

令和 3 年 5 月 19 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2020

課題番号：16H03257

研究課題名(和文) 栄養と運動による代謝と行動の日周リズム形成における階層的制御機構

研究課題名(英文) Hierarchical control mechanism in the formation of diurnal rhythms of metabolism and behavior by nutrition and locomotion

研究代表者

瀧口 正樹 (Takiguchi, Masaki)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：40179578

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：恒明条件下での概日行動リズム周期の延長が亢進した遺伝子標的破壊マウスについて、視交叉上核培養切片における時計遺伝子の概日発現リズムを調べた。恒明条件下での飼育では、明暗サイクル下に比べて、周期長の不安定化が見られたが、対照遺伝子型群に比べて有意差は認められなかった。現在、回転輪走行動による概日行動リズム周期の短縮における差異について検討中である。

肝臓に存在する尿素回路の5種類の酵素のうち、通常食摂取マウスでは、2種の酵素mRNAレベルにのみ日周リズムを認めた。一方、延長絶食、高炭水化物(無タンパク質)食、低タンパク質食、高タンパク質食では大部分の酵素mRNAレベルに日周リズムが見られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一般にマウス等の夜行性動物の概日行動リズム周期は恒明条件下で延長する。この延長の亢進を示した遺伝子標的破壊マウスは、活動・摂食による概日性あるいは日周性の行動リズム制御の優れたモデル系であり、リズム周期延長亢進の機構解明によりリズム障害への理解を深めうる。

肝臓の尿素回路は、アミノ酸に由来する有毒なアンモニアを尿素へと変換して解毒する代謝酵素系であり、その機能は、アミノ酸を摂取する摂食期に加え、体タンパク質を分解して得られるアミノ酸から糖新生を行なう絶食期にも必要とされる。その複雑なリズム形成機構の解明により、摂食・栄養による各種生理学的事象のリズム形成機構への理解が深まると信ずる。

研究成果の概要(英文)： We investigated the circadian expression rhythm of a clock gene in cultured slices of the suprachiasmatic nuclei derived from gene-targeted mice exhibiting enhanced elongation in the period length of circadian locomotor rhythms under the constant lightness. In cultured slices derived from mice kept under the constant lightness, period lengths of clock gene expression rhythms became unstable compared with the light-dark cycle condition, but no significant difference was observed compared with control genotypes. Currently, we are investigating the difference in shortening the period length of circadian locomotor rhythms due to the rotating-wheel running.

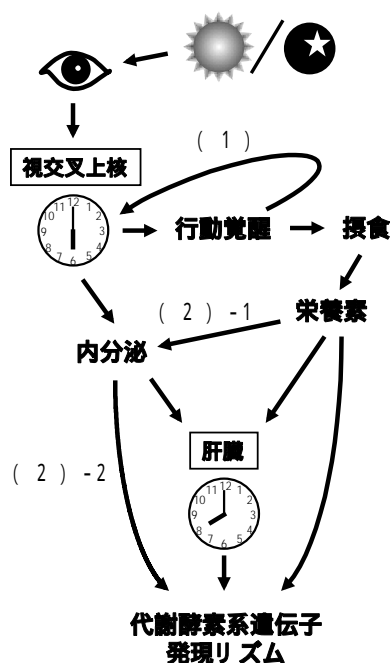
Out of five enzymes of the urea cycle present in the liver, mice fed with the standard diet showed diurnal rhythms of mRNA levels only in two enzymes. On the other hand, with prolonged fasting, a high-carbohydrate (no-protein) diet, low-protein diets, and high-protein diets, diurnal rhythms were observed in most enzyme mRNA levels.

研究分野：時間生物学

キーワード：生物時計 時間生物学 概日リズム

1. 研究開始当初の背景

概日(約1日の意)リズムは、生物内在性・自律性の生物時計によって発振され、地球の自転に同調して24時間の日周リズムを生む。全身の細胞では、時計遺伝子の転写が自らの産物の時計タンパク質により抑制され、活性化と不活性化を繰り返すことにより概日リズムが発振される。概日リズムを24時間に同調させる最も強力な因子は光(明暗サイクル)と栄養(摂食/絶食サイクル)である[図]。脳視床下部に存在する視交叉上核は全身の概日リズムの中核として機能する。光刺激は網膜視床下部路を経て視交叉上核ニューロンの時計遺伝子 *Period 1* (*Per1*) 等を活性化することによりその概日時計を日々リセットする。視交叉上核は活動/休息(覚醒/睡眠)の支配を通じて摂食/絶食サイクルを統御し、これによって規定される全身の細胞への摂取栄養素の供給が、各細胞の概日時計をリセットする[図では肝臓を例示]。一方、視交叉上核は内分泌系を通じても全身の時計のリセットに寄与し、これは摂取栄養素による修飾を受ける。さらに、栄養素や内分泌系は時計遺伝子のリセットに加え、より直接的にも代謝等の生理機能のリズムを制御する。このように、各種生理機能の日周リズム形成においては、各機能間のネットワークがさらに、視交叉上核を頂点とする階層的な支配を受け、この複合的な制御機構の解明が切望された。



報告者らは独自に開発した微量 mRNA 増幅法 (Ohtsuka, S., et al. 2004 *Genomics* 84, 715; Adachi-Uehara, N., et al. 2006 *Exp. Eye Res.* 83, 849; Miyauchi, O., et al. 2013 *PLoS ONE* 8, e79236) を応用したマイクロアレイ解析を行い、各種神経伝達物質に応答する遺伝子としてセクレトグラニン 遺伝子 *Scg2* を同定した (Iwase, K., et al. 2014 *J. Neurochem.* 128, 233)。さらに、世界に先駆けて作成した同遺伝子のノックアウト (KO) マウスは、350ルクスの恒明条件下で約 26.1 時間周期の概日行動リズムを示し、対照マウスの 25.3 時間に比し顕著な遅延を示した。一方、暗期前期の光パルス照射による位相後退には著変が見られなかった。従って、*Scg2* KO マウスの恒明条件下での概日行動リズム周期遅延の亢進を十分に説明するには、行動覚醒による膝状体間小葉、縫線核等からのフィードバック制御 [図の (1)] がもたらすリズム周期短縮効果の変化等を精査する必要性が示された。

他方、報告者らは先ず、摂食によるリズム変動が顕著な肝臓の脂肪合成系に着目し、その制御因子である *Spot14* (Sakao, E., et al. 2003 *J. Biol. Chem.* 278, 30450; Ishihara, A., et al. 2007 *J. Biol. Rhythms* 22,324) と *SREBP-1* (Matsumoto, E., et al. 2010 *J. Biol. Chem.* 285, 33028) の日周発現リズムの解析を行い、食餌 3 大栄養素組成の著しい影響を受けることを示した。また、従来より、報告者らは、アミノ酸の代謝により生じるアンモニアを解毒する尿素回路の酵素遺伝子群について転写調節機構の研究を行い (Takiguchi, M. & Mori, M. 1995 *Biochem. J.* 312, 649 に総説)、その過程で、同様にアミノ酸に由来する炭素骨格からグルコースを生成する糖新生系と協調した制御を受けることを示し、両酵素系が形成する「代謝ブロック」の概念を提唱した (Kimura, T., et al. 1998 *J. Biol. Chem.* 273, 27505)。さらに近年、両系遺伝子の日周発現リズムに対する食餌条件の影響を調べ、肝臓の代表的代謝経路である糖新生系と尿素回路の酵素遺伝子群の同調した発現リズム変動が、栄養素の直接的効果に加え、内分泌ネットワークのリズム変動によって媒介される [図の (2)-1 および-2] との仮説を得るに至った。

2. 研究の目的

本研究では、視交叉上核のリズム発振における光刺激に対する応答と行動覚醒からのフィードバックによる統合制御の機構 [図の (1)]、および摂取栄養素が内分泌ネットワークのリズム変動を介して肝臓の代謝酵素遺伝子の日周発現リズムを形成する機構 [図の (2)-1 および-2] の究明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 視交叉上核の概日リズム発振の統合制御における *Scg2* の役割

i) 行動覚醒によるフィードバック制御における *Scg2* の役割の検討: *Scg2* KO マウスおよび対照群として同腹の野生型あるいはヘテロ接合型マウスを、回転輪を装着したケージにおいて、12時間:12時間明暗 (12:12 明暗) サイクルにて 2 週間飼育後、恒明 (350ルクス) 条件下にて 3 週間以上飼育した。回転輪走行運動量のモニタリングに加え、放出赤外線検出式センサーを用いて自発行動量のモニタリングを行った。データの収録および解析には ClockLab システムを用い

た。回転輪を自由に走行させた場合と、回転輪をロックした場合の自発行動量の比較を行った。
ii) 視交叉上核の培養切片における概日発光リズム周期を指標にした解析: 時計遺伝子 *Per2* にルシフェラーゼ遺伝子 *Luc* を融合させた *mPer2: Luc* ノックインと *Scg2 KO* との二重変異マウスおよび対照マウスを 12:12 明暗サイクルあるいは恒明条件下で飼育し、少なくとも 10 日間自発行動量のモニタリングを行った後、視交叉上核切片を調製し組織培養を行った。リアルタイム発光計測システム *Kronos dio* を用いて *mPer2: Luc* に由来する発光をモニターした。

(2) 肝臓における尿素回路酵素遺伝子の日周発現リズムの食餌栄養素による制御

C57BL/6 雄マウスを 12:12 明暗サイクル [点灯時を **Zeitgeber time (ZT) 0** 時, 消灯時を **ZT12** 時と称する], 通常食 (クレア **CE-2: 55%炭水化物, 5%脂肪, 28%タンパク質** [固形成分重量比]) 自由摂食下にて 2 週間飼育後、餌を高脂肪食 (クレア **High Fat Diet 32: 22%炭水化物, 36%脂肪, 30%タンパク質**), 高炭水化物 (無タンパク質) 食 (**81%炭水化物, 6%脂肪, 0%タンパク質**), 低タンパク質食 (**66%炭水化物, 6%脂肪, 15%カゼイン**あるいは大豆タンパク質), 高タンパク質食 (**21%炭水化物, 6%脂肪, 60%カゼイン**あるいは大豆タンパク質) に変え、さらに 1 週間飼育した。延長絶食においては、**ZT9** 時に餌を除去し、さらに 2 晩飼育した。**ZT3** 時から 4 時間毎に、下大静脈から全血液と、肝臓を採取し、以下の解析を行った。

i) 尿素回路酵素 mRNA レベルの日周リズムの変化: 肝臓から RNA を抽出し、ノザン法により、尿素回路の 5 種類の酵素の mRNA レベルの日周リズムを調べた。

ii) 血中液性因子レベルの日周リズムの変化: 血漿中のインスリン、グルカゴン、レプチン、グレリン、コルチコステロン、**GIP, GLP-1** 等の代謝調節能の強いホルモン、液性因子の濃度リズムを調べ、糖新生系ならびに尿素回路酵素 mRNA レベルの日周リズムの変化を説明しうるか否かを検討した。また、血漿中の総タンパク質、アルブミン、尿素窒素を測定した。

マウスの飼育と実験は、千葉大学動物実験実施規程に準拠して行った。

4. 研究成果

(1) 視交叉上核の概日リズム発振の統合制御における *Scg2* の役割

i) 行動覚醒によるフィードバック制御における *Scg2* の役割の検討: これまでに、*Scg2 KO* マウス雄 3 匹、雌 3 匹と、対照群として同腹の *Scg2* 野生型あるいはヘテロ接合型マウスについて、恒明条件下で回転輪運動有り、無し各 3 週間にわたり、放出赤外線検出式センサーを用いた自発行動量のモニタリングを行った。今後、回転輪運動有り、無しの条件で概日行動リズム周期長に差異が認められるか、詳細な統計学的解析を行う予定である。

ii) 視交叉上核の培養切片における概日発光リズム周期を指標にした解析: *mPer2: Luc* ノックインと *Scg2 KO* との二重変異マウス、および対照群として同腹の *Scg2* 野生型あるいはヘテロ接合型マウス (**WH**) を、12:12 明暗サイクル (**LD**) あるいは恒明 (**LL**) 条件下で飼育後、視交叉上核切片を培養し、リアルタイム発光計測システムを用いて *mPer2: Luc* に由来する発光をモニターした。培養開始後モニタリングが安定した直後の 3 周期の平均長は、**KO/LD, KO/LL, WH/LD, WH/LL** の群間で有意差を認めなかった。一方、3 周期の変動係数 (標準偏差 / 平均値) は、**KO/LL** および **WH/LL** では **WH/LD** に比べ有意な増加が見られ、恒明条件下では、視交叉上核における時計遺伝子発現リズム周期が不安定化していることが示唆された。なお、切片培養の培地交換を行うと、いずれの群間でも、変動係数の差異が認められなかった。これは、培地交換により時計遺伝子発現リズムがリセットされたためと考えられ、また、この条件下では、**KO** と **WH** 群間でリズム特性に大きな差異が検出されないことが示された。

(2) 肝臓における尿素回路酵素遺伝子の日周発現リズムの食餌栄養素による制御

i) 尿素回路酵素 mRNA レベルの日周リズムの変化: 尿素回路の 5 種類の酵素のうち、各栄養条件で以下の数の酵素の mRNA レベルに有意な日周リズムが認められた: 通常食, 2 種; 延長絶食, 4 種; 高脂肪食, 1 種; 高炭水化物 (無タンパク質) 食, 5 種; 15%カゼイン食, 5 種; 60%カゼイン食, 4 種; 15%大豆タンパク質食, 5 種; 60%大豆タンパク質食, 5 種。通常食と高脂肪食において日周リズムを示す酵素が少ない理由としては次の理由が考えられる: 尿素回路は、アミノ酸に由来する有毒なアンモニアを尿素へと変換して解毒する代謝酵素系であり、その機能は、アミノ酸を摂取する摂食期に加え、体タンパク質を分解して得られるアミノ酸から糖新生を行なう絶食期にも必要とされる; これは、適量のタンパク質を含有する標準食 (28%タンパク質) や高脂肪食 (30%タンパク質) で特に妥当し、尿素回路酵素遺伝子は摂食期と絶食期に共に活性化され、その日周発現リズムは平坦に見える。これに対し、延長絶食、高炭水化物 (無タンパク質) 食、低タンパク質 (15%カゼインあるいは大豆タンパク質) 食では、摂食期 (延長絶食の場合は主観的摂食期) のアミノ酸負荷が消失あるいは軽減し、相対的に絶食期の発現活性化が著明になる。他方、高タンパク質 (60%カゼインあるいは大豆タンパク質) 食では、摂食期のアミノ酸負荷が増加し、発現活性化が亢進する。今後、こうした仮説の検証をさらに進める。

ii) 血中液性因子レベルの日周リズムの変化: 報告者らは先行する研究課題・基盤研究 (B) 「光と栄養による行動・代謝連環の日周リズム制御」において、血漿中のインスリン、グルカゴン、レプチン、グレリン、コルチコステロン、**GIP, GLP-1** 等の代謝調節能の強いホルモン、液性因子の日周リズムを明らかにした。通常食において、コルチコステロン濃度は絶食期初期から摂食期中期にかけて増加する日周リズムを示し、延長絶食、高炭水化物 (無タンパク質) 食では、さらに全般的な増加を示した。通常食において、グルカゴン濃度は変動を示さなかったが、インスリン濃度は絶食期に低下しグルカゴン / インスリン (**G/I**) 比が増加し、延長絶食、高炭水化物

(無タンパク質)食では、さらに全般的な増加を示した。今後、コルチコステロンや G/I 比が、特に、延長絶食、高炭水化物(無タンパク質)食における尿素回路酵素遺伝子の日周発現リズムを説明しうるか精査する必要がある。一方、高タンパク質(60%カゼインあるいは大豆タンパク質)食では、むしろ摂食期に低血糖が見られ、グルカゴン濃度も逆説的な上昇を示した。これは、少なくとも一部、高タンパク質食における、尿素回路酵素遺伝子の顕著な日周発現リズムを説明しうると考えられる。尿素窒素は、通常食、延長絶食、高炭水化物(無タンパク質)食、高タンパク質食において日周リズムを示し、ピークは、高炭水化物食を除き、いずれも摂食期・主観的摂食期に見られた。総タンパク質は、高タンパク質食において日周リズムを示し、摂食期にピークが見られた。アルブミンは、高脂肪食と高カゼイン食において日周リズムを示し、それぞれ、絶食期と摂食期にピークが見られた。これらから、尿素回路酵素遺伝子の日周発現リズムの意義考察に資する生理現象の例証が得られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Taira Akiko, Arita Emiko, Matsumoto Eriko, Oohira Ayano, Iwase Katsuro, Hiwasa Takaki, Yokote Koutaro, Shibata Shigenobu, Takiguchi Masaki	4. 巻 36
2. 論文標題 Systemic oscillator-driven and nutrient-responsive hormonal regulation of daily expression rhythms for gluconeogenic enzyme genes in the mouse liver	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chronobiology International	6. 最初と最後の頁 591 ~ 615
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/07420528.2019.1570246	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sugimoto Kazuo, Hiwasa Takaki, Shibuya Kazutomo, Hirano Shigeki, Beppu Minako, Iose Sagiri, Arai Kimihito, Takiguchi Masaki, Kuwabara Satoshi, Mori Masahiro	4. 巻 325
2. 論文標題 Novel autoantibodies against the proteasome subunit PSMA7 in amyotrophic lateral sclerosis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Neuroimmunology	6. 最初と最後の頁 54 ~ 60
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jneuroim.2018.09.013	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 YOSHIDA Yoichi, HIWASA Takaki, MACHIDA Toshio, KOBAYASHI Eiichi, MINE Seiichiro, MATSUSHIMA Jun, TAKIGUCHI Masaki, IWADATE Yasuo	4. 巻 58
2. 論文標題 Elevation of Autoantibody in Patients with Ischemic Stroke	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neurologia medico-chirurgica	6. 最初と最後の頁 303 ~ 310
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2176/nmc.ra.2018-0022	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Iwadate Yasuo, Suganami Akiko, Tamura Yutaka, Matsutani Tomoo, Hirono Seiichiro, Shinozaki Natsuki, Hiwasa Takaki, Takiguchi Masaki, Saeki Naokatsu	4. 巻 80
2. 論文標題 The Pluripotent Stem-Cell Marker Alkaline Phosphatase is Highly Expressed in Refractory Glioblastoma with DNA Hypomethylation	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Neurosurgery	6. 最初と最後の頁 248 ~ 256
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/neuros/nyw026	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	守屋 彰悟 (Moriya Shogo) (00793837)	千葉大学・大学院医学研究院・特任講師 (12501)	
研究分担者	菅波 晃子 (Suganami Akiko) (10527922)	千葉大学・大学院医学研究院・助教 (12501)	
研究分担者	岩瀬 克郎 (Iwase Katsuro) (80322030)	千葉大学・大学院医学研究院・講師 (12501)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	有田 恵美子 (Arita Emiko)	千葉大学・大学院医学研究院・技術職員 (12501)	
研究協力者	玉井 恵子 (Tamai Keiko)	千葉大学・大学院医学研究院・技術補佐員 (12501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------