

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K01872

研究課題名(和文) 食生活と環境化学物質が子ども達の脳神経に与える影響の網羅的な解析

研究課題名(英文) Comprehensive neurochemical analysis of the effects of food and chemicals on children

研究代表者

酒井 久美子 (Sakai, Kumiko)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：60225753

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：食品中に安定剤として使用されている安息香酸類を通常の食餌に添加してマウスを飼育した。それぞれのマウスで行動解析と脳海馬(学習や記憶を司る部位)のメタボローム解析を行なった。安息香酸群で、遺伝子の元になる核酸の代謝に異常が見られた。このマウスは学習効果は見られず、情緒不安定な行動を示した。また、亜鉛群のマウスは行動解析で、学習・記憶に優れ、社会性も向上していることが示された。亜鉛に関連したDNA発現やタンパク質の構造の安定化、酵素の活性発現の調節などにおいて、亜鉛が強く関わっていることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食品中に安定剤として使用されている安息香酸類の危険性は現在は問われていない。しかし、今回の結果から核酸合成に異常が見られたことは、安息香酸類の食品への添加に問題がある可能性を指摘する。今後は機序の解明や濃度依存性など、より詳細な検討を行うべきである。

また、同時に行った亜鉛量を通常より多め(過剰ではない)に与えたマウスは、行動解析を行ったところ、学習や記憶力が亢進し、社会性の向上が見られた。現在、ヒトでは、亜鉛摂取量の減少が問題となっており、特に妊婦、胎児、乳幼児での不足が指摘されている。今回の研究から、必要量よりも多めの亜鉛摂取が健全な子どもの心と体の発達に寄与する可能性を提言する。

研究成果の概要(英文)：We incidentally found that environmental zinc benzoate disrupted normal nervous transmission system. The present study was conducted to examine the effects zinc and benzoic acid on the brains of adolescent children using an experimental animal model in which mice were administered excess these materials for a long period.

Benzoate-supplemented mice showed poor cognitive performance and emotional lability. Metabolome analysis of these mice showed that nucleic acid metabolism altered. Behavioral experiments showed increases in some brain functions such as memory, learning and sociality of zinc-supplemented mice compared to control ones and some neurotransmitters were increased in metabolomic profiling.

研究分野：生化学 代謝解析

キーワード：脳 子ども 安息香酸 亜鉛 メタボローム解析 学習・記憶 社会性

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、子ども達の学習障害や情緒障害が社会的問題となっている。なぜ、最近の子ども達は「荒れ」たり、「キレ」たり、「ひきこもる」ようになったのだろうか？ 攻撃性は基本的に脳の微細構造障害や遺伝子の変化によるとされる (O. Cases et al., Science, 268, 1763, 1995, H. G. Brunner et al., Science, 262, 578, 1993)。これまでに筆者らは、安息香酸亜鉛がマウスの脳神経系を障害することを発見しているが、これが脳の微細な構造変化やそれを制御する遺伝子の障害と、どのように関連するかに焦点を当てた。

2. 研究の目的

本研究では現代の子ども達をとりまく化学物質過剰な生活環境や食生活が脳神経系に及ぼすリスクを、マウスを用いたメタボロミクスによる脳代謝物の網羅的定量解析により検討する。この解析手法は化学物質と食事栄養を一度に極微量で俯瞰できる技術であり、脳代謝物の評価系の確立を目指すとともに、申請者らがこれまでに見出している「亜鉛」「安息香酸」などの物質が影響を与える事象を多角的に検証することにより、化学物質や栄養異常が関与する神経伝達系の異常のメカニズムを追求する。

3. 研究の方法

(1) マウス実験：亜鉛、安息香酸、安息香酸亜鉛を含む飼料でマウスを飼育する。2~3 世代継代し、7~10 週齢で各種行動解析を行う。この後脳を取り出し、冷却下、迅速に脳の海馬部位を切り取り、液体窒素で凍結、-80℃にて保存する。

(2) メタボローム解析：(1) で保存した海馬を用い、ホモジナイズ後、水溶性画分を抽出、誘導体化して GC-MS/MS (トリプル四重極型ガスクロマトグラフ質量分析計、島津 GC-MS/MS TQ8040) により SHIMADZU Smart Metabolites Database (475 登録代謝物) を対象に MRM モードで測定を行う。得られたデータを多変量解析し、コントロール群と特殊飼料群の群分けを確認後、統計解析により有意差検定を行い、両者間で有意に変動した代謝物を抽出する。

(3) マイクロアレイによる DNA 発現解析：(1) で保存した脳部位より mRNA を調整し、遺伝子発現解析を行う。得られた発現変動遺伝子(シグナル値の比が2倍以上または0.5以下のもの)を DAVID (National Institute of Allergy and Infectious Diseases 提供の無料のデータベース) や Metascape で解析し、どのパスウェイに属するか調べる。

(4) 網羅的解析：上記 (1) (2) (3) で得られた結果を合わせて、パスウェイ解析ソフトウェア Ingenuity Pathway Analysis (IPA) を用いて、化学物質が、脳神経系に与える影響を考察する。

4. 研究成果

(1) 安息香酸群、安息香酸亜鉛群、亜鉛群のメタボローム解析

① それぞれの化学物質を添加した食餌で飼育したマウスの海馬のメタボローム解析を行った。いずれも約 300 種類の代謝物が同定されたが、各群での違いをみるため、すべての代謝物の面積値から SIMCA13 を用いて多変量解析を行った。図 1 に OPLS-DA 法での 4 群の Score Plot 図を示した。4 群ともに群分けすることができ、これは各群における変動代謝物の差が顕著出会ったことを示す。安息香酸群と安息香酸亜鉛群は近く、対照群、亜鉛群とは離れていた。

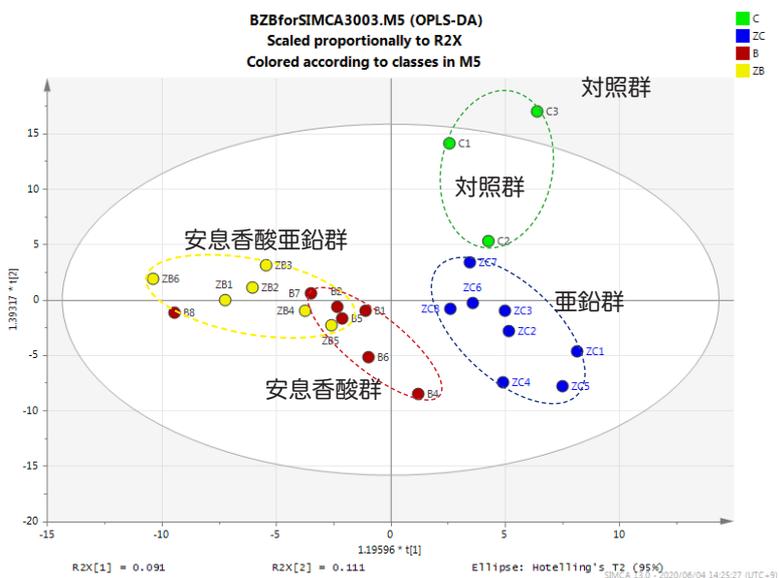


図 1. 食餌に添加した化学物質の違いによる海馬のメタボローム解析

② 図1で大まかに代謝の違いが示されたので、次に対照群と比較した際、どの代謝物が大きく有意に変動したのか、さらに解析を行った。

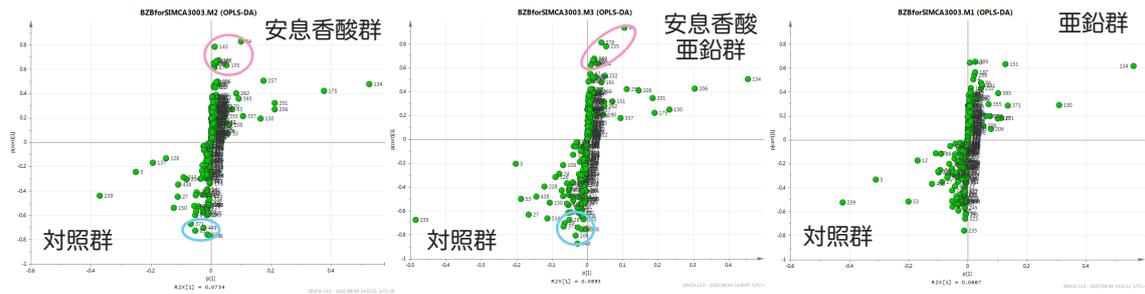


図2. 対照群と比較して変動した代謝物 S-plot 図

図1のScore Plot図の点がマウス1匹を示していたプロットであったのに対し、図2のS-plot図では点一つが一代謝物を表す。中央が原点となり、上下が有意差を表し、左右は物質の量を示す(数値は絶対値)。

図2の左図は対照群と安息香酸群を、中央の図は対照群と安息香酸亜鉛群を、右図は対照群と亜鉛群を比較した。丸で囲った部分の代謝物はそれぞれの群で有意に変動した代謝物である。亜鉛群では有意に変動した代謝物はあまり見られなかった。安息香酸群と安息香酸亜鉛群では対照群と比較して、どちらも有意に核酸塩基、Uracil, Guanine, Cytosine, Thymine, 7-Methylguanine, Uridine monophosphate (UMP)などが検出された。これらの代謝物をMetaboAnalyst4.0(オンラインの無料パスイ解析ソフトウェア)で解析したところ、図3のような代謝経路が抽出されてきた。一方で対照群では核酸合成のスタート物質であるRibose 5-phosphateが有意に検出された。これらの結果から核酸合成の停滞もしくは核酸分解の亢進で塩基が蓄積したと考えられ、いずれにせよ安息香酸の危険性を示唆する結果となった。

またトランスクリプトーム解析の結果では、安息香酸群は対照群と比較して、GO(遺伝子の機能定義と分類体系)ではextracellular matrix organisationが有意となった。結合組織系への懸念も生じた。安息香酸亜鉛群では有意なGOとして、positive regulation of nervous system developmentが抽出され、代謝物質としては安息香酸と類似していたが、mRNAレベルでは、亜鉛部分の影響が見られた。

安息香酸群の仔マウスの行動解析では、対照群に比べ、情緒不安定な行動を示しており、安息香酸の影響については今後の研究課題であり、食品添加剤として再検討を要する。

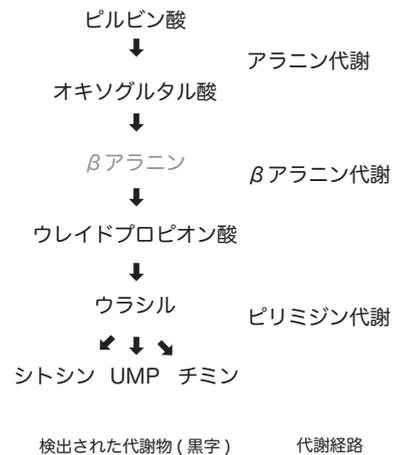


図3. 変動代謝物と関連する代謝経路

(2) 十分な亜鉛量を与えたマウスの行動解析とオミクスの網羅的解析 (C: 対照群, Z: 亜鉛群)

①行動解析: 対照群の3倍量の亜鉛(許容量範囲内)を与えて継代して飼育した2~3世代目のマウスで行動解析を行った。4種類のテスト中、新規物体認識テストと社会的相互作用認識テストで亜鉛群で有意に優れており、記憶力や社会性行動が向上した。

②亜鉛量のイメージング解析: 上記のマウスの脳組織切片でLA-ICP-MS/MS(レーザーアブレーションICP質量分析計)を用いたイメージング解析を行ったところ、海馬での亜鉛量は対照群の約1.3倍であった。

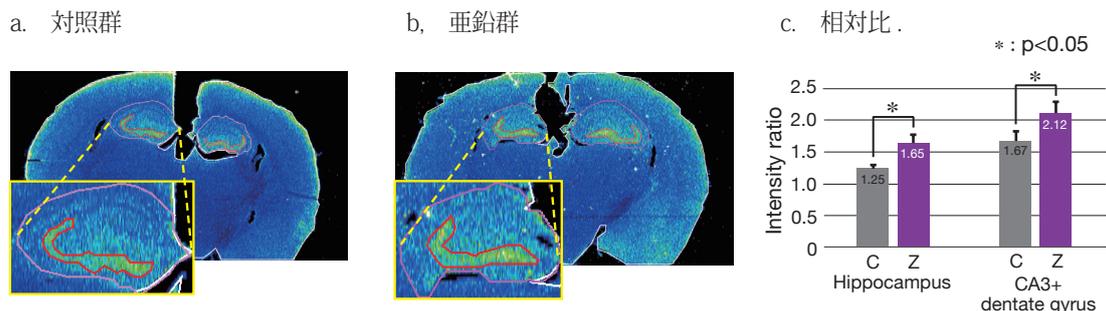


図4. 脳切片での亜鉛(^{64}Zn)のイメージング

③メタボローム解析：(1) では対照群と亜鉛群で有意な代謝物は少なかったため、データベースの代謝物を脳神経系関連の62種に絞って解析を行った。図5に多変量解析の結果のスコアプロットを示す。2群に分けられた。さらに群分けに寄与した代謝物をS-plotから抽出した(図6)。これら16個の代謝物をMetaboAnalystでパスウェイ解析を行った(図7)。変動代謝物として、アミノ酸やアミン類、特に神経伝達物質が抽出された。これらの関わる代謝経路として、カテコールアミン生合成系、チロシン代謝、フェニルアラニン代謝などが示された。多めの亜鉛はカテコールアミンなどの神経伝達物質の合成を亢進し、脳神経系のシグナル伝達を増強していることが示唆された。

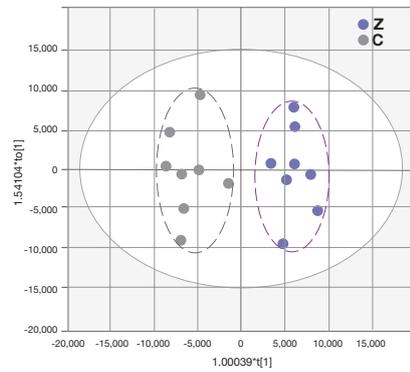


図5. 対照群と亜鉛群の多変量解析

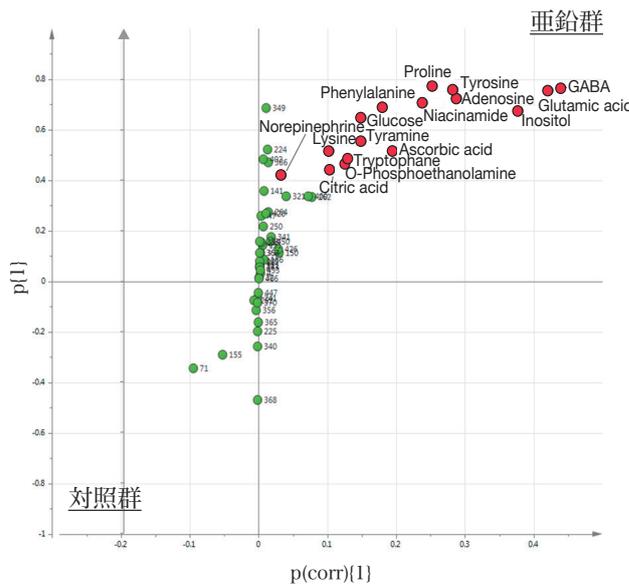


図6. 対照群と亜鉛群の多変量解析 S-plot

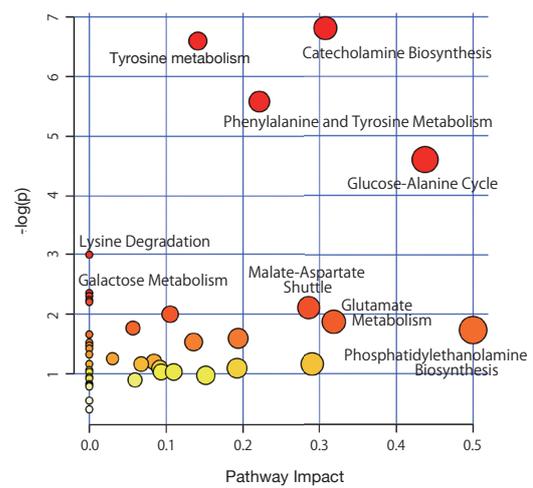


図7. 対照群と亜鉛群の多変量解析

④IPAによるオミクス統合解析：メタボロームの他に、亜鉛群マウスは遺伝子発現解析も行った。有意差のついた発現変動遺伝子、発現変動代謝物、さらに「亜鉛」のワードを加えて、IPAによるバイオインフォマティカルな統合解析をおこなった。変動のあった代謝物と遺伝子(図8の2つのパスウェイ中のいずれも中段)はまとめて下段の機能を発現させていた。機能としては、学習、認知、協調性、運動関連、カテコールアミン産生などが亢進、逆に情緒傷害、多動症、運動神経疾患などは抑制していることが示された。上段の3分子はそれらの中から上流で調節している因子として抽出されてきたもので、亜鉛を小胞に輸送するトランスポーター、ジンクフィンガータンパク質と亜鉛関連レギュレーターであった。

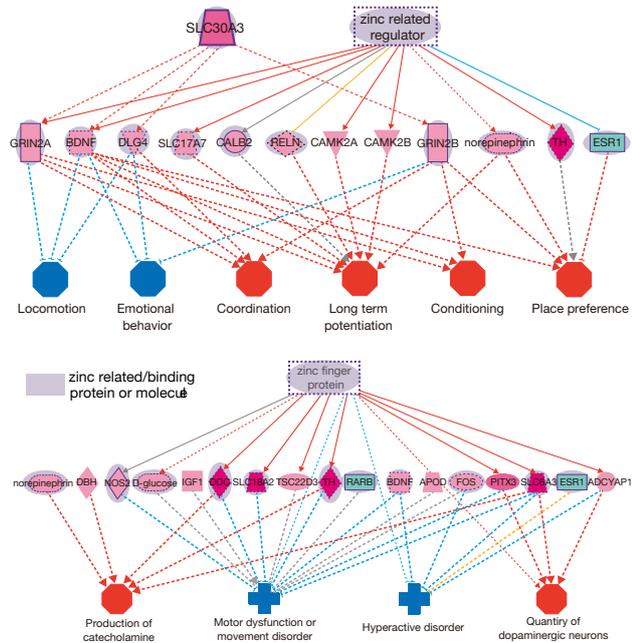


図8. オミクス統合解析

(3) まとめ

食品から摂取される安息香酸に関しては、今回、問題性が示された。亜鉛に関しては、最低必要量はカバーしてもそれ以上の摂取が、子ども達の学習障害、情緒障害に効果があることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shumin Sun , Fumiaki Hanzawa , Daeun Kim , Miki Umeki , Syunsuke Nakajima , Kumiko Sakai , Saiko Ikeda , Satoshi Mochizuki , Hiroaki Oda	4. 巻 294
2. 論文標題 Circadian rhythm-dependent induction of hepatic lipogenic gene expression in rats fed a high-sucrose diet.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J.Biol.Chem	6. 最初と最後の頁 15206 - 15217
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA119.010328	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 酒井久美子、西内美香、白川仁、駒井三千夫	4. 巻 9
2. 論文標題 亜鉛投与法の違いによる摂食促進効果をラット脳視床下部メタボローム解析で明らかにする：Zinc-ome(ジンクオーム)の観点から	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本亜鉛栄養治療	6. 最初と最後の頁 66 - 77
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sonoda A, Kamiyama N, Ozaka S, Gendo Y, Ozaki T, Hirose H, Noguchi K, Saechue B, Sachi N, Sakai K, Mizukami K, Hidano S, Murakami K, Kobayashi T.	4. 巻 23
2. 論文標題 Oral Administration of Antibiotics Results in Fecal Occult Bleeding Due to Metabolic Disorders and Defective Proliferation of the Gut Epithelial Cell in Mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genes Cells.	6. 最初と最後の頁 1043 - 1055
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.12649	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Mika Nishiuchi, Kumiko Sakai, Hiroyuki Tajima, Kazuo Katayama, Fumiko Kimura, Seiko Hoshi, Tomoko Goto, Hitoshi Shirakawa & Michio Komai	4. 巻 82
2. 論文標題 Orexigenic action of oral zinc: metabolomic analysis in the rat hypothalamus	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 2168-2175
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/09168451.2018.1516543	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 酒井 久美子	4. 巻 23
2. 論文標題 肥満研究におけるメタボロミクス解析の今-GC-MS/MSのターゲットメタボロミクスは組織間の代謝の違いを簡単に明らかにする-	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 肥満研究	6. 最初と最後の頁 149-155
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計10件(うち招待講演 1件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Kumiko Sakai, Seiichi Chiba, Kenji Sakai
2. 発表標題 Integrated omics analysis revealed mechanisms underlying improvement of mouse hippocampal function with zinc-enriched breeding over generations
3. 学会等名 The 97th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kumiko Sakai, Seiichi Chiba, Mami Koya and Kenji Sakai
2. 発表標題 Mechanisms underlying improvement of mouse hippocampal function with zinc-enriched breeding over generations were revealed by integrated omics analysis
3. 学会等名 The 6th Meeting of International Society for Zinc Biology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 酒井 久美子
2. 発表標題 亜鉛リッチな環境で生まれ育ったマウスの脳機能は向上する-オミクス解析で謎を解明する-
3. 学会等名 第18回日本亜鉛栄養治療研究会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 酒井 久美子, 西内 美香, 白川 仁, 駒井 三千夫
2. 発表標題 亜鉛投与法の違いによる摂食促進効果をラット脳視床下部メタボローム解析で明らかにする ~Zinc-ome (ジンクオーム) の観点から~
3. 学会等名 第18回日本亜鉛栄養治療研究会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 酒井 久美子, 西内 美香, 木村 ふみ子, 白川 仁, 駒井 三千夫
2. 発表標題 亜鉛経口投与によるラットの摂食促進効果に関する脳視床下部メタボローム解析
3. 学会等名 第12回メタボロームシンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 古屋マミ、千葉政一、酒井久美子
2. 発表標題 長期亜鉛投与と高齢マウスの脳代謝物の変動
3. 学会等名 第11回メタボロームシンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 酒井久美子、古屋マミ、千葉政一
2. 発表標題 GC-MS/MSターゲットメタボローム解析は皮下脂肪組織と腸間膜脂肪組織の生理的な違いを明らかにする
3. 学会等名 第11回メタボロームシンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 酒井久美子、櫻井マミ、千葉政一
2. 発表標題 肥満がもたらす脳の代謝異常のメタボローム解析
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 酒井 久美子
2. 発表標題 高シヨ糖食誘発脂肪肝のmyo-イノシトールによる抑制効果
3. 学会等名 第10回メタボロームシンポジウム
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 酒井 久美子
2. 発表標題 高シヨ糖食誘発脂肪肝に対するmyo-イノシトールの抑制効果のメタボローム解析
3. 学会等名 第7回癌・炎症と抗酸化研究会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	花田 礼子 (Hanada Reiko) (00343707)	大分大学・医学部・教授 (17501)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	千葉 政一 (Chiba Seiichi) (20457633)	大分大学・医学部・准教授 (17501)	
研究分担者	酒井 謙二 (Sakai Kenji) (50205704)	九州大学・農学研究院・教授 (17102)	