

# 概日リズムの攪乱を改善する栄養素の解析 —慢性的時差ぼけモデルを用いたアプローチ—

安尾 しのぶ

九州大学大学院農学研究院 准教授

## 緒 言

近年、24時間営業や夜更かし習慣、昼夜交替制勤務などが増加し、人々をとりまく明暗周期が不規則になっている。人を含む生物には、約24時間周期で刻まれる概日時計が備わっているが、不規則な明暗サイクルは概日時計を乱し、睡眠障害や肥満、高血圧、糖尿病、がんなどのリスクを高めることが明らかになりつつある<sup>1,2)</sup>。2007年には国際がん研究機関により、「概日時計の乱れを含む交替制勤務」が発がん性の可能性が高い因子(group 2A)に分類され、概日時計の乱れに対する対処策の同定が強く望まれる。

概日時計の中核は脳の視交叉上核に存在しており、時計遺伝子の転写・翻訳からなるフィードバックループにより約24時間の概日リズムが刻まれる。時計遺伝子は末梢臓器の細胞にも発現しており、末梢時計として代謝や細胞周期などを制御している。概日時計は環境の光によってリセットされるほか、食事のタイミングにも強い影響を受ける。我々はこれまで、様々な機能性をもつことが知られるアミノ酸栄養に着目し、マウスの活動リズムや時計遺伝子の発現を調節できるアミノ酸をスクリーニングしてきた。また、明暗周期を人為的に乱すことにより、肝臓の時計遺伝子発現や細胞周期関連遺伝子の発現異常を示す慢性的時差ぼけマウスを解析してきた<sup>3)</sup>。本研究では、慢性的時差ぼけマウスを用いて、概日時計調節アミノ酸による改善効果を解析した。

## 結 果

### 1. アミノ酸Aによる慢性的時差ぼけ改善効果

我々はこれまでの研究により、マウスにアミノ酸Aを単回強制経口投与すると、活動リズムの環境応答性や肝臓の時計遺伝子発現が調節されることを見出している。本研究では、アミノ酸Aの飲水投与が慢性的時差ぼけマウスの肝臓における時計遺伝子や細胞周期関連遺伝子の発現に及ぼす影響を解析した。

慢性的時差ぼけ処理(CJL)は先行研究に従い、10日間にわたり明暗周期を2日ごとに8時間前進させる処理とした<sup>3)</sup>。CBA/Nマウス雄を12時間明期12時間暗期(12L12D)で1週間馴化させた後、4群に分けた(アミノ酸投与・12L12D群、蒸留水投与・12L12D群、アミノ酸投与・CJL群、蒸留水投与・CJL群)。飲水をアミノ酸溶液あるいは蒸留水に変更して1週間飼育した後、CJLを行った。その後、光による急性的な効果を排除するため恒暗条件に移し、2日目の4時点における肝臓の時計遺伝子および細胞周期関連遺伝子の発現をreal-time PCRにて解析した。各データは*cyclophilin*の発現量で補正した。

蒸留水を投与した群では、解析を行った時計遺伝子のうち*Clock*の発現リズムがCJLで弱まり、有意な発現量の低下が確認された(図1A)。一方、アミノ酸Aを投与した群では、*Clock*の発現リズムは正常に保持されており、全体的な発現量の亢進が見られた(図1B)。

細胞周期関連遺伝子として、癌原遺伝子である*c-Myc*および癌抑制遺伝子である*p53*の発現を解析した。蒸留水群では、*c-Myc*の発現に有意な変化は見られなかったが、*p53*の発現がCJLにより有意に低下した(図1C)。アミノ酸Aの投与により、CJLによる*p53*の発現低下が阻止された(図1D)。

### 2. 肝臓の時計遺伝子調節アミノ酸による慢性的時差ぼけ改善効果

我々の先行研究により、単回強制経口投与で肝臓における複数の時計遺伝子の発現を変化させるアミノ酸として、トリプトファン(Trp)、リジン(Lys)、ロイシン(Leu)、アルギニン(Arg)を見出している。これらのアミノ酸をCJLとともに強制経口投与することで、CJLの影響を緩和できるか試みた。

CJL処理は上記同様に行った。10日間のCJL期間中、明期開始後3時間目に毎日各アミノ酸(5 mmol/kg)あ

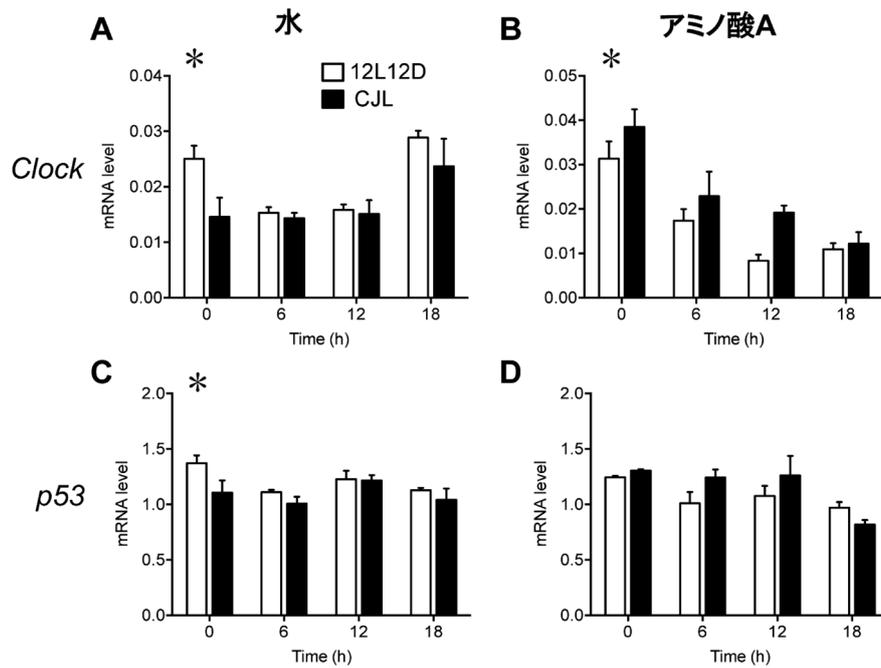


図1 アミノ酸Aの飲水投与が慢性的時差ぼけマウスに及ぼす影響

蒸留水 (A, C) あるいはアミノ酸A (B, D) を飲水で与えたマウスに慢性的時差ぼけ処理 (CJL) を与え、肝臓における *Clock* (A, B) と *p53* (C, D) の発現を解析した。各グラフの左上の\*は、CJLによる有意差を示す (two-way ANOVA, main effect of lighting condition,  $p < 0.05$ )。

るいは蒸留水を強制経口投与した。別途、12L12Dの条件で明期開始後3時間目に蒸留水を強制経口投与する対照群も設けた。CJL終了後、恒暗条件に移して3日目の3時点における肝臓の時計遺伝子や *c-Myc*、*p53* の発現を解析した。

興味深いことに、CJLとともに蒸留水を毎日経口投与したマウスでは、*Clock*の発現リズムが保持されていた (図2)。Trpを投与したマウスでは、リズムの変化が若干見られるのみであったが、Lys、Leu、Argを投与したマウスでは*Clock*の発現量が低下していた (図2)。*p53*の発現についても同様に、CJL下の蒸留水投与で発現の低下が阻止されており、アミノ酸の投与による発現変化は見られなかった。一方、*c-Myc*の発現にはCJL下の蒸留水投与で有意な上昇が見られ、その上昇はTrpの投与により抑制された (図2)。

### 考 察

本研究では、アミノ酸Aの飲水投与により、CJL下の肝臓における *Clock* の発現低下が改善された。*Clock* の突然変異マウスは肥満の表現型を示すことや<sup>4)</sup>、弱い放射線照射下における老化を早めることから<sup>5)</sup>、*Clock* はエネルギー代謝や老化に重要な役割を担うことが示唆さ

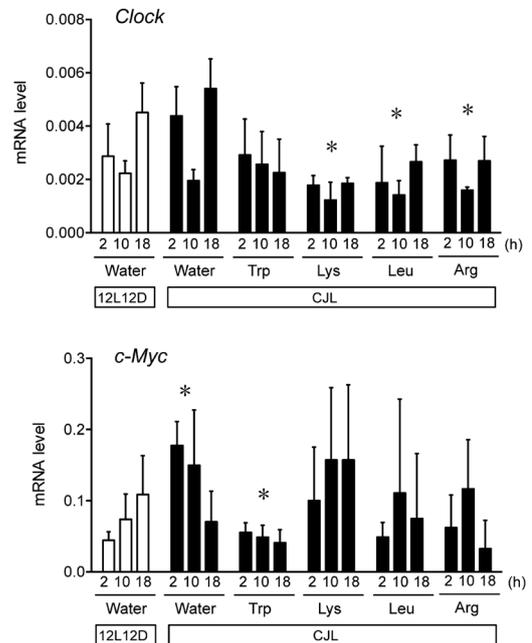


図2 アミノ酸および蒸留水の強制経口投与が慢性的時差ぼけマウスに及ぼす影響

12時間明期12時間暗期 (12L12D) あるいは慢性的時差ぼけ (CJL) 条件において、10日間にわたり、明期開始後3時間目に蒸留水あるいはアミノ酸 (Trp、Lys、Leu、Arg) を強制経口投与した。\*は12L12Dにおける蒸留水投与群と各処理群との有意差を示す (two-way ANOVA, main effect of treatment,  $p < 0.05$ )。

れている。本研究の結果から、明暗周期の乱れは *Clock* の発現異常に関連して代謝等の生体機能を攪乱すること、またアミノ酸Aの摂取によりその異常を予防できることが示唆された。さらに、CJL下における癌抑制遺伝子 *p53* の発現低下がアミノ酸Aの飲水投与で阻止された。この結果から、明暗周期の乱れによるがん発症リスクの上昇をアミノ酸Aにより軽減できる可能性が示唆された。

本研究ではさらに、CJLとともに Trp、Lys、Leu、Arg、あるいは蒸留水を毎日強制経口投与したところ、蒸留水の経口投与により CJL の *Clock* に対する影響が打ち消された。これは予想外の結果であるが、明暗周期が乱れた状況においても、強制経口投与など何らかの刺激が定時刻に与えられれば概日時計の乱れが改善されることを示唆しており、大変興味深い。一方、癌原遺伝子である *c-Myc* の発現については、CJL下の蒸留水投与群で有意に上昇したが、Trpの経口投与によりこの上昇を抑えることができた。Trpは神経伝達物質であるセロトニンや、睡眠に関わると知られるメラトニンの前駆体であり、概日時計との密接な関与が考えられる。現在、経口投与刺激の影響を排除するため、アミノ酸の飲水投与による予防改善効果を解析中である。

## 要 約

明暗周期を乱して作製した慢性的時差ぼけマウスモデルの肝臓における時計遺伝子や細胞周期関連遺伝子の発現異常について、アミノ酸栄養により予防改善できることが明らかとなった。現代社会は24時間型社会と呼ばれ、交替制勤務や24時間営業、時差のある地域への長距離フライト、パソコンやテレビなど光を発する機器の夜間利用など、昼夜を問わず活動する生活形態が広がりつつある。本研究の成果により、栄養学的に概日時計の乱れを予防改善できる道が開かれた。

## 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、研究助成を賜りました公益財団法人三島海雲記念財団ならびに関係者の皆様に感謝申し上げます。本研究は、九州大学大学院農学研究院、代謝・行動制御学のメンバーにご協力頂きました。

## 文 献

- 1) E. S. Schernhammer, et al.: *J. Natl. Cancer Inst.*, **93**, 1563–1568, 2001.
- 2) T. Kubo, et al.: *Am. J. Epidemiol.*, **164**, 206–211, 2006.
- 3) A. Iwamoto, et al.: *Chronobiol. Int.*, **31**, 189–198, 2014.
- 4) F. W. Turek, et al.: *Science*, **308**, 1043–1045, 2005.
- 5) M. P. Antoch, et al.: *Cell Cycle*, **7**, 1197–1204, 2008.