

「ヒストン脱アセチル化を介して寿命延長作用を  
発揮する食品成分の探索」

山梨学院大学健康栄養学部 名取貴光



## 1. 研究の背景

近年、ヒストン脱アセチル化酵素 (Hdac) の阻害薬がヒストンのアセチル化を介して各種遺伝子の発現を制御していること (エピジェネティックな調節) が明らかとなり、ガンや老化、各種疾患の予防・治療に向けた研究が進められている。また、ブドウに含まれるレスベラトロールが Hdac の一つである長寿遺伝子サーチュイン (Sirt1) の働きを高め、寿命を延長することが報告された。マウスを用いた実験では、高脂肪餌を投与した群は寿命が短縮するが、高脂肪餌と同時にレスベラトロールを投与すると標準餌とほぼ同様の生存率を示すことが示されている(1)。サーチュインは転写因子 (PGC-1 $\alpha$ ) の脱アセチル化を誘導して様々な代謝関連遺伝子の発現を調節し、その結果として寿命を延長することが明らかとなっている (2)。

Hdac 酵素群は、クラス I ~ IV に分類されている。クラス I に属する Hdac 群は NAD<sup>+</sup> 非依存的にヒストンタンパクの脱アセチル化を行う酵素である。酵素活性を阻害すると神経分化や細胞死抑制に関係する遺伝子の発現が惹起される。一方、長寿遺伝子として知られるサーチュインはクラス III に分類される NAD<sup>+</sup> 依存性の Hdac で活性化により転写因子の脱アセチル化を亢進し、代謝関連遺伝子の発現を誘導している。両者は、ヒストンアセチル化に関わる酵素でありながらその制御はまったく異なっている。いずれもアセチル基の有無に関連して遺伝子発現を制御して細胞分化や増殖に関わることが共

通点として挙げられるが、哺乳類におけるサーチュインの寿命延長作用については異論が多く、また飢餓状態で誘導されるという特別な現象であるため、未だ議論が続いている。

レスベラトロールを含めたポリフェノール類には抗酸化活性に由来する老化防止効果のあることが数多く報告されているが、そのメカニズムについては不明な点が多い。一般に、寿命はカロリー制限やインスリン-IGF1 経路、NF- $\kappa$ B 経路、酸化ストレス、テロメア短縮、クロマチン異常など様々な因子により制御されていることが知られている (3)。このような中、Hdac 活性を阻害する物質 (Hdac 阻害剤) が直接的な抗酸化作用とは異なる作用機序で老化防止効果を発揮していることが明らかとなった (4)。Hdac 阻害剤として知られるバルプロ酸や  $\beta$  ヒドロキシ酪酸 (BHB) を投与した線虫において寿命が延長されることが報告されている (5)。ポリフェノール類のいくつかには Hdac 活性を阻害する作用のあることが明らかとなっており、これまでに報告されている老化防止効果が単純な抗酸化作用によるのではなくヒストンアセチル化を介した遺伝子発現調節、すなわち、エピジェネティック調節により発揮されている可能性が考えられる。

## 2. 研究の目的

近年、Hdac 阻害薬がヒストンのアセチル化を介して寿命延長効果を発揮していることが明らかになっている。また、ポリフェノール類など一部の食品成分にも Hdac を阻害する活性のあることが報告されており、寿命延長に関わる遺伝子の発現がエピジェネティックな調節を受けている可能性が考えられる。本研究では、日常的に摂取している食品、すなわち、山梨県内で栽培されている農産物を主な対象として、ヒストンアセチル化を介して寿命延長効果を発揮する分子を見つ

け出し、次いで、生体内におけるその作用メカニズムの解明を行うことを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 蛍光ペプチドアッセイを用いたHdac活性阻害食品成分の探索

食品に含まれる生理活性物質は種類も多く構造も複雑であり、単離・精製には長い時間と労力が必要である。そこで本研究では人工の蛍光ペプチドを用いたアッセイ法を利用して簡便かつ迅速に食品由来Hdac阻害活性分子のスクリーニングを試みた。本方法は、アセチル化リジンを含む蛍光合成基質ペプチドとリシルエンドペプチダーゼを用いる蛍光ペプチドアッセイ系で、基質ペプチドのアセチル化リジン残基が脱アセチル化されるとリシルエンドペプチダーゼによる切断がおき、蛍光標識が消光基と離れて蛍光を発する原理に基づく。

山梨県産果樹類等の試料を凍結乾燥した後に粉碎し、メタノールで抽出を行った。ヘキサン、ジクロロメタン、酢酸エチル、ブタノール等で分画し、得られた画分のHdac活性に対する影響について、蛍光ペプチドアッセイ系を用いて評価を行った。Hdac活性を阻害しうる分子を含む画分の探索を行った。なお、標準品として入手可能なポリフェノール類に関しても同様にHdac阻害活性の有無について検討を行った。

#### (2) 線虫を用いた寿命延長効果分子の同定

線虫は、ライフサイクルが約30日と短く、わずか1ヶ月程度で寿命解析が可能である。試料無添加の餌を与えたコントロール群を対照とし、試料(試料より調製した画分または標準品)を混合した餌を与えた群の累積生存率を算出し、 Kaplan-Meier法を用いて生存分析を行った。同時に細胞体の異常や生殖能など安全性の確認を行い、寿命延長効果

を発揮する活性分子を含む画分を選定した。

#### (3) 線虫を用いた寿命延長効果の分子メカニズムの解析

活性分子を含んだ画分の投与群に対して、老化マーカー遺伝子の発現解析(リアルタイムPCR及び蛍光観察)を行い、Hdacにより制御される寿命延長関連遺伝子の解析を行った。また、関連遺伝子とそのシグナル系の変異体を用いて寿命延長効果への関与を確認した。更に、GFPを遺伝子下流に組み込んだトランスジェニック線虫を入手して活性分子を含む画分添加による遺伝子発現の局在と経時的変化を確認した。

### 4. 研究の成果

#### (1) 山梨県産果樹由来成分のHdac活性に対する影響

山梨県の特産品であるモモおよびブドウに豊富に含まれるアントシアニンのHdac活性への影響について検討を行った。蛍光ペプチドアッセイ系にアントシアニンおよびアントシアニンを添加し、一定時間反応させた後、蛍光強度を測定してHdac活性の阻害の有無について評価を行った。その結果、シアニジン、デルフィニジン、ペオニジン、ペチュニジン、シアニジン-3-グルコシド、ペラルゴニジン-3-グルコシドに有意なHdac阻害活性のあることが確認された(Fig.1)。

我々はモモやブドウと並び山梨県の特産品である甲州小梅にポリフェノール類が豊富に含まれていること、また、フラボノイドなどのポリフェノール類の一部に強いHdac阻害活性のあることを発見していた。そこで、甲州小梅由来のポリフェノール成分にHdac阻害活性があるか否か検討を行った。メタノール(MeOH)で抽出を行った後、ヘキサン(Hexane)、ジクロロメタン(DCM)、酢酸エチル

(EAc)、ブタノール (BuOH)、水 (Water) の各画分に分画し、得られた画分 (終濃度100 $\mu$ g/ml) について、Hdac活性に対する阻害効果の有無を検討した。その結果、DCMとBuOH画分に有意なHdac阻害活性のあることが確認された (Fig.2)。また、各画分に含まれるポリフェノール含有量を測定したところ、DCM画分にポリフェノール類が最も多く含まれていることが明らかとなった (Table1)。

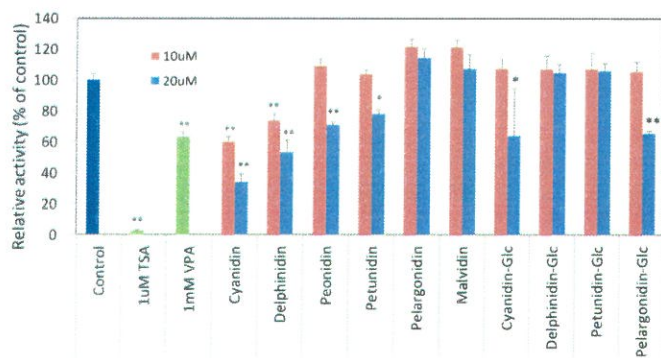


Fig.1 Effect of anthocyanin on Hdac enzyme activity. The values are represented as mean  $\pm$  SD in comparison to control. (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , ANOVA)

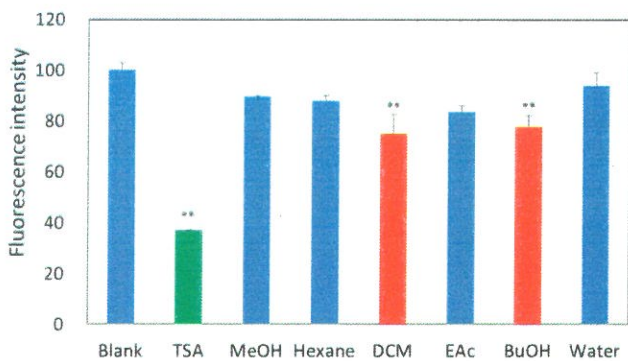


Fig.2 Effect of fraction-derived from *Prunus mume* extract on Hdac enzyme activity. Final concentrations of fraction were 100 $\mu$ g/ml. The values are represented as mean  $\pm$  SD in comparison to control. (\*\* $p < 0.01$ , ANOVA)

Table1 Polyphenol content of each fraction

Hexane	DCM	EAc	BuOH	Water
2.48	26.51	8.01	8.66	0.49

(g GA eq / 100g contents of dried-extract)

(2) アントシアニン類およびウメ由来画分の線虫の寿命延長に対する影響

Hdac阻害活性の確認されたアントシアニン類およびウメ由来のDCMとBuOH画分について、線虫の寿命に対する影響を検討した。アントシアニン類 (終濃度20 $\mu$ M) およびウメ由来の画分 (終濃度100 $\mu$ g/ml) を線虫の液体培養系へ添加し、 Kaplan-Meier法を用いて生存分析を行った。その結果、アントシアニン類では、デルフィニジン、ペオニジン、ペチュニジンに有意な寿命延長効果が確認された (Fig.3, Table 2)。また、ウメ由来の分画物においては、HexaneとDCM画分に顕著な寿命延長効果が確認された (Fig.4, Table 3)。

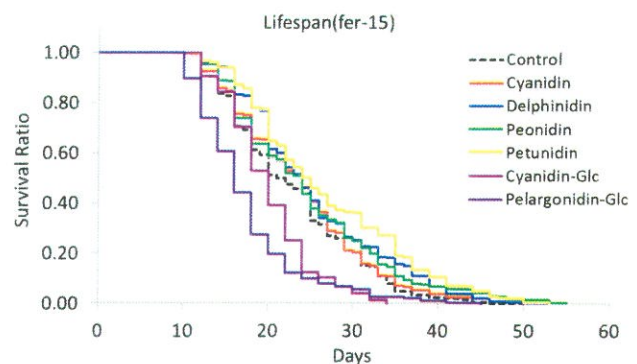


Fig.3 Effect of anthocyanin on lifespan in *Caenorhabditis elegans* (fer-15). Worms were incubated with 20 $\mu$ M anthocyanin. The number of dead or alive worms was counted every 2 days until all worms were dead, and the survival rates were calculated.

Table 2 Lifespan analysis of worms cultured with anthocyanins.

	Mean $\pm$ SD	Median $\pm$ SD	Log-rank tests (Mantel-Cox) VS Control
Control	22.86 $\pm$ 0.41	22.0 $\pm$ 0.82	-
Cyanidin	23.84 $\pm$ 0.46	24.0 $\pm$ 0.68	-
Delphinidin	25.34* $\pm$ 0.51	24.0* $\pm$ 0.62	$p < 0.001$
Peonidin	24.52* $\pm$ 0.50	24.0* $\pm$ 0.58	$p < 0.001$
Petunidin	26.73* $\pm$ 0.59	24.0* $\pm$ 0.91	$p < 0.001$
Cyanidin-Glc	19.99 $\pm$ 0.43	20.0 $\pm$ 0.52	-
Pelargonidin-Glc	17.39 $\pm$ 0.47	16.0 $\pm$ 0.46	-

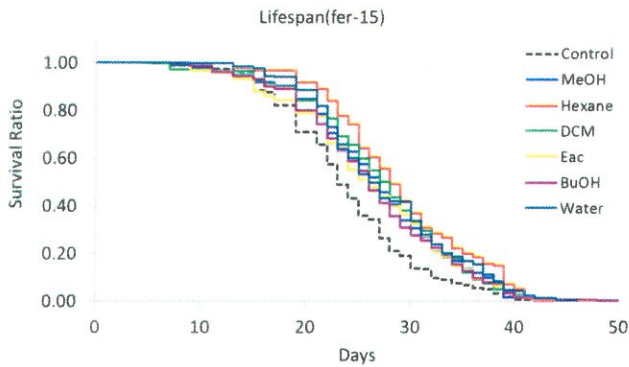


Fig.4 Effect of fraction-derived from *P. mume* extract on lifespan in *C. elegans* (fer-15). Worms were incubated with 100µg/ml each extract. The number of dead or alive worms was counted every 2 days until all worms were dead, and the survival rates were calculated.

Table 3 Lifespan analysis of worms cultured with fraction-derived from *P. mume* extract.

	Mean ± SD	Median ± SD	Log-rank tests (Mantel-Cox) VS Control
Control	23.94 ± 0.34	23.0 ± 0.35	-
MeOH	26.80* ± 0.38	27.0* ± 0.34	p < 0.001
Hexane	28.95* ± 0.34	28.0* ± 0.35	p < 0.001
DCM	27.05* ± 0.39	27.0* ± 0.48	p < 0.001
EAc	26.15* ± 0.40	26.0* ± 0.66	p < 0.001
BuOH	26.40* ± 0.36	26.0* ± 0.40	p < 0.001
Water	27.49* ± 0.36	26.0* ± 0.45	p < 0.001

### (3) 寿命延長効果の作用機序の解析と活性分子の特定

アントシアニン類、ウメ由来のDCMおよびBuOH画分の寿命延長効果がヒストンの脱アセチル化を介した効果であるか否かについて検討を行った。ヒトのHdac遺伝子に相当する線虫のホモログ(Hda)は、大きく3つのクラス(クラスI、クラスII、クラスIIa)に分類されている。そこで、HdacのクラスIに相当する線虫ホモログのhda-2およびhda-3、HdacのクラスIIに相当する線虫ホモログhda-4およびhda-10のそれぞれの変異体(欠損株)を用いて各試料添加の寿命延長への影響について検討を行った。hda-2株を用いた検討においては、デルフィニジンに有意な寿命延長効果がみとめられた。一方、ペオニジンおよびペチュニジン、ウメ由来のDCMおよびBuOH画分には寿命延長効果はみ

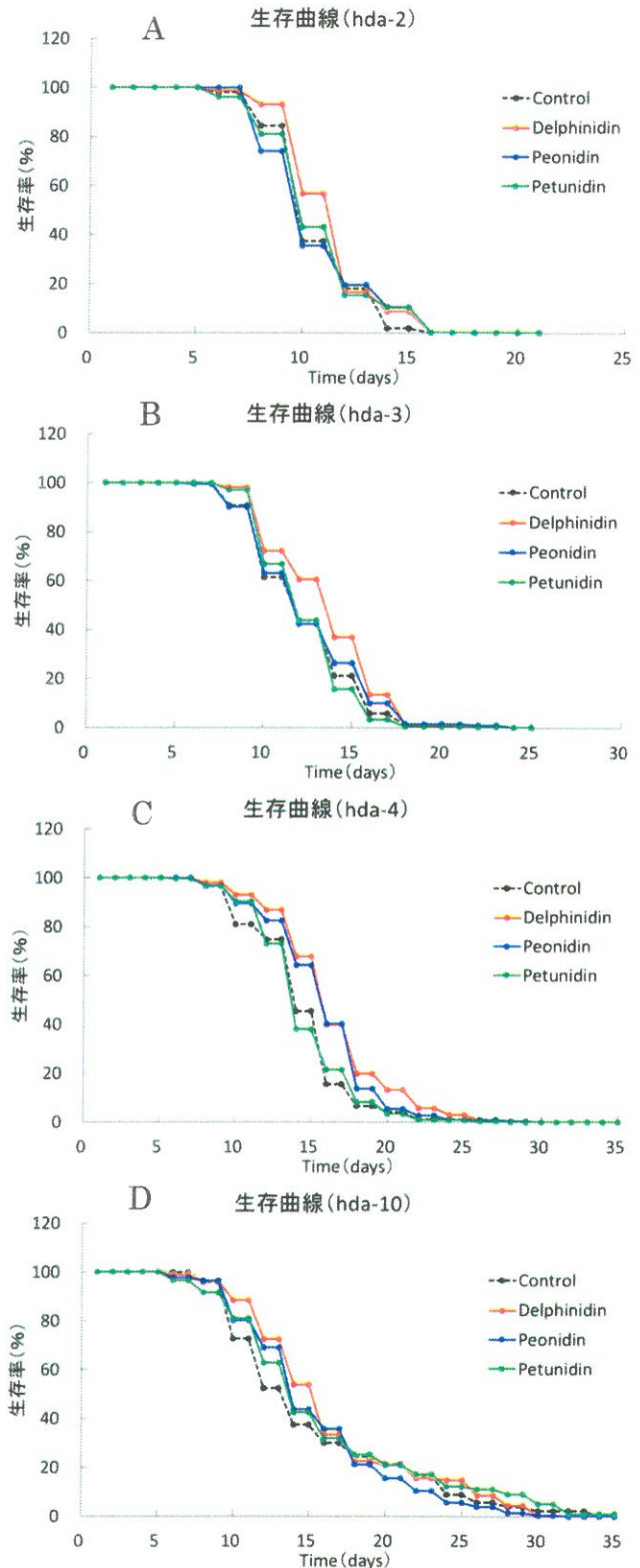


Fig.5 Effect of anthocyanin on lifespan in histone deacetylase mutants (A:hda-2, B:hda-3, C:hda-4, D:hda-10).

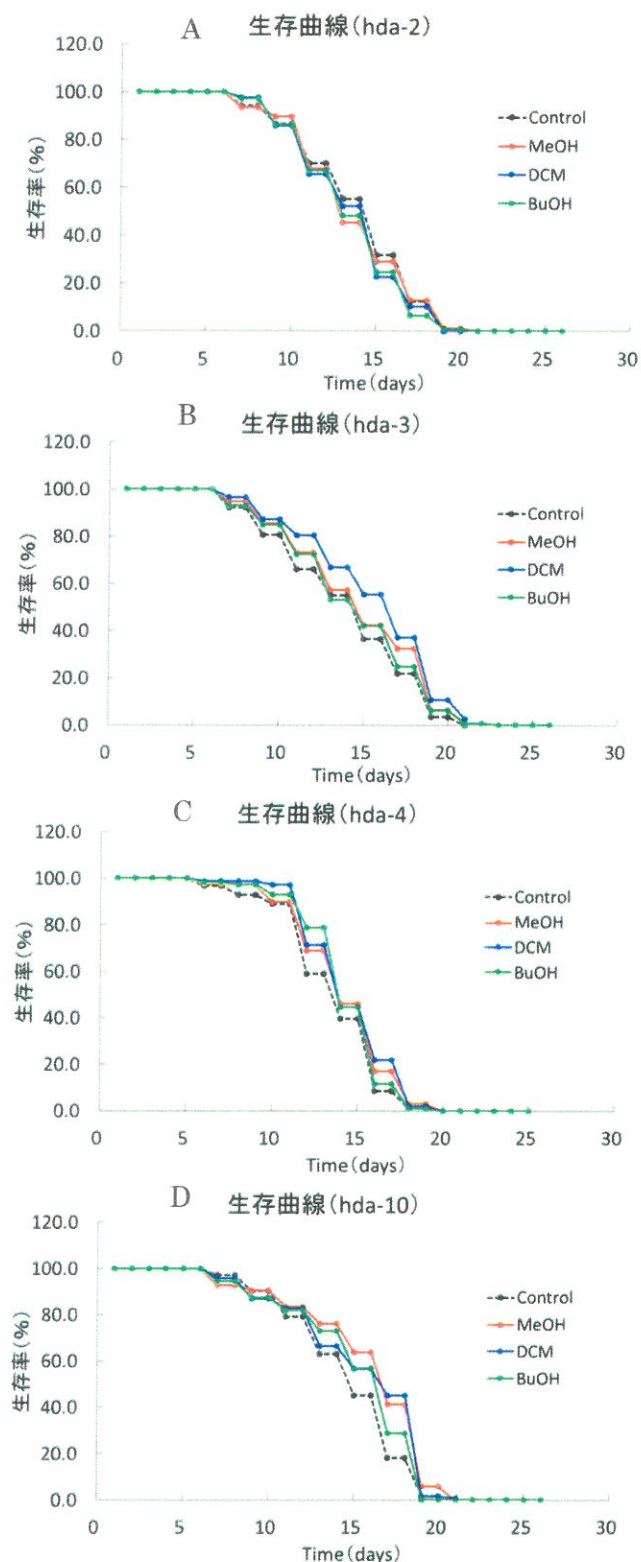


Fig.6 Effect of fraction-derived from *P. mume* extract on lifespan in histone deacetylase mutants (A:hda-2, B:hda-3, C:hda-4, D:hda-10) .

とめられなかった。また、hda-3株を用いた検討においては、ウメ由来のDCM画分に有意な寿命延長効果がみとめられたものの、デルフィニジン、ペオニジンおよびペチュニジン、ウメ由来のBuOH画分には寿命延長効果はみとめられなかった。一方、hda-4株を用いた検討においては、デルフィニジンとペオニジン、ウメ由来のDCM画分に有意な寿命延長効果がみとめられ、ペチュニジン、ウメ由来のBuOH画分には寿命延長効果はみとめられず、hda-10株を用いた検討においては、デルフィニジン、ウメ由来の

Table 4 Lifespan analysis of histone deacetylase mutants cultured with anthocyanins.

		Mean $\pm$ SD	Median $\pm$ SD	Log-rank tests (Mantel-Cox) VS Control
hda-2	Control	11.8 $\pm$ 0.17	11.0 $\pm$ 0.17	-
	Delphinidin	12.5* $\pm$ 0.15	13.0* $\pm$ 0.14	$p < 0.005$
	Peonidin	11.8 $\pm$ 0.18	11.0 $\pm$ 0.18	-
	Petunidin	11.9 $\pm$ 0.17	11.0 $\pm$ 0.18	-
hda-3	Control	13.5 $\pm$ 0.19	13.0 $\pm$ 0.36	-
	Delphinidin	14.7 $\pm$ 0.18	15.0 $\pm$ 0.24	-
	Peonidin	13.7 $\pm$ 0.20	13.0 $\pm$ 0.30	-
	Petunidin	13.6 $\pm$ 0.15	13.0 $\pm$ 0.26	-
hda-4	Control	15.6 $\pm$ 0.25	15.0 $\pm$ 0.18	-
	Delphinidin	17.6* $\pm$ 0.25	17.0* $\pm$ 0.23	$p < 0.001$
	Peonidin	17.0* $\pm$ 0.24	17.0* $\pm$ 0.27	$p < 0.001$
	Petunidin	15.7 $\pm$ 0.21	15.0 $\pm$ 0.18	-
hda-10	Control	16.5 $\pm$ 0.39	15.0 $\pm$ 0.35	-
	Delphinidin	17.7* $\pm$ 0.39	17.0* $\pm$ 0.33	$p < 0.05$
	Peonidin	16.6 $\pm$ 0.33	15.0 $\pm$ 0.25	-
	Petunidin	17.2 $\pm$ 0.48	15.0 $\pm$ 0.35	-

Table 5 Lifespan analysis of histone deacetylase mutants cultured with fraction-derived from *P. mume* extract.

		Mean $\pm$ SD	Median $\pm$ SD	Log-rank tests (Mantel-Cox) VS Control
hda-2	Control	15.0 $\pm$ 0.30	16.0 $\pm$ 0.35	-
	MeOH	14.8 $\pm$ 0.30	14.0 $\pm$ 0.41	-
	DCM	14.7 $\pm$ 0.28	16.0 $\pm$ 0.34	-
	BuOH	14.6 $\pm$ 0.30	14.0 $\pm$ 0.38	-
hda-3	Control	15.1 $\pm$ 0.28	16.0 $\pm$ 0.36	-
	MeOH	15.9 $\pm$ 0.32	16.0 $\pm$ 0.52	-
	DCM	16.7* $\pm$ 0.38	18.0* $\pm$ 0.44	$p < 0.001$
	BuOH	15.5 $\pm$ 0.15	16.0 $\pm$ 0.54	-
hda-4	Control	14.8 $\pm$ 0.28	15.0 $\pm$ 0.50	-
	MeOH	15.4 $\pm$ 0.24	17.0 $\pm$ 0.24	-
	DCM	15.7* $\pm$ 0.21	17.0 $\pm$ 0.31	$p < 0.05$
	BuOH	15.5 $\pm$ 0.33	15.0 $\pm$ 0.28	-
hda-10	Control	15.9 $\pm$ 0.23	16.0 $\pm$ 0.23	-
	MeOH	17.1* $\pm$ 0.29	18.0* $\pm$ 0.33	$p < 0.001$
	DCM	16.7* $\pm$ 0.35	18.0* $\pm$ 0.08	$p < 0.001$
	BuOH	16.4* $\pm$ 0.25	18.0* $\pm$ 0.23	$p < 0.05$

DCMおよびBuOH画分に有意な寿命延長効果がみとめられ、ペチュニジンとペオニジンには寿命延長効果はみとめられなかった。(Fig.5~6, Table 4~5)。

次に、リアルタイムPCR法を用いてHdacにより制御される寿命延長関連遺伝子の検討を行った。DCM画分の添加により、hsp70、sod1、sir2.1の発現量が増加し、daf-2およびdaf-16、skn-1の発現量が減少していた (Fig.7)。更に、インスリン/IGF-1経路への関与を確認するため、FOXOの線虫ホモログの変異体daf-16とdaf-16遺伝子下流にGFPを組み込んだトランスジェニック体を用いてウメ由来のDCM画分添加の影響について検討を行った。その結果、daf-16株を用いた検討においては、DCM画分に有意な寿命延長効果がみとめられた (Table 6)。また、蛍光顕微鏡を用いてdaf-16の局在を観察したところ、核内移行が誘導されている傾向はみとめられたものの顕著な移行はみとめられなかった (Fig.8)。

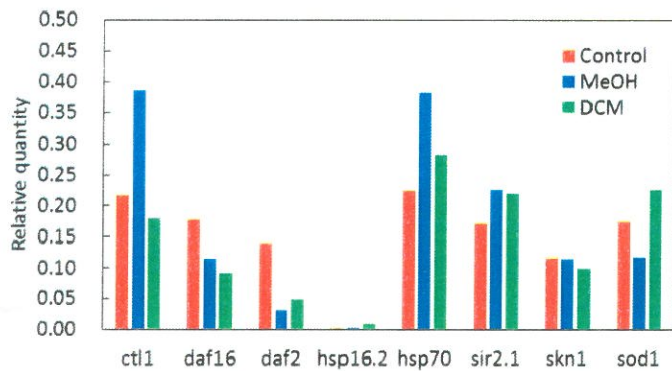


Fig.7 The mRNA expression change of genes was evaluated by the real-time PCR. Worms were incubated with 100µg/ml each extract for 10days. mRNA levels were normalized with that of act-1 as a control.

Table 6 Lifespan analysis of daf-16 mutants cultured with DCM fraction.

	Mean ± SD	Median ± SD	Log-rank tests (Mantel-Cox) VS Control
Control	10.84 ± 0.08	11.0 ± 0.12	-
MeOH	10.73 ± 0.07	10.0 ± 0.05	n.s
DCM	12.14* ± 0.09	12.0* ± 0.06	p<0.001

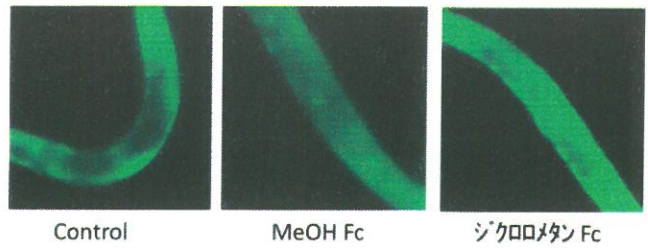


Fig.8 DAF-16::GFP response to treatment with DCM fraction. Worms were incubated with 100µg/ml each extract for 8days.

次に、酸化ストレスに対する耐性について検討を行った。線虫の培養系に試料を添加して一定期間培養した後、過酸化水素を添加し、酸化ストレスを加えた。一晚培養し生存率への影響を検討した。その結果、コントロールに比較してウメ由来のMeOH画分およびDCM画分を添加した際の生存率が高い値を示した (Fig.9)。しかし、この酸化ストレスに対する耐性は、若齢の線虫ではみとめられず、老齢の線虫でのみみとめられた。

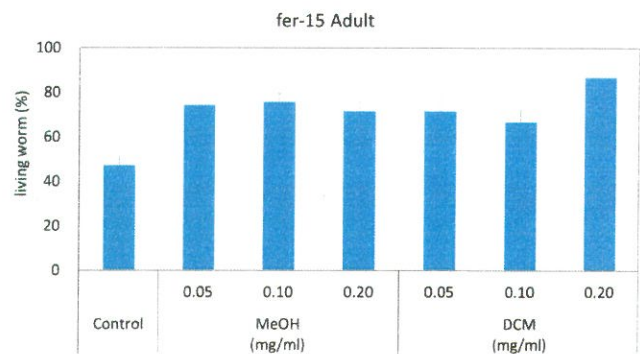


Fig.9 Treatment with DCM fraction improved oxidative stress resistance. After incubation with extracts for 28days, the worms were exposed to oxidative stress induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 3 hours. The number of dead or alive worms was counted after 24 hours, and the survival rates were calculated.

続いて、寿命延長効果を発揮している分子を同定するため、ウメ由来 DCM 画分の成分分析を行った。これまでにウメのMeOH抽出液から得られるDCM画分にリグナン類が多く含まれることが報告されている。そこで、HPLCを用いてDCM画分のリグ

ナン類について分析を行った。その結果、ウメ由来の DCM 画分にピノレシノール、ラリシレシノール、セコイソラリシレシノール、シリングレシノールが含まれていることが明らかとなった (Fig.10)。

そこで、検出されたピノレシノール、ラリシレシノール、セコイソラリシレシノール、シリングレシノールの Hdac 活性に対する阻害効果の有無を検討した。その結果、これらリグナン類に有意な HDAC 活性の増強がみとめられた (Fig.11)。また、線虫の培養系へこれらリグナン類を添加して寿命延長に対する影響を検討したところ、これらリグナン類全てに有意な寿命延長効果が確認された (Fig.12、Table 7)。

hda-2 および hda-3、hda-4、hda-10 のそれぞれの変異体 (欠損株) を用いてリグナン類添加時の線虫の寿命への影響について検討を行った。その結果、シリングレシノールのみ hda-4 において寿命延長を示した。一方、その他のリグナン類にはいずれの変異体においても寿命延長効果は確認されなかった (Fig.13、Table 8)。

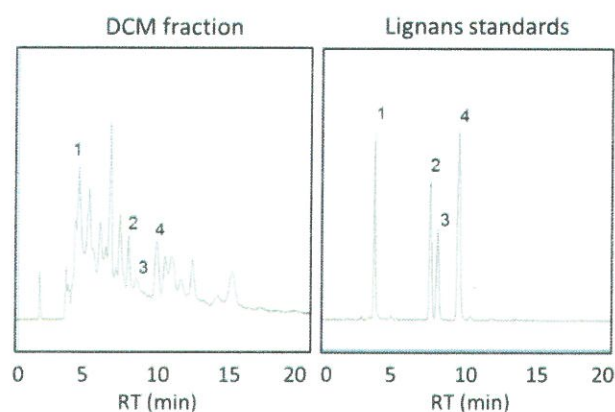


Fig.10 Analysis of lignans of DCM fraction by HPLC. The samples were applied to Kromasil C18 Column (5  $\mu$ m, 250  $\times$  4.6 mm I.D.) and eluted with CH<sub>3</sub>OH(A) and H<sub>2</sub>O(B) at a flow rate of 0.8 mL / min, with absorption monitored at 240nm. Eluent : A / B = 60 / 40 - 6 min - 75 / 25 - 30 min, Column. Temp. : 35°C. 1: Pinoresinol, 2: Lariciresinol, 3: Secoisolariciresinol, 4: Syringaresinol.

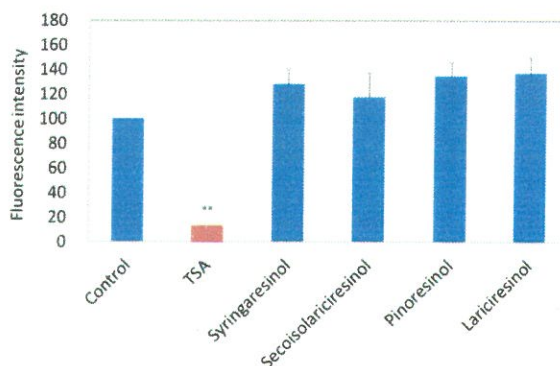


Fig.11 Effect of lignans on Hdac enzyme activity. The values are represented as mean  $\pm$  SD in comparison to control. (\* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.01, ANOVA)

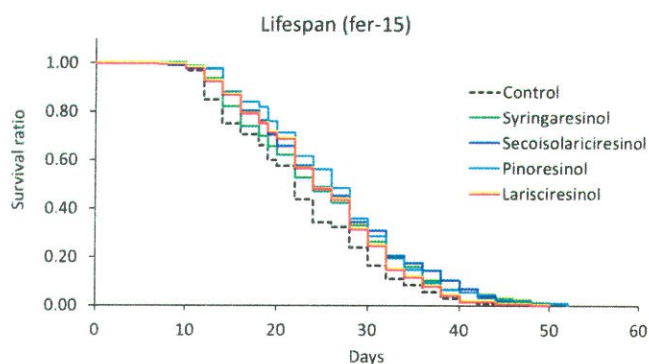


Fig.12 Effect of lignans on lifespan in *C. elegans* (fer-15). Worms were incubated with 20 $\mu$ M lignans. The number of dead or alive worms was counted every 2 days until all worms were dead, and the survival rates were calculated.

Table 7 Lifespan analysis of worms cultured with lignans.

	Mean $\pm$ SD	Median $\pm$ SD	Log-rank tests (Mantel-Cox) VS Control
Control	22.58 $\pm$ 0.47	22.0 $\pm$ 0.41	-
Syringaresinol	24.93* $\pm$ 0.51	24.0* $\pm$ 0.82	$p$ < 0.001
Secoisolariciresinol	25.90* $\pm$ 0.48	24.0* $\pm$ 0.65	$p$ < 0.001
Pinoresinol	26.17* $\pm$ 0.45	26.0* $\pm$ 0.50	$p$ < 0.001
Lariciresinol	24.94* $\pm$ 0.43	24.0* $\pm$ 0.81	$p$ < 0.001

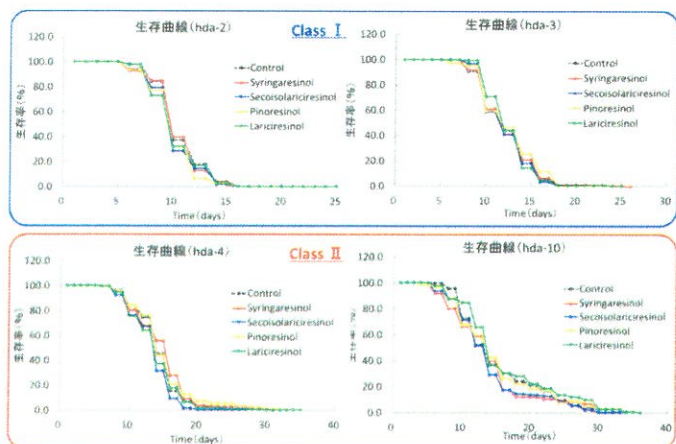


Fig.13 Effect of lignans on lifespan in histone deacetylase mutants (hda-2,3,4,10). Worms were incubated with 20 $\mu$ M lignans. The number of dead or alive worms was counted every 2 days until all worms were dead, and the survival rates were calculated.

Table 8 Lifespan analysis of histone deacetylase mutants cultured with lignans.

		Mean $\pm$ SD	Median $\pm$ SD	Log-rank tests (Mantel-Cox) VS Control
had-2	Control	11.80 $\pm$ 0.17	11.0 $\pm$ 0.17	-
	Syringaresinol	11.72 $\pm$ 0.20	11.0 $\pm$ 0.19	-
	Secoisolariciresinol	11.38 $\pm$ 0.16	11.0 $\pm$ 0.13	-
	Pinoresinol	11.26 $\pm$ 0.18	11.0 $\pm$ 0.18	-
	Lariciresinol	11.48 $\pm$ 0.16	11.0 $\pm$ 0.16	-
had-3	Control	13.50 $\pm$ 0.19	13.0 $\pm$ 0.36	-
	Syringaresinol	13.51 $\pm$ 0.18	13.0 $\pm$ 0.30	-
	Secoisolariciresinol	13.36 $\pm$ 0.16	13.0 $\pm$ 0.33	-
	Pinoresinol	13.70 $\pm$ 0.19	13.0 $\pm$ 0.31	-
	Lariciresinol	13.68 $\pm$ 0.14	13.0 $\pm$ 0.22	-
had-4	Control	15.57 $\pm$ 0.25	15.0 $\pm$ 0.18	-
	Syringaresinol	16.13 $\pm$ 0.28	17.0 $\pm$ 0.21	$p < 0.05$
	Secoisolariciresinol	14.61 $\pm$ 0.19	15.0 $\pm$ 0.16	-
	Pinoresinol	16.21 $\pm$ 0.31	15.0 $\pm$ 0.21	-
	Lariciresinol	15.01 $\pm$ 0.24	15.0 $\pm$ 0.24	-
had-10	Control	16.50 $\pm$ 0.39	15.0 $\pm$ 0.35	-
	Syringaresinol	15.55 $\pm$ 0.43	15.0 $\pm$ 0.33	-
	Secoisolariciresinol	15.20 $\pm$ 0.39	15.0 $\pm$ 0.29	-
	Pinoresinol	16.41 $\pm$ 0.47	15.0 $\pm$ 0.44	-
	Lariciresinol	17.22 $\pm$ 0.48	15.0 $\pm$ 0.23	-

長寿遺伝子として知られるサーチュインはクラスIIIに分類されているHdacであるが、これらは転写因子等の脱アセチル化を促進することで遺伝子の発現を調節していることが知られている。先の検討において寿命延長効果のみとめられたアントシアニン類とウメ由来 DCM および BuOH 画分の Sirt1 活性への影響を検討したところ、顕著な Sirt1 活性調節はみとめられなかった。また、サーチュイ

ン遺伝子の線虫ホモログ Sir2.1 の変異体 (欠損株) を用いて各試料添加の寿命延長への影響について検討を行ったところ、ウメ由来 DCM および BuOH 画分において有意な寿命延長効果がみとめられた (Data not shown)。

一方、DCM 画分において検出したリグナン類のHdac活性への影響検討したところ、有意なHdac活性上昇が確認された。リグナン類はレスベラトロールのようにクラスIIIHdac活性を高めることで遺伝子発現を調節し、寿命延長を導いている可能性も考えられる。そこで、Sir2.1株を用いてリグナン類がSirt1活性を介して線虫の寿命を延長しているか否かについて検討を行った。その結果、ピノレスシノール、ラリシレシノール、セコイソラリシレシノールに有意な寿命延長効果がみとめられた (Fig.14, Table 9)。

また、リグナン類による寿命延長がインスリン/IGF-1経路を介して行われているか否か確認するため、daf-16株を用いて寿命延長への影響を検討したところ、リグナン類に有意な寿命延長効果はみとめられなかった (Data not shown)。

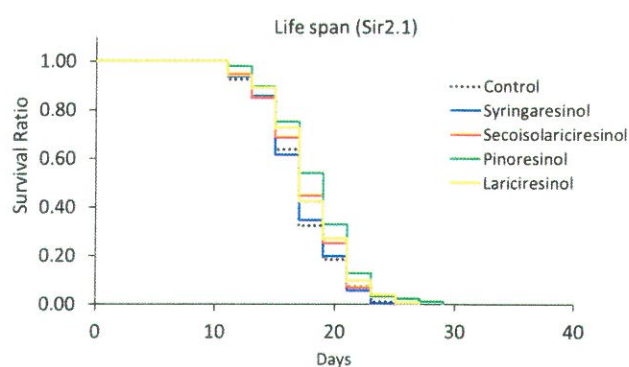


Fig.14 Effect of lignans on lifespan in sirtuin mutant (Sir2.1). Worms were incubated with 20 $\mu$ M lignans. The number of dead or alive worms was counted every 2 days until all worms were dead, and the survival rates were calculated.



Table 9 Lifespan analysis of sirtuin mutant (Sir2.1) cultured with lignans.

	Mean $\pm$ SD	Median $\pm$ SD	Log-rank tests (Mantel-Cox) VS Control
Control	17.02 $\pm$ 0.20	17.0 $\pm$ 0.19	-
Syringaresinol	17.03 $\pm$ 0.19	17.0 $\pm$ 0.22	-
Secoisolariciresinol	17.58* $\pm$ 0.21	17.0 $\pm$ 0.26	$p < 0.05$
Pinoresinol	18.37* $\pm$ 0.25	19.0* $\pm$ 0.32	$p < 0.005$
Lariciresinol	17.78* $\pm$ 0.23	17.0 $\pm$ 0.23	$p < 0.05$

## 5. 考察

本研究では、山梨県内で栽培されている農産物に由来する食品成分を主な対象として、ヒストンアセチル化を介して寿命延長効果を発揮する分子を見つけ出し、その作用メカニズムの解明を試みた。

ポリフェノール類には抗酸化による老化防止や Hdc を阻害または活性化する働きを有するものが数多く存在している。はじめに、モモやブドウに豊富に含まれるアントシアニン類について検討を行った。アントシアニジンの多くに Hdc に対する阻害活性がみとめられたが、配糖体であるアントシアニンはほとんど Hdc 阻害活性を示さなかった

(Fig.1)。これまでに報告されている Hdc 阻害物質の多くも糖が付加されていないアグリコンが中心であった。細胞内への取り込みも容易であると考えられるため、生体内での効果も期待できると考えられる。一方、ウメ（甲州小梅）由来の抽出液の中から Hdc 阻害活性成分の探索を試みたところ、DCM 画分と BuOH 画分に有意な Hdc 阻害活性がみとめられた (Fig.2)。これらの画分はポリフェノール含有量も多く、多種多様な機能性成分が含まれていると考えられる。そこで、Hdc 阻害活性を示した試料の線虫の寿命延長に対する効果を検討したところ、アントシアニン、ヘキササン画分や水層画分を含めたウメ由来抽出液の分画物全てに有意な寿命延長が確認された。ヘキササン画分には脂質や脂溶性ビタミン、水層画分には多糖や単糖類、タンパク質、アミノ酸などが多く含まれると考えられる。これまでに不飽和脂肪酸の一部（リノール酸）に

Hdc に対する阻害作用が報告されている。ヘキササン画分にみとめられた寿命延長効果の詳細は不明であるが、ビタミン E など抗酸化物質の関与、またリノール酸による Hdc 阻害作用に由来する可能性も考えられる。

次に、Hdc 酵素の関与を明らかにするため、ヒト Hdc 遺伝子の線虫ホモログである *hda-2,3,4,10* の変異体を用いて検討を行った (Fig.5.6)。デルフィニジンは *hda-2,4,10* に対し寿命延長効果が確認された。ヒストンのアセチル化に関与する酵素はクラス I Hdc に分類される *hda-2,3* である。従って、デルフィニジンの寿命延長効果は *hda-3* を介したエピジェネティック調節である可能性が考えられる。一方、ペオニジンは *hda-4* においてのみ寿命延長効果がみとめられた。従って、ペオニジンの寿命延長効果は *hda-2* および *hda-3, had-10* を介したエピジェネティック調節である可能性が考えられる。また、ペチュニジンはいずれにおいても寿命延長効果はみとめられなかった。従って、ペチュニジンの寿命延長効果は *hda-2,3,4,10* を介したエピジェネティック調節である可能性が考えられる。一方、ウメから分画した DCM 画分は、*hda-2* においてのみ寿命延長効果がみとめられなかった。従って、DCM 画分の寿命延長効果は *hda-2* を介したエピジェネティック調節である可能性が考えられる。また、BuOH 画分は、*hda-10* においてのみ寿命延長効果がみとめられた。従って、BuOH 画分の寿命延長効果は *hda-2,3,4* を介したエピジェネティック調節である可能性が考えられる。

以上より、ウメから分画した DCM 画分はヒストンアセチル化に中心的な役割を果たす *Hda-2* へのみ関与して寿命延長効果を発揮している可能性が考えられる。そこで、DCM 画分を用いて寿命延長効果の作用機序の解析と活性分子の特定の検討を行った。線虫において DCM 画分の添加により、

hsp70 と sod1 の発現量が増加していた (Fig.7)。寿命延長には各種ストレスに対する耐性の増強が深く関与していることが知られている (3)。本検討においても DCM 画分に酸化ストレスに対する耐性を高める効果が確認された (Fig.9)。ショウジョウバエにおいて Hdac 阻害剤が hsp70 の発現を増強することが報告されており (6)、ヒストンアセチル化の亢進により hsp70 と sod1 の発現が増強されている可能性が考えられる。また、寿命はカロリー制限やインスリン-IGF1 経路、NF- $\kappa$ B 経路などによっても制御されていることが知られている。転写因子の一つである daf-16 や skn-1 は発現量解析の結果では減少していたものの (Fig.7)、その局在、すなわち核内への移行が促進されている可能性も考えられた。しかし、検討の結果、顕著な核内移行は確認されず、また、daf-16 株 (変異体) を用いた検討において線虫の寿命が延長されたことから、DCM 画分による寿命延長効果はインスリン/IGF1 経路には寄らないものと考えられる。一方、skn-1 経路については検討が不十分であるため今後の更なる検討が望まれる。

続いて、DCM 画分の中から寿命延長の候補分子としてリグナン類を同定し、ヒストンアセチル化への関与について検討を行ったところ想定とは異なり、Hdac 活性が増強された (Fig.10,11)。また、線虫の寿命への影響を確認したところリグナン類はいずれも寿命を延長した (Fig.12, Table 7)。また、リグナン類はシリンガレシノールを除き Hdac の変異体 (hda-2,3,4,10) においては、ほとんど寿命延長を示さず、Sir2.1 株において寿命延長効果を示した。このことからピノレシノールおよびラリシレシノール、セコイソラリシレシノールは、Hdac を介して寿命延長を導いている可能性が考えられる。

本研究では、Hdac 活性を指標に活性分子の選定を行い、アントシアニン類の中から Hdac 活性を阻害することで寿命延長を示すアントシアニン類、

ウメ由来 DCM 画分の中から Hdac 活性を増強することで寿命延長を示すリグナン類を同定した。DCM 画分には他にも数多くの成分が含まれており、Hdac 活性阻害を介して寿命延長を導くリグナン類とは異なる活性分子が存在する可能性が示唆される。

## 6. 文献

- (1) Baur JA, Pearson KJ. et al.: Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature*. 2006, 444, p337-342.
- (2) Ng F, Wijaya L, Tang BL: SIRT1 in the brain: connections with aging-associated disorders and lifespan. *Front Cell Neurosci*. 2015, 9, 64.
- (3) Wenzhen Duan: Sirtuins: from metabolic regulation to brain aging. *Front Aging Neurosci*. 2013, 5, 36.
- (4) Edwards C, Canfield J, Copes N, Rehan M, Lipps D, Bradshaw PC.: D-beta-hydroxybutyrate extends lifespan in *C. elegans*. *Aging*. 2014, 6(8), p621-644.
- (5) Evason K, Collins JJ, Huang C, Hughes S, Kornfeld K: Valproic acid extends *Caenorhabditis elegans* lifespan. *Aging Cell*. 2008, 7(3), p305-317.
- (6) Zhao YM, Chen X, Sun H, Yuan ZG, Ren GL, Li XX, Lu J, Huang BQ: Effects of histone deacetylase inhibitors on transcriptional regulation of the hsp70 gene in *Drosophila*. *Cell Res*. 2006, 16(6), p566-576.

## 7. 謝辞

本研究は、2016年山梨県若手研究者奨励事業費補助金の交付により遂行したものである。本研究に対し多大なるご支援を頂いたことにこの場をかりて深く感謝いたします。