

平成 22 年 4 月 5 日現在

研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18380077  
 研究課題名（和文） 食品機能のニュートリゲノミクス解析における情報利用の高度化と体系化  
 研究課題名（英文） Improvement and Systematization of the Exploitation of Information for Nutrigenomics Analyses of Food Function

研究代表者  
 加藤 久典（KATO HISANORI）  
 東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授  
 研究者番号：40211164

研究成果の概要：様々なタンパク質栄養条件に応答した肝臓や皮膚での遺伝子発現の網羅的応答を幅広く明らかにした。それらのデータを有効に解析するためのバイオインフォマティクス手法を高度活用し、栄養研究における情報の有効利用を推進した。また、高脂肪食摂取や運動、抗肥満食品因子、マイルドなカロリー制限等に対する網羅的遺伝子発現やタンパク質量の応答に関する情報を蓄積した。従来から構築して維持しているニュートリゲノミクスデータベースを大幅に改良し、世界のニュートリゲノミクス研究を格段に発展させる礎を築いた。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	6,400,000	1,920,000	8,320,000
2007 年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2008 年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
年度			
年度			
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

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：DNA マイクロアレイ、カロリー制限、タンパク質栄養、データベース、ニュートリゲノミクス

## 1. 研究開始当初の背景

ニュートリゲノミクスとは、各種の生体分子を網羅的な解析（オミクス）を取り入れた食品や栄養の研究のことである。例えば、トランスクリプトミクス、プロテオミクス、メタボロミクスなどが含まれ、それぞれ遺伝子発現、タンパク質、代謝物を網羅的に調べるものであり、特にトランスクリプトミクスは DNA マイクロアレイの進歩によって広く使われるようになった。栄養・食品の分野において、こうした技術が非常に有効であることが明らかになってきていたが、その威力を十分

に活用するための、データ処理基盤の整備が遅れていた。特に、栄養や食品分野の研究者の中で、こうした膨大な情報の処理に熟達した者は非常に限られており、ニュートリゲノミクス情報を手軽に使えるツールおよび適切な処理手段の指針について、切望されていた。この目的を達成するため、既に代表研究者らは世界で唯一の、ニュートリゲノミクスデータベースを構築し、DNA マイクロアレイデータの蓄積や、文献情報の有機的活用の便に資してきた。

## 2. 研究の目的

基本的な食事摂取の変動に対してオミクスレベルでどのような変化が生じるかを、DNA マイクロアレイ解析、プロテオミクス解析により明らかにするとともに、得られた結果を他のニュートリゲノミクス研究における参照データとして利用できるものとするを計画した。

まず、遺伝子発現が顕著に影響を受ける条件として、タンパク質栄養の悪化についての検討を行った。肝臓と皮膚における遺伝子発現プロファイルを解析したが、今回4群16匹のラットについてのデータの処理について、正規化手法の最適化等を試みた。さらに、食品の機能性研究において、摂食量や摂食パターンが微妙な影響を受けて、網羅的解析においては結果の解釈を困難にする場合が多い。食品機能に関して意義のある変化を効率よく抽出する目的でも、マイルドなカロリー制限に対する応答を明らかにしておくことは有効と考えた。カロリー制限は、生活習慣病リスクの低減のほか、寿命の延伸などの効果が知られており、カロリー制限のマーカー遺伝子を明らかにしておくことは有効と考えられた。さらに、上記各条件について、プロテオミクス解析も行い、タンパク質量レベルでの変化も調べることにした。具体的な食品成分の解析として、高脂肪食において、カテキンの短期摂取の効果を調べ、さらに運動の効果の検討も試みることにした。一方、多くの遺伝子発現は、生体リズムの支配下であり、末梢のリズムが食事摂取により変動するため、短時間の食事摂取後に肝臓での発現が大きく変化する遺伝子をマイクロアレイ解析で調べ、特に時計遺伝子における変化を明らかにしようと考えた。

これらのデータを、ニュートリゲノミクスデータベースに搭載し、リファレンスデータとしての活用にも供することも目的とした。さらに、同データベースのデータ解析機能を強化し、情報利用の効率化を目指した。

## 3. 研究の方法

(1)Wistar 系雄ラット(7週齢)を用い、対照食(12%カゼイン)、無タンパク質食、12%グルテン食、12%グルテンにリシンとトレオニンを添加した食餌を一週間摂取させ、各群4匹の皮膚および肝臓をDNA マイクロアレイ解析に供した。アレイはAffymetrixのRat Genome 230 v2を用いた。変動が見られた遺伝子の一部に関しては、リアルタイムPCRにより確認を行った。

(2)Wistar 系雄ラット(6週齢)に、AIN-93G食を自由摂取させる群(対照群)および対照群の摂食量に比べ5%、10%、20%、30%少ない量を摂食させる群を設け、一週間および1ヶ月間飼育後に各組織を採取した。肝臓

のDNA マイクロアレイ解析を行い、顕著に変動が見られた遺伝子を抽出した。それらのうち、8種についてリアルタイムPCRによる確認も行った。

(3)Wistar 系雄ラットにカルニチンおよび大豆タンパク質を含む試料を単回摂取させ、肝臓の遺伝子発現プロファイルを解析した。

(4)Wistar 系雄ラットに通常食あるいは高脂肪食を1ヶ月間摂取させた。高脂肪食群には、さらに1%茶カテキンまたは0.1%クロフィプレートを加えた群も設けた。さらに高脂肪食を与えて、一日1時間のトレッドミランをさせた群も設定した。これらの肝臓よりRNAを調製し、DNA マイクロアレイ解析を行った。

(5)上記の および の肝臓タンパク質サンプルについて、2次元電気泳動による分離と蛍光検出および銀染色によるタンパク質の検出を行った。解析ソフトウェア(PDquest)を用い、対照群に比べて有意に変動があったタンパク質スポットを選別した。これらのスポットについては、MALDI-TOF MSによりタンパク質の同定を行った。

(6)データベースの改良において、Perl、Bioperl、MySQL、Apache、Estraier等のオープンソースソフトウェアを用いた。

## 4. 研究成果

(1)カゼイン食、グルテン食、制限アミノ酸を補足したグルテン食、無タンパク質食等を一週間ラットに摂取させ、皮膚での遺伝子発現プロファイルを得た。この際のマイクロアレイデータの最適な正規化手法について4種類の方法を比較検討したところ、qFARMsが食餌タンパク質の影響を最も明確にできることを明らかにした。食餌タンパク質悪化に対する興味深い応答として、皮膚のグルタチオン代謝系遺伝子が大きな影響を受けていることがわかり(図1)、実際に還元型グ

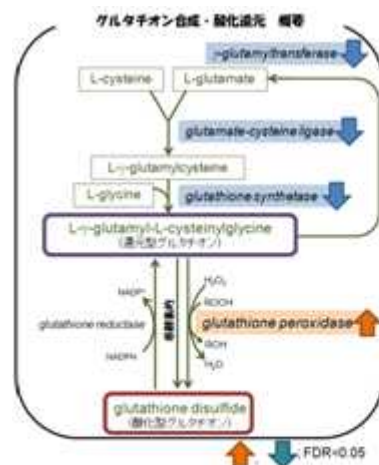
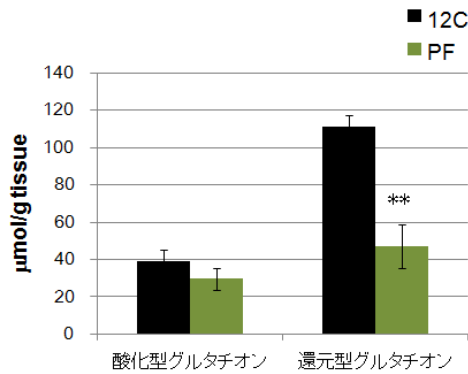


図1 無タンパク質食摂食時のグルタチオン関連遺伝子の変化

ルタチオン量が減少していることも明らかにした(図2)。

PGE2等の合成促進も認められ、こうした変化はタンパク質栄養悪化における炎症惹起の原因を成していることが示唆された。スフィンゴ脂質合成系も無タンパク質食やグルテン食では低下しており、皮膚のバリア機能低下に関与していると考えられた。



\*\*; P<0.01, vs 12C  
mean ± SE, n=6

図2 皮膚のグルタチオン量

肝臓においても、同様の解析を行った。肝臓については、コレステロール合成系と異化系の上昇など、以前の我々の結果(Endo et al. J. Nutr. 232,3632(2002))を再現するデータが得られた。GCN2経路の下流の遺伝子発現の変化なども認められた。

(2) ラットに5%から30%のマイルドなカロリー制限食を一週間ないしヶ月摂取させ、遺伝子発現プロファイルを対照と比較した。脂質代謝、糖代謝など多くの経路の遺伝子が、カロリー制限量に依存した変化を示したが、一方で短期や低レベルのカロリー制限で既に十分な応答を示す遺伝子も多く見られた。72の遺伝子について、何れのカロリー制限でも一貫した変化が認められた。SREBP 1, farnesyl diphosphate synthase (Fdps), fatty acid synthase (FAS), malic enzyme (Me), ATP citrate lyase (Acl) acyl-CoA synthetase short-chain family member 2 (ACSS2)など脂質合成関連遺伝子は、発現が低下していた。一方、carnitine palmitoyltransferase (Cpt)-1, Cpt-2 や、Cyp4A14といった脂質酸化系の遺伝子は発現上昇していた。コレステロール合成に関わるCYP51、DHCR7は低下、異化に関わるCYP7A1は発現上昇していた。8つの遺伝子について、リアルタイムPCRでも同じ結果が得られることを確認した(結果例のひとつを図3に示した)。

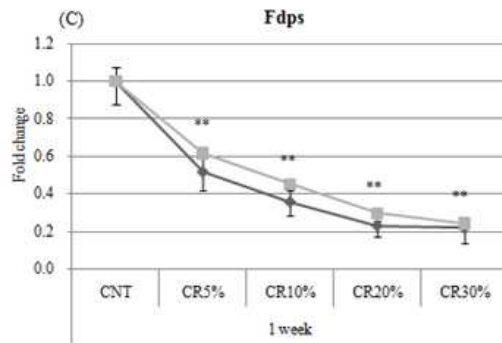


図3 一週間のカロリー制限による Fdps 遺伝子発現の結果

灰色の線がマイクロアレイ、黒の線がリアルタイムPCRの結果を示す。

低いカロリー制限レベルでは、体重には影響が出ないが、遺伝子発現レベルでは様々な変化が認められることがわかった。応答遺伝子のうち、今回の結果と既報の情報より、PPARαの下流遺伝子であるCYP4A14がカロリー制限のマーカーとして有効であることが示唆された。

(3)カルニチンや大豆タンパク質投与後、短時間の遺伝子発現変動を調べたところ、影響は限定的であった。しかし、例えばカルニチン投与後3時間および9時間で炎症低下を示唆する一連の応答が認められ、カルニチンの免疫調節作用として知られている応答の一部が再現された。一方、既に報告のある毒物投与への応答のプロファイルとの比較を行ったが、同じ方向の変化は見られず、安全性の確認という面でも有効であると考えられた。

(4)高脂肪食負荷時に、カテキン、クロフィブレート、運動を組み合わせた場合のDNAマイクロアレイ解析の結果、これらに共通の変化が多く見られた。しかし、それぞれに特徴的に大きな変動が見られた経路として、カテキンではMAPキナーゼ経路とWnt経路があった。これらはカテキンの抗腫瘍作用に関与している可能性がある。クロフィブレートではPPAR経路が特に顕著であったが、それ以外に分枝鎖アミノ酸代謝経路、酸化的リン酸化なども変化が顕著であった。運動の効果としては、AMPK経路、酸化的リン酸化が目立った変動を示した。

(5)ニュートリゲノミクスにおけるプロテオミクス解析手法の改良を進めた。例えば、各組織ごとのサンプル調製法の改良等を行い、肝臓、筋肉、脂肪組織等で再現性の良い泳動像を得られるようになった。例えば、無タン

パク質食やグルテン食摂取ラットの肝臓において、統計的に有意に量が変化したタンパク質を数 10 個同定できた。オルニチンアミノトランスフェラーゼの低下など、成長抑制に関わる変化、ビタミン B6 代謝関連の変化などを見出すことができた。一方、マイルドなカロリー制限に反応するタンパク質も多く見出すことができた。寿命との関係で注目されている prohibitin の上昇などが特に興味深いものであった。

(6)上記のマイクロアレイデータは、ニュートリゲノミクスデータベースのリファレンスデータとして登録した。すなわち、特定の成分の摂取の効果について検討したい研究者が、自分のデータとマイルドなカロリー制限等の結果を比較参照できるようにした。さらに文献情報の蓄積やその他のアレイデータの蓄積を進め、またインターフェースの改良なども行った。多くの新規データ解析機能を加えた。例えば、マイクロアレイデータを入力すると、多くの KEGG パスウェイ上の変化を一度に並べて俯瞰することができる機能を開発した(図4)。

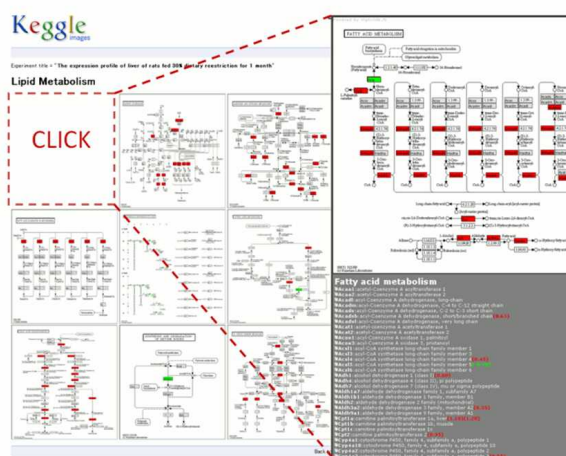


図4 KEGG パスウェイビューワーの使用例

## 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 8件)

加藤久典、小林進、勝谷友宏、三谷康正 ニュートリゲノミクスの新潮流 - テーラード栄養を身近なものに、バイオサイエンスとインダストリー、65, 19-23 (2007) 査読無

Nakai, N., Hashida, H., Kadota, K., Minami, M., Shimizu, K., Matsumoto, I.,

Kato H. and Abe, K. Genes related to the ubiquitin-proteasome system are up-regulated in the brown adipose tissue of 24 h-fasted rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72, 139-148 (2008) 査読有

Niwa, Y., Nishiyama, C., Nakano, N., Kamei, A., Kato, H., Kanada, S., Ikeda, S., Ogawa, H. and Okumura, K. Opposite effects of PU.1 on mast cell stimulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 375, 95-100 (2008) 査読有

Wu, T., Jin, Y.X., Kato, H. and Fu, Z.W. Light and food signals cooperate to entrain the rat pineal circadian system. *J. Neurosci. Res.* 86, 3246-3255 (2008) 査読有

Kato, H. Nutrigenomics: the cutting edge and Asian perspectives. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 17(S1), 12-15 (2008) 査読無

Dong, Y., Wu, T., Ni, Y.H., Kato, H., Fu, Z.W. Effect of fasting on the peripheral circadian gene expression in rats. *Biol. Rhythm Res.* 41, 41-47 (2010) 査読有

Wu, 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.* 298, 635-641 (2010) 査読有

Saito, 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.* in press (2010) 査読有

[学会発表](計 7件)

加藤裕美、タンパク質栄養悪化の影響のプロテオーム解析、2007年度日本農芸化学会大会、2007年3月25日、東京農業大学

亀井飛鳥、各種アミノ酸摂取がラット皮膚遺伝子発現に及ぼす影響の解析、2007年度日本農芸化学会大会、2007年3月26日、東京農業大学

斉藤 憲司、摂食量・体重の差異がラット遺伝子発現に及ぼす影響の網羅的解析、第61回日本栄養・食糧学会大会、2007年5月20日、京都国際会館

亀井飛鳥、タンパク質栄養悪化がラット皮膚遺伝子発現プロファイルに及ぼす影響

の解析、2008年度日本農芸化学会大会、  
2008年3月28日、名城大学

- ⑤Kenji Saito, Data storage and comparative analysis of gene expression profiles for promotion of nutrigenomics study. 19th International Congress of Nutrition, 2009年10月9日、Bangkok
- ⑥Aya okumura, Effect of lysine on lipid metabolism: A nutrigenomics study. 19th International Congress of Nutrition, 2009年10月9日、Bangkok
- ⑦石井駿介、Functional study of an amino acid response element of the phosphoenolpyruvate carboxykinase 2 (PEPCK2) gene. 第32回日本分子生物学会年会、2009年12月12日、パシフィコ横浜

[図書] (計3件)

- ①加藤久典 第5章 アミノ酸機能のニュートリゲノミクス解析 「アミノ酸の機能特性－ライフサイエンスにおける新しい波－」(日本栄養・食糧学会監修) 建帛社、pp171-187 (2007)
- ②加藤久典、阿部啓子 ニュートリゲノミクスのアレイ解析 「遺伝子医学MOOK(10)、DNAチップ/マイクロアレイ 臨床応用の実際」(油谷浩幸編)、メディカルドゥ、pp285-290 (2008)
- ③Abe, K., Kato, H., Yasuoka, A. and Nakai, Y. Genomics applied to nutrients and functional foods in Japan: State of the art. In: Genomics, proteomics, and metabolomics in nutraceuticals and functional foods. Bagchi, D., Lau, F.C. and Bagchi, M (eds) Wiley-Blackwell, U.S.A. pp127-154 (2010)

[その他]

ニュートリゲノミクスデータベース：  
<http://133.11.220.243/nutdb.html>

Kegg Overviewer (β版)：  
[http://133.11.220.243/cgi-bin/gomi/kegg/kegg\\_viewer2.cgi](http://133.11.220.243/cgi-bin/gomi/kegg/kegg_viewer2.cgi)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

加藤 久典 (KATO HISANORI)  
東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授  
研究者番号：40211164

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

(研究協力者：

斉藤 憲司 (SAITO KENJI)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・特任研究員

傅 正偉 (FU ZHENGWEI)

浙江工業大学 (中国)・教授)