

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21792075

研究課題名（和文）

口腔機能を介して日常生活の環境適応をはかる日内リズム中枢制御機構の解明

研究課題名（英文）

Central mechanisms of circadian entrainment via oral functions

研究代表者

中村 渉 (NAKAMURA WATARU)

大阪大学・大学院歯学研究科・特任准教授

研究者番号：60372257

研究成果の概要（和文）：時計遺伝子欠損（ノックアウト）マウスについて、毎日の給餌時間を一定時間に制限した状態で給餌時間を予知するような自発行動の活発化、「給餌予知行動」の行動リズム出現について検討した。行動概日リズムの周期が異なるマウスでは、固有周期依存的に給餌予知行動の出現が制限されるのに対して、分子時計機能不全マウスでは予知行動の出現制限が機能しなかった。このことから概日リズム振動体は予知行動を駆動するのではなく、制限するということが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：Many animals have an ability to anticipate periodic food availability. In this study, we have examined the food anticipatory activity in circadian clock deficient mice. Some KO mice which have slightly differences in intrinsic circadian period show limited entrainment to various period of feeding; the other molecular clock deficient mice do not. These results suggest that the canonical molecular clock may not drive food anticipatory behavioral activity, but may control it as a circadian manner.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・矯正・小児系歯学

キーワード：体内時計、概日リズム、環境同調、時計遺伝子、予知行動、制限給餌

1. 研究開始当初の背景

我々は1日24時間を基本時間単位として生活している。通常、社会人として生活するうえで、一日の行動リズムは生活習慣として定着している。規則正しい生活リズムを保った場合には疾患原因因子と宿主（防御）因子が拮抗して生理的均衡を保つことができ、そうでない場合には疾患を引き起こす結果となる。生体のあらゆる生理機能には約24時間周期の内因性リズム（概日リズム）があり、環境適応をはかるべく刺激因子に反応して正確な24時間周期への同調をおこなっている。概日リズムはバクテリアからヒトに至るまで時間を制御する分子時計の最小機能単位を単一細胞内に保存しており、近年、概日リズム発振分子機構の理解が急速に進んだ。哺乳類において、これら単一細胞が組織、器官を形成し、それらを動物個体機能として階層的に統合しているのは視床下部・視交叉上核である。視交叉上核は個体行動をはじめとする生理機能の概日リズムにおいてタイミングを制御するペースメーカーとして機能する。一方、この主要ペースメーカー視交叉上核に依存しない概日リズム制御機構として、摂食タイミング依存的リズムが知られている。摂食タイミングを24時間に1回定時刻に制限した場合、この時刻を予知するかのように摂食前に自発行動が活発化することが知られている。この行動に伴い、内分泌ホルモン、時計遺伝子発現等の概日リズムが変化する。本研究ではこれら制御機構が明らかでない摂食依存的概日リズムに対し、分子レベル・神経回路レベル・個体行動レベルからアプローチした。

2. 研究の目的

小児歯科領域における最終目標は、1日24時間の環境変動に調和した生活習慣の中に、歯科口腔保健の概念を組み入れ健全な口腔機能を維持する土台を築き上げることにある。生命活動の基盤は生理機能が環境変化に適応することであり、我々は環境変化を感覚器で受容する。顎顔面領域はいわゆる“五感”すべての受容器が存在し、情報をすばやく中枢神経系に入力し、生理機能を調整する。すなわち口腔は呼吸・捕食・発声の作動器であるだけでなく重要な環境情報入力機能を担っている。通常、生活の基盤となる環境は24時間の周期的な変動を示すが、生体システムとして調和した生命活動を営むには、生理機能リズムの調律と同調が不可欠となる。哺乳

類の生理機能リズムを環境変化に同調させているのは視床下部・視交叉上核であり、主要な環境入力には明暗の光入力であることが明らかにされている。その一方で、口腔を介する摂食機能は行動、生理機能リズムの一部を変容させ、主要体内時計とは別の概日リズム同調経路としてはたらくことが知られている。本研究では、哺乳類の生体時計機構を階層的システムとして捉え、周期的な環境変化への同調を可能にする神経回路構造を総合的に理解することを目的とした。

3. 研究の方法

近年、サーカディアンリズムのリズム発振分子機構が明らかになったことを背景に、基幹をなす各「時計遺伝子」群のそれぞれに対してKOマウスが作成されている。KOマウスを用いた分子機能解析と共に個体行動レベルの機能解析が進んだことにより、システムレベルでの「サーカディアンリズム機能変異モデルマウス」として用いることが可能になった。本研究では以下の時計遺伝子KOマウスを用いた概日行動リズム解析により、摂食可能時間制限の周期を変える実験プロトコール（Tサイクル実験）で、摂食予知行動について検証した。

時計遺伝子KOマウスの行動表現型

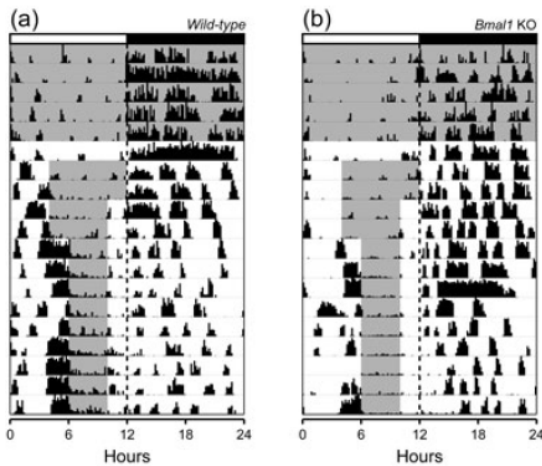
Cry1 KO: サーカディアンリズム周期短縮、
Cry2 KO: サーカディアンリズム周期延長、
Bmal1 KO および *Cry1/Cry2* Double KO: サーカディアンリズム発振不全

対照群（野生型）を含む各遺伝型マウスについて自発行動を連続的に測定し、1概日周期あたり4時間の定刻給餌条件下で給餌予知行動の出現について検討した。行動実験には従来の体内時計中枢・視床下部視交叉上核が正常なマウスと、それらを電氣的に破壊したマウスを用いた。さらに4時間の摂食可能時間のサイクル周期を変化させることにより、各実験条件（脳局所破壊、遺伝子改変、摂食タイミング周期）下における給餌予知行動のサーカディアンリズム特性について検証した。

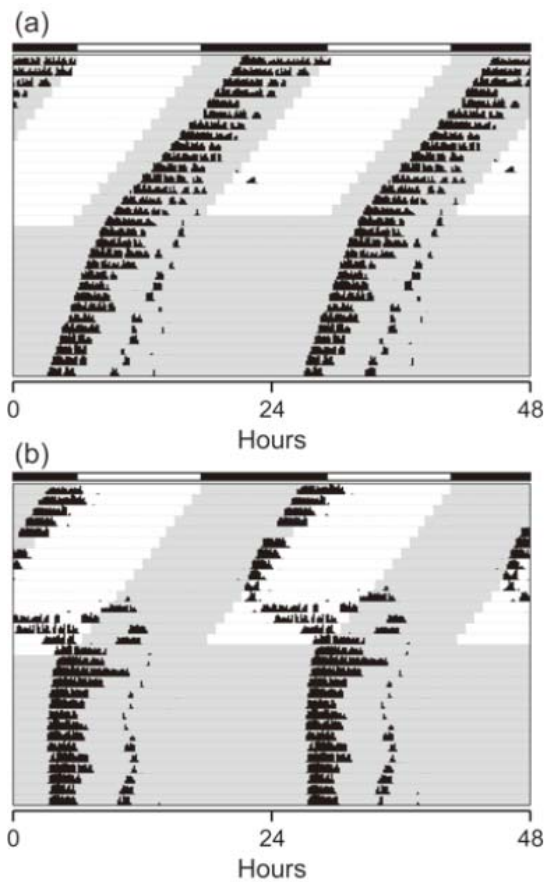
4. 研究成果

*Bmal1*KOマウスは、神経細胞を含む全身の細胞で概日時計機構が障害されていると考えられるにもかかわらず、24時間の周期的時

間制限給餌に対して摂食予知行動を示した(図2)。



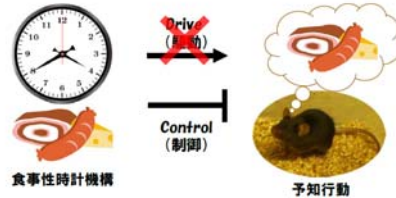
全ての遺伝子型マウスは24時間周期の時間制限給餌(T=24h)条件下で摂食予知行動を示した。そこで、時計遺伝子変異マウスで認められる摂食予知行動の振動性を検証するため、環境周期を変化させるT実験を行った。図3は明暗周期を23.2時間に調節した場合のハムスター輪回し行動リズムである。同調可能だった個体(a)と同調できない個体(b)の行動リズムを示す。



時間制限給餌実験において、視交叉上核を破壊した野生型マウスは22時間周期(T=22h)では予知行動を示さない個体(n=6/8)が認められ、T=21、20hでは予知行動を示さなかった。視交叉上核を破壊したCry1 KOマウスはT=22hで予知行動を示すのに対し、Cry2 KOマウスはT=22hで予知行動を示さなかった。Cry1/Cry2 Double KOマウスおよびBmal1 KOマウスに22hよりさらに短周期T=20h条件でも予知行動が認められ、Bmal1 KOではT=18、15hでも予知行動を示し時間制限食事における摂食予知行動出現の周期依存性と、各モデルマウスの固有サーカディアン周期は相関する。この結果は、食事性時計機構は予知行動を「駆動」という従来の仮説とは異なり、摂食予知行動の周期性を体内時計固有の周期範囲に「制限」という新しい概念を提唱する。さらに食事性時計機構は従来から知られている体内時計中枢・視交叉上核とは別の神経回路に存在することが示唆された。本研究の結果は、視交叉上核外サーカディアン行動リズムペースメーカーが、これまでに明らかにされている分子時計機構モデルに依存していることを機能的に証明した。

固有サーカディアン周期	T=24	T=23	T=22	T=21	T=20
Cry1 KO	22.7h	○	○	×	
wild-type	23.8h	○	△	×	×
Cry2 KO	24.2h	○	×	×	
Cry1/Cry2 KO	(-)	○			○
Bmal1 KO	(-)	○	○	○	○

*Bmal1KO: T=18, 15



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4件)

① Noguchi T, Michihata T, Nakamura W, Takumi T, Shimizu R, Yamamoto M, Ikeda M, Ohmiya Y, Nakajima Y. Dual-Color Luciferase Mouse Directly Demonstrates Coupled Expression of Two Clock Genes. *Biochemistry*. 49(37) 8053-61 (2010)

② 中村 涉、概日行動リズムを制御する視交叉上核、*時間生物学*、16巻、3-9 (2010)

③Yagita K, Horie K, Koinuma S, Nakamura W, Yamanaka I, Urasaki A, Shigeyoshi Y, Kawakami K, Shimada S, Takeda J and Uchiyama Y. Development of the circadian oscillator during differentiation of mouse embryonic stem cells in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107(8) 3846-3851 (2010)

④ Nakamura W. Behavioral analysis of circadian rhythms: Entraining the circadian clock and determining the food-entrainable oscillator mechanism. *Sleep Biol Rhythms.* 8(1):28-33 (2010)

〔学会発表〕 (計7件)

①中村 渉、マウス行動概日リズムの光同調と非光同調、第16回日本光生物学協会年会、2010.8.10 大阪

② Nakamura W. The food-entrainable oscillator does not drive anticipatory activity, but controls it as circadian manner. 12th Biennial Meeting of Society for Research on Biological Rhythms. 2010.5.23 FL (USA)

③中村 渉、概日リズムを制御する階層的神経回路構造の解明、第8回口腔医科学フロンティア、2010.3.6 福岡

④中村 渉、概日行動リズムを制御する視交叉上核、日本時間生物学会学術大会、2009.10.27 大阪

⑤ Nakamura W. Food-entrainment: current controversies and recent progress. XI. Congress of the European Biological Rhythms Society. 2009.8.27 フランス・ストラスブール

⑥ Nakamura W. Circadian output in the suprachiasmatic nucleus. XI. Congress of the European Biological Rhythms Society. 2009.8.26 フランス・ストラスブール

⑦ Nakamura W. Different property of food anticipatory activity in BMAL1-deficient mice. International Symposium on Biological Rhythm. 2009.8.4 札幌

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 渉 (NAKAMURA WATARU)

大阪大学・大学院歯学研究科・特任准教授

研究者番号：60372257