

平成 30 年 4 月 28 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2017

課題番号：25251046

研究課題名(和文) ゲノム情報・生理的多型性・行動からみた光環境における遺伝的及び可塑的適応性の評価

研究課題名(英文) Evaluation of genetic and plastic adaptation from the perspective of genome, physiological polytypism and behavior in light environment.

研究代表者

安河内 朗 (Yasukouchi, Akira)

九州大学・芸術工学研究院・教授

研究者番号：20136568

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,500,000円

研究成果の概要(和文)：光刺激が及ぼす生体への非視覚的影響と朝型・夜型の行動類型を対象に遺伝的要因の影響を検討した。その結果、内因性の概日リズム周期が長いものほど夜型の傾向にあり、彼らの朝の光刺激によるリズム位相の前進の程度が大きく、夜の光刺激による位相の後退は小さかった。これは概日リズム周期の個人差に関係なく、朝の光によってリズム周期は一定に保持されやすいことを示唆した。また遺伝的要因との関係では、夜の光曝露直後のメラトニン分泌量とLPIN1遺伝子座に位置するSNPが有意な関連を示した。

研究成果の概要(英文)：The purposes of this study were to examine the relationship of non-visual effects of the light and behavior like morning-type and evening-type to genetic factors. It was implied that person who has the longer endogenous cycle of circadian rhythm showed the tendency of evening-type as well as the greater advanced phase shift by the morning light and the smaller delayed phase shift by the nocturnal light. It was suggested that there was an adaptive response to the morning light to easily keep regular circadian rhythm independent of individual difference in endogenous circadian cycle. It was also demonstrated that there was a significant relationship between SNP located on gene locus of LPIN1 and melatonin secretion during nocturnal light exposure.

研究分野：生理人類学

キーワード：光環境 生理的多型性 クロノタイプ サーカディアンリズム メラトニン分泌量 ゲノムワイド関連解析

## 1. 研究開始当初の背景

生理人類学領域では、本来狩猟採集時代の環境に適応したはずの人類が、現代の科学技術文明下で如何なる生理的適応能をもつかに注目し、その適応の多様性を生理的多型性の概念を用いて評価しようとしている。これまでの我々の基盤研究の成果により、生活するヒトに負荷される光や温熱の物理的環境ストレスは、直接的というより、人の日常的な行動履歴（文明の利器をどの程度利用するか）を介するもので、それによって特徴的な生理的ストレス反応（生理的多型）が表出し、適応性に差異が生じることを明らかにした。しかしながら、ヒトの環境への適応性を評価するには遺伝的要因との関係を捉える必要があり、本研究への着想に至った。本研究では 1) 生理的多型性が遺伝的基盤を介して行動にも影響を及ぼしているのか、あるいは 2) 生理的多型性と行動的類型の関係は遺伝的要因とは独立しているのか、を明らかにする。もし生理機能が遺伝的要因に大きく依存している場合、その当該遺伝子領域の多型の維持に果たして正の自然選択が関与しているのかを今後検討し、遺伝的環境適応の存在の有無を明らかにしていかなければならないだろう。また 2) の場合には、生理的多型性が個体レベルの可塑的な適応である可能性が示唆できる。このように 1)-2) のゲノム情報・生理機能・行動の三者間の関係性から適応性を評価する試みは初めてである。本研究では、光環境が及ぼす生体への非視覚的影響と日常の行動を対象に遺伝的要因の影響を明らかにし、その適応性を評価する。

## 2. 研究の目的

これまでの基盤研究において、現代生活の中で利便性や文明の利器を求めがちな行動履歴が光や温熱の環境ストレスへの暴露履歴を反映し、それが異なる行動類型をもつ集団間に生理的多型性を表出させる例を客観的なデータで示すとともに、その適応性を評価してきた。しかしながら、ヒトの環境への適応性を評価するには遺伝的要因との関係を捉える必要があり、本研究では 1) 生理的多型が遺伝的基盤を介して行動にも影響しているのか、あるいは 2) 生理的多型と行動的類型の関係は遺伝的要因と

は独立しているのか、を明らかにする。またこれらと併せて生理的多型性が遺伝的適応に基づくのか可塑的な適応なのかも同時に検討する。

本研究では、ゲノム情報として遺伝子群とその発現領域に、行動類型としてクロノタイプ（朝型・夜型）に、生理機能への光の非視覚的影響としてメラトニン分泌量（ML）、夜間の光によるメラトニン分泌抑制（MLS）、およびメラトニン分泌増加開始時刻（DLMO）からみた概日リズム位相のそれぞれに注目し、行動類型と生理機能との関係、またそれらに対する遺伝的要因の関係性を明らかにする。さらに遺伝的適応性や可塑的適応性について検討する。なお、行動類型としてのクロノタイプと夜間の非視覚的影響としての生理機能（DLMO, ML, MLS）との関係について、朝と夜の光刺激のそれぞれが及ぼす異なる非視覚的影響がクロノタイプ間で特徴的に異なるか、その差異の存在についても明らかにする。

## 3. 研究の方法

光刺激としては、午前中の光は概日リズム位相（DLMO）を前進させ、夜の光は位相を後退させるとともに ML の分泌を抑制する作用がある。これらの光の非視覚的作用とクロノタイプとの関係と併せて遺伝子群およびそれらの発現調節領域の多型との関係を検討する。このため、朝と夜の光刺激を別系統の実験として実施する。

### (1) 朝の光実験

被験者は男子大学生の 27 名であった。Morningness - Eveningness Questionnaire (MEQ) を用いた被験者集団のクロノタイプは、“ほぼ朝型” 3 名、“中間型” 19 名、“ほぼ夜型” 5 名であった。

全被験者の DLMO（メラトニン分泌増加開始時刻）を事前に測定し、各被験者についてこの時刻を起点に実験時の光暴露や就寝・起床の各時刻を決定した。なお、実験前の 1 週間について、各被験者の就寝・起床時間を統制した。

実験日初日、被験者はその被験者が有する DLMO の 4 時間前から 2 時間後まで照度 10 lux 以下の暗照明 (DL: dim light) に曝露された。この間、DL 曝露 1 時間後から 5

時間について 30 分ごとに唾液を採取した。その後被験者は就床し、7 時間後に起床した。

2 日目は、起床 1 時間後から DLMO の 2 時間後まで DL に曝された。この間、DL 曝露最後の 5 時間について 30 分ごとに唾液を採取し、被験者の内因性のリズム周期をある程度反映すると考えられる DLMO の位相変化を求めた。その後被験者は就床し、7 時間後に起床した。3 日目は、起床 1 時間後から 3 時間かけて朝の光刺激 (2000 lux, 6700K) を実施した。その後 DLMO の 2 時間後まで再び DL 曝露とし、他日と光条件を統一した。DL 曝露の最後の 5 時間について 30 分ごとに唾液を採取して、朝の光刺激の影響を受けた新たな DLMO の位相変化を求めた。3 日目の夜間の光曝露については、DLMO の 2 時間後から 2 時間の光刺激 (500 lux, 6700K) を実施し、光曝露前後で ML (メラトニン分泌量) 及び MLS (メラトニン分泌抑制度) のそれぞれを求めた。

## (2) 夜の光実験

被験者は男子大学生の 41 名であった。MEQ を用いた被験者集団のクロノタイプは、“ほぼ朝型” 3 名、“中間型” 30 名、“ほぼ夜型” 8 名であった。

全被験者の DLMO を事前に測定し、各被験者についてこの時刻を起点に実験時の光曝露や就寝・起床の各時刻を決定した。なお、実験前の 1 週間について、各被験者の就寝・起床時間を統制した。

実験日初日、被験者は各自が有する DLMO の 4 時間前から 2 時間後まで DL に曝された。この間、DL 曝露 1 時間後から 5 時間について 30 分ごとに唾液を採取した。その後被験者は就床し、8 時間後に起床した。

2 日目は、起床後から DLMO の 2 時間後まで DL に曝され、その後 2 時間、夜の光 (1000 lux, 6700K) に曝された。唾液サンプルは、DLMO の 3 時間前から夜の光曝露が終了する 4 時間後までの 7 時間について、30 分毎に採取した。光曝露前までの唾液により、被験者の内因性のリズム周期をある程度反映すると考えられる DLMO の位相変化、および夜の光曝露によ

る MLS を求めた。その後被験者は就床し、6 時間後に起床した。3 日目は、起床後から DLMO の 4 時間後まで DL に曝露され、最後の 7 時間について 30 分ごとに唾液を採取し、前夜の光刺激に影響を受けた新たな DLMO の位相変化を求めた。

## (3) ゲノム解析

### 解析概要

光による生理機能への非視覚的影響の多型性と関連する遺伝子の発見を目的に、光曝露実験被験者の DNA を用いたゲノムワイド関連解析 (genome-wide association study: GWAS) を実施し、生理データとゲノムワイド SNP データとの関連を調べた。

### 試料

第一群 (n=27) の朝の光実験では、3 日目の起床 1 時間後から朝の光曝露を、また同日の DLMO の 2 時間後から夜の光曝露を実施した。第二群 (n=41) の夜の光実験では、2 日目の DLMO の 2 時間後に夜の光曝露を実施した。第一群と第二群の全被験者 (n=68) から OrageneDNA kit (DNAGENOTEK) を用いて唾液を採取した。この唾液から Puregenekit (QIAGEN) を用いて DNA を抽出した。

### GWAS

採取された全試料のうち 40 人についてジャボニカアレイによって 65 万個の SNP をタイピングした。つづいて、この 65 万 SNP にもとづく連鎖情報からの未タイピング SNP の推定 (imputation) を行い、最終的に 243 万個の SNP 情報を得た。この 243 万 SNP のうち、サンプル内でマイナーアレル頻度が 30 % 以上の 168 万 SNP をもちいて、測定もしくは聴取した普段の起床/就寝時刻、MEQ、DLMO 関連データ、ML 関連データの全 25 項目について GWAS を行った。

### 候補遺伝子アプローチ

GWAS によって生理的多型性との関連が示唆された SNP を含む候補遺伝子について、サンプル数を増やして関連解析をおこなった。ジャボニカアレイによるゲノムワイド SNP タイピングをおこなっていない被験者について、関連が示唆された SNP を含むゲノム領域について PCR 直接塩基配列決定を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 朝の光実験

概日リズムの周期は、一般に 24 時間よりも長いことが多い。このリズム位相の変化

は、DLMOの時刻の変化でみることができ、朝の光実験では、2日目の起床後から就寝までDLに曝されており、この状況下のDLMOでは個人の内因性のリズムがある程度反映されると思われる。被験者のリズム周期が24時間より長い場合は前日のDLMOに比べて遅くなることが考えられる。本実験においても、平均値でみると、1日目のDLMO(23.5h)に対して2日目(24.4h)では有意に後退( $p<0.05$ )した。クロノタイプを反映するMEQスコアは、2日目のDLMOの変異量、および就寝時刻とそれぞれ有意な相関関係があった。これは、夜型のものほど2日目のDLMOが遅くなり、また就寝時刻も遅くなることを示している。

3日目は、午前中に2000 luxの光を3時間浴びているため、DLMO(平均22.8h)は2日目より有意に前進( $p<0.001$ )した。3日目は、朝の光刺激がなければ2日目の位相後退が3日目も同程度加算されることが推測される。この3日目の予測後退からみるDLMOに対する朝の光による補正変異量(前進の程度)は、2日目のDLMOの位相後退が大きい個人ほど大きいという、有意な相関関係( $r=-0.697$ ,  $p<0.01$ )がみられた。これは個人の内因性リズム周期が長いものほど、朝の光で大きく位相が前進するため、概日リズム周期が長いものでも24時間にリセットされやすいと考えられた。

夜の光曝露については、500 luxの高色温度に対して、通常メラトニン分泌はこの光条件によって抑制されるが、それが見られなかった。朝の光を十分に浴びると夜の光によるメラトニン分泌抑制は生じにくいことが報告されており、これを追認するものと考えられる。またクロノタイプとメラトニン分泌抑制との有意な関係はなかった。

## (2) 夜の光実験

1日目と2日目のDLMO測定までは、朝の光実験と同じ環境条件であった。夜の光実験においても、2日目のDLMO(平均24.5h)は1日目(平均23.5h)より有意に後退( $p<0.05$ )し、またこの後退の程度が大きいものほど夜型の傾向を示し、これらは朝の光実験の結果と同様であった。

2日目の夜は光曝露を2時間実施し、夜の光によるMLSと3日目のDLMOの変異を評価した。夜の光曝露によるMLの抑制は、朝の光実験とは異なり、有意に分泌が抑制された( $p<0.05$ )。これは朝の光実験では、夜光曝露した当日の午前中は高照度の光に曝露されたのに対して、夜の光実験では暗照明下であったためと考えられる。さらに夜の光によるMLの抑制が大きいものほどMEQスコアは小さくなり( $r=-0.394$ ,  $p<0.05$ )

夜型になることを示した。

2日目の夜の光曝露による翌日のDLMOの変異について、朝の光実験と同様の考え方により、2日目の夜の光曝露がなければ3日目も同程度の遅れがあったと仮定した後退時刻を予測した。その結果、予測時刻に対する実測のDLMOはさらに有意な後退を示した( $p<0.05$ )。さらに2日目の暗照明下のDLMOの位相後退が大きいものほど夜の光曝露による位相後退は小さいという有意な相関関係( $r=-0.649$ ,  $p<0.01$ )が得られた。これは個人の内因性リズム周期が長いものほど、夜に光を浴びても後退する程度が小さいため、概日リズム周期が長いものでも翌朝の光で24時間にリセットされやすいと考えられた。

## (3) ゲノム情報の解析結果

### 概要

生理データとゲノムワイドSNPデータとの関連を調べた結果、夜の光実験における光曝露直後のMLとLPIN1遺伝子座に位置するSNP(rs10180912)が有意な関連を示した。

### 結果と考察

25の表現型のうち5つの表現型について関連が示唆された( $p<10^{-6}$ )。5つの表現型のうち、国際データベース等でannotationされている遺伝子に位置するSNPと有意な関連が示された表現型は、第二群の夜の光実験における光曝露後のMLだけであった。期待された朝と夜のそれぞれの光に対するDLMOの変異量と時計遺伝子群の間には有意な関係はみられなかった。夜の光曝露後のMLと関係した4SNPs、rs6432231(C/G)、rs10180912(A/G)、rs7598716(A/C)、rs4389306(A/G)は第2染色体短腕にあり、脂質代謝に関連する遺伝子LPIN1に位置した。LPIN1は30個のエキソンからなる150kbの遺伝子で、4つのSNPはイントロン1の中、6kb以内の領域中に存在していた。これら4SNPsは40人のサンプル内で完全に連鎖していた。個体ごとの生理データに立ち戻り調べた結果、派生型アレルをホモで持つ個体では光曝露後のMLが多いことが判明した。

GWASによって検出された4つのSNPは完全に連鎖していたため、そのうちのひとつrs10180912(G/A)についてのみPCR直接塩基配列決定をおこなった。これとジャポニカアレイのSNP情報と併せて第二群の光曝露後のMLとの関連解析を行った。その結果、rs10180912(G/A)がAAの個体はGG/AGと比べ、有意に光曝露後のMLが多く観察された。また、有意差は得られなかったものの睡眠直前のML(2日目・光曝露最後)や睡眠直

前の ML (3 日目・暗照明最後) のメラトニン計測でも AA の個体でメラトニン濃度が高く観察された。

本研究により第二群の光曝露後の ML が *LPIN1* 内の SNP の遺伝型の違いによって有意に異なることが示された。

*LPIN1* は脂質代謝のうちの 1,2 ジアシル-sn-グリセロール 3 リン酸の脱リン酸化反応を触媒する酵素であるが、この反応の生成物である 1,2 ジアシル-sn-グリセロールは生理活性を持つ脂質である。また、マウスやラットを用いた先行研究で葉酸欠乏のラットにおいてメラトニン分泌の減少がおこる現象や葉酸欠乏のマウスでの肝臓では夕方になると *lpin1* (*LPIN1* のオルソログ) の転写が上昇する現象が報告されている。*LPIN1* が唾液中のメラトニン濃度に関連している可能性が示唆される。

しかし本研究でみられた SNP が生体内でどのように発現に関与し、また 1,2 ジアシル-sn-グリセロールの代謝にどのように関連するのか不明な点が多く残った。今後の展望としては、まず GWAS の結果を強くサポートするために、新たに生理実験を行った別の被験者群の GWAS をおこない、同じ結果が得られるかを検証することが求められる。また、別のアプローチとして、この *LPIN1* 遺伝子をゲノム編集技術で改変したマウス (あるいはそれに替わる脊椎動物) を作成し、生理機能を測定することにより、*LPIN1* 遺伝子多型と生理多型との関連を証明することが、今後の課題である。

## 5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計 52 件)

1. AKarimi, R Razaghi, H Biglari, T Sera, S Kudo, Collision of the glass shards with the eye: A computational fluid-structure interaction model, *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 90:80-86, 2018, <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2017.12.008> 査読有.
2. T Akiyama, T Katsumura, S Nakagome, SI Lee, K Joh, H Soejima, K Fujimoto, R Kimura, H Ishida, T Hanihara, A Yasukouchi, Y Satta, S Higuchi, H Oota. An ancestral haplotype of the human *PERIOD2* gene associates with reduced sensitivity to light-induced melatonin suppression. *PLOS ONE* 12(6): e0178373, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178373> 査読有
3. 落合 将太郎, 原田 和樹, 李 相逸, 樋口 重和, 夜の青色光と赤色光の生理作用: 測定項目間の違いと印象評価との関連性. *日本生理人類学会誌*, 22:69-76, 2017 査読有
4. T. Katsumura, S. Oda, H. Mitani, H. Oota. Medaka population genome structure and demographic history unveiled via Genotyping-by-Sequencing. *bioRxiv*, 2017, Doi: <https://doi.org/10.1101/233411>, 査読有
5. 太田博樹, ゲノム人類学から見たふたご研究 / Twin research in Genome Anthropological point of view, *日本生理人類学会誌*, 22(2):91-96, 2017, 査読有.
6. A Karimi, R, Razaghi, M Navidbakhsh, T Sera, S Kudo, Mechanical Properties of the Human Sclera Under Various Strain Rates: Elastic, Hyperelastic, and Viscoelastic Models, *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering*, 7:686-695, 2017, <https://doi.org/10.1166/jbt.2017.1609> 査読有.
7. S. Nakagome\*, H. Chinen, A. Iraha, A. Hokama, Y. Takeyama, S. Sakisaka, T. Matsui, J.R. Kidd, K.K. Kidd, H.S. Said, W. Suda, H. Morita, M. Httori, T. Hanihara, R. Kimura, H. Ishida, J. Fujita, F. Kinjo, S. Mano, H. Oota, Confounding effects of microbiome on the susceptibility of *TNFSF15* to Crohn's disease in the Ryukyu Islands, *Human Genetics*, 136:387-397, 2017, 査読有.
8. K. Igarashi, J. Kobayashi, T. Katsumura, Y. Urushibara, K. Hida, T. Watanabe-Asaka, H. Oota, S. Oda and H. Mitani, *PLOS ONE*, 12: e0170006, Doi:10.1371/journal.pone.0170006, 2017, 査読有.
9. K. Koganebuchi, K. Haneji, T. Toma, K. Joh, H. Soejima, K. Fujimoto, H. Ishida, M. Ogawa, T. Hanihara, S. Harada, S. Kawamura and H. Oota. The allele frequency of *ALDH2\*Glu504Lys* and *ADH1B\*Arg47His* for the Ryukyu islanders and their history of expansion among East Asians. *American Journal of Human Biology*, 29(2), Doi: 10.1002/ajhb.22933, 2017, 査読有.
10. 田中冴季, 謝倩, 矢野峻朗, 犬塚優, 田尻弘範, 安河内朗, 混色光の分光分布と短波長成分が夜間メラトニン分泌に及ぼす影響. *日本生理人類学会誌*, 21:151-158, 2016, 査読有.
11. C-C Lu, C Chou, A Yasukouchi, T K

ozaki, H-Y Liue, Effects of nighttime lights by LED and fluorescent lighting on human melatonin. Journal of Ambient Intelligence and Humanized Computing, 7:837-844, 2016, 査読有.

### 【学会発表】(計 83 件)

1. A Yasukouchi, N Toda, H Noguchi. Optimal lighting conditions for office workers from the perspective of non-visual effects. Program book, The 1<sup>st</sup> International conference of occupational health and safety, 1<sup>st</sup>- 2<sup>nd</sup> November 2017, Bali, Indonesia, p.46
2. Higuchi S, Lee SI, Experimental approaches how to prevent light-induced melatonin suppression and circadian rhythm disturbance in shift workers, The 1st International Conference of Occupational Health and Safety, 1<sup>st</sup>- 2<sup>nd</sup> November 2017, Bali, Indonesia.
3. Higuchi S, Nishimura K, Lee SI, Kitamura S, Entrainment of Circadian Rhythm to Natural Light-Dark Cycle in Children. The 13th International Congress of Physiological Anthropology, September 13, 2017, Loughborough, UK
4. 李相逸、樋口重和、夜勤中の光によるメラトニン分泌抑制や概日リズムの位相後退をいかに防ぐか。第 24 回日本時間生物学会学術大会, 2017 年 10 月 28 日, 京都大学.
5. 勝村啓史、佐藤克、山下佳那、覚張隆史、尾田正二、今井正、吉浦康寿、武島弘彦、竹内秀明、小川元之、太田博樹、野生メダカにみられる消化管長の季節変動に相関する DNA メチル化変動領域の網羅的な探索 (ポスター), 第 122 回日本解剖学会総会・学術集会, 2017 年 3 月 28-30 日, 長崎.
6. 勝村啓史、太田博樹、野生メダカをモデルとした消化管長多型をもたらす進化メカニズムの解明。第 33 回日本霊長類学会大会 自由集会, 2017 年 7 月 15-17 日, 福島.
7. K Alireza, 世良俊博, 工藤奨, 実験的検証モデルを用いたヒト眼球損傷過程に関する数値解析。日本機械学会第 29 回バイオエンジニアリング講演会, 2017 年 12 月 14-15 日, 京都.
8. 國富雅貴, 万田周一郎, 世良俊博, 工藤奨。マイクロデバイスを用いた伸展負荷時の肺胞透過率測定。日本機械学会第 29 回バイオエンジニアリング講演会, 2017 年 12 月 14-15 日, 京都.

9. 山中涼太郎, 万田周一郎, 世良俊博, 工藤奨, 伸展負荷時における型肺胞上皮細胞内の小胞と細胞骨格の関係。日本生理人類学会研究奨励発表会, 2018 年 2 月 3 日, 福岡.
10. 田中冴季, 前田康彦, 牧添正貴, 奥永浩輔, 盛坪翔太, 久保啓杜, 樋口重和, 安河内朗, 朝および夜間の光曝露が夜間の非視覚的生理反応に及ぼす影響およびクロノタイプとの関係。日本生理人類学会第 73 回大会, 2016 年 6 月 4 日, 大阪.
11. Akira Yasukouchi, Shigekazu Higuchi, Hiroki Oota, Saki Tanaka, The effects of morning and night lights on phase shift of circadian rhythm and melatonin suppression among young adults with wide range-score of MEQ. 20th Congress of the European Anthropological Association, August 25<sup>th</sup>, 2016, Zagreb, Croatia.

### 【図書】(計 1 件)

1. 勝村啓史, 太田博樹。性的二型の分子進化的理解 メダカの尻鰭と性ステロイドホルモン。ホルモンから見た生命現象と進化シリーズ III, 成長・成熟・性決定。p.156-173, 2016, ISBN078-4-7853-5116-8

### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

安河内朗 (YASUKOUCHI AKIRA)  
九州大学・大学院芸術工学研究院・教授  
研究者番号: 20136568

#### (2) 研究分担者

太田博樹 (OOTA HIROKI)  
北里大学・医学部・准教授  
研究者番号: 40401228

#### (3) 研究分担者

樋口重和 (HIGUCHI SHIGEKAZU)  
九州大学・大学院芸術工学研究院・教授  
研究者番号: 00292376

#### (4) 研究分担者

工藤奨 (KUDO SUSUMU)  
九州大学・大学院工学研究院・教授  
研究者番号: 70306926