

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12341

研究課題名(和文) アミノ酸栄養と運動による総合的な体内時計調整への挑戦

研究課題名(英文) Coordination of circadian clock by amino acids and exercise

研究代表者

安尾 しのぶ (Yasuo, Shinobu)

九州大学・農学研究院・准教授

研究者番号：30574719

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：不規則な明暗周期による概日時計の乱れはがんや肥満などの発症リスクを高める。本研究では、我々がこれまでに同定してきた概日時計調節アミノ酸を用いて、慢性的時差ぼけマウスにおける情動変化の予防効果や、時計遺伝子発現に対する負の影響を明らかにした。また、不規則な明暗周期と高脂肪食との関連や、運動負荷による情動改善効果などを解明した。本研究により、アミノ酸栄養・食生活・運動習慣という複合的な側面から、概日時計の攪乱予防・改善が可能であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Disruption of the circadian clock by irregular illumination causes many diseases, including obesity and cancer. Previously, we identified the functional amino acids that can modulate the circadian clock in mice. This study clarified that these amino acids can prevent the adverse effect of chronic jet lag on affective behaviors. However, they also had negative effects on the expression of clock genes in the liver. We also clarified the relationship between irregular illumination and high fat diet, as well as the effect of exercise on affective behaviors. These data suggest that the circadian disruption can be improved by multiple factors, including amino acids, diet, and exercise.

研究分野：動物生理学

キーワード：概日時計 アミノ酸 時計遺伝子 高脂肪食 運動

1. 研究開始当初の背景

近年、24時間営業や昼夜交替制勤務が増え、不規則な明暗周期による概日時計(体内時計)の乱れが深刻化している。概日時計の乱れはがんや肥満、うつ病を始めとする様々な疾病リスクを高めるため、早急な対策が必要である。

概日時計は栄養や食事リズムにより調節されるため、栄養学的な概日時計の改善が可能である。一方で、高脂肪食などの偏った食生活は、不規則な明暗周期による概日時計の乱れを助長する恐れがある。栄養療法と並行して、運動による概日時計の調節を利用すれば、栄養と運動の相加・相乗効果という新しい切り口から、概日時計の総合的な調整が期待される。

我々はこれまでに、マウスを用いて、概日時計を調節できるアミノ酸を同定してきた。これらのアミノ酸のうち、トリプトファンとロイシンは肝臓における *Per2* などの時計遺伝子を増加させる。*Per2* は抗がん作用に関わることから、これらのアミノ酸が概日時計の乱れによる発がんリスクを改善できる可能性がある。また、セリンは光による概日時計のリセットを強めるため、光との協調作用により概日時計の攪乱を予防・改善できる可能性がある。

本研究では、これらのアミノ酸を用いて、明暗周期を乱した慢性的時差ぼけ(CJL)マウスにおける概日時計の攪乱改善効果を解析した。さらに、高脂肪食とCJLとの関連や、運動負荷が脳機能および肥満関連因子グルコーストランスポーター4(*Glut4*)の発現に及ぼす影響を解析した。

2. 研究の目的

(1) トリプトファン、ロイシン、セリンの経口投与がCJLマウスにおける情動行動や肝臓における時計遺伝子・細胞周期関連遺伝子の発現に及ぼす影響を解明する。

(2) 不規則な明暗周期による概日時計の攪乱と高脂肪食との相互作用を解明する。

(3) 概日時計の振幅が弱まる短日条件において、運動負荷が情動行動に及ぼす影響や、*Glut4* の発現調節機構を解明する。

3. 研究の方法

(1) CBA/N マウス(雄、6週齢)を使用した。CJL処理は、明暗周期を2日ごとに8時間ずつ前進させる明暗条件を10-20日間継続して行った。処理を行う1週間前から、飲水を蒸留水あるいはトリプトファン、ロイシン、セリンのいずれかに変更し、CJLの間は飲水投与を継続した。オープンフィールド試験(OFT)で自発運動量・不安様行動を、また強制水泳試験(FST)でうつ様行動を解析した。恒暗条件に移した後、Circadian time (CT) 2, 10に肝臓を採取し、時計遺伝子(*Per2*, *Reb-erba*)

や細胞周期関連遺伝子(*Wee1*)の発現をqPCRにより解析した。

(2) CBA/N マウスを通常餌(MF)+12L12D群、MF+CJL群、高脂肪食(HFD)+12L12D群、CJL+HFD群に分けた。HFDあるいはMFを2週間給餌した後、CJL処理を10日間行った。恒暗条件に移し、CT2, 10, 18に肝臓を採取して時計遺伝子や細胞周期関連遺伝子の発現をqPCRにより解析した。

(3) C57BL/6J マウス(雄、6週齢)を短日条件(8L16D)で飼育した。トレッドミル走行(1日1時間、10m/分、5日/週)を3週間行い、情動行動を解析した。また、短日条件および長日条件(16L8D)のZeitgeber time (ZT) 1, 7, 15に腓腹筋を採取し、*Glut4* の mRNA 発現および GLUT4 タンパク質量を解析した。また、インスリン投与後に血糖値を測定してインスリン感受性を解析した。さらに、トレッドミル運動および回転輪運動の負荷が *Glut4* の発現に及ぼす影響を解析した。

4. 研究成果

(1) OFTにおいて、総移動距離(自発運動量)や中央滞在時間(不安様行動)にCJLやアミノ酸の有意な影響は認められなかった。FSTにおいて、CJLにより無動時間が有意に低くなり($P=0.0156$)、躁様行動の増加が示唆された(図1)。この変化は、セリンやロイシンを摂取したマウスでは見られなかった(図1)。以上の結果から、セリンやロイシンには、概日時計の攪乱による情動変化を防止する効果があることが示唆される。

肝臓における *Per2* や *Wee1* の発現はCJLにより少し抑制される程度であったが、トリプトファンやロイシンの投与によりその抑制が強くなった(図2)。*Reb-erba* の発現はCJL処理でわずかに発現の日内変動が増加し、その増加はトリプトファンやロイシンの摂取で大きくなった。

以上より、慢性的に単一のアミノ酸を摂取することで、CJLによる情動変化は改善できるが、肝臓における時計遺伝子の発現には負の影響が生じることが示唆された。

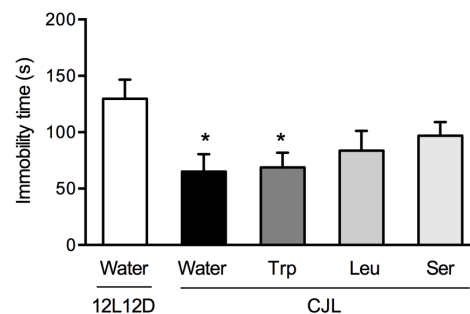


図1. CJL処理およびアミノ酸の飲水投与がマウスのうつ様行動に及ぼす影響。* $P<0.05$, Dunnett test

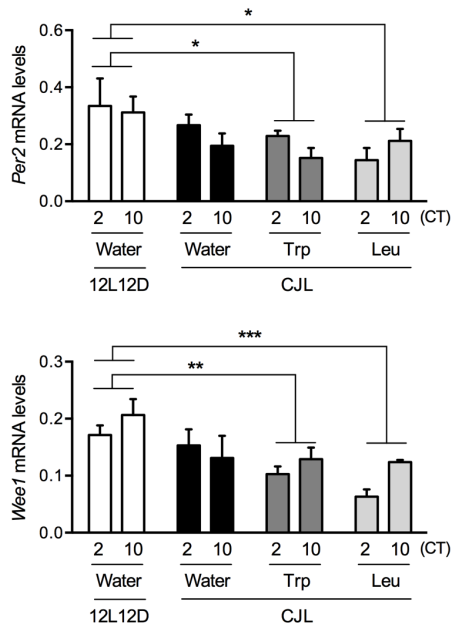


図 2. CJL 処理およびアミノ酸の飲水投与がマウスの肝臓における遺伝子発現に及ぼす影響。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.0001$, Dunnett test

(2) 次に、近年における食の欧米化を考慮して、HFD 食と CJL 処理の相互作用を解析した。HFD 食、CJL 処理ともに体重増加を促進したが (HFD: $P < 0.0001$, CJL: $P = 0.0057$, two-way ANOVA)、二つの処理間に交互作用は見られなかった (図 3)。

通常食 (MF) を給餌したマウスでは、CJL 処理により肝臓における *Rev-erba* の発現のピークが増加した (図 4)。一方、HFD を給餌したマウスでは、*Rev-erba* 発現の日内リズムが変化した (図 4)。肝臓における *Wee1* の発現については、MF 給餌群で CJL により発現リズムが消失するとともに全体のレベルが低下した (図 4)。一方、HFD 給餌群では発現リズムの消失が見られたものの、全体のレベルは維持されていた (図 4)。

以上より、CFJL 処理が肝臓の時計遺伝子や細胞周期関連遺伝子の発現に及ぼす影響は、通常食の場合と高脂肪食の場合とで異なることが示唆される。この原因として、高脂肪食自体が概日時計を乱す要因となり、CJL の攪乱効果を修飾したと考えられる。

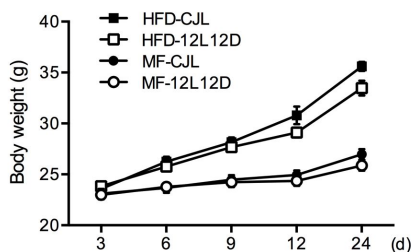


図 3. HFD および CJL 処理がマウスの体重に及ぼす影響

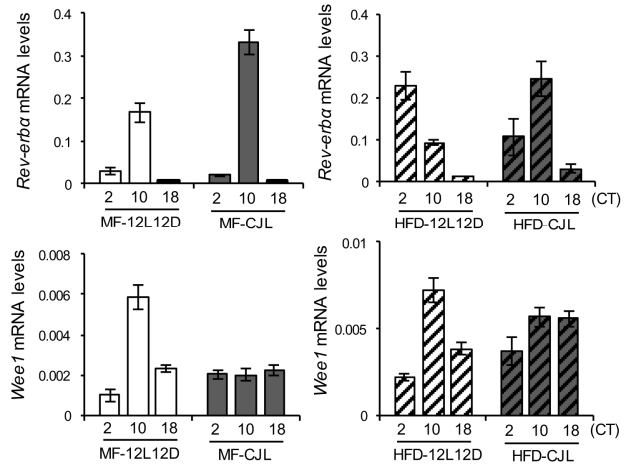


図 4. HFD および CJL 処理がマウスの肝臓における時計遺伝子および細胞周期関連遺伝子の発現に及ぼす影響

(3) トレッドミル運動を負荷したマウスでは、OFT における総移動距離や中央侵入回数は変化しなかった。FST において、初回無動までの時間が運動負荷群で長くなる傾向が見られ ($P = 0.0586$, t -test)、短日条件におけるうつ様行動の改善が示唆された。

腓腹筋における *Glut4* の発現や GLUT4 のタンパク質量は、短日条件において長日条件に比べて低かった (*Glut4*: $P = 0.0384$, two-way ANOVA; GLUT4: $P = 0.0093$, t -test, 図 5)。また、短日条件のマウスでは、インスリン抵抗性も確認された。*Glut4* の発現変化と活動量の関連を探るため、ホームケージにおける活動量を解析したところ、短日条件では長日条件より少なかった。このことから、*Glut4* の発現変化は活動量の変化を介して生じた可能性がある。この可能性を検証するため、運動負荷が *Glut4* の発現に及ぼす影響を解析した。しかし、トレッドミル運動や回転輸運動の負荷により *Glut4* の発現は影響を受けなかった。以上より、*Glut4* の発現変化は、運動による経路とは独立して日長の影響を受けることが示唆された。

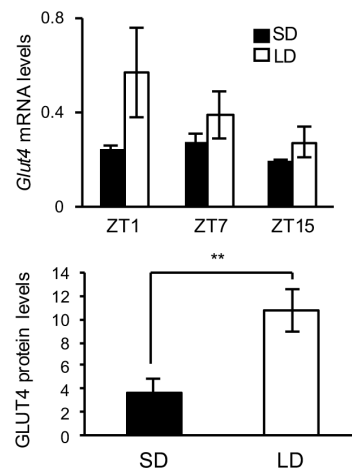


図 5. 長日条件 (LD) および短日条件 (SD) におけるマウスの腓腹筋における *Glut4* 発現および GLUT4 タンパク質量。** $P < 0.01$, t -test

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4件)

Tashiro, A., Shibata, S., Takai, Y., Uchiwa, T., Furuse, M., Yasuo, S. Changes in photoperiod alter Glut4 expression in skeletal muscle of C57BL/6J mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 485:82-88, 2017, 査読有
10.1016/j.bbrc.2017.02.023.

Uchiwa, T., Takai, Y., Tashiro, A., Furuse, M., Yasuo, S. Exposure of C57BL/6J mice to long photoperiod during early life stages increases body weight and alters plasma metabolomic profiles in adulthood. *Physiological Reports*, 4: e12974, 2016, 査読有
10.14814/phy2.12974.

Otsuka, T., Goda, R., Iwamoto, A., Kawai, M., Shibata, S., Oka, Y., Mizunoya, Y., Furuse, M., Yasuo, S. Dietary protein ingested before and during short photoperiods makes an impact on affect-related behaviours and plasma composition of amino acids in mice. *British Journal of Nutrition*, 114:1734-1743, 2015, 査読有
10.1017/S0007114515003396.

Kawai, M., Goda, R., Otsuka, T., Iwamoto, A., Uotsu, N., Furuse, M., Yasuo, S. Antidepressant-like effect of bright light is potentiated by L-serine administration in a mouse model of seasonal affective disorder. *Brain Research Bulletin*, 118:25-33, 2015, 査読有
10.1016/j.brainresbull.2015.08.010.

〔学会発表〕(計20件)

安尾しのぶ、田代絢子、高井佑輔. 動物の季節リズム研究における応用と代替法の可能性. 第29回日本動物実験代替法学会、2016年11月17日、九州大学(福岡市)

田代絢子、高井佑輔、打和龍宏、清水宣明、田中廣壽、古瀬充宏、安尾しのぶ. うつ様行動の光周性反応に及ぼす骨格筋グルココルチコイド受容体の影響. 第23回日本時間生物学会学術大会、2016年11月12日、名古屋大学(名古屋市)

打和龍宏、高井佑輔、田代絢子、柴田里

美、古瀬充宏、安尾しのぶ. 哺乳期の日長は成熟後の体重や代謝に影響を与える. 第23回日本時間生物学会学術大会、2016年11月12日、名古屋大学(名古屋市)

安尾しのぶ. オルニチンの時間栄養学～ホルモンリズム調節の観点から～, 第2回シトルリン・オルニチン研究懇談会、2016年9月30日、大手町サンスカイルーム(東京都千代田区)

安尾しのぶ. 体内時計の調節因子としてのアミノ酸および香り成分. 第14回果実酒・果実飲料と健康に関する研究会、2016年9月22日、和歌山医科大学(和歌山市)

打和龍宏、高井佑輔、田代絢子、柴田里美、古瀬充宏、安尾しのぶ. 哺乳期の日長は成熟後のマウスの体重や血漿・骨格筋メタボロームに影響を及ぼす. 第3回時間栄養科学研究会、2016年8月26日、東京農業大学(東京都世田谷区)

田代絢子、高井佑輔、打和龍宏、清水宣明、田中廣壽、古瀬充宏、安尾しのぶ. うつ様行動の光周性における骨格筋グルココルチコイド受容体の役割. 第3回時間栄養科学研究会、2016年8月26日、東京農業大学(東京都世田谷区)

Tashiro, A., Goda, T., Shibata, S., Takai, Y., Otsuka, T., Uchiwa, T., Furuse, M., Yasuo, S. The role of skeletal muscle glucocorticoid receptors in photoperiodic response of depression-like behaviors. 17th AAAP Animal Science Congress, 2016年8月23日、九州産業大学(福岡市)

Uchiwa, T., Takai, Y., Tashiro, A., Shibata, S., Furuse, M., Yasuo, S. Effect of postnatal photoperiod on body weight and metabolomics profiles in skeletal muscle and plasma in mice. 17th AAAP Animal Science Congress, 2016年8月23日、九州産業大学(福岡市)

Takai, Y., Kawai, M., Ogo, T., Ichinose, T., Furuya, S., Udo, H., Furuse, M., Yasuo, S. Effect of photoperiod during perinatal period on neurogenesis and stress-related behaviors in mice. 17th AAAP Animal Science Congress, 2016年8月23日、九州産業大学(福岡市)

安尾しのぶ、樋口重和、魚津伸夫、垂水千恵、雄長誠. アミノ酸栄養による体内時計の調節とヒトへの応用展開. 第70回栄養・食料学会大会、2016年5月15日、武庫川女子大学(神戸市)

Takai, Y., Kawai, M., Ogo, T., Ichinose, T., Furuya, S., Udo, H., Furuse, M., Yasuo, S. Effect of perinatal photoperiod on neurogenesis and affective behaviors in mice, 64th NIBB Conference "Evolution of Seasonal Timers", 2016年4月22日、岡崎コンファレンスセンター(岡崎市)

高井佑輔、池田裕美、有働洋、古瀬充宏、安尾しのぶ。幼若期における短日条件がマウスの神経新生・分化に及ぼす影響。日本畜産学会第121回大会、2016年3月29日、日本獣医生命科学大学(武蔵野市)

打和龍宏、高井佑輔、田代絢子、柴田里美、古瀬充宏、安尾しのぶ。若齢期の日長がマウスの成長や代謝に及ぼす影響。日本畜産学会第121回大会、2016年3月29日、日本獣医生命科学大学(武蔵野市)

安尾しのぶ。動物モデルを用いた季節性感情障害の解析と改善法の探索。第18回日本補完代替医療学会学術集会、2015年11月28日、石川県文教会館(金沢市)

高井佑輔、河井美里、市瀬嵩志、古屋茂樹、有働洋、古瀬充宏、安尾しのぶ。初期成長期における日長が情動行動や神経新生に及ぼす影響。第22回日本時間生物学会学術大会、2015年11月21日、東京大学(東京都文京区)

田代絢子、五田亮世、柴田里美、高井佑輔、大塚剛司、古瀬充宏、安尾しのぶ。情動の光周性における骨格筋グルココルチコイド受容体の役割。第22回日本時間生物学会学術大会、2015年11月21日、東京大学(東京都文京区)

高井佑輔、河井美里、小河匡、池田裕美、市瀬嵩志、古屋茂樹、有働洋、古瀬充宏、安尾しのぶ。幼若期の日長は情動行動・神経新生・脳内遊離アミノ酸組成に影響を及ぼす。日本アミノ酸学会第9回学術大会、2015年10月23日、滋賀県立大学(彦根市)

田代絢子、柴田里美、高井佑輔、大塚剛司、五田亮世、古瀬充宏、安尾しのぶ。骨格筋におけるグルココルチコイド関連遺伝子やグルコース輸送体の発現に及ぼす日長の影響。第2回時間栄養科学研究会、2015年9月2日、早稲田大学国際会議場(東京都新宿区)

Otsuka, T., Goda, R., Iwamoto, A., Kawai, M., Shibata, S., Oka, Y., Mizunoya, W., Furuse, M., Yasuo, S. Affect-related behaviors and plasma composition of amino acids in mice under short day were modified

by dietary proteins., The 12th Asian Congress of Nutrition, 2015年5月16日、パシフィコ横浜(横浜市)

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.agr.kyushu-u.ac.jp/lab/lrmb>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安尾 しのぶ (YASUO, Shinobu)
九州大学・大学院農学研究院・准教授
研究者番号: 30574719