

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：82718

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05514

研究課題名(和文)食品機能性評価ツールとしてのnon-coding RNAの有効性の検証

研究課題名(英文)Effectiveness of non-coding RNA as a food functionality evaluation tool

研究代表者

亀井 飛鳥(Kamei, Asuka)

地方独立行政法人神奈川県立産業技術総合研究所・食品機能性評価・研究員(任期無)

研究者番号：40514112

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：近年、ゲノムの転写産物のうち、かつてはジャンクと考えられていたnon-coding RNA(ncRNA)も機能性を持つことが示され、生体応答の新側面を捉えることが可能となった。本研究では食品の機能性評価にncRNAの解析を新規導入し、より詳細なトランスクリプトミクスへと発展させることを目指し、食餌性の鉄の過不足条件を例に解析を実施した。その結果、ncRNAも食餌の違いに機敏に応答すること、本条件下においては、鉄の主要貯蔵臓器である肝臓よりも血液における変動が顕著であることを捉えた。すなわち食に応答するマーカー分子として、coding RNAに加え、ncRNAを活用することの有効性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体内の変化を広く捉える方法はオミクス(omics)であるが、変化の初期段階を評価し、網羅性や感度の高い手法のひとつがトランスクリプトミクスである。この特性から、生体内の僅かな変化の検出が必要とされる食品の機能性評価においてはmRNAの解析が活用されてきた。一方、ncRNAは、がん等の疾病で顕著に応答して変動することが明らかにされているが、食品摂取に対する応答についての報告はほとんどなかった。本研究では、食品の機能性評価にncRNAの解析を導入し、食餌条件の違いに明確に応答することを捉え、評価ツールとしての有効性を示した。今後、食品の機能性評価における活用・展開が期待される。

研究成果の概要(英文)：Recently, it has been shown that some non-coding RNAs (ncRNAs), which were thought to be “junk”, have functions, it is expected to reveal a new aspect of biological responses by using ncRNA analysis. In this study, we conducted the analysis of ncRNAs to evaluate food functionality, and aimed to expand transcriptomics extensively. As a result, it was shown that expression of ncRNAs also changed by dietary iron status, and that expression changes in blood are remarkable than liver, which is a major organ for iron storage. These data indicated that ncRNAs have a potentiality of biomarker molecules that respond to foods.

研究分野：栄養化学

キーワード：iron non-coding RNA transcriptome

## 1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会を迎え、健康寿命の延伸や生活の質の向上が強く求められている今日、これへの食品の貢献の期待が高まっている。食品には様々な機能性評価の側面がある中で、mRNA 発現変動のグローバル解析であるトランスクリプトミクスは、我々も数多く報告しているように技術的にはすでに成熟の域に達しつつあるものの、近年、ゲノムの転写産物のうち、かつてはジャンクと考えられていた non-coding RNA (ncRNA) の中にも機能性を持つものがあることが示されるようになり、トランスクリプトミクスの新側面を捉えることが可能となった。本研究は、食品の機能性評価に ncRNA の解析を新規導入し、グローバルトランスクリプトミクスへと発展させることを目指すものである。

## 2. 研究の目的

### (1) 本研究の学術的背景、研究課題の核心をなす学術的「問い」

食品には、身体を作ったり、エネルギー源となったり、身体を整えたりする栄養素の働き（一次機能）そして味や香り、食感といった嗜好上の働き（二次機能）に加え、身体の調節に役立つ非栄養成分の生理学的働き（三次機能）が存在する。昨今では特に、三次機能（いわゆる機能性）への関心が高まっている。その背景には、超高齢化社会を迎え、平均寿命が延伸したことに伴う健康寿命延伸への要求の強い高まりがある。現代社会における平均寿命と健康寿命の隔たりは平均で 10 歳以上と大きく（図 1）、この差の短縮や QOL 向上に対する食品の貢献が期待されている。食品による生体調節作用の多くは医薬品と異なり、わずかな変化の長期的な積み重ねによるところが大きく、顕著な変化として捉えることが難しい。また、食品は多様な成分から成る複合系で、それらが相加的、相乗的、相殺的（拮抗的）に働くため、その作用は多岐に亘る。食品の作用やそのメカニズムを明らかにするために、生体内の変化をより広く迅速に、そしてより高感度で捉え、評価する新たな手法が強く求められている。我々は、食品を摂取することで起こる生体応答を測る指標として、これまでに mRNA の網羅的な測定を実施し、報告してきた。例えばメープルシロップの肝臓代謝

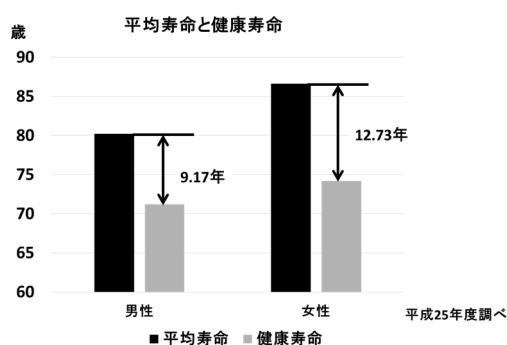


図1 日本における平均寿命と健康寿命の差

に及ぼす作用<sup>(1,2,3)</sup>、植物成分サラシアの免疫機能賦活作用<sup>(4)</sup>およびそのヒトにおける評価等である。これらの研究は主に動物を対象とし、血中成分の変化を説明する作用メカニズムや、早期の応答からその後の変化を予測するものであった。それらの素材の中には、動物で予測された現象がヒト介入試験でも同様に観察されたものもあることから<sup>(5)</sup>、mRNA の網羅的解析は食品の機能性評価方法として技術的に成熟したものになりつつあることが示されている。一方、食品摂取による作用の入力点や mRNA の発現制御メカニズム、より早期の応答について未だ解明されていない部分も多く残されている。より広範な情報を得、より効率的な食品の利用を目指すにあたり、食品の機能性評価研究における新たな解析・評価手法の確立が急務である。

### (2) 本研究の目的および学術的独自性と創造性

生体内の変化を広く捉える方法はオミクス (omics) であるが、変化の初期段階を評価し、網羅性や感度の高い手法のひとつがトランスクリプトミクスであり、対象は主に mRNA である。一方、昨今ではタンパク質をコードしない non-coding RNA (ncRNA) の解析が精力的に進めら

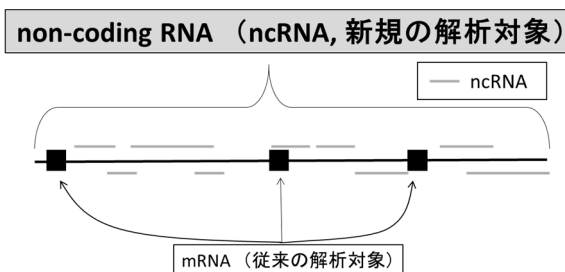


図2 食品の機能性評価の新規解析対象とする

ncRNA

変動することが明らかにされているが、食品摂取に対する応答についての報告はほとんどなか

った。報告者はこれまで、様々な食品の機能性を評価するため、動物を対象とするトランスクリプトミクスを実施してきた。その解析対象は mRNA であり、変動遺伝子のコードするタンパク質の働きから、食品の機能性やその作用メカニズムを推量するものであった。ここに ncRNA の情報を取り入れることで、mRNA の発現制御システムや世代を超えた制御メカニズムの解明等、多岐に亘る食品機能性情報の取得やその体系的な整備が可能になると期待される。本研究は、食品の機能性評価に ncRNA の解析を導入し、これまでの mRNA の解析とも組み合わせた総合的なトランスクリプトミクスへと発展させることを目指した(図2)。

### 3. 研究の方法

#### (1) 鉄欠乏性貧血マウス肝臓を対象とする解析

鉄は生体に必須の栄養素のひとつであり、鉄摂取量の不足や過度な出血が続くことにより、生体内の鉄蓄積量が不足すると、やがて貧血に至ることが知られている。貧血は、血中のヘモグロビンやヘマトクリット値に有意な差が生じ、末梢への酸素運搬が低下した状態である。本試験では、一般的な食餌成分のうち鉄を例にし、その不足が ncRNA の発現に及ぼす影響を明らかにする目的で実施した。雄性 C57BL/6J マウスについて通常群と貧血群とを設定し、それぞれから採取した肝臓を対象に ncRNA を含む RNA 解析を実施した。解析には、Clariom D Array, Mouse (Thermo Fisher Scientific)を用いた。取得した CEL データを用いて sst-RMA 法により正規化を行い、fold change >2 あるいは < 1/2、かつ empirical Bayes 法にて p-value < 0.05 と判定される RNA を変動 RNA と定義した。

#### (2) 鉄過剰摂取ラット肝臓を対象とする解析

鉄は必須の栄養素であるが、一方で生体内に過剰に存在するとフェントン反応を介してヒドロキシラジカル等を産生し、酸化ストレスによる細胞障害等を引き起こすことが知られている。体内への蓄積鉄量の増加は、過剰蓄積を引き起こす疾病によるもの他に、鉄の過剰摂取によっても引き起こされる。本試験では鉄過剰摂取が ncRNA 発現に及ぼす影響を明らかにする目的で実施した。鉄過剰の試験については、鉄剤等を過剰に摂取することを想定した量に加え、日常的に起こり得る鉄過剰摂取量も想定し、飼料中の鉄添加量を 3 段階に設定して応答の違いを捉える試みとした。雄性 SD ラットを通常食、鉄過剰食(低)、鉄過剰食(中)、鉄過剰食(高)摂取の 4 群に設定し、それぞれから採取した肝臓を対象に ncRNA を含む RNA 解析を実施した。解析には、Clariom D Array, Rat (Thermo Fisher Scientific)を用いた。取得した CEL データを用いて sst-RMA 法により正規化を行い、fold change >2 あるいは < 1/2、かつ empirical Bayes 法にて p-value < 0.05 と判定される RNA を変動 RNA と定義した。

#### (3) 鉄過剰摂取ラット血液を対象とする解析

(2)と同条件の鉄過剰摂取ラットの血液を対象に ncRNA を含む RNA 解析を実施した。解析には、Clariom D Array, Rat (Thermo Fisher Scientific)を用いた。取得した CEL データを用いて sst-RMA 法により正規化を行い、fold change >2 あるいは < 1/2、かつ empirical Bayes 法にて p-value < 0.05 と判定される RNA を変動 RNA と定義した。本試験の目的は、将来的にヒトを対象に評価することを想定し、ヒトにおいて採取可能な血液を用い、食餌条件の違いに応答するマーカー分子としての血液 ncRNA の活用の可能性を探ることにある。

なお、本研究にて用いた DNA マイクロアレイに搭載されているプローブセットの分類(グループ)とその数を表 1 に示す。

表1 DNA マイクロアレイに搭載されるプローブセットの分類

Group	Clariom D Array, Mouse	Clariom D Array, Rat
Coding	11264	24753
NonCoding	31717	25625
Precursor microRNA	1729	1626
Pseudogene	2758	2026
Ribosomal	388	370
Small RNA	2728	1324
tRNA	16	21
Multiple complex	15332	2259
Unassigned	24	10838

Thermo Fisher Scientific 社 HP より引用

### 4. 研究成果

#### (1) 鉄欠乏性貧血マウス肝臓を対象とする解析

通常群との比較解析により、貧血群にて発現変動した RNA を抽出した結果、発現増加は 129、発現減少は 44 であった。これらの発現変動 RNA について、その特徴抽出を目的に、本アレイのアノテーションに基づいたグループ(表 1 参照)への分類を行った。本アレイに搭載されるプローブセットのアノテーションにおいては、非コード RNA は、non-coding RNA、precursor microRNA、pseudogene、rRNA、tRNA、small RNA 等のグループに分類されており、このうち non-coding RNA に含まれる RNA 分子の多くは long non-coding RNA である。分類の結果、coding RNA と non-coding RNA はほぼ同数であり、precursor microRNA や pseudogene、small RNA もわずかに存在した。すなわち、本研究における第一の問いである「食餌の違いに応答した non-coding RNA (特に long non-coding RNA) の変動の有無」は、「有る」ということが明確に示された。続いて、特に鉄欠乏性貧血の肝臓における応答性の高い RNA 分子の特徴を見出すことを目的に、変動 RNA 数についてのオッズ比が 1 よりも大きいグループについて Fisher の正確確率検定を実施した。その結果、coding のグループにおいて  $p < 0.01$  を示し、高い濃縮度を示すことが明らかになった。すなわち、本試験で用いた Clariom D Array, Mouse に基づく解析においては、鉄欠乏性貧血マウス肝臓において顕著な発現変動を示す RNA は、coding RNA に特徴づけられることが示された。各グループの変動 RNA 数が変動 RNA の総数に対して占める割合を算出した結果を図 3 に示す。

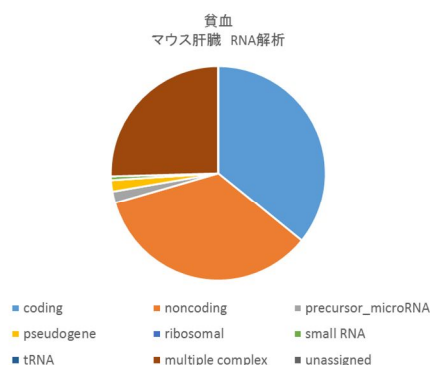


図3 貧血マウス肝臓の変動 RNA のグループ別分類  
グループ別の変動 RNA 数について、変動 RNA の総数に対する割合として示す。

## (2) 鉄過剰摂取ラット肝臓を対象とする解析

ここでは鉄過剰(中)のデータを示す。通常群との比較解析により、鉄過剰群にて発現変動した RNA を抽出した結果、発現増加は 9、発現減少は 19 であった。これらの発現変動 RNA について、それぞれ coding、non-coding 等の分類を行った。その結果、coding RNA、non-coding RNA、precursor microRNA に分類された。続いて、特に鉄過剰摂取(中)の肝臓における応答性の高い RNA 分子の特徴を見出すことを目的に、変動 RNA 数についてのオッズ比が 1 よりも大きいグループについて Fisher の正確確率検定を実施した。その結果、coding のグループにおいて  $p < 0.01$  を示し、高い濃縮度を示すことが明らかになった。すなわち、本試験で用いた Clariom D Array, Rat に基づく解析においては、鉄過剰食(中)ラット肝臓において顕著な発現変動を示す RNA は、coding RNA に特徴づけられることが示された。各グループの変動 RNA 数が変動 RNA の総数に対して占める割合を算出した結果を図 4 に示す。

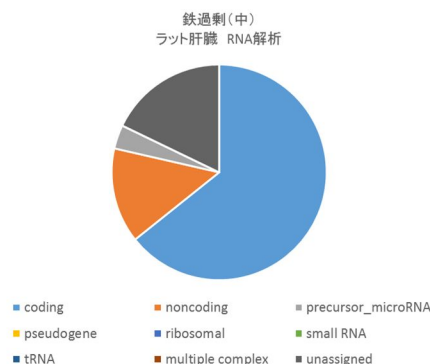


図4 鉄過剰(中)ラット肝臓の変動 RNA のグループ別分類  
グループ別の変動 RNA 数について、変動 RNA の総数に対する割合として示す。

## (3) 鉄過剰摂取ラット血液を対象とする解析

ここでは鉄過剰(中)のデータを示す。通常群との比較解析により、鉄過剰群にて発現変動し

た RNA を抽出した結果、発現増加は 82、発現減少は 16 であった。これらの発現変動 RNA について、それぞれ coding、non-coding 等の分類を行った。その結果、tRNA を除くすべてのグループに分類された。続いて、特に鉄過剰摂取（中）の血液における応答性の高い RNA 分子の特徴を見出すことを目的に、変動 RNA 数についてのオッズ比が 1 よりも大きいグループについて Fisher の正確確率検定を実施した。その結果、すべてのグループにおいて  $p > 0.05$  を示し、特定のグループに濃縮されることはなかったことが明らかになった。各グループの変動 RNA 数が変動 RNA の総数に対して占める割合を算出した結果を図 5 に示す。

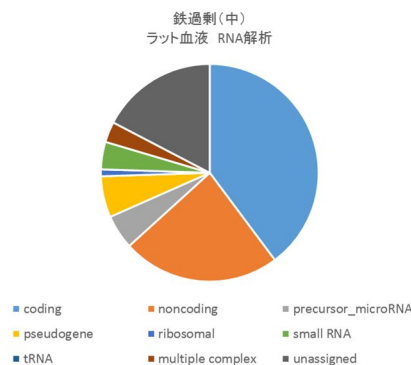


図 5 鉄過剰(中)ラット血液の変動 RNA のグループ別分類  
グループ別の変動 RNA 数について、変動 RNA の総数に対する割合として示す。

本研究から、食餌の違いに対して non-coding RNA も応答すること、またその応答のパターンは組織、細胞により異なることが示された。特に鉄摂取量という食餌条件の違いに対しては、肝臓に比べて血液において変動する RNA の分子数が多く、また、血液においては coding RNA だけでなく non-coding RNA に至るまで偏りなく応答する傾向が認められた。これらの結果より、食に応答するマーカー分子について、coding RNA に加え、non-coding RNA を活用することの有効性が示唆された。

#### 【参考文献】

1. Kamei, A., Watanabe, Y., Shinozaki, F., Yasuoka, A., Shimada, K., Kondo, K., Ishijima, T., Toyoda, T., Arai, S., Kondo, T., Abe, K. Quantitative deviating effects of maple syrup extract supplementation on the hepatic gene expression of mice fed a high-fat diet. *Mol Nutr Food Res*. 61. (2017)
2. Kamei, A., Watanabe, Y., Shinozaki, F., Yasuoka, A., Kondo, T., Ishijima, T., Toyoda, T., Arai, S., Abe, K. Administration of a maple syrup extract to mitigate their hepatic inflammation induced by a high-fat diet: a transcriptome analysis. *Biosci Biotechnol Biochem*. 79, 1893-1897. (2015)
3. Watanabe, Y., Kamei, A., Shinozaki, F., Ishijima, T., Iida, K., Nakai, Y., Arai, S., Abe, K. Ingested Maple syrup evokes a possible liver-protecting effort - physiologic and genomic investigations with rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 75, 2408-2410 (2011)
4. Oda, Y., Ueda, F., Kamei, A., Kakinuma, C., Abe, K. Biochemical investigation and gene expression analysis of the immunostimulatory functions of an edible Salacia extract in rat small intestine. *BioFactors*. 37, 31-39 (2011).
5. Oda, Y., Ueda, F., Utsuyama, M., Kamei, A., Kakinuma, C., Abe, K., Hirokawa, K. Improvement in Human Immune Function with Changes in Intestinal Microbiota by Salacia reticulata Extract Ingestion: A Randomized Placebo-Controlled Trial. *PLoS One*. 10, e0142909. (2015)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Toyoda,T., Kamei,A., Ishijima,T., Abe,K., and Okada,S.	4. 巻 16
2. 論文標題 A maple syrup extract alters lipid metabolism in obese type 2 diabetic model mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nutrition and metabolism	6. 最初と最後の頁 84
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12986-019-0403-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shinozaki,F., Kamei,A., Watanabe,Y., Yasuoka,A., Shimada,K., Kondo,K., Arai,S., Kondo,T., Abe K.	4. 巻 64
2. 論文標題 Propagule Powder of Japanese Yam (Dioscorea Japonica) Reduces High-Fat Diet-Induced Metabolic Stress in Mice through the Regulation of Hepatic Gene Expression	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular nutrition and food research	6. 最初と最後の頁 e2000284
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/mnfr.202000284	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 6件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Hideo Satsu, Mizuki Honda, Asuka Kamei, Mio Aida
2. 発表標題 Development of a NF B-responsive cell system and anti-inflammatory effect of 1-deoxynojirimycin in mulberry leaves
3. 学会等名 The 7th International Conference on Food Factors (ICoFF2019)（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 篠崎文夏、嶋田耕育、亀井飛鳥、野原正勝、立田みどり、渡邊隆之、徳田充孝、阿部啓子
2. 発表標題 着圧がマウス肝臓遺伝子発現に及ぼす影響
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 嶋田耕育、野原正勝、篠崎文夏、亀井飛鳥、立田みどり、渡邊隆之、徳田充孝、阿部啓子
2. 発表標題 体幹への着圧が代謝・生理機能に及ぼす影響
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 亀井飛鳥
2. 発表標題 食品の機能性を評価するために
3. 学会等名 「食品ニューテクノロジー研究会」例会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 亀井飛鳥
2. 発表標題 未病と食品の機能性
3. 学会等名 第84回日本技術士会神奈川県支部CPD講座（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 亀井飛鳥
2. 発表標題 食品の機能性評価～わずかな差の検出への試み
3. 学会等名 BioJapan2019/再生医療JAPAN2019（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 亀井飛鳥
2. 発表標題 ヒトを対象とする食品機能性評価への取り組み
3. 学会等名 ILSI Japan 寄付講座「機能性食品ゲノミクス」主催シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mizuki Honda, Mio Aida, Asuka Kamei, and Hideo Satsu
2. 発表標題 Establishment of a stable NFkB-responsive cell line and analysis of anti-inflammatory food substances
3. 学会等名 日本動物細胞工学会国際会議 (JAACT2018)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 亀井飛鳥
2. 発表標題 食品の機能性評価事例
3. 学会等名 戦略的イノベーション創造プログラム (SIP) 自然免疫制御技術研究組合第8回シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 阿部啓子、亀井飛鳥、豊田集
2. 発表標題 Human intervention trial on maple syrup to evaluate its preclinical effects
3. 学会等名 the 257th ACS (American Chemical Society) National Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年



〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------