

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：32425  
研究種目：基盤研究(C) (一般)  
研究期間：2020～2022  
課題番号：20K02401  
研究課題名(和文) 食生活の変化に伴う遺伝子発現制御を基盤としたテーラーメイド食品用新規指標の開発

研究課題名(英文) Development of novel indicators for tailor-made foods based on gene expression regulation associated with changes in dietary habits

研究代表者  
篠崎 文夏 (SHINOZAKI, Fumika)  
日本薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：00359647  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では食生活の変化として高脂肪食を摂取させたマウスの肝臓や血液の遺伝子発現やスプライシングバリエーションを調べた。その結果、高脂肪負荷によって遺伝子発現変動はしないが、スプライシングバリエーションが生じている可能性が高い遺伝子が多数あった。その中には食品成分レスベラトロールによって通常の状態に近づくことと推察されるものがあり、一部のスプライシングバリエーションは発現が食品成分によって制御されていることが明らかとなった。バイオマーカー候補となる肝臓と全血で共通して出現するスプライシングバリエーションは数個であった。また、全血のスプライシングバリエーションは食品機能性評価の早期応答の指標としての利用可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義  
個人の体調に適合した食品を摂取するテーラーメイド食品の実現には食品の機能を正しく知る必要がある。本研究は食品機能性評価のために食品摂取に鋭敏に反応する新規の指標を開発することを目的とした。血液で検出された一部のスプライシングバリエーションが食品成分で制御される可能性が示されたことから、早期に反応する指標としての利用可能性が示された。このことは、食品の効果を明らかにし健康の維持や改善に用いるための知見として社会に貢献するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, gene expression and splicing variants were examined in the liver and blood of mice fed a high-fat diet as a dietary change. The results showed that there were a number of genes whose gene expression did not change with the high fat load but were likely to have splicing variants. Some of them were presumed to be brought closer to the normal state by the food ingredient resveratrol, indicating that the occurrence of some splicing variants is regulated by food ingredients. Several splicing variants appearing in common in liver and whole blood, which are candidates for biomarkers, were found. In addition, splicing variants in whole blood showed potential for use as early response indicators for food functionality assessment.

研究分野：食品科学

キーワード：食品機能性評価 スプライシングバリエーション 遺伝子発現

## 1. 研究開始当初の背景

生活習慣病などの疾病を回避するには食生活や生活習慣の改善が効果的で、食生活においては機能性食品を用いて積極的に健康維持を図ることも考えられ、理想的には個々人の身体状態に合わせた食品 (= テーラーメイド食品) を摂取することが効率的であると考えられる。そのためには各々の食品の機能性を正しく知る必要がある。しかし、食品の効果は健康診断で用いられる血中脂質などの測定項目ではとらえにくい。そこで、新規の指標として食品摂取後の遺伝子発現レベルの変化が活用されるようになった (Shinozaki et al., 2020; Kamei et al., 2017)。これまでの研究から食品が遺伝子発現に影響することは明らかであるが、遺伝子発現は DNA から RNA に転写される段階からタンパク質の翻訳後修飾までの間の様々な段階で調節されていると考えられるが、食品による遺伝子発現変動はどの段階の何の変化に起因する結果であるかについては明確ではない。食品機能性を評価するためのより鋭敏に応答する新規指標を定めるためには様々な遺伝子発現調節段階をターゲットとして考える必要がある。近年では食品や食品成分が遺伝子発現調節に影響し、それが機能発現をもたらすと示唆されている。タンパク質をコードしていない RNA (non-coding RNA; ncRNA) にはマイクロ RNA (miRNA) や long non-coding RNA (lncRNA) があり、いずれも発現不良などで疾病を誘発することが示唆されている。これらは遺伝子発現の各段階に影響し、食品や食品成分によっても発現変動すると考えられる。また、スプライシングで生じる構造の異なるタンパク質 (スプライシングバリエント) も疾病と関連しており、そのほとんどが遺伝子産物異常によるものであることが報告されている。つまり、スプライシング異常によってできた機能欠損タンパク質や細胞障害性タンパク質によって疾病が引き起こされる。また、老化やメタボリックシンドロームの原因の 1 つとなる肥満においてもスプライシング異常が引き起こされることが報告されており (Latorre et al., 2017, Kaminska et al., 2016)、選択的スプライシングの破綻が加齢や代謝疾患の重要なプログラムを規定する可能性がある。これらのことから、疾病に至るまでの過程では通常転写産物と異常転写産物の比率が変化するのではないかと推察される。食品摂取によって、その比率を正常時の状態に維持することができるなら、それが疾病と関連した新規の食品評価の指標となると考えられる。これまでにスプライスバリエントに着目した食品評価の知見はほぼない。

## 2. 研究の目的

一般的に生体を使う実験では個体差が認められる。値のゆらぎはホメオスタシスが機能している証拠であり、ホメオスタシスが破綻したときに異常 (= 疾病) になると考えられる。完全に異常となってしまえば食品摂取での改善は難しくなるため、本研究ではホメオスタシスが破綻しかけているものの病気ではない「未病」と考えられる状態を用いて、食品摂取の効果を検出するために ncRNA やスプライシングバリエントが利用できるか、未病を悪化させないために効果的な食品の機能性を評価するための信頼性の高い新規指標として適当であるかといった問題を検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 未病モデルマウスの作製

未病であると推測される状態の再現のため、エネルギー比 45% の高脂肪餌 (2~6 週間) を投与することにより生活習慣病を模したモデルマウスを作製した。血中成分分析および肝臓のトランスクリプトーム解析を行った。得られたトランスクリプトームデータは GO Term に基づいて生物学的機能分類を行い、濃縮度の高い機能を調べた。

### (2) スプライシングバリエントの検出

未病モデルマウスの肝臓および全血液からトータル RNA を抽出し、DNA マイクロアレイ (Clariom D, mouse, Thermo Fisher Scientific) で分析した。スプライシングバリエント解析は Transcriptome Analysis Console 4.0 で行った。通常脂肪餌および高脂肪負荷 2 および 4 週間で生じたスプライシングバリエントを比較した。なお、スプライシングインデックスの絶対値が 2 以上をスプライシングバリエントが生じている可能性が高いものとした。

### (3) スプライシングバリエント生成における食品成分の影響の検討

高脂肪餌に食品成分ポリフェノール (レスベラトロール) を添加した餌を摂取させ、高脂肪負荷により生じたスプライシングバリエントが解消されるか否かを検討した。また、食品成分ポリフェノールの機能性評価に対するバイオマーカーと使用可能であるかを検討した。

まず、高脂肪負荷によって生じたスプライシングバリエントのうち食品ポリフェノール摂取で解消・低減するものを抽出した。また、肝臓と全血での比較を行い、組織間で共通して生じるスプライシングバリエントを抽出し、共通して生じたスプライシングバリエントの中から、遺伝子発現量が十分に個体間のばらつきが比較的小さいものを食品機能性評価用のバイオマー

カー候補として選抜した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 未病モデルマウスの作製

高脂肪負荷を 2, 4, および 6 週間行い、血液成分分析、肝臓のトランスクリプトーム解析を行った。その結果、血液成分には顕著な変化は認められなかったが、トランスクリプトーム解析では、通常脂肪群と高脂肪群に差異が認められた (図 1)。また、2, 4, 6 週で共通して変動した遺伝子があり、それらの生物学的機能を GoTerm に基づいた濃縮度解析で調べたところ、濃縮度の Top5 は表 1 に示すように脂質代謝関連が多く、高脂肪負荷によって脂質代謝に影響があることが分かった。(表 1)。これらのことから、高脂肪負荷の影響はあるが表現型 (血液成分) には現れない未病の状態であると推察された。

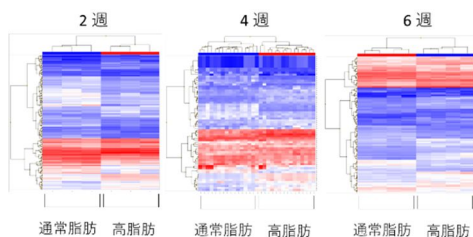


図 1 肝臓のトランスクリプトーム階層的クラスタ解析の結果

表 1 高脂肪負荷 2,4, および 6 週で共通する変動遺伝子の GOTERM

Term	Count
ステロイド代謝プロセス	21
脂質代謝プロセス	24
コレステロール生合成プロセス	10
コレステロール代謝プロセス	12
酸化的脱メチル化	7

##### (2) スプライシングバリエーションの検出

高脂肪負荷を 2 および 4 週間行ったあと、肝臓および血液のスプライシングバリエーション解析を行った。その結果、2 週間のみ、4 週間のみ、2 週間と 4 週間ともに検出されるスプライシングバリエーションがあり、肝臓および血液ともに 2 週間のみ、4 週間のみで出現するスプライシングバリエーションは数千ずつあった。2 週間と 4 週間で共通して得られたスプライシングバリエーションは肝臓で 240 個、血液で 96 個であった。これらが高脂肪負荷によって早期から生じるスプライシングバリエーションであると考えた。

トランスクリプトーム解析では高脂肪の影響が認められない遺伝子であってもスプライシングバリエーションが生じていたことから、トランスクリプトームよりもスプライシングバリエーションの方が早期の応答を検出できる可能性があると考えられた (図 2)。

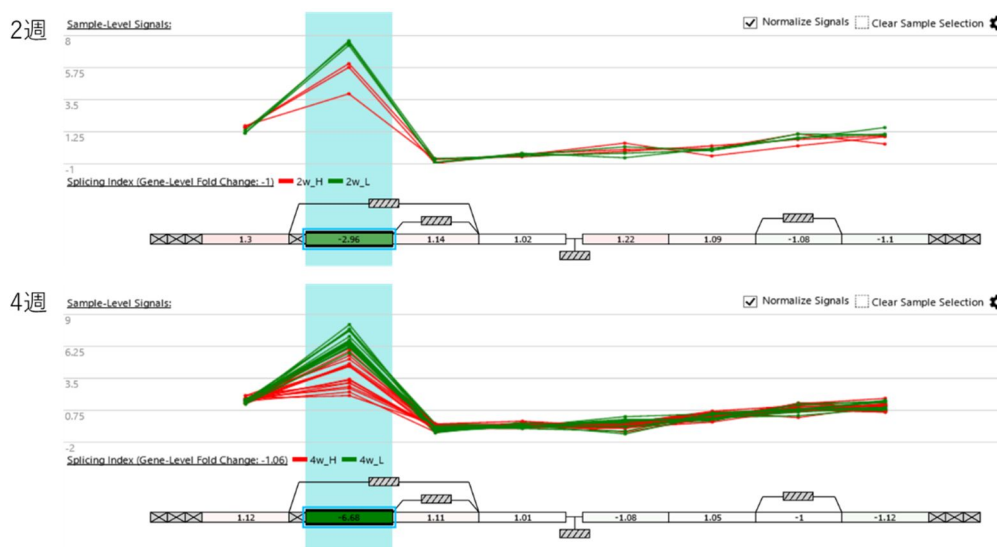


図 2 遺伝子発現には変化がなくスプライシングバリエーションが生じている例

上段：高脂肪負荷 2 週間, 下段：高脂肪負荷 4 週間

赤：高脂肪群, 緑：通常脂肪群

### (3) スプライシングバリエント生成における食品成分の影響の検討

図3の例に示すように食品成分レスベラトロールの摂取で解消・低減するものを抽出した(図3)。その結果、肝臓で130個余り、血液では470個のバリエントが得られた。そのうち

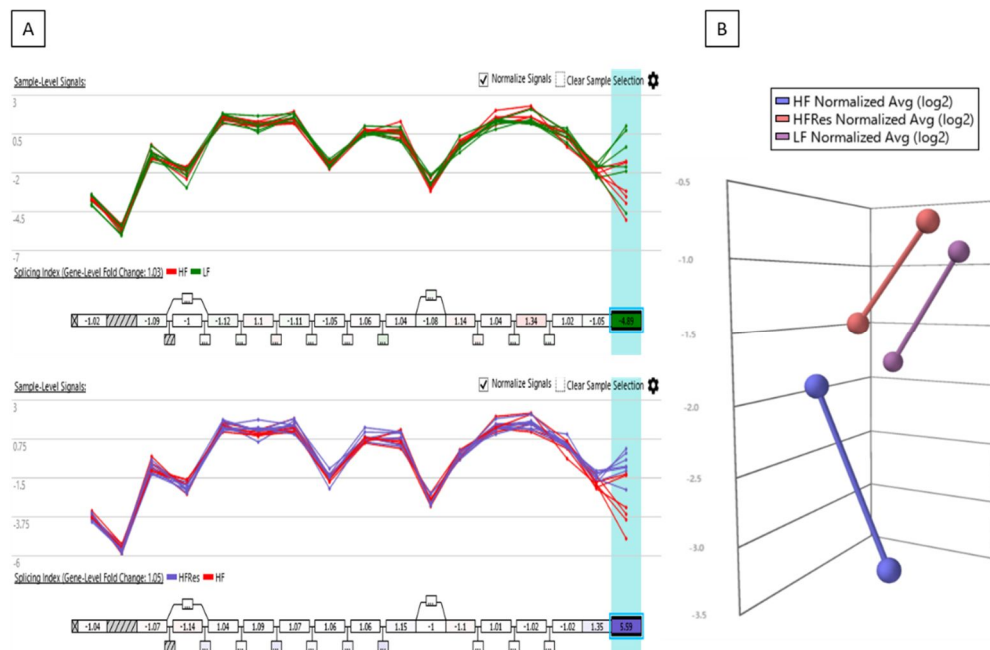


図3 レスベラトロールで解消したスプライシングバリエントの例

A:遺伝子構造図, B:3D-line plot,

LF:通常脂肪群, HF:高脂肪群, HFRes:高脂肪レスベラトロール群

遺伝子発現量が検出可能な範囲にあり、かつ、個体間のばらつきが比較的小さい( $p$  value $<0.1$ )という条件で肝臓と血液で共通して出現するものを抽出したところ数個であった。これらの遺伝子は今回使用した食品成分レスベラトロールの高脂肪に対する効果を評価する際に適用できる可能性があると考えた。

また、今回実験結果ではスプライシングバリエントについては血液と肝臓の組織間共通性は乏しいことが明らかとなった。血液で高脂肪負荷によりスプライシングバリエントが生じていると推察され、かつ、レスベラトロールの摂取によってスプライシングバリエントが改善されたと推察されたものについて生物学的機能性を調べた。その結果、フラボノイドのグルクロン酸抱合やDNA修復に関係するものが濃縮されていた。このことから、血球細胞のスプライシングバリエントの発生に食品成分影響が反映されているものと推察され、血液のスプライシングバリエントの解析が食品機能性評価に有効ではないかと考えられた。

以上の結果から、食品の成分に応答して生じるスプライシングバリエントが食品機能性評価に適用できる可能性、また、血液のスプライシングバリエントの情報が利用できる可能性が示された。しかし、異なる食品成分や食品、摂取する食品成分の濃度変化による影響などさらなるデータの蓄積が必要である。

#### <引用文献>

1. Shinozaki F, Kamei A, Watanabe Y, Yasuoka A, Shimada K, Kondo K, Arai S, Kondo T, Abe K (2020) Propagule Powder of Japanese Yam (*Dioscorea Japonica*) Reduces High-Fat Diet-Induced Metabolic Stress in Mice Through the Regulation of Hepatic Gene Expression. *Mol Nutr Food Res* 2020 Sep;64(17); e2000284. doi: 10.1002/mnfr.202000284.

2. Kamei A, Watanabe Y, Shinozaki F, Yasuoka A, Shimada K, Kondo K, Ishijima T, Toyoda T, Arai S, Kondo T, Abe K (2017) Quantitative deviating effects of maple syrup extract supplementation on the hepatic gene expression of mice fed a high-fat diet. *Mol Nutr Food Res*. 2017 Feb 61(2), doi: 10.1002/mnfr.201600477.
3. Latorre E, Harries LW. ( 2017 ) Splicing regulatory factors, ageing and age-related disease. *Ageing Res Rev*. 2017 Jul;36:165-170. doi: 10.1016/j.arr.2017.04.004.
4. Kaminska D, Käkelä P, Nikkola E, Venesmaa S, Ilves I, Herzig KH, Kolehmainen M, Karhunen L, Kuusisto J, Gylling H, Pajukanta P, Laakso M, Pihlajamäki J. (2016) Regulation of alternative splicing in human obesity loci. *Obesity (Silver Spring)*. 2016 Oct;24(10):2033-7. doi: 10.1002/oby.21587.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shinozaki Fumika, Kamei Asuka, Shimada Kousuke, Matsuura Hiroshi, Shibata Takeo, Ikeuchi Mayumi, Yasuda Kayo, Oroguchi Takashige, Kishimoto Noriaki, Takashimizu Shinji, Nishizaki Yasuhiro, Abe Keiko	4. 巻 14
2. 論文標題 Ingestion of taxifolin-rich foods affects brain activity, mental fatigue, and the whole blood transcriptome in healthy young adults: a randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover study	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Food & Function	6. 最初と最後の頁 3600 ~ 3612
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d2fo03151e	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Fumika Shinozaki, Asuka Kamei, Kousuke Shimada, Hiroshi Matsuura, Takeo Shibata, Mayumi Ikeuchi, Kayo Yasuda, Takashige Oroguchi, Noriaki Kishimoto, Shinji Takashimizu, Yasuhiro Nishizaki, and Keiko Abe	4. 巻 50
2. 論文標題 Single administration of taxifolin-rich extract to young adults improves their sequential single task performance-A randomized, placebo-controlled, double-blind, crossover trial-	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Jpn Pharmacol Ther	6. 最初と最後の頁 93-107
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 1. 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 & 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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 篠崎文夏, 亀井飛鳥, 嶋田耕育, 荒井綜一, 阿部啓子
2. 発表標題 自然薯ムカゴ摂取の代謝に対する影響
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2021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
---------	---------