

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 8 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2016

課題番号：25670115

研究課題名（和文）アショフの法則の機構解明：光刺激による概日リズムの変動を緩衝する要因

研究課題名（英文）Investigation of mechanism for Aschoff's rule

研究代表者

瀧口 正樹（Takiguchi, Masaki）

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：40179578

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）：恒明条件下で光強度が増すと、概日行動リズムの周期が昼行性動物では短くなり、夜行性動物では長くなるとのアショフの法則は動物界に広く妥当するが、その機構は未解明である。本研究は、恒明条件下での概日行動リズム周期の伸長が亢進し、アショフの法則が強調された形質を示す遺伝子改変マウスにおいて、光刺激に対する概日行動リズムの応答性の過敏化を示すことを目的とする。

研究成果の概要（英文）：Aschoff's rule states that, under constant light conditions, brighter light shortens period length in diurnal animals and prolongs in nocturnal animals. This rule applies to the animal kingdom widely, but its mechanism remains to be clarified. In this study, we aimed to reveal that light responsiveness of the circadian locomotor rhythm is hypersensitized in a gene-modified mouse strain, which shows enhancement of prolongation in the circadian locomotion period under the constant lightness and then exhibits the phenotype of emphasized Aschoff's rule.

研究分野：時間生物学

キーワード：生物時計 神経ペプチド

1. 研究開始当初の背景

概日(約1日の意)リズムは自律性・内因性の概日生物時計によって発振され、地球の自転による明暗サイクル等の外部環境リズムに同調して24時間の日周リズムを生む。他方、恒暗、恒明等の恒常条件下においては、概日時計が外部リズムから脱同調し、内因性の概日リズムを発振する。一般に、恒暗条件下での概日行動リズム周期は昼行性動物では24時間より長く、夜行性動物では短い。また、恒明条件下で光強度が増すと概日行動リズム周期は昼行性動物では短くなり、夜行性動物では長くなる。これはアショフの法則と呼ばれるが、その機構は未解明である。

我々は近年、独自に開発した微量 mRNA 増幅法 (Ohtsuka, S. et al. 2004 *Genomics* **84**, 715; Adachi-Uehara, N. et al. 2006 *Exp. Eye Res.* **83**, 849) を用いて、ニューロンにおけるセクレトグラニン II 遺伝子 (*Scg2*) の cAMP と Ca²⁺ による強い活性化を明らかにした。続いて、*Scg2* 遺伝子のノックアウト (*Scg2* KO) マウスを作成したところ、偶然にも、同マウスは恒明条件下で 26.1 時間周期の概日行動リズムを示し(対照マウスは 25.3 時間周期)、アショフの法則が強調された形質を示した。証明をめざす作業仮説は以下の通りである。(1) 恒暗条件下で、概日リズムの中核である視交叉上核に制御された行動リズムは、その効果を視交叉上核にフィードバックする。行動量の増加は視交叉上核の概日リズム周期を短縮させる。(2) 恒明条件は、昼行性動物では行動量を増加させ視交叉上核の概日リズム周期を短縮、反対に夜行性動物では行動量の減少により概日リズム周期を伸長させる。(3) 網膜から視神経を通り視交叉上核に直接的に伝わる光情報も、同方向の作用を示す。(4) 視交叉上核の特にニューロン間の同調機構は概日リズム周期の変動を緩衝しようとするが、恒明条件下では減衰する。*Scg2* 遺伝子はこの緩衝効果に寄与し、その欠失は恒明条件の影響を増大させる。

2. 研究の目的

本研究では、*Scg2* KO マウスにおいて、概日行動リズムの光刺激による変動が過敏化していることを明らかにする。一方、視交叉上核培養切片を用いて、グルタミン酸受容体刺激等によりアショフの法則を再現できる実験系を構築し、*Scg2* 由来神経ペプチドが概日リズム周期変動を緩衝することを証明する。

3. 研究の方法

(1) *Scg2* KO マウスの行動リズムに見られる光刺激応答性の亢進の検討

マウスの飼育と実験は、千葉大学動物実験実施規程に準拠して行った。マウスは 24 ± 1°C、自由摂食摂水にて飼育した。マウス飼育ケージの上方に装着した熱放射感知式運動検出装置 NS-As01 (ニューロサイエンス

社)により行動量を連続的にモニターし、1分毎にコンピューターに記録した。リズム性を ClockLab ソフトウェア (Actimetrics 社) を用いて解析した

概日行動リズム周期長の光強度依存性の解析: *Scg2* KO マウスおよび対照群として同腹の野生型あるいはヘテロ接合型マウスを 12 時間:12 時間明暗 (12:12LD) サイクルにて 2 週間飼育後、恒暗 (0.5 ルクス以下) にて 3 週間、赤色電球 2 ルクス恒照射にて 3 週間、続いて LED 電球恒照射を 3 週間ごとに段階的に 2, 10, 30, 100, 350, 1000 ルクスに上昇させ、飼育した。各照度への移行後 5 日目から 18 日目の間における概日行動リズム周期を求めた。

暗期光刺激によるマスキング効果の解析: 夜行性動物について暗期中途での光照射により運動量の減少が見られ、日周行動リズムのマスキングの典型例として知られている。*Scg2* KO マウスおよび対照マウスを 12:12LD サイクルにて 2 週間飼育後の 1 日の暗期に 4 時間(消灯後 3-7 時)に 2 ルクス(赤色電球)の光照射を行い、以後 2 週間ごとに 2(LED 電球, 以下同じ), 5, 10, 100, 1000 ルクスの光照射を行なった。光照射中(0 日)、あるいは翌日(+1 日)の同時間帯の運動量を、照射前日(-1 日)の同時間帯の運動量と比較した。

(2) 視交叉上核の培養切片における概日発光リズム周期を指標にした解析

時計遺伝子 *Period 2* (*Per2*) にルシフェラーゼ遺伝子 *Luc* を融合させた *mPer2::Luc* ノックインマウスの視交叉上核培養切片は顕著な概日発光リズムを示す。交配により *Scg2* KO と *mPer2::Luc* ノックインの二重変異マウスを得た。同マウスおよび対照マウスの脳から、McIlwain 型ティッシュチョッパーを用いて視交叉上核の前額断 300 μm 厚切片を調製し、カルチャーインサート上で培養した。AB-2550 クロノス Dio ルミノメーター(アットー社)を用いてルシフェラーゼ発光をモニターした。

4. 研究成果

特許出願まで公表を差し控える。

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 9 件)

Iwadate, Y., Suganami, A., Tamura, Y., Matsutani, T., Hirono, S., Shinozaki, N., Hiwasa, T., Tagiguchi, M., and Saeki, N. The pluripotent stem-cell marker alkaline phosphatase is highly expressed in refractory glioblastoma with DNA hypomethylation. *Neurosurgery* **80**, 248 (2017) 査読有
Muto, M., Mori, M., Hiwasa, T.,

Takiguchi, M., Iwadate, Y., Uzawa, A., Uchida, T., Masuda, H., Sugimoto, K., and Kuwabara, S. Novel serum autoantibodies against talin1 in multiple sclerosis: Possible pathogenetic roles of the antibodies. *J. Neuroimmunol.* **284**, 30-36 (2015) 査読有

Kuroiwa, N., Iwase, K., Morii, S., Takiguchi, M., and Hiwasa, T. Up-regulation of growth-inhibitory or tumor suppressive genes by overexpression of C/EBP α or C/EBP β in rastransformed NIH3T3 cells. *Integr. Mol. Med.* **2**, 150-157 (2015) 査読有

Shimada, H., Ito, M., Kagaya, A., Shiratori, T., Kuboshima, M., Suzuki, M., Liu, T. L., Nabeya, Y., Matsubara, H., Matsushita, K., Nomura, F., Takiguchi, M. and Hiwasa, T. Elevated serum antibody levels against cyclin L2 in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *J. Cancer Sci. Ther.* **7**, 60-66, doi: 10.4172/1948-5956.1000326 (2015) 査読有

Machida, T., Kubota, M., Kobayashi, E., Iwadate, Y., Saeki, N., Yamaura, A., Nomura, F., Takiguchi, M. and Hiwasa, T. Identification of stroke-associated-antigens via screening of recombinant proteins from the human expression cDNA library (SEREX). *J. Transl. Med.* **13**, 71, doi: 10.1186/S12967-015-0393-4 (2015) 査読有

Hiwasa, T., Iwase, K., Suichi, T., Hino, Y., Kimura, R., Shinmen, N., and Takiguchi, M. Identification of the p53-responsive element in the promoter region of the human decorin gene. *Mol. Biol.* **4**, 1000124 (2015) 査読有

Morii, S., Kato, M., Seki, N., Shinmen, N., Iwase, K., Takiguchi, M. and Hiwasa, T. Inhibition of cell growth by nuclear receptor COUP-TFI: Possible involvement of decorin in growth inhibition. *Biochem. Physiol.* **S4**, 1, doi: 10.4172/2168-9652.S4-001 (2014) 査読有

Iwase, K., Ishihara, A., Yoshimura, S., Andoh, Y., Kato, M., Seki, N., Matsumoto, E., Hiwasa, T., Muller, D., Fukunaga, K. and Takiguchi, M. The secretogranin II gene is a signal integrator of glutamate and dopamine inputs. *J. Neurochem.* **128**, 233-245, doi: 10.1111/jnc.12467 (2014) 査読有

Adachi-Hayama, M., Adachi, A., Shinozaki, N., Matsutani, T., Hiwasa, T., Takiguchi, M., Saeki, N. and Iwadate, Y.

Circulating anti-filamin C autoantibody as a potential serum biomarker for low-grade gliomas. *BMC Cancer* **14**, 452, doi: 10.1186/1471-2407-14-452 (2014) 査読有

Miyauchi, O., Iwase, K., Itoh, K., Kato, M., Seki, N., Braissant, O., Bachmann, C., Shozu, M., Sekiya, S., Osada, H. and Takiguchi, M. Efficient subtractive cloning of genes activated by lipopolysaccharide and interferon γ in primary-cultured cortical cells of newborn mice. *PLoS ONE* **8**, e79236, doi: 10.1371/journal.pone.0079236 (2013) 査読有

6 . 研究組織

(1)研究代表者

瀧口 正樹 (TAKIGUCHI MASAKI)
千葉大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号：40179578

(2)研究分担者

岩瀬 克郎 (IWASE KATSURO)
千葉大学・大学院医学研究院・講師
研究者番号：80322030

(3)連携研究者

松本 絵里子 (MATSUMOTO ERIKO)
千葉大学・大学院医学研究院・技術職員
研究者番号：20422256

(4)研究協力者

有田 恵美子 (ARITA EMIKO)
千葉大学・大学院医学研究院・技術職員

(5) 研究協力者

玉井 恵子 (TAMAI KEIKO)
千葉大学・大学院医学研究院・技術補佐員

(6) 研究協力者

木村 理沙 (KIMURA RISA)
千葉大学・大学院医学研究院・技術補佐員

(7) 研究協力者

平良 暁子 (TAIRA AKIKO)
千葉大学・大学院医学研究院・博士課程大学院生