

マウスを用いたたん白質含有食品の時間栄養学的視点研究

柴田重信*・長浜敬樹・糸川未紗・斉藤恵祐・田原 優・平尾彰子

早稲田大学先進理工学部

Chrono-Nutritional Aspects of Protein-Rich Food on Mouse Circadian Rhythm

Shigenobu SHIBATA*, Hiroki NAGAHAMA, Misa ITOKAWA,
Keisuke SAITO, Yu TAHARA and Akiko HIRAO

Laboratory of Physiology and Pharmacology,
Department of Electrical Engineering and Biosciences,
School of Advanced Biosciences and Engineering, Waseda University, Tokyo 162-8480

ABSTRACT

The rotation of the earth around its axis causes 24 h changes in environmental conditions including temperature, food availability, light, and darkness. In addition, seasonal changes in day length occur as a consequence of the earth orbiting the sun. In order to cope with and anticipate these changes, most organisms throughout the plant and animal kingdoms possess a circadian timing system. The peripheral circadian clock in mice is entrained not only by light-dark cycles but also by daily restricted feeding schedules. Behavioral and cell culture experiments suggest an increase in glucose level as a factor in such feeding-induced entrainment. For application of feeding-induced entrainment in humans, nutrient content and dietary variations should be considered. To elucidate the food composition necessary for dietary entrainment, we examined whether complete or partial substitution of dietary nutrients affected phase shifts in liver clocks of mice. A combination of glucose and casein without oil, vitamin, or fiber caused a significant phase advance. Reduction of casein content or substitution by amino acids in AIN-93M did not change the food-induced entrainment. Furthermore, casein substitution by soybean protein, soybean peptide or soybean amino acids did not change food-induced entrainment. The data suggest that requirement amounts of protein/amino acids for entrainment of the clock gene are small. Genistein and daidzein, a phyto-estrogen from soybean, strongly lengthened circadian rhythm and caused acute induction of *Per2* genes, whereas estrogen did not. These data suggest that soybean

*〒162-8480 東京都新宿区若松町2-2

may have some effect on circadian rhythm, and may help recovery from circadian deficit in shift-work. *Soy Protein Research, Japan* **14**, 38-43, 2011.

Key words : circadian, food-entrainment, liver, chrono-nutrition, soy bean, genistein

体内時計研究は時計遺伝子の発見とそれに続く10年間で、体内時計発振や同調の分子機構が解明されてきた。その後体内時計の研究は応用研究の方向に進んでいる。体内時計は視交差上核で主時計として働き、海馬や大脳皮質などでは脳時計として働き、さらに末梢臓器では末梢時計として機能することが分かってきた。したがって、生体のそれぞれの場所で働いている時計の働きに関して注目が集まるようになってきた。このことはそれぞれの臓器で働いている体内時計に関わる疾患の研究とも相まって研究が進んできた。時計遺伝子の変異に基づく体内時計の不調や、シフトワークなどによる体内時計の不調が、種々の疾患やメタボリックシンドロームにどのように関わるかについて、研究されてきた¹⁾。これらの研究は体内時計の不調が種々の疾患のリスクファクターになり得ることを示すものである。時間生物学としての体内時計の生物学的研究のみならず、この学問分野から派生してきた数々の学問分野も構築されつつある。例えば薬物の作用する時刻が薬効や副作用に大きく影響することから、薬物投与の時刻を考慮する投薬方法「時間薬理学」が発展してきた (Fig. 1)。また、食物や栄養の作用が摂取時刻によって影響されることから、同じカロリーと栄養素成分も摂食時刻により肥満になったりならなかったりすることが分かってきた。このように摂食の時刻を考慮する摂食方法を「時間栄養学」と呼ぶ²⁾ (Fig. 1)。

視交差上核依存性の体内時計は外界の周期的な光刺激によってリセットされるが、視交差上核非依存性の給餌性リズム時計は周期的な餌の提示でリセットされる²⁾。給餌性リズム時計は視交差上核依存性の時計より強力であり、脳の時計や末梢臓器の時計は給餌性リズム時計の位相に一致し²⁾、食や栄養のこのような作用を「体内時計作用栄養学」と呼ぶことにする (Fig. 1)。したがって餌の内容によって時計のリセットのされ方が異なってくると思われるが *in vitro* の実験系では化合物や栄養物の位相反応を見るのはかなり難しい。また、化合物や栄養物が給餌性リズムのリセット効果として働いたのか、光と似たりリセット効果として働いた

のか、区別しにくい。そこで、*ex vivo*の系で餌による体内時計のリセット効果を効率的にスクリーニングできる系を立ち上げた。すなわち、Per2::Luc knock-inマウスを用い、餌を一定時刻に与えることにより、肝臓の時計遺伝子発現リズムの位相が変化することを*ex vivo*の実験系で評価する。次にこの実験系を用いて、体内時計をリセットする栄養物の成分評価を行った。

次に大豆に含まれるフィトエストロゲンであるゲニステイン (GE) の体内時計に対する作用について調べた。ゲニステインやダイゼイン (DZ) はエストロゲン様作用あるいは逆抗エストロゲン作用を有する活性物質として知られている³⁾。文献的には、エストラジオール (E2) は体内時計の周期を変えることが報告されているので⁴⁾、GEやDZにも類似の作用が見られるか否かについて調べた。*in vitro*の細胞系では周期現象を、*in vivo*のマウスの実験では一過性の時計遺伝子発現を指標とした。

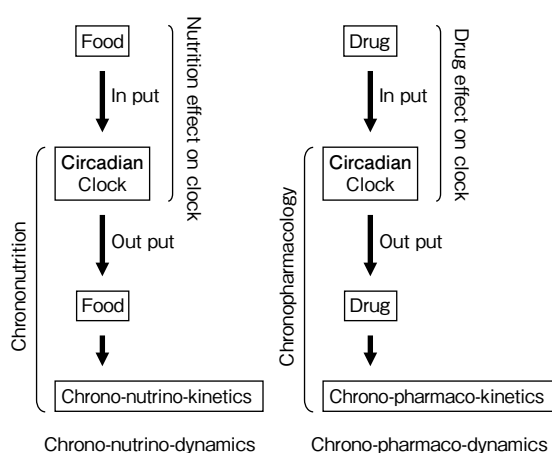


Fig. 1. Interaction between circadian clocks and food/drug.

方 法

たん白質置き換えの評価

肝臓のPer2時計遺伝子発現リズムをモニターするために、Per2::luciferaseマウスを入手し、このマウスをICR系のマウスと交配させ、F1世代を得た。GEやDZの作用を調べる実験にはICRの雄マウスを用いた。動物飼育室は8:00点灯、20:00消灯の明暗条件とし、時間生物学の慣例にしたがい、8:00をZeitgeber Time (ZT) 0、20:00をZT12と表し、このマウスを*ex vivo*で観測しているときは、8:00をpZT0、20:00をpZT12と表した。通常食はオリエンタル酵母社のMEQを用いた。また飼料の栄養成分を変更する実験では、通常食はAIN-93M調整食（オリエンタル酵母工業株式会社、東京；構成：カゼイン 14%、L-シスチン 0.3%、 α コーンスターチ 15%、 β コーンスターチ 47%、シュクロース 10%、大豆油 4%、セルロース 5%、AIN-93ミネラルMIX 3.5%、AIN-93ビタミンMIX 1%、酒石酸水素コリン 0.25%、tert-ブチル基ヒドロキノ 0.0008%）であり、米国国立栄養研究所（American Institute of Nutrition, AIN）から発表された組成が世界各国で広く使われているものである。スターチ部分やカゼイン部分を他のデンプンやたん白質あるいはアミノ酸と置き換えた。

ホタルは発光酵素であるルシフェラーゼ（luciferase）が発光基質であるルシフェリン（luciferin）を酸化することによって自ら発光する。このシステムを遺伝子のリズム解析に応用したのが、本研究で利用した実験系であるルミサイクル（ActiMetrics社）である。Per2::Luc KI マウスは前述したように、Per2遺伝子にルシフェラーゼが含まれるため、ルシフェリンを加える事により、Per2遺伝子の発現リズムを発光リズムとして観測する事が可能となる。本研究では、ZT3にサンプリングされた末梢組織（肝臓）をルミサイクルが設置された37℃のインキュベーター内で培養し、Per2遺伝子の発現リズム（発光リズム）を解析した。解析には、計測データ（RAWデータ）から24時間分の移動平均値を引くディトレンド処理を行い、その後2時間分の移動平均値で平滑化する平滑化処理を行った^{5,6)}。この波形データの発光値のpeak値を算出し、データを比較した。また、peak1の値が前進したか後退したかを評価の基準とした（位相の前進・後退）。また、体内時計の周期に対する作用は、Peak1からPeak4までに要する時間として評価した。

ゲニステインやダイゼインの評価

GEやDZが体内時計の周期に及ぼす影響を調べるために、Per2::Luc KI マウスのMEF（mouse embryonic fibroblast）を用いた。DMEMで培養を行い、培地に最終濃度が1-50 μ Mになるように、E2、GE、DZを加え、ルミサイクルによる生物発光リズムの計測を4日程度行った。

次に、これらの化合物が体内時計に作用するか否かを、一過性の時計遺伝子発現で評価した。E2、GE、DZ、をそれぞれ1 mg/kgの用量で、対照群は溶媒（オリーブオイル）を皮下投与し、180分後に安楽死させ、肝臓、子宮、卵巣を摘出した。RNAを抽出し、realtime RT-PCRで、Per1、Per2遺伝子発現を、ハウスキーピング遺伝子としてGAPDHの遺伝子発現を調べ、この発現で補正し、相対的発現量で示した。

結果と考察

消化しやすい炭水化物摂取によるリズム位相異常マウスのリズム正常化

グルコースとカゼイン食の組み合わせが、体内時計を同調させることが分かっている⁵⁾、カゼインたん白質の役割を明らかにする目的で、カゼインを他のたん白質や他のアミノ酸に置き換えることにした。餌を与える時刻依存的に肝臓のPer2遺伝子発現ピークが変化するので⁶⁾、あらかじめ餌を明期の最初の4時間与えることにより、人で言うところの夕食から夜食だけ餌を食べたことにする。このようなマウスを不摂生マウスと呼び、これに正常な時間帯である暗期のはじめに餌を1-2日間1-4 g与えると、与えた餌の量依存的に肝臓の体内時計の位相が元にもどる（Fig. 2）。この系の利点は、機能的食品を含んだ餌が、効率的に体内時計の位相を元に戻すことを敏感に評価できる。また餌を与えない時（ピーク位相が8-9時）に比較して餌を与えたときの位相（15-17時）が大きく後退し、自由摂食時のマウスとほとんど変わらない（Fig. 2）。実際そのようにして、餌の成分を変えて評価した。その結果、穀類のスターチは芋類のスターチより不摂生状態の体内時計を戻す効果が強かった（Fig. 3）。コーンスターチとポテトスターチを比較すると、前者の夜間投与がインスリン分泌を強力に促進した。これらの結果は、炭水化物摂取によるインスリン分泌が同調に寄与することを示し、インスリンの重要性⁷⁾を確認できた。

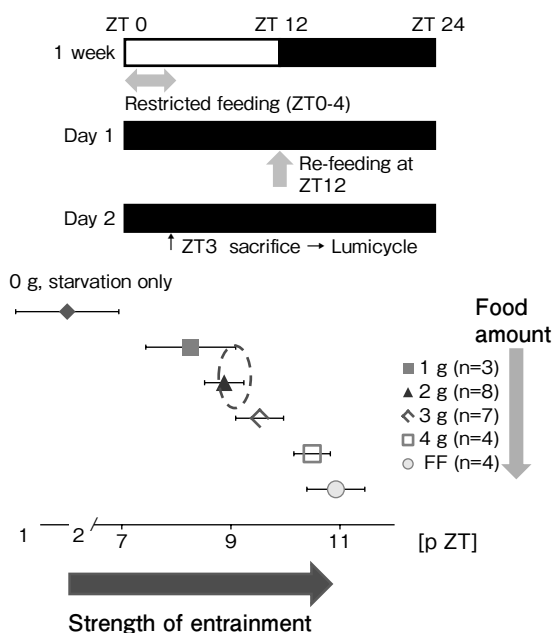


Fig. 2. Recovery effect by breakfast at ZT12 in abnormal rhythm with feeding at daytime in Per2:luc KI mouse. -food volume effect-

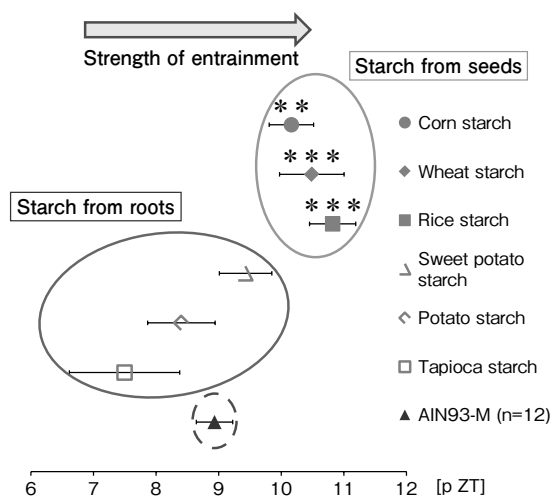


Fig. 3. Recovery effect by breakfast at ZT12 in abnormal rhythm with feeding at daytime in Per2:luc KI mouse. -different starch effect-

たん白質・アミノ酸置換餌のマウス体内時計同調

AIN-93Mのカゼインをそれに相当する全アミノ酸、必須アミノ酸、および非必須アミノ酸に置換したが、これらの置換食は、コントロール食と同程度の位相変位作用を示した (Fig. 4B)。次に、カゼインの必要量を調べるために、14%カゼイン食を、8%、6%に置換

した (残りの部分はコーンスターチで補填) 餌を与えた。しかしながら、位相変位作用にこれら3群間に差は見られなかった (Fig. 4A)。これらの結果は、今回のモデルで調べた限り、体内時計の食餌性同調に、たん白質やアミノ酸の関与は少ないことが明らかにされた。一般的に、たん白質やアミノ酸は食事性体温上昇 (DIT) を引き起こしやすいので、食餌性同調には体温上昇の関与は少ないと思われる。つぎに、たん白質の種類を変えるため、大豆たん白、大豆ペプチド、大豆たん白の組成アミノ酸を14%カゼインに置換して実験を行った結果、14%カゼインの効果とほとんど差は認められなかった (Fig. 5)。以上から、食餌性同調におけるたん白質の関与は少なかった。

ゲニステイン・ダイゼインの体内時計に対する作用

MEF細胞の発光リズムに対するGE, DZ, E2の作用について調べた。GEは濃度依存的に発振周期を延長させた (Fig. 6)。またDZにもそのような作用が見られたが、ESは高濃度でも周期延長作用は見られなかった (Fig. 6)。次に、GE, DZ, E2の時計遺伝子の一過性発現に対する作用を調べた。GE, DZは、マウス子宮のPer1遺伝子発現を増強した (Fig. 7)。Per2遺伝子発現は子宮ではGEとESで増大し、卵巣ではESで少し増大した (Fig. 7)。今回、GEとDZは体内時計の周期を延長させる作用を見いだしたが、ESではそのような作用は見られなかった。したがって、GEやDZはエストロゲン受容体に作用することなしに、時計に影響を及ぼす可能性が考えられた。実際、GEは、種々の酵素抑制作用が知られており、例えばtyrosine kinase, 5 α -reductase, aromatase, cdc2 kinase, MAP kinases, protein histidine kinaseなどを抑制する³⁾。他に、GEはPPARsという核内受容体のリン酸化のシグナルカスケードにも作用することが知られている³⁾。PPARsが体内時計に関与することは、これらの受容体活性化薬が体内時計の周期を変えることが知られている⁸⁾ので、GEはこれらの作用で体内時計の周期を延ばした可能性が考えられる。次にPer1やPer2の一過性の発現に対するGE, DZ, E2の作用について調べた。その結果、これらの化合物は、肝臓にはほとんど作用せず、卵巣に弱く、子宮に強く作用することが分かった。これらの化合物の中で、GEが一番強力に、子宮のPer1やPer2の遺伝子発現を増大させた。したがって、この作用もエストロゲン受容体を介する作用ではない可能性が示唆された。GEやDZは、E2とは異なり、将来、体内時計の不調を改善する化合物として役立つ可能性が示唆された。またこの作用にはエストロゲン受容体の関与を考慮する必要性は無いと言える。

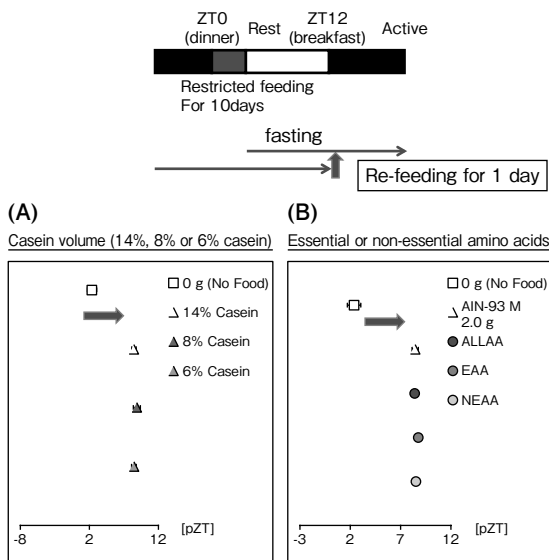


Fig. 4. Recovery effect by breakfast at ZT12 in abnormal rhythm with feeding at daytime in *Per2::luc* KI mouse. -casein volume (A) and amino acids effect (B)-

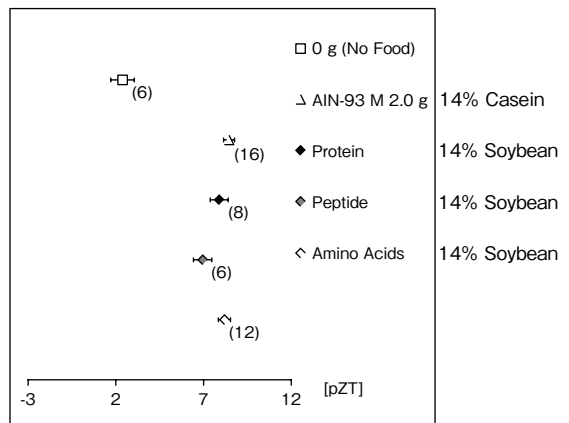


Fig. 5. Recovery effect by breakfast at ZT12 in abnormal rhythm with feeding at daytime in *Per2::luc* KI mouse. -soybean protein, peptide, and amino acids effect-

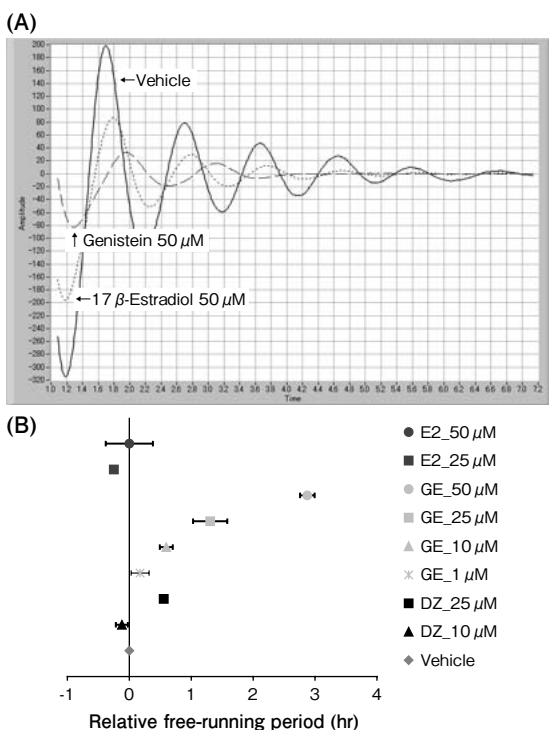


Fig. 6. Effect of genistein (GE), daidzein (DZ) and estrogen (E2) on free-running period in MEF cells from *Per2::luc* KI mouse. (A) Bioluminescence detrended wave, (B) dose-response. Period change from vehicle treatment (hr).

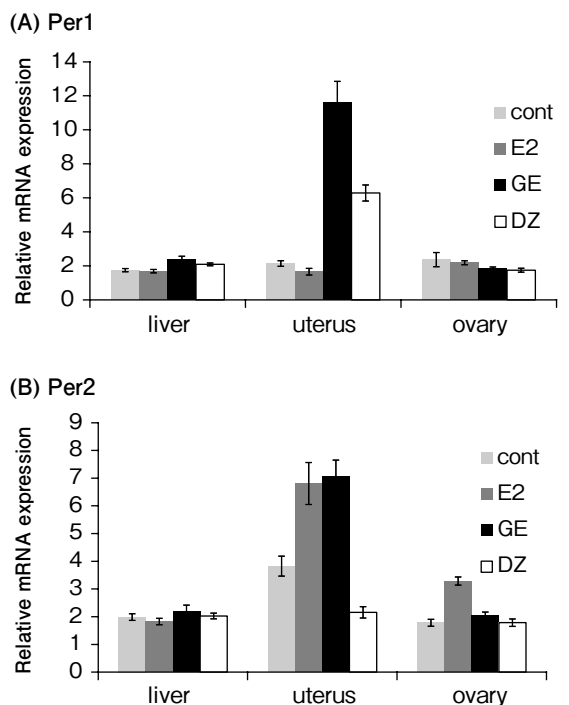


Fig. 7. Effect of genistein (GE), daidzein (DZ) and estrogen (E2) on *Per1* (A) and *Per2* (B) gene expression in the mouse liver, uterus and ovary.

要 約

今回、体内時計の食餌性同調機構の仕組みを明らかにするために、マウスの食餌（AIN-93M）中のデンプン質の違いとたん白質やその構成成分のペプチドやアミノ酸の違いについて調べた。その結果、デンプンは消化が良く、インスリン分泌を引き起こしやすいタイプのデンプンにより強い同調促進効果が見られた。一方、たん白質は、含量を変化させても、そのアミノ酸に置換しても、また他のたん白質の大豆たん白質、ペプチド、アミノ酸に置換しても、同調効果に差は認められなかった。したがって、食餌性同調にたん白質の寄与はきわめて低いと思われた。体内時計に対する作用を大豆成分であるゲニステインやダイゼインをエストラジオールと比較した結果、エストラジオールと無関係に、ゲニステインやダイゼインは、周期を延長させ、かつ子宮の時計遺伝子Per1やPer2の発現を促進させることから、これらの成分は、体内時計の不調を改善させる可能性が示唆された。

文 献

- 1) Asher G and Schibler U (2011): Crosstalk between components of circadian and metabolic cycles in mammals. *Cell Metab*, **13**, 125-137. Review.
- 2) Shibata S, Tahara Y and Hirao A (2010): The adjustment and manipulation of biological rhythms by light, nutrition, and abused drugs. *Adv Drug Deliv Rev*, **62**, 918-927, Review.
- 3) Dang ZC (2009): Dose-dependent effects of soy phyto-oestrogen genistein on adipocytes: mechanisms of action. *Obes Rev*, **10**, 342-349. Review.
- 4) Nakamura TJ, Moriya T, Inoue S, Shimazoe T, Watanabe S, Ebihara S and Shinohara K (2005): Estrogen differentially regulates expression of Per1 and Per2 genes between central and peripheral clocks and between reproductive and nonreproductive tissues in female rats. *J Neurosci Res*, **82**, 622-630.
- 5) Hirao A, Tahara Y, Kimura I and Shibata S (2009): A balanced diet is necessary for proper entrainment signals of the mouse liver clock. *PLoS One*, **4**, e6909-6917.
- 6) Hirao A, Nagahama H, Tsuboi T, Hirao M, Tahara Y and Shibata S (2010): Combination of starvation interval and food volume determines the phase of liver circadian rhythm in Per2::Luc knock-in mice under two meals per day feeding. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **299**, G1045-1053.
- 7) Tahara Y, Otsuka M, Fuse Y, Hirao A and Shibata S (2011): Refeeding after fasting elicits insulin-dependent regulation of Per2 and Rev-erba with shifts in the liver clock. *J. Biological Rhythms*, **26**, 230-240.
- 8) Teboul M, Gréchez-Cassiau A, Guillaumond F and Delaunay F (2009): How nuclear receptors tell time. *J Appl Physiol*, **107**, 1965-1971.