

助成番号 0843

サーカディアンリズムから見た食塩の摂取タイミング

大池 秀明

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所

概要 われわれはサーカディアンリズムと呼ばれる約 24 時間周期の体内時計を持っている。最近の研究から、体内時計は全身のほとんどの組織に内蔵されており、特に末梢組織の体内時計は、毎日、食事情報によって調整されていることが明らかになってきた。しかしながら、食事内容が体内時計に与える影響についてはほとんど明らかになっていない。そこで、本研究では、高食塩食の摂取がサーカディアンリズムに与える影響を解析することを目的とした。まず、雄の BALB/c マウスに高食塩食(8.0% NaCl)と通常食塩食(0.3% NaCl)を 4 週間与え、行動リズムと、腎臓の時計遺伝子発現リズムを比較した。その結果、行動リズムには特に変化は現れなかったが、腎臓の時計遺伝子発現リズムは、高食塩食を摂取させたものは通常食塩食を摂取させたものと比較して、約 2-3 時間リズムが前進していることが明らかになった。次に、濃度が半分の高食塩食(4.0% NaCl)および通常食塩食(0.3% あるいは 0.6% NaCl)を 4 週間摂取させ、同様に腎臓の時計遺伝子発現リズムを定量した。その結果、0.3% と 0.6% では差が見られないが、4.0% NaCl 食は 8.0% NaCl 食と同様にリズムが前進していた。さらに、肝臓における時計遺伝子発現リズムを解析したところ、腎臓と同様にリズムが前進していることが明らかになった。さらに、脂質代謝、糖代謝に關与する、PPAR α 、PEPCK1 (Pck1)、PDK4 の肝臓における遺伝子発現リズムを解析したところ、これらのリズムも同様にすべて前進していた。以上の結果から、少なくとも 4.0% NaCl 以上の高食塩食の摂取は、中枢のサーカディアンリズムには影響を与えないものの、末梢のサーカディアンリズムを前進させることが示唆された。

1. 研究目的

ほぼ全ての生物は、約 24 時間周期からなる体内時計“サーカディアンリズム”を有している。人においてこのリズムの乱れは、睡眠障害に始まり、肥満やがん、心筋梗塞などのリスクを高める^[1]。サーカディアンリズムは十数種類の時計遺伝子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、これが光や食事によって補正されている^[2]。その中枢は視床下部に存在するが、肝臓や心臓、腎臓など生体を構成するほぼすべての器官や組織にも固有のサーカディアンリズムが存在している。各組織において、固有のサーカディアンリズムが崩れることは、がんや機能不全のリスクが高まることを意味する。また、これらの機能的リズムの結果、血圧や体温などの生理反応も約 24 時間周期で変動している。これまで、食事時間や摂取カロリーが体内時計に与える影響の研究は数多くなされ

てきたが^[2]、個々の食品やその成分との関わりについてはほとんど検討されていない。しかしながら、サーカディアンリズムと食塩の摂取にも、機能的相関があると考えられる。実際、食塩の尿排出は夜に多いことが報告されており^[3]、食塩に対する感受性も朝と晩では異なることが知られている。本研究は、食塩の摂取量を変化させることで腎臓のサーカディアンリズムがどのように変化するか、さらには動物個体にどのような影響を及ぼすのかを検討することを目的とした。

2. 研究方法

マウスは 12 時間明暗サイクル(明期:8:00-20:00)、 $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 5\%$ の条件で飼育した。食餌、水はいつでも自由に摂取できる自由摂取とした。動物実験は、「農林水産省の所管する研究機関等における動物実験等の実

施に関する基本指針」に従い実施した。

2. 1 高食塩食(8.0% NaCl)の長期摂取が腎臓のサーカディアンリズムに与える影響

BALB/cAn マウス(雄, 10 週齢; 日本チャールズリバー) 32 匹を 1 週間の予備飼育後、2 群に分け、0.3% あるいは 8.0% NaCl 相当の Na 含有食(オリエンタル酵母)を 4 週間摂取させた。ZT* 1、4、7、10 と 3 時間毎に 4 点、各 4 匹ずつから腎臓を摘出し、RNA later (Ambion) に浸漬した。RNeasy Mini Kit(QIAGEN)にて total RNA を抽出し、RNA 各 3 µg、ランダムヘキサマー 150 ng、SuperScriptII 逆転写酵素 (Invitrogen) を使用し cDNA を合成した。SYBR Green Real-time PCR Master Mix (ToYoBo) を利用し、ABI Prism 7000 (ABI) にてリアルタイム PCR を行い、時計遺伝子の定量を行った。使用した遺伝子とプライマーは Table 1 の通り。サンプル間の定量値を比較するため、それぞれの遺伝子の定量値は GAPDH の定量値によって補正した。

* ZT: 明期の始まり(8:00)を 0 時とするツァイトゲバータイム (Zeitgeber time)

2. 2 高食塩食(4.0% NaCl)の長期摂取が末梢臓器のサーカディアンリズムに与える影響

BALB/cAn マウス(雄, 10 週齢) 54 匹を 1 週間の予備飼育後、3 群に分け、0.3%、0.6%、4.0% NaCl 食を 4 週間摂取させた。ZT1、5、9、13、17、21 と 4 時間毎に 6 点、各 3 匹ずつから腎臓、肝臓をサンプリングし、上述の方法によ

り、時計遺伝子の発現量を定量した。

2. 3 行動リズムの測定

BALB/cAn マウス(雄, 10 週齢) 8 匹を回転カゴ(メルクエスト)で飼育し、4 匹ずつ 2 群に分け、最初の 4 週間は 0.6% NaCl 食で飼育した。その後、0.3% NaCl あるいは 8.0% NaCl 食を 4 週間摂取させた。回転カゴの回転数を 15 分毎に計測し、活動量を経時的に測定した。48 時間毎のダブルプロットアクトグラムは、CIFII プログラム(メルクエスト)により作製した。

2. 4 高食塩食が末梢臓器の生理機能リズムに与える影響

2. 2 で調製した cDNA をテンプレートにして、2. 1 に記述した方法でリアルタイム PCR により、PPARα、Pck1、PDK4 の mRNA 発現量を定量した。使用したプライマーの配列は Table 1 の通り。

3. 研究結果

3. 1 高食塩食(8.0% NaCl)の長期摂取が腎臓のサーカディアンリズムに与える影響

マウスに通常食塩食(0.3% NaCl)あるいは高食塩食(8.0% NaCl)を 4 週間摂取させた。通常食塩食による 1 週間の予備飼育後、高食塩食に切り換えたグループでは、最初の 1 週間は摂餌量が急激に減り、体重も減少した(Fig. 1)。しかし、2 週目以降は摂餌量も回復し、4 週間後には、摂餌量も体重も 2 群間で有意差は見られなかった。

Table 1. Primer sequence using real-time PCR

Gene Name (Gene symbol)	NCBI accession	Primer forward (5'---3')	Primer reverse (5'---3')
Bmal1 (Arntl)	NM_007489	tcagatgacgaactgaaacacc	cggtcacatcctacgacaaa
Dbp	NM_016974	gcattccaggccatgagact	ccagtacttctcatcctctgt
Npas2	NM_008719	cccaggagtaccagtgcag	gaggaatgcagagcagctcg
Rev-erba(Nr1d1)	NM_145434	ccctggactccaataacaaca	tgccattggagctgtcact
Per1	NM_011065	gcttcgtggacttgacacct	tgctttagatcggcagtggt
Per2	NM_011066	gttccaggctgtggatgaa	ggcgtctcgcacgatcct
PPARα (Ppara)	NM_001113418	aactggatgacagtgcatttcc	ccctctgcaacttctcaat
PEPCK1 (Pck1)	NM_011044	atgtgtggcgcgatgacatt	aaccctgtttctgggttgat
PDK4 (Pdk4)	NM_013743	cgcttagtgaaactccttcg	cttctgggctcttctcatgg
NHE3 (Slc9a3)	NM_001081060	tccatgagctgaatttgaagg	tacttggggagcgaatgaag
GAPDH	NM_008084	catggccttccgtgttccta	cctgcttcaccactcttga

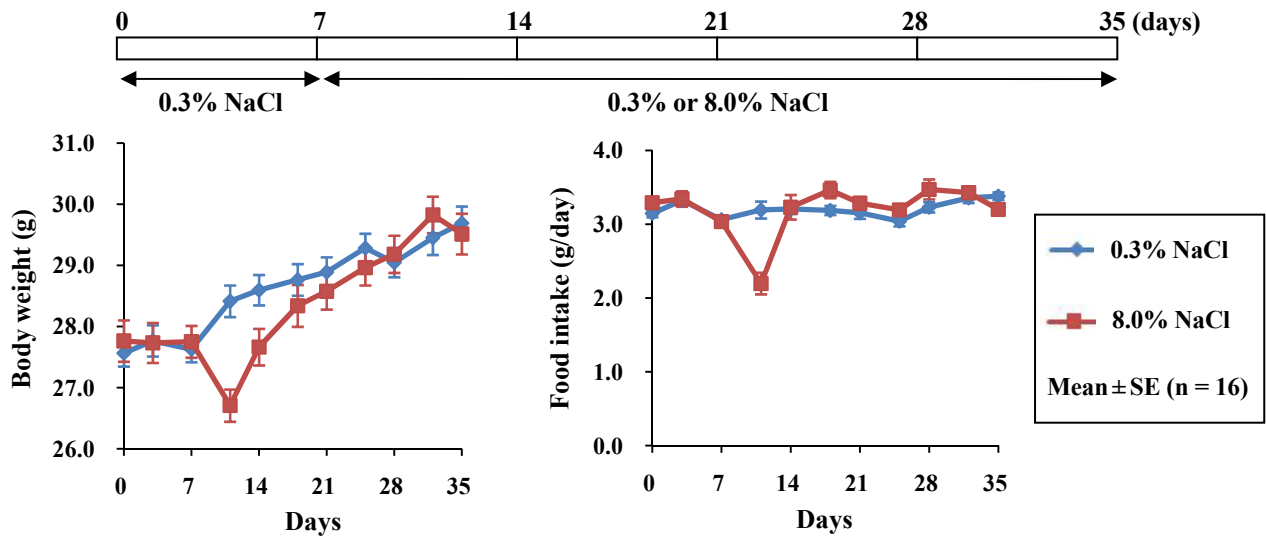


Fig. 1. Change of body weights and food intakes on mice fed normal-salt (0.3% NaCl) or high-salt (8.0% NaCl) diets for 4 weeks

それぞれの飼料を4週間摂取した後に、時計遺伝子である *Bmal1*、*Dbp*、*Rev-erba*、*Per1*、*Per2* について、腎臓における mRNA 発現量をリアルタイム PCR により定量した。いずれの遺伝子も、これまでに知られているのと同様に^[1]、時刻依存性の発現変動を示した (**Fig. 2**)。しかしながら、通常食塩食群と高食塩食群を比較すると、ほとんどの遺伝子で、その発現リズムに2-3時間程度の差があり、高食塩食群のリズムが前進していた。

3.2 高食塩食(4.0%)の長期摂取が末梢臓器のサーカディアンリズムに与える影響

上記のリズム変化が高食塩食による前進作用なのか、通常食塩食(0.3% NaCl)の食塩濃度がやや低い(一般的に市販されている試料は0.6% NaCl程度)ことによる後退作用なのかを調べるため、0.3、0.6、4.0% NaCl 食を4週間摂取させ、腎臓の時計遺伝子発現リズムをリアルタイム PCR により定量した。その結果、0.3% NaCl 食と0.6% NaCl 食はほとんど同じリズムを刻んでいたが、4.0% NaCl 食では、リズムが前進していた (**Fig. 3**)。

さらに高食塩食の摂取による腎臓のサーカディアンリズム前進が腎臓に特異的な効果かどうかを調べるため、0.3% NaCl 食と4.0% NaCl 食を与えたマウスの肝臓における時計遺伝子の発現リズムを解析した。その結果、4.0% NaCl 食を摂取したマウスは、腎臓と同様に、肝臓のリズムも約2-3時間前進していた (**Fig. 4**)。

3.3 高食塩食が行動リズムに与える影響

高食塩食の摂取が腎臓あるいは肝臓の時計遺伝子発現リズムを前進させることから、食餌の摂取時刻を含めた行動リズム全体が前進している可能性が考えられた。そこで、回転カゴによりマウスの活動量を経時的に測定し、高食塩食と通常食塩食摂取群の行動リズムを比較した。その結果、いずれの摂取群も、暗期になるとすぐに活動を始め、明期になると活動を終えた (**Fig. 5**)。食塩濃度の差による活動量の変化あるいは活動時間の変化は観察されなかった。

3.4 高食塩食が末梢臓器の生理機能リズムに与える影響

時計遺伝子は様々な遺伝子の発現を制御し、体温や脂質代謝などの生理機能にも日周内変動が起こる。そこで、時計遺伝子ではないが日周変動が知られている遺伝子の発現リズムも高食塩食摂取により前進しているのかどうか検討した。まず、肝臓において、脂質代謝に関連する *PPARα*、糖代謝に関連する、*Pck1* (*PEPCK-1*)、*PDK4* について、その mRNA 発現量を定量したところ、いずれも日周リズムが観察され、高食塩食摂取群において、時計遺伝子の発現リズムと同様に2時間程度そのリズムが前進していた (**Fig. 6**)。続いて、腎臓においてナトリウムの再吸収に関与することが知られているトランスポーター、*Na/H* 交換輸送体 (*NHE3*) の発現リズムについて定量したところ、こちらもリズムがやや前進していることが確認された。

Kidney

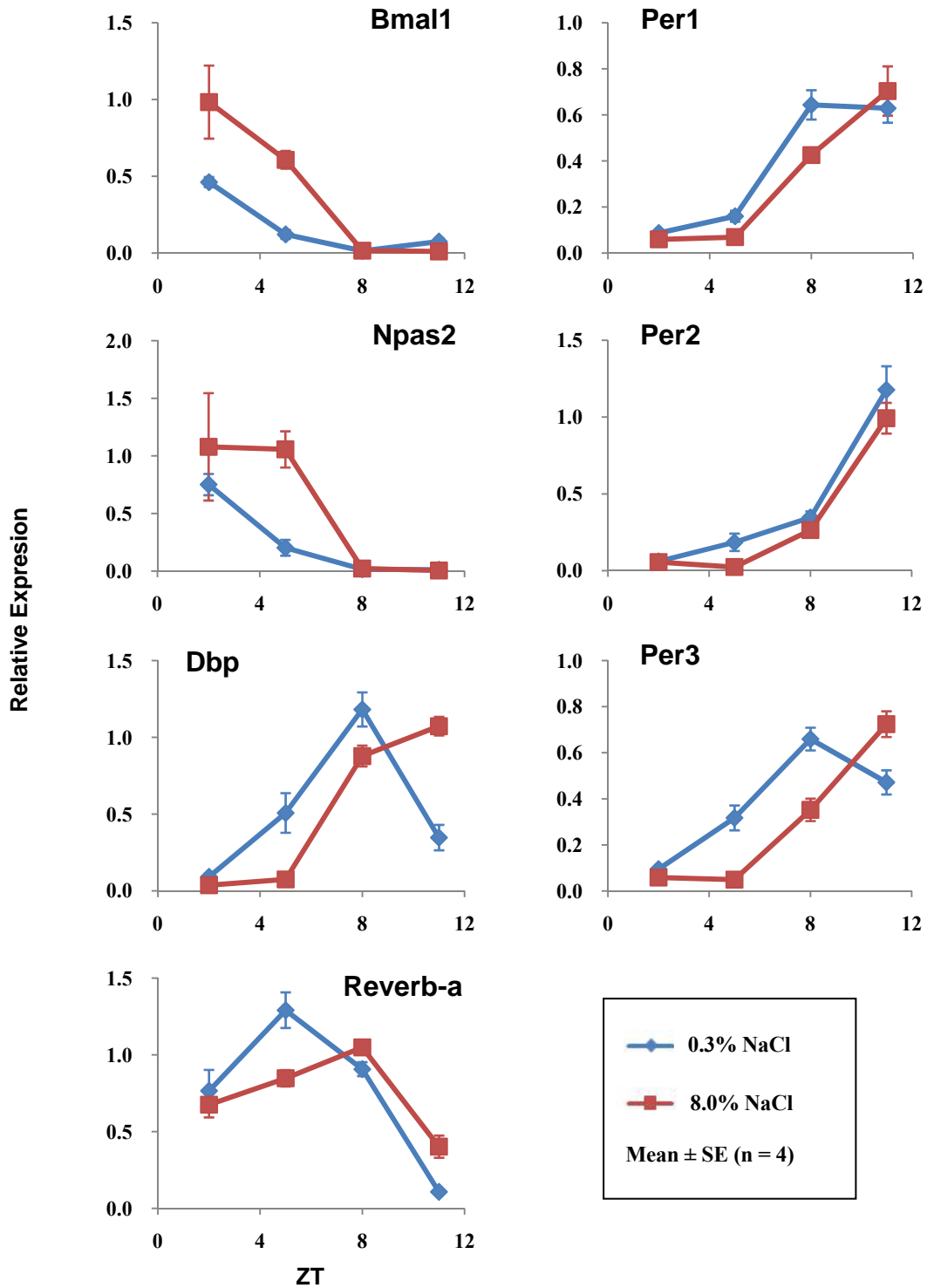


Fig. 2. Temporal expression of clock genes in kidneys of mice fed normal-salt (0.3%NaCl) or high-salt (8.0% NaCl) diets

Kidney

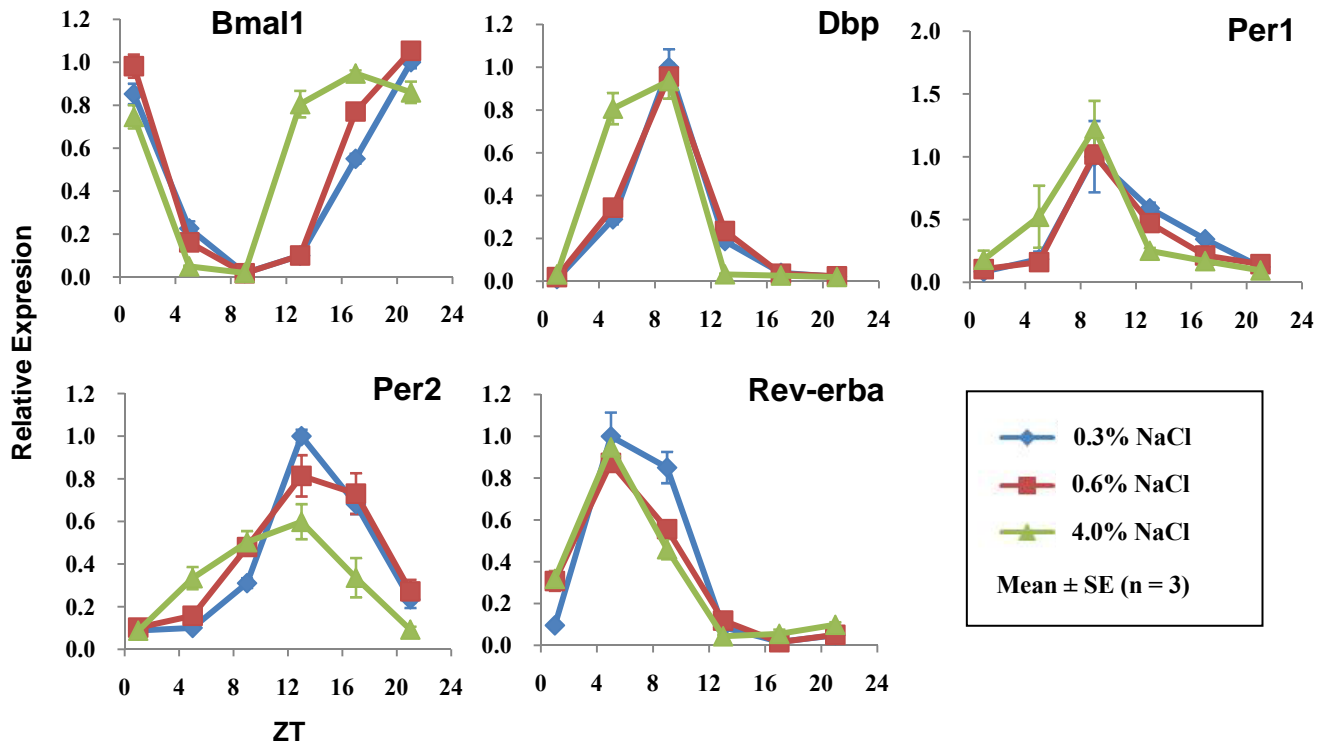


Fig. 3. Temporal expression of clock genes in kidneys of mice fed normal-salt (0.3% NaCl or 0.6% NaCl) or high-salt (4.0% NaCl) diets

Liver

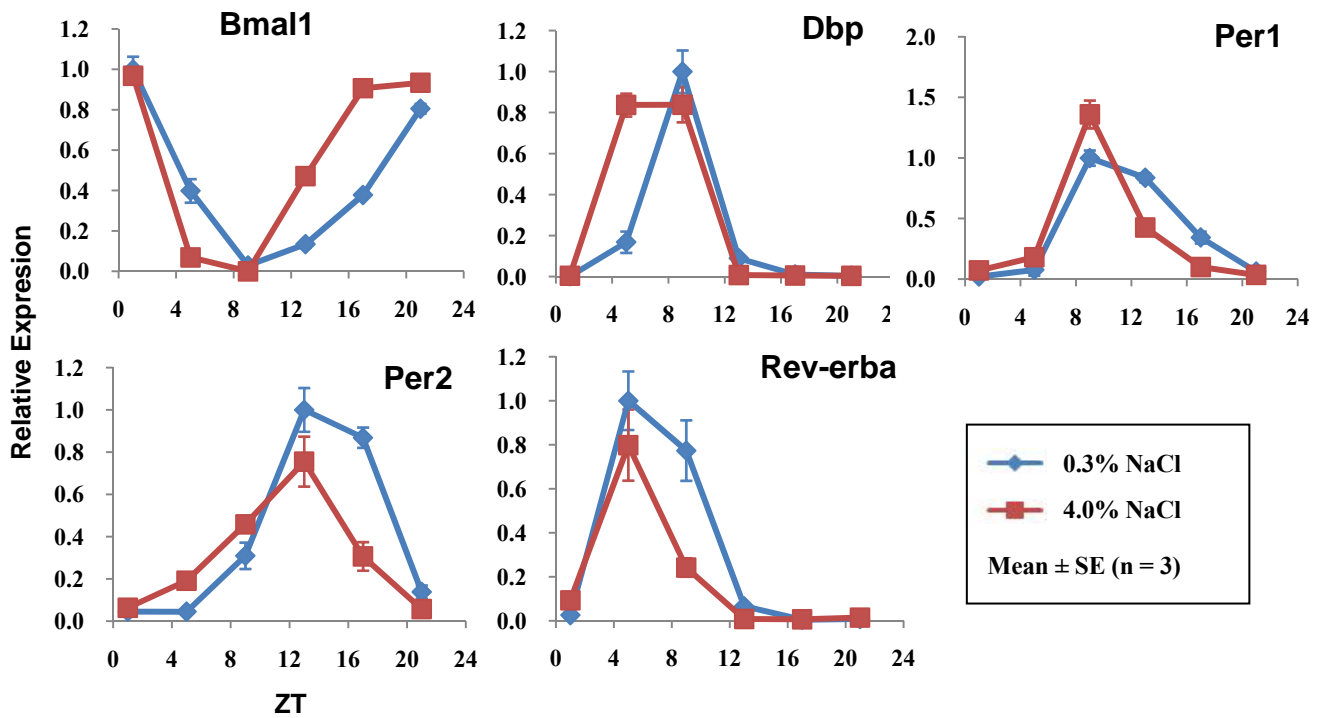


Fig. 4. Temporal expression of clock genes in livers of mice fed normal-salt (0.3% NaCl) or high-salt (4.0% NaCl) diets

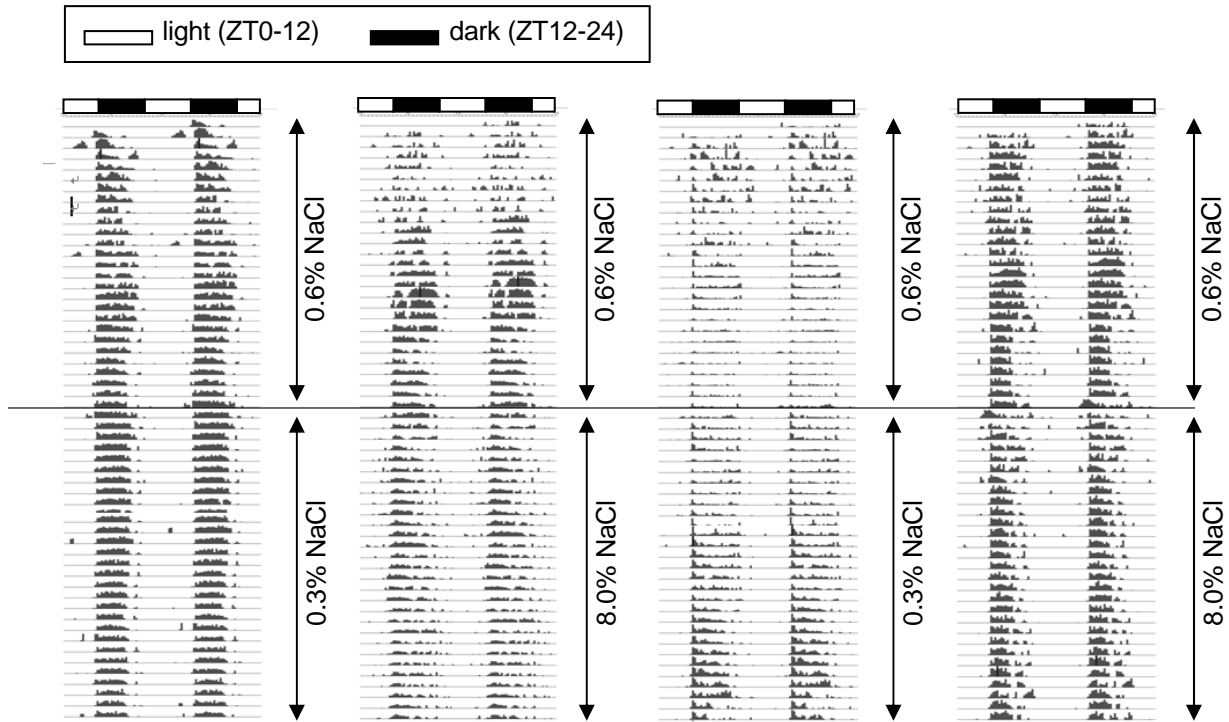


Fig. 5. Locomotor activity of mice fed normal-salt (0.3% NaCl) and high-salt (8.0% NaCl) diets

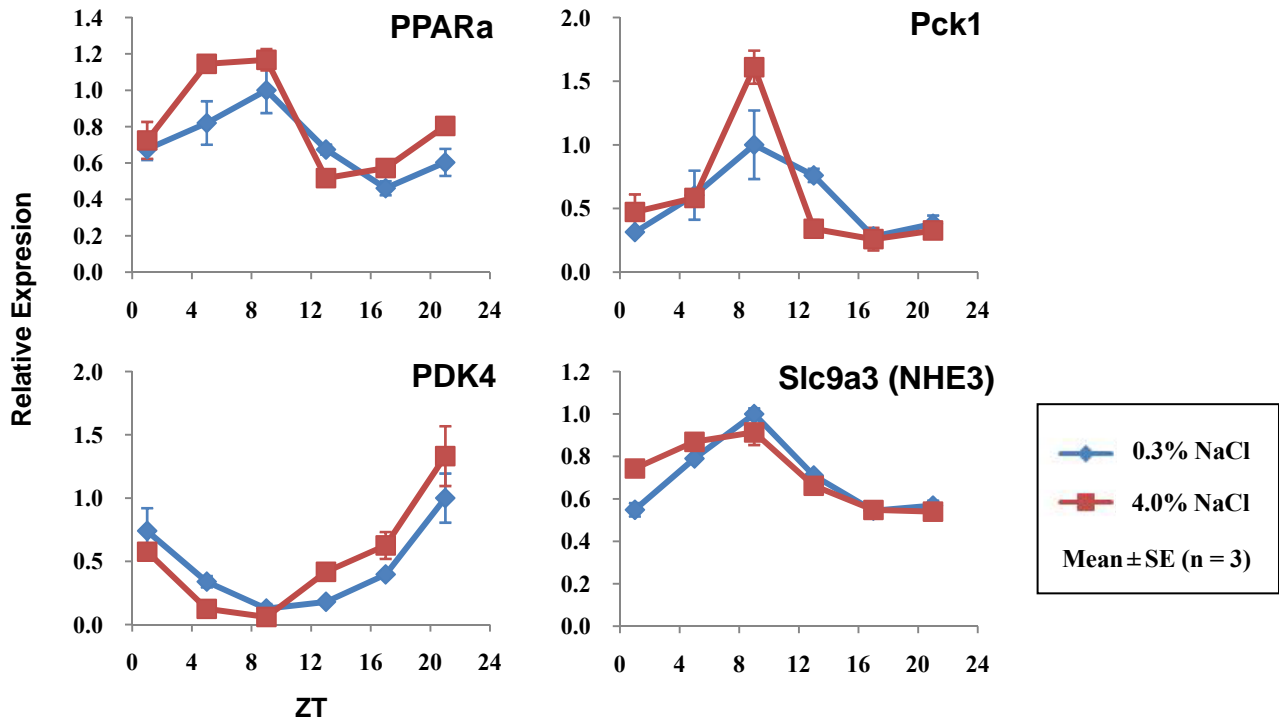


Fig. 6. Temporal expression of functional marker genes in livers or kidneys of mice fed normal-salt (0.3% NaCl) or high-salt (4.0% NaCl) diets

4. 考察

本研究は、高食塩食の摂取がマウスのサーカディアンリズムに与える影響を解析し、末梢臓器のリズムを前進させることを見出した。その濃度についてであるが、8.0% NaCl食でも、4.0% NaCl食でも4週間の摂取により効果が現れたことから(Fig. 2, 3)、少なくとも4.0%以上であれば十分な効果が出るものと考えられる。そのメカニズムについては、8.0% NaCl食の場合、餌を変えた直後は摂食量が落ち、体重が減少したが(Fig. 1)、4.0% NaCl食では、その影響は体重に現れるほどには見受けられなかったことから(data not shown)、体重の一過的な減少による影響ではないと考えられる。このリズム前進は、腎臓のみならず、肝臓でも確認されたことから(Fig. 4)、尿の産生量が増加したことによる腎臓の負荷といった特異的なものではなく、血液中の液性因子が関与し、複数の末梢組織に影響していることが考えられる。また、行動リズムには影響が現れなかったことから(Fig. 5)、液性因子であるとするならば、血液脳関門を通過しないものか、中枢には受容体が存在しないものである可能性が高い。グルココルチコイドやインスリンは、中枢時計にはあまり作用せずに、末梢組織の体内時計に大きな影響を与えることが知られており^{14, 51}、これらのホルモンの分泌量やリズムの変動により、末梢時計のリズムが前進している可能性が考えられる。

各末梢組織には末梢時計が存在しており、それは、それぞれの生理機能リズムと密接に関与している。肝臓のリズムは、血糖値を一日中維持することに必要であり、肝臓のリズムだけを特異的に消失させると、一日のうちで特定の時間帯のみ低血糖を引き起こしてしまう¹⁶。これは、脂質代謝と糖代謝にそれぞれリズムがあり、食餌からのエネルギーが欠乏する時間帯には、脂質からの糖新生による血糖値の維持が盛んになることを示している。実際、脂質の燃焼に関与しているPPAR α や糖新生に関与するPck1の遺伝子発現ピークは、マウスの休息期である昼間にくる。本研究の結果からもPPAR α 、Pck1の発現ピークは昼間のZT9付近にきているが(Fig. 6)、高食塩食の摂取により、その発現ピークは時計遺伝子と同様に2-3時間前進している。また、糖代謝に関与するPDK4も発現リズムも前進していることから、代謝系全般のリズムが前進していることが示唆される。また、腎臓の近位尿細管において、NHE3は、ナトリウムの再吸収に重要な機能を果たしている分子

であり、その発現は時計遺伝子により日周制御されていることが知られているが^{17, 81}、高食塩食の摂取によりこちらのリズムも前進していた(Fig. 6)。このことから、腎機能の生理リズムもやはり前進している可能性が考えられる。以上のことから、高食塩食の摂取により、末梢臓器全般の時計遺伝子発現リズムが前進することにより、その下流で制御されている、生理機能に直結する遺伝子群の発現リズムも前進し、脂質代謝や糖代謝、ナトリウムの再吸収などの生理機能全体のリズムが前進していることが示唆された。

5. 今後の課題

高食塩食の摂取により末梢時計が2-3時間前進したと考えられるが、行動リズムの解析から、マウスの睡眠・覚醒や食餌時間などは変化していないと考えられた。つまり、中枢時計と抹消時計の関係が、通常食塩食を摂取している場合と比較して2-3時間ずれている可能性が高い。これが、生体にとってどのような意味をもち、どれほどの影響を与えているのかは今のところ不明であるが、いわゆる「時差ボケ」は中枢時計と末梢時計のずれが原因でないかと考えられていることから、この現象を詳細に解析することにより、時差ボケの解消はもとより、中枢時計と末梢時計の関係やそれぞれの生理的意義について多くの知見が得られると予想される。また、別の展開として、食塩感受性高血圧のヒトにとって、サーカディアンリズムの観点から有効的あるいは避けた方がよい食塩摂取のタイミングを検討することも可能である。これらの成果が生活習慣病を予防するための食品開発、並びに規則正しい食習慣の見直しにつながることを期待している。

文献等

- Hastings, M., Reddy, A., and Maywood, E. (2003). A clockwork web: circadian timing in brain and periphery, in health and disease. *Nat Rev Neurosci* 4, 649-661.
- Mendoza, J. (2007). Circadian clocks: setting time by food. *J Neuroendocrinol* 19, 127-137.
- 加藤秀夫, 三浦由紀子, 西田由香, 河原裕美 (2001). からだのリズムと生活習慣病. *日本体質学会誌* 63, 19-21.
- Balsalobre, A., Brown, S., Marcacci, L., Tronche, F., Kellendonk, C., Reichardt, H., Schütz, G., and Schibler, E. (2000). A heterodimeric complex of a myocyte bHLH and a basic helix-loop-helix transcription factor defines a subset of mammalian circadian oscillators. *Nat Genet* 25, 297-303.

- U. (2000). Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. *Science* 289, 2344-2347.
5. Kuriyama, K., Sasahara, K., Kudo, T., and Shibata, S. (2004). Daily injection of insulin attenuated impairment of liver circadian clock oscillation in the streptozotocin-treated diabetic mouse. *FEBS Lett* 572, 206-210.
6. Lamia, K., Storch, K., and Weitz, C. (2008). Physiological significance of a peripheral tissue circadian clock. *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 15172-15177.
7. Saifur Rohman, M., Emoto, N., Nonaka, H., Okura, R., Nishimura, M., Yagita, K., van der Horst, G., Matsuo, M., Okamura, H., and Yokoyama, M. (2005). Circadian clock genes directly regulate expression of the Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchanger NHE3 in the kidney. *Kidney Int* 67, 1410-1419.
8. Nishinaga, H., Komatsu, R., Doi, M., Fustin, J., Yamada, H., Okura, R., Yamaguchi, Y., Matsuo, M., Emoto, N., and Okamura, H. (2009). Circadian expression of the Na⁺/H⁺ exchanger NHE3 in the mouse renal medulla. *Biomed Res* 30, 87-93.

No. 0843

Timing of Salt Intake from Circadian Aspect

Hideaki Oike

National Food Research Institute (NFRI), National Agriculture and Food Research Organization (NARO)
2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642, Japan

Summary

In mammals, circadian clocks are thought to be important on peripheral tissues for adjusting physiological events to environment. Unlike the central clock, which is located on suprachiasmatic nucleus and mainly driven by light/dark cycles, many peripheral clocks are influenced by feeding schedule. But the roles of peripheral clocks and the regulating factors are little known. Therefore, we examined the effects of high-salt diet on circadian rhythms of mice. We fed mice with high-salt diet (4.0% or 8.0% NaCl) or normal-salt diet (0.3% or 0.6% NaCl) for 4 weeks. Peripheral expression of clock genes, *Bmal1*, *Dbp*, *Per1*, *Per2* and *Rev-erba* in the kidneys and livers and locomotor activity were determined by real-time PCR and wheel running, respectively. The phase of clock genes was advanced in the both tissues of mice fed high-salt diet, but locomotor activity is not different between both groups. Expression rhythms of metabolic marker genes, *PPAR α* , *PEPCK1* (*Pck1*), and *PDK4* were also advanced in liver. Our result indicated that high-salt diet advanced the peripheral circadian clocks without affecting central clock.