

研究種目：若手研究（スタートアップ）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19890002
 研究課題名（和文） 生物発光イメージングによる発達期時計遺伝子発現リズム解析
 —非光同調臨界期の探索
 研究課題名（英文） Bioluminescent imaging of clock genes expression rhythm in
 developmental stage of mammals - The critical period of non-photic entrainment
 研究代表者 西出 真也 (NISHIDE SHINYA)
 北海道大学・大学院医学研究科・助教
 研究者番号：40451398

研究成果の概要：発達期マウスのリズム中枢（視床下部視交叉上核）における時計遺伝子発現リズムは、非光刺激により位相依存的に位相変位するのに対し、成獣マウス視交叉上核においては大きな位相反応はみられないことが示された。この結果は、成熟期においては主要なリズム調節因子は光刺激であるのに対し、幼弱期には母親からの非光シグナルの影響が大きいという生物時計の調節機構の違いを反映しているものと考えられる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,320,000	0	1,320,000
2008年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,670,000	405,000	3,075,000

研究分野：環境生理学

科研費の分科・細目：医歯薬学・環境生理学（含体力医学・栄養生理学）

キーワード：生体リズム、生後発達、遺伝子発現、分子イメージング

1. 研究開始当初の背景

哺乳類における生物時計の中枢は視床下部視交叉上核（SCN）に存在し、SCNは外界の明暗周期への同調及び全身に存在する末梢時計の統合を司ると考えられてきた。成獣においては光が生物時計機構に対する主たる同調因子であり、社会的刺激や周期的な食餌といった非光因子による生物時計機構の同調はほとんどみられない。SCNにおける約24時間周期の振動は胎生期にすでに開始しており、母親のリズムに同調したリズムが観察されているが、母親からの同調シグナルや同調のメカニズムは未だ不明である。母親からのシグナルは胎生期のみならず、新生児期にお

いても同調因子として作用し、母親の保育条件を変えることにより仔の時計遺伝子発現リズムが変化することが示されている。非光刺激への同調は成長発達と共に次第に減弱し、光同調に置き換わる。一方、発達期における末梢組織のリズムはほとんど明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

本研究は、幼若期における生物時計機構の発達を分析・比較検討することを目的として行われた。

(1) SCN 内生物時計の非光刺激に対する同調様式、及び末梢組織のリズムの生後発達による変化を、生物発光レポーターを導入したトランスジェニックマウスやラットを用いて、時計遺伝子発現リズムをリアルタイムで測定することにより検討する。生物発光は蛍光に比べて、細胞障害性が低いため長期間の連続測定が可能であり、かつ定量性の良い、優れたシステムである。時計遺伝子発現をホタルルシフェラーゼによりレポートするトランスジェニック動物を用いて SCN 及び末梢各組織の時計遺伝子 *Per2*, *Bmal1* 発現リズムの解析を行う。

(2) 新生児および成獣マウスの培養 SCN 組織に対して様々な位相において刺激を与え、その位相変位量を計測し、位相反応曲線を作成する。新生児マウス SCN は母親由来の同調因子に対して、そのグルコース代謝リズム (Reppert & Schwartz, Science, 1983) や遺伝子発現リズム (Ohta *et al.*, Eur. J. Neurosci., 2003) の位相が大きく変位しうることが示されているが、本実験では、哺乳類リズム中枢の位相反応性に発達段階による差が認められるか否かを検証する目的で行った。

(3) 近年の発光レポーターを用いた時計遺伝子発現リズムの解析結果 (Yoo *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2004; Nishide *et al.*, Genes Cells, 2006) から、末梢組織のリズムは SCN によって駆動されるのではなく、各々自律的に振動する能力をもち、SCN の役割は末梢各組織のリズムを同調させることにあると考えられるようになった。また、妊娠中の母親の食餌を特定の時刻に制限することによる仔のリズムの変化 (Honma *et al.*, Am. J. Physiol., 1987) や成獣における食餌性の末梢組織リズムの変化 (Stokkan *et al.*, Science, 2001) が報告されており、SCN を介さない同調機構の存在が考えられている。そこで本研究では、母子同調や食餌性同調等の外的因子が末梢組織リズムの発達に及ぼす影響を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 時計遺伝子 *Bmal1* 発現をモニターするマウス (*Bmal1-luc* マウス、Nishide *et al.*, Genes Cells, 2006) および *Per2* 発現をモニターするラット (*Per2-luc* ラット) から脳および末梢臓器を摘出し、スライス切片を作成、ルシフェリンを含有した液体培地を用いて、3.5 mm ペトリディッシュ内で培養した。組織からの発光をディッシュ型ルミノメータ (ATTO Kronos) を用いて 10 分間隔で測定した。

(2) 生後 6 日目 (新生児) 及び 8 ~ 12 週齢 (成獣) マウス SCN の *Bmal1* 発現リズムを連続モニタリングし、様々な位相において培地交換による刺激を行った。刺激前後の *Bmal1* ピーク位相から位相変位量を計算し、位相反応曲線を作成、新生児と成獣を比較した。また、新生児期におけるリズム周期および振幅を培養開始直後のデータから求め、成獣と比較した。

(3) 発達期の末梢組織リズムの検討には、胎児および交配の 21 日後に正常分娩により出生した *Per2-luc* ラットを用いた。仔ラットは胎生 20 日目、生後 5、12、19、26、33 日目に断頭し、SCN、肺、肝臓、腎臓の切片を作成して培養、*Per2* 発現リズムを測定した。各発達段階におけるピーク位相、周期、振幅を解析し、比較した。

4. 研究成果

(1) 成獣および新生児マウス培養 SCN における *Bmal1-luc* 活性には明瞭な概日リズムが観察された。両者のピーク位相に差はみられなかったが、新生児 SCN の *Bmal1* リズム周期は成獣に比べて有意に短かった。また、新生児 SCN のリズム振幅は有意に小さかった。培地交換刺激により、成獣 SCN、新生児 SCN ともに生物発光活性は一過性の上昇を示し、その後振動は再開した (図 1)。

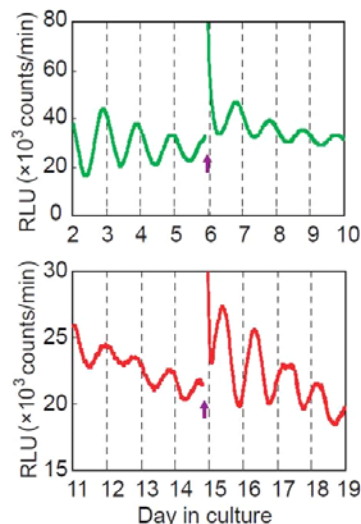


図 1
成獣 (緑) および新生児 (赤) の *Bmal1-luc* リズムの培地交換刺激への反応
矢印は培地交換を行った時刻を表す。

(2) 図 2 に *Bmal1-luc* リズムの培地交換刺激による位相反応の成獣及び新生児 SCN にお

ける差を示す。成獣に対する培地交換刺激はリズム位相の変位を引き起こさなかったのに対し、新生児 SCN は同じ刺激に対し、大きく位相が変位した。次に、刺激に対する位相反応の位相依存性を調べるために、様々な位相において培地交換を行った (図 3)。その結果、成獣 SCN と新生児 SCN は位相依存的な位相反応を示し、両者の間には有意な位相反応性の差が認められた。新生児 SCN は、主観的暗期の半ば付近における培地交換に対し大きな位相前進を示し、主観的暗期の初めの刺激に対しては位相後退を示した。一方、成獣 SCN は主観的明期の初めの刺激に対し有意な位相前進を示したものの、いずれの位相においても大きな位相変位は認められなかった。

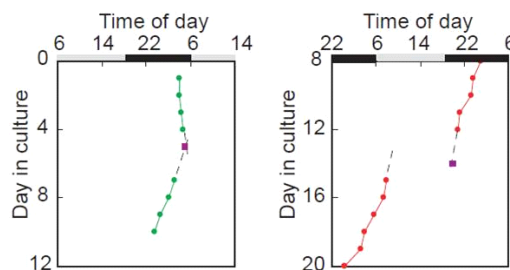


図 2 成獣 (緑) および新生児 (赤) のリズムの培地交換刺激に対する反応 縦軸は時刻、灰と黒のバーはそれぞれ主観的明期と暗期、横軸は培養日数を示す。丸は *Bmal1* ピーク位相、四角は培地交換を行った時刻を表す。新生児において大きな位相の変化が見られた。

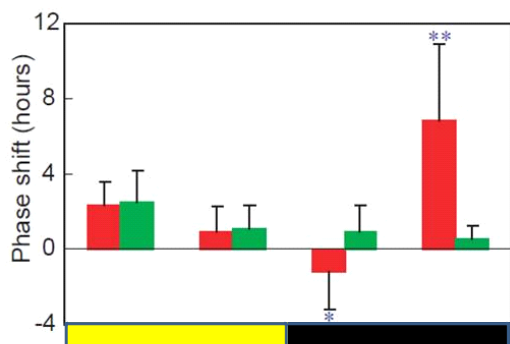


図 3 成獣 (緑) および新生児 (赤) の培地交換刺激による位相変位量 縦軸の正の値は位相前進、負の値は位相後退を示す。横軸は刺激を与えた位相を、黄 (主観的明期) と黒 (主観的暗期) のバーで示している。

(3) 前項で示した位相反応の誘因として、数日間培養した培地と新しい培地の化学組成の差による化学的要因と、培地交換時の温度変化や振動などの物理的要因が考えられる。新生児において主観的暗期の培地交換が大きな位相変位を引き起こす原因を検証するため、化学的要因を含まない物理刺激として、ディッシュから培地を取り出し、同じディッシュに戻す刺激を加えた。その結果、*Bmal1-luc* リズムの変位はみられず、培地交換による位相反応が化学的要因によるものであることが示唆された。

(4) ラットにおける *Per2-luc* リズムは、測定した全ての発達段階、臓器で明瞭な概日リズムを示した。過去に研究代表者が成獣 *Bmal1-luc* マウスを用いて得た結果 (Nishide *et al.*, 2006) と同様に、各臓器の *Per2* 発現は互いに異なる位相を示した。驚くべきことに、肺と腎臓は生後発達とともに *Per2* リズム位相が変化した (図 4)。胎生期における肺および腎臓の *Per2* ピーク位相は明期の初めに位置するが、発達とともに徐々に位相後退し、成獣においては暗期の初めにピークを示した。一方、SCN および肝臓の *Per2* 位相は胎生期から成獣にかけて変化を示さず、SCN の *Per2* ピークは主観的明期の後半、肝臓のピークは主観的暗期の半ばに存在した。この結果より、発達期の時計遺伝子発現の中枢・末梢各臓器間の位相関係は成獣と異なり、また発達とともに変化している可能性が示唆された。

(5) 以上の結果より、哺乳類の中枢・末梢組織における時計遺伝子発現のリズムは、出生前にすでに開始しており、リズム位相は生後発達とともに変化すること、及び臓器ごとに異なる変化をすることが示された。ラットやマウスはこの時期に母乳から固形食へと栄養摂取の形態が変化するため、末梢のリズムに対する食餌性の影響が考えられるが、メカニズムの解明にはさらなる研究が必要である。また、中枢である SCN においては、新生児と成獣では外的刺激に対する反応性が異なり、新生児培養 SCN は非光刺激である培地交換刺激に対し、大きな位相変位を示した。この結果は、新生児期においてのみ観察される母親のリズムへの同調のメカニズムを明らかにする上で重要な知見である。

(6) 本研究を通じ、新生児期においては生体リズムの中枢が外界の影響を受けやすいこと、末梢臓器のリズムが中枢以外の因子によって変化し得ることが示された。母親の生活リズムや照明など、子供を取り巻く環境は少なからずその発達に影響を与えていると思われる。核家族化の進行や長引く不況など、

子育て環境の悪化が懸念されているが、今後本研究の成果を広く社会や医療現場に還元していくとともに、生体リズムの発達機構をより詳細に解明していく予定である。

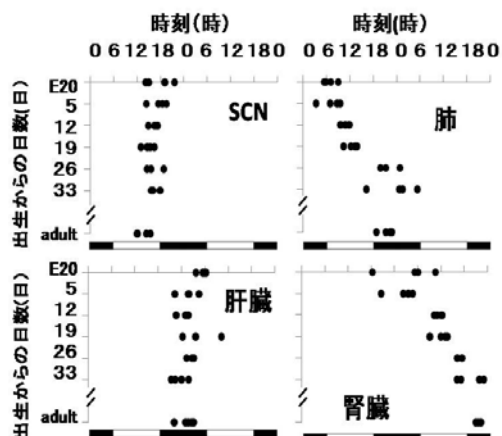


図4
ラットPer2ピーク位相の発達による変化
E20は胎生20日目を表す。グラフの下
のバーは、白が明期、黒が暗期を
表す。

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1件)

- ① Nishide, S., Honma, S., Honma, K., The circadian pacemaker in the cultured suprachiasmatic nucleus from pup mice is highly sensitive to external perturbation, *Eur. J. Neurosci.*, 27:2686-90, 2008 査読有

[学会発表] (計5件)

- ① 西出真也、本間さと、山田淑子、本間研一、マウス視交叉上核リズムに対するタンパク合成阻害剤の影響、第88回北海道医学大会生理系分科会、札幌(平成20年9月6日)
- ② Nishide, S., Honma, S., Honma, K., High responsiveness to medium exchange of the cultured suprachiasmatic nucleus in pup mice, Eleventh Meeting of the Society for Research on Biological Rhythms, Destin, USA (May17-21. 2008)
- ③ 西出真也、本間さと、山田淑子、本間研一、マウス視交叉上核における時計遺伝

子転写調節フィードバックループ阻害の影響、第85回日本生理学会大会、東京(平成20年3月25-27日)

- ④ Nishide, S., Honma, S., Honma, K., A phase response curve for non-photic stimuli in the cultured suprachiasmatic nuclei from developing mice, 2nd World Congress of Chronobiology, Tokyo (Nov4-6. 2007)
- ⑤ 西出真也、本間さと、本間研一、八若保孝、発達期マウス視交叉上核における時計遺伝子発現リズムの反応性、第45回日本小児歯科学会大会、東京(平成19年7月19-20日)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西出 真也 (NISHIDE SHINYA)

北海道大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：40451398

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし