

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：24403

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22565

研究課題名(和文) 生体リズムにおけるビタミンAの機能性解析

研究課題名(英文) Functional analysis of vitamin A in circadian rhythms

研究代表者

北風 智也 (KITAKAZE, Tomoya)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・助教

研究者番号：50874278

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：マウス骨格筋由来C2C12筋管細胞の概日リズムを同調させ遺伝子発現を評価した結果、ビタミンA代謝酵素とビタミンA応答遺伝子であるTg2の発現が24時間周期で変動した。細胞外に分泌されたTG2が生体リズムに与える影響を解析した結果、細胞外のTG2によって時計遺伝子BMAL1の24時間周期の発現パターンがわずかに変化した。以上のことから、骨格筋において、ビタミンA代謝は24時間周期を示し、ビタミンA応答遺伝子であるTG2が細胞外に分泌されることで、生体リズムを調節する可能性があることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、欠食やシフトワークなどによる生体リズムの乱れに起因する肥満や心血管疾患、睡眠障害などが問題視されている。本研究において、骨格筋でのビタミンA代謝が概日リズムを持つことが明らかとなり、ビタミンAに反応するマイオカインであるTG2が概日リズムを調節することが示唆された。概日リズムの乱れを是正するための標的として、マイオカインの重要性をさらに示すことができれば、新たな治療標的となり得ることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We have found that the mRNA expression of vitamin A-metabolizing enzymes and Tg2, which is vitamin A response gene, possessed circadian rhythm in C2C12 myotubes. To determine the effect of extracellular Tg2 on circadian rhythm, C2C12 myotubes were treated recombinant TG2. As a result, the expression pattern of the clock gene Bmal1 was slightly changed by extracellular TG2 in C2C12 myotubes. These results suggested that the metabolism of vitamin A possesses the circadian rhythm and extracellular TG2 regulates circadian rhythm in C2C12 myotubes.

研究分野：分子栄養学

キーワード：時間栄養学 骨格筋 マイオカイン ビタミンA トランスグルタミナーゼ2

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ビタミン A は、発生、炎症応答、エネルギー代謝など様々な生体機能に関与している。体内のビタミン A 濃度は、各部位におけるビタミン A 代謝酵素の発現量で厳密に制御されている。様々な環境（気温や 24 時間の明暗周期）や状況（運動時や発熱時など）において生体内のビタミン A 濃度が変化することが報告されているが、それらの環境や状況におけるビタミン A 代謝の変化の生理的意義は不明な点が多い。近年、欠食やシフトワークなどによる生体リズムの乱れに起因する肥満や心血管疾患、睡眠障害などが問題視されている。また、ビタミン A 欠乏食の摂取により生体リズムが乱れること、ビタミン A の摂取が肥満や心血管疾患、睡眠障害などを改善するも明らかになっており、ビタミン A 代謝の約 24 時間周期の日内変動が生体リズムとそれに起因する様々な疾患に大きく影響していることが示唆されている。申請者はこれまでの研究から、ビタミン A 前駆体である β-カロテンが骨格筋における分泌型タンパク質の発現量を変化させることで骨格筋肥大を促進することを明らかにしている。骨格筋はマイオカインと呼ばれる分泌型タンパク質を産生し、骨格筋自体や白色脂肪など他の組織の代謝や成長を調節する働きを持つ。一方、生体リズムを制御する転写因子 BMAL1 の骨格筋特異的な遺伝子欠損マウスは睡眠障害が起こることが報告されている。これは、骨格筋から分泌されたマイオカインが全身の生体リズムを調節することを示唆しているが、未だ不明な点が多い。

2. 研究の目的

本件研究の目的は、ビタミン A 代謝の日内変動によって発現量の変化するマイオカインを探索し、マイオカインが全身の生体リズムに与える影響を明らかにすることである。

3. 研究の方法

実験方法を以下に記載する。

(1) 培養細胞：培養細胞の培養はすべて 95% Air, 5% CO₂, 37°C のインキュベーター内で行った。細胞を PBS (-) で洗浄し、0.25% Trypsin と 0.02% EDTA を含む PBS (-) で処理することによって細胞を剥がし、新鮮な培地に懸濁することによって継代を行った。

European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC) より分与されたマウス筋芽細胞である C2C12 細胞の通常培養には 10% 牛胎児血清を含む DMEM (増殖培地) で培養した。筋芽細胞を筋管細胞に分化させる際は、90% コンフルエントにまで金が細胞を増殖培地で培養した後、2% 馬血清を含む DMEM (分化培地) で培養した。

(2) 概日リズムの同調：C2C12 筋管細胞を無血清 DMEM で 16 時間培養後、50% 牛胎児血清を含む DMEM で 2 時間培養することで血清刺激を与えた。その後、分化培地に戻し経時的に細胞を解析した。

(3) 定量的リアルタイム PCR (qPCR)：RNA を抽出し、逆転写反応に供した。得られた cDNA を使って qPCR によって mRNA レベルを定量した。

(4) レポーターアッセイ：レチノイン酸応答性レポーターベクター (pRARE-Luc) とコントロールベクター (pGL4.73[hRLuc/SV40]) とともに C2C12 細胞にトランスフェクションした。血清刺激を行うことで概日リズムを同調させた後、レチノールまたは all *trans*-レチノイン酸を含む増殖培地で 24 時間培養後、レポーター活性を測定した。

(5) 組換えタンパク質：pGEX-TG2 ベクターを *Escherichia coli* BL21 (DE3) もトランスフォーメーションして、組換え GST タグ付き TG2 (GST-TG2) を発現させた。組換えタンパク質を glutathione Sepharose 樹脂で精製し、GST タグはトロンピンと反応させて除去した。

4. 研究成果

(1) C2C12 筋管細胞におけるビタミン A 代謝酵素の発現変動

血清刺激後の C2C12 筋管細胞を 4 時間ごとに 28 時間後まで解析した。時計遺伝子である *Bmal1* と *Per2* の発現量を解析した結果、どちらの遺伝子発現も 24 時間周期を示した。ビタミン A 応答遺伝子である *Tg2* の発現は *Per2* と同様の周期性を示した。ビタミン A 応答遺伝子として知られる *Cyp26b1* の発現量が最大となるタイムポイントは *Per2* と一致し、*Meis2* の発現は *Bmal1* と同様の周期性を示した。レチノールをレチナルに代謝する酵素である RDH の発現量を解析した結果、*Rdh1* の発現は 24 時間周期を示したのに対し、*Rdh10* と *Rdh11* の発現量は一定であった。レチナルを all *trans*-レチノイン酸に代謝する ALDH1A の発現量を解析した結果、*Aldh1a1* は経時的に発現量が増加したのに対し、*Aldh1a3* は経時的に発現量が減少した。プロビタミン A で

ある カロテンのトランスポーターである *Cd36* の発現は *Rdh1* と同様の周期性を示した。これらの結果から、C2C12 筋管細胞においてビタミン A 代謝酵素の一部は 24 時間周期で発現が変動することが明らかになった。

(2) C2C12 細胞における概日リズムの同調がビタミン A シグナルの活性に与える影響

血清刺激による概日リズムの同調によって、ビタミン A 代謝酵素の発現が 24 時間周期を示すことが明らかになったため、次に、概日リズムの同調がビタミン A シグナルに与える影響を解析した。活性型ビタミン A である *all trans*-レチノイン酸はレチノイン酸受容体 (RAR) のリガンドとして機能し、RARE を介した転写活性を促進する。そこで RARE を介した転写活性を指標に解析を行った。All *trans*-レチノイン酸による RARE を介した転写活性は血清刺激の影響を受けなかったが、レチノール及び カロテンによる RARE を介した転写活性は血清刺激後の細胞で高値を示した。このことから、概日リズムはビタミン A 代謝を活性化することでビタミン A シグナルに影響を及ぼすことが明らかになった。

(3) 細胞外 TG2 が概日リズムに与える影響

ビタミン A 応答遺伝子である TG2 は骨格筋細胞から細胞外へ分泌されることでマイオカインとして機能することが明らかとなっている。そこで、細胞外の TG2 がマイオカインとして概日リズムに影響するか否かを検討した。血清刺激後の C2C12 筋管細胞に組換え体 TG2 を作用させ、時計遺伝子 *Bmal1* の発現量を経時的に検討した。その結果、TG2 は *Bmal1* の 24 時間の発現周期をわずかに前進させた。このことは TG2 が細胞外に分泌されることで、生体リズムを調節する可能性があることが示している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamamoto Mio, Yoshioka Yasukiyo, Kitakaze Tomoya, Yamashita Yoko, Ashida Hitoshi	4. 巻 13
2. 論文標題 Preventive effects of black soybean polyphenols on non-alcoholic fatty liver disease in three different mouse models	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Food & Function	6. 最初と最後の頁 1000 ~ 1014
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/d1fo03541j	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 -

1. 著者名 Shiraiwa Mariko, Kitakaze Tomoya, Yamashita Yoko, Ukawa Yuichi, Mukai Katsuyuki, Ashida Hitoshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Pectolinarigenin Induces Antioxidant Enzymes through Nrf2/ARE Pathway in HepG2 Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Antioxidants	6. 最初と最後の頁 675 ~ 675
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/antiox11040675	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	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 1件）

1. 発表者名 Tomoya Kitakaze, Yoko Yamashita, Hitoshi Ashida
2. 発表標題 Kaempferol and luteolin prevent xenobiotics-induced cytotoxicity through AhR- and Nrf2-pathways
3. 学会等名 The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2021（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 北風 智也、佐澤 小桃、野村 拓也、山下 陽子、芦田 均
2. 発表標題 ウコン中のセスキテルペンがアルコール代謝酵素の発現に及ぼす影響
3. 学会等名 第75回 日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野村 拓也、北風 智也、芦田 均
2. 発表標題 AhRによる体内時計の変調を介した脂肪肝のメカニズム解明とポリフェノールによる保護効果について
3. 学会等名 日本食品科学工学会第68回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 北風 智也、姜 浩、廣直 賢勇、野村 拓也、山下 陽子、芦田 均
2. 発表標題 ケンフェロールはJAK2依存的に骨格筋におけるグルコース取り込みを促進する
3. 学会等名 日本ビタミン学会第73回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 北風 智也、野村 拓也、芦田 均
2. 発表標題 AhRの活性化による肝臓の脂質蓄積における時計遺伝子の関与とフラボノイドによる抑制効果
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石野 正晃、北風 智也、牧山 敦志、芦田 均
2. 発表標題 ルテオリンによる肝臓での薬物代謝第2相酵素発現誘導に投与タイミングが及ぼす影響について
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 日本ビタミン学会	4. 発行年 2021年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 672
3. 書名 ビタミン・バイオフィクター総合事典「3.1.6 トピックス（カロテンと骨格筋と脂肪組織）：北風智也・山地亮一」	

〔産業財産権〕

〔その他〕

ホームページ等 https://cms-admin.omu.ac.jp/agri/nc/
--

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

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