

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 15日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22657020

研究課題名（和文） 給餌時刻を予知するメタボリック・オシレーターの発掘

研究課題名（英文） Search for metabolic oscillator regulating food anticipatory activity

研究代表者

深田 吉孝（FUKADA YOSHITAKA）

東京大学・大学院理学系研究科・教授

研究者番号：80165258

研究成果の概要（和文）：

一日の中で食餌が得られる時刻を予知する「食餌予知行動リズム」は、摂餌時計と呼ばれる脳内の時計機構によって制御されている。しかしこれまで、この摂餌時計が存在する脳領域や分子メカニズムは不明であった。本研究ではまず、給餌のタイミングを自由に調節できる自動給餌装置を開発した。さらに、食餌に応答する脳領域としてMBHに焦点を絞り、そのマイクロアレイ解析を通して摂餌時計（予知行動リズム）と連関するであろう遺伝子群を網羅的に探索した。

研究成果の概要（英文）：

Food anticipatory activities (FAA) are known to be induced by temporal restriction of feeding, and are regulated by a food-entrainable oscillator (FEO) located in the brain. One of the most important issues in this field is the localization of FEO and the molecular mechanisms of FEO. In this study, we developed an automated feeding apparatus that enables us to control the restricted feeding timing. Furthermore, we focused our attention to MBH as the brain region of FEO, and identified restricted-feeding response genes by microarray analysis of the MBH. The result should be valuable for approaching the molecular mechanisms of FEO.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	0	1,700,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	390,000	3,390,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学、動物生理・行動

キーワード：脳・神経、摂餌、サーカディアンリズム、動物行動、時計遺伝子、視床下部、体内時計、CRY

1. 研究開始当初の背景

一般に、実験室のマウスはいつでも餌を食べられる「自由摂食条件」で飼育されているが、一日の中で休息期の短い特定の時間帯だけに食餌を与える「制限給餌条件」で動物を飼育すると、活動期でないにもかかわらず給餌時刻の少し前から行動量が顕著に上昇するようになる。この予知行動リズムは、最低限の食餌を確保するために作動する神経機構であり、時計遺伝子に基づく概日リズム形成機構に制御されていると信じられてきた。興味深い事に、活動-休息の行動リズムを司る視床下部の視交叉上核 (SCN) を破壊したラットでは、活動-休息リズムが完全に消失するにもかかわらず食餌予知行動リズムは消えない。したがって、食餌予知行動は SCN 以外に存在する計時機構によって制御されると推定され、その最有力候補は視床下部背内側核 (DMH) と考えられてきた。しかし最近、DMH を破壊したマウスでも予知行動リズムが見られるという報告から DMH 優位説が崩れ、さらに、活動-休息リズムを示さない時計遺伝子ノックアウトマウスにおいても給餌予知行動リズムは消えないと報告された。以上の結果、SCN や DMH 以外の脳領域に、既知の時計機構とは全く異なる仕組みのメタボリック・オシレーターが存在する可能性が示唆された。本研究では「このメタボリック・オシレーターは本当に存在するのか？」という疑問から出発し、「その分子実体は何か？」という未開拓分野に切り込む。新しい観点から摂餌時計の存在を見直し、食餌の予知行動リズムを生み出す仮想メタボリック・オシレーターの発掘を目指した。

2. 研究の目的

最近の我が国の子供達の学習意欲や気力・体力の低下は基本的な生活習慣の乱れによると指摘され、これに対する取り組みの一つとして文部科学省は『早寝早起き朝ごはん』国民運動を全国的に推進している。この標語の通り、適切な時刻の食事は私たちの規則正しい生活リズム形成に極めて重要な役割を担っている。実際にげっ歯類を用いた研究から、休息期にのみ食餌を与え続けると行動リズムに異常が生じることが報告され、概日リズム形成における食餌タイミングの重要性が確認されている。しかし、摂餌時刻の情報概日時計の中核へと伝達される仕組みは

もちろん、給餌予知行動において中心的な役割を果たす脳領域の所在さえ混沌としている。本研究は、行動学的な研究から予測される重要な神経機構に新しい観点から切り込み、食餌と概日リズムの連関 (図 1) という、古くて新しい生理学的課題に対して分子レベルの道標を築く挑戦である。

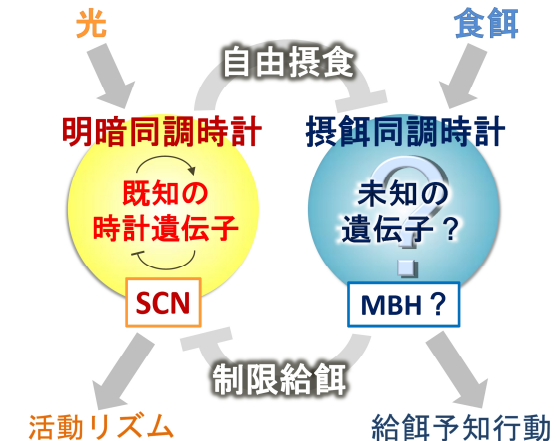


図 1 メタボリック・オシレーター概念図

3. 研究の方法

この四半世紀、摂餌リズムを担う脳領域は精力的に探索されてきたが、最近、謎はむしろ深まりつつある。摂餌時計としての DMH 優位説は見直す時期に至り、全脳領域の精査は極めて重要な課題として浮び上がってきた。本研究では、マウス全脳領域を対象に、これら摂餌応答遺伝子の発現レベルをリアルタイムで測定し、摂餌時計を担う脳領域を探索する。ここで探し出した脳領域を対象にマイクロアレイ解析を行い、制限給餌に応答する遺伝子群を網羅的に同定する。これらの応答遺伝子は、摂餌時計からの時刻シグナルの出力と考えられるので、その遺伝子情報を手がかりに、時刻シグナルを制御する転写因子やリン酸化シグナリングの鍵分子を同定し、メタボリック・オシレーターの分子実体に迫った。

4. 研究成果

(1) 自動給餌装置の開発

本研究では、マウスに給餌以外の刺激を与えることなく厳密な制限給餌実験を行うことが必須である。また、一回の給餌量を一定にしてエネルギー摂取量をコントロールすることが重要である。これまでに市販されていた給餌装置では、動力源としてステッピングモーターが使用されており、そのため装置か

らの発熱が非常に大きかった。しかし、当研究室ではマウスの行動測定用ケージを小さな遮光コンパートメントに入れ、光条件および温度・湿度を一定にした環境においてマウスを飼育しているので、発熱が大きいこの装置を導入することができなかった。そこで、ケージの上に置けるように小型・軽量化すること、装置からの発熱・発光・動作音を極力少なくすること、および1回の設定で10回の給餌が自動で行えることを考慮して自動制限給餌装置の開発を行った(図2)。開発した装置はケージの上に置き、餌を載せたターンテーブルが給餌時に一定角回転し、1個の餌をケージ内に供給する構造とした。ターンテーブルを一定角回転させる方法として、電磁石とバネによる直線運動を円運動に変換する画期的な機構を考案・実現し、上記条件をクリアした。ターンテーブルを回転させるための電磁石への通電時間はわずか数秒だけで、給餌間隔の数時間に比べて十分に小さく、その時の発熱はほとんどゼロである。また電磁石に通電していない時は、バネの力によりターンテーブルの回転を止めているので、待機時の発熱や動作音等の問題は解消された。これを、プログラミングタイマーと接続することによって給餌間隔を自由に調節できる自動給餌装置を完成した。この給餌装置の駆動機構について、現在、特許を出願中である。

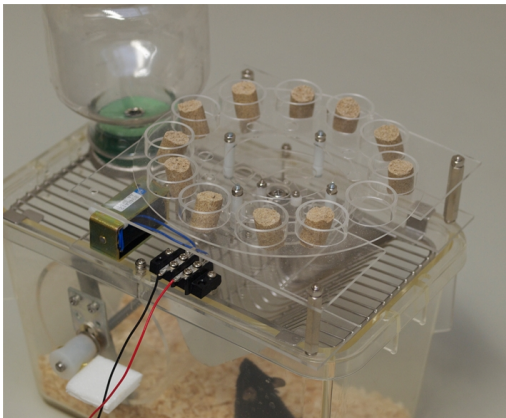


図2 自作した自動給餌装置

(2) 内因性の摂餌同調時計の存在証明

自律的な周期性を持つ振動体は、同調可能な摂餌サイクル周期に臨界点をもつ。しかし給餌の予知行動の場合、給餌間隔を短くし過ぎると動物は空腹を感じなくなり、給餌間隔を長くし過ぎると飢餓により異常行動を示

すため、自律的な振動体の存在を証明することが困難であった。そこで本研究では、時計遺伝子のKOマウスを用いた独創的な解析を展開した。時計遺伝子 *Cry1* のKOマウスは活動-休息リズムが短周期である一方で、*Cry2*のKOマウスは長周期のリズムを刻む。今回これらKOマウスが同調可能な給餌間隔を調べることにより、この古くからの難問に取り組んだ。

研究成果(1)で自作した自動給餌装置を駆使して様々な給餌間隔で制限給餌を行い、これらKOマウスが同調可能な限界幅を調べた結果、*Cry1*-KOマウスは*Cry2*-KOマウスに比べて給餌間隔の限界幅が短い方向にシフトしていることを見出した。以上の結果は、内因性の振動体により給餌の予知行動が生み出されていることを強く示唆しており、「摂餌時計の存在」という古くて新しい問題に決着をつけることが出来た。

(3) 摂餌時計を司る脳領域の同定

摂餌時計を担う脳領域を探索している過程で、視床下部の内側基底部(MBH)を破壊したマウスにおいて、予知行動が顕著に減弱することが早稲田大学の(共同)研究者(柴田重信教授)らから報告された[Tahara *et al.*, *JBR* (2010)]。MBHはDMHを含む脳領域であり、摂食中枢や満腹中枢も存在することが知られている。これらの事実より、摂餌同調時計はMBHに存在すると考えられた。この情報を受け、MBHにおける既知の時計遺伝子の発現パターンを観察したところ、多くの時計遺伝子の発現は自由摂食時にも日内変動しており、さらにマウスの休息期である明期に制限給餌を行った場合と、活動期である暗期に制限給餌を行った場合には、時計遺伝子の発現プロファイルが逆転していることが判明した。これまで肝臓などの末梢組織においては、概日時計が食餌のタイミングに強く同調することが知られていた。しかしSCNなどの脳領域では、時計遺伝子は光サイクルに強く同調するものの食餌のタイミングによる影響を受けにくいと考えられてきた。今回の我々の発見は、脳領域の中でもMBHにおける概日時計は、摂餌時刻に応答してまるで末梢組織のように振る舞うという大変興味深い計時システムであり、MBHが摂餌時計の中核を担う脳領域であることを強く示唆している。

(4) MBH の時計リセット因子

研究成果(2)で同定した摂餌時計の中脳脳領域 (MBH) において、その概日時計のリズムを連続測定する系を構築した。この実験には、時計遺伝子産物である PER2 タンパク質にルシフェラーゼを連結した融合タンパク質 (PER2::Luc) を発現するノックインマウスを用いた。この PER2::Luc マウスから MBH を含む脳切片を作成し、高感度 CCD カメラを装着した単一細胞発光イメージングシステムを用いて生物発光リズムを連続記録した。この際、活動期および休息期の様々な時刻に制限給餌を行ない、PER2::Luc リズムの摂餌時刻への応答を観察した結果、明期に制限給餌を行った場合 (明期 RF) と暗期に制限給餌を行った場合 (暗期 RF) では、MBH の時計遺伝子の発現リズムが完全に逆転していることを見出した (図 3)。これは、研究成果(3)で示したように、MBH の時計は摂餌時刻に応答してまるで末梢組織のように振る舞うという特性をより明瞭に表す結果である。

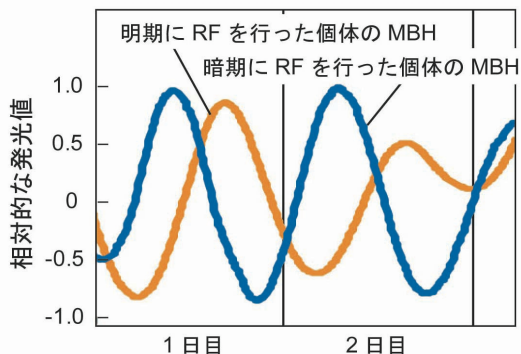


図 3 給餌時刻に応答する MBH の概日時計 RF; restricted feeding (制限給餌)

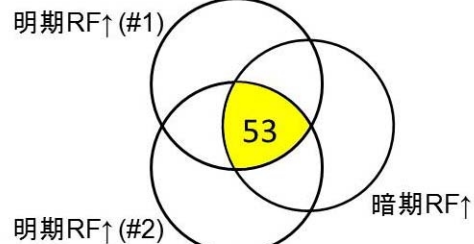
このように、単一細胞可視化システムを用いてマウス脳領域における発光リズム測定系を立ち上げる過程において、興味深いことに MBH が神経細胞の培養用サプリメント B27 の添加に応答し、その概日時計の位相が変化することを見出した。B27 には血液中に存在する一群のホルモンや生理活性物質が含まれており、これらは視交叉上核や肝臓の発光リズムに対しては時計同調効果を持たない。また、B27 を含まない培地で MBH を培養すると、異なる時刻にサンプリングしても内在性の位相を維持して発光リズムを刻むことから、B27 に含まれる何らかの因子が MBH に特異的な作用を与えて位相を制御す

ると考えられた。給餌時刻に応答して時計の位相が変化するという重要な特性を MBH が持つことを考え合わせると、今回の発見を切り口に MBH の位相変化の分子シグナリングを正確に記述することは、MBH における摂餌時計の分子メカニズムを解明するという目的に向けて大きな一歩となるに違いない。

(5) 食餌に応答する遺伝子の同定

メタボリック・オシレーター分子実体に迫るために、MBH において食餌に応答する遺伝子を網羅的に探索した。まずは明期に制限給餌を行ったマウスから様々な時刻に MBH を単離し、その total RNA を Agilent 社のマイクロアレイ (SurePrint G3 Mouse GE 8x60K フォーマット) 解析に供した。これと同様の解析を、暗期に制限給餌を行ったマウスを用いて遂行し、両者の遺伝子発現パターンを詳細に比較解析した。

【給餌時刻に転写誘導される遺伝子】



【給餌時刻に転写抑制される遺伝子】

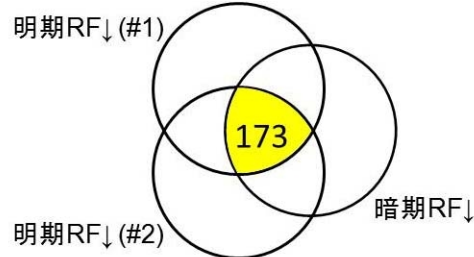


図 4 食餌に応答する遺伝子の網羅的探索

RF; restricted feeding (制限給餌)

#1 と #2 は独立の実験結果

MBH において給餌時刻に特異的に転写誘導される遺伝子を絞り込むため、i) 明期の制限給餌の給餌時刻に、暗期の制限給餌の給餌時刻の 12 時間後と比較して発現量が多い遺伝子 (明期 RF↑) と、ii) 暗期の制限給餌の給餌時刻に、暗期の制限給餌の給餌時刻の 12 時間後と比較して発現量が多い遺伝子 (暗期 RF↑) を抽出した。その結果、両者に共通する 53 個の遺伝子が給餌時刻に特異的に転写

誘導される遺伝子として同定された (図 4 上)。逆に、給餌時刻に特異的に転写抑制される遺伝子を絞り込むため、iii) 明期の制限給餌の給餌時刻に、暗期の制限給餌の給餌時刻の 12 時間後と比較して発現量が少ない遺伝子 (明期 RF↓) と、iv) 暗期の制限給餌の給餌時刻に、暗期の制限給餌の給餌時刻の 12 時間後と比較して発現量が少ない遺伝子 (暗期 RF↓) を抽出した。その結果、両者に共通する 173 個の遺伝子が給餌時刻に特異的に転写抑制される遺伝子として同定された (図 4 下)。申請時の計画の通り、摂餌に応答する遺伝子のリストを手に入れたので、今後はこれら遺伝子群を分子的な切り口として、メタボリック・オシレーター振動原理に迫ることが可能となった。

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 1 件)

Tsuyoshi Hirota, Naohiro Kon, Takashi Itagaki, Naosuke Hoshina, Toshiyuki Okano and Yoshitaka Fukada
Transcriptional repressor TIEG1 regulates *Bmal1* gene through GC box and controls circadian clockwork.
Genes Cells, 15, 111-121 (2010)
DOI: 10.1111/j.1365-2443.2009.01371.x
査読有り

[学会発表] (計 3 件)

① Rina Nunokawa, Hikari Yoshitane, Shigenobu Shibata, Yoshitaka Fukada
Mediobasal hypothalamus transmits the time of feeding to locomotor activity.
第 8 回国際比較生理生化学会議 ICCPB2011
2011 年 6 月 2 日 3 日
名古屋国際会議場 (名古屋市)

② 布川莉奈、吉種光、柴田重信、深田吉孝
制限給餌に伴う予知行動と遺伝子発現リズム変化の時刻依存性
第 17 回日本時間生物学会学術大会
2010 年 11 月 21 日
早稲田大学国際会議場 (東京都)

③ 深田吉孝
自律的に時を刻む生物時計の分子制御
ATI (財) 新世代研究所「時を計る」研究会
2010 年 7 月 29 日
新世代研究所 (東京都)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 間欠駆動機構及びこれを用いた給餌装置
発明者: 深田吉孝, 布川莉奈, 吉種光
権利者: 東京大学
種類: F16H 25/12
番号: CAP11001
出願年月日: 2011 年 3 月 31 日
国内外の別: 国内

[その他]

2011 年 7 月 8 日 TBS「はなまるマーケット」
『体内時計』ゲストコメンテーター(生活リズムを保つ上での規則正しい食事の重要性を一般家庭に向けて発信)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

深田 吉孝 (Fukada Yoshitaka)
東京大学・大学院理学系研究科・教授
研究者番号: 80165258

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし