

# Resorcinolic lipids による サーチュイン酵素活性促進効果

Resorcinolic Lipids Activate a sirtuin Enzyme

今井伸二郎\*

植物種子外皮に存在する Resorcinolic lipids (RLs) と呼ばれる成分が、生命維持に重要な長寿遺伝子 Sirtuin (NAD + 依存的脱アセチル化酵素) を特異的に活性化することを発見した。更に RLs には Sirtuin 依存的にショウジョウバエの寿命を延長する機能があることが確認された。

## 1 要約

ぶどう種子に存在するレスベラトロールはサーチュイン (NAD + 依存的脱アセチル化酵素) の酵素活性を直接促進することが報告され、老化抑制やメタボリックシンドローム予防などの様々な効果が研究されてきた。しかし、その後レスベラトロールによるこのサーチュイン活性化は測定系のアーティファクトであり、使用する基質のアセチル化リジン近傍のアミノ酸組成に影響を受けることなどが報告された。そこで、基質の組成に影響されず、サーチュインの酵素活性を直接促進する成分の探索を本研究の目的とした。約 50 種類の各種フィトケミカルライブラリーについて、CycLex 社製ヒト SIRT1 活性測定キットを用いスクリーニングを行ったところ、穀物外皮に存在する resorcinolic lipids (RLs) には、SIRT1 の酵素活性促進作用があることが確認された。この RLs について更に詳細な検討を行った。Lineweaver-Burk プロットによる酵素学的反応速度解析を行い、RLs 分子が酵素自体に働くアロステリック効果を示す可能性が示唆された。ヒト単球様細胞 THP-1 におけるヒストン脱アセチル化活性評価を行い、細胞内においても、RLs には脱アセチル化活性を亢進させる働きがあることが確認された。また、THP-1 及びヒト肝癌細胞 HepG2 において、SIRT1 遺伝子発現への影響を確認したところ、RLs は遺伝子発現に影響を与えない事が確認された。SIRT1 を活性化すると各種生物の寿命を延長させる効果が期待される。そこでショウジョウバエを用いた寿命延長効果を検討した。その結果、RLs はショウジョウバエ雄、雌共に対照に比べ平均寿命を有意に延長させた。サーチュイン遺

\* Shinjiro Imai 東京工科大学 応用生物学部 教授

伝子欠損ショウジョウバエにおいて、RLsはこの寿命延長効果を示さなかった事から、RLsによるショウジョウバエへの寿命延長効果はサーチュイン依存的であることが確認された。

## 2 序論

サーチュイン遺伝子は、長寿遺伝子または抗老化遺伝子とも呼ばれ、その活性化により生物の寿命が延長されると言われている。サーチュイン遺伝子から翻訳されるタンパク質である Sir2 様タンパク質はこの遺伝子の活性本体であり、原核生物から哺乳類まで様々な生物に保存された NAD<sup>+</sup>依存性脱アセチル化酵素である<sup>1)</sup>。特にヒストンと DNA の結合に、また各種転写因子の活性化などにも関与し、様々な遺伝子の遺伝的調節を行うことで寿命を延ばすと考えられている。サーチュイン (Sirtuin) の名前は、Silent mating type information regulation 2 homolog に由来する。酵母の Sir2 遺伝子がヒストン脱アセチル化酵素であることが見出され、この酵素の作用が代謝や遺伝子サイレンシング、DNA 修復<sup>2)</sup>、DNA 組換え<sup>3)</sup>、加齢に関与していることが示唆された<sup>4~6)</sup>。様々な種において、飼料中のカロリーを制限したときに寿命が延長され、老化に関係する栄養調節メカニズムが関与することが示唆されている<sup>7~9)</sup>。マウスの Sirt1 遺伝子のトランスジェニック過剰発現モデル<sup>10)</sup>、あるいはレスベラトロールによる薬理的活性化によってもたらされる Sirt1 活性の促進は、げっ歯類モデルにおける 2 型糖尿病に有益な効果を有することが示されており<sup>11)</sup>、サーチュインはこれら疾患の有用な治療標的として認知されている。サーチュイン遺伝子は飢餓やカロリー制限によって活性化されるが、ぶどう種子や赤ワインに多く含まれるポリフェノールである、レスベラトロールによっても酵素活性の作用を直接促進することが 2003 年デービット・シンクレアら<sup>12)</sup>により明らかにされ、様々な研究が進められた。カルコン、フラボンおよびスチルベンを含むいくつかのポリフェノールは、アセチル化ペプチド基質の脱アセチル化速度を増加させることが知られている。レスベラトロールによるアセチル化 SIR-2.1 ペプチドについては 2.5 倍まで、アセチル化 Sir2 ペプチドについては 2.4 倍まで、用量依存的に脱アセチル化を促進することが示されている<sup>12,13)</sup>。しかし、レスベラトロールによる SIRT1 活性化は、実験に用いた基質ペプチドに結合させた蛍光物質が影響した、測定系のアーティファクトであり<sup>14)</sup>、レスベラトロールには酵素活性促進作用は無いのではないかとの論文<sup>15)</sup>が 2010 年ミハエル・パチョレックらにより提出され、物議をかもした。その後シンクレアらは基質ペプチドのアセチル化リジンのカルボキシル基側に隣接するアミノ酸がチロシンのように芳香族アミノ酸の場合、レスベラトロールは酵素活性促進作用を示すが、アラニンの場合には活性促進が見られない等の反論論文<sup>16)</sup>を提出した。

そこで我々は基質のアミノ酸組成に影響を受けず、SIRT1 の酵素活性を促進する成分の探索を目的に研究を開始した。各種フィトケミカルについて評価を行い、候補成分として RLs を見出した。RLs はアルキルレゾルシノールとも呼ばれ、各種植物種子外皮に存在する。RLs には各種鎖長の飽和アルキル鎖が構造に含まれるもの、アルキル鎖に 1 から数個の 2 重結合が含ま

れるもの、アルキル鎖が枝別れした構造のアルキル鎖を含むものなど多種類が存在する。小麦やライ麦には直鎖のアルキル鎖で鎖長 17 から 23 個の RLs を含有している<sup>17)</sup>。RLs として小麦で 300~1400  $\mu\text{g/g}$ 、ライ麦では 360~3200  $\mu\text{g/g}$  と比較的多く含まれる<sup>18)</sup>。一方大麦、キビ・アワ類、メイズ、オーツブランには少なく、イネ、ソルガムには含まれていない。穀類以外ではマンゴー果実の外皮、カシューナッツ種子の殻、ウルシ、イチヨウ種子に含まれている。

RLs は小腸から吸収され、血漿中の推定半減期は 5 時間程度であるため、小麦およびライ麦全粒摂取のバイオマーカーとして用いられている<sup>19)</sup>。RLs は両親媒性の構造を持ち、フェノール性水酸基が含まれることから弱い抗酸化作用を持つ<sup>20)</sup>。

4g/kg 混餌飼料で RLs を摂取させたラットでは、 $\gamma$ -トコフェロール値を上昇させ、肝臓中の総コレステロール濃度を低下させた<sup>21)</sup>。また RLs には、肝臓の脂質蓄積および腸管コレステロール吸収を抑制することによってグルコース耐性を増加させ、その後、マウスの食餌誘発性肥満を抑制する活性が確認されている<sup>22)</sup>。レバトロールはサーチュインを介してこのようなグルコース耐性を高める活性がある<sup>23)</sup> ことから、この機能は RLs によるサーチュイン酵素活性促進作用に関連している可能性があると考えられる。

### 3 方法

#### 3. 1 ライ麦種子からの RLs 混合物の抽出液からの精製

ライ麦種子 (3.6 kg) を粉碎後 18 L のエタノールで懸濁し、24 時間連続攪拌した。懸濁液を濾過し、その濾液を減圧乾固し、500 ml の酢酸エチルで懸濁後再度濾過した。濾液を減圧乾固し、500 ml のヘキサンで懸濁後再度濾過し、濾液を減圧乾固したものを粗精製物とした。この粗精製物を以下の順相系シリカクロマトにより精製した。順相系シリカクロマトは Yamazen Science 社製の中圧クロマト装置を用い、High-flash 5L, 60Å, 40  $\mu\text{m}$  カラムを使用した。溶出は以下のステップグラジエント溶出にて実施した。ステップグラジエント (Hexane: EtOAc = 90 : 10, 9 分間, 80 : 20, 15 分間, 60 : 40, 15 分間, 流速 70 ml/min, 検出 : 紫外 275 nm) クロマト開始 32 分から 36 分のフラクションを集め、これを減圧乾固し、これを精製物とした。

#### 3. 2 精製物の各種 RLs 分析

精製物はメタノールに溶解し、以下の条件で逆相系 HPLC により分析定量した。

HPLC 条件 : 使用カラム : Inertsil ODS-3 C18, 5  $\mu\text{m}$ , 4.6  $\times$  250 mm column (GL Sciences, Tokyo) 溶出溶媒 : 100% メタノール, 流速 : 1ml/min, 検出 : 紫外 275 nm。

#### 3. 3 SIRT1 脱アセチル活性評価

CycLex 法 : ヒト SIRT1 脱アセチル活性は CycLex 社製 SIRT1/Sir2 Deacetylase Fluorometric Assay Kit を用い、同社マニュアルに従い実施した。

HPLC 法：HPLC によるヒト SIRT1 脱アセチル活性評価は 1  $\mu$ M p53 peptide (Gly-Gln-Ser-Thr-Ser-Arg-His-Lys-(Ac-Lys)-Leu-Met-Phe-Lys-Thr-Glu-Gly) を基質として用い、2.5 nM 組換え SIRT1 を室温 30 分間反応させ、脱アセチル化ペプチドとアセチル化ペプチドを HPLC で定量することにより評価した。HPLC 分析は以下の条件で実施した。

HPLC 条件：使用カラム；Inertsil ODS-3 C18, 5  $\mu$ m, 4.6  $\times$  50 mm column (GL Sciences). 溶出溶媒；移動相 A：100% H<sub>2</sub>O with 0.1% trifluoroacetic acid, 移動相 B：100% CH<sub>3</sub>CN with 0.1% trifluoroacetic acid. 直線グラディエント；0% ~ 35%, 流速 1.0 ml/min, 分析温度 25 $^{\circ}$ C, 検出：210 nm. 脱アセチルペプチドとアセチルペプチドのリテンションタイムはそれぞれ 9.7 and 10.6 min であった。

### 3. 4 細胞培養

ヒト単球様細胞 THP-1 は 10% 牛胎児血清を含む RPMI-1640 培地で 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 下で培養した。1  $\times$  10<sup>7</sup> cells/well の細胞濃度で各種 RLs, レスベラトロールを添加し、24 時間培養を継続した。ヒストン脱アセチル実験においては、100 nM trichostatin A (TSA) も添加した。

肝実質細胞 HepG2 は 10% 牛胎児血清を含む Eagle's Minimum Essential 培地で 37 $^{\circ}$ C 5% CO<sub>2</sub> で培養した。1  $\times$  10<sup>7</sup> cells/well の細胞濃度で各種 RLs, レスベラトロールを添加し、18 時間培養を継続した。グルコース制限培養において、THP-1 細胞及び HepG2 細胞はグルコースを含まない培地で培養した。THP-1 および HepG2 細胞は、グルコース制限下、4 回継代した。

### 3. 5 Histone 脱アセチル評価

アセチル化 histone の抽出は EpiGentek 社製 EpiQuik Total Histone Extraction Kit を用い同社マニュアルに従い実施した。抽出したアセチル化 histone の定量分析は EpiGentek 社製 EpiQuik Total Histone Acetylation Detection Kit を用い同社マニュアルに従い実施した。

### 3. 6 定量逆転写 PCR assay

定量逆転写 PCR (RT-PCR) は TAKARA 社製 Thermal Cycler Dice Real-time PCR System を用い、同社マニュアルに従い実施した。Total RNA は Qiagen 社製 RNA isolation kit を用い、同社マニュアルに従い抽出した。2  $\mu$ g の total RNA は TAKARA 社製 PrimeScript RT 試薬キットにより single-stranded DNA へ逆転写し、その cDNA を鋳型に PCR 反応は TAKARA 社製 SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup>II を用い同社マニュアルに従い実施した。使用したプライマーを下記に示す。

$\beta$ -Actin：5'-TGCACCACACCTTCTACAATGA-3'/5'-CAGCCTGGATAGCAACGTACAT-3'

SIRT1 : 5'-TAGAGCCTCACATGCAAGCTCTA-3'/5'-GCCAATCATAAGATGTTGCTGAAC-3'

### 3. 7 ショウジョウバエ

ショウジョウバエとして野生株は  $w^{1118}$  株 (stock no. 108479; identical to Iso31, isogenic  $w^{1118}$  stock in [BDSC] #5905) を, 変異株として  $Sir2^{17}$  株 (stock no. 24857; genotype:  $w^{1118}; Sir2^{17}/SM6a$ ) 及び  $Sir2^{KG00871}$  (stock no. 12966; genotype:  $y^1 w^{67e23}; P\{y^+ mDint2 w^{BR.E.BR} = SUPor-P\} Sir2^{KG00871}$ ) は Bloomington Drosophila Stock Center より入手した。全てのハエは 12 時間明暗下, 25°C, 50% 湿度下 飼育した。飼育には抗真菌剤として butyl p-hydroxybenzoate 0.35% (v/v) を含む, 10% (w/v) glucose, 7% (w/v) corn meal, 4% (w/v) yeast extract, 及び 0.3% (v/v) プロピオン酸を含む 0.55% (w/v) 寒天培地 からなる標準餌を用い実施した。

## 4 結果

約 50 種類の各種フィトケミカルライブラリーについて, CycLex 社製ヒト SIRT1 活性測定キットを用いスクリーニングを行ったところ, 穀物外皮に存在する RLs には SIRT1 の酵素活性促進作用があることが確認された。RLs 以外のフィトケミカルには明確な活性は確認されなかった。そこで, この RLs について詳細に検討する事とした。アルキル鎖が C5 の RL であるオリベトール, C15, C17 の RL, 対照として SIRT1 阻害剤のサーチノール, レスベラトロール類縁体の SRT1720 について SIRT1 酵素活性促進作用を検討した。その結果, 図 1a に示すようにオリベトール, C15, C17 のアルキルレゾルシノールについては酵素反応速度の上昇が確認されたが, SRT1720 についての反応速度の上昇は確認されなかった。一方サーチノールに関しては反応速度の抑制が確認され, 測定系が正常に測定されている事を示していた。HPLC 法による評価においては反応時間 1000 秒時点における基質濃度から脱アセチル基質濃度の差を算出し, 活性の評価とした。図 1b に示すように各サンプルの酵素活性は Cyclex 法と HPLC 法でほぼ同様の結果を示していた。

次に, C17 のアルキルレゾルシノールについてミハエリスメンテンと Lineweaver-Burk プロットによる酵素学的反応速度解析を行った。図 2a, b に示す様に, 基質である NAD<sup>+</sup>, アセチル化ペプチド量のどちらを可変させた場合でも, 基質濃度依存的に酵素活性の促進が確認された。このミハエリスメンテン式から, NAD<sup>+</sup> を変化させたとき, 対照の Km 値は 24.0  $\mu$ M, C17:0-RL では 25.6  $\mu$ M であり, 対照の Vmax は 78.1 Unit/sec に対し, C17:0-RL の Vmax は 114.9 unit/sec であった。このことから, C17:0-RL は対照に対し, Vmax を 1.47 倍上昇させていた (図 2a)。一方, ペプチド基質を変化させたとき, 対照の Km 値は 6.9  $\mu$ M, C17:0-RL では 4.9  $\mu$ M であり, 対照の Vmax は 93.5 Unit/sec に対し, C17:0-RL の Vmax は 196.1 unit/sec であった。このことから, C17:0-RL は対照にたいし Vmax を 2.1 倍上昇させていた (図 2b)。Lineweaver-Burk プロット解析 (図 2c, d) では, どちらの基質を用いた場

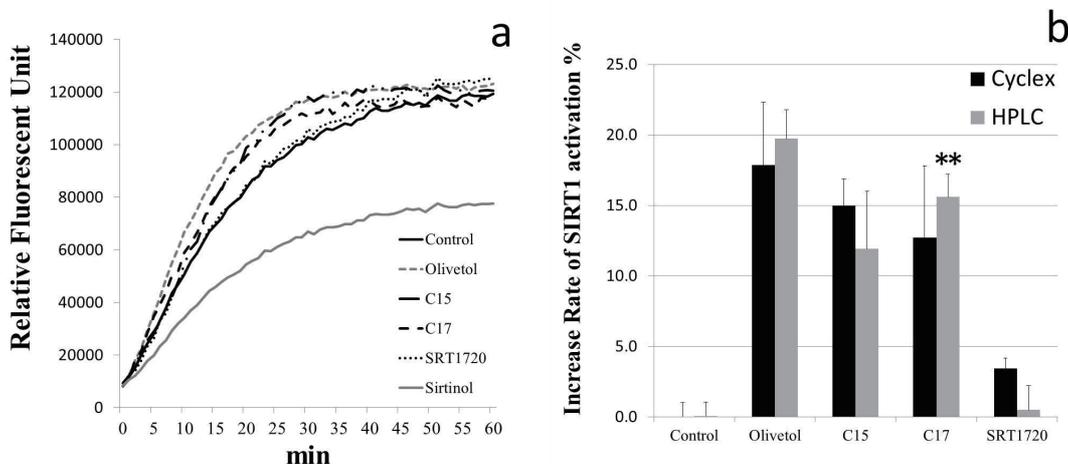


図1 組換え SIRT1 に対する RLs の効果

(a) RLs の SIRT1 脱アセチル化活性の経時変化を示す。各種 RLs および SIRT1720 は  $10 \mu\text{M}$  の濃度で、sirtinol は  $100 \mu\text{M}$  の濃度で、 $25 \mu\text{M}$  の  $\text{NAD}^+$  を含む組換え SIRT1 により酵素反応を行った。すべての値は 3 回測定の前平均値で示した。(b) 基質として p53 ペプチドを用いた反応時間 1000 秒時点における HPLC アッセイ法および CycLex アッセイにより測定された SIRT1 活性の対照に対する増加率を示す。エラーバーは標準誤差で表記した。対照との有意差はスチューデント T テストにより検定を行った。\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$

合でも対照と C17 : 0-RL との間で同じ x 軸値で交差したが、勾配が異なることが確認された。このことから、RLs 分子が酵素自体に働くアロステリック効果を示す可能性が示唆された。

次に、ヒト単球様細胞 THP-1 におけるヒストン脱アセチル化活性評価を行い、細胞内においても、RLs には脱アセチル化活性を亢進させる働きがあることを確認した。olivetol C15, C17RL, 陽性対照のレスベラトロールは、TSA 非感受性アセチル化ヒストンの割合を減少させた (図 3a)。レスベラトロールは SIRT1 の脱アセチル化活性を直接活性化しない可能性も有るが、動物の寿命を延ばすことが確認されている。レスベラトロールはまた、哺乳動物細胞の SIRT1 遺伝子の発現を有意に上昇させるとの報告がある<sup>24)</sup>。そこで、RLs にも SIRT1 遺伝子発現上昇活性があるかどうかを検討した。ヒト単球様細胞 THP-1 及びヒト肝癌細胞 HepG2 において、SIRT1 遺伝子発現への影響を確認したところ陽性対照であるレスベラトロールには文献どおり SIRT1 遺伝子発現上昇活性が確認されたが、RLs には遺伝子発現に影響を与えない事が確認された。培地中のグルコース濃度を制限し、細胞を培養すると SIRT1 遺伝子の発現量が増加する事でカロリー制限の代替評価法となる可能性が報告されている<sup>25)</sup>。そこで、THP-1 細胞、HepG2 細胞において培地中のグルコース濃度を制限し培養を行った場合の SIRT1 遺伝子発現量を評価した。その結果レスベラトロールと同様グルコース制限 (GR) 培養条件では、ヒト単球細胞株 THP-1 およびヒト肝癌細胞株 HepG2 における SIRT1 mRNA の発現レベルが有意に増加していた。(図 3b)。

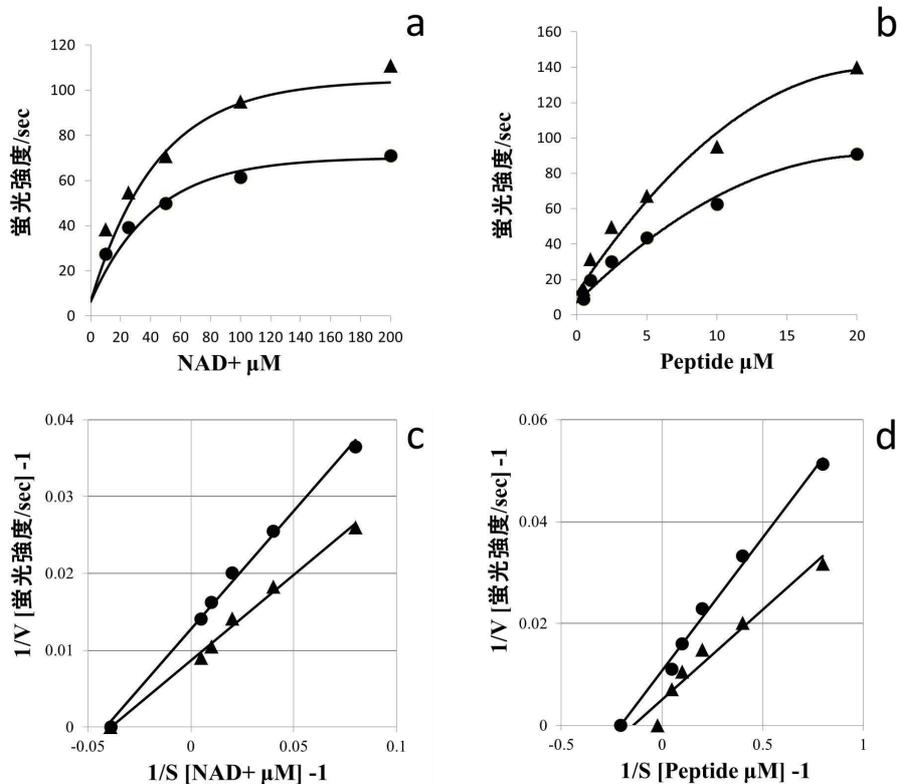


図2 酵素反応速度解析

反応時間 1000 秒における、各種濃度 (12.5~200  $\mu\text{M}$ ) の NAD+ 基質 (a) 及びペプチド基質 (b) 濃度 (0.5~20  $\mu\text{M}$ ) での SIRT1 活性についての C17:0-RL のミハエリスメンテンプロットを示す。(a) 及び (b) の逆数をプロットしたラインウェーバープロットをそれぞれ (c), (d) として示す。●はコントロールを▲は C17:0-RL を示す。全ての値は、3 回の測定の平均値で表記した。

SIRT1 を活性化すると各種生物の寿命を延長させる効果が期待される。そこでショウジョウバエを用いた寿命延長効果を検討した。0.07% (18.6 mM 当量) の RLs 混合物 (C17:0 33.1%, C19:0 33.6%, C21:0 25.3%, C23:0 8.0%) を含む標準飼料バイアルに成虫になった直後の野生株 ( $w^{1118}$  系統) を移し、飼育を開始した。同様に標準飼料バイアル及び 100  $\mu\text{M}$  のレスベラトロールを含む標準飼料バイアル、それぞれに同系統の成虫ハエを移し、方法で記載した条件で飼育を行った。RLs を含む飼料で生育したハエの平均寿命はオスで 22.0%, メスで 21.8% 延長した。一方レスベラトロールを含む飼料で生育したハエの場合、オスでは寿命が 19.0% まで延長されたが、メスでは 7.7% までしか上昇しなかった (図 4b)。オスの平均寿命値は標準飼料で 44.6 日、RLs 含有飼料で 54.4 日、レスベラトロール含有飼料で 53.1 日であった。メスの平均寿命値は標準飼料で 45.2 日、RLs 含有飼料で 55.0 日、レスベラトロール含有飼料で 48.6 日であった。これらの結果から、RLs ではオス、メス共にショウジョ

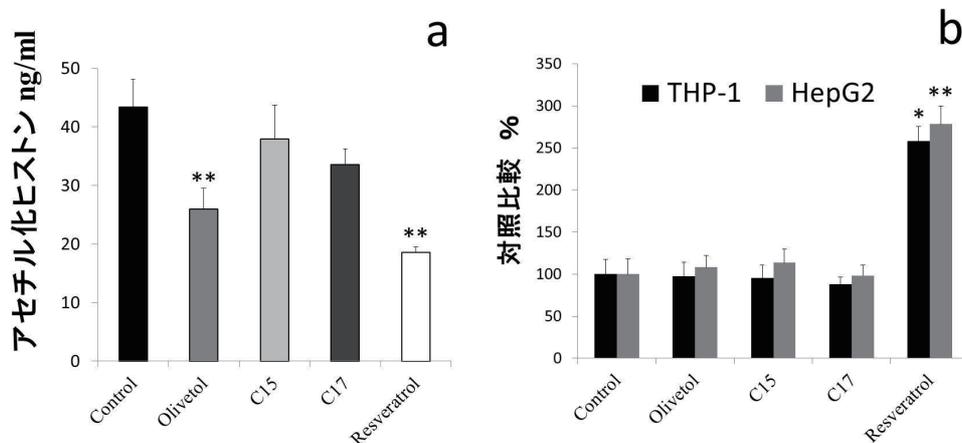


図3 ヒト細胞に対するRLsの効果

(a) THP-1細胞におけるヒストンの脱アセチル化活性に対する10  $\mu\text{M}$ のRLs及びレスベラトロール添加の増加効果を示す。(b) THP-1細胞およびHepG2細胞に10  $\mu\text{M}$ の各種RLs, レスベラトロールを添加した場合, およびグルコース制限下におけるSIRT1のmRNA発現レベルに及ぼす影響を示す。エラーバーは標準誤差で表記した。対照との有意差はスチューデントTテストにより検定を行った。\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$

ウバエの寿命を延長するが、レスベラトロールの場合ではオスのみ寿命を延長させるが、メスの場合は僅かしか寿命延長効果が見られないことが確認された。各群の飼料摂取量はキャピラリーフィーダー (CAFE) アッセイ法<sup>26)</sup>により測定されたが各群間に有意な差は確認されなかった(データ表記省略)。

RLsがサーチュイン (Sir2) 依存的にハエの寿命を延長したかどうかを判定するために、Sir2遺伝子発現量が著しく低下するSir2対立遺伝子欠損系列のショウジョウバエ (Sir2<sup>17</sup> / Sir2<sup>KG00871</sup>) を用い、同様の試験を実施した。RLsおよびレスベラトロールを含む飼料でこのハエを飼育した場合、Sir2どちらの飼料で生育されたハエでは寿命の延長が確認されなかった(図4c, d)。これらの結果から、RLsによる寿命延長効果はSir2依存的であることが示唆された。

## 5 結論

実験結果から、ヒトSIRT1脱アセチル化酵素活性がRLsにより促進されることが実証された。CycLexアッセイ法では、100  $\mu\text{M}$ のSirtinol添加によりSIRT1の脱アセチル化活性が阻害され、その阻害率は40%であり、既報<sup>27)</sup>のIC<sub>50</sub>値 (131  $\pm$  11  $\mu\text{M}$ )に相当していた。この結果より、CycLexアッセイ法はSIRT1の脱アセチル化活性を正確に測定できることを示している。酵素学的反応速度解析の結果から、RLsが酵素構造に影響することによってSIRT1の触媒活性を増加させることを示しており、これは、RLsによるアロステリック効果であると推論さ

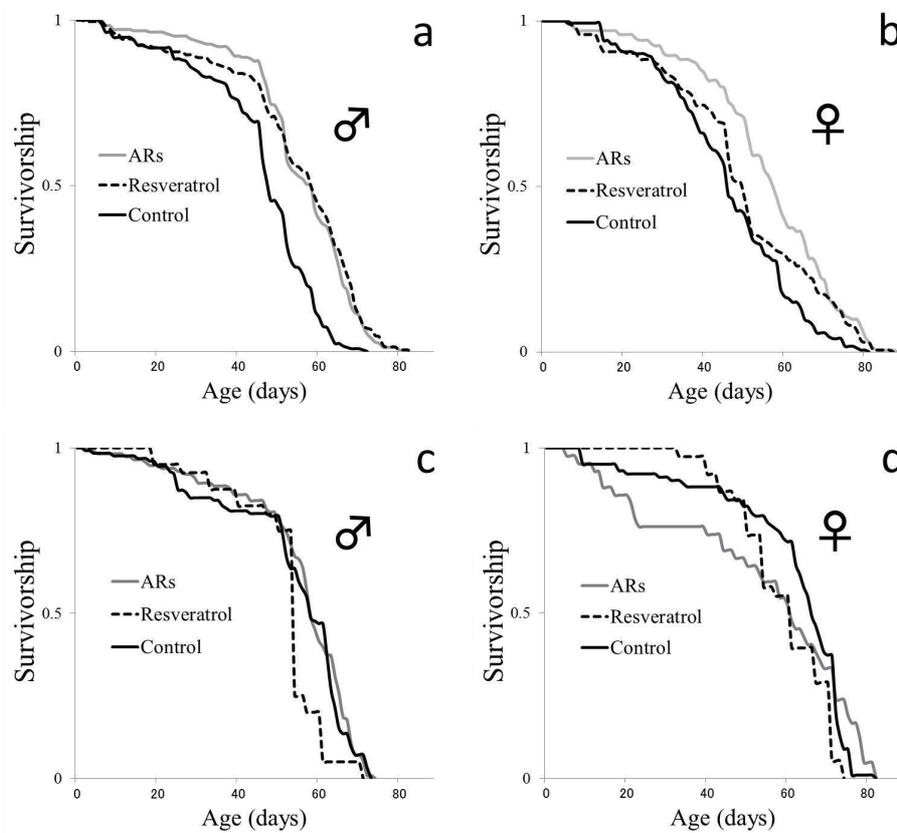


図4 ショウジョウバエに対する寿命延長効果

RLs 及びレスベラトロールを混餌飼料として与えた、野生株 ( $w^{1118}$ ) 株のオス (a) およびメス (b), および Sir2 遺伝子欠損株 ( $Sir2^{17}/Sir2^{KG00871}$ ) のオス (c) およびメス (d) のそれぞれの生存曲線を示す。

れる。

RLs およびレスベラトロール添加により、ヒト単球細胞株 THP-1 において TSA 添加条件下でアセチル化ヒストンの割合を減少させることが確認された。他種の脱アセチル化酵素とは異なり、サーチュインは脱アセチル化酵素阻害剤である TSA に対し非感受性である。このことから RLs による哺乳動物細胞内での脱アセチル活性はサーチュイン依存的であることが確認された。

2010 年、レスベラトロールによる SIRT1 酵素活性促進効果は使用したペプチド基質に蛍光物質が結合しているために相互作用することで作用していることが報告された<sup>15)</sup>。この報告の後、レスベラトロールによる SIRT1 活性化の直接的な作用について、新たな解釈がなされた。基質に結合させた蛍光物質は、それを疎水性アミノ酸で置換すれば、蛍光物質自体が活性化に必要ではないことが確認された<sup>28)</sup>。PGC-1 $\alpha$  などの天然型ペプチド基質は、インビトロでのレスベラトロールによる SIRT1 活性促進効果を示されており<sup>16)</sup>、PGC-1 $\alpha$  は、アセチル化リシンに対して

+ 1 位置にアラニン残基を含み、元のアッセイでは蛍光体と同じ位置にある<sup>10,13</sup>)。これらの結果は、SIRT1 活性化を媒介する天然の基質に構造的および位置的条件が存在することが示された。我々が実験に使用した基質は、アセチル化リジンの C 端側 + 1 位がロイシン残基になっている。RLs は CycLex アッセイ法と HPLC 法どちらも同じ程度に SIRT1 酵素活性を促進したが、レスベラトロールにはこの関係が当てはまらなかった。我々の実験では、レスベラトロールと同 SRT1720 は、CycLex アッセイ法、HPLC アッセイ法どちらの方法においても SIRT1 の脱アセチル化酵素活性を促進しなかった。ハッパードらの報告によれば SRT1720 は、レスベラトロールと同様基質ペプチドのアセチル化リジンの C 端側 + 1 位アミノ酸がチロシン残基である場合には SIRT1 活性を促進するとされている。

レスベラトロールは直接的に SIRT1 の脱アセチル化活性を誘導しなかったが、レスベラトロールは生存率を低下させることなく動物の寿命を延ばすと報告<sup>24,29</sup>) されており、ショウジョウバエを用いた我々の実験においてもそれは確認されている。カロリー制限は、様々な動物モデルで寿命を延ばすことが示されているが、この現象の根底にあるメカニズムはまだ明らかにされていない。細胞増殖培地中のグルコース濃度を低下させること (Glucose Restriction ; GR) により、カロリー制限に類似した *in vitro* 評価法が Ly らにより開発された<sup>25</sup>)。この評価法において、ヒト胎児肺線維芽細胞の GR は、SIRT1 の遺伝子発現レベルを増加させた。我々は、この方法に準じて THP-1 および HepG2 細胞における GR が SIRT1 の遺伝子発現レベルに影響するかどうかを検討した。両細胞における GR は、正常なグルコース濃度制御と比較して SIRT1 の遺伝子発現レベルを増加させた。本研究では、レスベラトロールは、ヒト単球細胞株 THP-1 およびヒト肝臓癌細胞株 HepG2 における SIRT1 mRNA の発現レベルを有意に増加させたが、RLs は SIRT1 mRNA の発現レベルに影響を与えなかった。これらの結果から RLs は SIRT1 mRNA 発現を変化させることなくヒストン脱アセチル化を促進することが示唆された。

RLs はショウジョウバエ寿命を Sir2 依存的に延長させるが、この作用はカロリー制限に関連する経路とは異なる別の経路を介して機能しているのかもしれない。サーチュインの遺伝子発現誘導はショウジョウバエの寿命を延ばすと報告されている<sup>30</sup>)。しかしながら、寿命延長効果は性差や遺伝的背景に影響される<sup>31</sup>) ので、報告されているサーチュインの遺伝子発現誘導が老化に及ぼす影響を詳細に調べたところ、ショウジョウバエの遺伝的背景の標準化と適切なコントロール下においては、明確な効果が消失していた<sup>32</sup>)。一方、発現誘導システムを用いた Sir2 の誘導発現を用いた場合、ショウジョウバエの寿命は増加が確認された<sup>33</sup>)。このように一方的に Sir2 遺伝子発現を上昇させるだけでは寿命延長が期待できない。RLs は遺伝子発現を誘導しないが、RLs によるサーチュイン酵素活性促進レベルは極端ではなく比較的軽度であるため、ショウジョウバエの寿命が延長されるのかもしれない。

レスベラトロールは全ての基質に対して SIRT1 酵素活性の促進作用を示すわけではないが、遺伝子発現レベルを誘導し、様々な薬効を誘発すると思われる。したがって、RLs とレスベラトロールでは、サーチュイン依存性について違いはないが、実際の作用メカニズムに関しては異

なっていると思われる。

いくつかの疫学研究によれば、小麦やライ麦の全粒粉摂取は癌、心血管疾患、糖尿病および肥満に対して防衛的であることが示されている<sup>34)</sup>。サーチュインの酵素活性は、これらの疾患の重要な調節因子であり、多くの加齢性疾患の発症において主に保護的に機能している<sup>35)</sup>。小麦やライ麦の全粒粉には、健康上の利点が知られている栄養素や植物化学物質が豊富に含まれている<sup>36)</sup>。今回の研究から、RLsはこれらの疾患の機能のために、小麦やライ麦の全粒粉に含まれる成分における中心的役割を果たす可能性がある。オープンラベルのランダム化試験では、精白小麦を含む食物を2週間連続して摂取した後、全粒粉小麦に置き換える方法で、体重に及ぼす影響を12週間にわたり調べた結果、全粒粉摂取は体重の顕著な変化なしに脂肪重量の割合をより大きく減少させていた<sup>37)</sup>。RLsはマウス脂肪細胞である3T3-L1細胞において、トリグリセリドの蓄積を阻害することができ、RLsがトリグリセリド合成を動物個体でも阻害できる可能性があることを示されている<sup>38)</sup>。これらの研究および我々の現在の知見から、RLsはサーチュインに依存して脂質代謝に影響を与える可能性があることを示している。RLsは様々な生物に存在し、その生物学的活性、生理学的役割、および代謝プロセスの調節への関与は僅かしか解明されていない<sup>39)</sup>。全粒穀物摂取とメタボリックシンドロームの間には反比例の関係があることが報告されている<sup>40)</sup>。これらの研究がRLsに関連しているかは明らかではないが、今回の我々の研究結果はそれらにRLsが関与している可能性を示唆している。

地中海ダイエットと呼ばれるギリシアのクレタ島や南イタリアの伝統的な食事法には、主に果物や野菜、マメ科植物、ナッツなどの植物由来食品に加え、小麦屋やライ麦の全粒粉が多く含まれている。この地中海ダイエットは世界規模の疫学調査、臨床試験の結果、栄養学的に最良の食事と呼ばれており、この食事を摂取している地域の平均寿命は他の地域より高いことが確認されている。しかし、これまで地中海ダイエット中のどのような成分が効果を示すのかが有用な知見は得られていなかった。今回の発見は地中海ダイエットの有用性を裏付ける証拠となると思われ、改めてこの食事法が見直される事となるであろう。多くの実験的証拠は、地中海ダイエットがメタボリックシンドロームの発生を減少させることに関して有益であり得るという示唆を支持している<sup>41)</sup>。地中海ダイエットのこれら機能は、RLsの摂取量に依存する可能性が高いと思われる。

本研究成果はScientific Reports誌に報告した。(42)

## 文 献

- 1) S. Greiss & A. Gartner, *Mol. Cells*, **28**, 407 (2009)
- 2) D. B. Lombard *et al.*, *Cell*, **120**, 497 (2005)
- 3) A. Salminen & K. Kaarniranta, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **378**, 6 (2009)
- 4) K. A. Moynihan *et al.*, *Cell Metab.*, **2**, 105 (2005)

- 5) V. J. Starai *et al.*, *Science*, **298**, 2390 (2002)
- 6) F. Liang *et al.*, *Nat. Rev. Endocrinol.*, **5**, 367 (2009)
- 7) J. C. Jiang *et al.*, *FASEB J.*, **14**, 2135 (2000)
- 8) C. Kenyon, *Cell*, **105**, 165 (2001)
- 9) E. J. Masoro, *Exp. Gerontol.*, **35**, 299 (2000)
- 10) A. S. Banks *et al.*, *Cell Metab.*, **8**, 333 (2008)
- 11) J. C. Milne *et al.*, *Nature*, **450**, 712 (2007)
- 12) K. T. Howitz *et al.*, *Nature*, **425**, 191 (2003)
- 13) J. G. Wood *et al.*, *Nature*, **431**, 686 (2004)
- 14) M. T. Borra *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **280**, 17187 (2005)
- 15) M. Pacholec *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **285**, 8340 (2010)
- 16) B. P. Hubbard *et al.*, *Science*, **339**, 1216 (2013)
- 17) A. B. Ross, *J. Agric. Food Chem.*, **60**, 8954 (2012)
- 18) A. B. Ross *et al.*, *Nutr Rev.*, **62**, 81 (2004)
- 19) R. Landberg *et al.*, *J. Nutr.*, **136**, 2760 (2006)
- 20) I. Gryazeva *et al.*, *Cell Mol. Biol. Lett.*, **20**, 24 (2015)
- 21) A. B. Ross *et al.*, *J. Nutr.*, **134**, 506 (2004)
- 22) K. Oishi *et al.*, *J Nutr.*, **145**, 199 (2015)
- 23) M. Lagouge *et al.*, *Cell*, **127**, 1109 (2006)
- 24) S. Costa Cdos *et al.*, *Obes. Surg.*, **21**, 356 (2011)
- 25) Y. Li, & T. O. Tollefsbol, *PLoS One.*, **6**, e17421 (2011)
- 26) W. W. Ja *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 8253 (2007)
- 27) A. Mai *et al.*, *J. Med. Chem.*, **48**, 7789 (2005)
- 28) H. Dai *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **285**, 32695 (2010)
- 29) S. Schuster *et al.*, *PLoS One.*, **9**, e91045 (2014)
- 30) B. Rogina. & S. Helfand, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 15998 (2004)
- 31) C. C. Spencer *et al.*, *Aging Cell*, **2**, 123 (2003)
- 32) C. Burnett *et al.*, *Nature*, **477**, 482-485 (2011)
- 33) J. H. Bauer *et al.*, *Aging (Albany NY)*, **1**, 38 (2009)
- 34) J. Slavin, *Nutr. Res. Rev.*, **17**, 99 (2004)
- 35) C. Sebastian *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **287**, 42444 (2012)
- 36) A. Fardet, *Nutr. Res. Rev.*, **23**, 65 (2010)
- 37) M. Kristensen *et al.*, *J. Nutr.*, **142**, 710 (2012)
- 38) J. Rejman & A. Kozubek, *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 246 (2004)
- 39) A. Kozubek & J. H. Tyman, *Chem. Rev.*, **99**, 1 (1999)
- 40) C. Vetrani *et al.*, *Nutrition*, **32**, 217 (2016)
- 41) E. Garcia-Fernandez *et al.*, *Nutrients*, **6**, 3474 (2014)
- 42) Y. Kayashima *et al.*, *Sci. Rep.*, **7**, 43679 (2017)