

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：33402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K02231

研究課題名(和文) ヒストンの脱アセチル化を介して抗老化作用を発揮する食品成分の探索

研究課題名(英文) Search for food ingredients that exert anti-aging effects through histone deacetylation

研究代表者

名取 貴光 (Natori, Takamitsu)

山梨学院大学・健康栄養学部・教授

研究者番号：00528721

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ヒストン脱アセチル化調節を介してアンチエイジング効果を有する食品成分として梅由来のリグナン化合物を見出した。これらリグナン化合物は、クラス I に属するHDACを活性化していた。そこで、線虫の寿命延伸に関わるクラス I HDACを検証したところ、HDAC1,2,3の活性化が寿命延伸に関わることが明らかとなった。梅リグナンのセコイソラリシレシノールとピノレシノールはHDAC活性を増強し、ヒストンの脱アセチル化を促進することでpmk-1を活性化または発現誘導し、次いでskn-1を核内移行させて寿命延伸に関連する遺伝子sod-1やgcs-1などの発現を増強することで寿命を延長していると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに報告されているレスベラトロールによるサーチュインの活性化は、直接寿命の延伸に結びつくわけではなく、一定の条件下(カロリー制限下)での効果・作用であった。今回我々の見出した梅由来のリグナン化合物は、HDACを介して遺伝子発現を調節し、寿命の延伸を導いていた。この作用機序は、これまでと異なる新規なアンチエイジングシグナルである。また、HDACの活性を調節する成分を探索することで、寿命の延伸に効果を発揮する成分が見出せる新たな評価系を確立した。この手法により、効率的に有効成分の探索が行えるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We have found a lignan compound derived from plum as a food ingredient having an anti-aging effect through the regulation of histone deacetylation. These lignan compounds activated HDACs belonging to class I. Therefore, when we examined Class I HDACs involved in extending the lifespan of *C. elegans*, it became clear that activation of HDACs 1, 2, and 3 was involved in extending the lifespan. Secoisolariciresinol and pinoresinol of plum lignans enhance HDAC activity and activate or induce expression of pmk-1 by promoting histone deacetylase, and then skn-1 is translocated into the nucleus to extend its lifespan. It is considered that the life span is extended by enhancing the expression of genes related to sod-1 and gcs-1.

研究分野：食品科学、神経科学、糖鎖生物学

キーワード：HDAC リグナン skn-1 pmk-1 寿命延長 hda-2

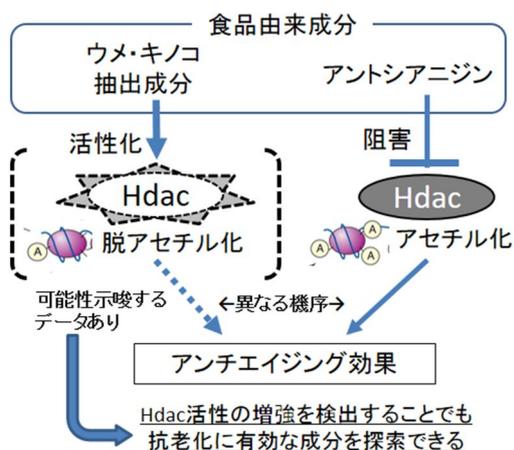
## 1. 研究開始当初の背景

長寿遺伝子として注目を集めているサーチュインは、活性化によって寿命を延ばすことが多くの生物種で知られていた。しかし、このサーチュインを介した寿命延伸は、カロリー制限時や高脂肪食付与時などの限定条件下において寿命が延びる現象であること、また、サーチュインを活性化する安全で確実な成分が見出せていないこと、など、多くの課題が挙げられていた。このサーチュインの活性化には、ブドウなどに含まれるレスベラトロールが有効であることが示されているが、日常の食事から必要量を摂取することは困難である。アンチエイジングに効果のある食品成分を探索する場合、サーチュインとは異なる新しいアンチエイジングシグナルを見つけ出し、そのシグナル系を標的とした成分探索系を確立することが望まれていた。

申請者らは、クラス Hdac 活性の阻害を指標に食品由来成分の中からアンチエイジング効果を示す分子の選定を行い、アントシアニン類を分離・同定する中で、ウメやキノコ由来抽出液が Hdac 活性を増強することでアンチエイジング効果を発揮している可能性を示すデータを得ていた。

## 2. 研究の目的

近年、長寿遺伝子サーチュイン(クラス に分類される Hdac の一つ)が注目を浴び、Hdac を介する転写調節の研究が数多く進められている。我々も、クラス Hdac 活性の阻害を指標に食品由来成分の中からアンチエイジング効果を示す分子として、アントシアニン類を分離・同定してきた。その過程において、Hdac 活性を増強することでアンチエイジング作用を発揮する物質が存在することを発見した。本研究では、未解明の Hdac 活性増強によるヒストン脱アセチル化調節を介したアンチエイジング効果の存在とその分子メカニズムを明らかにし、Hdac 活性増強を指標とする新たな評価系を構築することを目的とした。また、その評価系を用いて、アンチエイジング効果を有する食品のスクリーニングを試みた。



## 3. 研究の方法

### (1) 人工合成蛍光基質を利用した Hdac 活性測定

人工合成の蛍光基質ペプチドのアセチル化リジン残基は、Hdac により脱アセチル化を受けることでリシルエンドペプチダーゼによる切断を受け蛍光を発する。この蛍光強度を測定して Hdac 活性の測定を行った。クラスの Hdac (Hdac1,2,3) を含む反応系に、蛍光基質ペプチド、リシルエンドペプチダーゼ、リグナン化合物を添加して蛍光強度を測定した。

### (2) Hdac により制御を受けている老化関連遺伝子の選定

線虫は、ライフサイクルが短く、短期間で寿命解析が可能であることに加え、多くの変異体が入手可能である。線虫の寿命延伸に関与するクラス HDAC (HDAC1,2,3) を特定するため、それぞれの酵素を欠損する線虫(変異体、hda-1,2,3)を用いて寿命解析の検討を行った。試料無添加の餌を与えたコントロール群を対照とし、試料(リグナン化合物)を混合した餌を与えた群の累積生存率を算出し、カプラン・マイヤー法を用いて生存分析を行った。同時に細胞体の異常や生殖能など安全性の確認を行った。

### (3) Hdac の活性化によるアンチエイジング効果の分子メカニズムの解明

活性分子を含んだ画分の投与群に対して、老化マーカー遺伝子の発現解析(リアルタイムPCR 及び蛍光観察)を行い、Hdac により制御される寿命延伸関連遺伝子の解析を行った。また、関連遺伝子とそのシグナル系の変異体を用いて寿命延伸効果への関与を確認した。更に、GFP を遺伝子下流に組み込んだトランスジェニック線虫を入手して活性分子を含む画分添加による遺伝子発現の局在と経時的変化を確認した。

#### 4. 研究成果

クラス に分類される Hdac は、DNA が巻きついているヒストンタンパク質のアセチル基を除去する酵素で、代謝に関連する様々な遺伝子発現を調節することが知られている。最近、Hdac を阻害することで寿命が延伸されることが示されているが、我々は、リグナン化合物が Hdac 活性を増強することで寿命を延伸している可能性のあることを見出した。そこで、リグナン化合物(シリングレシノール、セコイソラリシレシノール、ピノレシノール、ラリシレシノール)の Hdac 活性に対する阻害効果の有無を検証した。その結果、ピノレシノール、ラリシレシノールに有意な HDAC 活性の増強がみとめられた (Fig.1a)。これらリグナン化合物はクラス に属する HDAC を活性化していた。また、クラス の Hdac である SIRT1 に対する活性増強の有無を確認したところ、いずれのリグナン化合物においても有意な活性増強は確認されなかった (Fig.1b)。したがって、ピノレシノールおよびラリシレシノールは、クラス Hdac を特異的に活性化し、その影響のもとで線虫の寿命を延伸していると考えられた。

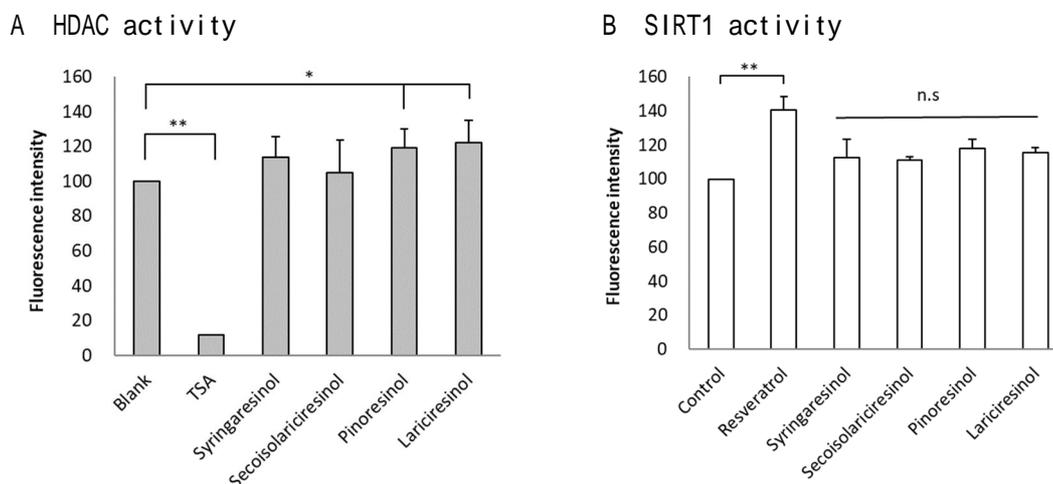


図1 リグナン化合物の Hdac 活性及び Sirt1 活性に対する影響

A)HDAC に対する増強活性、B)SIRT1 に対する増強活性.The values are represented as mean  $\pm$  SD in comparison to control. (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , ANOVA)

また、我々は、これらリグナン化合物が線虫の寿命を延伸することを確認している(図2)。そこで、線虫の寿命延伸がクラス のどの HDAC の関与であるのかを確認するため、各 Hdac を欠損する線虫(クラス Hdca の変異体、hda-1 (HDAC1 の変異体)、hda-2 (HDAC3 の変異体)、hda-3 (HDAC2 の変異体))にリグナン化合物を投与し、寿命延伸の有無について検討を行った。その結果、hda-1、hda-2、hda-3 のいずれの変異体においてもリグナン化合物による寿命の延伸は確認されなかった(図3)。また、HDAC4 の変異体である hda-4 株と SIRT1 の変異体である sir2.1 株に同様の試験を行ったところ、いずれの変異体においても有意な寿命延伸が確認された。図1に示したように、ピノレシノールとラリシレシノールは有意に HDAC 活性を増強しており、これらによるクラス の HDAC1,2,3 の活性化が寿命延伸に関与している可能性が示唆される。

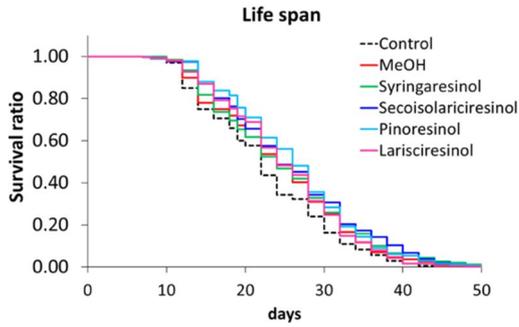


Table Lifespan analysis of worms cultured with lignans.

	Mean ± SD	Log rank test (Mantel-Cox) VS Control
Control	22.58 ± 0.47	-
MeOH	24.48* ± 0.51	p < 0.001
Syringaresinol	24.93* ± 0.51	p < 0.001
Secoisolariciresinol	25.90* ± 0.48	p < 0.001
Pinoresinol	26.17* ± 0.45	p < 0.001
Lariciresinol	24.94* ± 0.43	p < 0.001

図2 リグナン化合物による線虫の寿命延長効果

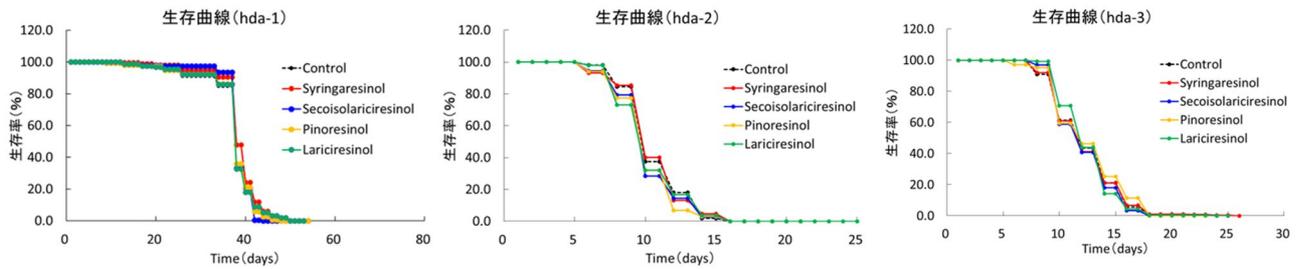


図3 Hdac 遺伝子欠損株線虫におけるリグナン化合物の寿命延長効果

次に、HDAC により影響を受ける候補遺伝子を特定するため、リアルタイム PCR 法による遺伝子解析を行った。その結果、リグナン化合物の添加により、hsp70、sod-1、gcs-1、pmk-1 の発現が増強されていた (図4)。pmk-1 は転写調節因子 skn-1 のリン酸化に参与する酵素である。また、skn-1 は gcs-1 のプロモーター領域に結合部位をもつ可能性が示されている。そこで、リグナン添加時の線虫内 skn-1 の局在を確認するため、Skn-1 の下流に GFP を発現するトランスジェニック線虫を準備して skn-1 の局在変化を蛍光顕微鏡にて観察した。図5に示したように、リグナン化合物の添加により skn-1 の核内移行が促進されている様子が観察された。特にセコイソラリシレシノールやピノレシノールで顕著であった。これらより、リグナン類は HDAC 活性を増強し、ヒストンの脱アセチル化を促進することで pmk-1 を活性化または発現誘導し、次いで skn-1 を核内移行させて寿命延伸に関連する遺伝子 (例えば、sod-1 や gcs-1 など) の発現を増強している可能性が考えられる。

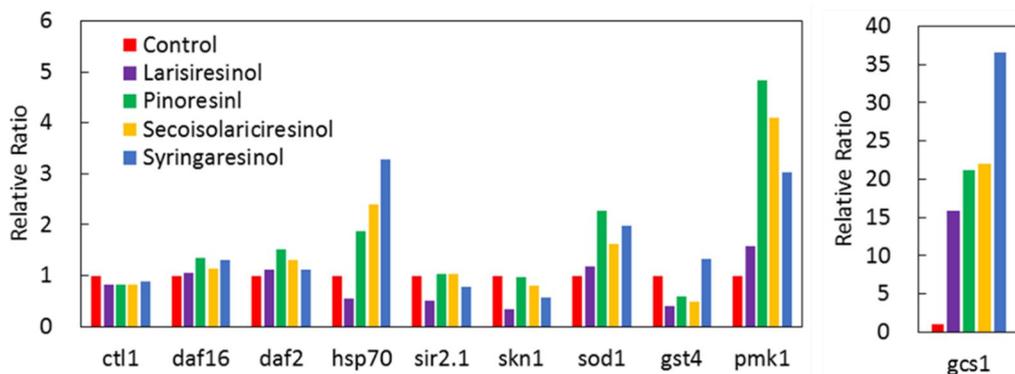


図4 リグナン化合物による遺伝子発現増強

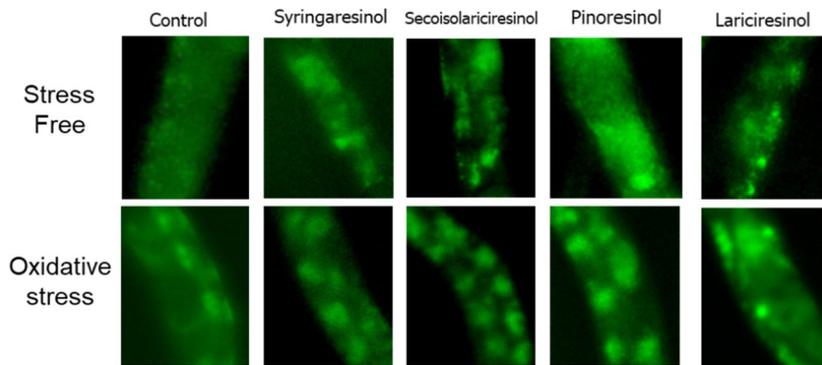


図5 リグナン化合物による Skn-1 の核内移行促進

発現誘導のみとめられた pmk-1 遺伝子は skn-1 のリン酸化を引き起こし、核内への移行を誘導することが知られ、また、skn-1 遺伝子は抗酸化やストレス耐性などの様々な遺伝子の発現を誘導することが知られている。現在、ピノレシノールやラリシレシノール添加により skn-1 のリン酸化を引き起こされているかどうか検討を進めている。

また、リグナン化合物(シリンガレシノール、セコイソラリシレシノール、ピノレシノール、ラリシレシノール)添加時の野生型および hda-2 変異体における pmk-1、hsp70、sod-1 遺伝子の発現量の比較を行ったところ、野生型に比較して、これら変異体の遺伝子は有意にその発現量が減少していた(図6)。このことは hda-2 が pmk-1、hsp70、sod-1 遺伝子の発現を調節する重要な分子であることを示唆していると考えられる。

以上、今回の研究より明らかとなった内容を図7にまとめた。

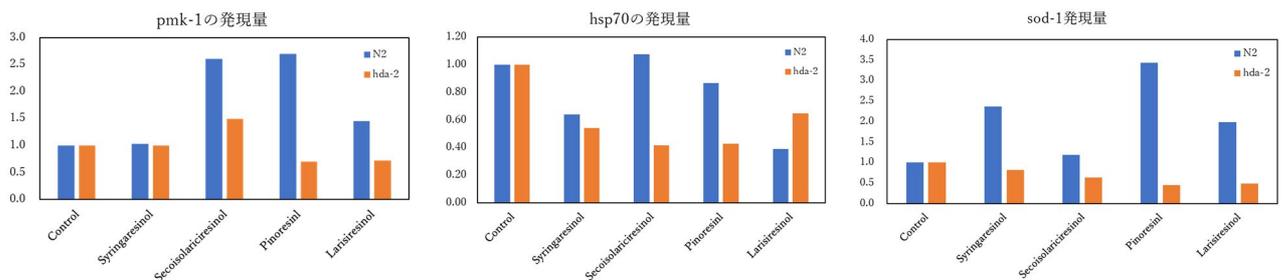


図6 リグナン添加による野生型 (N2) と HDAC3 欠損株 (hda-2) の遺伝子発現量の比較

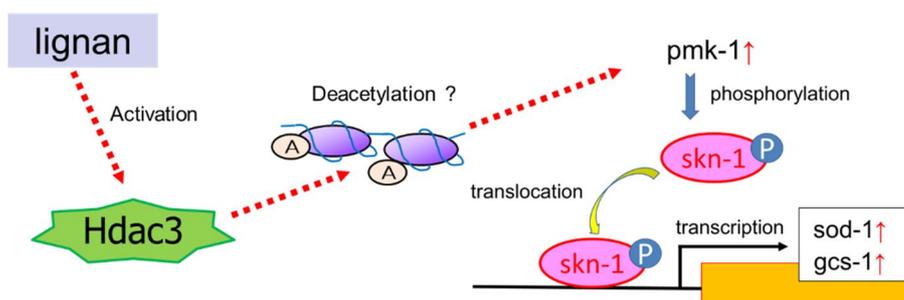


図7 リグナン化合物による HDAC の活性化と寿命延伸のメカニズム

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 徳永航、羽田曜大、名取貴光
2. 発表標題 ウメリグナンによるヒストンアセチル化調節と寿命延長効果について
3. 学会等名 日本食品保蔵科学会 第69回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takamitsu Natori, Yishi Jin
2. 発表標題 Polyphenols extend neurite outgrowth in neuronal cells and the lifespan in <i>C. elegans</i> via histone acetylation
3. 学会等名 22nd International <i>C. elegans</i> Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川住亮之、宮島まどか、春原天真、名取貴光
2. 発表標題 病態モデル線虫を用いた山ウドの機能性評価
3. 学会等名 日本食品保蔵科学会 第67回大会（山梨大会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 春原天真、川住亮之、宮島まどか、名取貴光
2. 発表標題 サフラン含有成分による神経変性疾患予防効果について
3. 学会等名 日本食品保蔵科学会 第67回大会（山梨大会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮島まどか、春原天真、川住亮之、名取貴光
2. 発表標題 モモ含有色素成分のアミロイド 凝集抑制効果と神経保護作用について
3. 学会等名 日本食品保蔵科学会 第67回大会（山梨大会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 飯塚樹枝、風間陽子、名取貴光、仲尾玲子
2. 発表標題 すもも（太陽）濃縮ペーストの色調及び成分変化
3. 学会等名 日本食品保蔵科学会 第67回大会（山梨大会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 名取貴光
2. 発表標題 Neuroprotection and anti-aging effects of anthocyanidins via histone acetylation
3. 学会等名 日本神経科学会 第41回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takamitsu Natori
2. 発表標題 Neuroprotection and anti-aging effects of anthocyanidins via histone acetylation
3. 学会等名 Society for Neuroscience Neuroscience2018（サンディエゴ）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 名取貴光
2. 発表標題 甲州小梅に見出されたアンチエイジング効果
3. 学会等名 日本食品保蔵科学会 第67回大会（山梨大会）（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 名取貴光
2. 発表標題 Lignans extends lifespan via histone deacetylation in <i>Caenorhabditis elegans</i>
3. 学会等名 線虫研究の未来を創る会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 春原天真、宮島まどか、名取貴光
2. 発表標題 Crocetin and crocetin from saffron reduces amyloid-beta-induced paralysis in an Alzheimer model of <i>Caenorhabditis elegans</i>
3. 学会等名 日本生化学会 第91回大会（京都大会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮島まどか、春原天真、名取貴光
2. 発表標題 Perch extract and anthocyanins alleviates beta-amyloid peptide toxicity in <i>Caenorhabditis elegans</i> model of Alzheimer's disease
3. 学会等名 日本生化学会 第91回大会（京都大会）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 名取貴光	4. 発行年 2021年
2. 出版社 フレグナンスジャーナル社	5. 総ページ数 108
3. 書名 フレグナンスジャーナル 5月号	

1. 著者名 名取貴光	4. 発行年 2020年
2. 出版社 マガジンハウス	5. 総ページ数 81
3. 書名 Dr.クロワッサン 体に効かせる野菜の食べ方	

1. 著者名 名取貴光	4. 発行年 2020年
2. 出版社 日本化学会機関誌	5. 総ページ数 75
3. 書名 化学と工業 12月号 甲州小梅に含まれる ウメリグナンの機能性について	

〔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
研究分担者	萱嶋 泰成  (Kayashima Yasunari)  (90365453)	山梨学院短期大学・その他部局等・教授(移行)    (43505)	

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
---------	---------