

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14730

研究課題名(和文)食品として摂取する核酸分子の腸管免疫における機能性解析

研究課題名(英文) Study on biological activity of food-derived nucleic acids in intestinal immune system

研究代表者

河合 慶親 (KAWAI, Yoshichika)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学系)・教授

研究者番号：50380027

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：核酸は、他の主要栄養素とともにあらゆる生物に存在するが、食品中の核酸含有量や適性摂取量および機能性など、核酸の食品・栄養学的意義については不明である。本研究では、食品中の核酸の抽出・定量法を確立するとともに、加熱調理によって核酸サイズが減少することが明らかとなった。また、大豆や鶏肉由来の核酸が、小腸上皮様モデルである分化Caco-2細胞において、腸管のバリア機能を担うmucin 2やclaudin 4のmRNA発現を誘導することを見出した。よって、食品由来核酸が腸管の保護・バリア機能向上に寄与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Foods contain nucleic acids as well as other major nutrients, whereas the contents, optimal intake, and functions have not yet been established. In this study, we investigated the development of the methods for extraction and quantitation of nucleic acids in foods. We also found that molecular weights of nucleic acids in foods decreased during cooking with heat. In addition, we found that nucleic acids derived from soybean and chicken meat induced mRNA expression of mucin 2 and claudin 4, which contribute to the barrier functions of intestinal cells. These results suggest that food-derived nucleic acids could play a protective role by inducing the barrier functions in intestine.

研究分野：食品機能学

キーワード：核酸 調理 腸管 機能性

## 1. 研究開始当初の背景

我々は動物や植物などの生物を食物として利用することで、これらの生物を構成する様々な成分を日常的に摂取している。核酸は、デオキシリボ核酸(DNA)やリボ核酸(RNA)といった高分子化合物であり、遺伝情報を担う物質としてすべての生物に存在している。ヒトは動物や植物、あるいは乳酸菌などの微生物を含む生物を食品として日々摂取している。食品にはたんぱく質や脂質、糖質の他、微量に含まれているビタミンやミネラルなどといった栄養素が含まれていることが広く知られている。これらの栄養素は、厚生労働省が5年ごとに改訂を行っている日本人の食事摂取基準で摂取基準が設けられ、文部科学省科学技術・学術審議会資源調査分科会が調査・公表している日本食品標準成分表においても、含有量情報が整備されている。また、機能性や疾病とのつながりについても多くの研究がなされており、食品・栄養学的意義が確立している。一方、同じようにあらゆる生物に必ず含まれている核酸については、これまで遺伝学や分子生物学に関連するものが中心であり、栄養成分あるいは機能性分子としての研究はほとんど行われてこなかった。たんぱく質や脂質と同様に高分子である核酸は微量栄養素より多く食品に含有していることが予想されるが、日本食品標準成分表においても核酸の項目はない。また、経口摂取した核酸の消化や吸収の機構などについても不明な点が多い。

一方で近年、食品成分として核酸を摂取した際の機能性に関する研究が少しずつではあるが報告されるようになってきた。例として、乳酸菌のゲノムに由来するオリゴヌクレオチドが炎症性サイトカインである IL-8 の分泌や iNOS の発現を抑制することや、経口摂取した植物由来 miRNA が動物の組織から検出され、遺伝子制御に関わることが示唆されている。また、母乳に含まれている miRNA の乳児への影響についての研究などもあり、食品成分として摂取する核酸の機能性について注目が集まっている。

## 2. 研究の目的

上述の通り、核酸はタンパク質や脂質、糖質などの主要栄養素とともにあらゆる生物に存在するが、食品中の含有量や適性摂取量、さらには機能性などの研究がほとんど行われておらず、食品・栄養学的意義が明確になっていない。これまでの核酸に関する研究は遺伝子発現などの生物学的な研究が中心であったが、上述したように核酸のもつ生理活性が報告されるようになり、食品から摂取する核酸にもこれまで明らかになっていない機能性が存在するのではないかと考えられる。食品に含まれる核酸の食品・栄養学的意義を評価するためには、まず実際に食事として摂取する核酸量を明らかにすることが必要と考えられる。そこで、本研究では食品中

の核酸量を正確に測定する方法を確立することを目的とした。また、調理や消化吸收過程における核酸の構造や量の変化についても検討するとともに、摂取した核酸との直接的な相互作用が予想される腸管における食品由来核酸の機能性を評価することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 食品からの核酸抽出法

ビーズ粉碎機専用チューブに試料を量り取り、ビーズ(ジルコニア ZB-30)を7個入れ、核酸抽出用バッファーを加えた後、MS-100R 型ビーズ粉碎機にセットし、5000 rpm で3分粉碎した。65 °C ウォーターバスで30分インキュベート後、遠心分離した上清を回収し、フェノール試薬を加えて20分振とうし、再度遠心分離した。上清を回収し、クロロホルムを等量加えて10分振とう後、遠心分離した上清を回収し、イソプロパノールを加えて核酸を沈殿させた。遠心分離後、沈殿を70%エタノールで洗浄し、乾燥させた。これにトリス-EDTA バッファーを適量加え、4 °C で溶解させた。

### (2) 核酸の定量

核酸の定量は QuantiFlour (Promega) を用いて行った。RNA 定量は QuantiFlour RNA System (Promega) を用いて行った。一本鎖 DNA (ssDNA) 定量は QuantiFlour ssDNA System (Promega) を用いて RNA 定量と同様に行った。二本鎖 DNA (dsDNA) 定量は、QuantiFlour dsDNA System (Promega) を用いて行った。

### (3) 核酸の分子サイズ測定

抽出した核酸の分子サイズはアガロースゲル電気泳動法によって測定した。2%アガロースとなるようにアガロースをトリス-酢酸-EDTA バッファーに加え、電子レンジで溶解させた。ある程度冷めたところでエチジウムブロマイド溶液を1滴加え、ゲル成型トレイ内でゲル化させた。6×Loading バッファーを2 µl 乗せ、サンプル 10 µl と混合し、そのうち 10 µl アプライし、100 V の定電圧で泳動した。泳動終了後、UV 照射装置で 312 nm の波長を照射し、YA-3 フィルターで低波長領域をカットして核酸のバンドを検出した。

### (4) 低分子核酸の HPLC 分析

加熱によって低分子化した核酸について、以下に示す条件を用いて、HPLC 分析した。

#### < HPLC 条件 >

検出器: Prominence SPD-20 (島津)

カラム: Develosil RPAQUEOUS AR-5 (4.6×150 mm)

移動相 A: 50 mM 酢酸アンモニウム

移動相 B: アセトニトリル

グラジエント条件: B5% (0 min), B5-30%

(0-20 min), B30% (40-45 min), B30-5% (45-46 min)

流速： 0.5 ml/min

検出： 260 nm

#### (5) Caco-2 細胞における機能性評価

ヒト結腸癌細胞由来 Caco-2 細胞は、ダルベッコ変法イーグル (DMEM) 培地に、10%ウシ胎児血清、ペニシリン-ストレプトマイシン混合溶液、非必須アミノ酸を加えた培地で培養した。コンフルエントに達した後、3 週間培養を続け、小腸上皮様に分化させた。食品から抽出した核酸を総核酸量 (dsDNA+ssDNA+RNA) が 1 mg/ml となるよう核酸処理用 DMEM 培地で希釈して処理し、4 時間培養した。

その後、細胞を PBS で洗浄し、Sepazol-RNA I Super G を加え細胞を溶解し、チューブに回収した。クロロホルムを 1/5 量加え、15 秒間よく混合した。遠心分離後、上清を回収し、2-プロパノールを等量加えて混合し、遠心分離することで RNA を沈殿させた。70%エタノールで沈殿を洗浄し、最終的に滅菌水に RNA を溶解させた。

逆転写反応は ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover を用いて行った。PCR は THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix を用いて LightCycler Nano システムにより測定を行なった。

## 4. 研究成果

### (1) 食品からの核酸抽出法の決定

食品中に核酸がどれだけ含まれているのか不明であるため、抽出方法ならびに定量方法の検討を行った。核酸抽出する際のフェノール試薬は pH 5.2 とすることで最も抽出効率が良かった。また、ビーズ式破碎装置の使用を試みたところ、固形食品からも核酸抽出が可能であることが示された。データは省略するが、食品を溶解する際の時間と温度についても検討を行ったところ、65 で 30 分反応を行うのが最適であった。以上の検討結果から、食品から核酸抽出を行う最適と思われる方法を確立することができた。

### (2) 食品中の核酸定量法の決定

Promega 社の蛍光プローブ (QuantiFlour® dsDNA Dye, ssDNA Dye, RNA Dye) を用いた核酸の蛍光定量法を確立した。本方法は、従来法である Nanodrop1000 を用いた吸光度による定量結果とも相関性を示した。蛍光法による測定では dsDNA、ssDNA、RNA それぞれのプローブで測定した結果から、食品 100 g あたりに含まれている核酸含有量を求めることとした。

そこで、日常生活で摂取している様々な食品の核酸定量を行った。その結果、大豆が最も多く、続いて鮭、きな粉、薄力粉の順番に多く、野菜類は少ない傾向にあった。野菜類

は水分量が多い分 100 g あたりの量が少ない傾向にあると考えられる。また、食品成分表の値と照らし合わせると、たんぱく質が多い食品において核酸量が多い傾向にあった。今回定量した食品では 50 ~ 800 mg の核酸が含まれていることが明らかとなった。

また、抽出した核酸をアガロースゲル電気泳動により分析したところ、食品ごとに含まれている核酸の分子サイズが異なることが明らかとなった。以上の結果より、決定した抽出・定量法により様々な食品中の核酸量の定量が可能となった。

以下の表には、本研究で測定した各種食品に含まれる核酸量を示した。

食品名	核酸 (mg)
精白米	282
薄力粉	429
大豆	842
きな粉	499
木綿豆腐	87
じゃがいも	57
にんじん	52
ピーマン	189
キャベツ	61
鶏肉	272
鮭	653

### (3) 加熱調理による核酸サイズの変化

(2)において食品によって核酸サイズに変化が見られ、特に加熱食品において分子サイズが減少している傾向が認められた。また、同じ食材でも加熱調理をした場合に、回収される核酸量が少ないという結果が得られた。そこで、加熱による核酸量と分子サイズについて詳細な検討を行った。その結果、200 で 5 分の加熱によって核酸量が有意に減少することが明らかとなった。また、電気泳動により分子サイズを確認したところ、米、大豆、鶏肉いずれの食品においても加熱による低分子化が認められた。以上の結果より、加熱による核酸の減少は低分子化によって 2-プロパノール沈殿法で回収されにくくなったためと予想された。

そこで、核酸の低分子化について確認するため、2-プロパノール沈殿時の上清を回収し、HPLC により解析を行った。今回の解析では加熱分解物の同定には至らなかったが、未加熱のコントロールで検出されなかったピークが確認できた。本条件においては、標準品のヌクレオチド monomer や dimer のピークが分離できた。今後、さらにピークの分離を試みるとともに、標準品との比較検討を行い、検出されたピークの同定を進める必要があ

る。

#### (4) Caco-2 バリア機能因子に対する効果

食品中に含まれる核酸の新たな機能性を探索するために、腸管細胞を標的として評価を試みた。小腸上皮様細胞モデルである分化 Caco-2 細胞に食品由来核酸を処理し、炎症性サイトカインである IL-8、抗菌ペプチド  $\beta$ -defensin 2、粘液ムチンのコア蛋白質である MUC2、タイトジャンクションを構成する Claudin 4 の mRNA 発現量についてリアルタイム RT-PCR による評価を行った。その結果、大豆あるいは鶏肉由来核酸の処理により MUC2 と Claudin 4 の発現量の増大が認められた。特に鶏肉由来核酸において有意な差が認められた。

以上の結果より、食品由来核酸が腸管の保護・バリア機能向上に寄与する可能性が示され、特に大豆や鶏肉の新たな機能性が示唆された。今後は、加熱による低分子化のメカニズムや低分子化した核酸の測定、及び消化酵素による核酸の消化・分解についての解析が課題である。

#### (5) まとめ

本研究では、まず食品からの核酸抽出および定量法を確立し、さらには加熱調理による核酸量やサイズの変化についての検討を行った。特に、精白米、大豆、鶏肉に焦点を当てて検討を行った結果、加熱によってこれらの核酸量が有意に減少することが明らかとなった。アガロースゲル電気泳動により分子サイズの解析を行ったところ、食品中の核酸は加熱により低分子化することが明らかとなった。また、核酸を抽出した後に加熱にすることによっても核酸量の減少と低分子化が確認された。これらのことから、高分子核酸は加熱により断片化しやすくなることが考えられた。

加熱による核酸量の減少が低分子化によることをより詳しく解析するために、2-プロパノール沈殿時の上清を回収し、HPLC により解析を行った。ヌクレオシドおよび DNA を構成する 4 塩基の 2 量体を標準品として用い、コントロールとサンプルを比較した。いずれにおいてもピークが確認できたが、同定にまで至らなかった。今後、溶出時間の検討を行い、ピークの分離を試みるとともに、検出されたピークの同定やピーク面積の比較を行い、加熱により低分子核酸が増加するかを明らかにする必要がある。

次に、食品由来核酸の新たな機能性の探索を試みることにした。経口摂取した食品由来核酸が高濃度で作用しうる場として腸管を標的として想定した。腸上皮細胞はタイトジャンクションの構成や粘液や抗菌ペプチドの分泌などを介して宿主防御の役割を果たしている。腸上皮細胞におけるバリア機能の破綻は炎症性腸疾患などに関わることが知られている。よって、食品由来成分によるバ

リア機能の促進はこれらの疾患の予防または治療につながることを期待される。そこで、腸管における食品由来核酸の機能性について評価を行った。小腸上皮様に分化した Caco-2 細胞に大豆または鶏肉から抽出した核酸を処理し、RT-qPCR により遺伝子発現の評価を行った。いずれの食品由来核酸においても MUC2 と Claudin 4 の mRNA 発現量の増大が認められた。特に鶏肉由来核酸において有意な増大が認められた。

以上、本研究の遂行により、食品由来核酸の抽出・定量ならびに機能性評価が可能となり、食品に含まれる核酸成分が腸管のバリア機能を高める可能性があることが示された。今後は、消化酵素による核酸の分解なども考慮した検討を行う必要がある。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Nuka, E., Tomono, S., Ishisaka, A., Kato, Y., Miyoshi, N., Kawai, Y. Metal-catalyzed oxidation of 2-alkenals generates genotoxic 4-oxo-2-alkenals during lipid peroxidation. *Biochem. Biotechnol. Biochem.* 80, 2007-2013 (2016). (査読有)  
DOI:10.1080/09168451.2016.1191334

[学会発表](計 3 件)

額惠理香、大西康太、寺尾純二、河合慶親「アデノシン類によるマクロファージ炎症促進作用に対するポリフェノールの効果」日本農芸化学会 2017 年度大会, 2017 年 3 月 19 日, 京都女子大学(京都府京都市)

額惠理香、寺尾純二、河合慶親「アデノシン類による炎症促進機構に対するポリフェノールの作用」第 21 回日本フードファクター学会学術集会, 2016 年 11 月 19 日, 富山国際会議場(富山県富山市)

額惠理香、寺尾純二、河合慶親「アデノシン類による炎症促進機構に対するポリフェノールの作用」第 22 回フードサイエンスフォーラム学術集会, 2016 年 9 月 8 日, ゆのこう美春閣(岡山県美作市)

[その他]  
ホームページ等

<http://www.tokushima-u.ac.jp/med/culture/shokuhinkino/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

河合 慶親 (KAWAI, Yoshichika)  
徳島大学大学院医歯薬学研究部・教授  
研究者番号 : 50380027