

1日2食の高脂肪食摂取がラット骨格筋時計遺伝子に及ぼす影響

玉崎千尋 藤井久雄

キーワード:高脂肪食,食事摂取タイミング,肥満,時計遺伝子

The influence of two meals per day of high-fat diet feeding on clock gene of rat skeletal muscle.

Chihiro Tamazaki and Hisao Fujii

Abstract

【Objective】Excess caloric intake is associated with the development of obesity. A number of recent studies suggest that attenuation of clock gene amplitude by high-fat diet causes obesity. Normalizing to the clock gene amplitude can be considered to contribute for the prevention of obesity. Also endurance training has the effect for prevention of obesity, but influence on the disorder of clock gene by high-fat diet intake is not clear. In the present study, we investigated the effects of high-fat diet intake and endurance training on clock gene in rat skeletal muscle. **【Methods】** Adult male wistar rats (~270g) were used. Animals were randomly divided into three groups: control diet (CON), high-fat diet (HF) and high-fat + training (HF+Tr). The CON animals were received a standard diet. HF and HF+Tr animals were received high-fat diet containing of 62% fat as calories. All animals were feeding two times per day. The rats of each group were provided equal food volume per day for six weeks. HF+Tr animals were exercised on treadmill (90min/day and 5days a week). The mRNA expression of clock gene (Bmal1, Clock and Per2) in skeletal muscle were tested at four points (ZT2, ZT8, ZT14 and ZT20). **【Results and Conclusion】** The body weight of HF was heavy significantly compared with CON and HF+Tr ($p < 0.001$). In skeletal muscle Bmal1 and Per2 gene expressions were not affected by high-fat diet. On the other hand, the amplitude of Clock expression was attenuated in the HF and HF+Tr. In present study, we consider the attenuation of Clock expression in skeletal muscle might be caused by lipid metabolism abnormality. Therefore, high-fat diet intake was suggested to become obesity.

Keywords: High-fat diet, meal timing, obesity, clock gene

I. 諸言

肥満などの脂肪の蓄積はエネルギー摂取量が、エネルギー消費量を上回る事で起こるが、近年の日本人のエネルギー摂取量は減少傾向にある。一方で、国民健康・栄養調査の結果では脂肪エネルギー比率は1975年度の21.4%から、26.4%(平成24年調査)まで上昇しており、食の欧米化による高脂肪食の摂取があげられ、摂取エネルギーの構成変化が生じている。

国民健康・栄養調査の結果から、現代における肥満やメタボリックシンドロームは運動不足によるエネルギー消費量の減少だけでなく、食の欧米化による高脂肪食の摂取が関連することが示唆された。また、肥後ら(2004)が行ったメタボリックシンドローム患者を対象とした栄養摂取状況調査では、メタボリックシンドローム患者は脂肪摂取量が多く、脂肪エネルギー比率が適正比率を上回っていたとの報告がある。現代社会における肥満はエネルギー摂取量の過多ではなく、摂取エネルギーの構成が関連することが示唆された。

高脂肪食摂取の影響は体重増加、インスリン抵抗性を発生させるだけでなく、体温や摂食行動、睡眠覚醒サイクル、エネルギー代謝などの生理学的現象をつかさどる時計遺伝子の発現に影響を与えるとの報告が Xiaoyan Wang et al.(2013), Rita Rinankoski- Tuikka et al.(2012)及び Kosaka A et al.(2007)や数々の先行研究によって示されている。

高脂肪食が時計遺伝子に与える影響は、その摂取タイミングや摂取量に大きく左右される。Yanagisawa et al.(2006)はマウスに対して8週間高脂肪食を自由摂取させたところ、高脂肪食摂取群でその摂取量が有意に高値を示した。また高脂肪食群の体重が有意に増加したが、肝臓および内臓脂肪組織の時計遺伝子発現に対しての影響は僅

かで、メタボリックシンドローム発症に関する時計遺伝子の役割について研究を進めていく必要性を上げている。摂取タイミングについて着目すると、Megumi Hatori al.(2012)は高脂肪食を暗期のみ摂取させる群と自由摂取群に分けて17週間飼育した。暗期のみ摂取群と自由摂取群で同量のエネルギー量(Kcal)を摂取させても自由摂取群の方が過体重を示し、肝臓においては *Bmal1* および *Per2* の位相が減弱した。高脂肪食を摂取してもマウスの活動期である暗期に摂取させた場合、自由摂取群と比較して体重の増加は抑制され、時計遺伝子の振幅は保たれていた。この事から、肥満や肥満に関連する代謝異常の予防に対して食事時間の制限が有効になる可能性を示唆している。また、Jane Reznick et al.(2013)はラットが非活動期になる明期に高脂肪食を摂取させ時計遺伝子、ホルモン濃度などの観察を行うだけでなく、グルコース利用や脂質酸化といったエネルギー消費に重要な骨格筋を解析対象とし、組織特異性についても検証した。その結果、肝臓においては時計遺伝子 *Bmal1* の振幅の減弱や位相のずれを生じたが、骨格筋に対しては見られなかった。このことから、食事による影響は組織によって異なることを報告している。また、生体で20-30%のエネルギーを利用している骨格筋での時計遺伝子の混乱は脂肪蓄積の増加に関連する可能性があることをあげている。Yuta Fuse et al.(2012)はマウスに対して同一エネルギー量の高脂肪食を暗期(活動期)のみの摂取(1食/日)群、暗期と明期で摂取させる2食/日(暗期:明期=3:1)群、自由摂取群の3群に分け8週間飼育を行った。その結果、2食/日群の体重が他の2群と比較して有意に低値を示した。

これらの先行研究より、高脂肪食摂取により時計遺伝子発現リズムの振幅が減弱す

るなどの乱れが、肥満の一因になっていることが報告された。しかし、その原因は食事の摂取タイミングや、高脂肪食摂取によるエネルギーの過剰摂取の影響があり、高脂肪食のみの影響については検証の必要性があげられる。

一方で、肥満および、メタボリックシンドロームの改善には、食事療法だけでなく運動療法も重要である。また、肥満、メタボリックシンドロームの予防・改善に有効な持久性トレーニングは、体脂肪量の減少、それによる除脂肪体重の割合の増加する。その結果として身体組成の改善、呼吸循環系や骨格筋、細胞内エネルギー代謝能の亢進に繋がる。

また、運動がもたらす効果として上記以外に時計遺伝子に与える影響についても検証されている。運動が時計遺伝子に与える影響として、Gretchen et al. (2012)は一日2時間の運動を行ったところ定時的に運動を行うことで、末梢組織の分子が反応しその身体活動刺激が全身の概日時計同調させることを示唆し、運動が時計遺伝子に与える影響について報告した。その他に T. L. Leise et al. (2013) 高齢マウスにランニングホイールで自発的に運動をさせたところ加齢による概日リズムの変化を軽減させるという報告もある。時計遺伝子の異常に対する運動の効果は上記により明らかではあるが、それが定時的かどうか、運動を取り入れるタイミングについてはまだ明らかではない。

II. 研究の目的

本実験では食事から得るエネルギーの構成に着目し、高脂肪食がラット身体及び骨格筋時計遺伝子に与える影響について検証する。そのため、時計遺伝子の発現リズムに影響を与える摂食リズムの影響を除くため、朝夕1日2食の給餌とした。

また、高脂肪食摂取の様な好ましくない食生活に対して行う持久性トレーニングがラット身体及びラット骨格筋時計遺伝子に与える影響についても検証する。

これらを検証することで、現代社会における肥満およびメタボリックシンドロームの予防・改善のための食事および運動処方に寄与することを目的とする。

III. 方法

1. 被験動物と試験デザイン

本実験では8週齢で平均体重が約270gのWistar系雄ラット(日本エスエルシー株式会社)60匹を用いた。室温は25℃、湿度50%、10:00(ZT0)から22:00(ZT12)を暗期とし、22:00から10:00を明期としたラットは1)コントロール群(CON群:n=20)、2)高脂肪食摂取群(HF群:n=20)、3)高脂肪食摂取+持久性トレーニング群(HF+Tr群:n=20)の3群に平均体重が等しくなるように分け飼育を行った。飼料はCON群に対してAIN93G(オリエンタル酵母工業)を摂取させ、HF群及びHF+Tr群には脂肪エネルギー比率60%の高脂肪食(HFD60:オリエンタル酵母工業)を与えた。本実験でのラットへの給仕はそれぞれの飼料をZT0-ZT2(明期摂取)、ZT12-ZT14(暗期摂取)で自由摂取させる1日2食のmeal-fed法を用いた。また、CON群の飼料の残量からエネルギー摂取量(Kcal)を求め、HF群とHF+Tr群のエネルギー摂取量が等しくなるようにpair-fed法を行った。飲料は水道水を用い、自由摂取とした。なお、体重は2日に1回の頻度で測定した。

HF+Tr群に対するトレーニング強度は16m/minから開始し徐々に負荷を上げ21m/minまで負荷を上げるシャトルラン方式を用いた。なお、実験における最終的な運動強度は木下幸文ら(2001)とSuzuki J et al. (1997)を参考にミトコンドリア酸化

酵素活性が有意に増加する 60%最大酸素摂取量(20ml/min)を目安に行った。トレーニング強度は 6 週間の持久トレーニング終了後、解剖時での運動の一過性の影響を除くため 48 時間の安静にした後に屠殺した。

屠殺は暗期 2 ポイント (ZT14, ZT20)、明期 2 ポイント (ZT2, ZT8) の計 4 ポイントで行った。解剖は体重 100g あたり 20mg のペントバルビタールナトリウム水溶液の腹腔内注射による完全麻酔下で一匹ずつ行った。解剖は開腹後に下大静脈から採血し、心臓を摘出し絶命させた。その後腓腹筋を摘出し、その都度直ちに液体窒素を用いてフリーズクランプし、分析を行うまで -80°C で保存した。凍結させた腓腹筋は液体窒素で冷やしたステンレス製鉢の中で粉碎し、そこから腱を除いたものから約 50mg を採取した。内臓脂肪に関しては、副睾丸脂肪、腹膜後方脂肪、及び腸間膜脂肪を摘出し、電子天秤で計量した物の合計量を、腹腔内脂肪量とした。

なお、ラットの飼育・維持、実験場の取り扱いについては、仙台大学動物実験倫理委員会の承認を得て行われた。

2. Total RNA抽出とReal-Time PCR

Total RNA は ISOGEN (株式会社ニッポンジーン、東京) を用いて抽出した。腓腹筋から得られた Total RNA のうち 2 μ g を High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) を用いて逆転写を行い、cDNA を合成した。

遺伝子発現は Applied Biosystems StepOne™ Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) を用いて行った。実験においては、cDNA10ng/ μ l とし、試薬には 2XSYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) を用いた。解

析対象の遺伝子は時間遺伝子 *Bmall*, *Clock* と *Per2* とした。異なるサンプル間の DNA 量変動をコントロールするため、真核細胞翻訳伸長因子 1 α 1 (eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1:EEF1A1) を内部標準として用いた。*EEF1A1* の遺伝子発現から解析対象遺伝子発現を相対的に標準化した。得られたデータは Comparative Ct ($\Delta \Delta$ Ct) 法を用いて解析した。

3. 統計処理

実験により得られたデータは平均値 \pm 標準偏差で表わした。腹腔内脂肪量の比較では対応のない一元配置分散分析を行い、その後の検定には Tukey の方法を用いた。遺伝子発現に関しては、時間を要因とした対応のない二元配置分散分析を行い、有意な交互作用が認められた場合には Bonferroni の方法による多重比較検定を行った。統計的有意水準は危険率 5% 未満とした。

IV. 結果

1. 体重、内臓脂肪及び累積摂取エネルギー量

実験終了時の体重は二元配置分散分析の結果、有意な交互作用が認められた各要因の単純主効果を検討した。飼育終了時の体重は、HF 群が CON 群及び HF+Tr 群と比較して有意に高値を示した ($p < 0.001$)。内臓脂肪量に関しては HF 群の副睾丸脂肪量、腎周囲脂肪量、腸間膜脂肪量及び内臓脂肪量はそれぞれ他の 2 群と比べて有意に高値を示した ($p < 0.001$)。

一方、実験中の累積摂取エネルギー量を示した。累積摂取エネルギー量には 3 群間に有意差は見られなかった。

2. 骨格筋における時計遺伝子発現

図 1 に腓腹筋における *Bmall* の遺伝子発現を示した。二元配置分散分析の結果、

各層殺ポイントでの群間差は示されなかった。そのため一元配置分散分析を行い各群の振幅について検証を行った。その結果 CON 群では ZT14 と比較して ZT20 及び ZT2 において有意に高値を示した ($p<0,001$)。HF 群及び、HF+Tr 群では ZT14 と比較して ZT2 が有意に高値を示した ($p<0,001$)。

図2に腓腹筋における *Clock* の遺伝子発現を示した。二元配置分散分析の結果、*Bmal1* 同様に各層殺ポイントでの群間差は無かったため、一元配置分散分析により振幅について検証を行った。CON 群においては ZT14 と比較して ZT2 が有意に高値を示した ($p<0,05$)。

図3に腓腹筋における *Per2* の遺伝子発現を示した。CON 群では ZT14 と比較して ZT20 及び ZT2 において有意に低値を示した ($p<0,001$)。HF 群では ZT14 と比較して ZT2 ($p<0,001$) 及び ZT8 ($p<0,01$) において

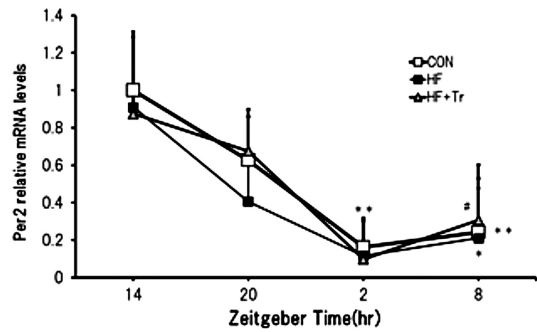


図3 3群の時計遺伝子Per2の相対発現量
CON: CON群(通常食摂取群), HF: HF群(高脂肪食摂取群), HF+Tr: HF+Tr群(高脂肪食摂取+持久性トレーニング群)
#: $p<0,05$... HF+Tr ZT14 vs HF+Tr ZT8, *: $p<0,01$... HF ZT14 vs HF ZT8, **: $p<0,001$... CON ZT14 vs CON ZT2, ZT8

有意に低値を示した。HF+Tr 群においては ZT14 と比較して ZT2 ($p<0,001$)、ZT8 ($p<0,05$) が有意に低値を示した。

V. 考察

本実験では定時的な高脂肪食の摂取がラットの進退に与える影響について検証を行うと共に、高脂肪食摂取時の持久性トレーニングが与える影響についても検証を行った。この結果、同一のエネルギー量を摂取させても HF 群は CON 群と比較して体重が有意に高値を示した。このことから肥満は、摂取エネルギー量ではなく、エネルギー構成が影響となることが示された。一方で、暗期(活動期)のみの摂取や、本試験とエネルギー配分は異なるが1日2食制で給餌を行った先行研究とは異なる結果となった。

HF+Tr 群に関しては、HF 群と同量のエネルギーを摂取させたが、体重は有意に低値を示したため、持久性トレーニングの効果が示唆された。持久性トレーニングが与えた影響について検証するために、脂質代謝に重要な骨格筋について分析を行った。腓腹筋の選定理由として、*Clock* 変異マウスの遺伝子発現を解析したところ、John J et al, (2007) は腓腹筋において筋肉クレアチンキナーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、ミトコンドリア ATP シンターゼなどの重要な

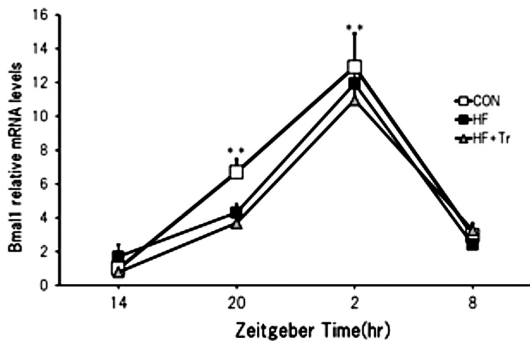


図1 3群の時計遺伝子Bmal1の相対発現量
CON: CON群(通常食摂取群), HF: HF群(高脂肪食摂取群), HF+Tr: HF+Tr群(高脂肪食摂取+持久性トレーニング群) **: $p<0,001$... CON ZT14 vs CON ZT20, ZT2, HF ZT14 vs HF ZT2 HF+Tr ZT14 vs HF+Tr ZT2

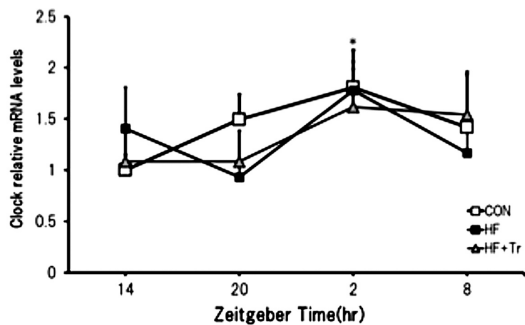


図2 3群の時計遺伝子Clockの相対発現量
CON: CON群(通常食摂取群), HF: HF群(高脂肪食摂取群), HF+Tr: HF+Tr群(高脂肪食摂取+持久性トレーニング群) #: $p<0,05$... CON ZT14 vs ZT2

代謝遺伝子の発現と関連することを報告しており、腓腹筋の時計遺伝子を分析することで、その下流にある転写の調節、タンパク質合成および分解、脂質代謝を推測できると考えたからである。

本実験の解析対象である時計遺伝子は、正の制御因子 (CLOCK+BMAL1) と、負の制御因子 (PER と CRY) が存在する。これらの遺伝子が互いに作用し合うことで発生する1日の遺伝子発現のリズムが体温や摂食行動、睡眠覚醒サイクル、エネルギー代謝などの生理学的現象の日内変動を作る。このリズムが乱れることは肥満やメタボリックシンドロームをきたす一因となっている。そしてこのリズムを乱す要因として高脂肪食の摂取が報告されている。

本実験において *Bmall* 及び *Per2* においては3群とも時間経過において有意差を認め、これらに関しては定時的な高脂肪食の給餌は時計遺伝子のリズム振幅に影響を与えていないことが示された。その一方で、非活動期にピークを迎える夜型時計遺伝子の *Clock* が HF 群及び HF+Tr 群で時間経過に対する有意差が認められず *Clock* において振幅の減弱が見られた。時計遺伝子の働きとして、Turek FW et al.(2005)、John J et al.(2007) 及び Staels, B(2006) は *Bmall* は脂肪組織の分化、脂肪酸・コレステロール合成にかかわる酵素群の遺伝子発現に関与している。そして、*Bmall* の過剰発現はそれらの増加を示すことを報告している。もう一つの正の制御因子である *Clock* に関して、Oishi K et al.(2006) は時計遺伝子 *Clock* を変異させたマウスと、食欲抑制ホルモンのレプチン遺伝子を欠損させた obesity-/マウスは脂質代謝機能に影響を与えることを報告した。また Turek F. et al.(2005) は *Clock* 変異マウスに対して高脂肪食を摂取させたところ昼夜なく摂取を続けインスリン分泌不全、肥満、メタボリックシンドロ-

ムを呈した。これらの結果は、概日リズム制御を司る時計遺伝子の機能障害が代謝性疾患の一因になることを強く示唆している。この2つの時計遺伝子の結果から、脂肪酸およびコレステロール合成の促進が肥満の原因ではなく、骨格筋 *Clock* の機能異常がもたらす脂質の代謝障害が影響していることが推測された。

VI. まとめ

朝夕の1日2食の高脂肪食摂取は、骨格筋における時計遺伝子 *Clock* の振幅が減弱した。この事から骨格筋において脂質代謝異常を惹起し、その結果肥満を示す事が推察された。

現代の欧米化した食生活は、骨格筋において脂質代謝を低下させる事が示唆され、また利便化した生活による運動不足も重なる事でより肥満になりやすい環境にあることが推測された。本実験の結果から、肥満の発生がエネルギーの過剰摂取だけではなく、エネルギー構成もその要因に当たることが示された。このことは、栄養指導において脂肪エネルギー比率についての知識を普及させる事が必要になる事を示す結果となった。

一方で、本実験における高脂肪食摂取時の持久性トレーニングは早朝・朝食前として設定した結果、その肥満抑制効果は見られたが、時計遺伝子のみではその機序を明らかにすることができず、今後の課題として更なる検討が必要となった。

VII. 参考文献

- Gretchen Wolff, Karyn A. Esser(2012) Scheduled Exercise Phase Shifts the Circadian Clock in Skeletal Muscle. *Med Sci Sports Exerc*,44(9), 1663-1670.
- Hadas Sherman, Yoni Genzer, Rotem Cohen, et al(2012) Timed high-fat diet resets cir-

- cadian metabolism and prevents obesity. *FASEB Journal*, vol.26 no. 8,3493-3502.
- 肥後綾子,藤井香,武田純枝ら(2004)メタボリック・シンドローム患者の栄養摂取状況と,摂取脂肪酸構成,血清脂肪酸組成の関係. *慶應保健研究*,22(1),105-111.
- 平成 24 年国民健康・栄養調査の概要,厚生労働省,2012, <http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/eiyou/h24-houkoku.html> (2015 年 2 月 20 日)
- Jane Reznick, Elaine Preston, Donna L. Wilks, et al(2013)Altered feeding differentially regulates circadian rhythms and energy metabolism in liver and muscle of rats. *Biochimica et Biophysica Acta* ,1832 228-238.
- John J. McCarthy, Jessica L. Andrews, Erin L. et al(2007)Identification of the circadian transcriptome in adult mouse skeletal muscle. *Physiol Genomics*, 31,86-95.
- Kohsaka A, Laposky AD, Ramsey KM et al(2007)High-Fat Diet Disrupts Behavioral and Molecular Circadian Rhythms in Mice. *Cell Metabolism*, 6(5), 414-421.
- Megumi Hatori, Christopher Vollmers, et al(2012) Time-Restricted Feeding without Reducing Caloric Intake Prevents Metabolic Diseases in Mice Fed a High-Fat Diet. *Cell Metabolism*, 15, 848-860.
- Oishi K, Atsumi G, Sugiyama S, (2006) Disrupted fat absorption attenuates obesity induced by a high-fat diet in Clock mutant mice. *FEBS*, 580 (1) , 127-130.
- Rita Rinnankoski-Tuikka, Mika Silvennoinen, Sira Torvinen, et al (2012) Effects of high-fat diet and physical activity on pyruvate dehydrogenase kinase-4 in mouse skeletal muscle. *Nutrition & Metabolism*, 9:53
- Staels,B(2006)When the Clock stops ticking metabolic syndrome explodes. *Nat. Med*12,54-55.
- T. L. Leise, M. E. Harrington, corresponding author P. C. Molyneux, I. Song et al(2013)Voluntary exercise can strengthen the circadian system in aged mice. *g h AGE*, 35, 2137-2152.
- Turek FW,Joshu C,Kohsaka A,Lin E,Ivanova G, McDearmon E,et al (2005) Obesity and Metabolic Syndrome in Circadian Clock Mutant Mice, *Science*. 308, 1043-1045.
- Xiaoyan Wang, Jie xue, Juan Yang, Meilin Xie (2013)Timed High-fat diet in the evening affects the hepatic circadian clock and PPAR α -mediated lipogenic gene expressions in mice. *Genes Nutr*, 8, 457-463.
- Yanagisawa H, Ando H, Hayashi Y, Obi Y (2006) High-fat feeding exerts minimal effects on rhythmic mRNA expression of clock genes in mouse peripheral tissues. *Chronobiology International*, 23 (5) , 905-914.
- Yuta Fuse,Akiko Hirao,Hiroaki Kuroda,et al(2012)Differential roles of breakfast only(one meal per day) and a bigger breakfast with a small dinner(to meals per day) in mice fed a high-fat diet with regard to induced obesity and lipid metabolism. *Journal of Circadian Rhythms*, 10:4.

