

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2013

課題番号：22590220

研究課題名(和文) 卵巣に存在する概日時計の生理機能

研究課題名(英文) Physiological role of circadian clock in the ovary

研究代表者

仲村 朋子(吉川朋子)(Nakamura (Yoshikawa), Tomoko)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・特任助教

研究者番号：30451397

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：生体内のほとんど全ての組織に概日時計が存在するが、末梢組織に存在する概日時計の生理機能はわかっていない。そこで卵巣の概日時計は、LHサージに対する反応性を調節することにより、排卵のタイミング決定に関与するのではないかと考えた。まず、これまでのin vitro 実験で得られていたLHの概日時計の位相を調節する作用がin vivoで再現されることをラットおよびマウスを用いて確認した。次に、卵巣より回収した濾胞細胞を用いて、分子生物学的にこの仮説を検証する実験に取り組んだ。しかし、解析に適した量および質の濾胞細胞の回収が困難であったことから、卵巣濾胞細胞より樹立された株化細胞における解析に切り替えた。

研究成果の概要(英文)：Circadian clock are found in most of the peripheral tissues of animals. However, the physiological roles of the clocks in peripheral tissues are yet to be shown. We hypothesized that ovarian circadian clock regulates the responsiveness of ovarian cells to LH and play a role in controlling the timing of ovulation. First, we expand our previous experiment to show the role of LH in resetting phase of circadian clock in vitro to in vivo, and obtained the consistent results. Next, molecular biological methods were employed to evaluate the hypothesis in rat ovarian granulosa cells. However, it was difficult to collect sufficient cells. Therefore, cell lines established from ovarian granulosa cells were used in further experiments.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・環境生理学

キーワード：生物リズム 概日時計 卵巣 末梢時計 排卵

1. 研究開始当初の背景

生体内のほぼ全ての末梢組織に概日時計が存在する。その位相は常に中枢の概日時計によって調節されていることから、時計として何らかの機能を持つ可能性が考えられる。しかし、その機能は全くと言っていいほどわかっていない。生殖システムと概日時計が密接に関係することは、よく知られている。そこで我々は、卵巣をモデル器官として使用し、末梢時計の生理機能の解明に向け、卵巣に存在する概日時計の位相がどのようにして調節されるのかをラット卵巣を用いて解析した。その結果、卵巣の概日時計は、黄体形成ホルモン(LH)により調節される可能性が示唆された。次に、発情間期あるいは発情前期に GnRH アンタゴニストを投与して内在性の生殖ホルモンの分泌を抑制したラットに様々な時刻に人工 LH サージを与えたところ、排卵誘導効率には時刻依存性があることがわかった。この結果は、卵巣そのものに存在する概日時計、あるいは生体内の他部位から送られてくる時刻情報のいずれかが LH に対する反応性の高い(あるいは低い)時間帯を決めることによって、排卵のタイミング決定に関わることを示唆している。

2. 研究の目的

我々のこれまでの研究結果から、卵巣に存在する概日時計は、卵巣の LH に対する反応性を調節することにより、排卵のタイミング調節に関与するのではないかと仮説を立てた。これまでの解析では、卵巣に存在する概日時計に対する LH の位相調節作用は、*in vitro* 実験系でしか示していなかった。そこで、この作用が、*in vivo* でも再現されることを示し、上記仮説の妥当性を検証する第一段階とする。次に、概日時計が排卵のタイミング調節にどのようにして関わるのかを、分子生物学的手法により解析し、メカニズムの解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) 概日時計遺伝子の発現を発光によりモニターすることのできる遺伝子改変ラットおよびマウスを用い、発情ステージ依存的に概日時計の位相が変化するか否かを調べる。LH による卵巣の概日時計の位相調節が生体内でも起こっていれば、LH サージを挟んで、発情ステージ依存的な位相変化が期待される。

(2) 発情ステージ各期のラットより、卵巣濾胞細胞を回収し、クロマチン免疫沈降法により LH サージから排卵に向かう遺伝子発現カスケードと概日時計の接点を探る。

4. 研究成果

(1) 発情各ステージのラットおよびマウスより卵巣組織を採取し、Period2(ラット)および PERIOD2(マウス)の発現を発光によりモニターした。いずれのステージでも、明確な概日リズムが観察された(図1)。培養1日目のピーク位相を解析すると、LH サージを挟んで、発情前期と発情期の間で有意な位相後退が認められた(図2)。この結果は、生体内において、LH サージが卵巣の概日時計の位相を調節していることを強く示唆している。

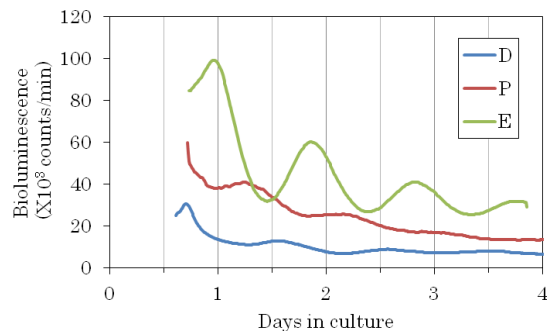


図1 発情各ステージにおけるマウス卵巣のPERIOD2-LUC 発光リズム。D: 発情間期、P: 発情前期、E: 発情期。

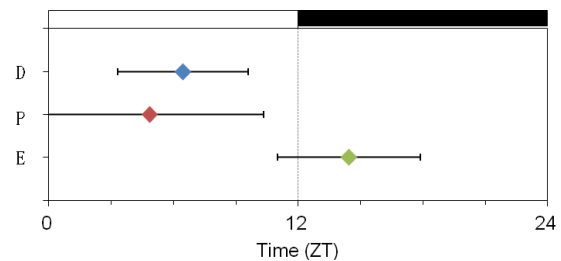


図2 発情各ステージにおけるマウス卵巣のPERIOD2-LUC 発光リズムのピーク位相。E(発情期)において有意な位相後退が認められた。

(2) 発情ステージ各期のラットより、卵巣濾胞細胞を回収し、クロマチン免疫沈降法により、排卵に先だって誘導される Cox2 発現における時計遺伝子による発現調節の可能性を、クロマチン免疫沈降法により検討した。しかし、アッセイ自体がうまくいかず、十分量の濾胞細胞が回収できないことが原因と考えられた。そこで、より効率的に実験試料を得るために、濾胞細胞より樹立された株化細胞を用いることにした。2種類の株化細胞を入手し、それらに自律振動する概日時計が存在することを、発光レポーターを導入し確認した。より明確なリズムを示した細胞株を今後の検討に用いることとし、LH による刺激の有無と Cox2 発現における時計遺伝子の発現調節関係を検討した。

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5件)

吉川朋子・本間さと時計遺伝子 日本臨床 2014 増刊号 最新肥満症学 261-165 (2014) 査読無

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 低温暴露による新生ラットの概日時計の位相シフト 北海道医学雑誌 88:89 (2013) 査読無

Yoshikawa T., Matsuno A., Yamanaka Y., Nishide S.-y., Honma S., Honma K-i. Daily exposure to cold phase-shifts circadian clock of neonatal rat *in vivo*. *Eur. J. Neurosci.* **37**:491-497 (2013) 査読有
DOI: 10.1111/ejn.12052

Sellix M.T., Yoshikawa T., Menaker M. A circadian egg timer gates ovulation. *Curr. Biol.* **20**:R266-267 (2010) 査読有
DOI: 10.1016/j.cub.2010.01.045

Pezuk P., Mohawk J.A., Yoshikawa T., Sellix M.T., Menaker M. Circadian organization is governed by extra-SCN pacemakers. *J. Biol. Rhythms* **25**:432-441 (2010) 査読有
DOI: 10.1177/0748730410385204

[学会発表](計20件)

吉川朋子・賈書生・本間さと・本間研一 マウス乳腺組織と内分泌器官において授乳が PER2::LUC 発光リズムに及ぼす影響 第91回日本生理学会大会(鹿児島市 鹿児島大学 2014.3.17)

吉川朋子・賈書生・本間さと・本間研一 マウス乳腺および内分泌組織における PER2::LUC リズム:授乳による影響の検討 第20回日本時間生物学会学術大会(狭山市 近畿大学 2013.11.9)

吉川朋子・松野亜美・本間さと・本間研一 ラット視交叉上核に存在する概日時計の温度補償性: *in vivo* における検討 第84回日本動物学会大会(岡山市 岡山大学 2013.9.28)

森田修司・櫻井孝憲・仲村厚志・中村整 クロキンパエにおける AMP キナーゼの概日時計への関与 第84回日本動物学会大会(岡山市 岡山大学 2013.9.28)

大澤政洋・中村整・仲村厚志 イモリの

嗅覚受容におけるリポカリンの役割 第84回日本動物学会大会(岡山市 岡山大学 2013.9.26)

齋藤拓也・仲村厚志・中村整 嗅覚味覚連合学習におけるクロキンパエ頭部の Shaker 遺伝子発現 第84回日本動物学会大会(岡山市 岡山大学 2013.9.26)

賈書生・吉川朋子・山下啓子・本間研一・本間さと マウス乳腺および内分泌組織における時計遺伝子発現リズム:発光レポーターを用いた検討 第93回北海道医学大会生理系分科会(旭川市 旭川医科大学 2013.8.31)

吉川朋子・松野亜美・本間さと・本間研一 Temperature sensitivity of circadian oscillator in the suprachiasmatic nucleus *in vivo* - Ambient temperature as a time cue for maternal entrainment. 第90回日本生理学会大会(東京都 タワーホール船堀 2013.3.27)

吉川朋子・黒田茂・本間さと・上田哲男・本間研一 マウスの視交叉上核に存在する概日振動体の光周期反応 光イメージング研究拠点クロージングシンポジウム(札幌市 北海道大学 2013.3.18)

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 母子同調因子としての環境温: *in vivo* における視交叉上核の温度感受性 第19回日本時間生物学会学術大会(札幌市 北海道大学 2012.9.15)

仲村厚志・吉川朋子・本間さと・中村整・本間研一 マウス視交叉上核における AMPK の概日時計機構への関与 第19回日本時間生物学会学術大会(札幌市 北海道大学 2012.9.15)

吉川朋子・本間さと・本間研一 Photoperiodic response of multiple circadian oscillators in mouse SCN 第89回日本生理学会大会(松本市 松本文化会館 2012.3.31)

Nakamura A., Nakamura T. The effect of food intake on expression level of AMPK beta in the brain of the blowfly, *Phormia regina*. 8th International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry (Nagoya Univ., Nagoya, 2011.6.1)

Suzuki T., Nakamura A., Nakamura T. Pharmacological analysis of the AMP-activated protein kinase in the regulation of food intake in the blowfly,

Phormia regina. 8th International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry (Nagoya Univ., Nagoya, 2011.6.1)

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回日本時間生物学学会学術大会(東京都 早稲田大学 2010.11.21)

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 新生ラットの概日リズムへの母子分離中の環境温度の影響 第81回日本動物学会大会(東京都 東京大学 2010.9.25)

仲村厚志・中村整 クロキンバエの摂食におけるAMPKの関与 第81回日本動物学会大会(東京都 東京大学 2010.9.25)

鈴木智之・仲村厚志・中村整 クロキンバエ摂食調節機能へのAMPキナーゼの関与 第81回日本動物学会大会(東京都 東京大学 2010.9.25)

仲村厚志・中村整 クロキンバエAMPKの摂食への関与 日本比較生理生化学会第32回大会(福岡市 九州大学 2010.7.17)

鈴木智之・仲村厚志・中村整 クロキンバエAMPKの摂食調節機能への関与 日本比較生理生化学会第32回大会(福岡市 九州大学 2010.7.17)

〔図書〕(計3件)

Honma S., Ono D., Suzuki Y., Inagaki N., Yoshikawa T., Nakamura W., Honma K-i. Suprachiasmatic nucleus: Cellular clocks and networks. In: *The Neurobiology of Circadian Timing* Kalsbeek A., Mellow M., Ronnerberg T., Foster R.G. Eds.) Elsevier, Progress in Brain Research 199: 129-141 (2012)

吉川朋子 光と生殖(哺乳動物) 太陽紫外線防御研究委員会(編)からだと光の事典 朝倉書店 pp.334-336 (2010)

Honma S., Yoshikawa T., Nishide S.-H., Ono D., Honma K.-I. Bioluminescent imaging for assessing heterogeneous cell function in the mammalian central circadian clock. In: *Molecular Imaging for Integrated Medical Therapy and Drug Development*

(Tamaki N., Kuge Y. Eds.) Springer pp.189-196 (2010)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

仲村 朋子(吉川 朋子) (NAKAMURA, Tomoko) (YOSHIKAWA, Tomoko)
北海道大学・大学院医学研究科・特任助教
研究者番号: 30451397

(2) 研究分担者

仲村 厚志 (NAKAMURA, Atsushi)
電気通信大学・情報理工学部・助教
研究者番号: 50361829