

緑茶による体内時計の調節

大 池 秀 明

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構
食品総合研究所 研究員

緒 言

ほぼ全ての生物は、約 24 時間周期の体内時計である“サーカディアンリズム”を有している。このリズムは睡眠や行動時間を規定するのみならず、エネルギー代謝や細胞分裂、内分泌制御など、あらゆる生命現象の基礎となっている。最近では栄養学の研究にこのリズムを取り入れた、「時間栄養学」が注目されている¹⁾。例えば、エネルギー代謝は昼夜でまったく活性が異なることから、昼間の食事より夜食が太りやすいことが理解できる。われわれは、摂取する食品成分によっても体内時計が影響を受けることを報告・研究している²⁾。そこで、特定の食品や食材あるいは食品成分を利用することにより、現代人の乱れがちな体内時計を効率よく調整し、健康で規則正しいリズム作りに役立てることを目指している。

サーカディアンリズムは、時計遺伝子と呼ばれる一連の遺伝子群が、約 24 時間周期の発現フィードバックループを形成することにより生み出される³⁾。これら時計遺伝子の下流では、多くの遺伝子発現が制御され、ヒト全遺伝子の約 10% は日周期変動すると言われている。その結果、細胞分裂やホルモン分泌など様々な生体現象が影響を受け、血圧や体温なども日周期変動する。

コーヒーや紅茶、緑茶にはカフェインが含まれ、古くからその覚醒作用が利用されてきた。また、緑茶のうま味成分として知られるテアニンには安眠効果やリラックス効果が知られており、睡眠・覚醒リズムと関連している。また、最近の研究から、脂質代謝の変化はサーカディアンリズムに影響を与えることが明らかになっており、カテキンの脂質代謝改善による体内時計調節効果も期待できる。しかしながら、緑茶やこれらの成分が体内時計に直接影響を与えるかどうかについての知見は存在しない。そこで本研究は、緑茶という日本人になじみ深い飲料により、行動レベルと遺伝子レベルで、サーカディアンリズムが影響を受けるのかを解析することを目的とした。

方 法

1. 動物等

全ての動物実験は、「農林水産省の所管する研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」に従い、食品総合研究所動物実験委員会の承認を経て実施した。雄の BALB/c マウス（日本チャールズリバー株式会社）を回転かご型行動量測定装置（SW-15S；メルクエスト社）で飼育した。回転かごの回転数は 5 分毎に記録し、ダブルプロットアクトグラムは CIF-II 解析ソフト（メルクエスト社）により作製した。飼育棚の照明により、12 時間毎の明暗周期（LD）を制御した。餌は自由摂取とし、水あるいは 1g/100ml に溶解した市販のインスタント緑茶を飲用水として 2 週間自由摂取させた。

2. 時計遺伝子発現量解析

2 週間の緑茶摂取後、各群の個体から肝臓をサンプリングし、RNeasy Mini Kit（キアゲン）により total RNA を抽出し、cDNA を合成した。THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix（東洋紡）を使用し、リアルタイム PCR により、時計遺伝子の発現量を解析した。なお、使用したプライマーは以下の通りである；mBmal1 (NM_007489), 5' -tcagatgacgaactgaaacacc-3', 5' -cggtcacatcctacgacaaa-3'; mDbp (NM_016974), 5' -gcattccaggccatgagact-3', 5' -ccagtactctcatccttctgt-3; mRev-erb α (NM_145434), 5' -ccctggactccaataacaaca-3', 5' -tgccattggagctgtcact-3'; mGAPDH (NM_008084) 5' -catggccttcctgttctcta-3' and 5' -cctgcttcaccaccttcttga-3'。Bmal1, Dbp, Rev-erb α の発現量は、GAPDH 発現量によりサンプル間の補正を行った値を利用した。

3. 細胞等

NIH3T3 細胞（RCB1862；理研 CELL BANK）に mBmal1-Luciferase (mBmal1 プロモーター約 0.8 kbp にホタルの発光酵素であるルシフェラーゼ遺伝子を結合させたコンストラクト) を導入し、薬剤耐性遺伝子を利用して、このレポーター遺伝子を安定的に発現する細胞株を樹立

した。発光のリアルタイム計測は、DMEM 培地 (高グルコース; インビトロジェン)、10 mM HEPES (シグマ)、Penicillin-Streptomycin (シグマ)、0.1 mM luciferine (プロメガ)、37℃、5% CO₂ 条件で培養しながら、Kronos Dio2500 (アトー) により、発光量を 10 分間隔で各 1 分間測定した。結果は、付属のソフトにより解析した。

結 果

まず、通常の 12 時間明暗周期下における、緑茶の自由摂取がマウスの行動リズムに与える影響を検討した。試験群には、水の代わりに、市販のインスタント緑茶を自由飲水させた。明暗周期下におけるマウスの輪回し行動は、暗期が始まる直前に開始し、暗期の後半まで続いた (図 1 上段)。一方、緑茶を飲用させた群も、類似の活動パターンを示したが、輪回しの開始時刻は、暗期の開始直後であることが多く、水飲用群と比べて若干遅れていた (図 1 下段)。2 週間の飲用試験後、ZT5 (Zeitgeber Time; 明期の開始点を 0 時とした 24 時間の時刻表

記) にマウスを解剖し、肝臓の時計遺伝子発現 (Bmal1, Dbp, Rev-erba の 3 遺伝子) を解析した。その結果、危険率 5% 水準の有意差はつかなかったが、Bmal1 の発現量は、緑茶の摂取によりやや低値を示し、Dbp の発現量は、緑茶の摂取によりやや高値をつけた (図 2)。Rev-erba の発現量は、ほぼ同程度であった。

われわれは、最近、カフェインがマウスの行動リズムに対し、周期長を伸長させるような効果があることを見出した⁴⁾。緑茶にもカフェインが含まれていることから、カフェインが体内時計に与える影響を細胞レベルで検討するため、時計遺伝子の発現をリアルタイムで検出することができる細胞株を樹立した; 時計遺伝子 Bmal1 のプロモーターとホタルの発光酵素であるルシフェラーゼを結合し、マウス線維芽細胞株である NIH3T3 細胞に導入し、このレポーター遺伝子を安定的に発現する細胞株を取得した (NIH3T3/mBmal1-Luc cell)。この細胞株は、ルシフェリン入りの培地で培養することにより、Bmal1 プロモーター依存的な、約 24 時間周期の発光リ

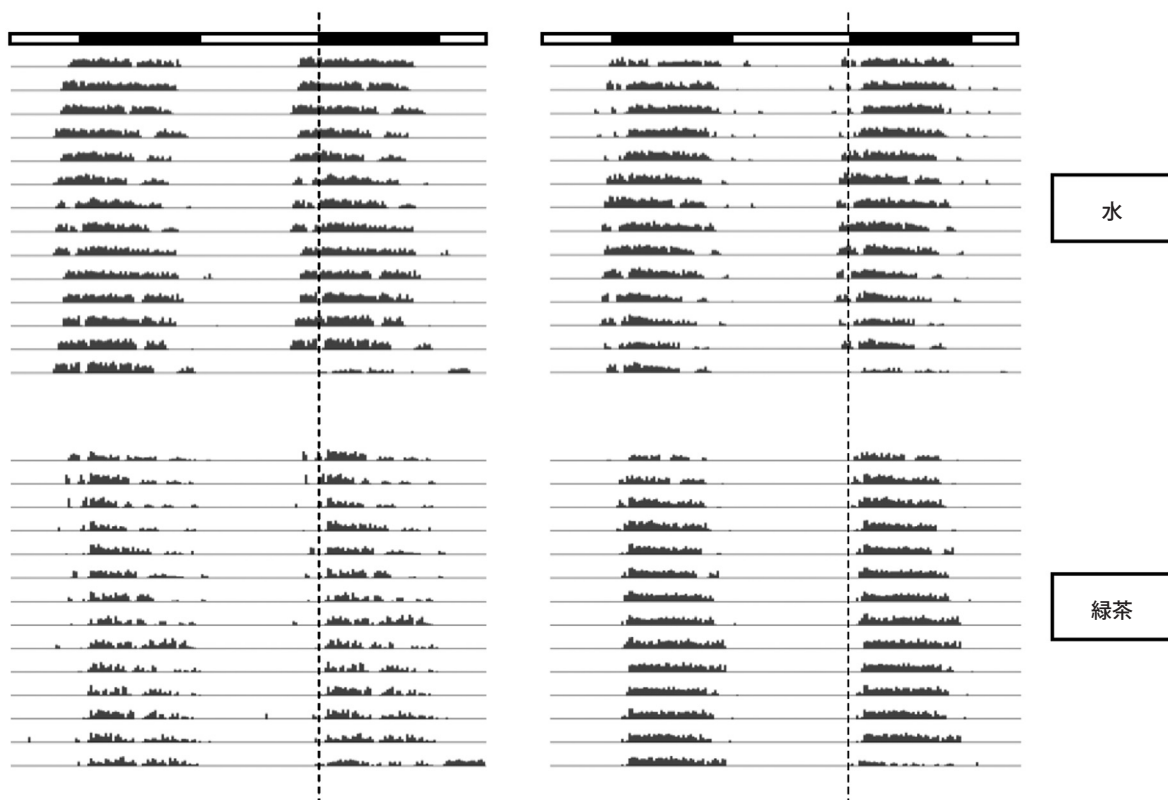


図 1 緑茶の飲用がマウスの自発運動リズムに与える影響

マウスを回転カゴ付きケージで飼育し、5 分毎に回転数を記録した。横 1 列が 48 時間の連続した記録を示し、1 段毎に 24 時間ずつ進むダブルプロットアクトグラム。2 週間にわたり水を飲用させたマウス (上段) と、緑茶を飲用させたマウス (下段) の代表的な 2 例をそれぞれ示した。12 時間の明暗周期を一番上の白黒バーで示している。縦に走る点線は、明期から暗期への切換え時間を示す。水を飲用させた対照群では、暗期に入る直前から行動を始めているのに対し、緑茶飲用群では、暗期に入り、少し遅れてから回転カゴを回し始めている。

ズムを示した (図 3)。この細胞株を利用し、カフェインが細胞のサーカディアンリズムに与える影響を検討した。培地に 2 mM のカフェインを添加し、発光をリアルタイムでモニタリングしたところ、カフェインの添加により、周期長が伸長する傾向にあった (コントロール 25.9 ± 0.5 時間、カフェイン 26.8 ± 0.4 時間; $p=0.07$; 3 回の独立したアッセイによる)。さらに、5 mM のカフェインでは、有意に周期長が伸長した (コントロール 26.0 ± 0.2 時間、カフェイン 27.3 ± 0.2 時

間; $p<0.01$; 4 回の独立したアッセイによる)。

考 察

細胞を使った実験から、カフェインは、各細胞が有している体内時計に直接働きかけて、その周期長を伸ばす効果があることが示唆された。これは、過去の報告において、アカパンカビやクラミドモナスの生育培地にカフェインを添加すると、これらの体内時計が伸長されるという結果^{5), 6)}と一致する。これらの報告で使用され

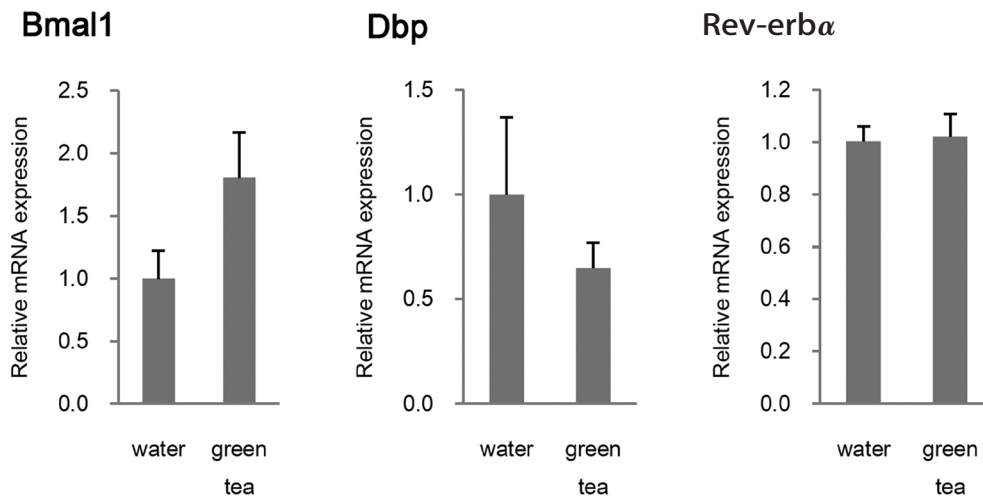


図 2 緑茶の飲用がマウスの時計遺伝子発現に与える影響

図 1 で示した 2 週間の緑茶摂取試験後、ZT5 (明期の始まりから 5 時間後) に肝臓を摘出し、リアルタイム RT-PCR 法により 3 種類の時計遺伝子の発現量を定量した。コントロールである水摂取群の発現量をそれぞれ 1.0 とし、相対発現量で示している。データは平均値 ± 標準誤差 (n = 4)。

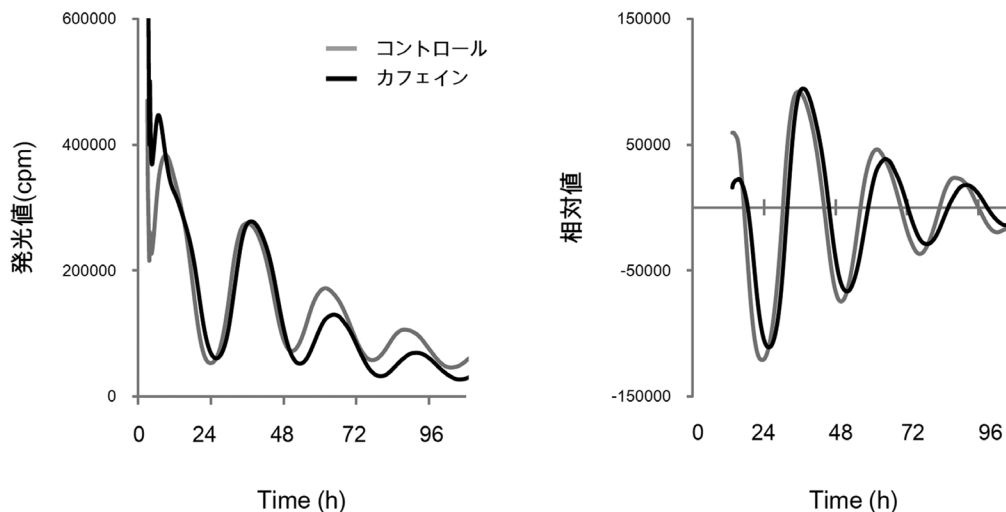


図 3 カフェインが NIH3T3 細胞株のサーカディアンリズムに与える影響

マウス線維芽細胞由来である NIH3T3 細胞株に時計遺伝子 Bmal1 のプロモーターで発現制御したルシフェラーゼ遺伝子 (ホタル発光酵素) を導入し、安定発現株を選抜。培養しながらリアルタイムで発光をモニタリングし、培地にカフェイン (2 mM) を添加した際に、サーカディアンリズムに与える影響を検討した。左は、代表的な発光の実測値データ。右は、発光の経時的な減衰を補正し、前後 12 時間の移動平均値を差し引いた相対的なリズム値。

ているカフェインの濃度は数 mM であり、本研究で使
 用した 2, 5 mM と同程度である。カフェインは、幅広
 い生物の体内時計に対して、いずれも周期長を伸長させ
 るという効果があることになるが、体内時計の分子機構
 は、これらの生物間で保存されておらず、由来は異なる
 という見方が一般的である。本研究によるカフェイン効
 果の相同性は、今後の体内時計研究の重要な手がかりに
 なる可能性がある。カフェインは、その構造がアデノシ
 ンに類似しており、ATP や cAMP を利用する酵素の阻
 害活性が知られていることから、細胞の基本的なエネル
 ギー代謝や、cAMP シグナリングといった共通項から、
 今後、体内時計の種間共通性が理解できるかもしれない。
 また、緑茶の飲用がマウスの行動に与える影響としては、
 やや行動開始点が遅れるという傾向が見られた。この結
 果と合うように、肝臓における時計遺伝子 Bmal1 の発
 現量は増加し、Dbp の発現量は減少する傾向が見られた。
 この 2 つの時計遺伝子は、もともと相反する位相を有
 しており、サンプリングを行った昼間の時刻 (ZT5) に
 おけるこれらの動きは、リズム位相の後退と相関してい
 る可能性が高い。われわれの最近の研究から、カフェイ
 ンにより、恒暗条件で飼育したマウスの行動周期が伸長
 するという結果が得られていることから、緑茶の飲用に
 よる影響がカフェインによる効果である可能性が考えら
 れる。今後、カフェインを低減させた緑茶等で、緑茶の
 他の成分による影響を検討する必要がある。

今後の展望

本研究は、緑茶の飲用がサーカディアンリズムに与え
 る影響を明らかにすることを通して、生体リズムを効率

的に整える食品や食事スタイルについて考えるきっかけ
 になることを期待している。リズム障害が原因で起こる
 睡眠障害や気分障害、あるいは、食事時刻に依存する肥
 満といったように、現代人が抱える多くの問題に生体リ
 ズムが関与している。食事と体内時計の関係を理解する
 とともに、豊かで健康な社会を実現するために、食品が
 寄与できる部分は少なくないと感じている。

要 約

マウスに緑茶を 2 週間飲用させ、行動リズムおよび
 時計遺伝子発現に与える影響を検討した。その結果、行
 動の開始時刻がやや遅れる傾向が見られ、それに伴い、
 肝臓の時計遺伝子発現も変動する傾向が見られた。ま
 た、その影響はカフェインによる効果であることが考え
 られ、実際に、カフェインが培養細胞の体内時計を伸長
 させることを明らかにした。

謝 辞

本研究の遂行には財団法人三島海雲記念財団より賜り
 ました研究助成金が不可欠でした。関係者の皆様方に深
 く御礼申し上げます。

文 献

- 1) 柴田重信, 小田裕昭, 加藤秀夫, 堀江修一, 榛葉繁紀: 時間栄養学
 (香川靖雄編著), 日本栄養・食糧学会監修, 女子栄養大学出版部.
- 2) <http://nfri.naro.affrc.go.jp/guidance/soshiki/kinou/kinouhyouka.html>
- 3) Reppert SM & Weaver DR: Nature, 418, 935-941, 2002.
- 4) Oike H et al.: 論文投稿中, 2010.
- 5) Feldman JF: Science, 190, 789-790, 1975.
- 6) Goodenough JE & Bruce VC: Biol Bull, 159, 649-655, 1980.