

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：82704

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350177

研究課題名(和文) ニュートリゲノミクスによる自然薯ムカゴの生理的機能の検証

研究課題名(英文) Evaluating the physiological functionality of a Japanese yam propagules by nutrigenomics

研究代表者

篠崎 文夏 (SHINOZAKI, Fumika)

公益財団法人神奈川科学技術アカデミー・未病改善食品評価法開発プロジェクト・研究員

研究者番号：00359647

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：自然薯ムカゴを高脂肪負荷マウスに投与し、その機能性の評価を試みた。高脂肪負荷により血漿アラニンアミノ基転移酵素濃度および肝臓中の中性脂肪は上昇した。高脂肪とムカゴの同時摂取は、有意ではないがそれらの上昇を抑制した。肝臓の遺伝子発現解析では、ムカゴの摂取によって高脂肪負荷によって起こる脂肪酸代謝の異常および酸化ストレスや小胞体ストレスを軽減すると示唆された。以上の結果から、高脂肪負荷時の自然薯ムカゴ摂取は高脂肪負荷による代謝異常を軽減することによって、肝障害の発生を遅延させる効果がある可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Our present study investigates the functionality of Japanese yam propagules using high-fat loaded mice, with significant increase in plasma alanine-amino transferase concentration and hepatic triacylglycerol level. However, high-fat loading together with propagules suppressed the increases of these parameters. Hepatic transcriptome revealed that the ingestion of propagules mitigated fatty acid metabolic disorder, oxidative stress and ER stress. The mice fed on Japanese yam propagules may thus delay the generation of their hepatic disorder through the modulation of metabolic disorder.

研究分野：食品科学

キーワード：食品機能性 ニュートリゲノミクス 遺伝子発現解析 自然薯ムカゴ

1. 研究開始当初の背景

食品の「三次機能」である体調調節機能を有する食品は「機能性食品」と呼ばれる。特に、肥満、高血圧、糖尿病などの生活習慣病のリスク軽減効果などを有する機能性食品は健康維持に有効とされ、現在では機能性を持つ新規食品とその成分の発見・開発が盛んとなっている。機能性食品は、薬剤とは異なって即効性はないが、長期間にわたって摂取し続けることによって徐動性を示すことから、通常の食事を補うものである。また、食品であることから成分は単一ではなく複合的であり、その機能的な効果も多岐にわたり、評価しなければならぬ項目も多い。このようなことから、食品の機能性の評価には長い時間と労力を要されてきた。食品の機能性評価には培養細胞を用いる *in vitro* の方法と生体を用いる *in vivo* の方法があるが、いずれも長所短所がある。培養細胞は、簡便であり多くの素材を一気にスクリーニングするのに適しているが、代謝後の効果を見ることができない。また、細胞の由来によって効果が異なること、場合によっては生体とは同じ反応が得られないことにも留意しなくてはならない。生体においては、経口摂取して、消化管を通過し消化・吸収の過程を経た後、つまり代謝された後の作用を見られるため、食品の効果を検証するにはこちらが適していると考えられる。しかし、フェノタイプとしての効果の確認には個体差があるため数多くの動物と長期飼育が必要な場合がある。また、健康な正常個体では変化を捉えにくく、通常よりも負荷をかけた状態で検証せざるを得ない場合も多い。

フェノタイプが現れる前には遺伝子応答に変化があるので、これを捉えることで次に起こりうる現象を推測可能であると考えられる。これまでに食品や食品成分を実験動物に摂取させた後の遺伝子発現変動を解析することによって、食品や食品機能成分の効果を検証してきた (Kamei *et al.*, 2013; Watanabe *et al.*, 2011; Yao *et al.*, 2010)。また、本手法では一度の実験で多くの臓器を採取することで対象とする食品成分の効果を全身でとらえることが可能であるという利点がある。

生薬に属する食材は機能性食品としての有力候補である。しかしながら、その効果は伝承によるものが多く科学的エビデンスに乏しい。これからはより効果的に生薬食材を利用するために、その効果・効能を科学的に検証し、科学的エビデンスに基づいた抗生活習慣病食品開発に結び付けることが重要である。

2. 研究の目的

生薬食材の一種である自然薯は、その根の部分の皮を除去して乾燥させたものは山薬として漢方薬に利用されている。自然薯は通常食べるときには、他のヤマノイモ類とは異

なり、皮ごと食べる。そのため、山薬とは異なる効果が期待される。これまでに伝承されている自然薯の効果効能は、スタミナ増強 疲労回復 胃弱 消化不良 糖尿病など多岐にわたる。

自然薯は葉の付け根にできるムカゴも食用で、加熱後皮ごと食べる。加熱後のムカゴ乾燥粉末の成分を調べたところ、ビタミンK やカロテン類が他のヤマノイモ類よりも多く、また、ポリフェノール類も比較的多いことがわかり、ムカゴも生理的機能を有する食材の有力候補であると考えられた。本研究では、自然薯のムカゴに注目し生理的機能を科学的に検証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ムカゴ試料作製

自然薯ムカゴは神奈川県伊勢原市産のものを用いた。洗浄したムカゴはコンビオープン (フジマック FCE-C) を用いて 100 で 10 分間スチーム処理した後、マッシャーで圧縮粉砕した。その後、凍結乾燥し、石臼型粉砕器で冷却しながら粉末化した。

(2) 動物飼育

機能性の評価はメタボリックシンドロームのモデルとして脂肪負荷による肥満誘導マウスを用いて行った。エネルギー比 45% 高脂肪の餌に コンスターチと置き換えでムカゴ微粉末を 5% 添加し、高脂肪ムカゴ飼料 (HFD+P) を作製した。また、コントロールとしてエネルギー比 45% 高脂肪飼料 (HFD) および脂質負荷の効果を計るために通常脂肪飼料 (LFD) を作製した。

マウス (C57BL6, 3 週齢, 雄) は LFD で 1 週間馴化した。馴化後 3 群に分け、試験餌を与え、4 週間あるいは 8 週間飼育した。飼育終了後、採血および採材した。なお、解剖前数日の糞を回収した。得られたサンプルは使用時まで 80 で保存した。

飼育期間中は毎日体重および摂餌量を測定した。また、餌と水は自由摂取とした。動物実験は実験動物中央研究所の承認を得て実施された。

(3) 血漿成分分析

血液から分離した血漿は生化学成分分析を行った。測定は長浜ライフサイエンスで実施された。

(4) 肝臓脂質分析

摘出した肝臓の脂質分析を行った。肝臓脂質の測定はスカイライトバイオテックにて実施された。

(5) 遺伝子発現解析

摘出した肝臓の細片は Trizol Reagent (Invitrogen) 中でホモジナイズし、トータル RNA を抽出し、RNeasy Mini Kit (Qiagen) で精製を行った。濃度測定したのち、バイオ

アナライザー(Agilent)で質の検定を行い、RINが8.0以上であることを確認した。

RNAはDNAマイクロアレイによるトランスクリプトーム解析を行った。DNAマイクロアレイはGeneChip® Mouse Genome 430 2.0 Array (Affymetrix)を用いて行った。DNAマイクロアレイデータは統計解析言語・環境「R」で正規化した。正規化手法はDistribution Free Weighted method (DFW)とした。正規化したデータを用いて階層的クラスター解析によって、各群で遺伝子発現の全体的な傾向を調べた。次に、Rankproducts法によってFalse Discovery Rate (FDR)が0.05以下でLFD群とHFD群の比較で発現が変動するプロンプセット、つまり高脂肪の影響を受け変動する遺伝子のプロンプセット、を抽出した。同様にHFD群とHFD+P群を解析し、ムカゴの影響を受ける遺伝子のプロンプセットを抽出した。これらの抽出プロンプセットで、発現変動がLF > HFかつHF < HF+P、逆にLF < HFかつHF > HF+Pであるプロンプセットを高脂肪の影響を改善したプロンプセットした。

改善プロンプセットはThe Database for Annotation and Integrated Discovery (DAVID)のウェブツールでどのような機能を持った遺伝子が有意に集まっているかを調べるため、Gene Ontologyに基づいたGene functional enrichment analysisを行った。

(6) 上流因子解析

改善プロンプセットは、Ingenuity Pathway Analysis (Qiagen)を用いて上流因子解析を行った。

4. 研究成果

(1) 摂食および成長に対する影響

飼育期間内の体重はHFD群およびHFD+P群でLFD群よりも増加した。しかし、HFD群とHFD+P群間には差はなかった。また、飼育期間中の摂食量および総摂取エネルギーはLFD群、HFD群、HFD+P群の3群間に有意な差はなかった。したがって、脂質負荷群の体重増加は摂取エネルギーの増加によるものではなく、脂質負荷の効果により肥満が誘導されたことが確認された。

高脂肪食へのムカゴの添加は摂食抑制、また成長阻害を示さないことが明らかとなった。

(2) 血漿生化学成分に対する影響

採取した血液から血漿を分離し、生化学成分分析を行った。4週飼育および8週飼育ともに、飼育後の血中生化学成分はHFD群とHFD+P群間では顕著な影響はなかった。しかし、肝臓障害マーカーのひとつであるアラニンアミノ基転移酵素(ALT)はHFD群でLFD群よりも有意に高かった。HFD+P群は通LFD群とHFD群の中間の値を示した。このことから、ムカゴ摂取はHFDによる肝障害の発生を抑制するか、または、遅延させると推察され

た(図1)。

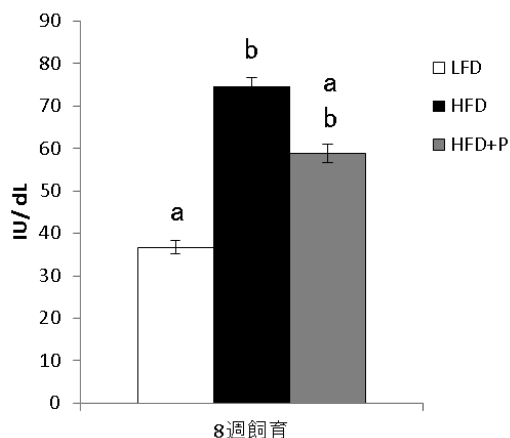


図1 血漿ALT濃度

値は平均値±標準誤差で示す(LFD群;n=6, HFD群およびHFD+P群;n=8)異なるアルファベット間には $p < 0.05$ で有意な差がある。

(3) 肝臓脂質に対する影響

肝中中性脂肪量は摂取4週では3群間に違いは認められなかった。摂取8週では摂取4週よりもさらに中性脂肪量が多くなった。また、HFD群はLFD群より有意に多く、高脂肪負荷による肝臓への中性脂肪蓄積が顕著となった(図2)。しかし、HFD+P群ではLFD群とHFD群の中間であり、中性脂肪の蓄積がHFD群よりも抑制された。

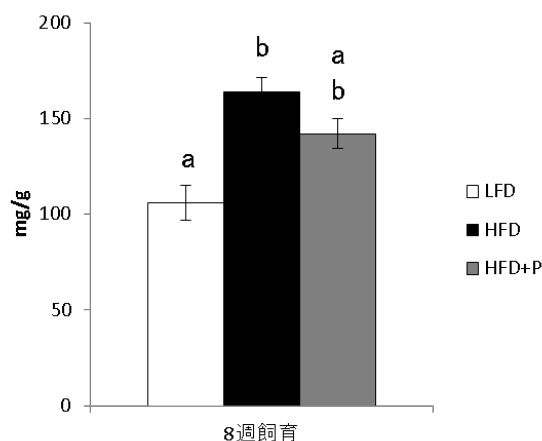


図2 肝臓中性脂肪量

値は平均値±標準誤差で示す(LFD群;n=6, HFD群およびHFD+P群;n=8)異なるアルファベット間には $p < 0.05$ で有意な差がある。

(4) 肝臓の遺伝子発現への影響

8週間飼育した個体の肝臓について、DNAマイクロアレイを用いた遺伝子発現解析を実施した。

得られたCELファイルデータについて階層的クラスター解析を行った結果、明確ではないが各群がおおまかなクラスターに分離され、各群の遺伝子発現傾向に違いが生じてい

ると考えられた。

次に、Rankproducts による二群間比較によって変動遺伝子を抽出した。LFD 群と HFD 群との比較によって高脂肪負荷による影響を検出し、また、HFD 群と HFD+P 群との比較によってムカゴ添加の影響を検出した。それらの変動遺伝子から、高脂肪の影響がムカゴ摂取で改善された遺伝子を抽出した(図3)。高脂肪負荷で遺伝子発現が低下し、ムカゴ同時摂取で改善した変動遺伝子は 166 個、逆に、高脂肪負荷で遺伝子発現が上昇し、ムカゴ同時摂取で改善した変動遺伝子は 268 個あった。

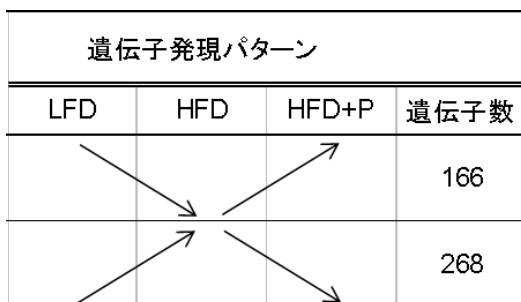


図3 肝臓の改善変動遺伝子数

得られた改善変動遺伝子がどのような生物学的機能を持つものかを GO Term 分類によって調べた(表1)。

表1 改善変動遺伝子の GO Term

GOID	Term	FDR-corrected p-value
GO:0044281	small molecule metabolic process	6.4E-07
GO:0019752	carboxylic acid metabolic process	7.9E-07
GO:0006082	organic acid metabolic process	9.8E-07
GO:0043436	oxoacid metabolic process	1.6E-06
GO:0042221	response to chemical	1.6E-06
GO:0070887	cellular response to chemical stimulus	1.7E-06
GO:0032787	monocarboxylic acid metabolic process	1.8E-06
GO:0051186	cofactor metabolic process	8.4E-06
GO:0010033	response to organic substance	2.9E-04
GO:0071310	cellular response to organic substance	4.5E-04
GO:0006631	fatty acid metabolic process	8.4E-04
GO:0044710	single-organism metabolic process	8.5E-04
GO:0006629	lipid metabolic process	2.3E-03
GO:0045454	cell redox homeostasis	2.4E-03
GO:0007162	negative regulation of cell adhesion	2.7E-03
GO:0006805	xenobiotic metabolic process	5.0E-03
GO:0006732	coenzyme metabolic process	8.0E-03
GO:0071466	cellular response to xenobiotic stimulus	9.4E-03

FDR-corrected p-value < 0.01を抜粋。階層図作成時に最下層に位置するGO Termを色付けた。

改善変動遺伝子は表1に示された GO Term に分類される遺伝子が多く、階層図作成時に最下層に位置する色付けされた GO Term、つまり GO:0071310 有機物に対する細胞応答、GO:0006631 脂肪酸代謝プロセス、GO:0045454 細胞酸化還元ホメオスタシス、GO:0007162 細胞接着の負制御、GO:0006805 生体異物代謝プロセス、GO:0071466 コエンザイム代謝プロセスが特徴的な機能であると考えられた。GO:0071310 はアミノ酸、折り畳み不全たんぱく質、ステロイド、サイトカイン類などに

対する応答遺伝子が含まれていた。GO:0006631 は脂肪酸合成、脂肪酸鎖長延長や不飽和化に関わる遺伝子の発現が HFD+P 群で上昇する方向に変動し、不飽和脂肪酸および長鎖脂肪酸が増加すると考えられた。GO:0045454 は細胞内の酸化還元環境を維持するための遺伝子が含まれたが、HFD+P 群で低下する方向に変動しており、HFD 群よりも酸化ストレスが少ない状態であると推察された。GO:0007162 には CD 抗原など接着分子類が含まれ、T 細胞増殖や分化が抑制されると考えられた。GO:0006805 は解毒に関わる酵素の遺伝子であった。これらは HFD+P 群で増加するように発現変動しており、HFD 群より異物代謝が促進されると示唆された。GO:0006732 は CoA や NADP など補酵素が必要な代謝プロセスであり、HFD+P 群ではアセチル CoA 代謝が抑制される方向であった。これらの結果から、高脂肪負荷マウスへの自然薯ムカゴの同時摂取は、脂質負荷によって変化した脂肪酸代謝を改善する方向に遺伝子発現を変動させることがわかった。また、酸化ストレスや小胞体ストレスなどを軽減するように機能すると推察された。

(5) 上流因子解析による制御因子予測

HFD 群で有意に活性化または阻害されていると予測された制御因子の中で、HFD+P 群で HFD 群と逆方向に制御されていると予測された因子を探索した。その結果、酸化ストレスや ER ストレスなどを制御する因子が抽出された。したがって、HFD+P 群では HFD 群でみられる高脂肪負荷ストレスを解除するように機能していると示唆された。

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 1 件)

Fumika Shinozaki, Takashi Abe, Asuka Kamei, Yuki Watanabe, Akihito Yasuoka, Kosuke Shimada, Kaori Kondo, Soichi Arai, Kota Kumagai, Takashi Kondo and Keiko Abe, Coordinated regulation of hepatic and adipose tissue transcriptomes by the oral administration of an amino acid mixture simulating the larval saliva of *Vespa* species. *Genes Nutr.* 11:21. doi: 10.1186/s12263-016-0534-2. eCollection 2016. 査読あり

[学会発表](計 2 件)

篠崎 文夏, 亀井 飛鳥, 渡部 由貴, 安岡 顕人, 近藤 香, 荒井 綜一, 近藤 隆, 阿部 啓子

高脂肪負荷マウスへの自然薯ムカゴ投与の影響, 日本農芸化学会 2015 年大会, 2015 年 3 月 25 日 岡山 岡山大学

篠崎 文夏, 山下治之, 亀井 飛鳥, 渡部 由貴, 安岡 顕人, 嶋田耕育, 近藤 香, 荒井 綜一, 近藤 隆, 阿部 啓子
自然薯ムカゴ抽出物の生理的機能性について, 日本農芸化学会 2017 年大会, 2017 年 3 月 19 日 京都 京都女子大学

〔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

篠崎 文夏 (SHINOZAKI, Fumika)
公益財団法人神奈川科学技術アカデミー・
未病改善食品評価法開発プロジェクト・常
勤研究員
研究者番号: 00359647

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

渡部 由貴 (WATANABE, Yuki)
公益財団法人神奈川科学技術アカデミー・
未病改善食品評価法開発プロジェクト・常
勤準研究員
研究者番号: 00552126

(4) 研究協力者

()