

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2015

課題番号：25702005

研究課題名(和文) Sirt3の活性制御機構から展開する、概日リズムと老化速度の関係解明

研究課題名(英文) Sirt3 might be a key molecule linking circadian rhythm to aging

研究代表者

大池 秀明(Oike, Hideaki)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・その他部局等・主任研究員

研究者番号：30455307

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 8,400,000円

研究成果の概要(和文)：マウス飼育の光環境を変動させて概日リズムを攪乱(時差ボケ)させることにより、摂食量の増加なしに肥満を誘発できることを見出した。この時差ボケ誘発肥満は、食餌時刻を特定の12時間に固定することで抑制されることから、食餌時刻の乱れが肥満を誘発していることが示唆された。これまでにマウスの皮膚や骨の老化を抑制することが明らかになっている乳酸菌H61株をマウスに半年間摂取させることで、加齢性難聴の進行を有意に抑制できることを見出した。血漿中の遊離脂肪酸量を解析したところ、マウスの聴力測定結果と相関が認められたことから、新たなバイオマーカーとしての利用可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：We found that a chronic shift in light/dark (LD) cycles induced obesity without increasing food intake in mice. Mice fed at a fixed 12 h under the LD shift did not develop symptoms of obesity despite isocaloric intake. These results suggest that disruption of circadian food intake induces obesity.

We demonstrated that intake of Lactococcus lactis subsp. cremoris H61 for 6 months prevented age-related hearing loss in C57BL/6J mice. Analysis of plasma revealed correlation between fatty acids and hearing ability, leading to a novel biomarker for aging.

研究分野：食品機能学、時間生物学、老化、栄養学

キーワード：老化 概日リズム エネルギー代謝 栄養 体内時計 乳酸菌

1. 研究開始当初の背景

老化現象は様々な組織や器官で観察される。その中で全てに共通し根源的な問題となるのは、活性酸素ダメージによる細胞死や細胞の機能不全である。特に、ミトコンドリアが果たす役割は大きく、活性酸素の7~8割は、エネルギー代謝の過程でミトコンドリア電子伝達系から産生される。実際に、抗酸化酵素であるカタラーゼをミトコンドリアで過剰発現させたマウスや、ミトコンドリアで機能する抗酸化剤の摂取はマウスの加齢に伴う難聴の進行(加齢性難聴)を遅延させる。カロリー制限は、多くの生物種の老化を遅延し、寿命を伸長させる。酵母や線虫の研究から、この過程にはSirtuinファミリー遺伝子の関与が示されている。ウイスコンシン大学の研究グループは、マウスのカロリー制限による加齢性難聴の遅延にはSirt3遺伝子が必須であることを示した。Sirt3はミトコンドリア局在型であり、カロリー制限によって活性化されると、種々のミトコンドリアタンパク質を脱アセチル化し、それにより代謝シフトが起こり、活性酸素ダメージが軽減されるものと想定される。しかし、Sirt3の活性化機構は不明であり、簡便に活性を測定するツールについてもほとんど存在しない。

多くの生物は、約24時間周期の概日リズム(体内時計)を有している。それは、DNAに損傷を与える紫外線や活性酸素を避けて夜間に細胞分裂を行い、また、餌にありつける時刻に合わせてエネルギー代謝を調節するなど、外界環境の日周変動に対し、自らの体内環境を効率的に適合させる機構である。このリズムは、個々の細胞において、時計遺伝子群が転写のフィードバックループを形成することによって生み出され、その下流で、糖新生や脂質代謝、薬物代謝、DNA修復など、多くの機能が概日制御を受ける。最近の研究から、末梢組織の概日リズムは、食餌のタイミングに同調することが明らかになっている。つまり、細胞内のエネルギー代謝は、食餌リズムに合わせて昼夜で切り替えられている。しかしながら、エネルギー代謝の中心器官であるミトコンドリアに関する概日データは非常に限られており、特に老化と概日性の関係についてはほとんど不明である。

カロリー制限は抗老化を実現する方法として有名であるが、概日リズムを効率化(増幅)する方法でもある。これは、各生理機能の日内変動を高め、機能同士の時間的連携や分業の効率を高めることにつながる。つまり、活性酸素の産生時刻に合わせて、細胞内の抗酸化機構や細胞修復機構の活性を調節し、DNA複製は反対の時刻に行うなど、抗老化能が最大限に引き出されているのではないかと解釈可能である。ミトコンドリアは活性酸素によるDNAダメージを受けやすい構造になっていることから、これを防ぐために、概日リズムによって活性酸素の産生とDNAの複製を時間的に分離することが重要である。ミ

トコンドリアの概日性に関しては、前述のように、知見の蓄積が少ないが、エネルギー代謝の概日性から考えると、ミトコンドリア活性も概日制御されていることは間違いない。最近、NAD⁺の細胞内濃度に概日リズムが存在し、Sirt1の活性が概日制御されていることが報告された。NAD⁺はミトコンドリア電子伝達系で利用される補酵素であり、細胞内NAD⁺の約8割がミトコンドリアに存在することを考えると、Sirt3活性も概日制御されている可能性が高い。Sirt3は様々なミトコンドリアタンパク質の活性を制御する司令塔的な存在であり、Sirt3の概日活性は、ミトコンドリア機能の概日制御の鍵となっていると考えられる。そして、カロリー制限による抗老化作用に必須な分子であることを考え合わせると、Sirt3の概日活性制御が、カロリー制限による抗老化作用の発現経路に結びつくと考えられる。

2. 研究の目的

本課題では、上述の通り、これまでほとんど明らかとなっていない、「老化」と「概日リズム」の関係を解明することを最終的な目標とし、その関連性を示すことを目的に、下記について研究を進めた。

(1) SIRT3の活性評価法の開発

SIRT3の概日活性変動を可視化して簡便に評価することを目的とし、発光を利用した評価ツールの開発を目指す。

(2) Clock変異マウスを利用した老化測定

概日リズムと老化の関連性を動物個体レベルで検証するため、時計遺伝子の1つであるClockに変異を有するマウス(概日リズムの振幅が非常に弱い)を利用し、加齢性難聴の進行を評価することで老化速度に与える影響を検討する。

(3) 光による概日リズム攪乱モデルマウスを利用した老化解析

光環境を変動させることで、概日リズムを攪乱したマウスを利用し、加齢性難聴の進行速度に与える影響を評価することで、概日リズムと老化の関連性を検討する。

(4) 乳酸菌H61株の摂取による老化遅延効果の検討

抗老化食品による老化遅延作用が、カロリー制限と同じ機構なのか、異なる機構なのかを明らかにすることで、老化予防のメカニズム解明につながることを期待し、これまでに、マウスの皮膚や骨密度低下に対する抗老化作用が明らかとなっている乳酸菌H61株(*Lactococcus lactis* subsp. *Cremoris* H61)を利用し、加齢性難聴の進行に与える効果について、WTマウスとSirt3ノックアウトマウスで検討する。

3. 研究の方法

(1) SIRT3の活性評価法の開発

hSIRT3 にルシフェラーゼを融合させたタンパク質 (hSIRT3-Luc) を発現するレポーター遺伝子を作製し、HEK293 細胞に安定発現させ、発光量を増加させる培養条件を検索した (カロリー制限を模倣した培養)。

SIRT3 活性の生細胞での可視化を目的として、既存のヒストンアセチル化を検出する FRET (蛍光共鳴エネルギー移動) プローブを改変し、BRET (発光共鳴エネルギー移動) により IDH2 (SIRT3 の標的タンパク質の 1 つ) のアセチル化を検出するプローブを設計した。

ルシフェラーゼを 2 つに分割し、それぞれに MDH2 (SIRT3 の標的タンパク質の 1 つ) を結合させ、SIRT3 活性依存的な MDH2 のダイマー化を検出するプローブを作製した。

(2) Clock 変異マウスを利用した老化測定

オスの ICR マウスと Clock 変異マウス (ICR バックグラウンド) を、通常の 12 時間明暗サイクル、自由摂食条件下で飼育し、それぞれ 3 ヶ月齢 (若齢コントロール) と 9 ヶ月齢で、聴性脳幹反応試験 (8, 16, 32 kHz) を行い、加齢性難聴の進行を評価した。

(3) 光による概日リズム攪乱モデルマウスを利用した老化解析

オスの C57BL/6J マウスを、通常の 12 時間明暗サイクル (コントロール群; 8:00-20:00) で飼育した群と、1 週間毎に明暗サイクルを 6 時間前進させて概日リズムを攪乱した群 (時差ボケ群) で 3 ヶ月間の飼育を行い、3 ヶ月齢と 6 ヶ月齢の聴力から加齢性難聴の進行度を評価した。また、食餌時刻を特定の 12 時間に固定した群 (時差ボケ食餌固定群; 20:00-8:00) も設定し、解析を行った。

(4) 乳酸菌 H61 株の摂取による老化遅延効果の検討

雌雄の C57BL/6J マウスと Sirt3 ノックアウトマウス (C57BL/6J バックグラウンド) に、乳酸菌 H61 株の死菌粉末を 0.05% 添加した飼料を与えて 6 ヶ月間飼育し、9 ヶ月齢の聴力測定と、内耳の組織学的解析から加齢性難聴の進行度を評価した。また、WT マウスに関しては、血液の ¹H-NMR 解析と遊離脂肪酸の定量を行い、血中バイオマーカーの探索を行った。

4. 研究成果

(1) SIRT3 の活性評価法の開発

hSIRT3-Luc を発現させた HEK293 細胞において、単純に、培地交換せずに数日間培養することで発光量が増加することを明らかにした。2 倍に希釈した培地では、発光量の増加に要する期間が短縮されることや、新しい培地に交換することで発光量が元に戻ることから、培地中の栄養分の枯渇により SIRT3 タンパク質が安定化 (分解抑制) されている可能性が考えられた。

上記の培養条件による BRET 現象は見られ

ず、機能するプローブは得られなかった。

上記の培養条件による発光量の増加は見られず、機能するプローブは得られなかった。

(2) Clock 変異マウスを利用した老化測定

3 ヶ月齢から 9 ヶ月齢までの 6 ヶ月間の飼育により加齢性難聴は進行していたが、WT マウスと Clock 変異マウスの有意差は得られず、Clock 変異による影響は見いだせなかった。

(3) 光による概日リズム攪乱モデルマウスを利用した老化解析

明暗サイクルの変化による概日時計の攪乱は、加齢性難聴の進行速度に影響を与えなかった。しかしながら、コントロール群と比較して、光環境を変動させた群は、有意に体重が増加し、肥満を呈することが明らかとなった (図 1; Oike et al., 2015 BBRC)。糖負荷試験を実施したところ、耐糖能が有意に悪化していた。また、肝臓の遺伝子発現を比較したところ、エネルギー代謝に関連する遺伝子 (G6pc, Pgc1a, Pck1, Pparg, Hmgcr, Ampk) において、発現量や日周発現リズムに変化が生じていた。さらに、食餌時刻固定群では、光環境の変動による肥満の誘導が抑制されたことから、時差ボケ環境に起因する食餌時刻の乱れが、肥満を誘導することが示された。

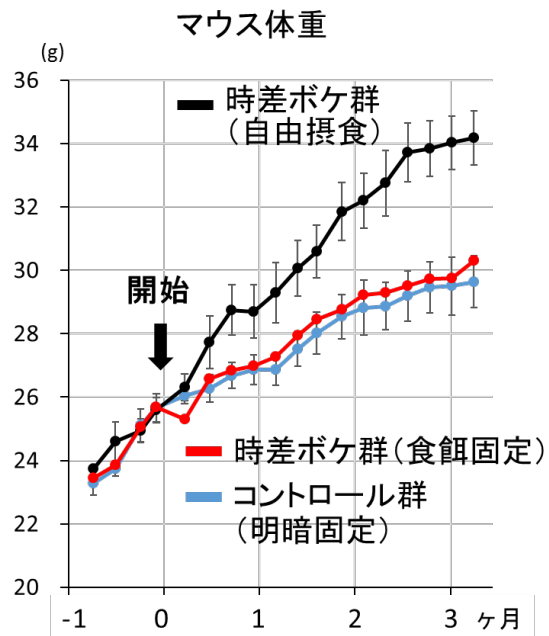


図1 時差ボケ飼育光環境による肥満の誘導

(4) 乳酸菌 H61 株の摂取による老化遅延効果の検討

まず、WT マウスにおいて、乳酸菌 H61 株の摂取により加齢性難聴の進行が有意に抑制された (図 2; Oike et al., 2016 Sci Rep)。Sirt3 ノックアウトマウスにおいても同様の効果が認められたことから、カロリー制限とは異なる抗老化メカニズムであることが示された。内耳の組織学的解析から、蝸牛の基

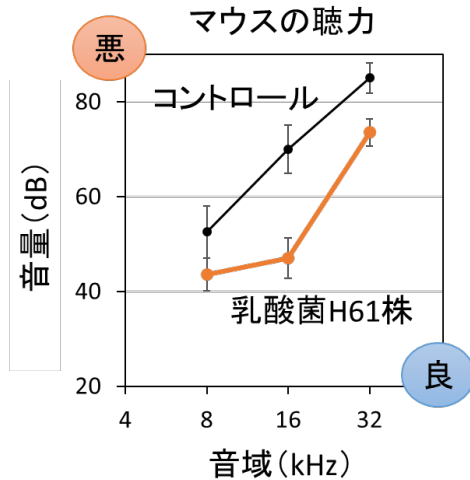


図2 乳酸菌H61株摂取による加齢性難聴の抑制

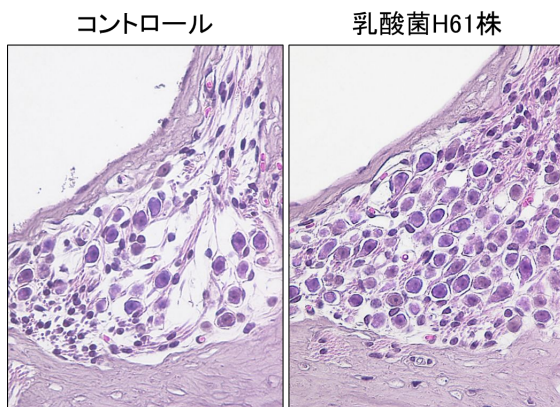


図3 乳酸菌H61株の摂取による聴覚神経細胞死の抑制

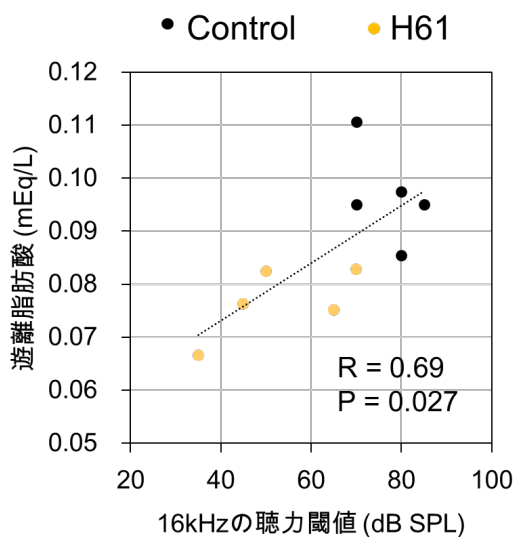


図4 血中遊離脂肪酸量と聴覚閾値の相関

底部に存在する聴覚神経細胞や有毛細胞の加齢に伴う減少が有意に抑制されていた(図3)。血漿の¹H NMR スペクトルと聴力測定の結果を比較解析したところ、脂肪酸由来のピークと聴力の相関が示唆されたことから、血漿中の遊離脂肪酸量を市販のキットにより測定した。乳酸菌 H61 株の摂取群では血中遊離脂肪酸が有意に低い値を示し、聴力測定結果との相関性が認められた(図4)。また、このような血中代謝物がバイオマーカーとして活用できる可能性も示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

1. **大池秀明** (2016) 時間栄養学の最新の話題, *Animus* 88, 32-36. 査読なし
2. **Oike H**, Aoki-Yoshida A, Kimoto-Nira H, Yamagishi N, Tomita S, Sekiyama Y, Wakagi M, Sakurai M, Ippoushi K, Suzuki C, Kobori M. (2016) Dietary intake of heat-killed *Lactococcus lactis* H61 delays age-related hearing loss in C57BL/6J mice. *Scientific Reports*. 6:23556. 査読有
DOI: 10.1038/srep23556
3. **Oike H**, Sakurai M, Ippoushi K, Kobori M. (2015) Time-fixed feeding prevents obesity induced by chronic advances of light/dark cycles in mouse models of jet-lag/shift work. *Biochem Biophys Res Commun* 456(3):556-561. 査読有
DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.08.059
4. **大池秀明** (2015) 食品成分による老化予防効果の評価 ~ マウス加齢性難聴を利用した評価系 ~, *食品と容器* 3, 187-191. 査読なし
5. **Oike H**, Oishi K, Kobori M. (2014) Nutrients, Clock genes, and Chrononutrition. *Curr Nutr Rep* 3, 204-12. 査読有
DOI: 10.1007/s13668-014-0082-6

〔学会発表〕(計8件)

1. **大池秀明**, 桜井睦, 一法師克成, 小堀真珠子. 体内時計を利用してマウスに肥満を誘導する飼育法. 日本農芸化学会2016年度大会, 2016/3/27-30, 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)
2. **大池秀明**, 一法師克成, 小堀真珠子. マウス時差ボケモデルにおける肥満の誘導と食餌時刻固定による抑制. 第22回日本時間生物学会学術大会, 2015/11/21-22, 東京大学(東京都文京区)
3. **Oike H**, Ippoushi K, Kobori M. Time-fixed feeding prevents body weight gain induced by chronic jet lag in mice. *European Biological Rhythms Society (EBRS)/World Congress of*

Chronobiology (WCC) meeting,
2015/8/2-6, Manchester (UK)

4. **大池秀明**. 食品・栄養成分による体内時計の制御. 第1回時間栄養科学研究会, 2015/2/14, 早稲田大学(東京都新宿区)
その他4件

[その他]

1. 研究者ホームページ

http://www.naro.affrc.go.jp/nfri-neo/introduction/chart/0203/hideaki_oike.html

2. 時間栄養学の解説ページ

<http://www.naro.affrc.go.jp/nfri-neo/introduction/chart/0203/chrononutrition.html>

6. 研究組織

- (1) 研究代表者

大池 秀明 (OIKE, Hideaki)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合
研究機構・食品研究部門・食品健康機能研
究領域・主任研究員

研究者番号：30455307