

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21380076

研究課題名（和文）ライフスタイルを包括した統合型ニュートリオミクス研究の基礎と展開

研究課題名（英文）Basic and Applied Research on Integrated Nutriomics Encompassing Various Aspects of Lifestyle

## 研究代表者

加藤 久典 (KATO HISANORI)

東京大学・総括プロジェクト機構・特任教授

研究者番号：40211164

## 研究成果の概要（和文）：

食品を摂取した動物がどのような応答を示すかを、多数の分子を網羅的に解析するオミクス解析という手法で解析した。遺伝子発現量、タンパク質量、代謝物量など、様々な網羅的解析を組み合わせた。この方向の研究を推進するためのデータベースや解析ツールを改良し、その有効性を実証した。食品のみならず、運動や日内リズムなど関係する生活習慣の影響も合わせて解析することに成功した。

## 研究成果の概要（英文）：

Methods for analyzing huge kinds of biological molecules, which are so called “omics” methods, were employed to exhaustively examine the response of animals to consumption of specific foods. Multiple exhaustive analyses including those for the levels of mRNA, proteins, and metabolites were combined. Efforts were made to improve a database and an analytical tool for the promotion of these types of researches, and their effectiveness was proved. The effects of factors relating to dietary habits, which include exercise and circadian rhythm were also examined.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	7,100,000	2,130,000	9,230,000
2010年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2011年度	3,200,000	960,000	4,160,000
年度			
年度			
総計	14,000,000	4,190,000	18,200,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：ニュートリゲノミクス、遺伝子発現、栄養、生活習慣、運動、日内リズム

## 1. 研究開始当初の背景

網羅的分子解析技術が進化して、食品の機能や安全の研究においても、トランスクリプトーム解析等がさかんに活用されるようになってきた。しかし、このような膨大なデ

ータが得られる実験系に栄養・食品学者が参入するにあたって、新しい情報処理の概念を前提としていない場合が多く、十分な解析を行えない、あるいは誤った結論を導く可能性も高くなっていることは否めない状況であ

った。また、正しい栄養の摂取や食品の機能性の活用という意味において、何を食べるかという点の他に、「いつ」「どのように」食べるかという部分も重要であることもさらに広く認識されるに至っている。健康に関わる生活習慣のうち、運動と日内リズムは、摂取する食品の影響に強く影響を及ぼしうる。最近、時間栄養学の進歩が著しく、食品と生体リズムの相互作用の解明が進んできた。このような様々な生活習慣を視野に入れての食品の機能性解析を、網羅的手法を効率よく取り入れて推進することの重要性は明白と考えられた。

代表者らは、既にニュートリゲノミクスデータベースを構築・公開し、食品の分野におけるオミクスデータを有効に利用する道具を提供してきた。一種類のオミクス解析に留まらず、トランスクリプトミクス、プロテオミクス、メタボロミクスといった、様々なオミクス解析を組み合わせて重要な情報を効率的に取得するために、このデータベースを改良し、さらに各オミクスの結果を同時に解析できるツールの構築は、非常に有用性が高いと考えられた。また、それらの情報を食品の機能性解析において効果的に活用するためには、基礎的な栄養条件への応答を解析する参照データの蓄積も重要であると考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究は、食事の内容に加えて、運動や生活リズムなど他のファクターを視野に入れ、各種の生体分子の網羅的解析を組み合わせることで、食が生体に及ぼす影響を総合的に理解することを目的とした。まず、運動による肝臓の遺伝子発現プロファイルへの影響を明らかにし、また運動パフォーマンスに効果があるとされているタウリンに着目し、遺伝子レベルでその機能メカニズムを明らかとすることを試みた。また、生体リズムにおける摂食の影響を探るために、摂食後に急速に発現が変動する遺伝子を網羅的に探索することにした。

また従来の食品機能のオミクス解析は、トランスクリプトームレベルでの検討がほとんどであるが、プロテオームやメタボロームも含めての変動の基礎的なデータの取得を試みた。すなわち、マイルドなカロリー制限に対するプロテオミクス解析をさらに進めたほか、タンパク質栄養悪化への応答をメタボロミクスレベルからも調べることにした。このようなオミクス解析の組み合わせを、有効に推進するため、データベースや解析ツールの改良を試みた。それらのツールを実際に活用しての、食品の機能性解析の応用の可能性を探るため、コーヒー成分摂取、香辛料摂取などについて、オミクスデータの解析を進

めることも試み、膨大なデータを効率的に解析できるツールであることを実証した。包括的なニュートリオミクスのもう一つの方向として、ライフステージの一時期の栄養とその後の表現型との関係を、胎児期低タンパク質の系を用いて明らかにすることも試みた。

## 3. 研究の方法

ラット (Wistar 系、SHRSP 系、SD 系) またはマウス (C57BL) を試験期間の飼育の後、深麻酔下で採血を行い安楽死させた。肝臓、筋肉、脂肪組織等を採取し、それらから RNA の抽出やタンパク質の調製を行った。RNA は DNA マイクロアレイ解析 (GeneChip, Affymetrix) に供し、いくつかの遺伝子の発現に関してはリアルタイム PCR によって、mRNA 量の結果を確認した。プロテオーム解析については、2次元電気泳動により各群で有意に量の異なるタンパク質スポットを確認し、スポット中のタンパク質をトリブシン処理後に MALDI TOF-MASS により同定した。メタボローム解析については、Human Metabolome Technologies 社に委託し、CE-MASS によって行った。

## 4. 研究成果

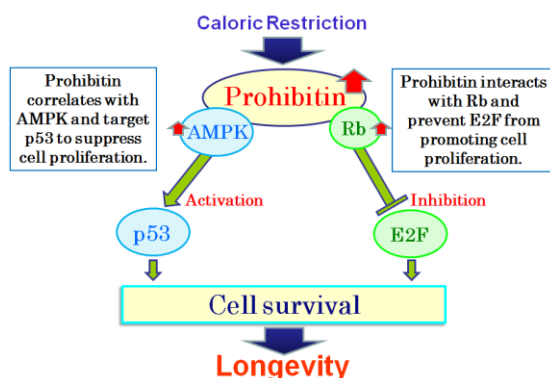
まず、最も適切な運動モデルを設定するため、運動の方法、時間、強度の検討を行った。高脂肪食を摂取させたラットをトレッドミルで走行させ、遺伝子発現の変化を DNA マイクロアレイにより網羅的に解析したところ、グルココルチコイド受容体などの変化が認められた。さらに、運動負荷と食品成分の相互作用を明らかにするため、2週間タウリンを与え ICR マウスにおいて、トレッドミルにより 30 分運動をさせ、肝臓において脂質代謝や糖代謝に関わる遺伝子の発現を解析した。脂肪酸不飽和化酵素 SCD1 の発現がタウリン群で有意に減少しており、脂肪合成が減少していることが示唆された。タウリン投与の遺伝子発現に対する効果を DNA マイクロアレイ解析により調べた結果では、カルボン酸代謝、プロテインキナーゼ経路、細胞死抑制に関わる遺伝子群が顕著に発現変動していた。筋管細胞を用いての検討では、タウリンにより糖の利用が低下することが明らかとなり、エネルギー源として脂質の利用が向上していることが示唆され、長時間の運動を効率よく行うことに寄与していると考えられた。

さらに、生体リズムが栄養素などの食事因子の効果にどのような影響があるかを調べる基礎データとして、短時間摂食後に末梢での発現が変動してくる時計遺伝子を肝臓の DNA マイクロアレイ解析により調べた。Per2 遺伝子が摂食刺激の応答を非常に顕著に受けることなどが明らかとなり、今後食事と時

間因子との組み合わせを解析する上でのツールとして有効であると考えられた。

マイルドなカロリー制限によって、肝臓のプロヒビチンの量が上昇することを既にプロテオーム解析から明らかにしているが、本年度プロヒビチンの寿命延伸効果に関わるAMPKやRbに関して、マイルドカロリー制限ラット肝臓における遺伝子発現が増加していることなどを明らかにし、プロヒビチン経路がカロリー制限による健康効果に寄与していることを確認した(図1)。この結果は、マイルドなカロリー制限の影響についてのトランスクリプトミクスとプロテオミクスの成果の融合から得られたものである。

また、トランスクリプトミクスとメタボロミクスの統合を目指し、既に得ているタンパク質栄養悪化(無タンパク質食摂取)ラットの肝臓を用いて、メタボロミクス解析に供した。TCAサイクルの中間体や、グルタチオン関連の変化が多く認められ、トランスクリプトミクス解析結果との多くの対応を見出すことができた。



一方、ニュートリゲノミクスデータベース(<http://www.nutrigenomics.jp>)に関しては、インターフェースのさらなる改良や動作の高速化を図り、より便利なツールとして完成に近づけた。トランスクリプトミクス、プロテオミクス、メタボロミクスのデータを統合して俯瞰できる機能を付与させた。これまでに取得したデータの解析に応用し、統合オミクス解析のツールとしての有効性を検証した。例えば、ラットへのアミノ酸(ロイシン)過剰投与の影響について、トランスクリプトームとメタボロームを組み合わせる解析を行い、両者で顕著な変化を示した因子についてクラスター解析に供したところ、両手法の結果は良く相関することが確認された。マウスおよびラットを高脂肪食で飼育し、同時にコーヒーポリフェノールや香辛料成分を摂取させ、肝臓、筋肉について、DNAマイクロアレイ解析を行って、その効果を網羅的に検討した。コーヒー成分では、PPAR gammaとその標的遺伝子の変動が顕著であることが見出された。また、プロテオミクス解析お

よびメタボロミクス解析を行ったところ、TCAサイクルや尿素サイクルの上昇が見られ、エネルギー産生の増加が示唆される一貫した結果が得られた。香辛料特にシナモンの摂取による遺伝子発現プロファイルの変化を既存のマイクロアレイデータと比較することで、香辛料の新たな機能性を解明することが可能となった。さらにロイシン摂取ラットにおいて、肝臓および血液のトランスクリプトームとメタボロームの解析を行い、それら両者からロイシン過剰摂取に応答するバイオマーカーを抽出する手法も確立した。一方、遺伝的高血圧易発症ラットモデルにおいて、妊娠時に低タンパク質食を与え、仔ラットの成長後の血圧を解析するとともに、腎臓等における遺伝子発現プロファイルの解析を進めた。胎児期栄養悪化により、カリクレイン・キニン系やアラキドン酸経路の遺伝子が多く変動していた。これにより、前年度までに進めてきた運動や生体リズムという要因に加えてライフステージの視野も取り込んだ統合オミクスとして発展させることができた。以上、食品関連分野における統合オミクスの試みは、世界で初めてであり、その有効性を内外にアピールすることに成功した。

## 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 11 件)

- ① Otani, L., Sugimoto, N., Kaji, M., Murai, M., Chang, S.-J., Kato, H. and Murakami, T. Role of the renin-angiotensin-aldosterone system in the enhancement of salt sensitivity caused by prenatal protein restriction in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J. Nutr. Biochem.* 査読有、印刷中、2012 DOI:10.1016/j.jnutbio.2011.04.014
- ② Kato, H., Takahashi, S. and Saito, K. Omics and integrated omics for the promotion of food and nutrition science. *J. Trad. Comp. Med.* 査読無、2011, 1, 25-30, DOI: 10.6219/jtcm.2011.009-R
- ③ Takahashi, S., Masuda, J., Shimagami, H., Ohta, Y., Kanda, T., Saito, K. and Kato, H. Mild caloric restriction up-regulates the expression of prohibitin: A proteome study. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 査読有、2011、405、462-467 DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.01.054
- ④ Wu, T., Ni, Y., Kato, H. and Fu, Z. Feeding-induced rapid resetting of the hepatic circadian clock is associated with acute induction of Per2 and Dec1

transcription in rats. Chronobiol. Int. 査読有、2010、27、1-18

DOI: 10.3109/07420520903398625

⑤Kamei, A., Watanabe, Y., Ishijima, T., Uehara, M., Arai, S., Kato, H., Nakai, Y. and Abe, K. Dietary iron deficiency induces a variety of metabolic changes and even apoptosis in rat liver: a DNA microarray study. Physiol. Genomics 査読有、2010、42、149-156

DOI: 10.1152/physiolgenomics.00150.2009

⑥Wu, T., Ni, Y., Dong, Y., Kato, H. and Fu, Z.W. Regulation of circadian gene expression in the kidney by light and food cues in rats. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 査読有 2010 298, 635-641 DOI: 10.1152/ajpregu.00578.2009

⑦Saito, K., Ohta, Y., Sami, M., Kanda, T. and Kato, H. Effect of mild restriction of food intake on gene expression profile in the liver of young rats: reference data for in vivo nutrigenomics study. Brit. J. Nutr. 査読有、2010 104, 941-950 DOI: 10.1017/S0007114510001625

[学会発表] (計 17 件)

①加藤久典 網羅的解析技術による食品の機能性研究の現状 第 65 回 日本栄養・食糧学会大会 2011 年 5 月 15 日 お茶の水女子大学

②Takahashi, S., Masuda, J., Shimagami, H., Ohta, Y., Kanda, T., Saito, K., Kato, H. Mild caloric restriction up-regulates the expression of prohibitin: A proteome study. 11th Asian Congress of Nutrition 2011 年 7 月 15 日 シンガポール

③Saito, K. and Kato, H. Keggler: Web-based visualization tool of omics data for the promotion of nutri-omics study. 11th Asian Congress of Nutrition 2011 年 7 月 15 日 シンガポール

④加藤久典 統合オミクス技術と食品機能性解析第 6 回核酸・核タンパク機能性研究会 学術大会 2011 年 8 月 8 日 北海道恵庭市

⑤高橋祥子、榊田旬子、島上洋、太田豊、神田智正、斉藤憲司、加藤久典 穏やかなカロリー制限による Prohibitin の発現上昇 2011 年日本農芸化学会大会 2011 年 3 月 26 日、京都女子大学 (京都府)

⑥加藤久典 ニュートリオミクスがもたらす栄養学の新展開 日本農芸化学会関東支部大会 2010 年 10 月 2 日 近畿大学 (奈良県)

⑦斉藤憲司、小笠原由貴、加藤久典 食品因子・運動負荷・薬剤がラット肝脂質代謝に与える影響のトランスクリプトーム解析

第 64 回日本栄養・食糧学会大会 2010 年 5 月 23 日 アステイ徳島 (徳島県)

⑧大谷りら、斉藤憲司、末安俊明、村上哲男、加藤久典 SHRSP ラットにおける胎児期の低タンパク質栄養に起因する食塩感受性亢進機構のトランスクリプトーム解析 第 64 回日本栄養・食糧学会大会 2010 年 5 月 23 日 アステイ徳島 (徳島県)

⑨Otani, L., Murakami, T. and Kato, H. Transgenerational Effects of Maternal Protein Restriction During Pregnancy on Salt Sensitivity and Life Span in Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats (SHRSP). 19th International Congress of Nutrition 2009 年 10 月 9 日 BITEK (バンコク)

⑩Saito, K., Ohta, Y., Sami, M., Kanda, T. and Kato, H. Data Storage and Comparative Analysis of Gene Expression Profiles for Promotion of Nutrigenomics Study. 19th International Congress of Nutrition 2009 年 10 月 6 日 BITEK (バンコク)

[図書] (計 5 件)

①佐藤隆一郎、加藤久典 (編) 学文社、基礎栄養学 2012 年 160 ページ

②加藤久典、斉藤憲司 エヌ・ティ・エス、バイオチップ実用化ハンドブック 2010 年、346-352

③Abe, K., Kato, H., Yasuoka, A. and Nakai, Y. Wiley-Blackwell Genomics, proteomics, and metabolomics in nutraceuticals and functional foods. 2010 年、127-154

④加藤久典 シーエムシー出版 食の安全科学の展開—食のリスク予測と制御に向けて 2010 年 98-102

[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

<http://www.nutrigenomics.jp>

<http://www.keggle.jp>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

加藤 久典 (KATO HISANORI)

東京大学・総括プロジェクト機構・特任教授

研究者番号：40211164

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：