

マウスや培養細胞を用いたイソフラボンの体内時計に対する作用解析

柴田重信*・桑原麻里

早稲田大学先進理工学部電気情報生命工学科生理薬理研究室

Chrono-Nutrition Effects of Protein-Rich Food on Mouse Circadian Rhythm

Shigenobu SHIBATA* and Mari KUWAHARA

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 the length of day 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 kingdom possess a circadian timing system. The peripheral circadian clock in mice is affected not only by light-dark cycles but also by chemicals and foods. It is known that estrogen influences circadian rhythm through estrogen receptors. Then, we examined the effect of soy isoflavone (Soyaflavon HG, obtained from Fuji oil Co., LTD.), in which glycoside forms of genistein and daidzein are included, and whose molecular structures are similar to estrogen, on circadian rhythm. Soy isoflavone is represented by genistein and daidzein, and soyaflavone HG consists of their glycoside, and thus is easily soluble in water. Application of soyaflavone HG to a culture medium keeping Per2::Luciferase KI Mouse Embryonic Fibroblast (MEF) or mouse liver slices could lengthen the bioluminescence rhythm, and also phase-advance or -delay the bioluminescence rhythm, depending on application time. Oral application to these mice could phase-advance using an *in vivo* imaging system. These data suggest that soyaflavone HG affects some circadian rhythm periods and phases, and maybe useful for recovery from deficit in circadian rhythm in shift-work. *Soy Protein Research, Japan* **16**, 73-79, 2013.

Key words : circadian, liver, soy bean, genistein, glycoside

*〒162-8480 東京都新宿区若松町2-2

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。時計遺伝子は視交叉上核で主時計としてのみならず、海馬や大脳皮質など脳時計として働き、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」がある。

大豆に含まれるゲニステイン (GE) やダイゼイン (DZ) は、エストロゲン様作用を有する活性物質として知られている²⁾。代表的なエストロゲンであるエストラジオール (E2) は体内時計の周期を変えることが報告されており³⁾、GEやDZもまた、体内時計の周期を変える作用を有することが考えられる。よって、GEやDZの配糖体から成る大豆イソフラボン素材であるソヤフラボンHG (Table 1) の、体内時計に対する作用について調べた。まずはソヤフラボンHGの体内時計の発振周期に対する作用について調べた。次に、「時間薬理学」の観点から、ソヤフラボンHGの投与タイミングの違いが体内時計の位相に及ぼす効果について

調べた。また、マウス行動リズム周期に影響を及ぼすか否かを検証するため、ソヤフラボンHGを飲水または混餌して与え、エリアセンサーによる行動リズム測定を行った。

さらに、ソヤフラボンHGを構成するイソフラボン配糖体のうち、どれがもっとも体内時計への作用に寄与しているかを検証するため、これらを構成している配糖体のアグリコンを投与し、周期現象に及ぼす影響を調べた。

方 法

ソヤフラボンHGの周期評価

ソヤフラボンHGやイソフラボン配糖体が体内時計の周期に及ぼす影響を調べるために、PER2::luciferase K.I.マウスのMEF (mouse embryonic fibroblast) や肝臓切片を用いた。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発現リズム解析に応用したのが、本研究で使用した実験系であるルミサイクル (ActiMetrics社) システムである。PER2::luciferase K.I.マウスは、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。

MEF実験ではDMEMで培養を行い、ソヤフラボンHG (最終濃度0.1-1.0 mg/mL) またはイソフラボン配糖体を加え、ルミサイクルによる生物発光リズムの計測を5日程度行った。次に、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 K.I.マウスを入手し、将来的にアルビノ化により容易にインビボイメージング実験を行うことができるようにするために、このマウスをICR系のマウスと交配させ、F1世代を得た。マウス切片実験では、ZT3 (ZT0を点灯時間、ZT12を消灯時間とする) にサンプリングされた肝臓組織をルミサイクルの設置された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う^{4,5)}。

この波形データの発光値のpeak値を算出し、データを比較する。体内時計の周期に対する作用は、Peak1からPeak3までに要する時間の平均として評価した。

Table 1. component element of soyaflavone HG

	isoflavone	equivalent to isoflavone aglycone
Daidzin	4.0%	2.4%
Glycitin	2.7%	1.7%
Genistin	0.3%	0.2%
Malonyl daidzin	28.8%	12.2%
Malonyl glycitin	10.1%	5.2%
Malonyl genistin	5.2%	2.3%
Acetyl daidzin	0.8%	0.5%
Acetyl glycitin	0.2%	0.1%
Acetyl genistin	0%	0%
total	52.1%	24.6%

ソヤフラボンHGやイソフラボン配糖体のリズム位相に対する作用

ソヤフラボンHGが体内時計の位相に及ぼす影響を調べるために、MEFを用いて前述したルミサイクルによる実験を行った。Peak1が現れたのを確認した後インキュベーターから細胞を取り出し、30分間試薬を含培養液で培養して、その後wash outし、測定を再開した。試薬滴下後に現れた波形（peak2）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）。

ソヤフラボンHG投与マウスの行動周期評価

マウス行動周期に及ぼす影響を調べるため、ソヤフラボンHG水溶液をマウスに飲水（0.5%）または混餌（0.4%）して与え、恒常暗下で行動周期を測定した。11日間恒常暗下（DD）で慣らした後、13日間恒常暗下でソヤフラボンHGを投与し、エリアセンサーで行動量を測定し、Clocklabという解析ソフトで、周期を求めた。ソヤフラボンが女性ホルモン作用を有する可能性があったので、使用動物はICR系メスマウスを使用した。

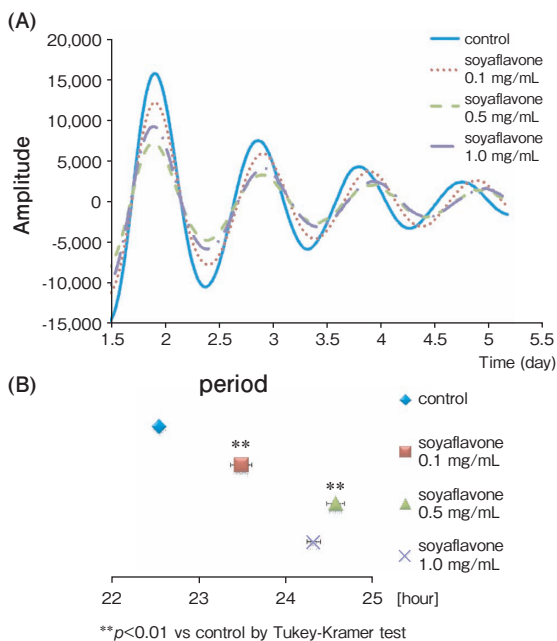


Fig. 1. Effect of soyaflavone HG on free-running period in MEF from PER2::luciferase K.I. mouse. (A) Bioluminescence detrended wave, (B) dose-response curve.

ソヤフラボンHG投与マウスの末梢臓器体内時計の位相に対する作用

マウスの末梢臓器の時計遺伝子発現リズムをインビボイメージングシステム（IVIS）により可視化することに成功したので^{6,7)}、この方法を利用し、ソヤフラボンの経口投与が末梢臓器の遺伝子発現の位相を動かすか否かについて調べた。MEF細胞の実験データを参考に、投与時刻をZT9に設定した。ソヤフラボン（100 mg/kg）を2日間投与し、3日目にIVISを行った。PER2::luciferase K.I.マウスを用いて、ZT5から4時間おきに、luciferine（15 mg/kg）をイソフルラン麻酔下に、皮下投与した。その後8分後に肝臓と顎下線を、10分後に腎臓を、露光し発光量を可視化した。発光量の相対値のリズム変動を計算し、コサイナー法によりピーク時刻を計測し、溶媒投与群との差を算出した。

結果と考察

ソヤフラボンHGのPER2発現リズム周期に対する作用

MEF細胞の発光リズムに対するソヤフラボンHGの作用について調べたところ、濃度依存的にPER2発現リズムの周期を延長した（Fig. 1）。次に、マウス肝臓を培養した際の発光リズムに対するソヤフラボン

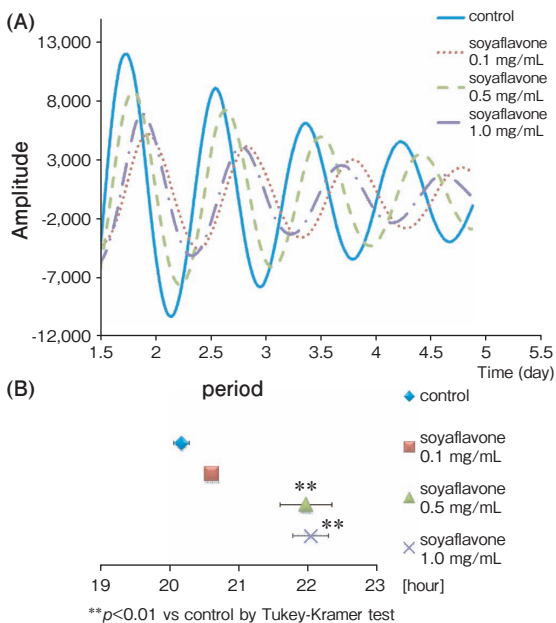


Fig. 2. Effect of soyaflavone HG on free-running period in liver slice from PER2::luciferase K.I. mouse. (A) Bioluminescence detrended wave, (B) dose-response curve.

HGの作用について調べたところ、ソヤフラボンHGはMEFと同様、濃度依存的にPER2発現リズムの周期を延長した (Fig. 2). 生体内では、水溶性が高い配糖体の状態では脂質である細胞膜を通過しにくいいため、腸内細菌により糖が外され非配糖体の形になって初めて消化管を通過し、体内に吸収されると考えられている。しかし今回の実験により、培養細胞や肝臓切片においても作用することが示されたので、イソフラボン類は配糖体の形である程度作用できる可能性が示唆された。また、振幅に対しては、高濃度で抑制される傾向にあった。

ソヤフラボンHGの位相変化に対する効果

前述の実験から、ソヤフラボンHGがPer2発現周期を延長する効果を有することが確認できたため、次に位相に対する効果について、MEFを用いて検証した。その結果、Per2発現リズムの漸減過程でのソヤフラボンHG投与によりPer2発現ピークの時刻を濃度依存的に後退させた (Fig. 3). 一方で、Per2発現リズムの漸増過程での投与によりPer2発現ピークの時刻は濃度依存的に前進 (Fig. 4) することが確認できた。投与タイミングにより位相を前後どちらにも動かせることが

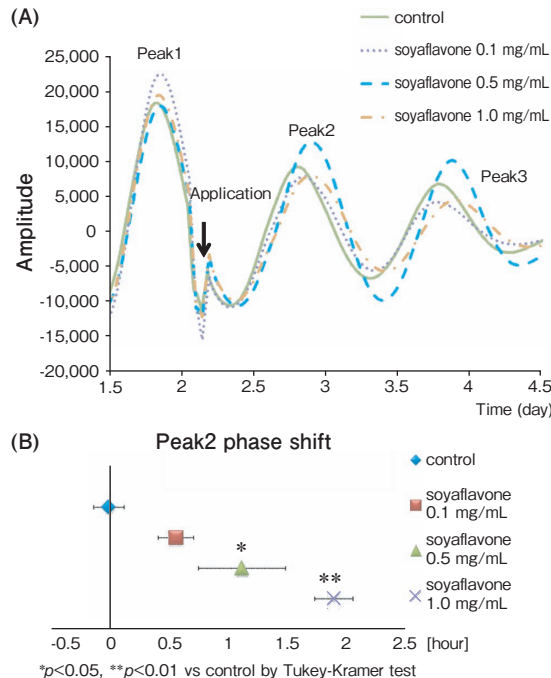


Fig. 3. Effect of soyaflovone HG on phase-delay in MEF from PER2::luciferase K.I. mouse. (A) Bioluminescence detrended wave, (B) dose-response curve.

ら、ソヤフラボンHGは時計の位相合わせに使える素材であることが示唆された。

ソヤフラボンHGのマウス行動周期に及ぼす影響

ソヤフラボンの生体に対する作用を調べるためにソヤフラボンHGのマウス行動リズム周期に対する影響を調べた。その結果、ソヤフラボンHGとcontrol群との間に差は認められなかった (Fig. 5). 恒常暗下ではマウスの行動周期は24時間より短縮されるが、*in vitro*および*ex vivo*の実験から示唆されたソヤフラボンHGの時計遺伝子発現周期延長効果から、マウスへの継続的なソヤフラボンHG投与により、行動周期を延長することを期待した。しかし、ソヤフラボンHGによる行動周期延長効果はみられなかった。このことから、ソヤフラボンHGのMEFや肝臓切片での周期延長効果の作用部位は、それぞれの細胞や組織であり、概日時計の中核である視交叉上核を介する作用ではないことが示唆された。

イソフラボン配糖体の周期延長効果への寄与

ソヤフラボンHGを構成するイソフラボン配糖体のうち、ソヤフラボンHGの効果である周期延長に最もかかわっている構成成分は何であるかを検証した。各

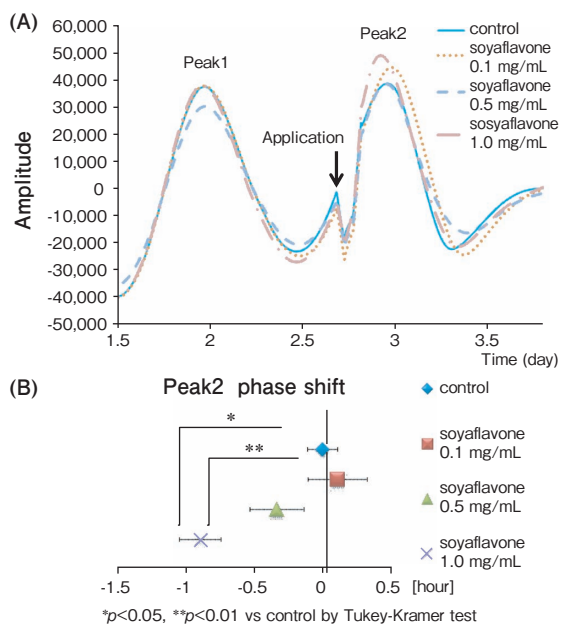


Fig. 4. Effect of soyaflovone HG on phase-advance in MEF from PER2::luciferase K.I. mouse. (A) Bioluminescence detrended wave, (B) dose-response curve.

イソフラボン配糖体の投与量は、ソヤフラボンHGの成分構成比 (Table 1) をもとにした。つまり、6種の配糖体を含有成分の存在比で考慮し、与えたところ、周期延長に寄与しているのはdaidzinであることがわかった (Fig. 6)。含有量が多いマロニル配糖体の周期延長効果へ与える影響が非常に弱いことから、マロニル基が周期延長への何らかの妨げになっていると考えられる。また、イソフラボン非配糖体 (アグリコン) がイソフラボン配糖体よりも周期をより強く延長していることも、上記の考察を支持している。イソフラボン非配糖体であるgenistein, daidzeinの分子量はそれぞれ270.24, 254.24, イソフラボン配糖体であるgenistin, malonyl genistin, daidzin, malonyl daidzinの分子量はそれぞれ432.38, 518.42, 416.38, 502.42である。つまり、配糖体で分子量が大きい高分子になるにしたがって、立体障害が出現し、そのことが効果へ影響を及ぼしている可能性が考えられた。また、ソヤフラボンHGが代謝されすべてアグリコンのgenisteinと daidzeinになると仮定して、genisteinと daidzeinの濃度を設定して、周期延長作用を調べたところ、genisteinの方がdaidzeinより強力である可能性が示唆された (Fig. 6)。

以上の結果、ソヤフラボンHGは、daidzeinの配糖体

を主に含むため、genistein程の強力な効果は期待できないが、マイルドな作用を示す素材として開発可能であると考えられる。

ソヤフラボンHG投与マウスの末梢臓器体内時計の位相に対する作用

対照群のマウスの肝臓、腎臓、顎下線の体内時計の位相のピーク時間は、21時、17.5時、18.9時であった。一方、ソヤフラボン (100 mg/kg,po) 投与マウスの、肝臓、腎臓、顎下線の位相のピーク時刻は、20.4時、16.7時、18.5時であり、肝臓、腎臓では位相が30-60分程度前進した。また、ゲニステイン (20 mg/kg,po) 投与マウスの、肝臓、腎臓、顎下線の位相のピーク時刻は、19.8時、17.5時、18.2時であり、肝臓や顎下腺では60分位相が前進した (Fig. 7)。今回の研究では暗期の開始3時間前にこれらの化合物を投与しているので、対照群に対しても最大3時間の位相前進が期待できた。実際のデータからは、臓器間の差にもよるが、ソヤフラボンで0.5-1時間、ゲニステイン投与で1時間の前進がみられた。従って、イソフラボン化合物は、マウス生体においても末梢時計の位相を動かすことが可能であることが分かった。

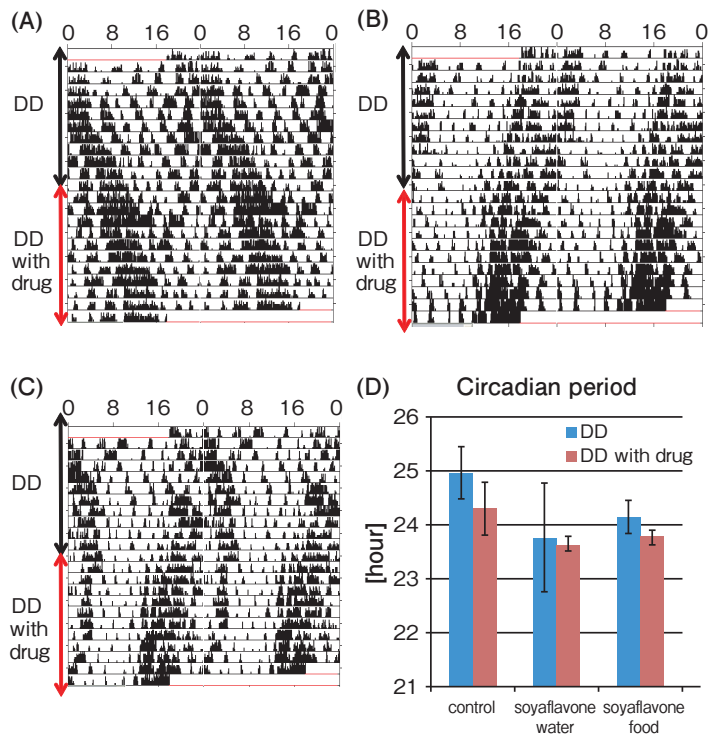


Fig. 5. Effect of soyaf flavone HG on mice behavior rhythm under constant dark housing. (A)control, (B) soyaf flavone by drinking water, (C)soyaf flavone by food, (D) Summary of circadian period.

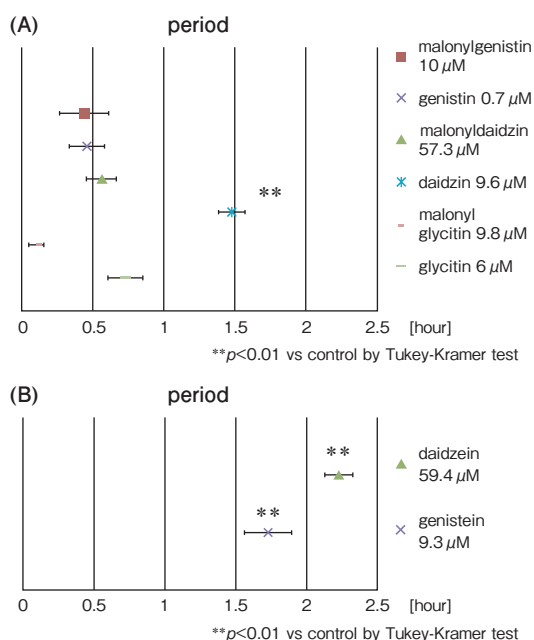


Fig. 6. Effect of isoflavone glycoside (A) and isoflavone aglycone (B) on free-running period in MEF from PER2::luciferase K.I. mouse. Each symbol shows difference of free-running period from methanol (control).

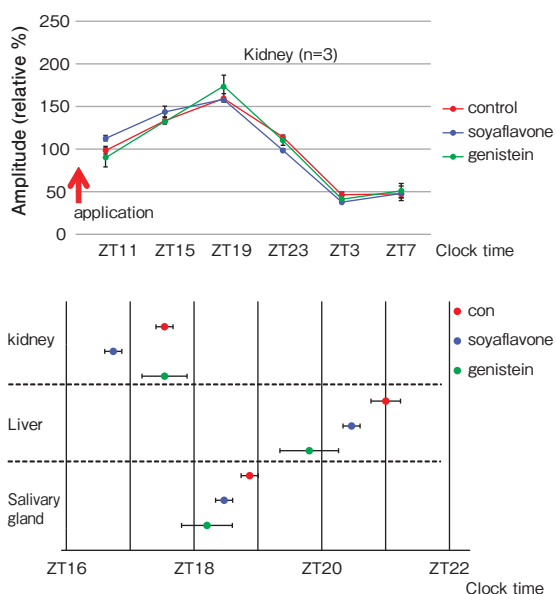


Fig. 7. Effect of soyaflavone HG or genistein injection at ZT9 on phase of peripheral clock from PER2::luciferase K.I. mouse using AIVIS. (A) Bioluminescence rhythm of peripheral clock, (B) Phase of clock.

要 約

エストロゲンは時計遺伝子発現に影響を与えることから、エストロゲンに構造が似ている大豆イソフラボンについて体内時計に対する作用を検証するため、大豆イソフラボン配糖体から成る素材である、ソヤフラボンHGあるいは、それを構成している成分を用いて実験を行った。ソヤフラボンHGをマウス胎児繊維芽細胞 (MEF) やマウス肝臓に滴下した際のPER2発現リズムを、リアルタイムシフエラーゼアッセイにより測定したところ、ソヤフラボンはMEF、肝臓いずれの場合においても発現周期を延長した。また、Per2発現減少相の投与のソヤフラボンHG投与によりPer2発現ピークを後退、増加相での投与により前進させた。さらにIVISを用いた実験から、生体でも末梢臓器の時計はソヤフラボンで前進させることができた。このことから、時計の位相合わせに使える素材であることが示唆された。ただし、行動周期に影響を及ぼさないことから、視交差上核には作用しないことが示唆された。

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) Dang ZC (2009): Dose-dependent effects of soy phyto-oestrogen genistein on adipocytes: mechanisms of action. *Obes Rev*, **10**, 342-349. Review.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) Tahara Y, Kuroda H, Saito K, Nakajima Y, Kubo Y, Ohnishi N, Seo Y, Otsuka M, Fuse Y, Ohura Y, Komatsu T, Moriya Y, Okada S, Furutani N, Hirao A, Horikawa K, Kudo T and Shibata S (2010): *In vivo* monitoring of peripheral circadian clocks in the mouse. *Curr Biol*, **22**, 1029-1034.
- 7) Kuroda H, Tahara Y, Saito K, Ohnishi N, Kubo Y, Seo Y, Otsuka M, Fuse Y, Ohura Y, Hirao A and Shibata S (2010): Meal frequency patterns determine the phase of mouse peripheral circadian clocks. *Sci Rep*, **2**, 711.