

卵タンパク質による体内時計同調を利用した朝食の提案と メタボリックシンドローム予防

名古屋大学大学院生命農学研究科栄養生化学・准教授 小田 裕昭

■ 緒 言

平成 28 年国民健康・栄養調査によると、日本人の 5 分の 1 は糖尿病が疑われている。つまり、メタボリックシンドロームの人が多くなっている。しかし、近年日本人の摂取エネルギーは若干減っており、脂質の摂取の増加や運動の減少が問題であると考えられているが、健康志向で運動する人がそれほど少ない訳ではない。それでは、他にどのような因子が問題であろうか。近年、朝食欠食など食生活の乱れが大きな影響を持つだろうと考えられるようになってきた。

古くから「規則正しい食生活は健康の秘訣だ」といわれ、私たちは経験的に食事のタイミングの重要性を認識していた。日本の古い書物でも、朝食の重要性は指摘されてきている。摂取タイミングの乱れは、肥満やメタボリックシンドローム、生活習慣病、2 型糖尿病へ結びつくことも分かってきた。職業柄時間と無関係な生活をする看護師、フライトアテンダント、シフトワーカーには肥満やメタボリックシンドローム、さらにはガンが多いことが分かっている¹⁾。グローバル化が進んだ現代社会では規則正しい生活をするのはむしろ困難になり、仕方なく不規則な生活を送っている人が多い。これまで体内時計という光によって制御される睡眠覚醒のリズムが注目されてきたが、メタボリックシンドロームなどの代謝疾患の場合は摂食のタイミングが重要であることがわかってきた。何を食べるかよりも食事のタイミングを正常化するだけで健康になれる可能性を示している。

日本をはじめ先進国では、若年層で朝食を日常的に食べない朝食欠食者が約 30% になる。観察研究では、朝食には肥満や疾患を防ぎ、成績や集中力が上がるなど、朝食の意義が報告されてきた。一方、朝食について懐疑的な意見や、むしろ否定的な意見も多いことも事実である。これは、朝食について介入試験や動物実験が少なく、科学的根拠が不足しているからである。私たちは、朝食欠食モデル動物プロトコルを考案して、実験を行った²⁾。同じ食事を同じ量摂取しても、4 時間遅らせて摂食するだけで体重増加がもたらされることがわかった。そして、それは体温の概日リズムの異常と肝臓の脂質代謝遺伝子、時計遺伝子のズレがもたらすものであることがわかった。つまり、食事の中でも、絶食後の最初の食事である朝食には、体内時計をリセットする重要な役割があると考えられている。しかし、どのような朝食を食べたら良いのかということは分かっていない。そこで本研究では体内時計を同調させる作用があると考えられているタンパク質に注目して、その中でも卵白タンパク質にその作用が強いと考え実験を行った。卵白タンパク質が体内時計を同調させることを実験的に示し、卵を含む朝食が健康作りになることを提案することによって健康的な生活に資することを目指す。

■ 方 法

本研究では、卵白タンパク質が直接的に肝臓時計を同調させる作用があることを示すため実験を行った。そのためゾンデにより卵白タンパク質を胃内投与し、肝臓ならびに脂肪組織、筋肉の生物時計の同調作用を検討することとした。まず最初にゾンデによるタンパク質を投与することの予備実験を行った。ラットの 1 日の摂取量を 3 等分し、それぞれ朝食、昼食、夕食と想定して、朝食分のタンパク質相当量をゾンデにて投与することを考えた。まず、卵白を溶かす溶媒として、蒸留水、100mM リン酸緩衝液の異なる pH 溶液 (pH6 ~ pH8) を用いた。今回は卵白タンパク質が容易に水、リン酸緩衝液いずれにも溶けたため、蒸留水に溶かすことにした。ゾンデによる投与液量は、100g 体重あたり 1mL が標準とされている³⁾。しかし、これでは必要なタンパク質量を投与できないことが明らかであったため、約 5mL 未満の量を投与することにした。この量はほぼ最大許容量である。この投与液量で、ラットにストレスを与えずに、またこぼさず全量を与える練習を行った。これは、過去の経験でもゾンデ投与により、死亡する個体も少なからずあったからである。そのため、まずは蒸留水のみで投与練習を行った。非麻酔下、イソフルラン麻酔下でゾンデによる投与を行った。投与に時間がかかったり、ラットが暴れたりすると、翌日体重が増加しないことがわかった。しかし、ゾンデによる胃内投与がスムーズに短時間でできた場合、翌日の体重などに影響を与えないことがわかった。このストレスの制御のため、軽い麻酔が必要だろうと考えた。イソフルラン麻酔下では、暴

れないものの動物に力が入っていないためゾンデ手技の感覚は異なり、少しでも麻酔が深くなりすぎると体重増加が抑えられることも分かり、ストレスなく約 5mL を短時間で投与できるようにトレーニングした。

5 週齢の Wistar 系雄ラットを 48 匹用いて、午前 8 時から 20 時まで明期の動物室で実験を行った。時刻は、明期の開始時を 0 時とする ZT 表記により示す。20% カゼインを含む標準食を自由摂食させ、水も自由飲水させた。1 週間飼育後、ZT12 から 24 時間絶食を行った。翌日 ZT12 にゾンデにて卵白タンパク質を投与した。対照群には、水を投与した。その後も絶食をつづけ、ZT14、ZT18、ZT2、ZT6、ZT10、ZT14 に各群 4 匹ずつ断頭によりと殺し、血液、肝臓、精巣上体脂肪組織、腓腹筋を採取した。ZT6 では盲腸内容物を採取した。

血清を分離し、中性脂肪、コレステロール、遊離脂肪酸、血糖値、コルチコステロンを測定した。肝臓から全 RNA を抽出し、リアルタイム PCR 法にて mRNA 量の定量を行った。盲腸内容物の腸内細菌叢の解析を行った。

■ 結 果

卵白タンパク質投与の 24 時間前から、また投与後も絶食していたため、体重は徐々に低下していった。しかし、卵白タンパク質投与後の体重減少量は、対照群に比べ小さかった。卵白タンパク質溶液を投与しているため、はじめから投与重量が大きい、それ以上のものであった。この体重差は予想していなかった。解剖時に盲腸が大きくなっているのに気づき、盲腸内容物の重量が多いことにより体重減少が抑制されたことがわかった。そのため予定していなかった、腸内細菌叢の解析を急遽行おうと考え、ZT6 に盲腸内容物を採取した。ゾンデによる投与液量が多いとき、速く胃を通過することが知られているため、投与した卵白タンパク質が通常より早く小腸に到達し、盲腸にも早く達して腸内細菌叢に変化をもたらしたと考えられた。

血清コレステロールは、時間とともに低下傾向にあったが、ZT6 以降で卵白タンパク質の方が高値を示した。他の血清の分析項目では、若干差があるものの大きな差は見られなかった。

肝臓の時計遺伝子の発現を検討したところ、投与 2 時間後で *Per1* 遺伝子発現の急性誘導が観察された(図 1)。一方、14 時間後に *Cry1* 遺伝子発現の低下が見られた。他の時計遺伝子において顕著な変化は見られなかった。

卵白タンパク質投与群において体重減少が抑えられ、それが主に盲腸内容物の増加によるものであることがわかったので、盲腸の腸内細菌叢を解析した。対照群では *Firmicutes* 門が主要な腸内細菌であった。ZT6 の時点で 42 時間絶食状態ではあるが、*Firmicutes* 門が主要な門である点は、普通食を摂取した非絶食ラットと同様であった。ところが、卵白タンパク質を与えた群では、*Bacteroidetes* 門が主要な門となっていた(図 2)。

■ 考 察

食事が肝臓をはじめとする消化器系など末梢組織の同調因子として働くことが分かってきている。どうやって食事が末梢の臓器時計を同調させるかについては、様々な可能性が示されている。グルコースなどの栄養素そのものや、体温、食べたものが消化管を刺激して神経系を介したシグナルが末梢時計を同調させる¹⁾。最も重要な因子として、ホルモンなどの液性因子が同調させると考えられており、その中でもインスリンが重要な肝臓の同調因子として働いていることを私たちは見出した⁴⁾。インスリンの応答臓器である、脂肪組織や筋肉にとってもインスリンは重要な同調因子である。

食事のタイミングが同調させるが、食事のどの食品成分が同調作用を有するか必ずしも実験的に証明されていない。グルコースは、培養細胞において直接細胞時計を同調させることが知られている⁵⁾。上で述べたように糖質摂取はインスリンを介した同調も起こしている。一方、食餌から栄養素を除く実験から、糖質だけでなくタンパク質にも同調作用があることが報告されている⁶⁾。インスリンは、血糖値の上昇に応答して分泌されるだけでなくアミノ酸にも応答して分泌されることが知られている。したがって、糖質、タンパク質ともにインスリンを介して同調を引き起こしている可能性がある。しかし、タンパク質のインスリン分泌作用は大きいものではなく、食餌タンパク質自身に同調作用がどの程度あるかについては、十分わかっていない。

食餌タンパク質の量は、筋肉タンパク質の合成量に重要であり、不活動や加齢に伴う筋肉萎縮を抑える上で重要であることが認識されるようになってきた。特に筋肉タンパク質合成量を維持する上において朝食のタンパク質量が低いのではないかと考えが示されるようになった⁷⁾。現代の日本人は、朝食を欠食する若者が多いだけでなく、朝食そのものがアメリカ型の比較的軽い糖質が多いも

のようになってきている。このような背景から、朝食に十分なタンパク質を取ることが健康に必要なという仮説が考えられるようになった。実際に、起床時は比較的長期の絶食後であり、糖新生によって血糖値が維持されている。その原料は主に筋肉タンパク質由来のアミノ酸であると考えられている。したがって、朝食は、グルコースを供給して血糖値を維持するだけでなく、アミノ酸を供給して糖新生をサポートするという役割が考えられる。このような点からも、朝食時の糖質ならびにタンパク質は重要であろうと考えられる。

今回、卵白タンパク質が直接的に肝臓時計遺伝子を同調する作用を有するかを検討する実験を行った。Per1をはじめとする一部の時計遺伝子に変動が見られ、タンパク質に同調作用があると示唆される結果を得た(図1)。しかし、インスリンの場合には、強い同調作用が知られており、食餌タンパク質の同調効果はあったとしてもそれほど大きくないだろうと考えられる。今回はまだインスリン濃度を測定していないが、同調作用の大きさから食餌タンパク質はインスリンを介さない機構で効いている可能性が考えられた。

今回このような実験系を始めて考案して、食餌タンパク質の効果を見ようと試みたが、絶食に伴う体重減少の抑制が見られ、それが盲腸内容物の増加によるものであることがわかった。これは予期せぬものであり、急遽盲腸内容物の腸内細菌叢の解析を行った。対照群も絶食をしているが、その腸内細菌叢は、Firmicutes 門が主要な腸内細菌であった。ところが、卵白タンパク質を投与した方では、Bacteroidetes 門が主要な腸内細菌になるという変化をもたらした(図2)。今回、ゾンデによる投与量が多く、素早く小腸に流れ込んだ可能性が考えられ、盲腸へ流れ込む速度も速かった可能性がある。このような人為的な条件下ではあるが、卵白タンパク質が腸内細菌叢に大きな影響を与えることがわかり、興味深い現象である。これがどのような生理的意味を示すのか現在不明であるが、今後、門以下の分類、例えば属や種など解析をしていくつもりである。

■ 要 約

朝食時の卵白タンパク質の投与が肝臓時計の同調作用を有するか検討したところ、Per1をはじめとする一部の時計遺伝子を変動させたため、同調作用は大きくないものの同調作用を有することを明らかにした。つまり、朝食時の卵の摂取は体内時計の同調作用を有していると考えられた。また、卵白タンパク質投与は、盲腸内容物の重量を増加させ、Bacteroidetes 門の割合を増加させるという変化をもたらすことが明らかとなった。

■ 文 献

- 1) 小田裕昭、孫淑敏、金多恩、時間栄養学からみた糖尿病・メタボリックシンドローム、プラクティス 36, 167-174(2019)
- 2) Shimizu, H. *et al.* Delayed first active-phase meal, a breakfast skipping model, led to increased body weight and shifted the circadian oscillation of the hepatic clock and lipid metabolism-related genes in rats fed a high-fat diet. *PLOS ONE* 13, e0206669(2018)
- 3) Diehl, K-H. *et al.* A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *J. Appl. Toxicol.* 21, 15-23,(2001)
- 4) Yamajuku, D. *et al.* Real-time monitoring in three-dimensional hepatocytes reveals that insulin acts as a synchronizer for liver clock. *Sci. Rep.* 2, 439(2012)
- 5) Hirota, T. *et al.* Glucose down-regulates per1 and per2mRNA levels and induces circadian gene expression in cultured rat-1 fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 277, 44244-44251(2002)
- 6) Hirao, A. *et al.* A balanced diet is necessary for proper entrainment signals of the mouse liver clock. *PLOS ONE* 4, e6909(2009)
- 7) Mamerow, M. M. *et al.* Dietary protein distribution positively influences 24-h muscle protein synthesis in healthy adults. *J. Nutr.* 144, 876-80,(2014)

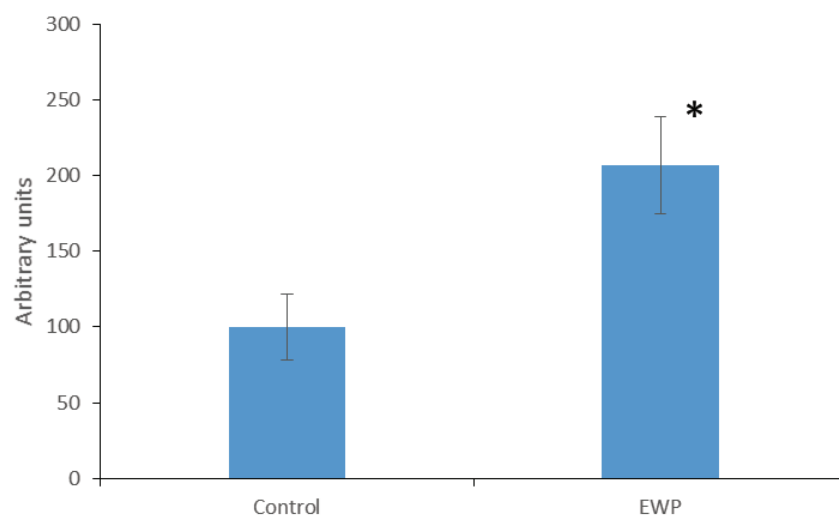


図1 卵白タンパク質の胃内投与による肝臓 Per1 遺伝子発現の急性誘導
ZT12 に卵白タンパク質を胃内投与し、ZT14 の2時間後に肝臓を得た。

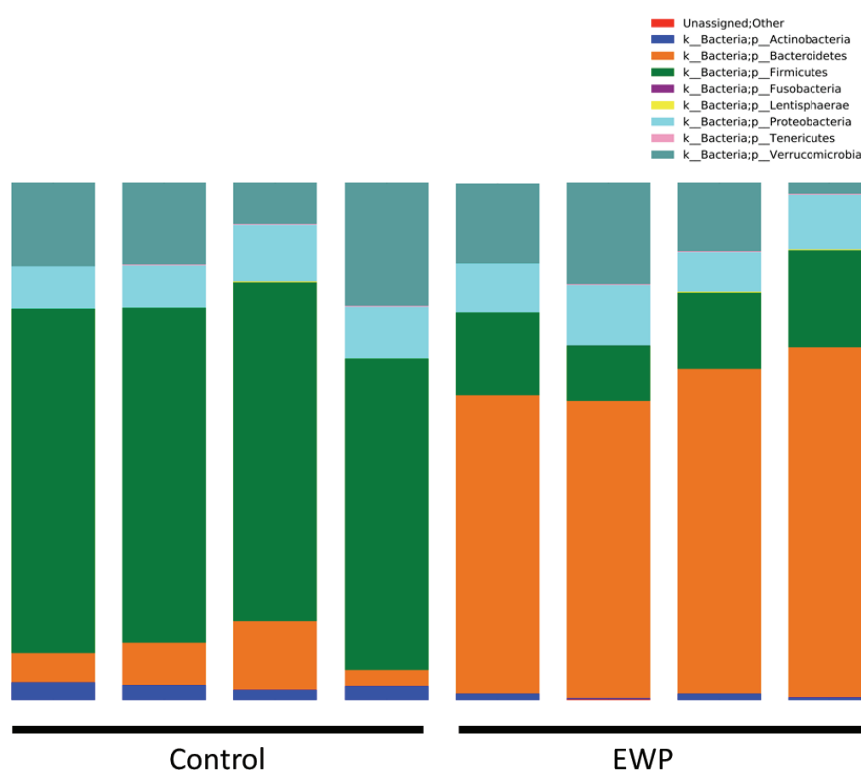


図2 卵白タンパク質投与18時間後の盲腸内細菌叢の変化
卵白タンパク質投与群では、盲腸内容物が多くなり、Bacteroidetes 門の割合が増加してた。
対照群では、主要な菌叢が Firmicutes 門であった。