

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20780151

研究課題名(和文) マイクロアレイデータベースを利用した乳児期における魚油の新規機能解析

研究課題名(英文) Searching for novel nutritional function of fish oil on infants using microarray database.

研究代表者 木村 ふみ子

(KIMURA FUMIKO)

東北大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号：50321980

研究成果の概要(和文)：

本課題は、ドコサヘキサエン酸(DHA)およびエイコサペンタエン酸(EPA)が乳児の生育に与える影響を、動物実験とマイクロアレイデータベースの解析を通して明らかにし、魚油の新たな健康機能を証明することを目的とし実施した。その結果、脳は他の臓器くらべ変動は少ないものの、母親の n-3 系脂肪酸の不足の影響をうけることが示された。さらに、腎臓は n-3 系脂肪酸が不足した状態で上昇する n-6 系ドコサペンタエン酸の増加が大きいことから、今後、腎臓と LC-PUFA 機能の関係をより詳細に検討していく必要があることが明らかになった。また、乳児期には n-3 系脂肪酸が不足した状態では、 α -リノレン酸は n-3 系脂肪酸源としての効果が弱く、乳幼児においては魚油などに多く含まれる DHA が有効であることが示された。マイクロアレイデータのメタ解析は統一されたデータ数がそろわず、時期尚早であったが、今後さらなる掲載数の増加が予想されるため、データの収載状況を見極め、さらなる検討をつづけていきたい。

研究成果の概要(英文)：

This research aimed to elucidate the effect of docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA) on infant growth using animal experiment and meta-analysis of microarray data. Rats infant brain DHA level declined, when their mothers fed n-3 fatty acid deficient diet at only the gestation and lactation period, although the rate of decline of it was less than other tissues. Kidney n-6 docosapentaenoic acid level was increased in rat infant with n-3 fatty acids insufficient status. Therefore, kidney would be important target tissue for the study of long-chain fatty acid biological function. Alpha-linolenic acid was proved to be unable to improve insufficient n-3 fatty acids status in infant. Therefore, infants need DHA which is abundant in fish oil. About the investigation of meta-analysis of microarray data, the available data related to n-3 fatty acid nutrition were incompatible for meta-analysis at the present point. As listed data is expected to increase, further research would be needed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：食品化学

科研費の分科・細目：水産・水産化学

キーワード：魚油、 ω -3系脂肪酸、ラット、小児栄養、マイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

哺乳類はn-3系脂肪酸のリノレン酸からDHAやEPAなどのn-3系長鎖不飽和脂肪酸(LC-PUFA)を合成できるが、成長の著しい新生児ではその合成は充分でなく、食餌により補う必要がある。実際、母乳にはn-3系LC-PUFAが含まれており、乳児用調整乳へはDHAの添加が推奨されている。成人でもn-3系LC-PUFAの生合成は限定的であり、DHA・EPAを多く含む魚油は妊婦にとってもn-3系LC-PUFAの効率的な供給源である。DHAと脳・視神経の発達との関係はよく調べられているが、乳児期における心臓や腎臓など他の組織での機能性は知られていない。

n-3系LC-PUFAの母乳含量は魚食民族で特に多く、n-3系脂肪酸の摂取量の少ない欧米諸国では少ない。日本では食の欧米化に加え、魚介類の含まれるメチル水銀や重金属の危険性から妊婦の魚介類の摂取を制限する傾向があり、日本人の母乳に含まれるn-3系LC-PUFA含量が減少していると予想される。

n-3系脂肪酸不足下では脳・神経系へのDHAの供給が優先されることから、他の組織でのDHA・EPAの供給不足の影響に興味を持たれる。申請者らは、妊娠ラットをn-3系脂肪酸欠乏食で飼育したとき、母乳のn-3系脂肪酸類が1/3以下に減少すること、この仔に魚油(DHAとEPAを含む)または微細藻類油(DHAを含む)を経口投与すると、両群で血中トリグリセリドの、EPA・DHAが上昇し、微細藻類油でもEPAが上昇することから、DHAからEPAが合成される可能性を指摘した(Kimura et al., Fishery Science, 2005)。さらに、n-3系脂肪酸欠乏食の仔の血清および肝臓のn-3系LC-PUFAは、離乳時には対照の1/2以下で、n-3系LC-PUFA源の投与により回復するが、欠乏・回復の程度は脂肪酸種で異なり、DHAの回復が最も早く、n-3系ドコサペンタエン酸で最も遅いことを明らかにしている。これらの成果は、新生児において栄養条件の違いにより、生体のn-3系LC-PUFAの代謝調節が行われていることを示唆し、他の組織についてもn-3系LC-PUFAの挙動を調べることで、n-3系脂肪酸の変動の影響を受けやすい組織を明らかにできると期待される。

一方、遺伝子発現を網羅的に解析するマイクロアレイ分析は、情報量が多く、生体成分の新規機能解析に最適である。特に Gene Express Omnibus (GEO 全米バイオテクノロジー情報センター)には既存の分析結果がデータベースとして収録されており、これらの横断的解析でn-3系LC-PUFAの機能解析が効率

的にできると期待される。

そこで、本課題では、動物実験でn-3系脂肪酸不足の影響を受けやすい組織を明らかにすると同時に、マイクロアレイデータベースの解析からn-3系LC-PUFAの投与で変化する遺伝子群を選抜し、細胞培養系でのn-3系LC-PUFA添加試験とリアルタイムPCRにより更なる選抜を行う。得られた遺伝子群について、その機能を解析することで、魚油の新たな健康機能を明らかにする。

文献：Kimura F, Endo Y, Fujimoto K, Doisaki N, Koriyama T. Administration of two oils rich in n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids to rat pups of dams fed a diet high in fat and low in n-3 polyunsaturated fatty acids; Fisheries Science, Vol. 71 (2), 431-440, (2005)

2. 研究の目的

本課題は、ドコサヘキサエン酸(DHA)およびエイコサペンタエン酸(EPA)が乳児の生育に与える影響を、動物実験とマイクロアレイデータベースの解析を通して明らかにし、魚油の新たな健康機能を証明することを目的とした。すなわち以下の三点について研究を行った。

(1) n-3系脂肪酸欠乏・補填に対する脳、肝臓、腎臓、心臓等の組織におけるn-3系LC-PUFAの挙動を調べ、n-3系脂肪酸の変動の影響を受けやすい組織の解明。

(2) 植物油に対する魚油のn-3系長鎖不飽和脂肪酸欠乏の改善効果の優位性の証明。

(3) GEOに収録されたn-3系LC-PUFAの投与実験に関するデータセットを横断的に解析し、着目すべき遺伝子の選出。

本研究を通し、乳児期のDHAすなわち魚油の重要性を示すとともに、マイクロアレイデータベース解析を通し、利用が進み始めたマイクロアレイ解析に関する理解を深める。特に既存のマイクロアレイデータベースを利用することにより、効率的に研究を進めることの可能性を探り、さらに、複数のデータの比較を行うことで、マイクロアレイ分析法の最大の問題であるノイズの影響を排除し、再現性のよい結果を得ることができると期待された。

3. 研究の方法

(1) n-3系脂肪酸欠乏・補填に対する脳、肝臓、腎臓、心臓等の組織におけるn-3系LC-PUFAの挙動を調べ、n-3系脂肪酸の変動の影響を受けやすい組織の解明。

SD 系雌ラット (n=6) に n-3 系脂肪酸欠乏食 (落花生油・紅花油の混合油を脂質とした AIN-93G 準拠食) を妊娠 4 日目より与え、誕生した仔ラットを各腹毎に雄雌 3 匹にし、雄雌 1 匹ずつ魚油群、微生物油群、無添加群とした。生後 5 日齢から 21 日齢まで、魚油群と微生物油群には試験油 (魚油または微生物油) を 20% (w/w) 濃度でカルボキシメチルセルロース (CMC) 水溶液に分散したものを、無添加群には CMC 水溶液のみを体重 1g あたり 5 μ l 投与した。離乳後は母獣と同じ餌で飼育し、27 日齢の雄を一晩絶食後、断頭し、各種臓器 (脳、脾臓、肝臓、腎臓、心臓、胸腺) および血漿の脂肪酸組成を対照群 (AIN-93G 食で同様に飼育した母獣 (n=2) の仔) と比較した。

(2) 植物油に対する魚油の n-3 系長鎖不飽和脂肪酸欠乏の改善効果の優位性の証明。
妊娠 4 日目の SD 系雌ラット (n=12) を 2 群に分け、一方を n-3 系脂肪酸欠乏食で飼育し (欠乏食群)、他方は大豆油を油脂源とする餌 (AIN-93G) で飼育した (AIN 食群)。出産後 5 日目にその仔ラットの胃内容物を回収し、脂肪酸組成を測定した。さらにこれらの母ラットから生まれた仔ラットを 4 日目に紫蘇油 (紫蘇・パーム混合油) 群、魚油群、負対照 (1% カルボキシメチルセルロース) 群の 3 群に分け、5 日齢~18 日齢までそれぞれの試料を投与 (12% 脂質乳化液を体重 1g あたり 10 μ l) した。21 日齢で離乳し、12~16 時間の絶食後に断頭により採血し、血漿及び赤血球の脂肪酸組成を測定した。

(3) GEO に記載された n-3 系 LC-PUFA の投与実験に関するデータセットを横断的に解析し、着目すべき遺伝子の選出。
Gene Expression Omnibus に記載された n-3 系 LC-PUFA の投与実験に関するマイクロアレイ分析結果の再解析を行うため、fish oil, docosapentaenoic acid, eicosapentaenoic acid, n-3 fatty acid のキーワードで検索を行い、得られたデータについて、掲載データおよび実験計画の検証を行った。

4. 研究の成果

(1) n-3 系脂肪酸欠乏・補填に対する脳、肝臓、腎臓、心臓等の組織における n-3 系 LC-PUFA の挙動を調べ、n-3 系脂肪酸の変動の影響を受けやすい組織の解明。
n-3 系脂肪酸欠乏で飼育した妊娠ラットの仔に、授乳期に魚油 (EPA を含む n-3 系長鎖不飽和脂肪酸源) または微細藻類油 (EPA を含まない n-3 系長鎖不飽和脂肪酸源) を経口投与し、離乳後に臓器の脂肪酸組成を測定した。母獣が妊娠・授乳期に n-3 系脂肪酸欠乏を摂取することで、各組織中の n-3 系脂肪酸含量は低

下したが、脳は他の組織より減少率が小さかった。n-3 系長鎖不飽和脂肪酸の投与により、組織の n-3 系脂肪酸含量は回復し、特に DHA の回復率が顕著であった (図 1)。すなわち脳は n-3 系脂肪酸含量が高い一方で、飼料の n-3 系脂肪酸含量の変動による影響が小さかった。腎臓は飼料の n-3 系脂肪酸含量の低下で、n-3 系長鎖不飽和脂肪酸含量が減少するが、n-3 系脂肪酸欠乏の指標である n-6 系ドコサペンタエン酸含量の増加が特に顕著で、飼料の n-3 系脂肪酸欠乏の影響を受けやすい臓器である可能性が示唆された。

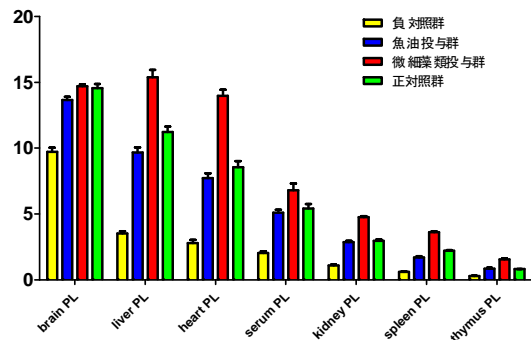
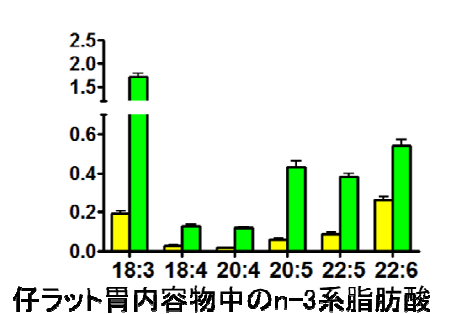


図 1 各組織膜リン脂質の DHA 構成比

(2) 植物油に対する魚油の n-3 系長鎖不飽和脂肪酸欠乏の改善効果の優位性の証明。
母ラットの餌の n-3 系脂肪酸の不足により、仔ラットの胃内容物の n-3 系脂肪酸は有意に減少し、その減少量は ALA で著しかった (図 2)。



***: 二群間で P<0.001 (t検定)

図 2 母親の n-3 系脂肪酸欠乏食摂取が仔ラットの胃内容物 (母乳) の n-3 系脂肪酸構成比に与える影響

n-3 欠乏食を摂取した母ラットから生まれた仔ラットの血漿及び赤血球の ALA 濃度は、大豆油食を摂取した母ラットの仔と比較し、全て有意に低くなった。仔ラットへの投与脂質 (負対照、紫蘇油、魚油) の違いで比較すると、血漿では、魚油投与群の DHA 濃度は親の食餌に関わらず有意に高くなった。一方、赤血球では、n-3 系欠乏食を摂取した母の仔は、魚油投与群は、他の 2 群より有意に高かった

が、大豆油食を摂取した母の仔ラットは3群間で有意な差は見られなかった。負対照群、紫蘇油群、魚油群で、親の餌の影響を調べると、負対照群のDHA濃度は、血漿、赤血球ともに、n-3欠乏食を与えた母ラットの仔が有意に低くなり、魚油投与群では、親の食餌による有意な差は見られなかった。すなわち、仔ラットに直接DHAを与えたことにより、親のn-3系脂肪酸欠乏の影響が解消され、仔ラット血漿と赤血球のDHA濃度が大豆油食並に回復したと考えられた。紫蘇油群のDHA濃度は、母親が大豆油食、n-3系欠乏食いずれの場合も、負対照群とほぼ同程度で、仔ラット体内では、食餌由来のALAからDHAの合成は、n-3系脂肪酸の欠乏状態に関わらず、ほとんど行われていないと考えられた(図3)。

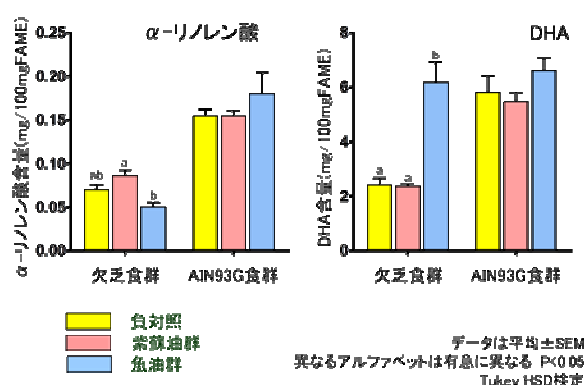


図3 赤血球中のα-リノレン酸およびDHAの構成比

以上の結果より、ALAは成獣ではDHAの前駆体として有効であるが、乳幼児期ラットでは、n-3系欠乏条件下でもDHAの合成が促進されないことが示唆された。

(3) GEOに収録されたn-3系LC-PUFAの投与実験に関するデータセットを横断的に解析し、着目すべき遺伝子の選出。

Gene Expression Omnibusに収録されたn-3系LC-PUFAの投与実験に関するマイクロアレイ分析結果の再解析では、Kothapalliら(2007)、Bordoniら(2007)、Bergerら(2002)のデータを精査したが、Bordoniら(2007)とBergerら(2002)が、再解析に不適当なデータであることが明らかになった。その後、研究期間中にKnoch B(2008)とDe Vogel-van den Bosch HMら(2008)のデータが新たに収録されたが、使用しているプラットホームが異なるため、データベースの統合ができなかった。マイクロアレイデータのメタ解析をn-3系LC-PUFAの機能検索に使用するには、データベースにおける齧歯類を用いたn-3LCPUFAに関する栄養実験のデータが少ないこと、さらに収録されている個々の実験の実験条件、特に脂質含量や脂肪酸組成が大きく異なるこ

とが原因だったと考えられる。

以上の研究により、乳児期にはn-3系脂肪酸が不足した状態では、α-リノレン酸はn-3系脂肪酸源としての効果が弱く、乳幼児においては魚油などに多く含まれるDHAが有効であることが示された。脳は他の臓器に比べn-3系脂肪酸が不足の影響は少ないものの、妊娠中のn-3系脂肪酸不足だけで子の脳のDHAが相当量減少するが、授乳期間のDHAの補填で回復が可能なが示された。また、他の臓器はn-3系脂肪酸不足の影響を受けやすく、DHAが比較的豊富な心臓・腎臓のうち、腎臓はn-6DPAの増加が大きいことから、今後、腎臓とLC-PUFA機能の関係をより詳細に検討していく必要があることが明らかになった。マイクロアレイデータのメタ解析は統一されたデータ数がそろわず、時期尚早であったが、今後さらなる掲載数の増加が予想されるため、データの収載状況を見極め、さらなる検討をつづけていきたい。

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)

1. F. Kimura, S. Ito, Y. Endo, N. Doisaki, T. Koriyama, T. Miyazawa, K. Fujimoto, Long-term supplementation of docosahexaenoic acid-rich, eicosapentaenoic acid-free microalgal oil in n-3 fatty acid-deficient rat pups. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 72, 608-610 (2008) 査読あり

[学会発表] (計7件)

1. 木村 ふみ子、フゲジレット、仲川 清隆、宮澤 陽夫 妊娠・授乳期におけるα-リノレン酸供給の重要性について、日本農芸化学会 東北支部・北海道支部合同支部大会 (東北支部第145回大会), 2010年9月27日, 仙台市
2. 木村ふみ子, 呼格吉楽図, 仲川清隆, 宮澤陽夫 妊娠・授乳期のn-3系脂肪酸の制限が仔ラットのリノレン酸代謝に与える影響, 第62回日本ビタミン学会大会, 2010年6月12日, 盛岡市
3. 木村 ふみ子、平形 一馬、呼格 吉楽図、宮澤 陽夫 離乳期のn-3系脂肪酸不足ラットにおけるαリノレン酸の代謝, 第64回日本栄養・食糧学会大会, 2010年5月23日, 徳島市
4. 木村 ふみ子、呼格 吉楽図、宮澤 陽夫、胎児・授乳期にn3脂肪酸が不足した新生児ラットの長鎖多価不飽和脂肪酸の分布, 日本農芸化学会 2010年度大会, 2010年3月28日, 東京大学(東京都)

5. 木村 ふみ子、フゲ ジレト、仲川 清隆、宮澤 陽夫、仔ラットの胃内容物に含まれる長鎖多価不飽和脂肪酸に関する研究、日本脂質栄養学会第18回大会、2009年9月4日、コクヨホール(東京都)
6. Fumiko Kimura, Yasushi Endo, Teruo Miyazawa, Kenshiro Fujimoto, Excess docosahexaenoic acid gets retroconverted to eicosapentaenoic acid in rat pups of dams fed a diet low in n-3 polyunsaturated fatty acids, The 1st International Conference on Lipid Hydroperoxide Biology and Medicine Sendai 2009, 2009年11月5日, Hotel Sendai Plaza (Sendai)
7. Fumiko Kimura, Risa Okada, Junko Natsusaka, Teruo Miyazawa, Yasushi Endo, Kenshiro Fujimoto, Effect of fat content in the daily diet on the postprandial serum triglyceride levels in rats, The 1st International Conference on Lipid Hydroperoxide Biology and Medicine Sendai 2009, 2009年11月5日, Hotel Sendai Plaza (Sendai)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 ふみ子 (KIMURA FUMIKO)
東北大学・大学院農学研究科・助教
研究者番号：50321980

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：