

平成 22 年 5 月 12 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2009

課題番号：19599001

研究課題名 (和文) 卵巣に存在する概日時計の生理的役割の解明

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

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

研究成果の概要 (和文)：

哺乳類では、視床下部の視交叉上核に存在する概日時計が、末梢組織に存在する概日時計の位相を調節すると考えられている。しかし、その調節の方法はほとんどわかっていない。本研究では、ラット卵巣をモデル器官とし、LH が卵巣に存在する概日時計の位相を調節することを生体レベルで検討した。薬理的あるいは外科的な方法により、生体内の LH 濃度を一定に保つと、卵巣における概日リズムの振幅は著しく減衰することがわかった。この結果は、LH が卵巣における概日時計の振動維持に必要であることを強く示唆する。

研究成果の概要 (英文)：

Current understanding in the field is that the circadian clock in the suprachiasmatic nucleus controls the phase of circadian clock in the peripheral organs. However, the mechanism of the control is remained to be shown. In this study, we used the rat ovary as a model of the peripheral organ, and investigated the potency of LH to control the phase of the circadian clock. When LH level was kept at a constant level in the rat by a pharmacological or surgical method, the amplitude of circadian oscillation was significantly decreased. The result indicates that LH is important to maintain circadian oscillation in the ovary.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,617,021	0	1,617,021
2008 年度	382,979	114,893	497,872
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	534,872	3,934,893

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 (含体力医学・栄養生理学)

キーワード：概日リズム、末梢時計、中枢時計、卵巣、黄体形成ホルモン、LH サージ、ルシフェラーゼレポーター、発情周期

1. 研究開始当初の背景

概日時計は、地球上に生息するほぼ全ての生

物が持つ生理機能のひとつである。概日時計の本体は、複数の時計遺伝子からなる転写・翻訳のフィードバックループであることが示されている。哺乳類では、視床下部の視交叉上核 (SCN) に中枢時計が存在し、末梢組織に存在する概日時計の位相を調節すると考えられている。それぞれの末梢組織の概日時計の位相は、常に SCN の概日時計に対して特定の位相関係に調節されていることから、その位相であることが、それぞれの組織における生理機能に必要である可能性が考えられる。しかし、その調節の方法や、末梢時計が果たす生理的役割についてはほとんどわかっていない。

2. 研究の目的

これまでに、ラット卵巢をモデル器官として SCN から末梢への概日時計の位相調節シグナルの解析を行った結果、卵巢に存在する概日時計の位相は、液性因子のみでも調節されることがわかった。また、培養した卵巢濾胞細胞を用いた解析から、その液性因子は、黄体形成ホルモン (LH) である可能性を示唆することができた。

本研究では、LH が卵巢に存在する概日時計の位相を調節することを、生体を用いた解析において示す。

3. 研究の方法

時計遺伝子 *Period2* プロモーター下流にルシフェラーゼレポーターを組み込んだトランスジェニックラット (*Per2-luc* ラット) を用いた。成体雌の中から、4 日周期の規則的な発情周期を示す個体を選別し、以下の実験に供した。

(1) 発情周期の各期 (発情前期、発情期、発情後期、発情間期) において、SCN および卵巢を単離・培養し、生物発光リズムを記録・解析した。

(2) 生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン

(GnRH) のアゴニストである Goserelin を腹腔内に埋め込んだ浸透圧ポンプにより慢性的に投与し、生体内における LH を高濃度一定とした。アゴニスト投与により発情周期が停止したことを確認した後に、SCN および卵巢を単離・培養し、生物発光リズムを記録・解析した。

(3) ハラスナイフによる hypothalamic suprachiasmatic frontal cut を行い、発情周期を停止した。それらの個体より SCN および卵巢を単離・培養し、生物発光リズムを記録・解析した。

4. 研究成果

(1) LH サージは発情前期の日の決まった時刻に起こり、排卵を誘発する。LH が卵巢概日時計の位相調節に関与しているなら、LH サージの前後において卵巢概日時計の位相は変化すると考えられる。実際に、発情周期のうち、LH サージの起こる前日 (発情間期) と翌日 (発情期) における *Per2-luc* 発現リズムの位相の間に、有意差が認められた。

(2) 発情周期に伴って起こる LH サージが、卵巢の概日時計の位相を調節しているならば、その位相調節シグナルが存在しない状態においては、卵巢と SCN の概日時計は通常の位相関係を保つことができなくなると考えられる。そこで、生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) のアゴニストを投与し、薬理的に生体内における LH 濃度を一定に保ち、卵巢の概日リズムにどのような変化が見られるかを解析した。GnRH アゴニスト投与群では、卵巢における *Per2-luc* 発現リズムの振幅は著しく減衰することがわかった。これらの結果から、LH サージが卵巢における概日時計の振動維持に必要であることを強く示唆することができた。

(3) GnRH アゴニスト投与により、薬理的に生体内における LH 濃度を一定にしたとき、卵巢における概日時計の振動は著しく減衰した。しかし、薬理的な手法では、予期せぬ副作用により結果に影響が生じている可能性も否定できない。そこで、ハラスナイフによる hypothalamic suprachiasmatic frontal cut を行い、外科的な手法により生体内における LH 濃度を一定にすることにした。その結果、GnRH アゴニスト投与の場合と同様に卵巢における *Per2-luc* 発現リズムの振幅は著しく減衰することがわかった。

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 6 件)

- ① Sellix, M. T., Yoshikawa, T., Menaker, M. A circadian egg timer gates ovulation. *Curr. Biol.* **20**:R266-267 (2010) 査読有
- ② Yoshikawa T., Yamazaki S., Biscoe E. W., Numano R., Gallaspy L. M., Soulsby S., Papadimas E., Pezuk P., Doyle S. E., Tei H., Sakaki Y., Block G. D., Menaker

- M. Ontogeny of circadian organization in the rat. *J. Biol. Rhythms* **24**:55-63 (2009) 査読有
- ③ Yoshikawa T., Sellix M., Pezuk P., Menaker M. The timing of the ovarian circadian clock is regulated by gonadotrophins. *Endocrinology* **50**:4338-4347 (2009) 査読有
- ④ Doyle S.E., Yoshikawa T., Hillson H., Menaker M. Retinal pathways influence temporal niche. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**:13133-13138 (2008) 査読有
- ⑤ Honma S., Inagaki N., Ono D., Yoshikawa T., Hashimoto S., Honma K. Clock mechanisms for seasonal adaptation: Morning and evening oscillators in the suprachiasmatic nucleus. *Sleep and Biological Rhythms* **6**:84-90 (2008) 査読有
- ⑥ 吉川朋子・本間さと・本間研一 生体リズムの分子機構 日本臨床 **66** (S2):90-95 (2008)
- [学会発表] (計8件)
- ① 吉川朋子・本間さと・本間研一 Photoperiodic response of multiple oscillators in mouse SCN. 第16回日本時間生物学会学術大会 (大阪国際会議場 2009.10)
- ② 吉川朋子 卵巣に存在する概日時計の位相調節機構の解明 第80回日本動物学会大会 (グランシップ静岡 2009.9)
- ③ 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及ぼす影響 日本動物学会第80回日本動物学会大会 (グランシップ静岡 2009.9)
- ④ 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 Effects of environmental temperature during maternal deprivation on circadian rhythms of neonatal rats. International Sapporo Symposium on Biological Rhythm (札幌 北海道大学 2009.8)
- ⑤ 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 Effects of ambient temperature during maternal deprivation on circadian rhythms of neonatal rats. XXXVI International Congress of Physiological Science (京都国際会議場 2009.7)
- ⑥ 吉川朋子・本間さと・本間研一・Michael Menaker Phase control of the ovarian circadian clock by the central clock. 第85回日本生理学会大会 (東京 京王プラザホテル 2008.3)
- ⑦ 吉川朋子・山崎晋・Elizabeth W. Biscoe・沼野利佳・Lauren M. Gallaspy・Stacy Soulsby・Evagelia Papadimas・Pinar Pezuk・Susan Doyle・程 肇・榊佳之・Gene D. Block・Michael Menaker Ontogeny of circadian organization in rat. 2nd World Congress of Chronobiology (東京 京王プラザホテル 2007.11)
- ⑧ 吉川朋子・本間さと・本間研一 *Per1-luc* oscillations and localizations of neuropeptides in the suprachiasmatic nucleus. 第14回日本時間生物学会学術大会 (東京 京王プラザホテル 2007.11)
- [図書] (計3件)
- ① Honma S., Yoshikawa T., Nishide S.-H., Ono D., Honma K. -I. In: *Molecular Imaging for Integrated Medical Therapy and Drug Development* (Tamai N., Kuge Y. Eds.) Bioluminescent imaging for assessing heterogeneous cell function in the mammalian central circadian clock. Springer pp.189-196 (2009)
- ② 吉川朋子・本間さと 視交叉上核と光周性 海老原史樹文 (編) 光周性の分子生物学 シュプリンガー・ジャパン pp.159-168 (2009)
- ③ Yoshikawa T., Iigo M., Okano T., Fukada Y. Roles of melatonin in

photoperiodic gonadal response of
birds. In: *Experimental
Endocrinology and Reproductive
Biology* (Haldar C., Singaravel M.,
Pandi-Perumal S.R., Cardinali D.P.
Eds.) Science Publishers pp.85-102
(2008)

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・電気通信学部・助教

研究者番号：50361829

(H21)

(3) 連携研究者