

平成 30 年 5 月 13 日現在

機関番号：23901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26560062

研究課題名(和文) 食用植物種子は時計遺伝子発現を制御するか? -食による新たな疾病予防への挑戦 -

研究課題名(英文) Do the edible plant seeds control clock gene expression? - Challenge to the new disease prevention by food

研究代表者

岡田 悦政 (OKADA, Yoshinori)

愛知県立大学・看護学部・准教授

研究者番号：60224036

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：24時間周期は視交叉上部核で制御されている。ヒト肺老齡線維芽細胞時計遺伝子(Per1&Bmal1)と時計制御遺伝子(Sirt1)に関し、種子熱水、エタノール抽出物の影響を分析した。Per1増加は熱水、エタノール抽出物であった。Bmal1は増加、Sirt1は抑制、PER1とBMAL1転写因子は増加、SIRT1はレスベラトロールと類似、グルココルチコイド受容体は増加。種子抽出物は時計機構の標的となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The main component of the circadian system is the suprachiasmatic nucleus. The study was to analyze the effects of hot-water and ethanol extracts from plant seeds on changes in the expression of clock genes (Per1 and Bmal1) and clock-controlled gene (Sirt1) in the human lung old fibroblasts. Per1 increased in the hot-water extracts and in the ethanol extracts. Bmal1 was up-regulated in the samples. Sirt1 decreased in the samples. PER1 and BMAL1 transcription factors increased in the samples. SIRT1 showed similar patterns to the resveratrol. Glucocorticoid receptor increased. Some of plant seeds increase the transcription factors of clock genes in the old fibroblasts, which mean that clock machinery is a target for these extracts.

研究分野：健康管理学

キーワード：時計遺伝子 植物種子 肺線維芽細胞 時計制御遺伝子 転写因子 グルココルチコイドレセプター  
RT-PCR Sirt1

1. 研究開始当初の背景

概日リズムのズレは、様々な疾病や老化との関連性が示唆されている。近年、時計遺伝子が細胞代謝を司り、概日リズムをコントロールしていることが少しずつ明らかになっている。時計遺伝子をコントロールすることは、広く疾病や老化を予防することに繋がっている。

時計遺伝子の中心的役割を担う Period (Per)、Cryptochrome (Cry)、Clock、Brain and Muscle Arnt-like (Bmal or Arntl) の4つの遺伝子は、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 と BMAL 複合体は E-Box に結合して転写を活性化し、転写因子 PER と CRY が作られる。2008年に Oike と Kobori は、100 $\mu$ M-Resveratrol が Bmal, Per を活性化することを報告している<sup>1)</sup>。また、長寿遺伝子とされる Sirt1 の転写因子 SIRT1 は時計遺伝子の転写因子 CLOCK-BMAL 複合体に直接結合する<sup>2)</sup>。Resveratrol は Sirt1 を活性化する報告から鑑みて、一つの機構として推論されるのは、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。

一方、本実験に使用した食用種子抽出成分 (EPS) はフェノール性成分を熱水抽出において 0.74-1.92 mg/g<sup>6)</sup>、エタノール抽出において 1.70-4.40mg/g<sup>4)</sup> 含有しており、抗酸化性ばかりでなく、生体に対する有益な可能性を有し、例えば、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 誘導の酸化ストレスの防御<sup>3)</sup>、抗炎症作用、アディポネクチン産生効果<sup>4)</sup>、アミロイド $\beta$  による細胞傷害抑制効果<sup>5)6)</sup> 等を示している。「食」の立場から時計遺伝子をコントロール出来るか、EPS を通じて検討する。

2. 研究の目的

本研究は、食由来成分による概日リズム制御が可能であるかという点にある。EPS の潜在的な可能性の一つとして、時計遺伝子の制御に対して検討することを目的としている。

【平成26年度】

時計遺伝子 Per1, Bmal1 (Clock に比べ判定が確実なため Bmal に変更)、それらの制御遺伝子 Sirt1 の mRNA 発現に対し、トータル26種の Per1 の検討から選択した8種の EPS が影響を及ぼすのかを検討する。

【平成27年度】

平成26年度の結果を受け、Per1, Bmal1, Sirt1 の mRNA の発現に影響を与えた EPS について、それぞれの転写因子についても検討する。

【平成28年度】

Per1, Bmal1, Sirt1 の mRNA 発現に変化を与えた一つの機構を仮定し検討するため、Glucocorticoid receptor 量に対する変化

を検討する。

3. 研究の方法

【試料調製】

EPS はそれぞれ粉碎後、熱水抽出及びエタノール (EtOH) 抽出し、調整試料とした。Hot-water 抽出14種 (Cabbage, Bitter melon, Carrot, Green soybean, Japanese radish, Qing geng cai, Shiso, Lettuce, Rapeseed (Chinese colza), Okra, Potherb Mustard, Luffa, Corn, Komatsuna)、EtOH 抽出12種 (Cabbage, Green soybean, Japanese radish, Qing geng cai, Lettuce, Potherb Mustard, Spinach, Broccoli, Onion, Asparagus, Edible burdock, Chinese chives) のサンプルを試料とした。Oike と Kobori の報告<sup>1)</sup> から比較物質として 100 $\mu$ M Resveratrol を用いた。

【細胞の調整】

ヒト線維芽細胞 (TIG-1-60) を 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 条件下にて一定期間調整培養した。

【試料投与及び培養】

マイクロプレートに細胞を一定数播種後、同調化させるため一週間培養後、サンプルを投与した。

【RNAの抽出及びmRNA発現】

各 well からトータル RNA を抽出し、Per1, Bmal1, Sirt1 を逆転写させ、リアルタイム PCR にて測定し解析した。

【mRNAの転写因子の測定】

各 EPS による時計遺伝子活性化の結果を受け、転写因子 PER1, BMAL1 制御遺伝子 SIRT1 が増加するか否か ELISA 法によって、タンパク量を検討した。

【Glucocorticoid receptor 量の測定】

Glucocorticoid が receptor に結合すると E-Box を活性化することが報告されているため、ELISA 法を用い Glucocorticoid receptor 量を測定した。

4. 研究成果

(1) 時計遺伝子 Per1, Bmal1 及び時計遺伝子制御遺伝子 Sirt1 の mRNA に対する発現量への影響

【Per1のmRNA発現量】

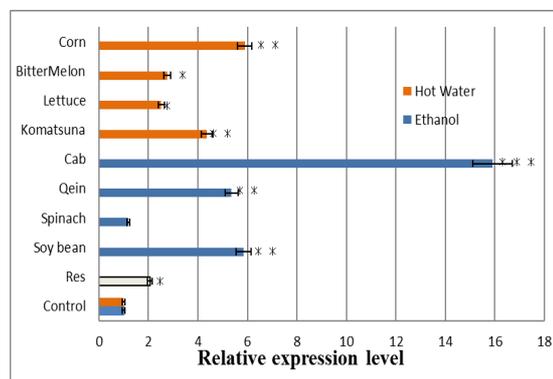


Fig.1 The levels of Per1 expression

Hot-water 抽出14種、EtOH 抽出12種の種

子サンプルについてスクリーニングを行った結果、コントロールよりも高い発現量を示した8種のEPSについてFig.1に示した。

これらEPSのうち、EtOH抽出のCabが最も高い発現量を示し、次いでEtOHのSoy beanとHot-water抽出のCornが同様な結果を示した。比較物質として用いたResveratrolはコントロールより高いものの、Spinachに次ぐ結果に留まった。

これらのPer1のmRNA発現に対する結果を踏まえ、以下の測定項目に関しては同サンプル(8種)について検討した。

【 Bmal1 の mRNA 発現量 】

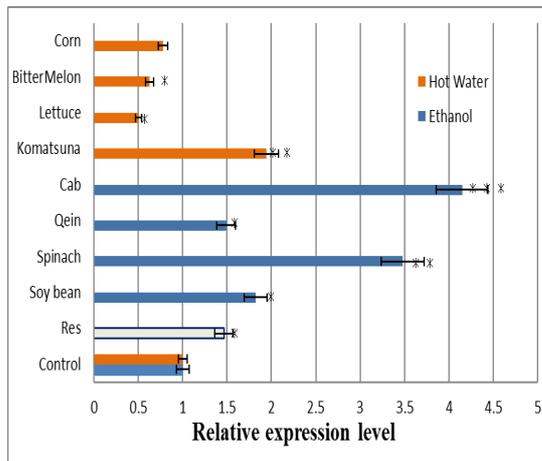


Fig.2 The levels of Bmal1 expression

Fig.2に示すように、EtOH抽出はコントロールよりも全て高い発現量を示し、中でもCabが顕著に高い結果を示した。Hot-water抽出のうち、コントロールより高い活性を示したEPSはKomatsunaのみであった。Resveratrolはコントロールよりも高い発現量を示したものの、Qeinとほぼ同様な結果であった。

【 Sirt1 の mRNA 発現量 】

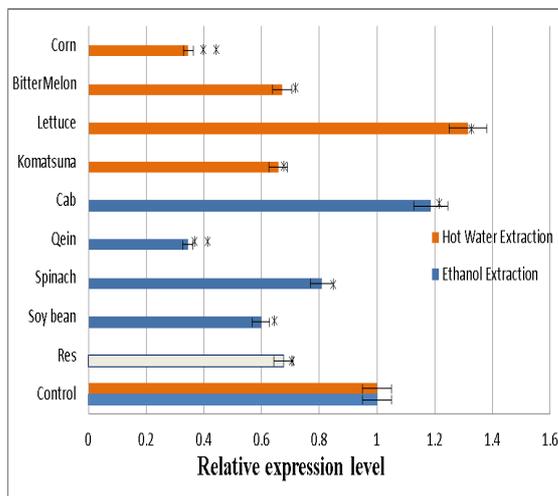


Fig.3 The levels of Sirt1 expression

比較物質である Resveratrol はコントロー

ルよりも低い結果を示したが、EPSはHot-water抽出のLettuceそして、EtOH抽出のCabが有意に高い発現量を示した。以上3つの発現量を示した結果から、Cabの時計遺伝子の発現への影響が認められ、Sirt1との関連による可能性が示唆されたものの、この点はさらなる確認が必要である。

(2) 時計遺伝子及び時計遺伝子制御遺伝子における転写因子タンパク発現量への影響

【 PER1 のタンパク発現量 】

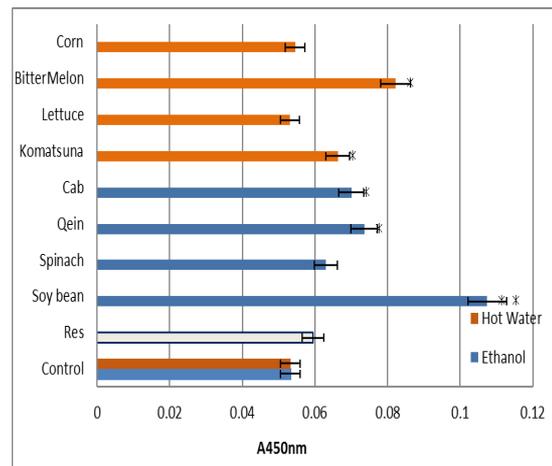


Fig.4 The levels of transcription factor PER1

タンパクの発現量はmRNA発現量(Fig.1)とは異なる結果を示した。EtOH抽出の場合、全てコントロールより高いものの、Soy beanが最も高タンパク量であった。Hot-water抽出の場合、コントロールより有意に高いタンパク量を示したEPSはBitter melon, Komatsunaであった。

【 BMAL1 のタンパク発現量 】

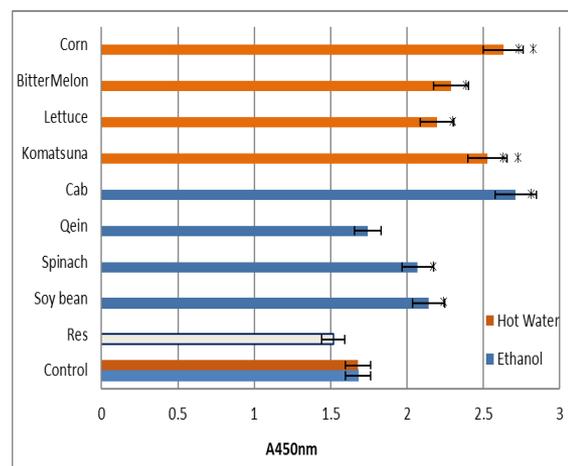


Fig.5 The levels of transcription factor BMAL1

Hot-water抽出の場合、mRNA発現とほぼ同様な傾向が認められた。また、EtOH抽出の場合もSoy beanを除いては同様な傾向が

認められた。コントロール及び Resveratrol よりも全ての EPS においてタンパク量は多く、この点においては Fig.2 に示した様に、コントロールよりも低い mRNA 発現量を示した Hot-water 抽出の Corn, Bitter melon, Lettuce の関係性と異なる（相関しない）。EtOH 抽出の Cab においては、mRNA 発現とタンパク量が唯一同様な傾向を示した。

### 【 SIRT1 のタンパク発現量】

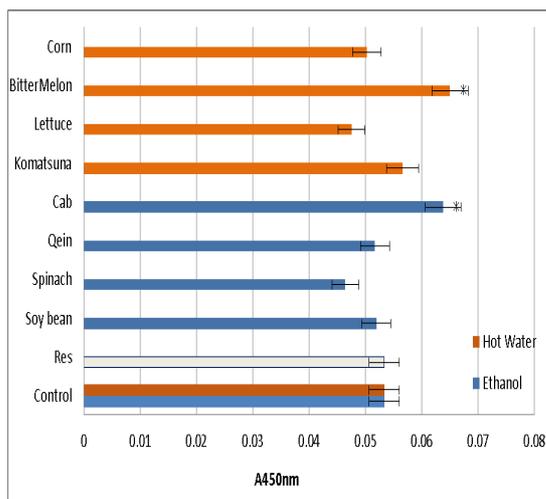


Fig.6 The levels of transcription factor SIRT1

コントロールよりも高いタンパク量を示したのは、Hot-water 抽出の Bitter melon, Komatsuna、EtOH 抽出の Cab であった。Resveratrol はコントロールとほぼ同様な結果を示した。Sirt1 の mRNA 発現量と比較すると異なる結果を示した。EtOH 抽出の Cab は唯一同様な傾向が見られた。mRNA 発現とタンパク量の異なりは、タンパクの分解速度や転写及び翻訳レベルでのコントロール、タンパク合成の時間など様々な理由が考えられ、今後さらに検討を行う必要がある。

### (3)発現機構の検討

Glucocorticoid を介する間接的経路の確認試験として Glucocorticoid receptor- $\alpha$  量への影響を検討した。

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<sup>1)</sup>から Oike と Kobori は Sirt1/PCG-1 $\alpha$  (ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体-1 $\alpha$ ) 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。EPS 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、Glucocorticoid receptor- $\alpha$  の関与する経路を検討した。Glucocorticoid は receptor に結合すると、E-box を活性化することが知られるため<sup>7)8)</sup>、Glucocorticoid receptor- $\alpha$  量の測定を通して EPS の影響を検討した。

### 【 Glucocorticoid receptor- $\alpha$ 量】

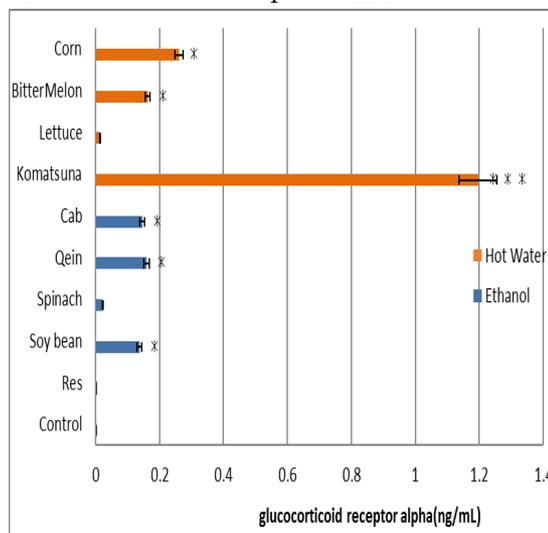


Fig.7 The levels of Glucocorticoid receptor- $\alpha$

Hot-water 抽出の Lettuce, EtOH 抽出の Spinach を除いた EPS において、コントロールよりも有意に高い結果を示した。中でも Hot-water 抽出の Komatsuna が著しく高いレベルを示し、Resveratrol はコントロールレベルであった。

Fig.6 で示した結果と照らし合わせると、Komatsuna は SIRT1 タンパクレベルがコントロールレベルよりもやや高いものの有意差はなく、逆に Glucocorticoid receptor- $\alpha$  が著しく高くなったことから、SIRT1 を介した経路ではない可能性を示唆した。

### 【References】

- 1) H Oike and M Kobori, Biosci biotechnol Biochem, 72(11), 3038-3040, 2008
- 2) G Asher et al., Cell, 134(2), 317-328, 2008
- 3) M Okada, Y Okada, R Inaba et al. Environ Health Prev Med. 3(1), 6-11, 1998
- 4) Y Okada, M Okada, Y Sagesaka, Plant Food Hum Nutr, 65(3), 225-232, 2010
- 5) 岡田瑞恵, 岡田悦政 基礎老化研究, 39(3), 43-48, 2015
- 6) Y Okada and M Okada, J Pharm Bioallied Sci, 8(2), 141-145, 2016
- 7) S Young et al., Endocrinology, 150(5), 2153-2160, 2009
- 8) P G Abellan et al., PLOS ONE, 7(12), 1-10, 2012

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 6 件)

1. 岡田瑞恵、岡田悦政

Petasites japonicus による時計遺伝子 mRNA 発現量変化の関連因子の検討  
日本家政学会第 69 回大会、2017.5.26 ~ 28、奈良女子大学(奈良県奈良市)

2. 岡田悦政、岡田瑞恵

植物種子抽出物による時計遺伝子の活性化機構、日本家政学会第 69 回大会、2017.5.26 ~ 28、奈良女子大学(奈良県奈良市)

3. 岡田悦政、岡田瑞恵

ケルセチンとコーヒー酸はヒト肺若齢及び老齢線維芽細胞の時計遺伝子を制御する(その 2)、第 89 回日本生化学会大会、2016.9.25 ~ 27、仙台国際センター(宮城県仙台市)

4. 岡田瑞恵、岡田悦政

概日時計遺伝子発現に対する *Petasites japonicus* の影響、日本家政学会第 68 回大会、2016.5.27 ~ 29、金城学院大学(愛知県名古屋市)

5. 岡田悦政、岡田瑞恵

植物種子抽出物による時計遺伝子の活性化、日本家政学会第 68 回大会、2016.5.27 ~ 29、金城学院大学(愛知県名古屋市)

6. 岡田悦政、岡田瑞恵

ケルセチンとカフェ酸はヒト肺若齢及び老齢線維芽細胞における時計遺伝子を制御する、BMB2015、2015.12.1 ~ 8、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

岡田 悦政 (OKADA, Yoshinori)  
愛知県立大学・看護学部・准教授  
研究者番号：60224036

(2)研究協力者

岡田 瑞恵 (OKADA, Mizue)  
Yms Laboratory