡眠・覚醒・生体リズムの調節機構. *日本臨床*. 67 巻 8 号: pp. 1475-1482. (2009) [査読無]
- 5) 山仲勇二郎, 橋本聡子, 本間さと, 本間研一. 時差症候群・交代勤務睡眠障害のバイオロジー. *睡眠医療*. 3: pp. 379-382. (2009) [査読無]
- 6) 山仲勇二郎, 本間さと, 本間研一. 睡眠障害の時間治療. *医薬ジャーナル*. Vol. 45 (6) : pp. 107(1617)-112(1622). (2009) [査読無]

[学会発表] (計10件)

- 1) 山仲勇二郎. 時間隔離実験室を利用したヒト生物時計の構造解析. 第17回日本時間生物学会学術大会. 2010年11月20日(早稲田大学 国際会議場・井深大記念ホール, 東京都 新宿区)
- 2) 吉川朋子, 松野亜美, 山仲勇二郎, 西出

- 真也, 本間さと, 本間研一. 母子分離中の環境温度が新生ラットの概日リズムにおよぼす影響. 第17回日本時間生物学会学術大会. 2010年11月20日~21日(早稲田大学国際会議場・井深大記念ホール, 東京都 新宿区)
- 3) 山仲勇二郎, 本間さと, 本間研一. マウス末梢時計の8時間位相前進させた明暗周期への再同調は新奇環境暴露により促進される. 第90回北海道医学大会生理系分科会・日本生理学会北海道地方会. 2010年9月25日(旭川医科大学, 北海道 旭川市)
- 4) 山仲勇二郎. 運動が生体リズムに与える影響. 第65回日本体力医学会大会. 2010年9月16日(千葉商科大学, 千葉県市川市)
- 5) 山仲勇二郎, 本間さと, 本間研一. 明暗周期位相シフト後の新奇環境暴露によるマウス末梢時計の再同調促進効果に関する考察. 第87回生理学会大会. 2010年5月21日(いわて県民情報交流センターアイーナ, 岩手県 盛岡市)
- 6) Yujiro Yamanaka, Satoko Hashimoto, Koji Nakamura, Yusuke Tanahashi, Shin-ya Nishide, Yoshiko Yamada, Sato Honma, Ken-ichi Honma. Rapid shift of social schedule induces an internal desynchronization between sleep-wake cycle and plasma melatonin rhythms. The 1st ASRS Summit and Symposium of Asia Oceania Sleep Research and Sleep Medicine in Okinawa. 2009年10月31日(万国津梁館, 沖縄県 名護市)
- 7) 山仲勇二郎, 橋本聡子, 中村宏次, 本間さと, 本間研一. 脱同調パラダイム実験によるヒト生物時計の構造解析. 日本睡眠学会第34回定期学術集会. 2009年10

月25日(大坂国際会議場, 大阪府 大阪市)

- 8) Yujiro Yamanaka, Sato Honma, Ken-ichi Honma. Nonphotic time cues phase-dependently accelerate phase-shifts of mouse peripheral clocks. XI. Congress of European Biological Rhythm Society. 2009年8月24日(ストラスブール大学, フランス ストラスブール)
- 9) Yujiro Yamanaka, Sato Honma, Ken-ichi Honma. Scheduled novel exposure phase-dependently accelerates re-entrainment of mouse peripheral clocks after an 8 h advanced light-dark cycles. Sapporo Symposium on Biological Rhythm. 2009年8月3日(北海道大学学術交流会館, 北海道 札幌市)
- 10) Yujiro Yamanaka, Sato Honma, Ken-ichi Honma. Re-entrainment of circadian rhythms after 8 h advanced light-dark cycles depends on the timing of exposures to novel environment in mice. XXXVI the International Union of Physiological Sciences 2009. 2009年8月1日(国立京都国際会館, 京都府 京都市)

[図書] (計1件)

- 1) 山仲勇二郎, 本間さと, 本間研一. 体温リズムの異常. 朝倉書店. からだと温度の事典. (2010) pp. 139-142.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山仲 勇二郎 (YAMANAKA YUJIRO)
北海道大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号: 20528433

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし