

機関番号：12611

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20300243

研究課題名（和文） 遺伝子発現を基にした食品機能成分の機能解明

研究課題名（英文） Analysis of food ingredient's effect based on the gene expression

研究代表者 大塚 譲 (OTSUKA YUZURU)

お茶の水女子大学・大学院人間文化創成科学研究科・教授

研究者番号：20135833

研究成果の概要（和文）：

ヒト肝癌細胞 Hep-G2 あるいはヒト正常細胞 HUCF2 などを用いて、食品抽出物が遺伝子発現にどのような影響をもたらすのかを検討するため、DNA マイクロアレイにて網羅的な遺伝子発現を解析し、食品の機能性を明らかにすることにした。さらに、パスウェイ解析やリアルタイム-PCRにより詳細な遺伝子発現への影響を検討した。

研究成果の概要（英文）：

To investigate the food effect on the health, food ingredient's effects on the gene expression were analyzed using DNA microarray, pass way analysis and real time PCR methods.

The HepG2 cells derived from human hepatoma and HUCF2 cells from human normal fibroblast were incubated with elder, human mother's milk, alpha-tocotrienol, PQQ etc. RNA was isolated and labeled and analyzed using Agilent DNA microarray. Oxidative phosphorylation pass way was increased by elder addition. EGF signaling pass way was increased by mother's milk addition. FGF signaling pass way was increased by alpha-tocotrienol. This pass way activates Map kinase signaling pass way to cause cell growth on HUCF2 cell.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2009年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2010年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

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：DNA マイクロアレイ、遺伝子発現、食品機能、HepG2、HUCF2

## 1. 研究開始当初の背景

CoQ10 などのように機能を持った食品成分やアガリスク等の健康食品が市場に出回っているがその効果には不明な点も多く、また毒性も懸念されるものも多い。近年遺伝子の発現や抑制機構と生命現象の関連についての研究が進み、様々な生命現象の原因となる遺伝子が特定され、その遺伝子の発現の変化により寿命やアレルギー、発ガン、奇形な

どの生命現象が説明されるようになった。例えばサーチュイン（SIRT1）やアデニレートサイクレス 5（AC5）の発現が長寿と関係し、これらの発現をコントロールすれば寿命を延ばせることが下等生物で明らかにされ、ヒトでも当てはまると考えられるようになった。またインターロイキン-4 や-10（IL-4, IL-10, Th2型サイトカインと呼ぶ）の発現が上昇するとアレルギーになりやすい。一方こ

これらの Th2 型サイトカインが減少し、インターロイキン-2 (IL-2, Th1 型サイトカイン) の発現が上昇するとアレルギーが抑制されることが明らかにされた。さらに、Akt1 や Myc の発現がガン細胞では上昇している例が多く、これらの発現を抑制することでガンの増殖を抑制し、ガン治療に結びつくことが最近明らかにされた。従ってこれらの遺伝子発現をコントロールすることができれば寿命を延ばす食生活やアレルギーやガンになりにくい食生活が提案できる。

## 2. 研究の目的

最近食品素材・添加物としての利用が期待される PQQ やトコトリエノール類、各種ハーブ類などを細胞に添加した際の遺伝子発現の変化を、細胞の増殖時、アレルギー発症時、細胞のガン化に伴って変化する遺伝子発現のパターンと比較検討し、これらの機能性食品としての新しい機能や安全性を評価することと、新規の機能性成分を持った食品素材を探索することにした。

そのために各種食品成分抽出液を各種細胞等に投与し、遺伝子発現にどのような変化が生じるかを、DNA マイクロアレイを用いて網羅的に分析した。細胞増殖や長寿に関係する遺伝子や、食品アレルギー、ガン細胞、奇形で特異的に発現している遺伝子等に注目し、PQQ とトコトリエノール等の食品機能と安全性を評価した。

## 3. 研究の方法

### ● 食品成分の抽出

食品サンプル 1 g に MQ 水 10 ml あるいはメタノール 10 ml を加え抽出した後、0.22 μm filter (MILLIPORE) で滅菌ろ過したものを食品抽出物とした。

### ● DNA マイクロアレイ解析

細胞の遺伝子発現に及ぼす食品抽出物の影響は以下の方法で検討した。ヒト由来各種細胞(HUCF2, Hep-G2)およびラット由来細胞(PC12)を  $2 \times 10^5$  cells/ml 濃度で 2 ml ずつ 35mm Culture Dish(ビーエム株式会社)に播種し、24 時間後に培地を交換し、各種食品抽出物を添加し 16 時間培養した。食品抽出物は培地に対して 0.5%になるよう培地で希釈して用いた。各サンプルは n=3 で調製した。培養後 Isogen を用いて RNA を抽出し、DnaseI 処理後、マイクロアレイ分析を行った。各サンプルから total RNA を 0.33 μg ずつ集めて 1 つのチューブに入れて 1~2 μg 相当を用いた。cRNA の作成、マイクロアレイリーダー等はメーカーのプロトコールに従った。cRNA を Cyanine3 でラベル化した後、吸光度を測定して cRNA 溶出量と Cy3 色素

の取込効率を算出した。Agilent オリゴ DNA マイクロアレイキットプロトコールにおいて、通常 cRNA の溶出量は 1.65 μg 以上、CyDye の取込効率は 9 pmol/μg 以上であれば、cRNA のラベル化は成功したと判断した。

### ● パスウェイ解析

パスウェイ解析は Search Objects in KEGG Pathways を用いて行った。まず、それぞれの抽出物添加群のマイクロアレイの結果をコントロール発現量の比でそれぞれ表した。そして、発現の比が 2 倍以上、0.5 倍以下のものにそれぞれ区切ってそれらの遺伝子が含まれるパスウェイを検索した。

### ● RT-PCR による解析

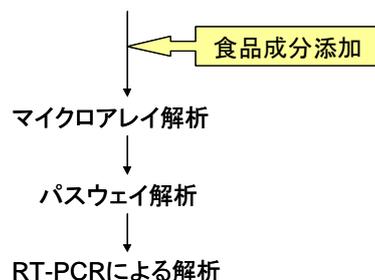
抽出した TotalRNA を逆転写反応にて cDNA を作製し、各グループにつきサンプル数 n=3~4 で実験を行った。

RNA 4 μg 相当に対し、M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen) 2 μl, 5× first strand buffer (Invitrogen) 8 μl, 0.1 M DTT (Invitrogen) 4 μl, 2 mM dNTPs (TOYOBO) 20 μl, Oligo(dT)15 primer (Promega) 1.5 μl, RNase Inhibitor (40U) 1.5 μl を加え、サーマルサイクラー(日本バイオラットラボラトリー株式会社)を利用し、37°C, 60min インキュベーション後、98°C, 5min で酵素を失活させ、急冷し、4°Cまたは-20°Cで保存した。PCR 生産物を定量する方法として SYBR®Green (Applied Biosystems)を使用したインターカーター法を用いた。7300 Real Time PCR system (Applied Biosystems)を用いて PCR 反応を行った。

解析は、7300 system Software 解析ソフトを使用し、Ct 値から相対的な濃度を下の計算法で算出し、得られた値を β-actin の相対値で補正することでおこなった。

$$[\text{Ct}1(\text{1 つめの試料の Ct 値})^2] / [\text{Ct}2,3, \dots (\text{2 つめ以降の Ct 値})^2]$$

ヒト由来細胞 (Ex. HUCF2, Hep-G2 etc.)



#### 4. 研究成果

##### • Hep-G2 細胞

ヒトには約 32000 (研究論文によっては 24000) の遺伝子が発現しているといわれている。ハーブの一種であるエルダーを加えることによって発現量が 3 倍以上、または 3 分の 1 以下に変動した遺伝子の数は、252 個と 60 個であった。内訳を見ると核酸の代謝に関連するものが多く認められた。

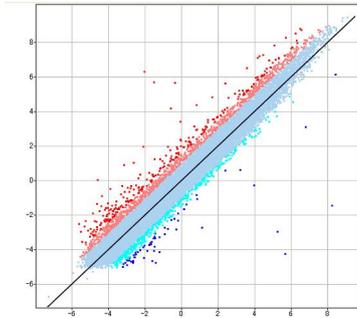


図 1 エルダー添加によるマイクロアレイのスクリーンショット

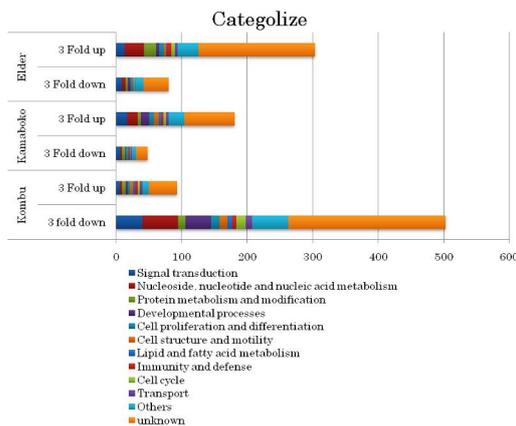


図 2 コントロールと比較して変動した遺伝子の総数と分類(エルダー添加)

そこでさらにその機能を明らかにするために、実験結果をパスウェイ解析した。この解析により、体の中のどんなグループの遺伝子の発現に変化が多かったかを調べることが可能となる。結果、酸化リン酸化に関するパスウェイの遺伝子の発現が上昇しており、エルダーにより代謝が活性化されたことが示唆された。一方、サイトカイン-サイトカイン受容体相互作用に関するパスウェイの発現が抑えられていた。炎症と関わりの強いパスウェイなので、エルダーの効能として知られている抗炎症作用によるものと推定された。また、薬物代謝酵素の第一相の酵素の発現はほとんど上昇せず、第二相の酵素の発現はかなりの数が上昇していた。従って、ハーブは発ガン性物質などの異物を摂取した場合に、速やかに体外に排泄してくれる可能性が考えられた。

表 1 遺伝子発現の変動が見られた遺伝子群

	2倍以上	0.5倍以下
1	リボソーム	Wntシグナル経路
2	酸化リン酸化	サイトカイン-サイトカイン受容体相互作用
3	パーキンソン病	ユビキチン依存性たんぱく質分解
4	全身性エリテマトーデス	結腸直腸癌
5	ユビキチン依存性たんぱく質分解	肺癌

次に母乳がどのような遺伝子を動かすのかを調べ、抗酸化を中心とした母乳の機能性を明らかにすることを目的として、母乳添加における遺伝子発現への影響を検討することにした。コントロールと母乳のほかに、酸化ストレスのモデルとして、活性酸素の一種である過酸化水素を添加した培養細胞についてもマイクロアレイを行った。

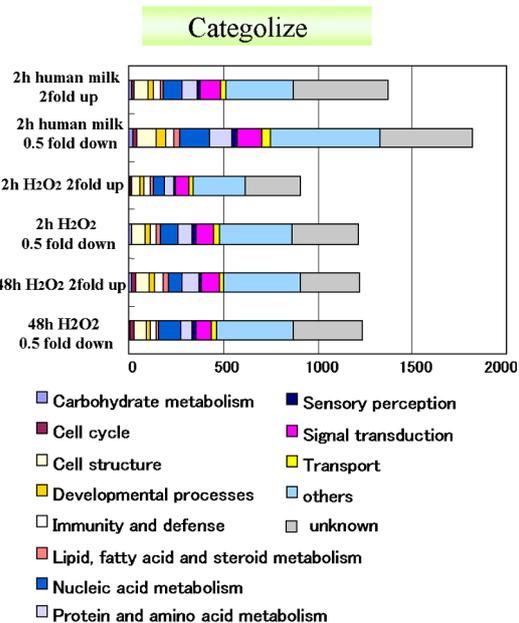


図 3 コントロールと比較して変動した遺伝子の総数と分類(母乳添加)

図 3 では、コントロールと比べて母乳や過酸化水素を処理した細胞で、発現量が 2 倍以上ないし 0.5 倍以下に変動した遺伝子の数と、その種類を示した。母乳を添加した細胞では、2 倍以上が 1372 遺伝子、0.5 倍以下が 1819 遺伝子と、多くの遺伝子が影響を受けることがわかる。

分類ごとにその内訳を見ると、シグナル伝達や核酸代謝 (Nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism) に関与する遺伝子の変動が、特に多いことがわかった。シグナル伝達に関与する遺伝子は、2 倍以上が 109、0.5 倍以下に発現量が動いたものが 133 あり

た(過酸化水素処理ではそれぞれ 72, 95)。核酸代謝に関与する遺伝子は、2倍以上 101, 0.5倍以下 165 あった(過酸化水素処理ではそれぞれ 53, 93)。シグナル伝達と核酸合成、代謝に関わる遺伝子については Pathway 解析を行って遺伝子の変動を調べることにした。

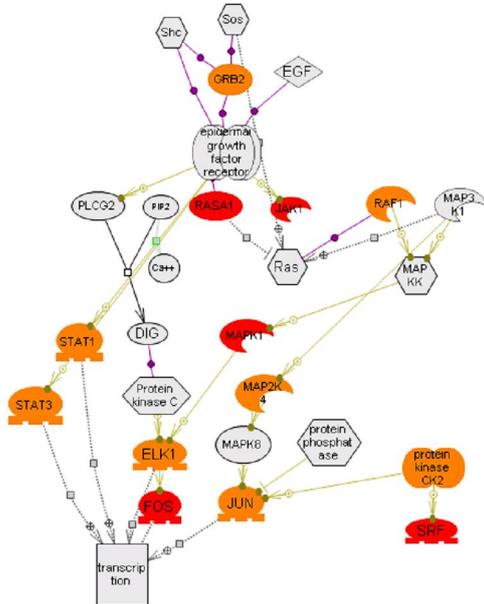


図4 母乳2時間処理後の EGF Signaling

解析した 44 パスウェイの中で、母乳添加により最も変動が顕著にみられたのは EGF signaling であった。上皮増殖因子 EGF は、リセプターに結合すると MAP キナーゼカスケードを介して種々の転写因子やシグナル伝達遺伝子を誘導し、細胞増殖を促進させる。母乳添加細胞では、MEK1、ERK2 をはじめとして多くの転写因子やシグナル伝達物質が発現誘導されていた。Early Growth Response 1 が 4 倍、FOS が 5.5 倍など、著しい発現の促進がみられた。

実際に細胞増殖曲線をとって見たところ、母乳処理により HepG2 の細胞増殖が促進されているということが確認できた。これらのことから、母乳の HepG2 細胞への増殖促進は EGF signaling によって引き起こされるということが示唆された。

● HUCF2 細胞

機能的食品成分として知られている PQQ が遺伝子発現にどのような影響をもたらすかをマイクロアレイによって解析し、特に酸化ストレスモデルとして過酸化水素を添加した系も実験に用いた。

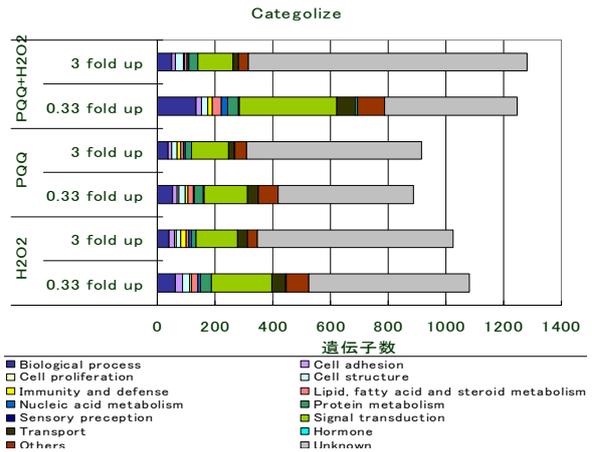


図5 コントロールと比較して変動した遺伝子の総数と分類(PQQ 添加)

発現に変動のあった遺伝子、酸化に関与した遺伝子について RT-PCR を用いて mRNA 発現量を測定し、マイクロアレイ実験の結果検証を行った。

表2 RT-PCR で測定した遺伝子

OS	Gene Name	Expression ratio		
		H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	PQQ	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +PQQ
SOD2	superoxide dismutase 2, mitochondrial	0.81	0.31	0.84
SOD1	superoxide dismutase 1, soluble (amyotrophic lateral sclerosis 1 (adult))	1.49	1.69	1.77
CAT	catalase	0.57	0.77	0.43

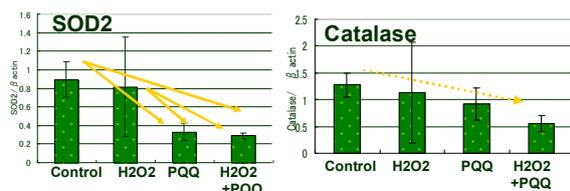


図6 酸化遺伝子における発現量の変動

過酸化水素のみ添加では SOD1, SOD2 の発現に有意な変化は見られなかったが、PQQ 添加により発現は有意に減少した。マイクロアレイの結果と比較すると、SOD1 はマイクロアレイの結果と異なった挙動を示したが、SOD2 は近似した挙動を示した。また、catalase にも発現量の減少が見られた。従って、PQQ を添加した正常細胞では、少なからず活性酸素が除去されたため、基質となる活性酸素が少なくなった可能性が示唆された。

$\alpha$ -Tocotrienol 添加により HUCF2 細胞の成長が促進される傾向がみられた。そこで、 $\alpha$ -Tocotrienol がどのような遺伝子を動かすのかをマイクロアレイを用いて網羅的に調べ、抗酸化を中心とした $\alpha$ -Tocotrienol の機能性を明らかにすることにした。コントロールと $\alpha$ -Tocotrienol のほかに、酸化ストレスのモデルとして、活性酸素の一種である過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) を添加した場合とあらかじめ $\alpha$ -Tocotrienol 処理をしてから  $H_2O_2$  暴露した場合についてもマイクロアレイを行った。

$\alpha$ -Tocotrienol 添加により Fibroblast Growth Factor (FGF)、その受容体である Fibroblast Growth Factor Receptor (FGFR) の発現上昇が確認された。また、いくつかの FGF, FGFR について $\alpha$ -Tocotrienol 添加、過酸化水素添加、双方添加時の遺伝子発現量を表 3 にまとめた。

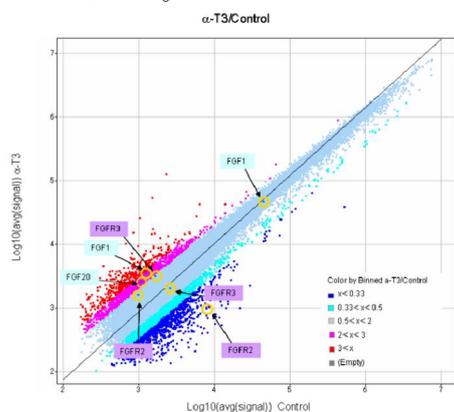


図 7  $\alpha$ -Tocotrienol 添加によるマイクロアレイのスキッタープロット

表 3 遺伝子発現の変動が見られた遺伝子

	$\alpha$ -T3	$H_2O_2$	$\alpha$ -T3+ $H_2O_2$
FGF1	2.79	0.65	1.78
FGF1	1.03	1.15	1.09
FGF20	2.39	0.76	0.93
FGFR2	1.66	0.81	1.72
FGFR2	0.78	0.72	0.93
FGFR2	0.19	0.10	0.08
FGFR3	1.91	1.02	2.11

$\alpha$ -Tocotrienol 添加により発現が上昇した FGF, FGFR は過酸化水素添加時には発現が減少しているか発現量に変化は見られなかった。また、あらかじめ $\alpha$ -Tocotrienol 処理してから過酸化水素を添加したものは過酸化水素のみを添加したときよりもその影響を受けていないことが確認された。本研究により $\alpha$ -Tocotrienol が FGF 発現を増加させ、細胞増殖に関与していることが明らかになった。

FGF は、チロシンキナーゼ領域を含む膜貫

通型受容体を活性化して細胞の増殖を促す。FGF によって活性化されるシグナル伝達分子群の中で、最も詳細が明らかになっているのが MAP キナーゼ経路である。

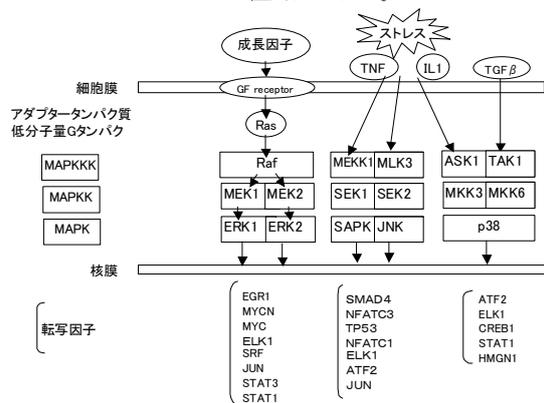


図 8 MAP キナーゼ経路

この経路は、FGF 受容体が活性化されると低分子量 G タンパク質 Ras がリン酸化され、その結果として Raf、MEK1/2、ERK1/2 から構成される MAP kinase 経路がリン酸化により活性化されるというものである。活性化された ERK1/2 は、細胞核内へ移行し、多数の転写因子をリン酸化し、活性化することによって細胞の増殖に貢献する。

$\alpha$ -Tocotrienol 処理した Huc-F2 ではこの MAP キナーゼ経路のうち、MEK2 (MAP2K2) 発現量がコントロールと比べて 1.2 倍に増加していた。発現量が上昇していた MAPK2 の遺伝子は細胞の増殖、分化、転写に関与する遺伝子であることから、 $\alpha$ -Tocotrienol の細胞増殖作用は、FGF signaling が細胞増殖に影響を及ぼして引き起こされていたことが示唆された。

## 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 9 件)

- Y Sone, J-K Moon, TT Mai, NN Thu, E Asano, K Yamaguchi, Y Otsuka and T Shibamoto  
"Antioxidant/anti-inflammatory activities and total phenolic content of extracts obtained from plants grown in Vietnam" J Sci Food Agric in press. (査読有)
- TT Mai, K Yamaguchi, M Yamanaka, Nguyen TL, Y Otsuka, Nguyen VC.  
"The Beta-Cell Damage Protective and Anti-Cataract Effects of Aqueous

- Extract of *Cleistocalyx Operculatus* Flower Bud in STZ Diabetic Rats" *J Agric. Food Chem.* 58(7):4162-8, 2010. (査読有)
3. Y Sone, Y Kudo, R Oba, Y Otsuka. "Effect of oxygen concentration on the expression of antioxidant gene in HepG2" *Biosci Biotechnol Biochem.* 74(6): 1267-70, 2010. (査読有)
  4. Y Sone, K Yamaguchi, A Fujiwara, T Kido, K Kawahara, A Ishiwaki, K Kondo, Y Morita, N Tominaga and Y Otsuka. "Association with lifestyle factor, polymorphisms in Adiponectin, Perilipin and Hormone Sensitive Lipase, and clinical markers in Japanese male" *J Nutr Sci Vitaminol.* 56(2):123-31, 2010. (査読有)
  5. K Yamaguchi, Y Noumi, K Nakajima, C Nagatsuka, H Aizawa, R Nakawaki, E Mizude, Y Otsuka, T Homma and Nguyen VC. "Effect of salt concentration on the reaction rate of Glc with amino acids, peptides and proteins." *Biosci. Biotech. Biochem.* 73(11), 2379-2383, 2009. (査読有)
  6. T MIZUNAGA M SAWAMURA, S YOSHIOKA, Y SONE and Y OTSUKA. "A New Metalloanthocyanin from the Blue Petals of *Salvia uliginosa*" *J.HomeEco.J.* 533(60): 785-90, 2009. (査読有)
  7. DNA マイクロアレイ解析による食品添加物の評価 *FFI ジャーナル* Vol.213, No.2, 2008 (査読有)
  8. Etsuko Ueta, Maho Kurome, Yuko Teshima, Mami Kodama, Yuzuru Otsuka, and Ichiro Naruse "Altered signaling pathway in the dysmorphogenesis of telencephalon in the Gli3 depressed mouse embryo, Pdn/Pdn" *Congenital Anomalies* (2008) 48, 74-80. (査読有)
  9. Wang L, Shimizu Y, Mizunaga T, Matsumoto S, Otsuka Y. "Expression, purification and characterization of yeast protein disulfide isomerase produced by a recombinant baculovirus-mediated silkworm, *Bombyx mori*, pupae expression system." *Biotechnol Lett.* 2008 Apr; 30(4), 625-30. (査読有)
- [学会発表] (計 2 件)
1. 桐谷珠鈴, 岩城依里, 加藤理江, 小川千穂, 曾根保子, 大塚譲: "PhIP 添加に伴う AhR 結合領域の ChIPonchip 法による解析" 第 32 回日本分子生物学会年会. (2009.12.12) 横浜
  2. 宮倉玲子, 曾根保子, 大塚譲: "酸化ストレス応答遺伝子の解析" (社)日本家政学会第 61 回大会. (2008.5.30) 東京
- [その他]  
<http://www.cf.ocha.ac.jp/ieshl/otsuka/index.htm>
6. 研究組織
    - (1)研究代表者  
大塚 譲 (OTSUKA YUZURU)  
お茶の水女子大学・大学院人間文化創成科学研究科・教授  
  
研究者番号 : 20135833
    - (2)研究分担者  
上田 悦子 (UETA ETSUKO)  
鳥取大学・医学部・講師  
  
研究者番号 : 40335526
    - (3)連携研究者  
なし