

概日行動・生理リズムに対する高塩高脂肪食の影響

中村 孝博

明治大学農学部生命科学科

概要 本研究の目的は、概日リズムに対する高塩高脂肪食の影響を理解し、そのメカニズムを解明することである。概日リズムは、血圧調節、心血管機能、糖質コルチコイド(コルチコステロン)や成長ホルモンなどのホルモン分泌、睡眠/覚醒サイクル、体温調節、免疫機能など、さまざまな生理現象で認められる生命の基本現象である。高塩食は末梢組織における時計遺伝子発現量を高め、それが引き金となり心血管疾患を引き起こすことが明らかとなった。副腎から律動的に分泌されるコルチコステロンは、末梢組織の細胞時計の自律振動を調節するために重要な組織であり、高塩食が概日リズムに及ぼす影響を理解するための重要な末梢組織であるといえる。高エネルギー摂取量は高塩分摂取量と強く相関し、高塩高脂肪食の概日リズム機構に対する影響を解明する研究は、心血管疾患や代謝性疾患などの生活習慣病のメカニズム解明に直結する。しかしながら、これまでに概日リズムに対する高塩高脂肪食の影響を調べた研究はなされていなかった。本研究では、①概日行動リズムに対する高塩高脂肪食の影響を観察すること、②その原因となることが予想されるコルチコステロンリズムへの影響を検討すること、③副腎組織における時計遺伝子およびコルチコステロン合成関連遺伝子発現リズムへの影響を検討した。

マウスを用いた検討により、高塩高脂肪食は活動リズムの振幅の減少を引き起こし、副腎皮質における時計遺伝子発現やコルチコステロン合成酵素リズムに影響し、コルチコステロンリズムをかく乱していることが観察された。これらの結果は、高塩高脂肪食が引き起こす各種疾患は、概日リズムの乱れを介して起こることを示唆している。

1. 研究目的

本研究の目的は、概日リズムに対する高塩高脂肪食の影響を理解し、そのメカニズムを解明することである。概日リズムは、血圧調節、心血管機能、糖質コルチコイド(コルチコステロン)や成長ホルモンなどのホルモン分泌、睡眠/覚醒サイクル、体温調節、免疫機能など、さまざまな生理現象でみとめられる生命の基本現象である。海外旅行や交代勤務などで引き起こされる概日リズムの乱れは、心血管疾患、代謝性疾患、がん、免疫疾患などのさまざまな疾患と関連していることが明らかにされてきている。概日リズムは、BMAL1, CLOCK, CRY, PER などの時計遺伝子と呼ばれる遺伝子群で構成されるフィードバックループによって制御される。BMAL1, CLOCK, NPAS2, および RORタンパク質は転写活性化因子として機能し、PER, CRY,

および REV-ERB は阻害剤として機能して、自身とその標的遺伝子の約 24 時間の自律的な振動を生成する。

高塩食は末梢組織における時計遺伝子発現量を高め、それが引き金となり心血管疾患を引き起こすことが明らかとなった。また、最新の順遺伝学に基づく研究では、塩分調節に寄与する SIK (salt-inducible kinase 3) や Nalcn (Sodium leak channel non-selective protein) が睡眠量とその必要量の恒常性調節において、重要な役割をしていることが報告され、塩化ナトリウムレベルが概日リズムの調節に重要であることを示した。さらに、時計遺伝子である CRY 遺伝子の欠損マウスは副腎に障害がおり、高血圧になることが報告された。副腎から律動的に分泌されるコルチコステロンは、末梢組織の細胞時計の自律振動を調節するために重要な組織であり、高塩食が概日リズムに及

ばす影響を理解するための重要な末梢組織であるといえる。

一方、「脂肪」は概日リズムに影響を与える栄養因子の1つであり、多くの検討がなされている。これまでの研究では、高脂肪食を自由に摂取すると、絶食時のリズムが乱れ、生理、代謝、および遺伝子発現のリズムが減弱することが報告されている。高エネルギー摂取量は高塩分摂取量と強く相関し、高塩高脂肪食の概日リズム機構に対する影響を解明する研究は、心血管疾患や代謝性疾患などの生活習慣病のメカニズム解明に直結する。しかしながら、これまでに概日リズムに対する高塩高脂肪食の影響を調べた研究はなされていなかった。

本研究では、①概日行動リズムに対する高塩高脂肪食の影響を観察すること、②その原因となることが予想されるコルチコステロンリズムへの影響を検討すること、③副腎組織における時計遺伝子およびコルチコステロン合成関連遺伝子発現リズムへの影響を検討した。

2. 研究方法

本研究目的である「概日リズムに対する高塩高脂肪食の影響を理解し、そのメカニズムを解明する」を達成するため以下のⅠ－Ⅲの実験計画を実施した。なお、本研究では実験動物としてマウスを用いた。

実験Ⅰ：高塩高脂肪食がマウス概日行動リズムに与える影響

6週令雄性 BALB/c マウスを購入し、明暗コントロールが可能な飼育箱内で12時間12時間の明暗条件下にて自由摂食にて飼育した。正常食の栄養組成は20% kcalのタンパク質、70% kcalの炭水化物、10% kcalの脂肪とし、高脂肪食は、20% kcalのタンパク質、20% kcalの炭水化物、60% kcalの脂肪とした。高塩高脂肪食として、高脂肪食の塩化ナトリウム含有量を通常の0.3%から8%として動物に与えた。4週間、給餌した後に輪回しケージに1匹ずつ入れ輪回し活動記録を開始した。2週間の明暗条件および3週間の恒常暗条件下にて輪回し活動記録を行い、活動量、活動期(α)／休息期(ρ)、恒常暗条件下での活動周期を求めた。

実験Ⅱ：高塩高脂肪食がコルチコステロンリズムに与える影響

実験Ⅰと同条件で10週令まで飼育した動物をメタボリックケージにいれ、馴化した後、明暗条件下にて4時間おき

24時間の糞のサンプリングを行った。ELISAキットを用いて、各群の糞中のコルチコステロン濃度を計測した。

実験Ⅲ：高塩高脂肪食がマウス副腎の時計遺伝子発現に与える影響

実験Ⅰと同条件で明暗コントロールが可能な飼育箱内で10週令になるまでグループ飼育し、12時間12時間の明暗条件下で飼育後、4時間おきに安楽死させ副腎のサンプリングを24時間分行った。各臓器よりRNAを抽出し、リアルタイムPCRにて主要時計遺伝子であるPer1, Per2, Cry2, Clock, Bmal1の遺伝子発現量を計測し、そのリズムについて解析を行った。また、実験Ⅱとして、副腎でのコルチコステロン合成に関わる遺伝子であるStAR, CYP11A, CYP11Bについても発現リズム解析を行った。

3. 研究結果

結果1：高塩高脂肪食は概日リズム周期に影響しないが、活動レベルを顕著に低下させる。

概日輪回し活動に与える高塩高脂肪食の影響を観察したところ、概日リズム周期には影響を与えなかった(図1)。しかしながら、高塩高脂肪食マウスは、正常食群と高脂肪食群に比べ、明暗条件および恒常暗条件下において有意な活動レベルの減少が認められた。また、脂肪食(高脂肪食群および高塩高脂肪群)マウスは明暗条件下における有意な活動期の短縮が認められた。これらのことから、高塩高脂肪食は活動リズムの振幅の減少を引き起こすことが明らかとなった。

結果2：高塩高脂肪食は糞中コルチコステロンリズムをかく乱する。

正常食のマウスにおける糞中コルチコステロンレベルは明暗条件の明期と暗期が切り替わる時間帯にピークを迎える日内リズムを示す(図2)。しかしながら、高塩高脂肪食のマウスは、夜間の終わりに近い時間帯にもう一つのピークが認められる二峰性のリズムが認められた。高脂肪食群ではこのような現象は認められず、高塩高脂肪食条件がコルチコステロンリズムをかく乱することが示された。また、コルチコステロンの合成酵素をコードする遺伝子であるCyp11aは、高塩高脂肪食群のマウスの副腎において優位に減少していた。これらのことから、高塩高脂肪食は合成酵素に影響し、コルチコステロンリズムをかく乱していることが考えられる。

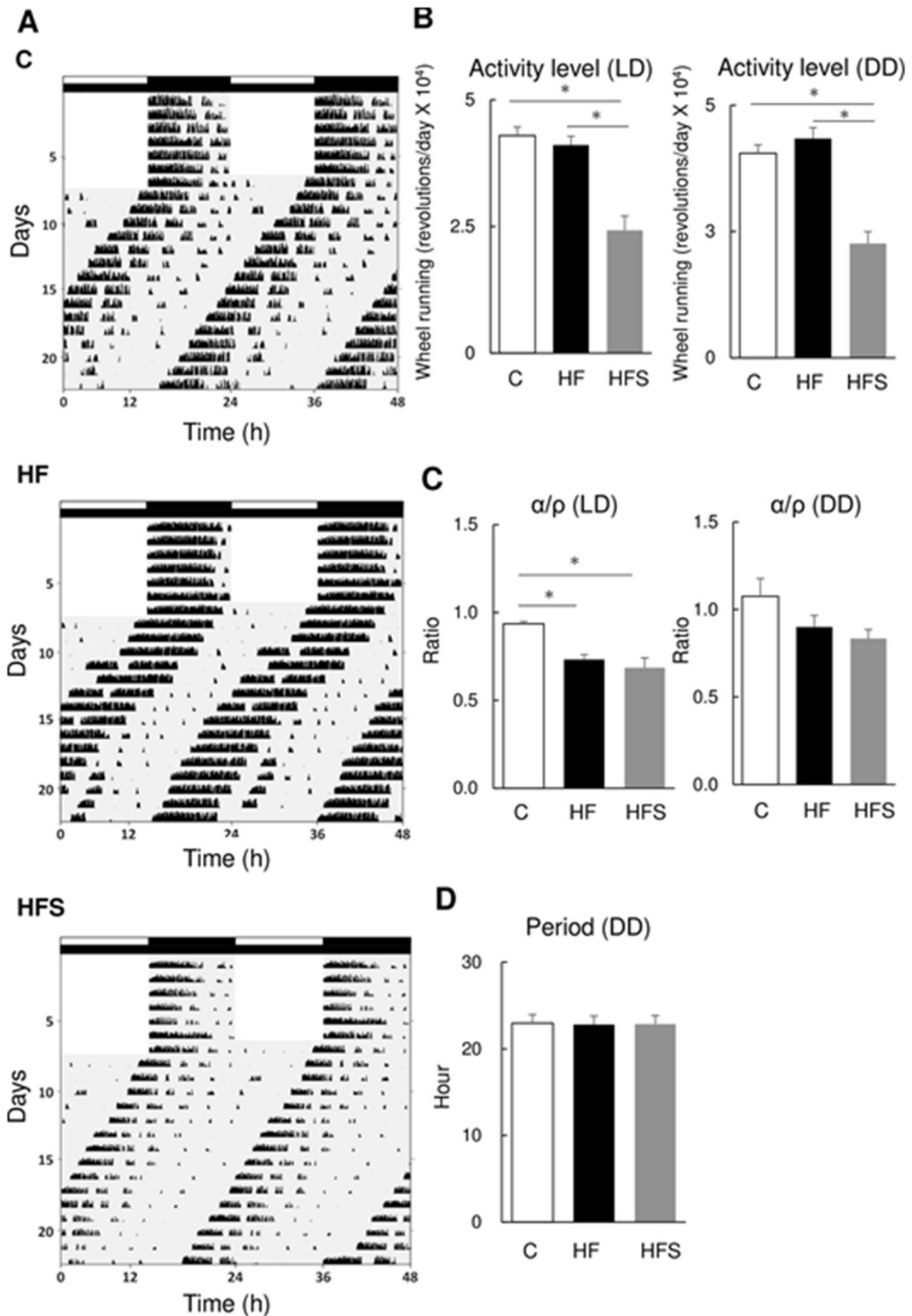


図 1: 高塩高脂肪食は概日リズム周期に影響しないが、活動レベルを顕著に低下させる。
 (A) 輪回し活動の代表例。明暗条件 7 日間, 恒常暗条件 15 日間分を示している。図中 C は正常食群, HF は高脂肪食群, HFS は高塩高脂肪食群である。(B) 明暗 (LD) および恒常暗 (DD) 条件における活動量を示している。(C) 明暗 (LD) および恒常暗 (DD) 条件における活動期/休息期の比を示している。(D) 恒常暗 (DD) 条件における概日周期を示している。*P < 0.05

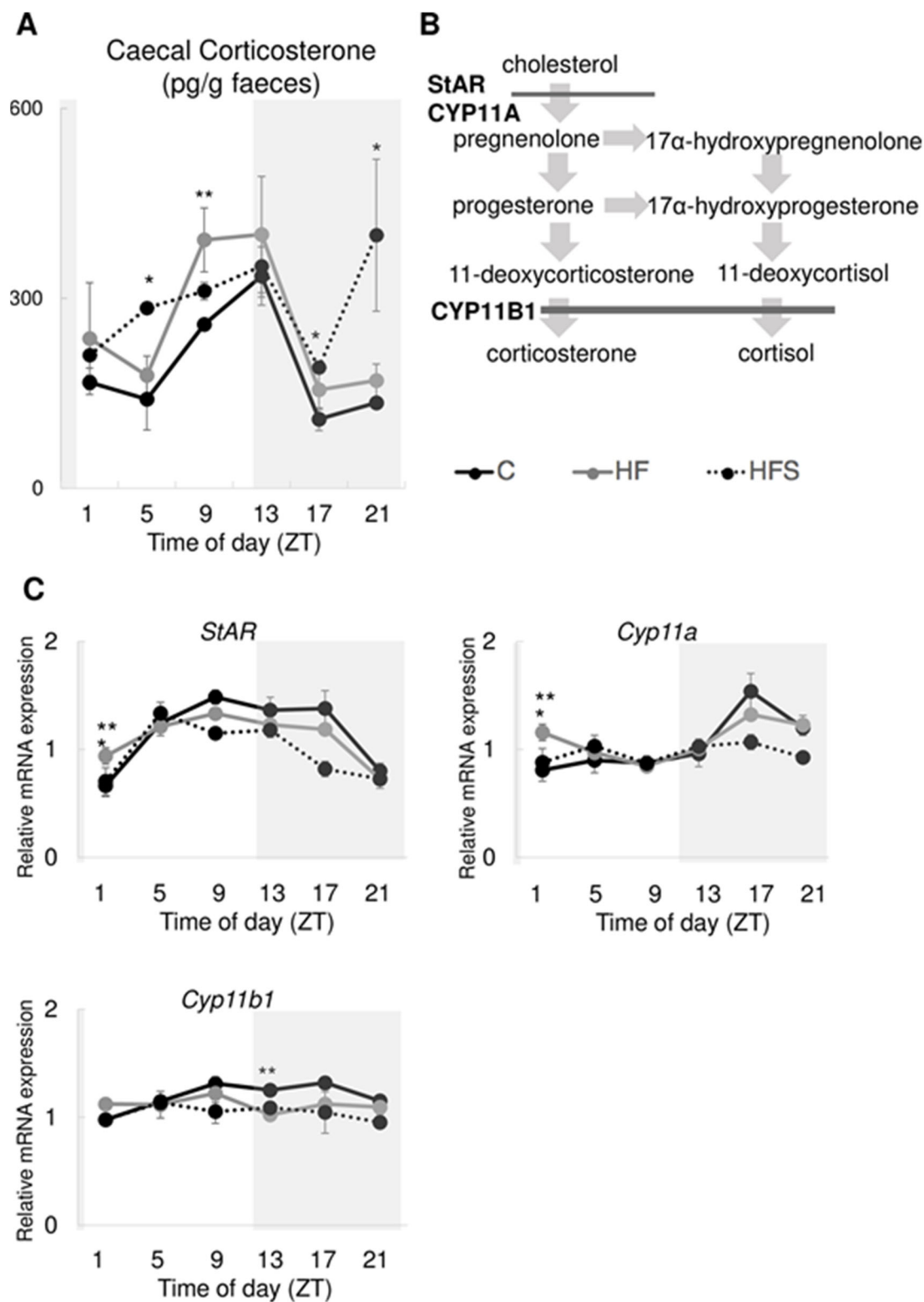


図 2: 高塩高脂肪食は糞中コルチコステロンリズムをかく乱する。

(A) 明暗条件下における糞中コルチコステロンリズム。図中Cは正常食群, HFは高脂肪食群, HFSは高塩高脂肪食群である。(B) 副腎におけるコルチコステロン合成経路。明暗(LD)および恒常暗(DD)条件における活動量を示している。(C) 明暗条件での副腎におけるStAR, Cyp11a, Cyp11b1の発現リズム。*P < 0.05 for HF vs. HFS, **P < 0.01 for HF vs. C

結果3: 高塩高脂肪食は副腎における時計遺伝子発現リズムに影響する。

主要な時計遺伝子である *Per1*, *Per2*, *Cry2*, *Clock*, *Bmal1* の遺伝子発現量を副腎にて計測した(図 3)。その結果, 高塩高脂肪食は副腎における *Cry2* のレベルを低下させ, *Bmal1*, *Clock* の遺伝子発現リズムに影響することが示された。これらのことから, 高塩高脂肪食は副腎の時計遺伝子発現リズムに影響し, 副腎機能に関わるリズムがかく乱している可能性が示唆される。

4. 結論

本研究では, 高塩高脂肪食がマウスの活動リズムの低下とコルチコステロン合成リズムの乱れを引き起こすことを示した。これらの結果は, 高塩高脂肪食が引き起こす各種疾患は, 概日リズムの乱れを介して起こることを示唆している。

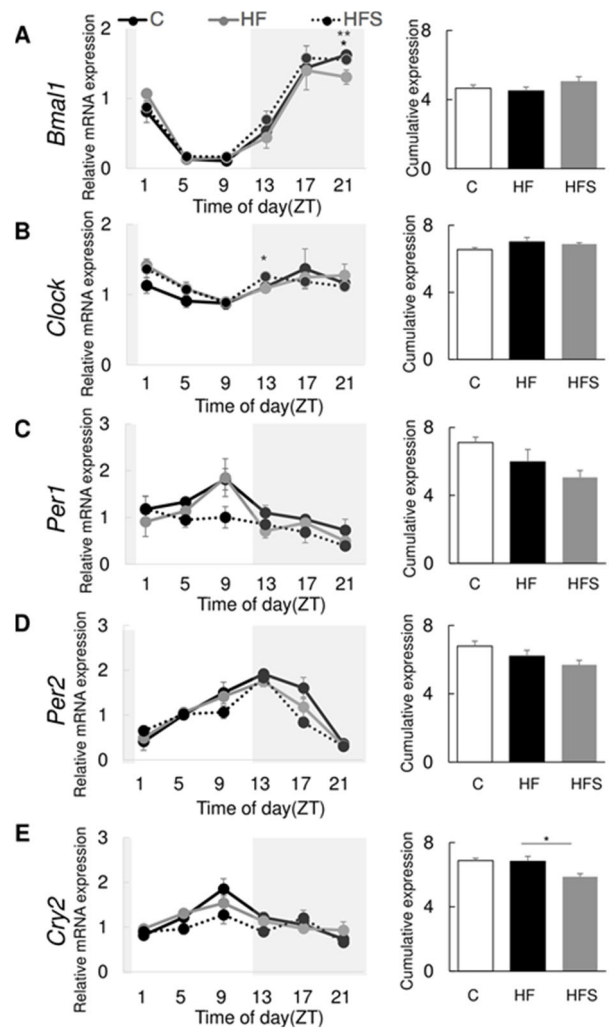


図 3: 高塩高脂肪食は副腎における時計遺伝子発現リズムに影響する。

(A-E) 右図, 明暗条件下での副腎における時計遺伝子 (*Bmal1*, *Clock*, *Per1*, *Per2*, *Cry1*) 発現リズム。左図は一日における総発現量を示す。*P < 0.05 for HF vs. HFS, *P < 0.01 for HF vs. C

Effects of High Salt and Fat Diets on Circadian Behavior and Physiology

Takahiro Nakamura

Meiji University

Summary

Salt is an essential nutrient; however, excessive salt intake is a prominent public health concern worldwide. Various physiological functions are associated with circadian rhythms, and disruption of circadian rhythms is a prominent risk factor for cardiovascular diseases, cancer, and immune disease. Certain nutrients are vital regulators of peripheral circadian clocks. However, the role of a high-fat and high-salt (HFS) diet in the regulation of circadian gene expression is unclear. This study aimed to investigate the effect of an HFS diet on rhythms of locomotor activity, caecum glucocorticoid secretion, and clock gene expression in mice. Mice administered an HFS diet displayed reduced locomotor activity under normal light/dark and constant dark conditions in comparison with those administered a normal diet. The diurnal rhythm of caecum glucocorticoid secretion and the expression levels of glucocorticoid-related genes and clock genes in the adrenal gland were disrupted with an HFS diet. These results suggest that an HFS diet alters locomotor activity, disrupts circadian rhythms of glucocorticoid secretion, and downregulates peripheral adrenal gland circadian clock genes.