

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 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：14602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010 年度～2012 年度

課題番号：22650179

研究課題名（和文） 食物成分刺激による摂食関連 mRNA・miRNA の発現調節解析

研究課題名（英文） Expressional and regulatory characterization of mRNA and miRNA for food-intake related molecules

研究代表者 松田 覚

(MATSUDA SATORU)

奈良女子大学・研究院生活環境科学系・教授

研究者番号：50242110

研究成果の概要（和文）：

一般に使用される香辛料やハーブなどの成分をターゲットとして、各種標的細胞からどのような摂食関連分子の誘導を引き起こすのか、細胞シグナル伝達にかかわる mRNA や miRNA の発現を調べ、体内の食欲増進や健康の維持にどのように働くのかを分子生物学的に探究した。例えば種々のローズマリーやセージ刺激などによって AKT1 などの遺伝子発現がどのように変化するのかを培養細胞系において検討し、誘導される遺伝子をウエスタンブロッティングや蛍光組織染色などを用いて解析し、摂食システムやそれらの細胞シグナル伝達との関わりを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Some of herbs and spices have shown potential in preventing the occurrence and/or progression of cancer and other chronic diseases including anorexia. They are being screened to explore the possibility of development of feasible medical drugs by analyzing the expression of mRNA and miRNA. For example, mRNA and protein expression levels of AKT1 were reduced compared with the control cells 48 hours after these herbal treatments in cells treated with sage or rosemary extract.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	0	1,500,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	420,000	3,320,000

研究分野：食品機能分子生物学

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：健康と食生活・遺伝子発現・細胞内シグナル伝達・摂食ホルモン

1. 研究開始当初の背景

高齢者や若年者のダイエット施行中の中には摂食障害を起こしているケースが多い。また高レベルの食欲不振や拒食症は医学的に

も重要な問題を含み治療が難しい。古来いろいろな香辛料の適度の摂取が、こうした場合に安全な食欲増進効果をもたらし、一部に良好な結果を得てきたことが知られている。一

方最近のバイオ研究から、食欲の調節には短鎖ペプチドなどからなる摂食ホルモンが重要な役割を担っていることが明らかになっている。

2. 研究の目的

本研究では一般に使用される香辛料の成分をターゲットとして、各種標的細胞からどのような摂食ホルモンの誘導を引き起こすのか、ペプチドホルモンの mRNA の発現を調べる。さらに、サイトカインやマイクロ RNA の誘導を解析して、体内の食欲増進にどのように働くのかを細胞内シグナル伝達系を中心とした分子生物学的に解明することを目的とする。

3. 研究の方法

種々のスパイス刺激やカプサイシンなどによって、ホルモン産生がどのように変化するのかを培養細胞系において検討する。また同様にして、誘導されるマイクロ RNA を解析して、摂食システムとの関わりを追及する。解析手法として、ウエスタンブロッティングや蛍光組織染色そして *in situ* ハイブリダイズを行い、正常細胞と比較検討する。そしてそれぞれの細胞内分子のリン酸化動態を解析する。さらに血中の摂食ホルモン量の解析や mRNA や miRNA の遺伝子発現変化の推移を詳しく検討する。用いる細胞としては Jurkat 細胞や HEK293 細胞の他、U937 や MKN7 など種々の遺伝子の発現が検出可能な細胞で検討を加える。誘導が確認されたマイクロ RNA はその塩基配列を決定して、生理作用を追及する。上記の刺激作用が明らかになった香辛料について、どの成分が誘導を担うのかについても検討する。培養細胞の cDNA ライブラリーからグレリンやレプチンの遺伝子全長をクローニングした後、

GST や His タグなどとの融合蛋白質を作製・精製し、培養細胞系における活性を測定する。また、摂食ホルモンの細胞内シグナル伝達系にかかわると考えられるアダプター蛋白質をクローニングして、神経細胞やリンパ球においてその機能を探求し、新規アダプター分子の中で NESCA や NESH については特異抗体を作製し、摂食ホルモン発現に至るシグナル伝達系を解析する。AKT などのシグナル伝達系キナーゼの活性化を調査する。

4. 研究成果

最初に培養細胞の cDNA ライブラリーからグレリンやレプチンの遺伝子全長をクローニングした後、GST や His タグなどとの融合蛋白質を作製・精製し、培養細胞系における活性を測定した。また、種々のスパイス刺激やカプサイシンなどによって、摂食ホルモン産生がどのように変化するのかを培養細胞系において検討した。解析手法として、RT-PCR 法、ウエスタンブロッティング法や蛍光組織染色法を用い、Jurkat 細胞や HEK293 細胞の他、U937 や MKN7 など上記の解析を始めた。この結果、各種香辛料のエタノール抽出液刺激によって、特定の遺伝子発現制御が起こりうることを示した。たとえば、グレリン遺伝子は赤トウガラシによって発現が上昇した。その他、癌の発症や悪性化に関わる BRCA1 や TIMP-1 の発現がセージなどのハーブ抽出液によって変化した。また、しょうが抽出液によって心臓の機能をコントロールしている CNOT3 の発現が上昇した。これらの発現は mRNA レベルだけでなくたんぱく質レベルでも検出された。これらのことより、香辛料やハーブの成分には未だ知られていない遺伝子発現制御を介した有用作用があることが示された。これら研究成果を欧文論文として

発表するなど、本研究助成によって十分な研究の進展があった。香辛料が胃腸を単に刺激するのみならず、摂食ホルモンやサイトカインやマイクロRNAなどの遺伝子発現誘導を介して、積極的かつ機能的に食欲の調節を行うことが明らかにできれば、味覚以外での香辛料の有意義な作用を論理的に再発見できる可能性が高い。摂食ホルモンやマイクロRNAの解析は斬新であり、本研究でも明らかにしたような細胞生物学的に未知の知見をもたらしたと考えられる。

香辛料の適度の摂取が安全な食欲増進効果を引き出すのに良好な結果を得てきたことが知られている。また、食欲の調節には短鎖ペプチドなどからなる摂食ホルモンが重要な役割を担っていることが明らかになっている。そこで一般に使用される香辛料の成分をターゲットとして、各種標的細胞からどのような摂食ホルモンの誘導を引き起こすのか、ペプチドホルモンのmRNAの発現を調べ、サイトカインやマイクロRNAの誘導を解析して、体内の食欲増進にどのように働くのかを分子生物学的に探究した。種々のスパイス刺激やカプサイシンなどによってグレリンやレプチンなどのホルモン産生がどのように変化するのかを培養細胞系において検討し、誘導されるマイクロRNAをウエスタンブロッティングや蛍光組織染色そしてin situハイブリダイズを用いて解析し摂食システムとの関わりを追及した。摂食ホルモン発現に関与する食事成分と、Caveolin・SHPS-1およびSIRPa1や多重合型Fibronectinとの関係を調べ、遺伝子発現系にこれら分子を介した食事成分があることを明らかにした。窪み構造下でのリガンドレセプターの相互作用と情報伝達が3次元的にどのように行われるか検討し、カベオリンやSrcに対する特異抗体を用い、免疫沈降や蛍光細胞染色によって局在を確認すると共に成長因

子やインスリンそしてカルシウム負荷における変化を追跡した。それらの成果として研究結果を踏まえて効果的な食事のデザインを考案した。さらに臨床においても効率よく利用できるよう、生体内で起こる分子群の情報のやりとりに注目しながら、摂食障害やメンタル疾患などの治療や予防へと結びつける示唆と考察を総説論文として発表した。そして今後の研究につなげるため、ここまで得られた情報を基に適切な食生活レベルでの方法を提案している。

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 9 件)

1. **Matsuda S**, Kobayashi M, Kitagishi Y. Expression and Function of PPARs in Placenta. *PPAR Res.* 2013;256508, 2013.
2. **Matsuda S**, Kitagishi Y, Kobayashi M. Function and characteristics of PINK1 in mitochondria. *Oxid Med Cell Longev.* 2013;601587, 2013.
3. Kitagishi Y, Kobayashi M, Kikuta K, **Matsuda S**. Roles of PI3K/AKT/GSK3/mTOR Pathway in Cell Signaling of Mental Illnesses. *Depress Res Treat.* 2012;752563, 2012.
4. Kitagishi Y, Kobayashi M, **Matsuda S**. Defective DNA repair systems and the development of breast and prostate cancer. *Int J Oncol.* 42(1):29-34, 2012.
5. Okumura N, Yoshida H, Nishimura Y, Kitagishi Y, **Matsuda S**. Terpinolene, a component of herbal sage, downregulates AKT1 expression in K562 cells. *Oncol Lett.* 3(2):321-324, 2012.
6. Kitagishi Y, Nishimura Y, Yoshida H, Okumura N, Murakami M, **Matsuda S**.

Peppermint up-regulated JMJD1B protein expression in Daudi culture cells. Int. J. Curr. Res. 3:365-368, 2011.

7. Yoshida H, Okumura N, Kitagishi Y, Nishimura Y, **Matsuda S**. Turmeric and curcumin repressed presenilin1 protein expression in Jurkat cells. Experimental and Therapeutic Medicine 2:629-632, 2011.
8. Nishimura Y, Kitagishi Y, Yoshida H, Okumura N, **Matsuda S**. Ethanol extracts of black pepper or turmeric down-regulated SIRT1 protein expression in Daudi culture cells. Molecular Medicine Reports 4: 727-730, 2011.
9. Yoshida H, Okumura N, Kitagishi Y, Nishimura Y, **Matsuda S**. Ethanol extract of Rosemary repressed PTEN expression in K562 culture cells. Int J appl Boil pharm Technol 2:316-322, 2011.

[学会発表] (計 4 件)

1. ○北岸靖子、**松田覚**「食品成分刺激による細胞内リン酸化蛋白質の変化」日本家政学会第 65 回大会、東京、2013 年 5 月 18 日
2. ○西村友里、吉田仁美、奥村奈央子、北岸靖子、立石知佳、**松田覚** 「香辛料による老化遺伝子発現調節の解析」日本家政学会第 63 回大会、千葉、2011 年 5 月 28 日
3. ○北岸靖子、吉田仁美、**松田覚**「食品成分を用いた毒性の低い遺伝子導入試薬開発の試み」日本家政学会第 62 回大会、広島、2010 年 5 月 29 日
4. ○吉田仁美、北岸靖子、西村友里、**松田覚**「香辛料刺激による摂食ホルモン遺伝子発現調節の検討」日本家政学会第 62 回大会、広島、2010 年 5 月 29 日

[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
特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松田 覚 (MATSUDA SATORU)
奈良女子大学・研究院生活環境科学系・教授
研究者番号：50242110