

妊娠期における食事時間が子の体内時計機能 およびその発達に及ぼす影響に関する研究

守 屋 孝 洋

東北大学大学院薬学研究科・細胞情報薬学分野 准教授

緒 言

睡眠・覚醒やホルモン分泌など多くの生体機能は1日の中で変動しており、これらは体内時計によって制御されている。哺乳類では、視床下部に存在する視交叉上核 (Suprachiasmatic nucleus; SCN) が体内時計のセンターとしてはたらし、身体のような組織に細胞単位で存在する末梢時計を階層的に制御することが最近の研究により明らかになってきた。体内時計による時刻発振は細胞レベルで観察され、時計遺伝子と総称される一連の転写調節因子によって構成される転写・翻訳のフィードバックループによって生み出されることが最近10年間の研究によってわかってきた (図1)。すなわち、*Per1* および *Per2* 遺伝子のプロモーター上には転写因子認識エレメントである E/E' ボックスが存在し、これらのシスエレメントを介して CLOCK と BMAL1 タンパク質のヘテロダイマーが *Per* 遺伝子の転写を活性化する。その結果、産生された PER タンパク質は核内に移行し、CLOCK・BMAL1 タンパク質による転写を抑制し、次第

に PER タンパク質の発現レベルは低下する。それにより CLOCK・BMAL1 タンパク質による転写活性化が再開し、これらの転写・翻訳のフィードバックループが約24時間で繰り返され、これが細胞内で概日リズムが形成される駆動力になるものと考えられている。一方、CLOCK・BMAL1 タンパク質自身の発現も *Rev-Erbα* などの働きによって日内変動するため、フィードバックループによる概日リズムはより頑強に形成されているといえる。

ところで体内時計が正常に働くためには、自身の位相を外界の時間と同調させる必要があるが、我々は、「食事」が光に匹敵する強い同調因子として全身の体内時計をリセットすることを明らかにした¹⁾。また、食事による全身の体内時計の同調メカニズムの一部として、視床下部背内側核 (Dorsomedial hypothalamic nucleus; DMH) が食事に速やかに反応することを報告した²⁾。すなわち、*Per* 遺伝子の発現を指標にして、食事に反応するマウス脳部位を網羅的に検索したところ、18時間の絶食

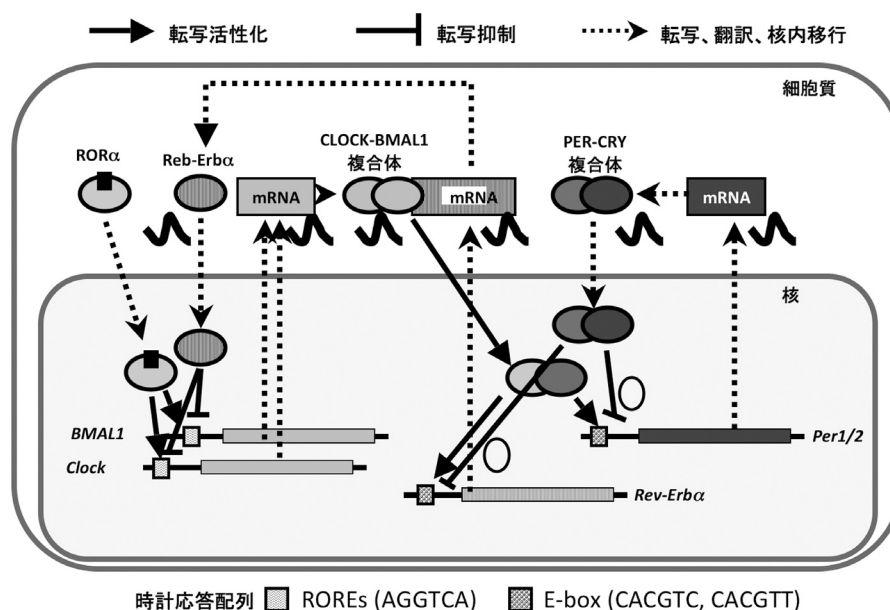


図1 時計遺伝子による細胞自律的な概日リズム形成メカニズム

後の給餌は、唯一、視床下部背内側核において *Per1* 及び *Per2* mRNA を一過的に上昇させ（図2）、この一過的な発現上昇が引き金として食事は DMH 時計を速やかに同調することを明らかにした。

一方、体内時計は胎生期より働いていることが成長後の行動リズムの解析から推定されていたが、時計遺伝子の発現解析により、マウスの体内時計は出生3日前には機能し始めていることが報告された³⁾。さらに最近、我々は妊娠時の母の食事が胎仔の体内時計を強力に同調させることを見出し⁴⁾、子の体内時計の発達における食事の重要性を明らかにした。しかしながら、妊娠中の食事による子の体内時計の同調機構は十分に明らかにされていない。そこで本研究では、妊娠期の食事による子の体内時計同調作用における神経機構ならびに分子機構を明らかにすることを目的とした。

実験方法

【妊娠および非妊娠マウスの行動リズムの測定】

マウスは時計遺伝子レポーター導入マウス（Period2::Luciferase knockin mice; Per2::Luc KI マウス）を用いた。雄性 Per2::Luc ホモ KI マウスと雌性 Per2::Luc ホモ KI マウスをオーバーナイトで交配させ、Timed pregnant マウスを作成した。交配直後からマウスを個別飼育し、焦電型赤外線センサー（秋月電子製）によって5分ごとの自発運動量を24時間連続で記録した。マウスは実験を通して明暗サイクル（明期12時間、暗期12時間）下で飼育した。

【制限給餌スケジュール】
妊娠7日目の暗期開始1時間前から絶食させ、翌日（妊娠8日目）から、明期開始5時間後（zeitgeber time 5; ZT5）から9時間後（ZT9）までの4時間の間だけ給餌を行う制限給餌を11日間連続で行った。妊娠19日目のZT5にエーテル深麻酔下でマウス胎仔を取り出し、胎仔脳を摘出した。対照群は実験期間を通して自由に摂食させる自由摂食群とした。

【時計遺伝子 Per2・ルシフェラーゼ発光リズムの測定】

妊娠19日目に摘出したマウス胎仔脳からビブロスライサーを用いて SCN または DMH を含む厚さ 200 μ m の脳スライスを作成し、Millicell 膜上で長期器官培養を行った。培養直後から培養液にルシフェリン（0.1 mM）

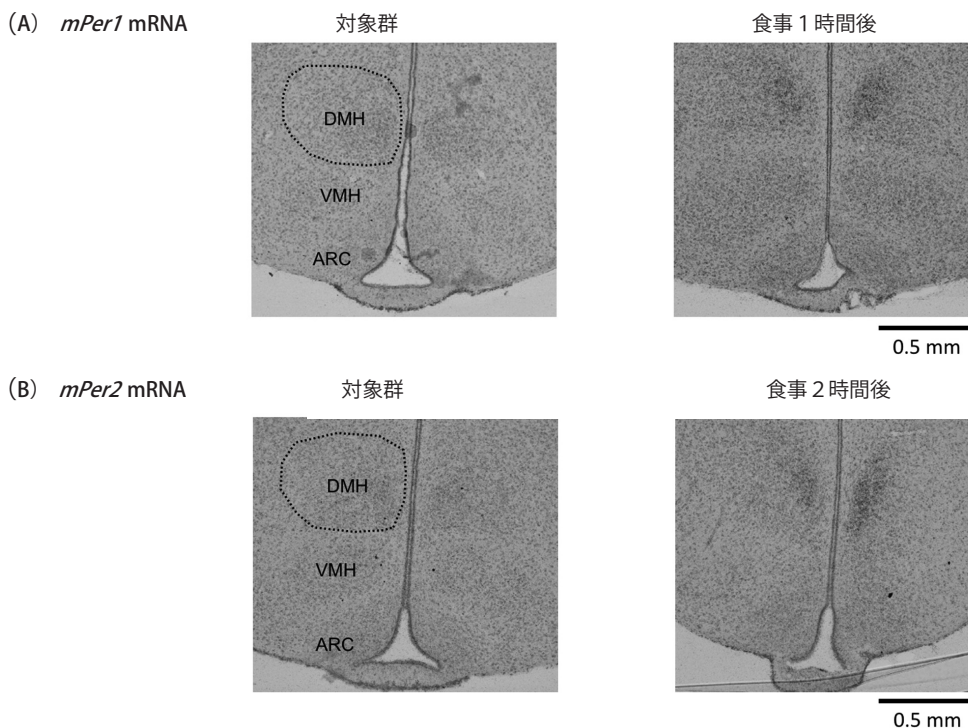


図2 成体マウスの視床下部背内側核における食事誘発性の *mPer1* および *mPer2* mRNA 発現上昇

成体の雄性マウスを前日の暗期開始1時間前より絶食させ、翌日の明期開始5時間後から給餌を行い、その1時間後（A）または2時間後（B）に脳をサンプリングした。In situ hybridization 法（エマルジョン法）によって *mPer1* および *mPer2* mRNA 発現を可視化した。対照群の写真中の点線の囲みは視床下部背内側核（DMH）を示す。

DMH: Dorsomedial hypothalamic nucleus（視床下部背内側核）。VMH: Ventrolateral hypothalamic nucleus（視床下部腹外側核）。ARC: Arcuate nucleus（弓状核）。

を添加し、光電子増倍管 (PMT) を検出器とした生物発光連続測定システムによって時計遺伝子 *Per2*・ルシフェラーゼ発光を記録した。時計遺伝子 *Period2* の発現は、そのプロモーター領域に存在する転写因子応答配列 E-box を介して約 24 時間周期で制御されるため、*Per2::Luc* ノックインマウス由来の組織培養からの生物発光を記録すると、約 24 時間周期の生物発光リズムが観察される。記録したデータから前後 24 時間の移動平均値を減算し、detrended data を計算し、さらにコサイン法によって発光リズムの振幅、周期、位相を求めた。

記録開始から 24 ~ 48 時間後にあらわれるピーク位相が生体内でのリズム位相を反映していることが報告されているので⁵⁾、このピーク位相を SCN あるいは DMH の生体内でのリズム位相の指標とした。

結果および考察

【妊娠および非妊娠マウスの行動リズムに対する制限給餌の影響】

妊娠および非妊娠マウスの行動リズムに対する制限給餌の影響を焦電型赤外センサーによって記録した自発運動リズムの記録から解析した (図 3)。自由摂食条件下

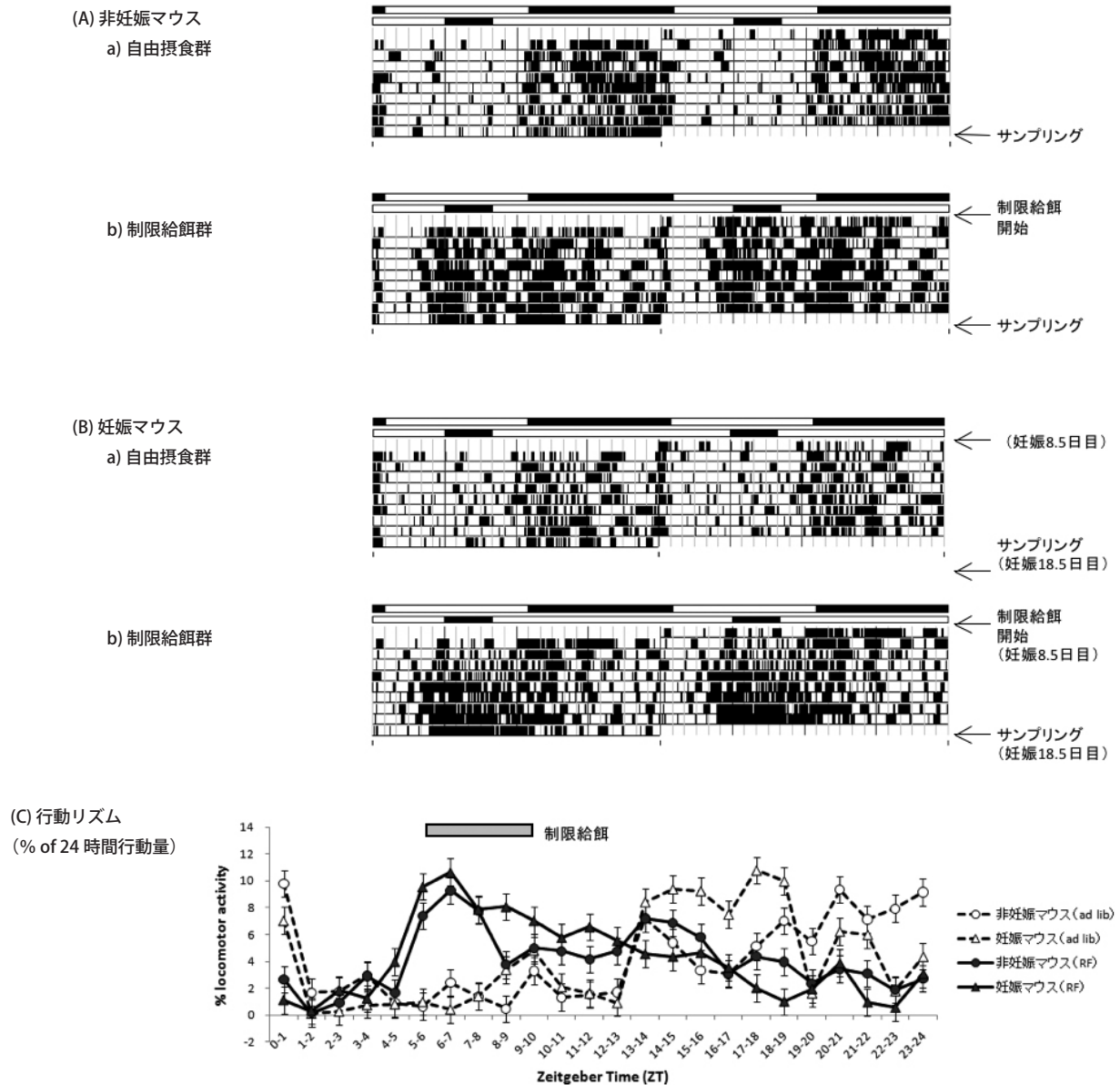


図 3 妊娠および非妊娠マウスの行動リズムに対する制限給餌の影響

非妊娠マウス (A) および妊娠マウス (B) の行動リズムに対する制限給餌の影響。代表的な行動リズムのダブルプロットアクトグラムを示した。各アクトグラム上の上段の白黒カラムは明暗サイクルを、下段の黒カラムは制限給餌時間を表す。制限給餌は明期開始 5 時間後 (ZT5) から明期開始 9 時間後 (ZT9) までの 4 時間行い、妊娠 8.5 日目から妊娠 18.5 日までの 11 日間行った。対照群は自由に餌を与えた。(C) サンプルング前日の行動リズムを 24 時間の行動量を 100% として表した。

では、妊娠および非妊娠マウスのいずれも暗期に行動レベルが高くなる夜行性型の行動リズムを示したが（図3 A、B）、非妊娠マウスの行動量が暗期後半に高くなるのに対して、妊娠マウスの行動量が暗期前半に高くなる傾向が観察された（図3 C）。

明期の4時間のみ給餌を行う制限給餌は、妊娠および非妊娠マウスのいずれにおいてもその行動リズムは明期に集中する昼行性の行動リズムを惹起し（図3 A、B）、その時間分布に、妊娠マウスと非妊娠マウスの間に顕著な差は認められなかった（図3 C）。また、妊娠および非妊娠マウスのいずれにおいても給餌開始時刻の2時間前から行動レベルが上昇していることから（図3 C）、制限給餌による昼型の行動パターンは給餌自体によって受動的に惹起される生体応答ではなく、自律的なリズムを発振する体内時計によって駆動されていることが考えられる。

【時計遺伝子 *Per2*・ルシフェラーゼ発光リズムに対する制限給餌の影響】

妊娠19日目（胎生19日目）に摘出したマウス胎仔の体重を計測したところ、自由摂食群と制限給餌群の間に有意な差は認められなかった（data not shown）。したがって、本研究で採用した制限給餌スケジュールはマウス胎仔の身体的発達に障害を及ぼさないことが確認できた。

次に、胎生19日目のマウス胎仔脳からSCNを含む脳スライスを作成し、*Per2*・ルシフェラーゼ発光リズムを3日間連続測定したところ、自由摂食群（対照群）および制限給餌群の母マウスから摘出した胎仔SCNはいずれも約24時間周期の明瞭な発光リズムを示した（図4 A）（ R^2 係数 > 0.800 ）。発光リズムのリズム周期について対照群と制限給餌群の間に有意な差は観察されなかった（対照群； 24.298 ± 0.990 hr、制限給餌群； 22.495 ± 0.845 hr）。一方、ピーク位相については自由摂食群（対照群）および制限給餌群の間に有意な差が観察された。すなわち、対照群のSCNのピーク位相はZT14.3に見られるのに対して、制限給餌群のSCNのピーク位相はZT9.8に観察され（図4 A、C）、制限給餌はピーク位相を4.5時間前進させることが明らかになった。

一方、マウス胎仔脳からDMHを含む脳スライスを作成し、*Per2*・ルシフェラーゼ発光リズムを3日間連続測定したところ、自由摂食群（対照群）および制限給餌群の母マウスから摘出した胎仔DMHはいずれも約24

時間周期の発光リズムを示したが、そのリズム強度はSCNに比較すると弱かった（図4 B）（ R^2 係数 > 0.66 ）。発光リズムのリズム周期について対照群と制限給餌群の間に有意な差は観察されなかった（対照群； 22.154 ± 0.363 hr、制限給餌群； 22.065 ± 0.005 hr）。一方、ピーク位相については自由摂食群（対照群）および制限給餌群の間に有意な差が観察された。すなわち、対照群のDMHのピーク位相はZT21.6に見られるのに対して、制限給餌群のDMHのピーク位相はZT14.2に観察され（図4 B、C）、制限給餌はピーク位相を7.4時間前進させることが明らかになり、制限給餌はSCNよりもDMHの体内時計を強く同調することがわかった。

【胎仔と成体マウスの体内時計に対する制限給餌の同調作用の比較】

本研究によりマウス胎仔脳において、母への制限給餌はSCNおよびDMHの体内時計の位相を変化させる効果を示し、その同調作用はDMHに対してより強力にあらわれることが明らかになった。

我々は成体マウスを対象にした研究により、SCNにおける時計遺伝子の発現リズムは光刺激によってリセットされる一方^{6) 7)}、明期4時間の制限給餌によっては全く影響を受けないことを報告しており¹⁾、これは本研究で明らかになった胎仔マウスのSCNに対する同調効果と対照的である。成体マウスのSCNは網膜神経節細胞からの直接的な神経投射を受けているのに対して、胎仔SCNは網膜からの神経投射も未完成であり、また網膜自身が十分に光感知能をもたないと考えられるため、このような差異がSCNの食事に対する反応性の違いを生み出しているのかもしれない。母での食事がどのようなシグナル分子を介して胎仔SCNを同調しているのかについてはメラトニンやドーパミンなどいくつかの候補分子が考えられるが、今後、これらのシグナル経路に関与する遺伝子の欠損マウスなどを用いて解明する必要がある。

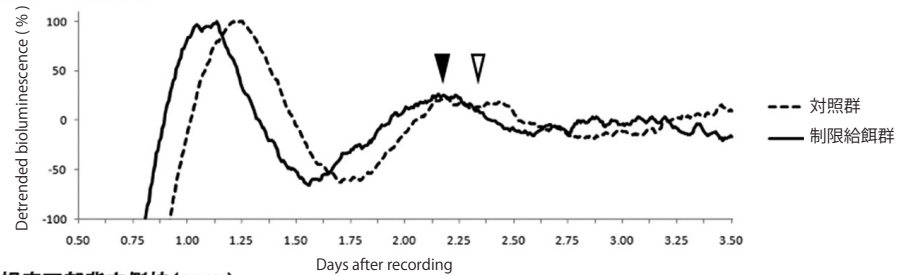
一方、DMHにおいては、食事は成体マウスおよび胎仔マウスに対しても同様に強力な同調作用を示すことが明らかになった。これは食事によるDMH時計の同調が成体マウスおよび胎仔マウスにおいて同様のメカニズムが働いている可能性を示唆している。前述したように我々は*Per* 遺伝子の発現を指標にして、食事に反応するマウス脳部位を網羅的に検索したところ、18時間の絶食後の給餌は、唯一、DMHにおいて*Per1* 及び*Per2*

mRNAを一過的に上昇させ、さらに制限給餌は DMH における時計遺伝子の発現リズムを速やかにリセットすることを報告しているが²⁾、同時に DMH の局所破壊は自発運動および深部体温で観察される食事同調性リズムに影響を与えないことを見出しており²⁾、DMH は高い食事反応性時計を有しているが、食事誘発性リズムはその他の脳部位あるいは末梢組織によって駆動されている可

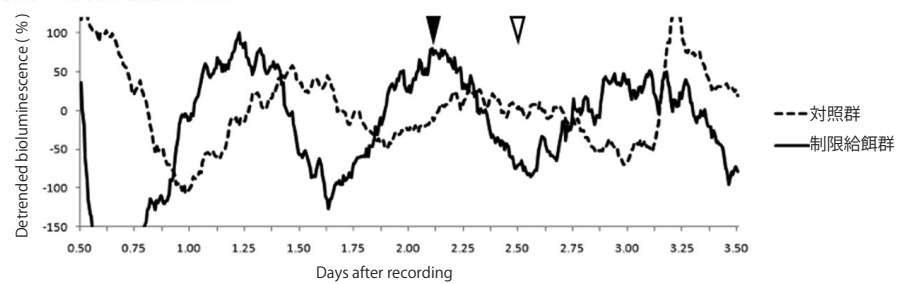
能性を報告した。DMH の食事同調リズムにおける役割についてはいくつかの研究グループ間で見解が一致しておらず⁸⁾、さらなる検討が必要と思われるが、成体と胎仔においていずれの DMH の体内時計も食事によって強く同調するという性質を有していることは興味深い。時計遺伝子ノックアウトマウスなどを用いたさらなる研究が必要である。

(A) Per2発光リズム(代表例)

a 視交叉上核(SCN)

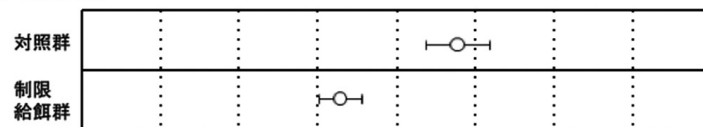


b 視床下部背内側核(DMH)



(B) Per2発光リズム・ピーク位相

a 視交叉上核(SCN)



b 視床下部背内側核(DMH)

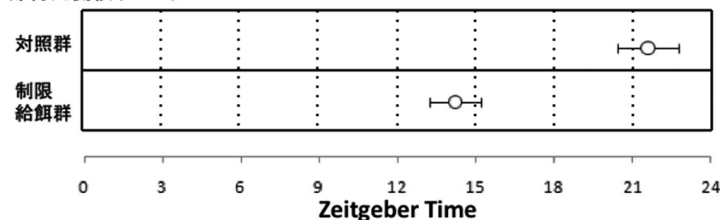


図4 胎仔の Per2 発光リズム・ピーク位相に対する母の制限給餌の影響

妊娠 8.5 日目から 17.5 日目までの 10 日間、Per2-luc ノックインマウスに 1 日 4 時間 (ZT5 ~ ZT9)、制限給餌を行い、妊娠 18.5 日目に胎仔脳を摘出し、視交叉上核 (SCN) および視床下部背内側核 (DMH) を含む脳スライス (厚さ 200 μ m) を作成し、Millicell 膜上で培養を行った。培養直後から発光基質 luciferin (0.1 mM) をメディアウムに添加し、生物発光連続測定システムにより時計遺伝子 Per2 の発現変化を記録した。(A) 制限給餌あるいは自由摂食条件下での SCN および DMH の発光リズムの代表例。白三角および黒三角はコサイン法によって算出されたピーク位相を示す。

(B) SCN および DMH の発光リズム・ピーク位相に対する制限給餌の影響。N = 3.

要 約

母への食事時間が胎仔脳の体内時計の位相に対する影響を時計遺伝子・ルシフェラーゼ発光リズムを指標にして検討した。その結果、妊娠マウスへの 11 日間の制限給餌は胎仔マウスの SCN および DMH の体内時計の位相を変化させたが、制限給餌が、SCN 時計のピーク位相を 4.5 時間前進させるのに対して、DMH 時計に対してはピーク位相を 7.4 時間前進させることが明らかになり、制限給餌は SCN よりも DMH の体内時計を強く同調することがわかった。DMH は成体げっ歯類においても食事時間に強く同調する性質を有していることが明らかになっているため、DMH の食事同調性時計としての機能は発達過程を通して共通にみられる現象であることが明らかになった。

謝 辞

本研究は、財団法人三島海雲記念財団の平成 21 年度学術研究奨励金により行われたものです。助成していただきました財団法人三島海雲記念財団に深く感謝申し上げます。また、本研究を遂行するにあたり、多大なご支援をご助言をいただきました東北大学大学院薬学研究科・細胞情報薬学分野の中畑則道教授に深く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Hara et al.: *Gene to Cells*, **6**:269-278. 2001.
- 2) Moriya et al.: *Eur. J. Neurosci.*, **29**:1447-1460. 2009.
- 3) Shimomura et al.: *Eur. J. Neurosci.*, **13**:687-693. 2001.
- 4) Ohta et al.: *PLoS ONE*, **3**:e2601. 2008.
- 5) Akiyama et al.: *Tohoku J Exp. Med.*, in press.
- 6) Shigeyoshi et al.: *Cell*, **91**:1043-1053. 1997.
- 7) Akiyama et al.: *J. Neurosci.*, **19**:1115-1121. 1999.
- 8) Mistlberger et al.: *J. Circadian Rhythms*, **7**:11. 2009.