

Title	マウス顎下腺の概日時計発振過程の解明及び唾液腺機能分子の発現リズム解析
Author(s)	内田, 仁司
Citation	大阪大学, 2014, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/34349
rights	©2016. This manuscript version is made available under the CC-BY-NC-ND 4.0 license http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

博士論文

マウス顎下腺の概日時計発振過程の解明及び

唾液腺機能分子の発現リズム解析

大阪大学大学院 歯学研究科

統合機能口腔科学専攻

高次脳口腔機能学講座 顎口腔機能治療学教室

(教授 阪井 丘芳)

内田 仁司

緒言

唾液は口腔内の健康維持に必要不可欠である(Brosky, 2007). 唾液は三大唾液腺と小唾液腺から分泌され, 大部分が三大唾液腺に由来する(Schneyer & Levin, 1955). 唾液分泌は自律神経系によって制御されており, 交感神経は主にタンパク質成分の分泌に関与し, 副交感神経は水成分の分泌に関与する (Garrett & Thulin, 1975; Abe & Dawes, 1978; Garrett *et al.*, 1991). ヒトの耳下腺で味覚刺激によって唾液分泌速度が増加し(Froehlich *et al.*, 1987), アトロピン投与によって唾液分泌速度と電解質濃度が減少することが報告されている(Shannon *et al.*, 1969). 一方で, ヒトの安静時唾液は, 分泌速度と構成成分に日内変動のあることが知られており(Dawes, 1972), 活動期に分泌量が増加し, 休止期に減少する. また, 唾液には種々の酵素や成長因子が含有されており(Cohen, 1962; Levine, 1993), マウス顎下腺における上皮成長因子と神経成長因子の濃度(Siminoski *et al.*, 1993), アドレナリン受容体の密度(Basso & Piantanelli, 2002)やラット耳下腺に含有される α -AMYLASE 活性に日内変動を示すことが報告されている(Bellavia *et al.*, 1992). しかしながら, この様な唾液腺機能に概日リズムを生じるメカニズムは明らかでない.

哺乳類において, 視床下部視交叉上核は全身の概日リズムを調節するペースメーカーとして機能し, 生理機能や行動リズムを制御している. この概日リズムは時計遺伝子: *Period (Per)*, *Cryptochrome (Cry)*, *Brain and muscle Arnt-like protein-1 (Bmal1)*及び *Circadian locomotor output cycles kaput (Clock)* で構成される転写・翻訳フィードバックループによって自律的に発振すると考えられている(Reppert & Weaver, 2002). また, 視交叉上核以外の脳神経部位や肝臓, 肺, 腎

臓や骨格筋の末梢組織も自律的な概日リズムを示すことが明らかとなっている (Yamazaki, 2000; Abe *et al.*, 2002; Yoo *et al.*, 2004). 顎下腺において, 時計遺伝子の mRNA 発現が概日リズムを示すという報告がある (Furukawa *et al.*, 2005; Zheng *et al.*, 2012). しかしながら, 顎下腺の概日リズムが視交叉上核によって駆動される受動的リズムであるのか, 顎下腺自体の自律的な内因性リズムであるのか, または環境の周期的変化に応じて制御を受ける外因性リズムなのかの検証がなされておらず, 顎下腺機能の日内変動を制御している要素は明らかでない.

顎下腺の器官発生期において, 概日時計発振機構の開始時期は不明である. ラット視交叉上核では胎生 19 日齢から代謝活性に昼夜差を示し (Reppert & Schwartz, 1983; 1984), ICR マウスでは胎生 17 日齢の視交叉上核で *Per1* mRNA 発現に概日リズムを示すことが報告されており (Shimomura *et al.*, 2001), 出生前に時計機構が発振すると考えられる. 末梢組織では, 胎生 22 日齢ラットの肝臓で *Per1* 発現に概日リズムを示すことが報告されている (Ohta *et al.*, 2008). しかしながら, 顎下腺で概日リズムの発振開始時期を明らかにした報告は存在せず, また, 発生期における概日リズムが果たす機能的役割は明らかとなっていない.

出生後, 新生仔は母体からの血流を介した直接的な生理機能制御から解放される. 生後発達における概日リズム位相は末梢組織ごとに異なることが明らかにされており (Yamazaki *et al.*, 2009), 各器官における機能発達に依存した概日リズム位相の同調経路が示唆される. 口腔機能は出生直後から生命活動に不可欠な吸啜機能を担い, 生後発達により咀嚼機能を獲得する. 顎下腺では, 生後の口腔機能発達が分子時計機構の同調因子となり, 機能発現の最適なタイミングを制御している可能性がある.

本研究は、唾液腺機能における概日リズムの制御機構を解明することを目的とし、マウス顎下腺を用いて時計遺伝子発現と唾液腺機能分子の遺伝子発現の時間変動を解析した。また、概日時計の発振開始時期を胎生期顎下腺で検出し、生後発達期における顎下腺概日リズム位相の推移を比較検討した。

材料と方法

1. 動物

8-12 週齢雄 C57BL/6J Jms Slc (B6) マウス, 8-12 週齢雄 *Per2::luc* ノックインマウス, 8-12 週齢雄 *Cry1^{-/-}*マウス, 8-12 週齢雄 *Cry2^{-/-}* マウス及び 6-10 か月齢雌 *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}*マウスを用いた. B6 マウスは日本 SLC より購入し, 実験と同じ環境下で 2 週間飼育した後, 実験に使用した. *Per2::luc* ノックインマウス(Yoo *et al.*, 2004)は Jackson Laboratory (Maine, USA) より購入し, *Cry1^{-/-}*, *Cry2^{-/-}* マウス (Vitaterna *et al.*, 1999)は大阪大学医学系研究科 藤堂 剛教授より提供を受け, 歯学研究科動物飼育施設にて交配, 繁殖を行った. 飼育は, 明期 8:00-20:00, 暗期 20:00-8:00 の明暗サイクル下で行い, 自由給水摂食とした. 明期の開始時刻を Zeitgeber time (ZT) 0, 暗期の開始時刻を ZT12 と定めた.

すべての動物実験は, 大阪大学大学院歯学研究科動物実験委員会の承認を受け行った (動歯-20-042-0).

2. 顎下腺における生物発光イメージング

ヘテロ接合型 *Per2::luc* ノックインマウスにエーテル麻酔を施し, 頸椎脱臼を行った. 顎下腺を摘出し, 7.5% Sodium bicarbonate solution (SIGMA), 10 mM HEPES (SIGMA), 100 U/ml penicillin 及び 100 µg/ml streptomycin (GIBCO®) を添加した Hank's 緩衝溶液 (GIBCO®)に移した. D.S.K *LinearSlicer*TM PRO 7 (Dosaka EM Co., Ltd.) を使用して, 摘出した顎下腺を 50 µm 厚に薄切した. 薄切した顎下腺を MilliCell®-CM Culture Plate Inserts (MILLIPORE) 上に静置し, 7.5% Sodium bicarbonate solution, 10 mM HEPES, 25 U/ml penicillin, 25 µg/ml streptomycin, B27 supplement (GIBCO®) 及び 0.1 mM luciferin を添加した Dulbecco's modified

eagle medium (GIBCO®) 1.2 mL を加えた 35 mm Non-Treated Dish (IWAKI) に移した。Dish はシリコングリース (Shin-Etsu Chemical Co.,Ltd.) と FEP film 25F (T・G・K Co.,Ltd.) で封入した。顎下腺薄切切片の明視野像及び発光像を CCD カメラ (Hamamatsu Photonics K.K.) を用いて撮影した。

3. 視交叉上核および顎下腺における生物発光測定

*Cry1^{-/-}*または *Cry2^{-/-}*ヘテロ接合型 *Per2::Luc* ノックインマウスにエーテル麻酔を施し、頸椎脱臼を行った。顎下腺と脳を摘出し、Hank's 緩衝溶液に移した。脳はスライサーを用い 300 μ m 厚の冠状断切片を作成した。視交叉上核を含有する切片を選択し、メスで同神経核を含む小切片を切り出した。摘出した顎下腺は 2 mm \times 2 mm \times 2 mm の小片に分離した。視交叉上核小切片と顎下腺小片を培養膜上に移し、記録用培地を加えた 35 mm dish に静置した。培養組織を 36°C インキュベーター内へ移動し、Photomultiplier Tube (Hamamatsu Photonics K.K.) を用いて、ルシフェリンを基質とする生物発光を連続的に測定した。

4. 顎下腺採取・顎下腺組織培養

B6 マウス及び *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}*マウスを ZT4, 8, 12, 16, 20, 24 の 6 点で、エーテル麻酔を施し頸椎脱臼を行った後、顎下腺を採取した。片側顎下腺を 1.5 ml マイクロチューブ中の 800 μ l TRIzol® reagent (Life Technologies) に浸漬して液体窒素で急速冷凍を行い、 -80°C で保存した。

Per2::luc ノックインマウスから両側顎下腺を摘出した。組織採取は ZT6 に行い、12 の小片に分離後 3 片ずつ 4 枚の 35 mm dish に分割して培養した。培養開始後、生物発光状態を記録しながら 6 時間ごとに顎下腺組織を回収し、1.5 ml

マイクロチューブ中の 800 μ l TRIzol® reagent に浸漬して液体窒素で急速冷凍を行い、 -80°C で保存した。

冷凍保存した組織サンプルは室温で解凍後、TRIzol® reagent 内で顎下腺をホモジナイザーペッスルで破碎した。PureLink™ RNA Mini Kit (Life Technologies) を使用して total RNA を抽出し、DNase I (Roche) を用いて DNase 処理を行った。Total RNA から PrimeScript RT reagent Kit (TaKaRa BIO INC.) を用いて逆転写反応させ、mRNA 特異的な cDNA の合成を行った。

5. Quantitative real-time Reverse Transcription Polymerase chain reaction

(qPCR) 法を用いた遺伝子発現解析

qPCR 反応は iQ™ SYBR® Green Supermix (BIORAD) を使用して、MyiQ Single Color Real-Time PCR Detection System (BIORAD) にて 40 サイクル (95°C ; 10sec / 55°C ; 30sec) 行った。目的遺伝子である *Per2*, *Bmal1*, *albumin D-element binding protein (Dbp)*, *Aquaporin 5 (Aqp5)*, *Amylase (Amy)* の発現量は、 β -Actin を内部標準として相対値補正を行った。プライマー配列は以下の通りである。

	FW	Rv	Reference
<i>β-Actin</i>	5'-ctctttccagccttccttc-3'	5'-atctccttctgcacctctgc-3'	
<i>Per2</i>	5'-ccagaggaactagcctataagaacca-3'	5'-gaactgcacttcctttcagg-3'	(Furukawa <i>et al.</i> , 2005)
<i>Bmal1</i>	5'-cagtgccactgactaccaagaaa-3'	5'-cctccaagcattcttgatcc-3'	(Furukawa <i>et al.</i> , 2005)
<i>Dbp</i>	5'-aggaaactgaagcctcaaccaatc-3'	5'-ctccggctccagtacttctcat-3'	(Furukawa <i>et al.</i> , 2005)
<i>Aqp5</i>	5'-ggccctcttaataggcaacc-3'	5'-ttgcctggtgtgtgtgtt-3'	(Zheng <i>et al.</i> , 2012)
<i>Amy</i>	5'-ggatggagaaaagatgtcctac-3'	5'-catcaccctgtgaaacc-3'	(Mishima <i>et al.</i> , 2012)

6. 胎仔および新生仔顎下腺における生物発光測定

胎生期顎下腺を採取するため、雌マウスの輪回し行動を測定し交配日を決定した。発情前期に該当する雌マウスを ZT12 から ZT0 まで雄 *Per2::luc* マウスと同一ケージ内に入れて交配させた。妊娠の成立は交配後の輪回し行動量の減少を以て確認した。交配翌日の ZT6 を胎生 0.5 日齢とした。実験には胎生 13.5 日齢, 14.5 日齢, 15.5 日齢, 16.5 日齢及び 17.5 日齢の胎仔を各 8 匹使用した。ZT6 に母マウスにエーテル麻酔を施し、頸椎脱臼を行い、Sakai らの方法に従って顎下腺を摘出した(Sakai & Onodera, 2008)。母マウスの腹部から子宮を摘出し、4°C の DMEM/F-12 (GIBCO®) に移した。子宮から胎仔を摘出してガラス製の解剖プレート上へ横向きに静置した。実体顕微鏡下においてメスにて頸部と口角の 2 点で平行に切断し、下顎を分離した。下顎から舌に付着している顎下腺を分離し、Nuclepore Track-Etch Membranes (Whatman®) 上に載せ、150 µg/ml ascorbic acid, 50 µg/ml transferrin 及び 0.1 mM luciferin を添加した DMEM/F-12 を加えた 35 mm dish で浮遊培養した。Dish を封入し、5% CO₂ 条件下 36°C インキュベーター内で生物発光を連続的に測定した。

新生仔は出生日を生後 0 日齢とし、生後 0 日齢, 生後 1 日齢, 生後 7 日齢, 生後 14 日齢, 生後 21 日齢及び生後 28 日齢を使用した。ZT6 にエーテル麻酔を施し頸部切断または頸椎脱臼を行い、顎下腺と脳を摘出した。視交叉上核は前述の方法で切片を作成し、生物発光を記録した。顎下腺は、生後 0 日齢, 生後 1 日齢及び生後 7 日齢は全体を使用し、生後 14 日齢, 生後 21 日齢及び生後 28 日

齢は小片に分離して生物発光を記録した。成体マウスは 8-12 週齢を 10 匹使用した。

7. データ解析

生物発光の測定記録解析は、Nakamura らの方法を一部改変して行った (Nakamura *et al.*, 2005)。1 分ごとの時系列データとして取得された生物発光記録から 24 時間移動平均を減じ、3 時間の移動平均により平滑化した。平滑化したデータにおいて、生物発光の測定開始後 12-36 時間の最高点を頂値位相とした。概日周期は、測定開始から 12 時間後以降の 4 サイクルの頂点間の時間を算出し、その平均値とした。

RNA 発現解析には、 Δ CT 法を改変して用いた (Wong & Medrano, 2005)。各遺伝子の qPCR の CT 値を β -Actin で相対値補正し、6 点 (生体内) または 4 点 (体外培養下) の平均値により標準化した。Cry1^{-/-} Cry2^{-/-} 顎下腺の mRNA 発現量は β -Actin で相対値補正し、対照群野生型の平均値により標準化した。時間依存的な mRNA 発現の日内リズム解析はコサイナー法で行い、Circadian Physiology software (<http://www.circadian.org/software.html>) を使用した。多群間の統計学的解析には、one-way analysis of variance (ANOVA) 及び Scheffé's post-hoc test, Dunnett's test を用い、2 群間の比較は Student's t test で行った。

結果

1. 野生型と *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}* マウス顎下腺における遺伝子発現の日内変動

野生型マウス顎下腺（各点 n = 6）における mRNA 発現を時刻依存的に定量した。*Per2* mRNA の発現量は日内変動を示し [F (5, 30) = 115.2, $P < 0.01$], コサインナー法を用いた解析から頂値位相は ZT15 であった (Fig. 1a). *Bmal1* mRNA の発現量は日内変動を示し [F (5, 30) = 47.3, $P < 0.01$], ZT23 に発現の頂値位相を示した (Fig. 1b). *Per2* と *Bmal1* mRNA の日内発現リズムは互いに逆位相であった。*Dbp* mRNA の発現量は日内変動を示し [F (5, 30) = 51.1, $P < 0.01$], 頂値位相は ZT11 であった (Fig. 1c). *Per2* と *Dbp* の発現リズムは4時間の位相差を示した。*Aqp5* の mRNA 発現は日内変動を示し [F (5, 30) = 3.96, $P < 0.01$], ZT15 に頂値位相を示した (Fig. 1d). 一方, *Amy* mRNA の発現は有意な日内変動を示さなかった [Fig. 1e; F (5, 30) = 0.63, $P = 0.68$].

Cry1^{-/-}Cry2^{-/-} 顎下腺では, *Per2* [Fig. 1a; F (5, 12) = 0.71, $P = 0.63$], *Bmal1* [Fig. 1b; F (5, 12) = 0.53, $P = 0.75$], *Dbp* [Fig. 1c; F (5, 12) = 0.07, $P = 0.99$], *Aqp5* [Fig. 1d; F (5, 12) = 0.18, $P = 0.96$] 及び *Amy* [Fig. 1e; F (5, 12) = 0.86, $P = 0.53$] mRNA の発現に日内変動を示さなかった (Fig. 1; 各点 n = 3).

2. *Cry1^{-/-}* 及び *Cry2^{-/-}* マウス視交叉上核および顎下腺における PER2 概日リズム

生物発光を指標とした局在測定の結果, 顎下腺において PER2 は腺房部に発現を示した (Fig. 2a). 連続的な生物発光測定の結果から成体から摘出した培養顎下腺組織は, 野生型, *Cry1^{-/-}*, *Cry2^{-/-}* いずれも概日リズムを示した (Fig. 2c). 顎下腺の PER2 概日リズムは, 2 サイクル以降に振幅の減衰を生じた [Fig. 2d; F(4,

24) = 12.9, $P < 0.01$]. PER2 概日リズムの周期は, 野生型顎下腺で 23.0 ± 0.8 時間であった. $Cry1^{-/-}$ 顎下腺の概日周期は 20.3 ± 0.4 時間であり, 野生型顎下腺と比較して有意な短縮を示し, $Cry2^{-/-}$ 顎下腺では 25.1 ± 0.8 時間と有意な延長を示した [Fig. 2e; 各 $n = 8$, $F(2, 21) = 93.3$, $P < 0.01$].

視交叉上核は破線で示す領域に存在し (Fig. 2b), その生物発光強度は概日リズムを示した (Fig. 2f). 視交叉上核では, 顎下腺の PER2 概日リズムで見られたような, 生物発光リズム振幅の減衰が認められなかった [Fig. 2g; $F(4, 20) = 0.47$, $P = 0.76$]. PER2 発現の概日リズム周期は, 野生型視交叉上核で 24.2 ± 1.1 時間であった. $Cry1^{-/-}$ 視交叉上核の概日周期は 22.1 ± 0.6 時間であり, 野生型視交叉上核と比較して有意な短縮を示し, $Cry2^{-/-}$ 視交叉上核では 26.3 ± 1.1 時間と有意な延長を示した [Fig. 2h; 各 $n = 8$, $F(2, 21) = 38.2$, $P < 0.01$]. 視交叉上核と顎下腺の PER2 概日リズム周期を比較すると, いずれの遺伝型においても顎下腺が示す概日周期が短かった.

3. 培養顎下腺組織における遺伝子発現の概日変動

培養条件下顎下腺における *Per2*, *Bmal1*, *Dbp*, *Aqp5*, *Amy* の時間依存的な mRNA 発現の変動を定量した. *Per2* mRNA の発現は概日変動を示し, 組織摘出前の飼育条件における ZT18 に最大値を示した [Fig. 3a; $n = 5$, $F(3, 16) = 15.9$, $P < 0.01$]. *Bmal1* mRNA の発現は概日変動を示し, *Per2* 発現が最大であった ZT18 に最小値を示した [Fig. 3b; $n = 5$, $F(3, 16) = 8.3$, $P < 0.01$]. *Per2* 及び *Bmal1* mRNA 発現の概日変動は互いに逆位相であり, 生体内における *Per2* 及び *Bmal1* 発現変動の位相関係と同様であった.

Dbp mRNA の発現は概日変動を示し、最大値は ZT12 であった [Fig. 3c; n = 5, $F(3, 16) = 50.5, P < 0.01$]. *Dbp* mRNA の発現リズムは、生体内と生体外培養下で類似していた.

Aqp5 mRNA の発現は概日変動を示し [Fig. 3d; n = 5, $F(3, 16) = 106.3, P < 0.01$], ZT12 に最大値を示した. 生体外培養下における *Aqp5* のリズム位相は、生体内と比較して 4 時間前方に変位していた. 生体内で発現変動を示さなかった *Amy* mRNA は生体外培養下では概日変動を示し [Fig. 3e; n = 5, $F(3, 16) = 40.9, P < 0.01$], 発現の最大値は ZT12 であった. 概日変動の有意性と概日リズム位相から、培養顎下腺における *Aqp5* 及び *Amy* mRNA は、*Dbp* mRNA と同様の発現パターンを示した.

4. 胎生期顎下腺における PER2 概日リズム

胎生期顎下腺の概日リズム発振時期を明らかにするため、単房状の胎生 13.5 日齢顎下腺と出生直前の胎生 17.5 日齢顎下腺における PER2 発現について検討を行った. 胎生 13.5 日齢顎下腺では分枝形態形成が進行する一方で、PER2 発現は一定状態で推移し、概日リズムを示さなかった (Fig. 4a, c). 胎生 13.5 日齢顎下腺に対して、胎生 17.5 日齢顎下腺では明瞭な PER2 発現概日リズムを示した (Fig. 4b, d).

出生前の顎下腺に PER2 概日リズムが発振することが明らかとなったため、胎生 13.5 日齢から 17.5 日齢まで 1 日ごとに顎下腺における PER2 発現の測定を行い、概日リズムの発振開始時期の同定を試みた. PER2 発現は各胎生日で発現パターンが異なり、胎生 17.5 日齢で明瞭な概日リズムを確立した (Fig. 5a, b, c, d, e;

各 $n = 8$). 8-12 週齡顎下腺における PER2 概日リズムは培養開始から 12.7 ± 1.8 時間後に頂値を示したのに対し, 胎生 17.5 日齡顎下腺では培養開始から 21.5 ± 0.4 時間後であり, 互いの PER2 概日リズムは逆位相を示した (Fig. 5e, f; 各 $n = 8$). また, 組織摘出・培養開始直後には概日リズムを示さなかった胎生 13.5 日齡顎下腺は, 17 日間の器官培養を行うことで, 培養 13 日目に明瞭な概日リズムを確立した (Fig. 5g; $n = 8$).

5. 視交叉上核および顎下腺における PER2 概日リズムの生後発達

出生後における PER2 概日リズムの頂値位相の変位過程を検証するため, 生後 0 日齡, 1 日齡, 7 日齡, 14 日齡, 21 日齡及び 28 日齡の視交叉上核と顎下腺における PER2 概日リズムを比較した. 視交叉上核及び顎下腺の PER2 発現は生後 0 日齡から明瞭な概日リズムを示した. 視交叉上核における頂値位相は, 生後 0 日齡で $ZT15.5 \pm 1.1$, 生後 1 日齡で $ZT15.0 \pm 1.7$, 生後 7 日齡で $ZT14.5 \pm 1.8$, 生後 14 日齡で $ZT14.4 \pm 0.3$, 生後 21 日齡で $ZT12.5 \pm 0.7$, 生後 28 日齡で $ZT13.6 \pm 0.9$ であり, 8-12 週齡の成体マウス視交叉上核の $ZT13.8 \pm 0.9$ と違いはなかった (Fig. 6a, Fig. 7a). 顎下腺の頂値位相は, 8-12 週齡の成体マウス顎下腺で $ZT18.5 \pm 1.8$ であった. これに対して, 生後 0 日齡で $ZT2.3 \pm 2.2$, 生後 1 日齡で $ZT3.4 \pm 5.2$ であり, 頂値位相は有意に前方変位していた (Fig. 7b, d; $P < 0.01$). 生後 7 日齡で $ZT12.6 \pm 1.3$, 生後 14 日齡で $ZT12.1 \pm 1.2$, 生後 21 日齡で $ZT14.3 \pm 0.8$ であり, 頂値位相の後退を示したが, 8-12 週齡と比較すると有意に前方であった ($P < 0.01$). 生後 28 日齡では $ZT16.4 \pm 1.4$ となり, 8-12 週齡の成体マウス顎下腺と有意差を示さなかった (Fig. 6b, Fig. 7b; $P > 0.05$).

考察

1. 顎下腺 PER2 発現の概日リズム

概日時計の分子機構は、時計遺伝子のプロモーター領域に存在する E-box による発現制御を中心とした転写・翻訳フィードバックループ機構によって発振することが示唆されている(Ueda *et al.*, 2005). 概日リズムのフィードバックループモデルの中で、CRY1 及び CRY2 は、E-box モチーフに結合する転写活性化因子・BMAL1-CLOCK ヘテロ二量体の機能を制御する抑制因子として作用する(Kume *et al.*, 1999). *Cry1* 欠損マウスまたは *Cry2* 欠損マウスは行動概日リズムの自由継続周期が各々短縮、延長し(van der Horst *et al.*, 1999; Vitaterna *et al.*, 1999), *Cry1*^{-/-}*Cry2*^{-/-}マウスは行動、代謝や生理機能に概日周期性を示さないことが明らかになっている(Matsuo *et al.*, 2003; Doi *et al.*, 2010). 本研究において、培養顎下腺組織は明瞭な PER2 概日リズムを示すと共に、*Cry1* 欠損により概日周期の短縮を、*Cry2* 欠損により概日周期の延長を認めた. 更に *Cry1*^{-/-}*Cry2*^{-/-}マウスは顎下腺における遺伝子発現に概日リズムを示さず、*Per2* 発現量は定常高値、*Bmal1* 発現量は定常低値を示した. また、顎下腺における *Per2* および *Bmal1* の発現リズムの位相関係が逆位相となることも分子時計フィードバックループモデルに合致する. 以上より、顎下腺に転写・翻訳フィードバックループによる分子時計機構が存在し、CRY は概日周期を調節すると共にリズム発振に不可欠な因子であると結論できる.

2. 顎下腺における時計制御遺伝子及び唾液腺機能分子発現の概日変動

Dbp は E-box を介した発現制御を受け, 明瞭な概日リズムを示す時計制御遺伝子である(Ueda *et al.*, 2005). 顎下腺の *Dbp* mRNA 発現は生体内と生体外培養下の両方で概日変動を示し, 頂値位相はいずれも ZT12 であった. *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}*顎下腺では E-box を介する強力な抑制因子である CRY が存在せず, *Dbp* mRNA の発現は常に高値で発現し, 日内変動を示さなかった. これらの結果は, 顎下腺においても *Dbp* 発現が E-box を介した転写制御に強く依存していることを示している.

Aqp5 mRNA の発現は生体内と生体外培養下の両方で概日変動を示したが, *Dbp* の発現リズムと比較した場合, 生体内ではリズム位相の後退を示した. *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}*顎下腺では発現量は定常高値を示した *Dbp* mRNA と異なり, 中間で一定値を示した. これらのことから, *Aqp5* mRNA は E-box を介した発現制御を受け概日発現リズムを示すが, 複合的に生体内の何らかの同調因子によるリズム調節を受けていると考えられる. AQP は水チャネルとして機能する膜タンパク質であり(Preston *et al.*, 1992), 現在までに AQP0-12 までの 13 種類が発見されている. その中で唾液腺には AQP1, 3, 4, 5 及び 8 が発現している (Castle, 2005; Verkman, 2005; Delporte & Steinfeld, 2006). ノックアウトマウスを用いた研究から, AQP5 が顎下腺からの水分分泌に関与することが明らかとなっている (Ma *et al.*, 1999; Krane *et al.*, 2001). 本研究の結果と共に, *Aqp5* の発現変動が安静時唾液の概日リズム形成に重要な役割を担っていると考えられる.

Amy mRNA の発現は生体内で概日変動を示さなかったが、生体外培養下で *Dbp* mRNA と類似した発現パターンの概日変動を示した。ヒトでは味刺激によってアミラーゼ分泌量が亢進することが知られており (Froehlich *et al.*, 1987), さらに“ストレスマーカー”として用いられることからわかるように交感神経活動を反映した急性分泌制御を受ける。アミラーゼは糖質分解酵素として機能し、口腔領域への刺激に応じて発現するタイミングが調整されることは合目的であると考えられる。本研究の結果から、*Amy* は培養条件下のような定常状態では E-box を介した概日発現リズムを示すが、生体内ではその発現制御は軽微であり、むしろ環境応答がベースにある概日変動をマスクしていると考えられる。

3. 胎生期顎下腺の PER2 概日リズム

マウスの唾液腺発生は胎生 11-12 日に間葉組織に上皮組織が陥入することから開始される。単房状の上皮組織にクレフトが生じ、分枝形成及び導管伸長による形態形成が進行する (Tucker, 2007)。この過程は腎臓、肺、涙腺、乳腺などに共通しており、唾液腺は上皮 - 間葉相互作用及び分枝形態形成のモデル器官として用いられてきた (Borghese, 1950a; b)。顎下腺において単房状の胎生 13.5 日は概日リズムを示さなかった。しかしながら、胎生 13.5 日齢顎下腺を長期間の器官培養を行うことで、生体外試験管内で PER2 発現の概日リズムが出現した。この結果は、顎下腺には発生初期段階で既に内在性に時計機能を獲得していることを示しており、胎生期顎下腺の器官培養を用いることで、唾液腺初期発生における形態形成と機能獲得及び概日時計機能獲得の機構解明に応用可能であると考えられる。

4. PER2 概日リズムの生後発達

生後発達期において、視交叉上核では出生直後から成体と同位相の概日リズムを示したことから、一貫して環境明暗サイクルが主要な同調因子として機能することが推察される。これまでに、新生仔ラットでは親ラットと過ごす時間帯が変化すると、リズム位相が一定である視交叉上核に対し、肝臓ではリズム位相が変位することが報告されている(Yamazaki *et al.*, 2009)。本研究では、吸啜期の生後 0 日齢、1 日齢と 7 日齢、吸啜と咀嚼が可能な生後 14 日齢と 21 日齢、離乳後咀嚼のみを行う生後 28 日齢の顎下腺概日リズムを比較・検討した。顎下腺の概日リズムは経日的にリズム位相が変位し、離乳直前まで成体マウス顎下腺より有意にリズム位相が前進していた。これに対して、離乳 1 週間後の生後 28 日齢では、成体マウス顎下腺と同位相の概日リズムを示した。これらの結果は、顎下腺が出生直後に環境明暗サイクルに同調する視交叉上核の制御が主要同調因子として作用していないことを示すと共に、生後発達過程において、母仔行動のタイミング、口腔機能の発達に伴い推移する食餌時間・様式等が概日リズム同調因子として作用すると考えられる。

結論

マウス顎下腺は、時計遺伝子の転写・翻訳フィードバックループに依存した自律的な内因性概日リズムを発振することが明らかとなった。唾液腺機能分子の遺伝子発現は顎下腺自体の内因性概日リズムと共に、視交叉上核によって駆動される受動的な概日リズムに制御される。また、顎下腺発生初期には概日リズム発振機構が内在しており胎生期に明瞭な概日リズムが確立する。顎下腺は

生後発達期に受動的な内因性リズムを基盤に外因性リズムを同調因子として、
唾液腺機能が最適なタイミングで発揮される概日リズム位相を確立すべく成熟
していく。

謝辞

本研究の遂行にあたり，ご指導，ご助言を賜りました顎口腔機能治療学教室 阪井丘芳教授並びに口腔時間生物研究室 中村 渉准教授に深甚なる謝意を評します．また，博士課程在学中に多大なるご助力をいただきました帝京平成大学薬学部薬学科 中村孝博先生，口腔時間生物学研究室 中村奈々博士、顎口腔機能治療学研究室の先生方に厚く御礼申し上げます．

参考文献

Abe, K. & Dawes, C. (1978) The effects of electrical and pharmacological stimulation on the types of proteins secreted by rat parotid and submandibular glands. *Arch Oral Biol*, **23**, 367-372.

Abe, M., Herzog, E.D., Yamazaki, S., Straume, M., Tei, H., Sakaki, Y., Menaker, M. & Block, G.D. (2002) Circadian rhythms in isolated brain regions. *J Neurosci*, **22**, 350-356.

Basso, A. & Piantanelli, L. (2002) Influence of age on circadian rhythms of adrenoceptors in brain cortex, heart and submandibular glands of BALB/c mice: when circadian studies are not only useful but necessary. *Exp Gerontol*, **37**, 1441-1450.

Bellavia, S.L., Sanz, E.G., Sereno, R. & Vermouth, N.T. (1992) Alpha-amylase circadian rhythm of young rat parotid gland: an endogenous rhythm with maternal coordination. *Arch Oral Biol*, **37**, 429-433.

Borghese, E. (1950a) The development in vitro of the submandibular and sublingual glands of *Mus musculus*. *J Anat*, **84**, 287-302.

Borghese, E. (1950b) Explantation experiments on the influence of the connective tissue capsule on the development of the epithelial part of the submandibular gland of *Mus musculus*. *J Anat*, **84**, 303-318.

Brosky, M.E. (2007) The role of saliva in oral health: strategies for prevention and management of xerostomia. *J Support Oncol*, **5**, 215-225.

Castle, N. (2005) Aquaporins as targets for drug discovery. *Drug Discovery Today*, **10**, 485-493.

Cohen, S. (1962) Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *J Biol Chem*, **237**, 1555-1562.

Dawes, C. (1972) Circadian rhythms in human salivary flow rate and composition. *J Physiol*, **220**, 529-545.

Delporte, C. & Steinfeld, S. (2006) Distribution and roles of aquaporins in salivary glands. *Biochim Biophys Acta*, **1758**, 1061-1070.

Doi, M., Takahashi, Y., Komatsu, R., Yamazaki, F., Yamada, H., Haraguchi, S., Emoto, N., Okuno, Y., Tsujimoto, G., Kanematsu, A., Ogawa, O., Todo, T., Tsutsui, K., van der Horst, G.T. & Okamura, H. (2010) Salt-sensitive hypertension in circadian clock-deficient *Cry*-null mice involves dysregulated adrenal *Hsd3b6*. *Nat Med*, **16**, 67-74.

Froehlich, D.A., Pangborn, R.M. & Whitaker, J.R. (1987) The effect of oral stimulation on human parotid salivary flow rate and alpha-amylase secretion. *Physiol Behav*, **41**, 209-217.

Furukawa, M., Kawamoto, T., Noshiro, M., Honda, K.K., Sakai, M., Fujimoto, K., Honma, S., Honma, K., Hamada, T. & Kato, Y. (2005) Clock gene expression in the submandibular glands. *J Dent Res*, **84**, 1193-1197.

Garrett, J.R., Suleiman, A.M., Anderson, L.C. & Proctor, G.B. (1991) Secretory responses in granular ducts and acini of submandibular glands in vivo to parasympathetic or sympathetic nerve stimulation in rats. *Cell Tissue Res*, **264**, 117-126.

Garrett, J.R. & Thulin, A. (1975) Changes in parotid acinar cells accompanying salivary secretion in rats on sympathetic or parasympathetic nerve stimulation. *Cell Tissue Res*, **159**, 179-193.

Krane, C.M., Melvin, J.E., Nguyen, H.V., Richardson, L., Towne, J.E., Doetschman, T. & Menon, A.G. (2001) Salivary acinar cells from aquaporin 5-deficient mice have decreased membrane water permeability and altered cell volume regulation. *J Biol Chem*, **276**, 23413-23420.

Kume, K., Zylka, M.J., Sriram, S., Shearman, L.P., Weaver, D.R., Jin, X., Maywood, E.S., Hastings, M.H. & Reppert, S.M. (1999) mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell*, **98**, 193-205.

Levine, M.J. (1993) Development of artificial salivas. *Crit Rev Oral Biol Med*, **4**, 279-286.

Ma, T., Song, Y., Gillespie, A., Carlson, E.J., Epstein, C.J. & Verkman, A.S. (1999) Defective secretion of saliva in transgenic mice lacking aquaporin-5 water channels. *J Biol Chem*, **274**, 20071-20074.

Matsuo, T., Yamaguchi, S., Mitsui, S., Emi, A., Shimoda, F. & Okamura, H. (2003) Control mechanism of the circadian clock for timing of cell division in vivo. *Science*, **302**, 255-259.

Mishima, K., Inoue, H., Nishiyama, T., Mabuchi, Y., Amano, Y., Ide, F., Matsui, M., Yamada, H., Yamamoto, G., Tanaka, J., Yasuhara, R., Sakurai, T., Lee, M.C., Chiba, K., Sumimoto, H., Kawakami, Y., Matsuzaki, Y., Tsubota, K. & Saito, I. (2012) Transplantation of side population cells restores the function of damaged exocrine glands through clusterin. *Stem cells*, **30**, 1925-1937.

Nakamura, W., Yamazaki, S., Takasu, N.N., Mishima, K. & Block, G.D. (2005) Differential response of Period 1 expression within the suprachiasmatic nucleus. *J Neurosci*, **25**, 5481-5487.

Ohta, H., Xu, S., Moriya, T., Iigo, M., Watanabe, T., Nakahata, N., Chisaka, H., Hanita, T., Matsuda, T., Ohura, T., Kimura, Y., Yaegashi, N., Tsuchiya, S., Tei, H. & Okamura, K. (2008) Maternal feeding controls fetal biological clock. *PloS one*, **3**, e2601.

Preston, G.M., Carroll, T.P., Guggino, W.B. & Agre, P. (1992) Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science*, **256**, 385-387.

Reppert, S.M. & Schwartz, W.J. (1983) Maternal coordination of the fetal biological clock in utero. *Science*, **220**, 969-971.

Reppert, S.M. & Schwartz, W.J. (1984) The suprachiasmatic nuclei of the fetal rat: characterization of a functional circadian clock using ¹⁴C-labeled deoxyglucose. *J Neurosci*, **4**, 1677-1682.

Reppert, S.M. & Weaver, D.R. (2002) Coordination of circadian timing in mammals. *Nature*, **418**, 935-941.

Sakai, T. & Onodera, T. (2008) Embryonic organ culture. *Curr Protoc Cell Biol*, **Chapter 19**, Unit 19.18.

Schneyer, L.H. & Levin, L.K. (1955) Rate of secretion by individual salivary gland pairs of man under conditions of reduced exogenous stimulation. *J Appl Physiol*, **7**, 508-512.

Shannon, I.L., Suddick, R.P. & Chauncey, H.H. (1969) Effect of atropine-induced flow rate depression on the composition of unstimulated human parotid fluid. *Arch Oral Biol*, **14**, 761-770.

Shimomura, H., Moriya, T., Sudo, M., Wakamatsu, H., Akiyama, M., Miyake, Y. & Shibata, S. (2001) Differential daily expression of Per1 and Per2 mRNA in the suprachiasmatic nucleus of fetal and early postnatal mice. *Euro J Neurosci*, **13**, 687-693.

Siminoski, K., Bernanke, J. & Murphy, R.A. (1993) Nerve growth factor and epidermal growth factor in mouse submandibular glands: identical diurnal changes and rates of secretagogue-induced synthesis. *Endocrinology*, **132**, 2031-2037.

Tucker, A.S. (2007) Salivary gland development. *Semin Cell Dev Biol*, **18**, 237-244.

Ueda, H.R., Hayashi, S., Chen, W., Sano, M., Machida, M., Shigeyoshi, Y., Iino, M. & Hashimoto, S. (2005) System-level identification of transcriptional circuits underlying mammalian circadian clocks. *Nat genet*, **37**, 187-192.

van der Horst, G.T., Muijtjens, M., Kobayashi, K., Takano, R., Kanno, S., Takao, M., de Wit, J., Verkerk, A., Eker, A.P., van Leenen, D., Buijs, R., Bootsma, D., Hoeijmakers, J.H. & Yasui, A. (1999) Mammalian Cry1 and Cry2 are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature*, **398**, 627-630.

Verkman, A.S. (2005) More than just water channels: unexpected cellular roles of aquaporins. *J Cell Sci*, **118**, 3225-3232.

Vitaterna, M.H., Selby, C.P., Todo, T., Niwa, H., Thompson, C., Fruechte, E.M., Hitomi, K., Thresher, R.J., Ishikawa, T., Miyazaki, J., Takahashi, J.S. & Sancar, A. (1999)

Differential regulation of mammalian period genes and circadian rhythmicity by cryptochromes 1 and 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 12114-12119.

Wong, M.L. & Medrano, J.F. (2005) Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques*, **39**, 75-85.

Yamazaki, S. (2000) Resetting Central and Peripheral Circadian Oscillators in Transgenic Rats. *Science*, **288**, 682-685.

Yamazaki, S., Yoshikawa, T., Biscoe, E.W., Numano, R., Gallaspy, L.M., Soulsby, S., Papadimas, E., Pezuk, P., Doyle, S.E., Tei, H., Sakaki, Y., Block, G.D. & Menaker, M. (2009) Ontogeny of circadian organization in the rat. *J Biol Rhythms*, **24**, 55-63.

Yoo, S.H., Yamazaki, S., Lowrey, P.L., Shimomura, K., Ko, C.H., Buhr, E.D., Siepk, S.M., Hong, H.K., Oh, W.J., Yoo, O.J., Menaker, M. & Takahashi, J.S. (2004) PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 5339-5346.

Zheng, L., Seon, Y.J., McHugh, J., Papagerakis, S. & Papagerakis, P. (2012) Clock genes show circadian rhythms in salivary glands. *J Dent Res*, **91**, 783-788.

図説明

Figure 1 マウス顎下腺における遺伝子発現の日内変動

野生型マウス顎下腺 (●) 及び *Cry1^{-/-} Cry2^{-/-}* マウス顎下腺 (○) における *Per2* (a), *Bmal1* (b), *Dbp* (c), *Aqp5* (d), *Amy* (e) mRNA の発現を示す. mRNA の相対発現量を平均値 + 標準偏差で表している. 横軸は同調時間 (ZT) を表しており, 明期の開始時刻を ZT0, 暗期の開始時刻を ZT12 とした. 縦軸は対数で表記し, 6 点の mRNA 発現量の平均値で標準化した. 図中の白黒のバーは明期と暗期を示している. 統計学的処理は one-way ANOVA と Scheffe's post-hoc test にて行った (* $P < 0.01$).

Figure 2 *Cry1^{-/-}* 及び *Cry2^{-/-}* マウスの視交叉上核, 顎下腺における PER2 概日リズム

マウス顎下腺の明視野像と発光像を示し, 発光強度は擬似色で表している (a). 視交叉上核を破線で示している (b). 野生型, *Cry1^{-/-}* 及び *Cry2^{-/-}* 顎下腺 PER2 概日リズムの代表例を示し, 縦軸は発光強度, 横軸は培養時間を表している (c; 各 $n = 8$). 野生型顎下腺 PER2 概日リズム振幅を平均値 \pm 標準偏差で示し, 横軸はサイクル数を表している (d). 各遺伝型における顎下腺 PER2 概日周期を平均値 \pm 標準偏差で示す (e). 野生型, *Cry1^{-/-}* 及び *Cry2^{-/-}* 視交叉上核の生物発光リズムの代表例 (f; 各 $n = 8$) と野生型視交叉上核 PER2 概日リズム振幅強度の推移 (g) を平均値 \pm 標準偏差で表している. 各遺伝型における視交叉上核 PER2 概日周期を平均値 \pm 標準偏差で示す (h). スケールバーは 250 μm を表す. 統計学的処理は one-way ANOVA と Scheffe's post-hoc test にて行った (* $P < 0.01$).

Figure 3 生体外培養条件下顎下腺における遺伝子発現の概日変動

Per2 (a), *Bmal1* (b), *Dbp* (c), *Aqp5* (d) 及び *Amy* (e) mRNA 発現を示す。周期性の有無を明確にするため 14:00 はダブルプロットで表記している。縦軸は 4 点の mRNA 発現量の平均値で標準化し、平均値 ± 標準偏差で表している。横軸は時刻を示し、白黒のバーは組織摘出前の飼育条件における明期と暗期を表している。統計学的処理は one-way ANOVA と Scheffé's post-hoc test にて行った (* $P < 0.01$)。

Figure 4 胎生期顎下腺における PER2 概日リズム

胎生 13.5 日顎下腺の明視野像と発光像を示し、発光強度は擬似色で表している (a)。黒スケールバーは 500 μm を示している。胎生 17.5 日齡顎下腺の明視野像と発光像を示す (b)。白スケールバーは 500 μm を示している。胎生 13.5 日齡顎下腺 (c) 及び胎生 17.5 日齡顎下腺 (d) の生物発光を指標とした PER2 概日リズムを示す。縦軸は生物発光強度、横軸は培養開始後の経過時間を示している。

Figure 5 経日的な胎生期顎下腺の PER2 概日リズム発振過程

胎生 13.5 日齡 (a), 14.5 日齡 (b), 15.5 日齡 (c), 16.5 日齡 (d), 17.5 日齡 (e) 及び 8 週齡 (f) 顎下腺の PER2 発現変動を示す。胎生期顎下腺は代表 4 例を、成体顎下腺は代表 1 例を示す (各 $n = 8$)、縦軸は生物発光量を、横軸は培養経過時間を示し、培養開始時刻を 0 と表している。胎生 13.5 日齡顎下腺の長期器官培養における PER2 発現変動を示す (g)。図中の矢印は培地交換を表しており、縦軸は生物発光強度、横軸は培養開始後の経過日数を示している。

Figure 6 視交叉上核及び顎下腺における概日リズムの生後発達

生後 0 日齢, 1 日齢, 7 日齢, 14 日齢, 21 日齢, 28 日齢における視交叉上核 (a) 及び顎下腺 (b) PER2 概日リズムの代表例を示す. 縦軸は生物発光強度, 横軸は培養開始後の経過時間を示し, 各組織を調整した時間を 0 で表している.

Figure 7 生後発達における視交叉上核と顎下腺 PER2 発現概日リズム位相の変遷

生後 0 日齢, 1 日齢, 7 日齢, 14 日齢, 21 日齢, 28 日齢及び 8-12 週齢の視交叉上核 (a) と顎下腺 (b) における PER2 概日リズムの頂点位相を平均値 \pm 標準偏差で示している. 横軸は時刻を示し, 縦軸は日齢及び週齢を示している. 白黒のバーは明期と暗期を表す. 統計学的処理は one-way ANOVA と Dunnett's test にて行った (* $P < 0.01$).

Figure 1

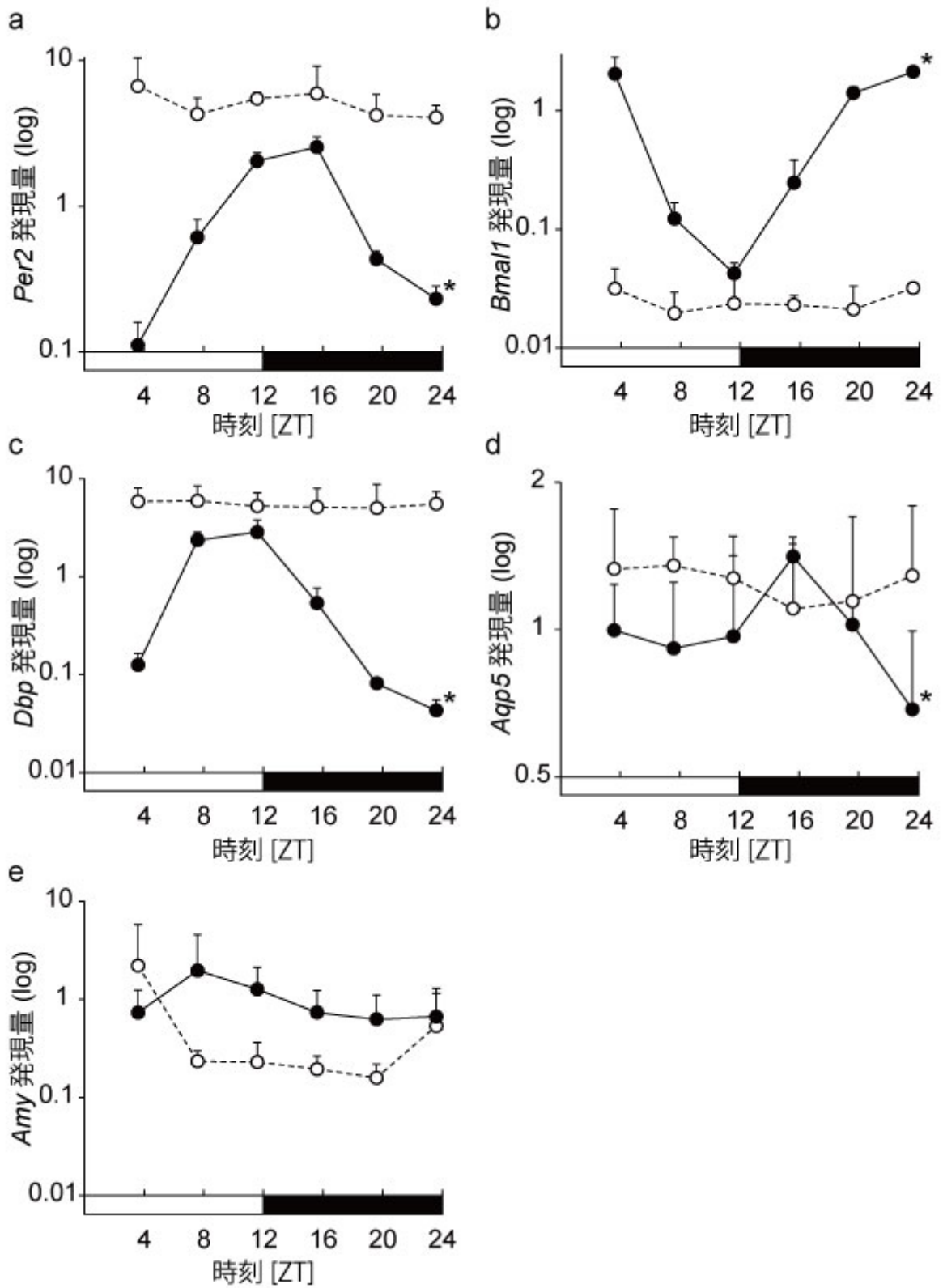


Figure 2

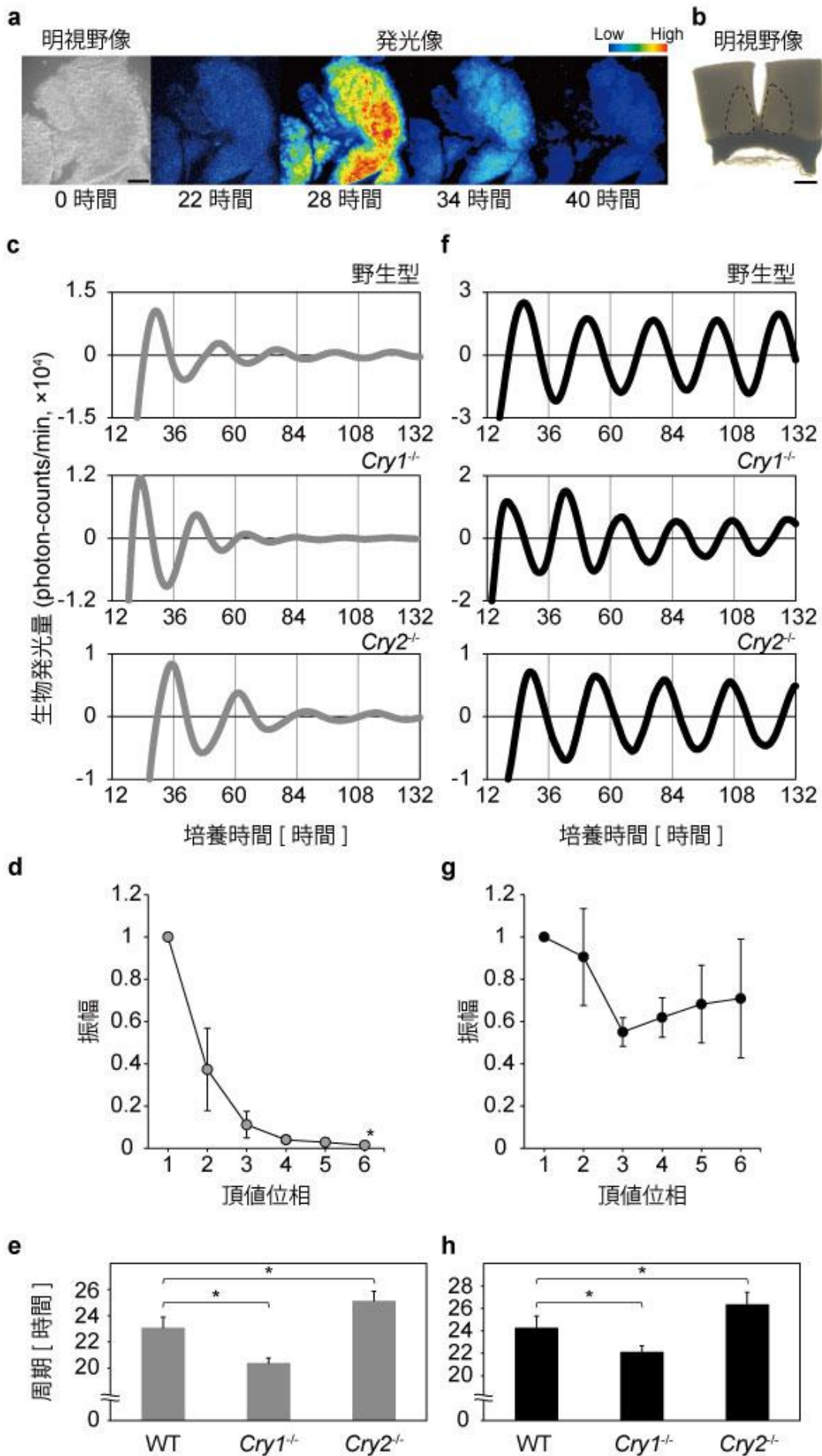


Figure 3

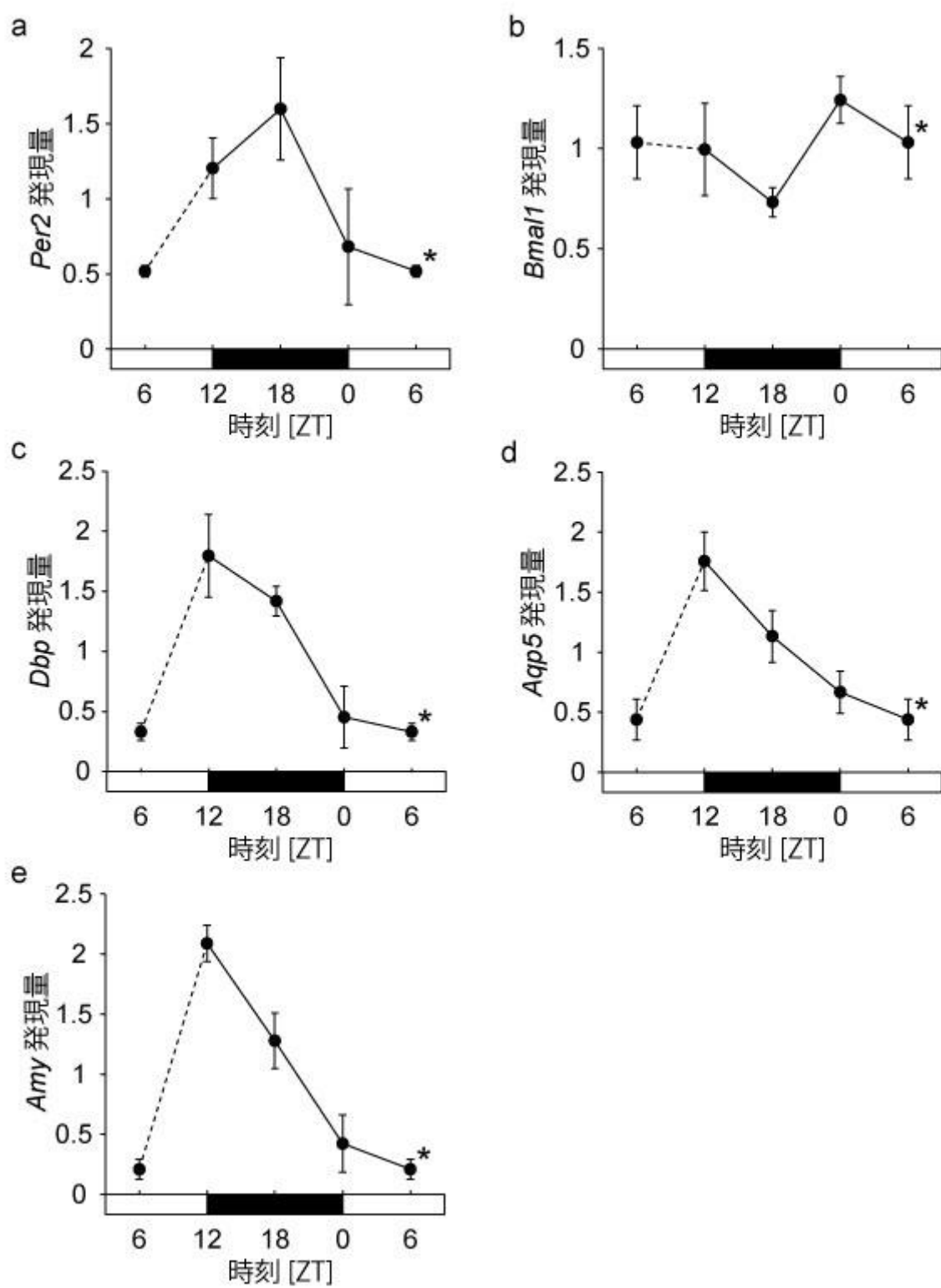


Figure 4

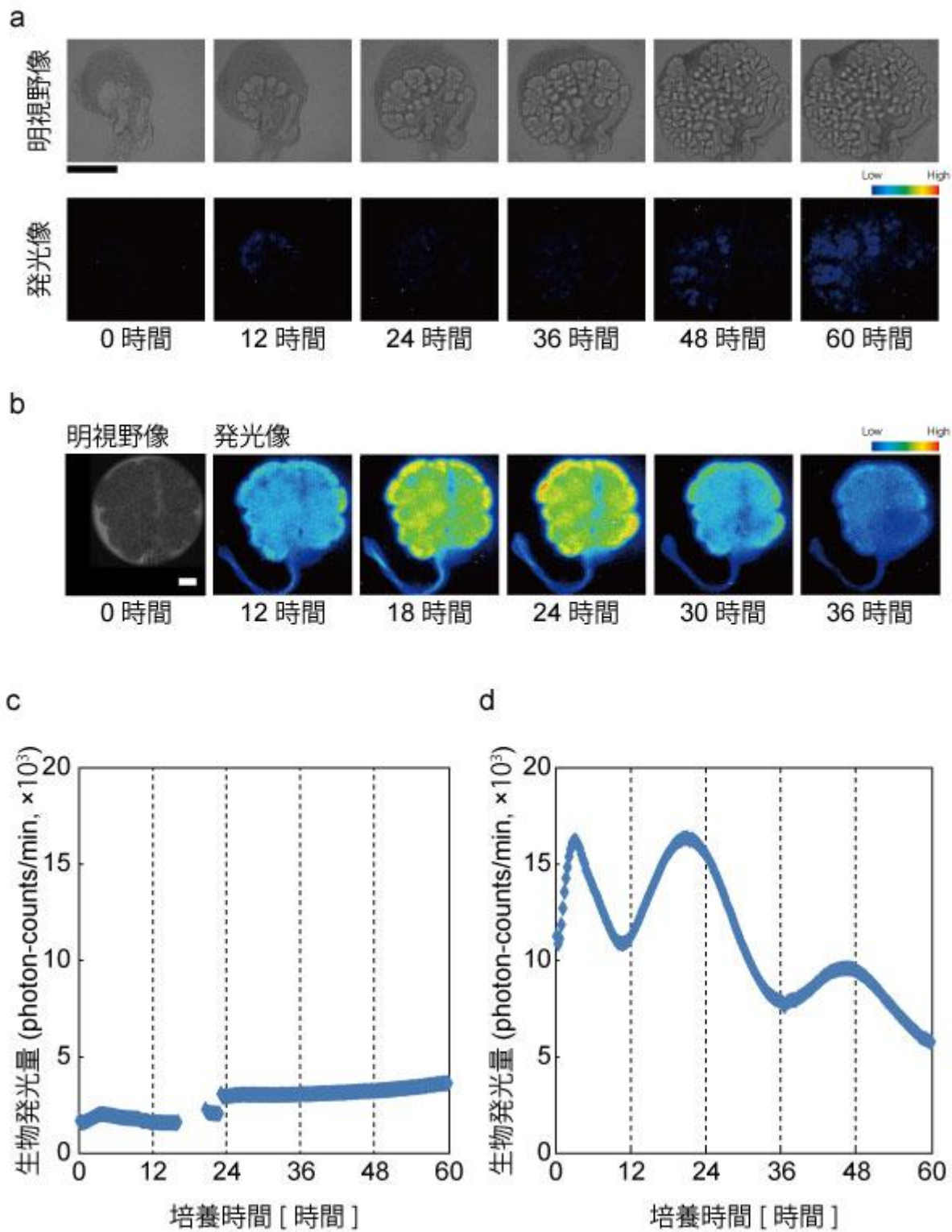


Figure 5

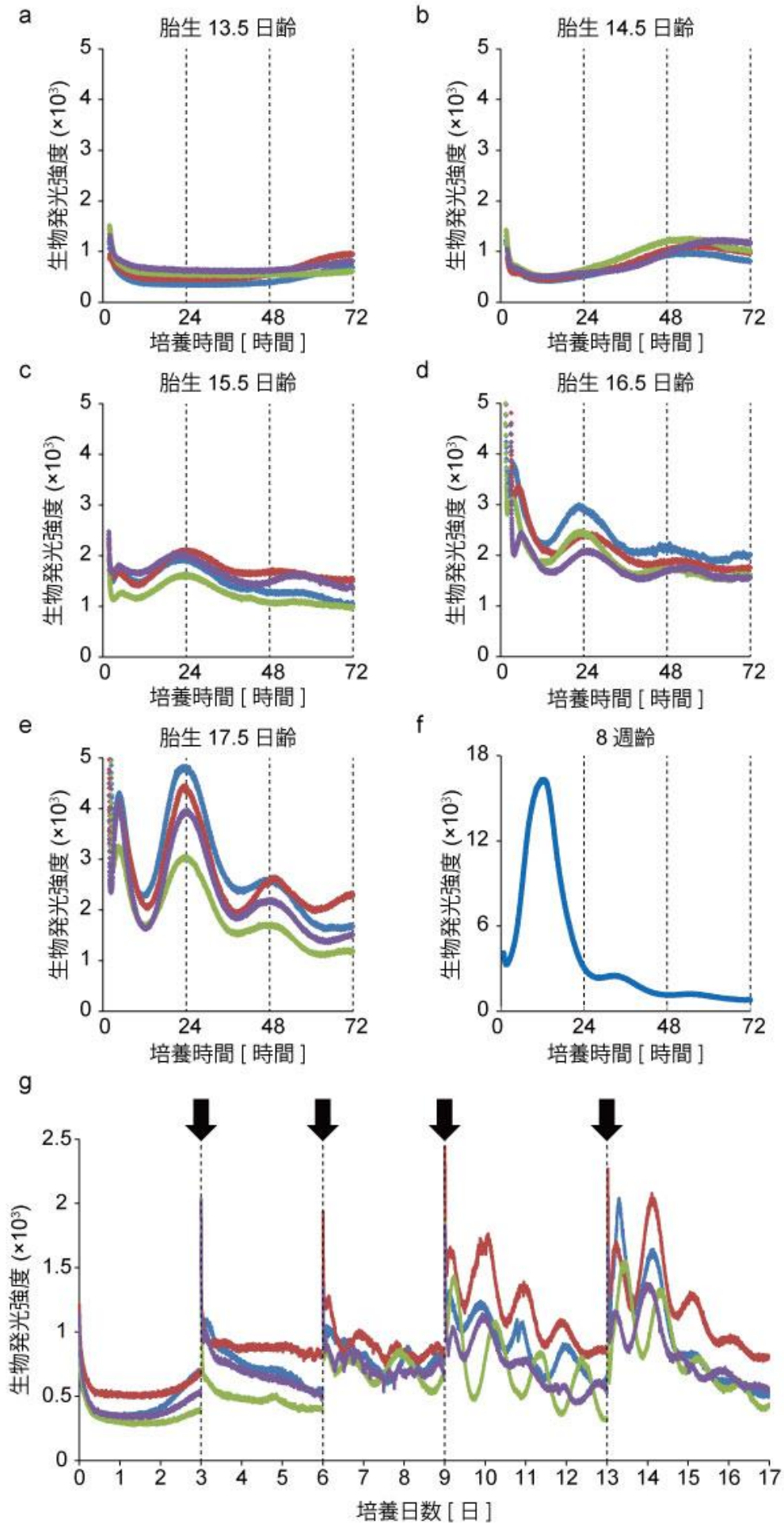


Figure 6

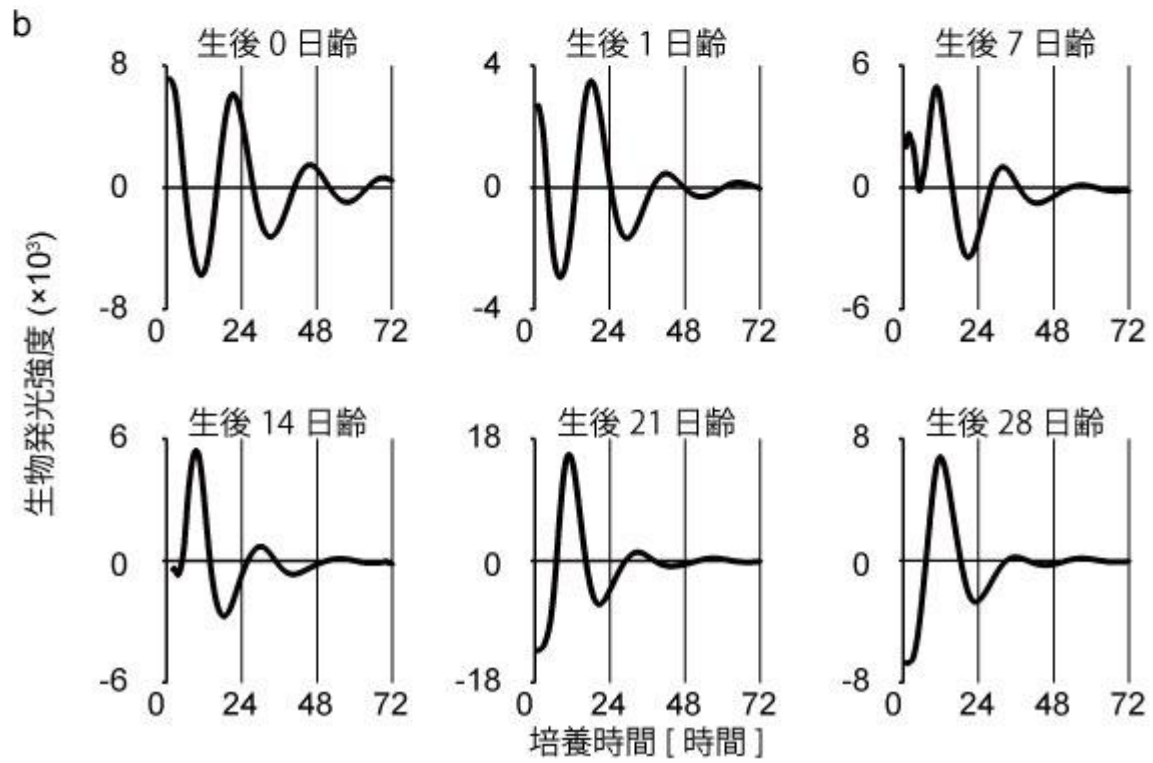
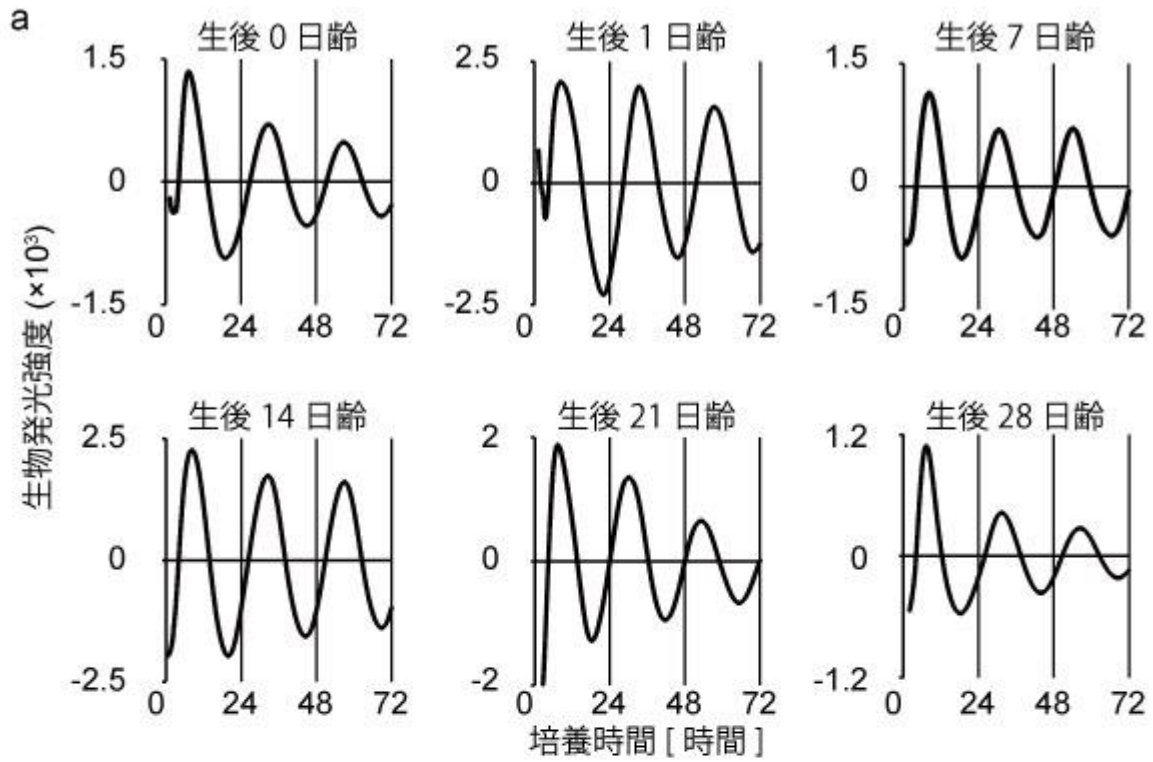


Figure 7

