

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：34509

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670118

研究課題名(和文)変温マウスを用いた生物時計温度補償性の検証

研究課題名(英文)Assessment of temperature compensation of circadian rhythm by using cold-blooded mice

研究代表者

平岡 義範(Hiraoka, Yoshinori)

神戸学院大学・薬学部・助教

研究者番号：60397552

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：概日リズムは温度変化に関わらず、ほぼ一定の周期を保つ“温度補償性”がある。これまで哺乳類個体の体温を変化させて概日時計の温度補償性を検証することは不可能であったが、我々の作製したNRDc欠損マウス(KO)は変温マウスであったことから、この変温マウスを用いた概日時計の温度補償性の検証を目的とした。環境温度変化とKOの体温変化の相関関係を検討するため、KOを高温域(38℃)、および、低温域(10℃)で飼育したところ、短期的にはKOの体温はそれぞれ高温(約38℃)、および、低温(約35℃)になったが、長期間安定して維持することは困難であることが分かった。

研究成果の概要(英文)：The period of the circadian rhythm is kept relatively constant over a wide range of temperatures, which means “temperature compensation”. So far, it is impossible to change body temperature of warm-blooded mammals. NRDc deficient mice (KO) that we generated have a feature as so-called “cold-blooded mice”. To evaluate the correlation between environmental temperature and body temperature, we housed KO mice at high temperature (38℃) and low temperature (10℃). Body temperature of KO mice became 38℃ and 35℃, respectively. However, it is difficult to keep these body temperatures for a long period.

研究分野：細胞生物学、分子生物学

キーワード：概日リズム 温度補償性

## 1. 研究開始当初の背景

概日時計は哺乳類では、睡眠・覚醒、体温調節、ホルモン分泌などの基本的生理機能を約 24 時間周期のリズム(概日リズム)で維持するために重要な機構である。概日リズムは温度変化に関わらず、ほぼ一定の周期を保てるという“温度補償性”があり、シアノバクテリアから哺乳類培養細胞に至るまで広く認められている。一般的に化学反応は温度変化に大きな影響を受け、例えば、生物の生理機能を担う酵素反応は温度が変化するとその反応速度は敏感に変化する。しかしながら、前述したように、生物の概日リズム周期は温度が大きく変化しても、生理的温度条件下ではほぼ一定である(温度補償性)。細胞内では様々な生理反応が複雑に起こっているにもかかわらず、なぜ温度補償性を保持できるのかは、生物時計研究における最大のなぞの一つである。

一方、哺乳類は恒温動物であるため、環境温を変化させても体温をほぼ一定に保てることから、実際、哺乳類個体の体温を変化させて、概日時計の温度補償性を検証することはこれまで実験的に不可能であった。

## 2. 研究の目的

我々の同定したメタロプロテアーゼ nardilysin (N-arginine dibasic convertase; NRDC) は、細胞局在に依存した多機能性(細胞外: シェディング活性化、核内: 転写調節など)を有し、その欠損マウス(NRDC<sup>-/-</sup>)は、成長遅延や行動異常など多彩な表現型を呈した(Ohno *et al.*, **Nat. Neurosci.** 2009)。さらに、NRDC<sup>-/-</sup>の特筆すべき表現型の一つは低体温であり(室温: 23 °C で野生型マウス NRDC<sup>+/+</sup>: 38.0 °C、NRDC<sup>-/-</sup>: 36.5 °C) さらに、寒冷環境下(4 °C)では体温を維持できないという、恒温動物の最大の特徴を欠失したマウスであった。NRDC<sup>-/-</sup>は環境温の変化に伴い体温の変化する“変温マウス”であったことから、本研究では、この変温マウスを用いた哺乳類個体における概日時計の温度補償性の検証を目的とした。

## 3. 研究の方法

NRDC<sup>-/-</sup>を用いた哺乳類個体における概日時計温度補償性の検証に向け、まず、環境温変化と NRDC<sup>-/-</sup>の体温変化の相関関係の検討を行った。

### (1) 高温域の検討:

NRDC<sup>-/-</sup>は室温(23 °C)で既に低体温(NRDC<sup>+/+</sup>: 38.0 °C、NRDC<sup>-/-</sup>: 36.5 °C)であることから、NRDC<sup>-/-</sup>が NRDC<sup>+/+</sup>と同じ体温を維持できる環境温の検討を行った。

### (2) 低温域の検討:

前述したように、NRDC<sup>-/-</sup>は寒冷環境下(4 °C)では体温を維持することができない変温マウスであった。4 °C という厳しい寒冷環境では、体温が下がり続けてしまうため、NRDC<sup>-/-</sup>が低体温(34 ~ 35 °C)を長期に維持できる環

境温の検討を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 高温域の検討:

NRDC<sup>-/-</sup>が NRDC<sup>+/+</sup>と同じ体温を維持できる環境温を設定するため、まず、環境温を 38 °C にして飼育したところ、体温も 38 °C 前後になった。しかしながら、38 °C で飼育すると 1 週間前後でマウスが弱り始めてしまうため、38 °C での飼育は 1 週間が限度であることが分かった。したがって、長期間(約 1 ヶ月)の測定期間を要する概日リズムの測定は不可能であった。

### (2) 低温域の検討:

NRDC<sup>-/-</sup>が低体温(34 ~ 35 °C)を長期に維持できる環境温を設定するため、まず、環境温 10 °C で検討を行った。環境温 10 °C では NRDC<sup>-/-</sup>の体温は 12 時間後に 35 °C 前後になるが、マウス個体差が非常に大きいことが分かった。例えば、環境温 10 °C の部屋に入れて数時間で体温が急激に低下してしまうマウスもいれば、数日(2~3 日)体温の下がらないマウスも存在した。

以上の結果から、NRDC<sup>-/-</sup>の体温を高温および低温域で長期間安定して維持することは困難であると考えられた。

## 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 2 件)

1. Hiraoka Y, Matsuoka T, Ohno M, Nakamura K, Saijo S, Matsumura S, Nishi K, Sakamoto J, Chen PM, Inoue K, Fushiki T, Kita T, Kimura T and Nishi E. Critical roles of nardilysin in the maintenance of body temperature homeostasis. **Nat. Commun.** 2014; 5:3224. doi: 10.1038/ncomms4224.
2. Ohno M, Hiraoka Y, Lichtenthaler SF, Nishi K, Saijo S, Matsuoka T, Tomimoto H, Araki W, Takahashi R, Kita T, Kimura T and Nishi E. Nardilysin prevents amyloid plaque formation by enhancing  $\alpha$ -secretase activity in an Alzheimer's disease mouse model. **Neurobiol. Aging.** 2014; 35: 213-222. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2013.07.014. Epub 2013 Aug 15.

[学会発表](計 19 件)

1. Ohno M, Watanabe S, Hiraoka Y, Nishi K, Saijo S, Sakamoto J, Chen PM, Kita T, Nishi E, Kimura T. Nardilysin, an Activator of Ectodomain Shedding, is a Novel and Potent Biomarker for Acute Coronary Syndrome. 第 115 回日本循環器学会近畿地方会(2013 年 6 月 15 日、

- 京都)
2. 大野美紀子, 平岡義範, 松浦博, 西清人, 西城さやか, 坂本二郎, 陳博敏, 牧山武, 北徹, 木村剛, 西英一郎 ナルディライジンによる心拍数制御機構 第 18 回日本病態プロテアーゼ学会学術集会 (2013 年 8 月 16-17 日、大阪)
  3. 西城さやか, 平岡 義範, 松岡 龍彦, 大野美紀子, 中村 和弘, 松村 成暢, 西 清人, 坂本二郎, 陳 博敏, 北 徹, 木村 剛, 西 英一郎 体温恒常性維持におけるナルディライジンの役割 平成 25 年度 温熱生理研究会 (2013 年 9 月 5-6 日、岡崎)
  4. Nishi K, Sato Y, Ohno M, Hiraoka Y, Saijyo S, Sakamoto J, Chen P, Kita T, Inagaki N, Kimura T, Nishi E. Nardilysin is a critical regulator of insulin secretion and glucose metabolism, American Heart Association scientific sessions 2013. Nov 18, 2013, Dallas, USA.
  5. 西城さやか, 平岡 義範, 松岡 龍彦, 大野美紀子, 中村 和弘, 松村 成暢, 西 清人, 坂本二郎, 陳 博敏, 北 徹, 木村 剛, 西 英一郎 ナルディライジンは PGC-1 $\alpha$  を制御することで体温恒常性維持機構と適応熱産生を調節する 第 36 回日本分子生物学会年会 (2013 年 12 月 3-6 日、神戸)
  6. 西 清人, 佐藤 雄一, 大野 美紀子, 平岡 義範, 西城 さやか, 坂本二郎, 陳 博敏, 松岡 龍彦, 北 徹, 稲垣 暢也, 木村 剛, 西 英一郎 ナルディライジンはグルコース応答性インスリン分泌を制御する 第 36 回日本分子生物学会年会 (2013 年 12 月 3-6 日、神戸)
  7. 大野 美紀子, 平岡 義範, Lichtenthaler Stefan F, 富本 秀和, 荒木 互, 高橋 良輔, 坂本二郎, 陳 博敏, 北 徹, 木村 剛, 西 英一郎 アルツハイマー病におけるナルディライジンの意義 第 36 回日本分子生物学会年会 (2013 年 12 月 3-6 日、神戸)
  8. Hiraoka Y, Matsuoka T, Ohno M, Nishi K, Nakamura K, Kita T, Kimura T and Nishi E. Critical roles of a metalloendopeptidase nardilysin in cold-induced adaptive thermogenesis. ASCB (American Society for Cell Biology), December 14-18, 2013, New Orleans, USA
  9. Nishi K, Sato Y, Ohno M, Hiraoka Y, Saijyo S, Sakamoto J, Chen P, Kita T, Inagaki N, Kimura T, Nishi E. Nardilysin controls glucose metabolism through the regulation of insulin secretion 第 78 回日本循環器学会学術集会 (2014 年 3 月 21 日、東京)
  10. Saijo S, Hiraoka Y, Matsuoka T, Ohno M, Nakamura K, Matsumura S, Nishi K, Sakamoto J, Chen P, Kita T, Kimura T, Nishi E. Nardilysin Regulates Adaptive Thermogenesis and Body Temperature Homeostasis through Modulation of PGC-1 $\alpha$  第 78 回日本循環器学会総会 (2014 年 3 月 23 日、東京)
  11. 西清人, 佐藤 雄一, 大野美紀子, 平岡義範, 西城さやか, 稲垣 暢也, 西英一郎. ナルディライジンは膵  $\beta$  細胞においてインスリン分泌を制御する 第 61 回日本生化学会近畿支部例会 (2014 年 5 月 17 日、京都)
  12. 西城さやか, 平岡義範, 松岡龍彦, 大野美紀子, 西清人, 西英一郎 ナルディライジンは PGC-1 $\alpha$  を制御することで体温恒常性維持機構と適応熱産生を調節する 第 61 回 日本生化学会近畿支部例会 (2014 年 5 月 30 日、京都)
  13. 大野美紀子, 平岡義範, 松浦博, 西清人, 西城さやか, 坂本二郎, 陳博敏, 牧山武, 北徹, 木村剛, 西英一郎 多機能プロテアーゼによる心拍数制御機構 第 35 回日本循環制御医学会総会 (2014 年 7 月 4 日~5 日、福岡)
  14. 西清人, 佐藤雄一, 大野美紀子, 平岡義範, 西城さやか, 坂本二郎, 陳博敏, 北徹, 稲垣暢也, 木村剛, 西英一郎 ナルディライジンはグルコース応答性インスリン分泌を制御する 第 46 回日本動脈硬化学会学術集会 (2014 年 7 月 10-11 日、東京)
  15. 西城さやか, 平岡義範, 松岡龍彦, 大野美紀子, 中村和弘, 松村成暢, 西清人, 坂本二郎, 陳 博敏, 北 徹, 木村 剛, 西 英一郎 ナルディライジンは PGC-1 $\alpha$  を制御することで体温恒常性維持機構と適応熱産生を調節する 第 46 回 日本動脈硬化学会総会・学術集会 (2014 年 7 月 10-11 日 東京)
  16. Ohno M, Hiraoka Y, Nishi K, Saijo S, Sakamoto J, Chen P, Makiyama T, Kita T, Matsuura H, Kimura T, Nishi E. Nardilysin controls heart rate through the regulation of sinus node automaticity. Cold Spring Harbor Meeting (Nuclear Receptors & Diseases), Oct 28-Nov1, 2014, Cold Spring Harbor, NY, USA
  17. 西城さやか, 平岡義範, 大野美紀子, 中村和弘, 松村成暢, 西清人, 坂本二郎, 陳博敏, 森田雄介, 北徹, 木村剛, 西英一郎 褐色脂肪組織に発現するナルディライジンは体温恒常性維持機構において重要な役割を示す 第 37 回日本分子生物学会年会 (2014 年 11 月 25-27 日、横浜)
  18. 大野美紀子, 松浦博, 平岡義範, 西清人, 西城さやか, 坂本二郎, 陳博敏, 牧山武, 北徹, 木村剛, 西英一郎 多機能プロテアーゼによる洞房結節自動能制御機構 第 37 回日本分子生物学会年会 (2014 年 11 月 25-27 日、横浜)

19. 西清人、佐藤雄一、大野美紀子、平岡義  
範、西城さやか、坂本二郎、陳博敏、森  
田雄介、松岡龍彦、北徹、稲垣暢也、木  
村剛、西英一郎 ナルディライジンによ  
るインスリン分泌制御の解析 第 37 回  
日本分子生物学会年会 (2014 年 11 月  
25-27 日、横浜)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

平岡 義範 (HIRAOKA, Yoshinori)

神戸学院大学薬学部・助教

研究者番号：60397552

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

西 英一郎 (NISHI, Eiichiro)

京都大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：30362528