

機関番号：32689

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390065

研究課題名（和文）マウス体内時計への同調因子としての朝ご飯（ブレイクファスト）の役割解明

研究課題名（英文）Role of breakfast in food-induced entrainment of mouse circadian clock

研究代表者

柴田 重信（SHIBATA SHIGENOBU）

早稲田大学・理工学術院・教授

研究者番号：10162629

研究成果の概要（和文）：我々の体内時計は24時間よりずれており24時間に合わせる機構として同調がある。同調刺激には光と食事が重要であることが分かっている。そこで、マウスを用い、朝・昼・夕食のいずれが、同調刺激として有効であるか、また、食事の内容によって同調刺激に差が見られるか否かについてマウスを用いて調べた。その結果、長い絶食の後の食餌（ブレイクファスト）が、血糖値を上げ、インスリン分泌を引き起こしやすい食事内容が体内時計を同調させやすかった。

研究成果の概要（英文）：Circadian clock is entrained by light as well as by fixed feeding. In this project we asked which mealtime is key for entrainment, and what kind of food is good entrainment. Breakfast (feeding after long-long starvation) rather than other mealtimes could entrain the liver clock. Among nutrients of food, easily digestible cornstarch had stronger entraining force through high insulin secretion. The present results suggest us digestible starch for breakfast is good maintenance of circadian rhythm.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	9,000,000	2,700,000	11,700,000
2009年度	3,100,000	930,000	4,030,000
2010年度	3,200,000	960,000	4,160,000
年度			
年度			
総計	15,300,000	4,590,000	19,890,000

研究分野：時間生物学

科研費の分科・細目：環境生理学

キーワード：体内時計、食事同調、インスリン、朝日、肝臓、代謝

## 1. 研究開始当初の背景

体内時計は発振、24時間に合わせる同調、時計信号の出力という要素から成り立っている。この中で同調は光によるものと、食事によるものと大別される。光は視交叉上核の時計を同調させるが、食事は末梢時計を同調させることが知られている。人を含む動物は、光刺激と食事刺激の両方の同調刺激を受け取り、この両者によって体内時計を同調させていると思われるが、その詳細は不明である。

## 2. 研究の目的

今回、特に食事同調における食事時間の問題、つまり（1）朝・昼・夕のいずれの食事が同調に重要であるかを明らかにする。（2）食事時間の重要性が解決できたとしても、同調効果として食餌量を明らかにする。（3）マウスの食餌成分は、炭水化物、たんぱく質、脂質、ビタミン、ミネラルから成り立っている。どのような食餌の栄養成分が同調に重要であるかを明らかにする。

### 3. 研究の方法

肝臓の Per2 時計遺伝子発現リズムをモニターするために、Per2::luciferase マウスを Takahashi のグループから入手した。このマウスを ICR 系のマウスと交配させ、F1 世代を得た、おもに雄を用いて実験を行った。動物飼育室は 8:00 点灯、20:00 消灯の明暗条件とし、時間生物学の慣例にしたがい、8:00 を ZT0、20:00 を ZT12 と表し、このマウスを *ex vivo* で観測しているときは、8:00 を pZT0、20:00 を pZT12 と表した。

通常食は、オリエンタル酵母社の MEQ を用いた。飼料の栄養成分を変更する実験では、通常食は AIN-93M とした。また、それぞれの栄養成分を増減した飼料を用いた。さらにコーンスターチを他のスターチに置換する実験では、試薬特級のでん粉を用いた。

ホタルは発光酵素であるルシフェラーゼ (luciferase) が発光基質であるルシフェリン (luciferin) を酸化することによって自ら発光する。このシステムを遺伝子のリズム解析に応用したのが、本研究で使用した実験系であるルミサイクル (ActiMetrics 社) である。Per2-luc K. I. マウスは前述したように、Per2 遺伝子にルシフェラーゼが含まれるため、ルシフェリンを加える事により、Per2 遺伝子の発現リズムを発光リズムとして観測するために、非常に高感度な光電子増倍管 (Photo multiplier tubes ; PMT) を用いた。ルミサイクルとはこの PMT を 4 つ備えたシステムであり、培養組織が生存している限り、リアルタイムなリズムの測定が可能である。本研究では、ZT3 にサンプリングされた末梢組織 (肝臓) をルミサイクルの設置された 37°C のインキュベーター内で培養し、Per2 遺伝子の発現リズム (発光リズム) を解析した。解析には、計測データ (RAW データ) から 24 時間分の移動平均値を引くディトレンド処理を行い、その後 2 時間分の移動平均値で平滑化する平滑化処理を行う。この波形データの発光値の peak 値を算出し、データを比較する。また、peak1 の値が前進したか後退したかを評価の基準とした (位相の前進・後退)。末梢組織培養における Per2-luc 発光プロファイルはサンプリングによる影響をほとんど受けず、サンプリング時のマウスの組織での Per2 遺伝子発現の位相にほぼ正確に対応している。

一般的に、制限給餌 (Restricted Feeding ; RF) とは、強制的に食事のできる時間帯を定め、その時間帯以外は餌を与えないことであり、決められた時間帯のみ餌が提示される。前述した通り、餌を与える時間帯によって、末梢組織の時計遺伝子の位相が変化するこ

とが知られており、主観的昼 (ZT0-12) の時間帯における RF では位相の前進が起こる。本研究では、位相前進効果が見やすく、同調しやすい、摂食行動を目で追いやすいなどの理由から、ZT6 からの RF で実験を行っている。これは、24 時間の絶食後 (前日の ZT6 に餌を抜く)、次の日から ZT6 に餌を提示するというスケジュールである。マウスがコントロール食に順応させるために、実験の 4 日前に標準食からコントロール (AIN-93M) 食に切り替えた。コントロール食からの 24h 絶食の後に、ZT6 にタブレットを各マウスに給餌した。また、このスケジュールにおいて、餌の提示時間は提示されてから 4 時間とし、RF 後に、食糧消費量をチェックした。4 時間以内にほとんどのマウスは完食したが、嗜好性によって完食しなかったものもいる。ZT10 までに食べきれなかった餌は取り除き、残っている餌が 2 日目に 0.09g/10g BW (一日摂食量の 2SEM) 以上のものは実験に使用しなかった。

また、DMH を破壊することにより、摂食リズムをなくしたマウスを用意した。12 時間の絶食時間を設けて餌を 1 日 2 食にする実験を行った。ZT6 と ZT18 にそれぞれ 1.8 g が摂取できるようにした。18 時間 : 6 時間と変則的な絶食をおこない 1 日 2 食 (1 日当たり 3.6 g) を与える実験を行った。この場合、餌の量比を 18 時間絶食 (朝食) と 6 時間絶食 (夕食) で (40 : 0)、(30 : 10)、(20 : 20)、(10 : 30)、(0 : 40) と変えた。

コントロール食に用いたのは、AIN-93M 調整食 (オリエンタル酵母工業社の株式会社、東京、日本 ; 構成 : カゼイン 14%、L-シスチン 0.3%、 $\alpha$  コーンスターチ 15%、 $\beta$  コーンスターチ 47%、シュークロース 10%、大豆油 4%、セルロース 5%、AIN-93 ミネラル MIX3.5%、AIN-93 ビタミン MIX1%、酒石酸水素コリン 0.25%、tert-ブチル基ヒドロキノロン 0.0008%) であり、米国国立栄養研究所 (American Institute of Nutrition, AIN) から発表された組成が世界各国で広く使われているものである。

### 4. 研究成果

#### (1) 餌の量の検討

先行研究において、4 時間の RF がマウス肝臓の時計遺伝子発現の位相前進に必要であると報告されている。そこで、Per2::luciferase mice (23.8 $\pm$ 0.8 g N = 26) を用い、24h 絶食後、4 時間の摂食量測定したところ、1 日目は 1.4 $\pm$ 0.11 g/マウス (0.60 $\pm$ 0.040 g/10 g 体重 [BW])、2 日目は 2.0 $\pm$ 0.13 g/マウス (0.85 $\pm$ 0.047 g/10 g BW) であった。したがって、以降全ての実験にお

いて、マウスの体重に適した用量のタブレットを作成し投与している。また、2日間RFのスケジュールにおいては、摂食量の多い順に肝臓の位相が有意に前進していることが確認された。(F4, 32 = 12.3, P<0.01, one-way ANOVA)。

### (2) RF 日数の検討

RF 日数検討のために 0.85g/10 g BW の餌を4時間(ZT6-ZT10)のRFし、その期間を1, 2, 4, 14日間設けた。その結果、肝臓の時計の位相前進には最低でも2日必要であり、4日間以上のRFによって位相前進の最大値に達することが解った。これは、RFを4時間に設定し、14日間経過したときの位相前進と同様の値を示しているからである。したがって、本実験では2日間のRFスケジュールを実験に採用した。AIN-93Mをコントロールとして、それぞれの栄養物のパーセント構成を示す。

### (3) 栄養素置換の効果

各栄養成分を完全置換したタブレットを初日に0.6g/10g BW、24-h絶食後の2日目に0.85g/10g BWの用量をRFした。肝臓の時計は100%のコーンスターチで観察され、同様に、大豆油でも位相前進が観察されたが、有意差は認められなかった(vs. 2day fasting P>0.05)。100%シュクロース、100%グルコース、および100%カゼインにおいては、位相前進を引き起こさなかった(P>0.05, fisher PLSD test)。100%グルコースも100%のフルクトースも位相前進を引き起こさなかったため、AIN-93Mに含まれた他の栄養成分を混合することによって、初めて肝臓の時計の位相前進への糖の機能が働くことが示唆された。また、4.5%ビタミンミネラルMIXと95.5%のグルコース、5%セルロースと95%グルコース、また4%大豆油と96%グルコースとの組み合わせは位相前進を引き起こさなかった(vs. 100%グルコース P>0.05)。しかし、14%カゼインと86%グルコースの組み合わせは肝臓の位相を有意に前進させた(vs. 100%グルコース P<0.05)。また、コントロール食(AIN-93M) (19.9 ± 1.2, N=5)と標準食(MEQ) (19.0 ± 0.8, N=5)を与えているマウスの肝臓の位相を比較すると両間に差は見られなかった。したがって、本研究においてコントロール食は標準食と同等の働きを有するものと考えた。

### (4) リズム位相異常マウスの餌による正常化

ところで、上記で用いた摂食のプロトコールは、人の健康を考えた場合矛盾する。普段通りに餌を食べている時間を無理やりに夜食

の時間帯に設定する条件になっているからである。したがって、炭水化物・カゼインの組み合わせ食が夜食として良いということになる。そこで次に、あらかじめ餌を明期の最初の4時間与えることにより、人で言うところの夕食から夜食だけ餌を食べたことにする。このようなマウスを不摂生マウスと呼び、これに正常な時間帯である暗期のはじめに餌を1-2日間1-4g与えると、与えた餌の量依存的に肝臓の体内時計の位相が元にもどる。この系の利点は、機能性食品を含んだ餌が、効率的に体内時計の位相を元に戻すことを敏感に評価できる。また餌を与えない時(ピーク位相が8-9時)に比較して餌を与えたときの位相(15-17時)が大きく後退し、自由摂食時のマウスとほとんど変わらない(図5)。実際そのようにして、餌の成分を変えて評価した。その結果、穀類のスターチは芋類のスターチより、不摂生状態の体内時計を戻す効果が強かった。

### (5) 肝臓の食餌性リズム同調の朝食効果

1日2食の実験を、ZT6, と ZT18 の12時間の絶食を空けて行った。その結果、肝臓の時計遺伝子発現のピーク時刻はZT6とZT18を単独に1日1食行った時の位相に持っていこうという引っ張り合いが起こり、中間地点のZT12に落ち着くことが分かった。次に1日2食実験を絶食時間が18時間、6時間で行った。この実験では視床下部のDMHが破壊されているので、餌のリズムが消失しているので、マウスはそれぞれ18時間絶食後の餌を朝食として、6時間の絶食後の餌を夕食として食べている。まず、朝食・夕食の餌の比率を2:2にしたところ、朝食だけ食べる群(40:0)と、同じ位置に肝臓のリズムのピークが来た。この比を15:25とし、朝食を少なめにしても朝食だけの位置と同じであった。しかしながら、10:30と夕食の比率を高めると、この場合は夕食のみ(0:40)と同じ位相に来了。以上の結果をまとめると、2食による肝臓の位相決定には絶食時間が長くて取る食餌(朝食)が効果的であること(図1)、またこの作用は食餌量依存的であることが分かった。

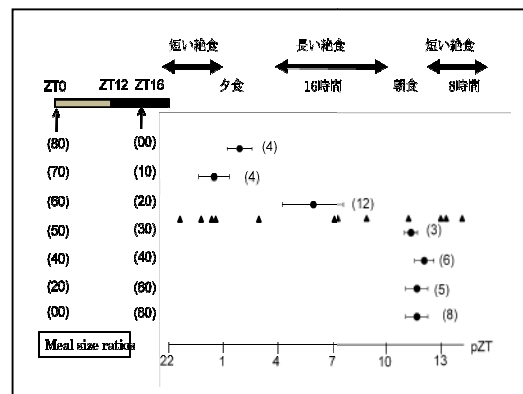


図1の説明。絶食時間を16時間:6時間とした1日2食による肝臓時計遺伝子発現リズムのリセット効果

Aは実験プロトコルを示す。括弧内の数値は餌の比率を示す(0.45mg 餌の個数) Bは実験結果を示す。2食の位相は、ZT16の餌に引張られる。しかし夕食と朝食の比が60:20のときは、位相が分散してかつ、平均値は中間地点に集まる。括弧内の数値は使用マウス数

#### 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 18 件)

① Yu Tahara, Makiko Otsuka, Yuta Fuse, Akiko Hirao, and Shigenobu Shibata. Refeeding after fasting elicits insulin-dependent regulation of *Per2* and *Rev-erba* with shifts in the liver clock. *J Biological Rhythms*, in press, 2011(査読有り)

② Yuki Nakamura; Daisuke Harama; Naomi Shimokawa; Mutsuko Hara; Rhuyo Suzuki, Yu Tahara; Kayoko Ishimaru; Rhohei Katoh; Ko Okumura; Hideoki Ogawa; Shigenobu Shibata; Atsuhito Nakao The circadian clock gene *Period2* regulates a time of day-dependent variation in cutaneous anaphylactic reaction *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, in press, 2011(査読有り)

③ Naoto Hayasaka, Kazuyuki Aoki, Saori Kinoshita, Shoutaroh Yamaguchi, John K. Wakefield, Sachiyo Tsuji-Kawahara, Kazumasa Horikawa, Hiroshi Ikegami, Shigeharu Wakana, Takamichi Murakami, Ram Ramabhadran, Masaaki Miyazawa and Shigenobu Shibata. Attenuated food anticipatory activity and abnormal circadian locomotor rhythms in *Rgs16* knockdown mice *PLoS One*, in press, 2011(査読有り)

④ Sato-Mito N, Sasaki S, Murakami K, Okubo H, Takahashi Y, Shibata S, Yamada K, Sato K; the Freshmen in Dietetic Courses Study II group. The midpoint of sleep is associated with dietary intake and dietary behavior among young Japanese women. *Sleep Med.* 12(3):289-294. 2011. (査読有り)

⑤ 柴田重信、「体内時計と疾患と治療」*ファルマシア*、日本薬学会、2011年、印刷中。(査読有り)

⑥ 柴田重信、「体内時計と食・栄養科学」*食品工業*、54、46-53、2011年 (査読なし)

⑦ 柴田重信、平尾彰子「時間栄養学とはなにか」*日本薬理学雑誌*、金芳堂、137、109-114、2011年、(査読なし)

⑧ Matsumoto E, Ishihara A, Tamai S, Nemoto A, Iwase K, Hiwasa T, Shibata S, Takiguchi M. Time of day and nutrients in feeding govern daily expression rhythms of the gene for sterol regulatory element-binding protein (SREBP)-1 in the mouse liver. *J Biol Chem.* 285(43):33028-33036. 2010. (査読有り)

⑨ Hamada T, Shibata S. The role of GABAergic neuron on NMDA- and SP-induced phase delays in the suprachiasmatic nucleus neuronal activity rhythm in vitro. *Neurosci Lett.* 468:344-347. 2010(査読有り)

⑩ Tahara Y, Hirao A, Moriya T, Kudo T, Shibata S. Effects of medial hypothalamic lesions on feeding-induced entrainment of locomotor activity and liver *Per2* expression in *Per2::luc* mice. *J Biol Rhythms.* 25:9-18. 2010(査読有り)

⑪ Yamamura Y, Yano I, Kudo T, Shibata S. Time-dependent inhibitory effect of lipopolysaccharide injection on *Per1* and *Per2* gene expression in the mouse heart and liver. *Chronobiol Int.* 27:213-232. 2010(査読有り)

⑫ Hirao A, Nagahama H, Tsuboi T, Hirao M, Tahara Y, Shibata S. Combination of starvation interval and food volume determines the phase of liver circadian rhythm in *Per2::Luc* knock-in mice under two meals per day feeding. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 299(5):G1045-1053. 2010 (査読有り)

⑬ 平尾彰子、柴田重信、「時計遺伝子と栄養」*脳21*、金芳堂、第13巻396-401、2010年(査読無し)

⑭ 堀川和政、柴田重信、「生体リズムを調整する太陽光と食事」、*循環器内科*、Vol. 68、422-427 科学評論社、2010年(査読無し)

⑮ 田原 優、柴田重信、「子供の体内時計と遺伝」、*乳幼児医学・心理学研究*、vol. 89、89-96、2010年(査読無し)

⑯ 柴田重信、「生体時計」、pp6-9 睡眠関連病態、小児科臨床ピクシス(神山 潤)、中山書店、2010年(査読無し)

⑰ Shibata S, Tahara Y, Hirao A. The adjustment and manipulation of biological rhythms by light, nutrition, and abused drugs. *Adv Drug Deliv Rev*. 62(9-10):918-927. 2010 Review. (査読有り)

⑱ Shibata S, Hirao A, Tahara Yu. Restricted feeding-induced entrainment of activity rhythm and peripheral clock rhythm, *Sleep and Biological Rhythms*, 8, 18-27, 2010 review(査読有り)

[学会発表] (計 16件) 招待講演のみ

① 柴田重信「時間栄養学 ～体内時計と食事のリズム～」多摩区栄養士研修会、多摩市民会館、川崎市、2011年、2月8日

② 柴田重信「生活リズムと体内時計」第9回糖尿病市民セミナー・東京「くらしの中の糖尿病」よみうりホール、東京、2011年2月6日

③ 柴田重信「時計遺伝子と食餌リズム」第13回脂質・栄養シンポジウム、花王ホール、東京、2011年1月29日

④ 柴田重信「からだところの健康の実践：時間栄養学の考え方」早稲田大学 教育総合研究所 教育最前線講演会シリーズ XI 現代生活の「時計」と「休息」、早稲田大学、2010年12月11日

⑤ 柴田重信「子どもの脳の発達に不可欠な睡眠とそのリズム」第2回神戸市民講座、神戸、2010年10月16日

⑥ 柴田重信「体内時計と食・栄養科学」、シンポジウム、第57回日本食品科学工学会、東京農業大学、2010年9月1-3日

⑦ 柴田重信「エイジングとアンチエイジングに対する体内時計の関わり」私立大学戦略的基盤形成研究支援事業 第2回 学術講演会—エイジングに伴う生体機能変化とアンチエイジング戦略、近畿大学、2010年、6月5日

⑧ 柴田重信「リズム障害と生活習慣病」シンポジウム、第35回日本睡眠学会、名古屋、2010年7月1, 2, 日

⑨ 柴田重信「時計遺伝子と時間栄養学」茨城県栄養士会総会、特別講演、水戸市、2010年5月26日

⑩ 柴田重信「時間栄養学の視点からのマウス体内時計研究」、第87回日本生理学会、シンポジウム盛岡、2010年5月19-21日

⑪ 柴田重信「体内時計研究の基礎から応用」、山梨大学セミナー、2010年4月12日

⑫ 柴田重信 Nutrition and Circadian Clock System, 日本農芸化学会 2010、東大、東京 2010年3月27-30日

⑬ 柴田重信 体内時計を利用した創薬から治療戦略まで、「体内時計オーバービュー」日本薬学会130年会、岡山、2010年3月28-30日

⑭ 柴田重信 時間栄養学(時間食理学)とは何か、第83回日本薬理学会年会、2010年3月16-18日

⑮ 柴田重信「リズム障害の基礎と応用」関東睡眠談話会 2010、東京、2010年2月27日

⑯ 柴田重信「体内時計とメタボリックシンドローム」、126回内分泌セミナー、朝日生命成人病研究所、東京、2010年2月6日、

[図書] (計4件)

① 柴田重信、「食品の体内時計に対する効果」、体内時計の科学と産業応用、CMC出版、2011

② 平尾彰子、柴田重信、「体内時計が栄養・食物摂取に及ぼす効果」、体内時計の科学と産業応用、CMC出版、2011

③ 柴田重信、「体内時計と代謝」時間生物学、化学同人、2011

④ 田原 優、柴田重信、「概日リズム評価法」、pp27-35、実践行動薬理学(武田弘志、

辻、稔、赤池昭紀)、金芳堂、2010年

<http://www.eb.waseda.ac.jp/shibata/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

柴田重信 (SHIBATA SHIGEBU)

早稲田大学・理工学術院・教授

研究者番号：10162629