

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650490

研究課題名(和文) 栄養の概日リズム調節特性を利用した光栄養療法の開発

研究課題名(英文) Light-nutritional treatment for circadian disruption using functional nutrition

研究代表者

古瀬 充宏 (FURUSE, Mitsuhiro)

九州大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：30209176

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：近年、24時間営業や交替制勤務等の増加により、人々を取り巻く明暗周期が不規則化している。不規則な照明条件は内因性の概日時計を攪乱させ、睡眠障害や肥満、糖尿病、高血圧、がんなどの発症リスクを高めることが明らかになりつつある。本研究では、マウスを用いて、活動リズムや時計遺伝子発現を調節できる幾つかのアミノ酸を同定し、概日時計に関連する疾病モデルマウスにおける改善効果を明らかにした。本研究により、概日時計の乱れをアミノ酸栄養により予防改善する道が開かれた。

研究成果の概要(英文)：Disruption of the circadian clock by irregular illumination in the modern world causes many diseases, including sleep disorders, obesity, diabetes, hypertension, and cancer. It is important to identify the nutritional factors that can modulate the properties of the circadian clock. This study identified the functional amino acids that can modulate the activity rhythm or expression of clock genes in the brain and peripheral organs. This study further confirmed the utility of these amino acids for clock-related diseases using animal models. These data highlight the importance of amino acid nutrition for the regulation of the circadian disruption.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学、食生活学

キーワード：生活リズム 概日時計 アミノ酸 栄養 時計遺伝子

1. 研究開始当初の背景

近年、24時間営業や夜更かし習慣、昼夜交替制勤務などが増加し、人々を取り巻く明暗サイクルが不規則になっている。ヒトを含む生物には、約24時間周期で刻まれる内因性の概日時計(体内時計)が備わっているが、不規則な明暗サイクルは概日時計を攪乱させ、睡眠障害や肥満、高血圧、糖尿病、がんなどの発症リスクを高めることが明らかになりつつある。このため、概日時計の乱れに対する対処策の開発が急務となっている。

概日時計は毎朝の光によりリセットされるほか、食事の時刻にも強い影響を受ける。しかし、食事に含まれる特定の栄養素が概日時計に及ぼす影響はあまり知られていない。概日時計の調節機能を持つ機能性栄養素を同定できれば、現代社会における概日時計の乱れやそれに起因する疾病に対して、栄養学的な改善法を講じることが可能となる。

本研究では、多様な生理機能を持つことが知られるアミノ酸栄養に着目し、マウスを用いて、概日時計調節機能をもつアミノ酸を探索した。また、同定されたアミノ酸の機能性を追求するため、概日時計に関連する疾病モデルマウスにおける改善効果を解析した。

2. 研究の目的

(1) 20種類のアミノ酸のうち、マウスの回転輪活動リズムの位相を変化させるアミノ酸、及び同リズムの光リセットを強めるアミノ酸を同定する。

(2) 20種類のアミノ酸のうち、概日時計の中核である視交叉上核や末梢時計である肝臓の時計遺伝子の発現に影響を及ぼすアミノ酸を同定する。

(3) 明暗周期を人為的に乱した慢性的時差ぼけマウスにおいて、視交叉上核や肝臓の時計遺伝子発現に見られる影響を解明する。また肝臓における細胞周期関連遺伝子発現に見られる影響を解明する。

(4) 概日時計が関連すると知られる季節性情感障害(冬季うつ病)には、高照度光療法が有効である。本研究で同定した光リセット増強アミノ酸により、光療法の効果増強を試みる。

3. 研究の方法

(1) CBA/N マウスの回転輪活動リズムをモニタリングし、恒暗条件の Circadian time (CT: 主観的時刻) 8 に 20 種類のアミノ酸 (5 mmol/kg) をそれぞれ単回経口投与した。各アミノ酸について、投与前後における位相変化量を解析した。同様に、CT14.75 に各アミノ酸を単回経口投与し、CT15 から光パルス (15 分間、300 lux) を照射して、光による位相変化量(光リセット)を解析した。

(2) CBA/N マウスを 12 時間明期 12 時間暗期で馴化後、Zeitgeber time (ZT) 3 に各アミノ酸を単回経口投与し、その 90 分後に脳と肝臓を採取して時計遺伝子の発現を解析した。

(3) CBA/N マウスを用いて、明暗周期を 2 日ごとに 8 時間ずつ前進させる慢性的時差ぼけ処理を 10 日間行った。その後、光による急性的な効果を排除するため恒暗条件に移し、3 日目の CT0, 6, 12, 18 に脳と肝臓を採取した。視交叉上核と肝臓における時計遺伝子の発現、及び肝臓における細胞周期関連遺伝子 (*c-Myc*: がん原遺伝子; *p53*: がん抑制遺伝子) の発現を解析した。また、慢性的時差ぼけ処理のホルモンシグナルとして、松果体ホルモンであるメラトニンと、副腎皮質ホルモンであるコルチコステロンに着目し、慢性的時差ぼけマウスにおける血漿ホルモン濃度と、肝臓における各ホルモンの受容体遺伝子の発現を解析した。

(4) C57BL/6J マウスを短日条件で飼育すると、長日条件のマウスに比べて強いうつ様行動を示す。これを季節性情感障害のモデルとして、光リセット増強アミノ酸である L-セリンが高照度光の抗うつ様効果を増強するかを解析した。

短日条件 (8 時間明期 16 時間暗期) のマウスに高照度光を毎日 1 時間ずつ照射すると同時に、光照射の 15 分前に L-セリン (5 mmol/kg) あるいは生理食塩水を皮下投与した。この処理を 2 週間継続した後、自発運動量をオープンフィールド試験 (OFT) にて、うつ様行動を強制水泳試験 (FST) にて解析した。脳を採取し、縫線核の切片を用いて、情動を制御するセロトニン (5-HT) および神経活性マーカーである *c-Fos* の免疫陽性細胞数の計測を行った。

4. 研究成果

(1) 20種類のアミノ酸のうち、L-スレオニン、L-アルギニン、及びL-グルタミン酸の投与により、回転輪活動リズムの位相が有意に後退した (L-スレオニン, $p < 0.01$; L-アルギニン, $p < 0.05$; L-グルタミン酸, $p < 0.05$, *t*-test, 表 1)。また、L-セリンの投与により、光リセットが有意に強められることが判明した ($p < 0.01$, *t*-test, 表 1)。

これらの解析により、概日時計調節アミノ酸と光リセット増強アミノ酸が同定された。

(2) 視交叉上核において、L-アルギニン及びL-グルタミン酸の投与で *Bmal1* の発現が低下し ($p < 0.05$, *t*-test)、L-プロリンの投与により *Per1* の発現が低下した ($p < 0.05$, *t*-test) (表 1)。 *Per2* の発現に影響を及ぼすアミノ酸は確認されなかった。

一方で、肝臓においては、L-トリプトファンや L-リジンを始め、12 種類のアミノ酸が様々な時計遺伝子の発現を変化させた (表 1)。

アミノ酸により発現が調節される遺伝子の種類や誘導/抑制の方向が異なっていたが、構造や代謝経路が似たアミノ酸に関しては、類似の反応性を示す傾向が見られた。

以上の結果から、アミノ酸栄養は視交叉上核の時計をわずかに動かす一方で、肝臓の時計に大きく影響を及ぼすことが解明された。

表 1. アミノ酸の経口投与が CBA/N マウスの回転輪活動リズム (CT8 に投与) やその光リセット (CT14.75 に投与後 CT15 に光パルス)、視交叉上核 (SCN) 及び肝臓の時計遺伝子発現に及ぼす影響

	Activity		SCN			Liver				
	CT15	CT8	<i>Per1</i>	<i>Per2</i>	<i>Bmal1</i>	<i>Per1</i>	<i>Per2</i>	<i>Bmal1</i>	<i>Cry1</i>	<i>Dbp</i>
Ser	**	-	-	-	-	↓↓	-	↑	↑↑	↓
Thr	-	**	-	-	-	↓↓	-	↑	↑↑	↓↓
Ala	-	-	-	-	-	↓	-	↑↑	↑↑	↓↓
Trp	-	-	-	-	-	-	↑↑	↑	↑↑	↓↓
Lys	-	-	-	-	-	-	↑↑	↑↑	↑↑	↓↓
Arg	-	*	-	-	↓	-	↑↑	↑	↑↑	↓
Leu	-	-	-	-	-	-	↑↑	↑↑	↑	↓↓
Met	-	-	-	-	-	-	↑↑	-	↑↑	↓
Cys	-	-	-	-	-	-	↑↑	-	↑↑	↓
Glu	-	*	-	-	↓	-	↑↑	-	↑↑	-
His	-	-	-	-	-	-	↑↑	↑	↑	-
Pro	-	-	↓	-	-	-	↑	↑↑	-	↓
Ile	-	-	-	-	-	↑	-	-	-	-
Gly	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Phe	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Val	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tyr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Asp	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Asn	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gln	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(t-test, *, ↑, ↓: p < 0.05; **, ↑↑, ↓↓: p < 0.01)

(3) 慢性的時差ぼけマウスでは、視交叉上核における時計遺伝子の発現リズムは継続していたが、その位相は対照群に比べて 5-9 時間程度後退していた (two-way ANOVA, interaction between treatment and time, *Per1*, *Per2*, *Bmal1*: p < 0.0001; *Cry1*: p < 0.001, 図 1)。

一方、肝臓においては、慢性的時差ぼけ処理により *Per1* や *Per2* の発現が上昇し、*Clock* の発現は逆に抑制された (two-way ANOVA, main effect of treatment, *Per1* and *Per2*: p < 0.01; *Clock*: p < 0.0001, 図 2)。さらに、肝臓における *c-Myc* および *p53* の発現が有意に上昇した (two-way ANOVA, main effect of treatment, *c-Myc*: p < 0.01; *p53*: p < 0.0001, 図 2)。*Per2* と *p53* の発現量には有意な相関が見られた (p < 0.01, r=0.54)。

血漿メラトニンおよびコルチコステロン濃度に慢性的時差ぼけ処理の有意な影響は見られなかった。メラトニン受容体 MT1 の肝臓における発現リズムが慢性的時差ぼけ処理により消失し、グルココルチコイド受容体 GR の発現量が減少した (two-way ANOVA, main effect of treatment, p < 0.001)。

以上の結果から、人為的な明暗周期の攪乱は視交叉上核の時計よりも末梢時計に強く影響を及ぼし、細胞周期関連遺伝子やホルモン受容体遺伝子の発現を乱すことが解明された (Iwamoto et al., Chronobiol Int, 2014)。

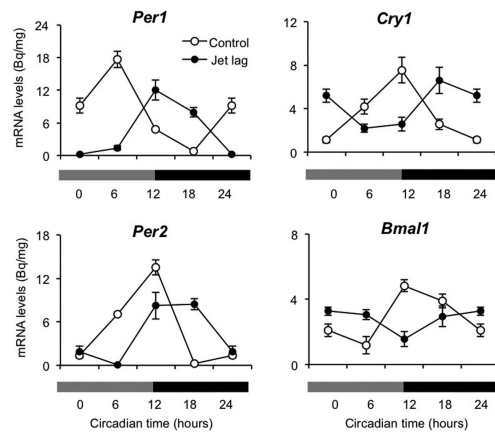


図 1. 慢性的時差ぼけ処理が CBA/N マウスの視交叉上核における時計遺伝子発現に及ぼす影響

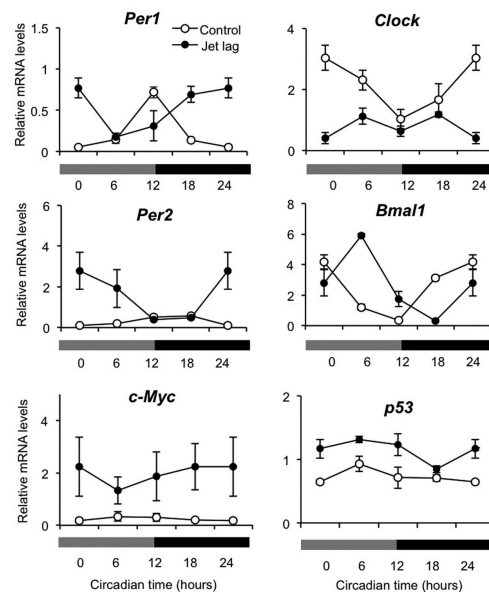


図 2. 慢性的時差ぼけ処理が CBA/N マウスの肝臓における時計遺伝子 (*Per1*, *Per2*, *Clock*, *Bmal1*) および細胞周期関連遺伝子 (*c-Myc*, *p53*) の発現に及ぼす影響

(4) 生理食塩水の投与群では、短日条件における高照度光の照射により、FSTにおける無動時間 (うつ様行動) が有意に抑制され、抗うつ様効果が確認された (one-way ANOVA followed by Dunnett multiple comparison test, p < 0.05, 図 4)。概日時計の光リセットを強める L-セリンを高照度光前に皮下投与した結果、高照度光による抗うつ様効果が増強された (one-way ANOVA followed by Dunnett multiple comparison test, p < 0.001, 図 4)。OFTによる自発運動量の指標に高照度光や L-セリンの影響は見られず、うつ様行動に特異的な影響であると示唆された。

縫線核の幾つかの小領域において、5-HTの免疫陽性細胞数や神経活性 (5-HT と c-Fos の共局在細胞数) が高照度光により増加することが判明した。またその増加は、光照射前の L-セリン投与により増強された。

これらの結果から、L-セリンは高照度光療法の抗うつ様効果を強めること、またその作用機序には縫線核における 5-HT 神経活性が関与することが示唆された。

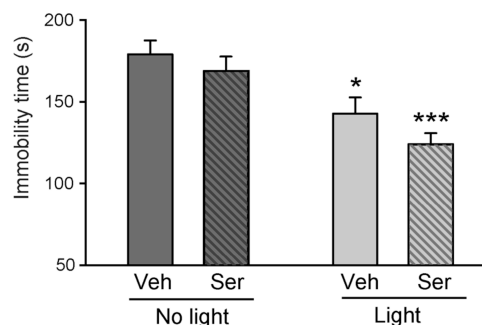


図 4. L-セリンによる高照度光の抗うつ様効果の増強。うつ様行動は FST における無動時間 (immobility time) により解析した。Veh, vehicle, 生理食塩水; Ser, L-セリン; No light, 光無照射群; Light, 光照射群; * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, one-way ANOVA followed by Dunnett multiple comparison test

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 6 件)

- ① Ikeda H, Kawase T, Nagasawa M, Chowdhury VS, Yasuo S, Furuse M. Metabolism of amino acids differs in the brains of Djungarian hamster (*P. sungorus*) and Roborowskii hamster (*P. roborowskii*). SpringerPlus, in press, 査読有
- ② Otsuka T, Kawai M, Togo Y, Goda R, Kawase T, Matsuo H, Iwamoto A, Nagasawa M, Furuse M, Yasuo S. Photoperiodic responses of depression-like behavior, the brain serotonergic system, and peripheral metabolism in laboratory mice. *Psychoneuroendocrinology* 40: 37-47, 2014, 査読有
10.1016/j.psyneuen.2013.10.013
- ③ Iwamoto A, Kawai M, Furuse M, Yasuo S. Effects of chronic jet lag on the central and peripheral circadian clocks in CBA/N mice. *Chronobiology International* 31: 189-198, 2014, 査読有
10.3109/07420528.2013.837478
- ④ Tomonaga S, Yamasaki I, Nagasawa M, Ogino Y, Uotsu N, Teramoto S, Furuse M. Oral administration of L-serine increases L- and D-serine levels in the plasma and brain of fasted rats. *Letters in Drug Design*

& *Discovery* 9: 663-667, 2012, 査読有
10.2174/157018012801319436

- ⑤ Nagasawa M, Ogino Y, Kurata K, Otsuka T, Yoshida J, Tomonaga S, Furuse M. Hypothesis with abnormal amino acid metabolism in depression and stress vulnerability in Wistar Kyoto rats. *Amino Acids* 43: 2010-2111, 2012, 査読有
10.1007/s00726-012-1294-y
- ⑥ Otsuka T, Goto M, Kawai M, Togo Y, Sato K, Katoh K, Furuse M, Yasuo S. Photoperiod regulates corticosterone rhythms by altered adrenal sensitivity via melatonin-independent mechanisms in Fischer 344 rats and C57BL/6J mice. *PLoS One*, 7:e39090, 2012, 査読有
10.1371/journal.pone.0039090

[学会発表] (計 23 件)

- ① 河井美里、大塚剛司、山崎いづみ、古瀬充宏、安尾しのぶ. 高照度光および L-セリンが短日条件におけるマウスのうつ様行動に及ぼす影響. 第 20 回日本時間生物学会学術大会、2013 年 11 月 9 日、近畿大学
- ② 岩本綾香、古瀬充宏、山崎いづみ、安尾しのぶ. 概日時計を調節できるアミノ酸の探索：L-セリンによる光応答性の増強. 第 20 回日本時間生物学会学術大会、2013 年 11 月 9 日、近畿大学
- ③ 長澤麻央、川瀬貴博、池田裕美、岩本綾香、安尾しのぶ、古瀬充宏. Wistar Kyoto ラットの脳における L-セリン代謝酵素の遺伝子発現解析. 日本アミノ酸学会第 7 回学術大会、2013 年 11 月 2 日、熊本医師会館
- ④ 河井美里、大塚剛司、山崎いづみ、古瀬充宏、安尾しのぶ. 短日条件における高照度光の抗うつ様効果と L-セリンによる増強. 日本アミノ酸学会第 7 回学術大会、2013 年 11 月 2 日、熊本医師会館
- ⑤ 岩本綾香、古瀬充宏、山崎いづみ、安尾しのぶ. L-セリンは光による概日時計の光リセットを強化する. 日本アミノ酸学会第 7 回学術大会、2013 年 11 月 2 日、熊本医師会館
- ⑥ 池田裕美、川瀬貴博、長澤麻央、スルチョードリ ビシュワジット、安尾しのぶ、古瀬充宏. ジャンガリアンハムスターとロボロフスキーハムスターにおける L-および D-アミノ酸含量の比較に関する研究. 日本畜産学会第 117 回大会、2013 年 9 月 9 日、新潟大学

- ⑦ Yasuo S, Otsuka T, Kawai M, Furuse M. Photoperiodic responses of the brain serotonergic system and mood-related behaviors in mammals. 12th Congress of the European Biological Rhythms Society, Aug 2013, Munich, Germany
- ⑧ Nagasawa, M, Otsuka T, Togo Y, Yamanaga M, Yoshida J, Yamasaki I, Uotsu N, Teramoto S, Yasuo S, Furuse, M. Antidepressant-like effects of acute and chronic L-serine treatment in Wistar and Kyoto rats. International Conference and Exhibition on Nutraceuticals and Functional Foods, Dec 201, Kona, Hawaii, USA
- ⑨ 長澤麻央、大塚剛司、都合勇希、山長聖和、吉田惇紀、山崎いづみ、魚津伸夫、寺本祐之、安尾しのぶ、古瀬充宏. L-セリンの単回および長期給与は Wistar Kyoto ラットならびに Wistar ラットにおいて抗うつ様効果を誘導する. 日本アミノ酸学会第 6 回学術大会、2012 年 9 月 28 日、千葉大学
- ⑩ 岩本綾香、河井美里、松尾陽香、古瀬充宏、安尾しのぶ. 概日時計に影響を及ぼすアミノ酸の探索. 日本アミノ酸学会第 6 回学術大会、2012 年 9 月 28 日、千葉大学
- ⑪ 松尾陽香、岩本綾香、大塚剛司、秋月さおり、青木麻実、古瀬充宏、安尾しのぶ. L-オルニチンの投与時刻依存的なホルモン分泌リズム制御. 日本アミノ酸学会第 6 回学術大会、2012 年 9 月 28 日、千葉大学

〔産業財産権〕

○出願状況（計 2 件）

名称：冬季うつ病の改善剤
 発明者：山崎いづみ、安尾しのぶ
 権利者：同上
 種類：特許
 番号：特願 2014-009286
 出願年月日：2014 年 1 月 22 日
 国内外の別： 国内

名称：メラトニン分泌調節剤
 発明者：安尾しのぶ、菱田幸宏、秋月さおり、根橋麻美、上村彩子
 権利者：同上
 種類：特許
 番号：特願 2014-72675
 出願年月日：2014 年 3 月 31 日
 国内外の別： 国内

〔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

古瀬 充宏 (FURUSE, Mitsuhiro)
 九州大学・大学院農学研究院・教授
 研究者番号：30209176

(2) 研究分担者

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