

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 29 日現在

機関番号：23901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K00863

研究課題名(和文) 食用植物種子による時計遺伝子発現の制御：成分の特定と機構解明

研究課題名(英文) Control of clock gene expression by edible plant seeds: identification of components and elucidation of mechanism

研究代表者

岡田 悦政 (Okada, Yoshinori)

愛知県立大学・看護学部・教授

研究者番号：60224036

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：植物種子抽出成分による時計遺伝子制御を目的に、時計遺伝子(Per1、Bmal1)とその制御遺伝子Sirt1発現に影響を与える種子を検索した。その結果幾つかの種子の有効性を確認した。特に、有効性の高かったレタス種子抽出成分について高速液体クロマトグラフィーによる単離及び特定を行った。単離成分毎の遺伝子発現への影響を確認し、その機構を検討した。結果、単離成分毎の遺伝子発現への有効な影響を確認した。また、この単離成分による機構は、NRF2及びNR1D1発現への影響が確認され、これらの遺伝子活性化が関連していた。さらにSIRT1アセチル化酵素活性への影響を確認し、発現機構に関与することが推察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

レタス種子(LSE)には、Sirt1を活性化し、Per1への直接効果があり、ヒストンのアセチル化に関与し、その働きを促進する。LSEがアセチル化に関与できる点は非常に新しい。また、NRF2介在抗酸化経路の活性化を時計遺伝子が調節しており、細胞内redoxバランスは体内時計のズレを含めたストレスや老化等によって、そのバランスの揺らぎが時計遺伝子に影響を与えている可能性がある。LSEの細胞内抗酸化効果は、このredox反応に影響する可能性がある。食成分による時計遺伝子活性化機構を証明した報告はなく、LSEによる遺伝子制御は、体内時計のズレが招いた疾病、生活習慣病を予防、改善する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：For the purpose of clock gene regulation by plant seed extract components, plant seeds that affect the expression of clock genes (Per1, Bmal1) and its regulatory gene Sirt1 were searched. As a result, we confirmed the efficacy of several seeds. In particular, the hot water extracts of lettuce seeds with high efficacy were isolated and identified by high performance liquid chromatography. The effects of each isolated extract component on gene expression were confirmed, and their mechanisms were investigated.

As a result, the effective effect of each isolated component on the clock gene expression was confirmed. In addition, the gene expression mechanism by this isolated component was confirmed to have an effect on NRF2 and NR1D1 expression. Furthermore, the effect of the isolated component on acetyltransferase activity, which is important in the gene activation, was confirmed, and it was speculated that it is involved in the clock gene expression.

研究分野：健康科学

キーワード：時計遺伝子 レタス種子 Sirt1 HPLC NRF2 NR1D1 Bmal1 Per1

1. 研究開始当初の背景

時計遺伝子の中心的な役割を演じる Period(Per)、Cryptochrome(Cry)、Clock、Bmal の 4 つは、約 24 時間のフィードバックループによる連続的な繰り返しを刻んでいる。転写因子 PER と CRY は複合体を作り、転写因子 CLOCK と BMAL を制御する。一方、転写因子 CLOCK、BMAL 複合体は、E-Box(CACGTG,CACGTT)に結合して転写を活性化し、転写因子 PER と CRY が作られる。このように持続的かつ循環的な繰り返しを刻んでいる。この概日リズムにおける時計遺伝子の「ズレ」は乳ガン¹⁾はじめ生活習慣病等を引き起こす。近年、食由来成分の時計遺伝子への影響に関する報告が幾つか見られる。Ribas らは、ブドウ種子から抽出した proanthocyanidin の長期摂取が、肥満ラットの肝臓、腸、そして腸間膜の白色脂肪組織における時計遺伝子および時計制御遺伝子の発現を調節することを報告している²⁾。さらに、Sun らは、resveratrol が、高脂肪食によって誘導された脂質代謝の概日リズム(Clock,Bmal1,Per2)の乱れを修復することを示した³⁾。これらの報告は、共にポリフェノール成分が、脂質代謝を司る時計遺伝子の攪乱を修正する報告である。また、resveratrol は、SIRT1 のアクティベーターでもある⁴⁾。SIRT1 の働きは、アセチル化酵素を経て、時計遺伝子の発現を制御し、CLOCK-BMAL1 複合体を調節するという機構が示されている⁵⁾ため、resveratrol は、SIRT1 のこの働きを促進するのではないかと推察されている。しかしながら、食由来成分による時計遺伝子制御機構についての研究は未だ始まったばかりで、推論の域を出ない。一方、食用植物種子抽出成分(EPPS)は、ポリフェノール性成分を(熱水抽出 0.74-1.96 mg/g、エタノール抽出 1.70-4.40mg/g)含み、活性酸素消去能、抗糖化作用、アミロイド誘導による細胞死を抑制する⁶⁾⁷⁾⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾ことを申請者は、既に報告している。さらに新知見として、EPPS は、平成 26-28 年度の科研費研究において時計遺伝子 Per1 の発現を 25-50%抑制する効果が得られ、resveratrol と同等以上の働きが期待できる可能性がある。本研究は、これらの知見を踏まえ、EPPS の活性成分を特定し、EPPS が影響を及ぼす機構を明らかにすることを目的とする。これらを通し、分子レベルで食由来成分の持つ機能性を明らかにするとともに、食成分の生体への寄与の可能性を広げたい。

2. 研究の目的

本研究においては、時計遺伝子の発現に影響を与えた食用植物種子についてその成分の特定と、それらの機構を検討することにある。食用植物種子抽出成分(EPPS)が、ヒト肺由来線維芽細胞における時計遺伝子の mRNA 発現に影響を与えた熱水抽出の単離及び特定を行い、単離された成分毎の Bmal1,

Per1 そしてこれらの制御遺伝子 Sirt1 の mRNA 発現への影響を検討し、活性成分の特定を行う。また、それらの活性段階の機構を検索する。

【平成 29 年度】

Bmal1,Per1,Sirt1 の発現に影響を与えた熱水抽出成分の単離、特定とその発現の確認を行う。成分単離及び特定と、単離成分の Bmal1,Per1, Sirt1 mRNA 発現への影響を検討する。

【平成 30 年度】

EPPS による時計遺伝子発現機構の確認 Redox 機構の制御を行う Nrf2 及び NR1D1 に対する影響を明らかにする。

【平成 31 年度】

EPPS による時計遺伝子発現機構の確認 アセチル化を促進させ、SIRT1 の働きを増強させるか否かを明らかにする。

3. 研究の方法

【1. 熱水抽出の活性成分の特定】

1) 熱水抽出サンプルの調製

乾燥食用植物種子は、粉碎後蒸留水を加え、100 で 10 分間加熱する。その後、60 分間攪拌後、水層はフィルターにて濾過する。

2) 高速液体クロマトグラフィーによる精製
1)により得られた成分を高速液体クロマトグラフィーにより、さらに分離し同定を行う。

【2. 時計遺伝子の mRNA 発現に対する確認】

1) 細胞の調整

ヒト線維芽細胞を 37、5% CO₂ の条件下で調整培養後、一定細胞数に達した段階で、マイクロプレートにて細胞を播種する。細胞を同調化するため、一週間培養を継続する。

2) 試料投与及び培養

1)に、1-2)によって得られた試料を滅菌フィルター処理後投与し、一定期間培養する。

3) RNA の抽出

各 well より、トータル RNA を抽出する。(NucleoSpin 8/96RNA タカラバイオ)

(実験担当：研究協力者 岡田瑞恵)

4) 時計遺伝子及びその制御遺伝子の発現解析

3)で抽出したトータル RNA は、Bmal1, Per1, 制御遺伝子 Sirt1 のそれぞれの mRNA を逆転写させ、リアルタイム PCR にて測定し解析する。

【3. EPPS による時計遺伝子発現の機構検索】

NRF2 及び NR1D1 発現変化を通しての影響

1) 細胞の調整

ヒト線維芽細胞を 37、5% CO₂ の条件下で調整培養後、一定細胞数に達した段階で、マイクロプレートにて細胞を播種する。細胞を同調化するため、一週間培養を継続する。

2) 試料投与及び培養

1)に、1-2)によって得られた試料を滅菌フィルター処理後投与し、一定期間培養する。

3) RNA の抽出

各 well より、トータル RNA を抽出する。
 (NucleoSpin 8/96RNA タカラバイオ)
 (実験担当：研究協力者 岡田瑞恵)
 4) Nrf2 及び NR1D1 遺伝子の発現解析
 3-3)Nrf2 及び NR1D1 の mRNA を逆転写させ、リアルタイム PCR にて測定し解析する。
 (実験担当：研究協力者 岡田瑞恵)

【4. EPPS による時計遺伝子発現の機構検索】

SIRT1 のアセチル化促進による相乗性効果

1) 細胞の調整

ヒト線維芽細胞を 37、5% CO₂ の条件下で調整培養後、一定細胞数に達した段階で、マイクロプレートにて細胞を播種する。細胞を同調化するため、一週間培養を継続する。

2) 試料投与及び培養

1)に、1-3)によって得られた試料を滅菌フィルター処理後投与し、一定期間培養する。

3) SIRT1 のアセチル化の測定

細胞から核を分離後、核を抽出する。

Nuclear extracts を調製後、マイクロプレートに加え、450nm 測定を行った。
 (EpiQuik™ HAT Activity / Inhibition Assay Kit/ Epigentek Group)

4. 研究成果

(1)熱水抽出の活性成分の特定

【植物種子サンプル 15 種の総フェノール量の測定】

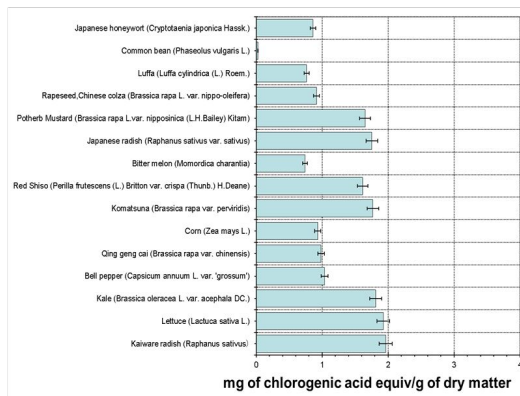


Fig. 1 Total phenolic content of water-soluble extracts from the seeds of 15 dried plants marketed in Japan.

Hot-water 抽出 15 種の種子サンプルについてクロロゲン酸当量測定を行った結果を Fig.1 に示した。

これら EPPS のうち、Hot-water 抽出の Kaiware が最も高い総フェノール量を示し、次いで Lettuce と Kale が同様な結果を示した。

この結果を踏まえ、以下の測定項目に関しては、その上位サンプルについて検討したが、以下については、その代表として Lettuce 種子抽出サンプルを示す。

【レタス種子抽出成分の HPLC 分析結果】

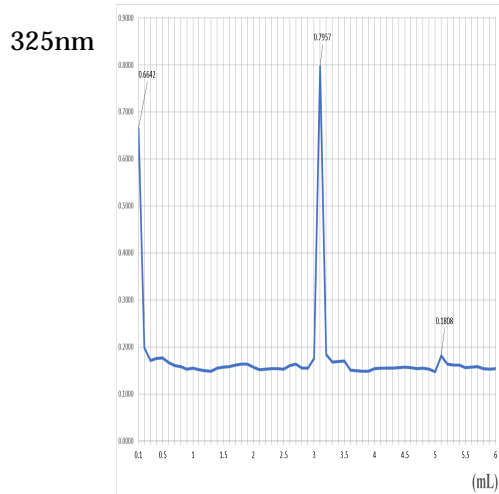


Fig. 2 HPLC analysis of lettuce seed extracts.

Fig.2 に示すように、3.1mL 近辺に 325nm の吸収ピークがある均一な分画成分を単離した。これを以下の実験にレタス種子抽出成分(LSE)として使用した。

(2) 時計遺伝子及び時計制御遺伝子における遺伝子発現量への影響

【 Per1 の mRNA 発現量】

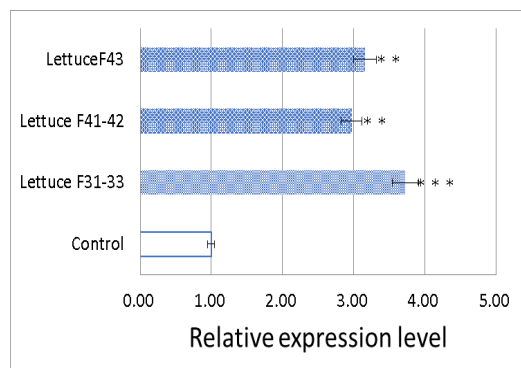


Fig. 3 Effect of fractional components of lettuce seed extracts on the Per1 expression.

Fig.3 に示すように使用した LSE 分画においてコントロールよりも高い発現量を示した。Per1 の発現量に関し、およそ 3~3.5 倍の発現量増大を示した。

【 Bmal1 の mRNA 発現量】

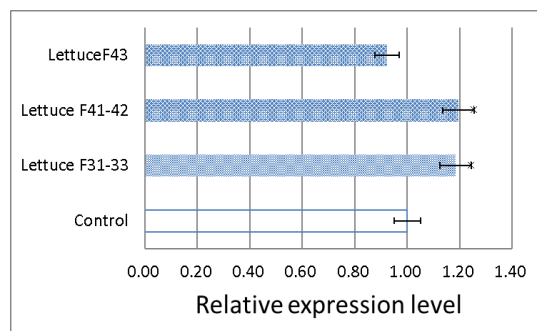


Fig. 4 Effect of fractional components of lettuce seed extracts on the Bmal1 expression.

Bmal1 の発現量は、およそ 1.2 倍の増加を示したが、Per1 発現量 (Fig.3) に比べ分画サ

ンプル全ての増大は見られず、若干異なる結果を示した。

【 Sirt1 の mRNA 発現量 】

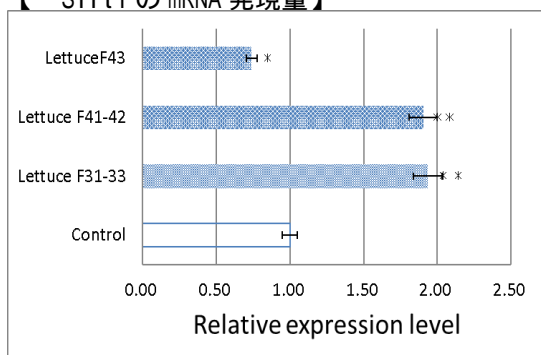


Fig. 5 Effect of fractional components of lettuce seed extracts on the Sirt1 expression.

Sirt1 発現の場合、Bmal1 発現とはほぼ同様な傾向が認められた。また、その発現量の増大はコントロールに比べおよそ 2 倍であり、この点においては Fig.4 に示した Bmal1 発現に比べ、コントロールよりも高い mRNA 発現量を示した。

(3)発現機構の検討

【EPPS による時計遺伝子発現の機構検索】

1) NRF2 及び NR1D1 発現変化を通しての影響

ケルセチン¹²⁾は、果物、野菜、種子、ベリー類、お茶などに含まれる天然のバイオフィラノイドであり、また、レタス種子にはクロロゲン酸異性体が含まれ、その代謝物であるカフェ酸もヒマワリ種子¹³⁾はじめ多くの種子に含まれている。そのため、これら 2 種のポリフェノールを用い、EPPS による時計遺伝子発現機構の確認試験として NRF2 及び NR1D1 発現変化を通しての影響を検討した。

時計遺伝子を活性化する経路は、Resveratrol が Sirt1 を活性化する報告⁴⁾から Oike と Kobori は Sirt1/PCG-1 (ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体-1) を経た経路を推論している。また、それら推論から鑑みると、Sirt1 を活性化することで転写因子 SIRT1 がより多く CLOCK-BMAL 複合体に結合する機会を得ることが推察される。EPPS の場合も同様な機構が考えられるが、さらに別の可能性を確認するため、EPPS による時計遺伝子発現の機構検索として、NRF2 の発現変化を通しての影響について検討を行う。NRF2 が redox バランスと概日リズム振動の関性に介在し、その中心的な役割を NADPH が担っていることから¹⁴⁾、試料は、抗酸化機能を有するポリフェノールを含有するため、細胞内 redox 反応に関与することが推定され、その結果 redox に変化を与えることが、時計遺伝子にどのような影響を与えるのか、また、NRF2 の役割に変化を与えるのか (Nrf2 の mRNA レベル) を明らかにするため研究を実施した。Nrf2 の mRNA 発現に変化が認められないなら、粗抽出の段階で認められた Bmal1, Per1, Sirt1 への影響から、直接的な影響も

考えられる。同時に、遺伝子発現機構に關与する NR1D1 発現への影響も検討した。

【 NRF2 発現量 】

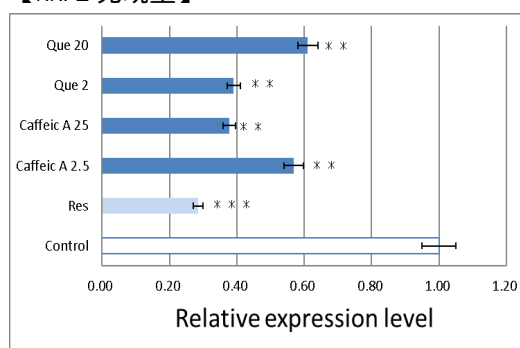


Fig. 6 Effects of resveratrol(Res), quercetin(Que2, 20 μ M) and caffeic acid(Caffeic A 25, 25μM) on the NRF2 expression.

Fig.6 に示すように、全てのサンプルにおいて NRF2 発現は抑制された。比較物質として示したレスベラトロールと同様な傾向であったが、それぞれのサンプルにおいて濃度特性が示された。

【 NR1D1 発現量 】

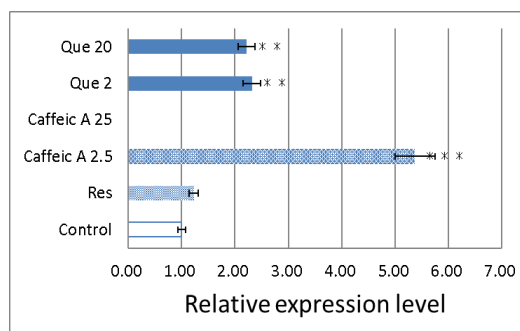


Fig. 7 Effects of resveratrol(Res), quercetin(Que2, 20 μ M) and caffeic acid(Caffeic A 2.5, 25μM) on the NR1D1 expression.

NR1D1 発現量に関し、レスベラトロールに比べ、Caffeic A 25 を除き高い発現量の増大を示した。恐らくこのことが時計遺伝子、及び制御遺伝子発現へ大きな機構関与が推察された。

【EPPS による時計遺伝子発現の機構検索】

2) SIRT1 のアセチル化促進による相乗性効果

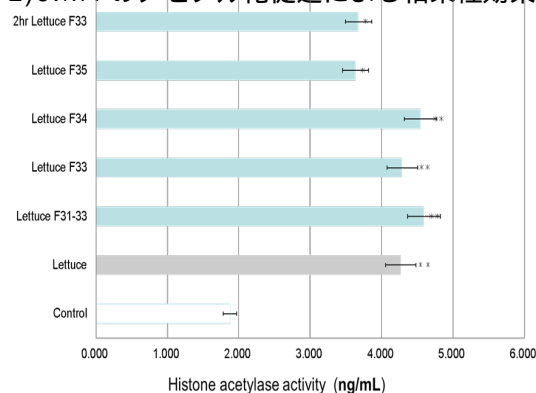


Fig. 8 Effect of lettuce and its fractionation components on histone acetylase activity in young cells.

ヒストンアセチル化酵素活性は、使用した LSE 全ての分画サンプルにおいてコントロールよりも高い活性を示した。この結果もまた、時計遺伝子、及び Sirt1 の mRNA 発現量への影響を示す結果と関連する内容と考えられる。

これらの結果は少なくとも EPPS の代表とした LSE 分画成分は、時計遺伝子 Bmal1, Per1、及びその制御遺伝子 Sirt1 mRNA 発現への影響を示した。またこれらの遺伝子発現への影響に関する機構は、今回検討した Nrf2 mRNA 発現の抑制、同時測定 of NR1D1 発現増大、さらにヒストンアセチル化酵素活性への直接的な影響等が、現段階で認められ、その可能性を示唆した。

【References】

- 1) S Davis, DK Mirick, RG Stevens, *J Natl Cancer Inst*, 93(20),1557-1562,2001
- 2) Ribas-Latre A, Baselga-Escudero L, Casanova E et al., *J Nutr Biochem*, 26(2),112-119,2015
- 3) Sun L, Wang Y, Song Y et al., *Biochem Biophys Res Commun*, 458(1),86-91,2015
- 4) H Oike and M Kobori, *Biosci Biotechnol Biochem*,72(11),3038-3040,2008
- 5) Insung Park, Yool Lee, Hee-Dae Kim et al., *Endocrinol Metab*, 29,370-387,2014
- 6) Y Okada and M Okada, *Journal of pharmacy & bioallied sciences*, 5(2),141-147,2013
- 7) Y Okada, M Okada, Y Sagesaka, *Plant Foods for Human Nutrition*, 65(3),225-232,2010
- 8) Y Okada and M Okada, *Journal of pharmacy & bioallied sciences*, 8(2),141-145,2016
- 9) 岡田瑞恵、岡田悦政、基礎老化研究、39(3), 2015
- 10) M Okada and Y Okada, *Biochemistry research international*, 9347468, 2016
- 11) Y Okada and M Okada, *J.Diabetes& Metabolism*, 5(5), 1-8, 2014
- 12) Oboh G, Ademosun AO, Ogunsuyi OB, *Adv Exp Med Biol*, 929, 377-387, 2016
- 13) Suryaprakash P, Kumar RP, Prakash V, *Int J Biol Macromol*, 27(3), 219-228, 2000
- 14) G Rey, U K.Valekunja, K A.Feeney, L Wulund et al., *Cell Metabolism*, 24,462-473, 2016

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yoshinori Okada, Mizue Okada	4. 巻 47(2)
2. 論文標題 Quercetin, Caffeic Acid and Resveratrol Regulate Circadian Clock Genes and Aging-Related Genes in Young and Old Human Lung Fibroblast Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mol Biol Rep	6. 最初と最後の頁 1021-1032
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11033-019-05194-8.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岡田瑞恵、岡田悦政
2. 発表標題 食品機能性成分とフキノトウ花蕾抽出成分のヒストンH3、H4およびアセチル化の検討
3. 学会等名 日本家政学会第73回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡田悦政、岡田瑞恵
2. 発表標題 レタス種子抽出分画成分による遺伝子活性化機構
3. 学会等名 日本家政学会第73回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡田悦政、岡田瑞恵
2. 発表標題 植物種子抽出分画成分による時計遺伝子の活性化
3. 学会等名 日本家政学会第72回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡田瑞恵、岡田悦政
2. 発表標題 カフェ酸、ケルセチンのNR1D1およびNRF2発現への影響
3. 学会等名 日本家政学会第71回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡田悦政、岡田瑞恵
2. 発表標題 ヒト肺若齢及び老齡線維芽細胞における食用植物種子抽出物による時計遺伝子転写因子の制御
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 岡田瑞恵、岡田悦政
2. 発表標題 Petasites japonicus 抽出成分による REV-ERB alpha , Nrf2の mRNA 発現量の変化
3. 学会等名 日本家政学会第70回大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 岡田悦政	4. 発行年 2021年
2. 出版社 八千代出版	5. 総ページ数 192
3. 書名 Active Aging 健康管理学 - 予防医学の視点から -	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	岡田 瑞恵 (Okada Mizue)	y m s ラボ・Ageing and Nutrition Research・Nutrition Section	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関