

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：30109

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05951

研究課題名（和文）時計遺伝子による分娩発来の制御機序の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the involvement of the circadian genes on onset of parturition

研究代表者

天野 朋子（Amano, Tomoko）

酪農学園大学・農食環境学群・教授

研究者番号：60388585

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では分娩のタイミングの人為的制御による動物生産の効率化やヒトの早産/遅産の防止に資するため、分娩のタイミングを制御する要因についてマウスを用い検討を行った。当初は睡眠など、生体のリズム的な生理の変化を司る時計遺伝子を要因と目した。しかし本研究の結果から、時計遺伝子よりも分娩直前の照明の条件（環境の明暗）が分娩のタイミングに關与することが明らかとなり、照明の条件による分娩のタイミングの制御の可能性を示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では哺乳類であるマウスにて分娩直前の照明の条件（環境の明暗）が分娩のタイミングに關与することが明らかとなった。このことから畜舎の照明の管理により、家畜の分娩のタイミングを管理者に都合のよい時間に集中させるなどの技術開発が想定され、動物生産の効率化が見込める。またヒトの分娩のタイミングの正常化への応用も想定され、早産/遅産の防止などにも役立つ可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the factors that regulate the birth timing in mice in order to contribute to the animal production and the prevention of preterm birth in humans by developing a technique to regulate the birth timing. We firstly assumed that the circadian clock genes that are known to control the rhythmic physiological phenomena such as sleep as the main factor. However, our results demonstrated that the lighting condition (environmental light and darkness) immediately before delivery is more involved in the birth timing than the circadian clock genes, suggesting the possibility of controlling the birth timing by the lighting condition.

研究分野：動物遺伝学

キーワード：分娩のタイミング マウス 環境の明度

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

時計遺伝子の発現量は1日の明暗(昼と夜)に従って増減し、睡眠のように特定の時刻に起こる現象を発生させる。一方、哺乳類の雌性生殖には分娩を始め、特定の時期や時刻に起きる現象が多く、時計遺伝子の関与が想定される。最近我々は、時計遺伝子の機能を失った雌マウスは正常に妊娠し、胎仔の発育にも問題はないが、分娩が遅れる傾向があることを見出し、さらに出産の予定日を過ぎても分娩しない個体も多いことを確認した。このことは時計遺伝子が適期の分娩発生を促し、母子の健康に関わる可能性を示す。

そこで本研究ではマウスにて分娩発生に関わるホルモンのうち、時計遺伝子に合成が制御されるものの同定、分娩発生時の子宮にて、時計遺伝子に制御される遺伝子の特定の2つを行い、分娩発生の制御機序を解明することを当初の目的とした。本研究から得られる知見は、動物生産では動物群の分娩のタイミングを集中させ、分娩看護の省力化を図る技術の開発に貢献するほか、ヒトの出産のタイミングを正常化させることにより、早産などの低減にもつながる。

2. 研究の目的

我々はこれまでに時計遺伝子のひとつ(*Clock*)の機能のないマウス(*Clock* ホモ変異マウス)の繁殖能の調査を行い、妊娠した *Clock* ホモ変異マウスでは、分娩が集中して起こる交尾後 18-19 日目を越えても分娩兆候(巣作り行動など、分娩に先立つ特徴的行動の発現)が弱く、野生型マウスに比べ、分娩が遅延する傾向を認めた(Amano *et al.*, 2016)。時計遺伝子は全発現遺伝子の約 1/10 を制御する上位の転写制御因子であり、様々な遺伝子(実働因子)に働きかけ、分娩を発生させると想定される。そこで本研究では分娩発生に関わるホルモンのうち、時計遺伝子に合成が制御されるものの同定、分娩発生時の子宮にて時計遺伝子に制御される遺伝子の特定を行い、時計遺伝子による分娩発生の制御機序を解明することを当初の目的とした。

3. 研究の方法

実験1: 時計遺伝子には複数の遺伝子があり、そのうち *Per1* と *Per2* の2つを欠いた系統は、他の時計遺伝子を欠いた系統に比べ睡眠などのリズム的現象の消失が強く、時計遺伝子の機能のないモデルマウスとして多用される。そのため本研究では *Per1* と *Per2* の両方をホモに欠損したマウス(以下 double K0 マウス)を用い、妊娠期間の長さ(出産のタイミング)を野生型マウスと比較した。具体的には野生型マウスの雌雄 27 つかい、及び double K0 マウスの雌雄 28 つかいの交配を行い、それぞれから得られる妊娠マウスの妊娠期間(交尾後、膈に形成される膈栓を確認した時点から最初の仔の娩出が開始した時点まで)を調査、比較した。このとき照明の点灯や消灯のリズムが分娩の発生に影響しないよう、出産直前の妊娠 17.5 日目以降は消灯した条件にて妊娠マウスを飼育した。

実験2: 実験1の結果、当初の予測と異なり野生型マウスと double K0 マウスの妊娠期間に差は認められず、時計遺伝子の分娩発生への関与は薄いことが示唆された(野生型マウス: 19.9 ± 0.1 日, double K0 マウス: 20.3 ± 0.1 日, 表1及び図1)。通常マウスは妊娠 19 日目の前半に分娩が集中する傾向があるが、本データでは野生型マウスの分娩が 19.9 ± 0.1 日と遅れており、照明の条件(D/D)が分娩開始のタイミングに関与した可能性があった。そこで本研究では照明の条件が分娩開始に与える影響について野生型マウスについて詳細に検討を行った。照明の条件は、終日点灯(L/L)、12時間の点灯と12時間の消灯の繰り返し(L/D)、終日消灯(D/D)の3条件とした。

実験3: 実験2にて各照明条件で飼育した妊娠マウスにつき、照明と分娩発生とをつなぐ機序を推察するため、分娩発生の際に低下するプロゲステロンの血中濃度を測定、比較した。

実験4: 照明の変更による分娩発生時期の制御を行う技術を確立する上で、妊娠中の照明条件の変更が胎仔の健康に与える影響を考慮する必要がある。そこで本実験では、実験2の各照明の条件で飼育した妊娠マウスに由来する新生仔の数や体重を比較した。

4. 研究成果

当初の期待と異なり野生型マウスと double K0 マウスの妊娠期間に差は認められず、時計遺伝子の分娩発生への関与が薄いことが示唆された(野生型マウス: 19.9 ± 0.1 日, double K0 マウス: 20.3 ± 0.1 日, 表1と図1)。通常マウスは妊娠 19 日目の前半に分娩が集中する傾向があり、本データでは野生型マウスの分娩も遅れていた。この検討では点灯と消灯(昼と夜)の繰り返しが生産に与える影響を除くため D/D で検討を行っており、その影響で野生型マウスの分娩が遅れた可能性が考えられた。そこで照明の条件が分娩発生に与える影響を調べるため、妊娠した野生型マウスを妊娠 17.5 日目以降 L/L、L/D、D/D で飼育し、分娩発生のタイミングへの影響を確認した。その結果、L/L、L/D、D/D の妊娠期間はそれぞれ 19.5 ± 0.1 日、 19.3 ± 0.1 日、 19.9 ± 0.1 日となり、D/D で顕著に分娩のタイミングが遅れていた(表1及び図1、 $P < 0.05$)。本結果は妊娠後期の照明の条件が分娩のタイミングを制御することを示すものであり、分娩発生

機序の一端が解明されるとともに、妊娠後期の照明の管理による家畜の分娩開始時期の人為的変更や、ヒトの分娩のタイミングの正常化などの技術開発の可能性が示された。

分娩を発生させる要因のひとつとして、母体の卵巣にて黄体が退行し、血中プロゲステロン濃度が下がることが知られている。そこで本研究では L/D と D/D の処理区の野生型妊娠マウスについて、照明条件の変更から 1 日後の血中プロゲステロン濃度を確認した。その結果、L/D 処理区の平均プロゲステロン濃度は $42.8 \pm 7.2 \text{ ng/ml}$ であったが、D/D は $65.3 \pm 4.2 \text{ ng/ml}$ となり、D/D では血中プロゲステロン濃度の減少が有意に遅れることが明らかとなった(図 2)。このことから、妊娠後期の照明条件が黄体退行を制御し、これが分娩のタイミングに関わることが示され、照明による分娩発生制御の一端が明らかとなった。

一方で、妊娠した動物を照明の条件を変更して飼育した場合、胎子の発育や健康に影響する可能性がある。そこで本研究では各照明条件にて飼育された野生型の妊娠マウスから得られた新生子につき、その数と体重を計測し、それぞれ比較した。その結果、L/L, L/D, D/D の各処理区間にて一産あたりの仔の数に差はなかったが、一匹の仔あたりの平均体重は $1.3 \pm 0.01 \text{ g}$, $1.4 \pm 0.01 \text{ g}$, $1.4 \pm 0.01 \text{ g}$ となり、L/L から得られた仔の体重が他の処理に比べ顕著に軽かった(表 1, $P < 0.05$)。このことは妊娠後期の長い照明時間が胎子の発育に影響を及ぼすことを示唆した。

< 以下図表 >

表 1 分娩直前(妊娠 17.5 日)から終日点灯(L/L)、12 時間毎の点灯と消灯の繰り返し(L/D)、終日消灯(D/D)として飼育した野生型マウスの妊娠期間

	野生型 L/L	野生型 L/D	野生型 D/D	double KO D/D
供試個体数	27	27	28	28
分娩個体数/交尾個体数 [%]	27 (100.0)	27 (100.0)	28 (100.0)	28 (100.0)
妊娠期間(交尾から分娩開始までの日数 ± SEM)	19.5 ± 0.1^{ab}	19.3 ± 0.1^a	19.9 ± 0.1^b	20.3 ± 0.1^c
娩出された仔の総数	202	211	220	213
1産あたりの平均の仔の数 ± SEM	7.5 ± 0.5	7.8 ± 0.3	7.9 ± 0.4	7.6 ± 0.4
1匹の仔の平均の体重(g ± SEM, 娩出直後に測定)	1.3 ± 0.01^a	1.4 ± 0.01^b	1.4 ± 0.01^b	1.4 ± 0.01^b

図 1 分娩直前(妊娠 17.5 日)から終日点灯(L/L)、12 時間毎の点灯と消灯の繰り返し(L/D)、終日消灯(D/D)として飼育した野生型マウスの分娩開始時間の推移

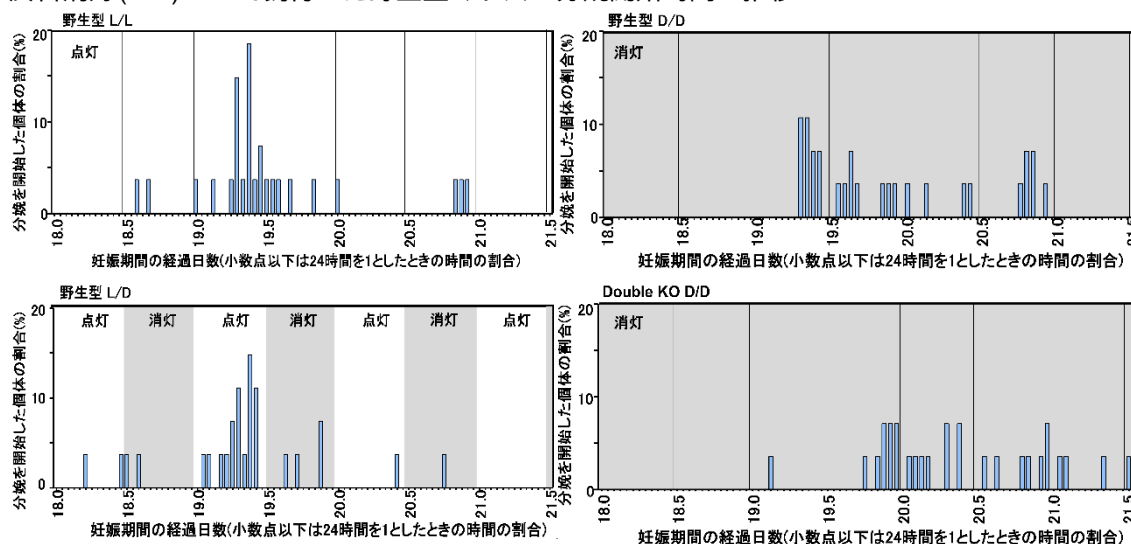
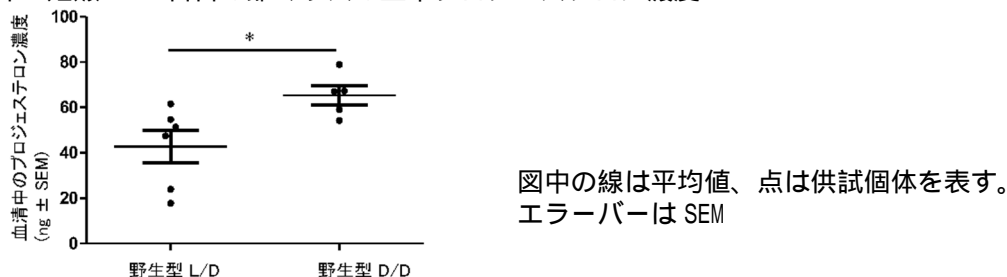


図 2 妊娠 18.5 日目の雌マウスの血中プロゲステロン濃度



図中の線は平均値、点は供試個体を表す。
エラーバーは SEM

< 引用文献 >

Amano T, Anzai M, Matsumoto K. The Clock mutation reduces reproductive performance of mice by affecting the implantation capacity: Maternal Clock mutation is not the only factor affecting implantation. Theriogenology, 86: 1670-1684. 2016.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Amano Tomoko, Ripperger Juergen A, Albrecht Urs	4. 巻 154
2. 論文標題 Changing the light schedule in late pregnancy alters birth timing in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Theriogenology	6. 最初と最後の頁 212 ~ 222
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.theriogenology.2020.05.032	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 天野 朋子
2. 発表標題 照明のスケジュールと概日時計がマウスの分娩のタイミングに与える影響：恒暗は分娩のタイミングに影響する
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会（国際学会）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------