

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700820

研究課題名(和文) マグネシウム欠乏食短期投与ラット肝臓の栄養素代謝のトランスクリプトーム解析

研究課題名(英文) Transcriptome analysis of the effects of short-term dietary magnesium deficiency on the hepatic nutrition metabolism in rats.

研究代表者

石島 智子 (ISHIJIMA, Tomoko)

東京大学・農学生命科学研究科・助教

研究者番号：80568270

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：生体内現象は遺伝子活動を反映する。マグネシウム(Mg)欠乏食投与2週間および3日間のラットの肝臓における発現変動遺伝子の網羅的な解析を行ったところ、肝臓におけるエネルギー代謝全体が変化することが示唆された。この変動は、4週間のMg欠乏食投与時と類似しており、4週間投与で観察された遺伝子発現変動は、既に3日間投与の段階で引き起こされていることが明らかになった。また2週間投与あるいは3日間投与では、幾つかの血清中の生化学的指標および肝臓中の遺伝子発現変動に異なる部分があり、投与期間に特徴的な変化も捉えることができた。

研究成果の概要(英文)：We performed a global analysis of hepatic gene expression in rats fed a magnesium (Mg)-deficient diet for a shorter term (2 weeks or 3 days), with the result that hepatic energy metabolism was changed to a greater or lesser extent. These changes were generally similar to those in rats fed the same Mg-deficient diet for a longer term (4 weeks). Thus it is likely that overall changes in hepatic energy metabolism in rats fed the Mg-deficient diet for the longer term are already induced shortly. However, changes in some serum biochemical parameters and some hepatic gene expression in rat fed the Mg-deficient diet were different between the two administration periods. We also characterized temporal factors specific to the difference in the Mg-deficient administration periods.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：マグネシウム欠乏 短期投与 ラット 肝臓 栄養素代謝 エネルギー代謝 トランスクリプトーム解析

### 1. 研究開始当初の背景

マグネシウム(Mg)は、生体内において酵素作用、カルシウムとの拮抗作用、また骨の構成成分としての機能や、体温・血圧の調節、神経の興奮、筋肉の収縮など多くの生理的および生化学的作用に参与している。

Mg の不足状態が生体に及ぼす影響については、Mg 欠乏食を投与したラット (Mg 欠乏ラット) を用いて多くの研究が行われてきた。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から糖質、脂質、ビタミン、そしてミネラルといった各栄養素の代謝における Mg 欠乏食投与の影響については明らかにされてきた。Mg 欠乏食投与によるタンパク質代謝への影響についてはあまり知見が得られていなかったことから、報告者が検討を行ったところ、タンパク質栄養状態の低下が引き起こされることが明らかになった (Nemoto T *et al.* Magn Res 2006)。以上のように個々の栄養素の代謝と食餌性 Mg との関連性は、明らかにされてきた。

一方、前述の通り 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参与しており、特に約 300 種類の酵素の補因子として代謝に参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ていると想定された。生体内における栄養素の代謝は、エネルギー源としての利用など個々の栄養素の代謝と区切って考えることができない。多くの先行研究の結果を並べても、条件が異なることなどから一定の見解が得られず、栄養素代謝全般への影響を捉えることは困難である。同一条件下で網羅的な解析を行い、栄養素全般として Mg 欠乏食投与によって引き起こされる代謝変化を捉えることが重要であるが、このような解析した例はなかった。そこで報告者は、まず Mg 欠乏の影響として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 Mg 欠乏食投与を行ったラットの肝臓において DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析を行い、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。その結果、Mg 欠乏食投与により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、正常食を投与し、飼料中 Mg 濃度を回復することにより、Mg 欠乏による遺伝子発現変動がどのように変化するのかを解析した。その結果、Mg 欠乏食投与によって発現変化を示した遺伝子の約 80% の遺伝子が Mg 欠乏食投与によって示された変化に対し逆向きの変化を示し、さらにそのうち約 80% の遺伝子の発現量が正常食投与と同程度まで回復した。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。

### 2. 研究の目的

報告者は、先行研究としてまず比較的遅い段階で引き起こされる Mg 欠乏食投与による影響の現れる 4 週間と長期投与の解析を行ったが、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された。また 4 週間の Mg 欠乏食投与では食餌性 Mg の欠乏による直接的な影響だけでなく、他のミネラルや栄養素とのアンバランスによって引き起こされる間接的な影響も含まれると考えられた。よって 4 週間よりも早期の解析を行うことにより Mg 欠乏の直接的な影響が見られるということも推察された。

そこで本研究では、4 週間よりも短期の Mg 欠乏食投与を行ったラットの肝臓において DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析を行い、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目的とした。4 週間よりも短い Mg 欠乏食の投与期間として、現象面の変化が現れるいくつかのポイントを選択し、各解析ポイントにおいて DNA マイクロアレイ解析と血液および臓器中の生化学データの取得を行い、遺伝子発現変化と生化学的指標の変動との関連性について考察を行う。また経時的な変化についても検討することとした。

### 3. 研究の方法

(1) 【2 週間の Mg 欠乏食投与を行ったラット肝臓の栄養素代謝に対するトランスクリプトーム解析】

Mg 欠乏食投与による成長抑制が引き起こされる前ではあるが、血清中の Mg 濃度やタンパク質濃度の低下、体内窒素保留量の低下が観察される 2 週間を第一のポイントとして解析を行った。

飼料は AIN-93G 飼料組成に基づき作製し、Mg 欠乏食は Mg 給源である酸化マグネシウムを添加せずに調製した。

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 2 群に分け、正常食および Mg 欠乏食を 2 週間投与した。なお、Mg 欠乏食投与により飼料摂取量の低下が引き起こされることから、飼料摂取量を等しくするため、正常食投与群は Mg 欠乏食投与群に対しペアフィードイングを行った。飼料投与 2 週間後、解剖を行い血液の採取と肝臓の摘出を行った。

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・タンパク質) について測定を行った。

DNA マイクロアレイ解析に用いるため、肝臓からは total RNA を抽出した。DNA マイクロアレイ解析の過程は Affymetrix 社のマニュアルに従い、抽出した total RNA から 3' IVT Express Kit を用いて aRNA を作成し、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、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や Mg 欠乏食投与によって発現が有意に変化した遺伝子の抽出を行った。またこれらの遺伝子群の機能的な特徴についても解析した。

#### (2) 【3日間の Mg 欠乏食投与を行ったラット肝臓の栄養素代謝に対するトランスクリプトーム解析】

現在までに行われてきた Mg 欠乏食投与ラットに関する先行研究の中で最も短い Mg 欠乏食投与期間と思われる 8 日目において、血漿中の Mg 濃度やタンパク質濃度の低下、サイトカイン濃度の上昇といった血液中の生化学的指標の変化が観察されていた (Nassir F *et al.*, Nutr Res 2002)。このことから 1 週間以内をポイントとして解析を行うことを検討し、Mg 欠乏食投与による飼料摂取量の低下が引き起こされる前の Mg 欠乏食投与 3 日目での解析を試みた。

飼料は AIN-93G 飼料組成に基づき作製し、Mg 欠乏食は Mg 給源である酸化マグネシウムを添加せずに調製した。

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 2 群に分け、正常食および Mg 欠乏食を 3 日間投与した。なお、Mg 欠乏食投与 3 日目は飼料摂取量の有意な低下が引き起こされる前ではあるが、飼料摂取量を等しくするため、正常食投与群は Mg 欠乏食投与群に対しペアフィーディングを行った。飼料投与 3 日後、解剖を行い血液の採取と肝臓の摘出を行った。

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・タンパク質) について測定を行った。

DNA マイクロアレイ解析に用いるため、肝臓からは total RNA を抽出した。DNA マイクロアレイ解析の過程は Affymetrix 社のマニュアルに従い、抽出した Total RNA から 3' IVT Express Kit を用いて aRNA を作成し、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、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や Mg 欠乏食投与によって発現が有意に変化した遺伝子の抽出を行った。またこれらの遺伝子群の機能的な特徴についても解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 【2 週間の Mg 欠乏食投与を行ったラット肝臓の栄養素代謝に対するトランスクリプトーム解析】

Mg 欠乏食投与により血清中 Mg 濃度の有意な低下が観察され、Mg 欠乏が引き起こされていることを確認した。また血清中のトリグリセリド、LDL コレステロールの有意な上昇、グルコース、HDL コレステロール、総タンパク質およびアルブミン濃度の有意な低下が Mg 欠乏食

投与により示された。

肝臓の DNA マイクロアレイ解析の結果、階層的クラスタ解析では、正常食投与群と Mg 欠乏食投与群で大きくクラスタが分かれ、正常食投与と Mg 欠乏食投与では肝臓での遺伝子発現様式が大きく異なることが示された。

Mg 欠乏食投与により発現が有意に変化した遺伝子を抽出し、それらの機能的な特徴について解析したところ、脂質、糖質および有機酸の代謝、ホルモン刺激や栄養素への応答、免疫・炎症応答に関する遺伝子が多く含まれていた。

栄養素代謝に関する遺伝子の変動について詳細をみたところ、脂肪酸とコレステロールの生合成および解糖に関係する遺伝子の発現上昇、脂肪酸酸化、コレステロール異化および糖新生に関係する遺伝子の発現低下がみられた。これらの結果から、2 週間の Mg 欠乏食投与でも肝臓におけるエネルギー代謝全体が変化することが示唆された。またこの変動は、4 週間の Mg 欠乏食投与時と類似しており、4 週間投与で観察された変動は、すでに 2 週間投与の段階で引き起こされていることが明らかになった。

##### (2) 【3 日間の Mg 欠乏食投与を行ったラット肝臓の栄養素代謝に対するトランスクリプトーム解析】

Mg 欠乏食投与により血清中 Mg 濃度の有意な低下が観察され、Mg 欠乏が引き起こされていることを確認した。血清中トリグリセリド濃度は、2 週間投与同様に Mg 欠乏食投与により有意な上昇を示した。また血清中総コレステロール濃度も 2 週間投与同様に有意な差はみられなかった。2 週間の Mg 欠乏食投与で有意差のみられた血清中の LDL コレステロール濃度の上昇、HDL コレステロールおよびグルコース濃度の低下は、3 日間投与では観察されなかった。

肝臓の DNA マイクロアレイ解析の結果、階層的クラスタ解析では、正常食投与群と Mg 欠乏食投与群で概ね大きくクラスタが分かれ、既に 3 日間の Mg 欠乏食投与で肝臓での遺伝子発現様式は大きく変化することが示された。

Mg 欠乏食投与により発現が有意に変化した遺伝子を抽出し、それらの機能的な特徴について解析したところ、栄養素代謝、炎症応答を含む刺激応答、細胞周期に関する遺伝子が多く含まれていた。

栄養素代謝に関する遺伝子については、脂肪酸およびコレステロールの生合成に関係する遺伝子の発現上昇、脂肪酸酸化に関係する遺伝子の発現低下がみられ、概ね脂質代謝に関しては 2 週間投与と同様な変化が示唆された。

細胞周期に関する遺伝子の発現変動は、3 日間の Mg 欠乏食投与により観察されたことから、Mg 欠乏食投与は、一過的な細胞周期制御に影響を与える可能性が示された。

### (3)【Mg 欠乏食投与 2 週間投与と 3 日間投与の影響の違いについて】

両投与期間において、Mg 欠乏食投与により Mg 欠乏状態が引き起こされていることは確認できた。その上で DNA マイクロアレイ解析の結果、肝臓における遺伝子発現様式は投与 3 日目から既に正常食投与と Mg 欠乏食投与で異なることが明らかになった。栄養素代謝に関しては、特に脂質代謝に関する遺伝子が投与 3 日目から変動を示すことが明らかになった。これについてトリグリセリド（中性脂肪）の変動については、肝臓の遺伝子発現変動から推測される、血清中濃度の上昇を示したのに対し、コレステロールの変動については、肝臓の遺伝子の発現の変動は見られたものの、血清中における変化はみられなかった。2 週間の投与では血清中 LDL コレステロール濃度の上昇や HDL 濃度の低下が観察されたことから、Mg 欠乏食投与によるコレステロール代謝への影響においては、遺伝子の発現変動が先行していることが示唆された。また、2 週間投与では血清中のトリグリセリドとコレステロール濃度は両指標とも有意な変動を示していたが、3 日間投与ではトリグリセリドのみが有意な変化と異なる変動を示したことから、これらの指標に対する Mg の影響（関与）の違いが 2 つの投与期間の解析により明らかになった。

## 5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 1 件)

中村紀章、短期間のマグネシウム欠乏食摂取ラットにおける肝臓の遺伝子発現解析、日本農芸化学会 2012 年度大会、2012 年 3 月、京都女子大学（京都）

〔その他〕

石島智子、マグネシウム欠乏の経時的生体変化の解析、東京大学 ILSI Japan 寄附講座「機能性食品ゲノミクス」 期研究成果シンポジウム「“食と健康”をめざす統合食品科学のニューフロンティア」、2012 年 6 月、東京大学（東京）

## 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