

令和元年5月16日現在

機関番号：34504

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08535

研究課題名(和文) Usp46変異マウスを活用した概日リズムの給餌同調機構の解明

研究課題名(英文) Food entrainment of circadian activity rhythms in Usp46 mutant mice

研究代表者

海老原 史樹文 (Ebihara, Shizufumi)

関西学院大学・理工学部・教授

研究者番号：50135331

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：CS マウスは、給餌サイクルに概日リズムが同調する特異な性質を持つ。また、抗うつ薬の反応性を調べる強制水泳や尾懸垂テストにおいて無動化しない。申請者は、CS マウスの無動化の原因遺伝子Usp46 を特定していたが、新たにUsp46KO マウスの概日リズムが給餌サイクルに同調することを見出した。Usp46 はGABA 神経系の機能制御に関係することから、本研究では、給餌同調にGABA 系が関与しているか否かについて検討した。しかし、給餌同調にGABA系が関与する明確な結論を得ることはできなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

交代勤務や海外旅行による概日システムのみスアライメント(時差ぼけ状態)や明暗サイクルに同調できない視覚障害者、あるいは非24 時間睡眠覚醒症候群などの概日リズム睡眠障害に対して、食事などの非光同調因子を概日リズムの有効な同調因子として利用できる新しい技術の開発につながる学術的、社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：Circadian wheel-running rhythms of CS mice perfectly entrain to 24h feeding cycles, which is not usually observed in other strains of mice. In addition these mice show typical behavioral phenotype in the tail suspension test and forced swimming test, which are widely used for assessing antidepressant activity and depression-like behavior. We have identified Usp46 as a causative gene for these behavioral phenotypes. Recently, we found that Usp46 KO mice entrain to feeding cycles as CS mice. Because Usp46 affects GABA systems, this study examined the hypothesis that Usp46 is involved in entrainment of circadian activity rhythms to feeding cycles. However, the results does not support this hypothesis.

研究分野：時間生物学

キーワード：概日リズム 給餌同調 マウス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

光は概日リズムの最も強力な同調因子であるが、光以外の同調因子として給餌サイクルがよく研究されている。ラットやマウスでは、1日の一定時間に限定して餌を与える (restricted feeding schedule, RF) と、給餌2~3時間前から給餌時刻に向かって急激に活動性が増加する給餌予知活動リズムが観察される。このリズムは、主時計である視床下部の視交叉上核 (suprachiasmatic nucleus, SCN) に依存して現れるのではなく、摂食同調振動体 (food entrainable oscillator, FEO) の働きにより出現する。しかし、FEO の局在や実体についてはこれまでに多くの研究が行われたにもかかわらず未だに明らかにされていない。一般に、給餌サイクルは SCN 振動体に影響せず、恒常環境下で制限給餌サイクルを与えると、給餌サイクルに同調した予知活動リズムと SCN に依存したフリーランニングリズム (同調していないリズム) とが混在して現れる (図1左)。

しかし近交系マウス CS は、給餌サイクルに対して SCN と FEO のいずれの振動体も同調する (1)。すなわち、CS マウスは、予知活動リズムもフリーランニングリズムも給餌サイクルに100パーセント同調するこれまでに例のない極めて特異なマウスである (この現象を給餌同調と呼ぶことにする)。CS マウスは給餌同調以外にも、周期が長い、リズム分割が起きるなど野生型マウスとは異なる概日特性を示す。一方、申請者は、抗うつ薬の反応性を調べる強制水泳や尾懸垂テストにおいて CS マウスでは無動化が起きないことを発見し、遺伝学的手法により、無動行動を制御する量的形質遺伝子、*Usp46* を特定することに成功した (2)。この遺伝子は、脱コピキチン化酵素をコードしており、養育行動、認知/記憶行動、スクロース嗜好性など多様な行動表現型に影響を及ぼす (3)。さらに最近、*Usp46* ノックアウト (KO) マウスの概日リズムが、CS マウスと同様に給餌サイクルに同調することを新たに見出した (図1右)。

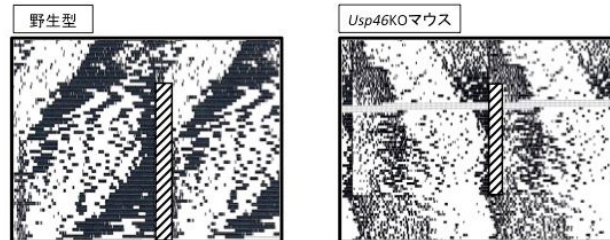


図1. 概日リズムに及ぼす制限給餌 (RF) の影響  
野生型マウス: リズムはRFに同調しないが予知活動が見られる。  
*Usp46*KOマウス: RFに同調したリズムと予知活動が見られる。

この発見は、給餌同調の制御機構解明に向けた重要な手掛かりとなると考えられる。本研究では、CS マウスの給餌同調は、図2に示すように、通常のマウスとは異なる機構によるものと仮定して実験を行なった。すなわち、CS マウスにおいては、FEO を介して摂食情報が SCN に伝わり、摂食サイクルに同調した活動リズムが生じると考え、その原因として GABA 神経系の関与を想定した。

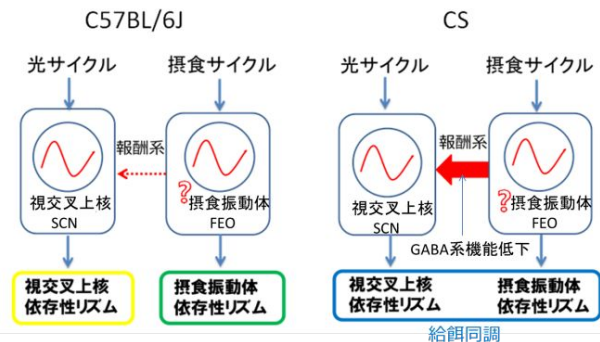


図2 CS マウスの給餌同調仮説

2. 研究の目的

これまでに、*Usp46* は抑制性神経伝達物質である GABA の働きに影響を与える (2、4) ことが明らかとなっていることから、本研究では、*Usp46* 変異マウス (CS、*Usp46* KO マウス) を活用して概日リズムの給餌同調に関する GABA 神経系の関与について検討した。そのために以下の実験を行なった。

(1) *Usp46* 変異マウスの概日リズムの特性の把握

*Usp46* KO マウスは CS といくつかの行動異常が共通するが、概日リズムについての共通性は明らかでない。そこで、C57BL/6J を遺伝的背景に持つ *Usp46* KO マウスを用いて、概日リズムの各種パラメータ、光による位相反応、嗜好餌呈示による概日リズムへの影響を調べた。

(2) 給餌刺激に伴う概日リズムの位相変位誘発法の確立

給餌同調の神経機構を明らかにするために、給餌刺激に伴う概日リズムの位相変位誘発法の確立を行った。給餌同調が生じるためには、概日リズムの位相前進・後退が生じているはずである。そこで、給餌に対する概日リズムの位相変位誘発法として最適な条件について検討した。その際に、通常の餌に加え、報酬系を刺激する餌についても検討した。

(3) 給餌同調における報酬系の関与

先行研究において、FEO 依存性リズムの発生に報酬系の関与が報告されていることから (5)、給餌同調にも報酬系が関与している可能性について検討した。

(4) 行動薬理学的検討

上記で確立した手法を用いて、位相変位に GABA 系が関与しているかについて、GABA 受容体作動薬、拮抗薬を用いて給餌に伴う位相変位への影響を検討した。

(5) 組織化学的検討

*Usp46* の脳内発現部位を明らかにすることは、給餌同調機構を考察する上で重要である。し

かし、免疫組織化学に適する USP46 特異抗体が作成できていないため、ここでは *Usp46* 遺伝子の第 1 exon 下流に挿入されたトラップベクター由来の *lacZ* ( $\beta$ -galactosidase をコード) を利用した X-Gal 染色を用いて発現部位を調べた。

### 3. 研究の方法

#### (1) *Usp46* 変異マウスの概日リズムの特性の把握

マウスを回転輪付きの飼育ケージ入れ、明暗周期 (LD 12 : 12) と恒暗条件下で輪回し活動リズムを長期間測定した。まず、概日リズムの基本特性である、活動量、活動パターン、概日周期について調べた。次に、恒暗条件下で短時間 (30 分) の光パルス照射した時の概日リズムの位相反応を調べた。さらに、高嗜好餌を毎日一定時刻に提示した時の概日リズムの変化について、明暗条件 (LD 14 : 10) と恒暗条件で調べた。

#### (2) 給餌刺激に伴う概日リズムの位相変位誘発法の確立

CS マウスを用いて実験を行った。まず、自由摂食下で概日リズム (回転輪活動) を明暗周期 (LD 12 : 12) に同調させ、次に、24 時間の絶食後、LLdim (恒薄明条件) の下で 3 日間連続して 1 日摂取量 (g) の 8 割のエサを定刻に与えた (制限給餌)。制限給餌を行う時刻は明期開始後 0、6、12、18 時間とし、その後自由摂食に戻し、10 日間の活動リズムの記録をもとに位相変位量を測定した。また、コントロールとして、CS マウスを同じ光条件スケジュールのまま自由摂食させる群を設けた。さらに、CS マウスの実験結果から、最大位相変位を起こす時刻を求め、C57BL/6J マウスで制限給餌実験を同様に行った。

#### (3) 給餌同調における報酬系の関与

通常餌と嗜好餌 (チョコレートクッキー) を用いて嗜好性テストを行った。その結果、嗜好餌の摂食量が有意に多く、高い嗜好性が確認された。そこで、CS マウスに嗜好餌を呈示して給餌同調を調べた。

#### (4) 行動薬理的検討

CS マウスでは、GABA 神経系の機能低下により、FE0 から SCN へ情報がより強く伝達されると考えられる。そこで C57BL/6J マウス (FE0 から SCN への情報が弱い) に対して GABA<sub>A</sub> 受容体遮断薬であるピククリンを、CS マウスに対して GABA<sub>A</sub> 受容体作動薬であるニトラゼパムを投与し、位相変位への影響を調べた。

#### (5) 組織化学的検討

*Usp46* KO マウスにおける *Usp46* 遺伝子の第 1 exon 下流に挿入されたトラップベクター由来の *lacZ* ( $\beta$ -galactosidase をコード) を利用した X-Gal 染色により *Usp46* の脳における発現領域を検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) *Usp46* 変異マウスの概日リズムの特性の把握

*Usp46* KO マウスにおける概日リズムの各種パラメータは CS マウスとは異なっていた。光による位相反応は暗期前半の位相後退の変化量が小さく、光への活動の適応性の低さが示されたが、既知の CS の知見とは異なる特徴を示した。嗜好餌の提示では、恒暗条件で特徴的な形質は見られなかったが、明暗条件で明期中央の嗜好餌提示には先行研究にある CS と似た活動増加が呈された。しかし嗜好餌提示の中止に伴う恒暗条件の移行で、視交叉上核に制御される活動への影響は見られず、食事による同調の面で CS とは異なる結果を示した。

#### (2) 給餌刺激に伴う概日リズムの位相変位誘発法の確立

CS マウスでは、コントロール群でわずかな位相変位しか見られなかった (平均で約 10 分の位相前進) が、明期開始直後に制限給餌を行った場合、平均約 40 分の位相前進、明期開始後 6 時間で平均約 100 分の前進、明期開始後 12 時間で平均約 65 分の前進が見られた。つまり、明暗条件の明期のいずれの時刻 (明期開始後 0 時間、6 時間、12 時間) に制限給餌を行っても、コントロール群と比べて位相が有意に前進した。一方で、暗期の中央に当たる明期開始後 18 時間に制限給餌を行った場合は、平均約 5 分の位相後退が見られた。また、CS マウスにおいて最大の位相変位を引き起こした明期開始後 6 時間に、C57BL/6J マウスを用いて同様の実験を行ったところ、ほとんど位相変位を示さなかった (平均で約 12 分の位相前進)。これらの結果から、CS マウスでは短期間の制限給餌によって位相変位を引き起こすことができ、明期開始後 6 時間の制限給餌が最も位相変位を引き起こす度合いが強いことが分かった。従って、CS マウスにおける食事同調の脳内メカニズムの解明を行うための薬物投与実験の際には、明期開始後 6 時間に制限給餌を行うと良いことが分かった。

#### (3) 給餌同調における報酬系の関与

嗜好餌を与えることにより明確な給餌同調が確認できた。また、給餌同調が現れないと考えられていた C57BL/6J マウスでも嗜好餌に概日リズムが同調する個体が確認された。このことから、嗜好性の高い餌 (報酬系を強く刺激すると考えられる) により給餌同調が生じやすくなることが分かった。

#### (4) 行動薬理的検討

位相変位に GABA 系が関与しているかについて、上記で確立した手法を用いて、GABA 受容体作動薬、拮抗薬を用いて給餌に伴う位相変位への影響を検討したが、C57BL/6J、CS 共にコントロール群と薬物投与群において位相変位量に有意差が認められなかった。

#### (5) 組織化学的検討

*Usp46* 遺伝子座に挿入されたトラップベクター由来の Beta ガラクトシダーゼによる X-gal 染色を用いた組織学的探索を行ったところ、脳内で広く発現がみられたが、概日時計の中核である視交叉上核(SCN)での発現は少なかった。従って、*Usp46* KO マウスの概日リズム異常は SCN に依存するものではない可能性が考えられた。

#### <引用文献>

- Abe *et al.*, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 292.1 R607-R615 (2007)  
Tomida *et al.*, *Nat. Genet.* 41(6):688-95 (2009)  
Imai *et al.*, *PLoS One.* 8(3):e58566 (2013)  
Imai *et al.*, *PLoS One.* 7(6):e39084 (2012)  
Gallardo *et al.*, *Elife* 3 e03781 (2014)

#### 5. 主な発表論文等

[学会発表](計 2件)

村田知弥、吉岡一真、西方圭那、杉山文博、海老原史樹文、BioID による脱ユビキチン化酵素 USP46 の新規相互作用因子の同定、第 41 回 日本分子生物学会年会(神奈川県横浜市、2018 年 11 月)

坂口舞、川西美実、村田知弥、海老原史樹文、給餌刺激によるマウス概日活動リズムの位相変位誘発法、第 25 回日本時間生物学会学術大会(長崎市、2018 年 10 月)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。