

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K16275

研究課題名(和文)日本人のマグネシウム摂取状況を反映したラット肝臓内栄養素代謝に関する包括的解析

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of the effects of mild dietary magnesium deficiency on the hepatic nutrition metabolism in rats : a study based on a magnesium intake in Japan.

研究代表者

石島 智子 (ISHIJIMA, Tomoko)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・特任助教

研究者番号：80568270

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：マグネシウム(Mg)欠乏の度合いは、0.02%Mg食投与の方が0.04%Mg食投与よりも重度であるが、0.02%Mg食投与では血清Mg濃度以外の血清指標に有意な変化はみられなかった。肝臓における発現変動遺伝子数は、0.02%Mg食投与の方が0.04%Mg食投与よりも多かった。発現変動を示した遺伝子には、脂質代謝、糖質代謝、免疫応答、細胞接着に関するものが両群に共通して多く含まれており、Mg欠乏が軽度であってもこれらの機能は影響を受けることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In experiments with rats, bodily magnesium (Mg) state largely depended on dietary Mg quantity; serum Mg was lower in 0.02% Mg diet group than 0.04% Mg diet group, although common serum indexes were not changed in 0.02% Mg diet group compared to control diet group. Genetically, however, the numbers of significantly changed hepatic genes were much more in 0.02% Mg diet group than in 0.04% Mg diet group. In both cases, the changed genes included those for lipid-glucose metabolism, immune response, and cell adhesion. It is thus suggested that even a small decrease a dietary Mg quantity can influence the gene expressions for these physiologically important events in the liver.

研究分野：栄養生化学

キーワード：軽度マグネシウム欠乏 ラット 肝臓 栄養素代謝 トランスクリプトーム解析

## 1. 研究開始当初の背景

日本人が健康の保持・増進を図る上で摂取することが望ましいエネルギー及び栄養素の量の基準として、「日本人の食事摂取基準」(厚生労働省報告)が定められている。2015年版において、マグネシウム(Mg)の推定平均必要量(18~29歳)は男280mg/日、女230mg/日、推奨量(18~29歳)は男340mg/日、女270mg/日とされている。

日本人の栄養摂取量等の現況を示した国民健康・栄養調査の結果、平成25年度のMg摂取量(20~29歳)は男221mg/日、女192mg/日と推奨量のみならず推定平均必要量をも下回った状況にある。理論上、推奨量さらには推定平均必要量を下回ることにより摂取不足によりもたらされる健康障害のリスクは上昇するとされているが、これらの基準を下回る状況(現在の日本人のMg摂取不足状況下)において実際に健康障害が引き起こされているのか、その詳細は明らかにされていないのが現状である。またこれに関連して、「日本人の食事摂取基準」を定めるにあたり、科学的エビデンスが不足していることも事実である。

ヒトにおいては血液以外のサンプリングが難しいこと、また遺伝的要因および生活様式が多様であることなどから、Mg不足の真の影響を捉えることが困難である。したがって実験動物における検証が有効であると考えられる。

Mgの不足状態が生体に及ぼす影響は、Mg欠乏食を投与したラット(Mg欠乏ラット)を用いて、主に血液中や臓器中の栄養素量、酵素活性といった生化学的指標の変動、また一部は遺伝子の発現変動などにより各栄養素の代謝について明らかにされてきた。タンパク質代謝への影響について、報告者らは、タンパク質栄養状態の低下が引き起こされることを明らかにした(Nemoto T *et al.* Magn Res 2006)。

一方、Mgは生体内において多くの生理的および生化学的作用に関与しており、特に約300種類の酵素の補因子として代謝に関与していることから、Mg欠乏状態では生体内全般において様々な代謝変化が引き起こされると想定された。報告者らはこれを解明するのに有効な手法として、遺伝子の発現変動を網羅的に捉えられるDNAマイクロアレイ解析を用いることにした。

まず正常食の約10分の1の飼料中Mg濃度(0.004%)重度のMg欠乏食投与により比較的遅い段階で現れる成長抑制が引き起こされた4週間の投与を行ったラットの肝臓において栄養素代謝を中心に包括的に理解することを試みた。その結果、エネルギー代謝全体が変化していることが示唆された。

次に4週間のMg欠乏食投与後、正常食を1週間投与し、飼料中Mg濃度を回復することにより、Mg欠乏食投与によって発現変化を示した遺伝子の発現量は正常食投与と同

程度まで回復する傾向であることがわかった。このように食餌性Mg量の変動によって遺伝子の発現は変化することが明らかになった。

その後も報告者らは、遺伝子の発現変化は現象面の変化よりもより早期に活発に引き起こされると推察し、成長抑制が引き起こされる4週間よりも前の2週間および3日間のMg欠乏食投与を行ったラットの肝臓において解析を行った(平成24年度~平成25年度若手研究(B), 課題番号24700820)。その結果、遺伝子発現変動については、2週間投与、3日間投与共にほぼ4週間投与と同様であることが示されたが、2週間と4週間の2つの投与期間でみられた血清中トリグリセリド濃度とコレステロール濃度の変化が、3日間投与ではトリグリセリド濃度のみみられるなど経時的な変化の一部が示された。

このように重度のMg欠乏によって引き起こされる栄養素代謝への影響を生化学的指標とDNAマイクロアレイ解析により解明してきたが、現在の日本人のMg摂取不足状況および今後起こりうるMg摂取不足の程度とはかけ離れている。

また実験上において、重度のMg欠乏食投与では、飼料摂取量の低下が引き起こされることから、摂食量を等しくする(ペアフィードを行う)必要がある。そのため正常食(対照)群は、摂食量を制限され、これにより摂食パターンも変化することから、その影響も踏まえた上での解析を行ってきた。軽度のMg欠乏食投与では、生体内における欠乏の度合いが軽度になり、飼料摂取量の低下が引き起こされず、自由摂食での解析が可能になることが推察され、摂取Mg量以外の要因を排除できることが期待される。

## 2. 研究の目的

本研究では、現在または今後想定される日本人のMg摂取量を基にラットへのMg欠乏食投与を行い、食餌性Mgの欠乏が肝臓に与える影響を、特に栄養素代謝を中心に包括的に理解することを試みた。

## 3. 研究の方法

(1)【日本人のMg摂取不足状況を想定したラット肝臓の栄養素代謝に関する生化学的解析】

現在の日本人のMg摂取不足状況および今後起こりうるMg摂取不足状況を想定したMg欠乏食をラットに投与し、その摂取状況下で引き起こされる生体への影響、特に栄養素代謝についての生化学的解析を行った。

飼料はAIN-93G飼料組成に基づき作製した。正常食のMg濃度0.05%を推奨量(充足率100%)と仮定し、Mg欠乏食は、現在の日本人のMg摂取量の推奨量に対する充足率約70%を想定した0.04%Mg食、その半量の0.02%Mg食(充足率40%)、さらにその半

量の 0.01%Mg 食 (充足率 20%) に設定し、Mg 給源である酸化マグネシウム量にて調製した。

#### 0.01%Mg 食投与実験の飼育方法

3週齢のWistar系オスラットを正常食で7日間予備飼育後、平均体重が等しくなるように3群に分け、正常食を自由摂取させる正常食群、0.01%Mg食を自由摂取させる0.01%Mg食群、0.01%Mg食投与による飼料摂取量の低下が予測されたことから、0.01%Mg食投与群と飼料摂取量を等しくするため、正常食でペアフィーディングを行ったペアフィーディング群とし、14日間飼育を行った。

#### 0.02%Mg食および0.04%Mg食投与実験の飼育方法

3週齢のWistar系オスラットを正常食で7日間予備飼育後、平均体重が等しくなるように3群に分け、正常食を自由摂取させる正常食群、0.02%Mg食を自由摂取させる0.02%Mg食群、0.04%Mg食を自由摂取させる0.04%Mg食群とし、14日間飼育を行った。

共に解剖時には、臓器および組織重量の測定と血液の採取を行った。

血液の遠心分離により血清を得て、栄養素代謝の指標(ミネラル・糖質・脂質・たんぱく質等)について測定を行った。

### (2)【日本人のMg摂取不足状況を想定したラット肝臓の栄養素代謝に関するトランスクリプトーム解析】

0.01%Mg食投与では飼料摂取量の低下が引き起こされてしまったため、DNAマイクロアレイについては、0.02%Mg食投与、0.04%Mg食投与について解析を行うことにした。

DNAマイクロアレイ解析を行うため、(1)で飼育を行った正常食群、0.02%Mg食群および0.04%Mg食群の各群のラットから肝臓を摘出した。DNAマイクロアレイ解析の過程はサーモフィッシュサイエンティフィック社のマニュアルに従って行った。肝臓より抽出・精製したTotal RNAからGeneChip 3' IVT PLUS Reagent Kitを用いてaRNAを作製し、GeneChip Rat 230 2.0へのハイブリダイゼーション、洗浄、染色、スキャンの過程を得て、データを取得した。取得したデータは正規化を行い、まずサンプル間の遺伝子発現様式の類似度を示す階層的クラスタ解析を行った。Mg食投与により発現が有意に変動した遺伝子の抽出は、0.02%Mg食群、0.04%Mg食群それぞれにおいて正常食群に対する比較を行い、同条件にて行った。その後、抽出された遺伝子群の機能的な特徴について解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1)【日本人のMg摂取不足状況を想定したラ

ット肝臓の栄養素代謝に関する生化学的解析】

#### 0.01%Mg食投与実験

飼料摂取量は正常食群に比べ0.01%Mg食群において5%の有意な低下を示した。そのため体重増加量は、正常食群に比べ0.01%Mg食群で有意に低下したが、摂食量が等しいペアフィーディング群との間に差は見られず、摂取Mg量が異なることによる成長への影響はみられなかった。

0.01%Mg食投与の影響については、摂食量が等しいペアフィーディング群との比較結果を以下に示した。

肝臓重量は、0.01%Mg食群で有意に増加し、重度Mg欠乏食投与による変化と同様な方向性を示した。

血清中Mg濃度は、0.01%Mg食群において有意に低下した。また血清中のカルシウム濃度の有意な上昇、リン濃度の有意な低下がみられ、これら血清中ミネラルの変動も重度Mg欠乏食投与による変化と同様な方向性を示した。

血清中グルコース濃度は、0.01%Mg食群において有意な低下を示した。

脂質代謝に関連する項目として、血清中トリグリセリド濃度、リン脂質濃度およびLDLコレステロール濃度は、0.01%Mg食群において有意な上昇を示した。一方、血清中総ケトン体濃度は有意な低下を示し、遊離脂肪酸濃度、HDLコレステロール濃度は低下傾向を示した。

たんぱく質代謝および腎機能に関連する項目として、血清中総タンパク質濃度および尿素窒素濃度は0.01%Mg食群において有意に上昇し、血清中アルブミン濃度は有意に低下した。

概ねこれらの血清指標の変動も重度Mg欠乏食投与による変化と同様な方向性を示した。

重度Mg欠乏食投与よりも軽度ではあるが、0.01%Mg食投与によっても飼料摂取量の低下が引き起こされた。このことから、0.01%Mg食投与による影響には、ペアフィーディングによる影響が少なくとも含まれていることが示唆された。

#### 0.02%Mg食および0.04%Mg食投与実験

飼料摂取量に3群間で有意な差はみられなかった。血清中Mg濃度は、0.02%Mg食群、0.04%Mg食群共に正常食群に対し有意に低下したが、その低下度合いはそれぞれ30%、8%とMg摂取量の少ない方が重度であった。

0.02%Mg食群において、正常食群に対し血清Mg濃度以外の血清指標に有意な差はみられなかった。

0.04%Mg食群では、正常食群に対し精巢周囲白色脂肪組織重量の上昇傾向、血清中リン濃度の有意な上昇、総タンパク質の低下傾向およびアルブミン濃度の有意な低

下がみられた。

血清中 Mg 濃度の低下は、0.02%Mg 食群よりも 0.04%Mg 食群で重度であったが、血清中 Mg 濃度以外の血清指標は軽度である 0.04%Mg 食群の方が数多く変化した。

### (2)【日本人の Mg 摂取不足状況を想定したラット肝臓の栄養素代謝に関するトランスクリプトーム解析】

0.01%Mg 食投与では、重度 Mg 欠乏食投与时同様に飼料摂取量の低下により真の食餌性 Mg の欠乏による影響が捉えられない可能性があることから、DNA マイクロアレイ解析は、0.02%Mg 食投与と 0.04%Mg 食投与について行った。

階層的クラスター解析の結果、0.02%Mg 食群、0.04%Mg 食群の各群内のサンプルにおける遺伝子発現パターンは類似する傾向にあるものの、重度 Mg 欠乏食投与时のように明確にクラスターは分かれず、0.02%Mg 食投与および 0.04%Mg 食投与による肝臓の遺伝子発現への影響は弱いことが示された。

0.02%Mg 食投与により発現が有意に上昇した遺伝子には、糖代謝、脂質代謝、免疫応答、ホルモン応答、細胞死、細胞接着などに関するものが多く含まれていた。一方、発現が有意に低下した遺伝子には、糖代謝、情報伝達、翻訳、転写調節などに関するものが多く含まれていた。

0.04%Mg 食投与により発現が有意に上昇した遺伝子には、脂質代謝、免疫応答、ホルモン応答、細胞接着などに関するものが多く含まれていた。一方、発現が有意に低下した遺伝子には、グルコース代謝、概日リズムなどに関するものが多く含まれていた。

### (3)【生化学的解析結果とトランスクリプトーム解析結果との包括的考察】

0.02%Mg 食投与により血清 Mg 濃度以外の血清指標に有意な変化はみられなかったが、0.04%Mg 食投与よりも発現変動した遺伝子の数は多く、血清 Mg 濃度の低下度合い同様に Mg 欠乏の程度は 0.04%Mg 食投与よりも大きく、肝臓に及ぼされる影響も強いことが示唆された。Mg 欠乏の程度が重度で、発現変動遺伝子数が多いにも関わらず、栄養素代謝に関わる血清指標に変化がみられなかったことからすると、遺伝子の発現変動は、血清指標を正常に維持するための Mg 欠乏状態に対応した代謝調節のために引き起こされている可能性が推察された。

0.02%食投与により発現が有意に低下した遺伝子には翻訳に関するものが多く含まれていた。Mg は翻訳段階の酵素の活性化に関与していることから、Mg 欠乏による翻訳への障害が引き起こされていると推察された。また翻訳に関する遺伝子の発現変化が 0.02% Mg 食投与によってのみみられたことについ

ては、0.04%食投与よりも Mg 欠乏度合いが重度であったことに起因すると考えられた。

一方、0.04%Mg 食投与は、血清 Mg 濃度や発現変動遺伝子数から 0.02%Mg 食投与よりも Mg 欠乏の程度が軽度で、肝臓に及ぼされる影響も弱いことが示唆された。しかし、0.02%Mg 食、0.04%Mg 食それぞれにおいて発現上昇した遺伝子には脂質代謝、免疫応答、ホルモン応答、細胞接着に関する遺伝子、発現低下した遺伝子にはグルコース代謝に関する遺伝子が共通して多く含まれおり、Mg 欠乏の程度が軽度であってもこれらの機能は影響を受けることが示唆され、これらの機能と Mg との関連の強さが推察された。

0.04%Mg 食投与では、組織重量や一部の血清指標の変動がみられた。Mg 欠乏の程度が軽度であることから、Mg 欠乏に対応した代謝調節が完全には行われておらず、Mg が不足したことによる直接の変化が示されていると推察された。

以上のことから、0.02%Mg 食投与と 0.04%Mg 食投与によるそれぞれの状況が少なくとも異なることが示された。今後は各 Mg 食投与において、各機能に含まれる遺伝子の詳細について解析し、どのような代謝変化が引き起こされているのかについて明らかにする予定である。

## 5. 主な発表論文等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石島 智子 (ISHIJIMA, Tomoko)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・特任助教

研究者番号：80568270