

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19154

研究課題名（和文）生体調節作用に資する植物-動物間の界を超えた機能性RNAのふるまいを捉える

研究課題名（英文）Capturing the behavior of functional RNAs across the plant-animal boundary contributing to bioregulatory actions

研究代表者

藤村 由紀（Fujimura, Yoshinori）

九州大学・農学研究院・准教授

研究者番号：20390304

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：近年、食餌性の植物由来機能性RNAの一種であるmicroRNA(miRNA)が動物体内でも作用する可能性が示され、植物-動物間の界を超えたmiRNAの役割が注目されつつある。本研究では、生体調節作用を有する代表的な食餌性植物のmiRNA発現プロファイルと生体調節作用と連動する特徴的なmiRNA-mRNA制御構造の一端を明らかにすることを目的とした。緑茶(*Camellia sinensis* L.)のmiRNA発現プロファイルを次世代シーケンス解析により取得し、その機能制御に関わる可能性のある生体側の標的mRNAを見出すと共に、関連する生物学的イベント・シグナル伝達経路を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生命科学分野では、動物体内における内在性miRNAが様々な生命現象や疾患制御に重要な役割を果たすことが解明されつつあるが、これらの界を超えた動物体内で作用する生体調節機能に関する研究は未開拓なままである。本研究の実現は、食品科学分野では遅れている「新たな生体調節因子としての機能性RNA研究」の進展に寄与すると共に、「有用な機能性RNAを含有する新規品種の開発」や「機能性品種の新たな判別マーカーの開発」への応用も可能となる。また、本研究成果は、植物由来の機能性RNAに着目した新たな戦略の機能性食品、植物製剤や生薬ならびに補完代替医療（CAM）の研究開発にも貢献できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Recently, it has been shown that microRNAs (miRNAs), a type of functional RNA derived from dietary plants, may also act in animals, and the role of miRNAs across the plant-animal kingdoms is attracting increasing attention. The aim of the present study was to elucidate miRNA expression profiles of representative dietary plants with biological activities and some of the characteristic miRNA-mRNA regulatory structures linked to the biological activities. The miRNA expression profiles of green tea (*Camellia sinensis* L.) were obtained by next-generation sequencing analysis to find the possible biological target mRNAs involved in their functional regulation and to identify the associated biological events and signalling pathways.

研究分野：食品機能学

キーワード：miRNA 機能性RNA ファイトケミカル 緑茶

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生命科学分野における機能性 RNA、特に、約 20 塩基の一本鎖ノンコーディング RNA である microRNA (miRNA) に関する研究は、動物体内における内在性 miRNA が様々な生命現象や疾患制御に重要な役割を果たすことが解明されつつあるなど、極めてホットなテーマである。植物分野では、シロイヌナズナをはじめ、大豆、トマト、キュウリ、トウモロコシ、ジャガイモなどの植物中の miRNA の解析が活発に進められており、特に、植物生理に関連した miRNA-mRNA 間の相互関係の解析の進展は著しい。しかしながら、これらの界を超えた動物体内で作用する生体調節機能に関する研究は、現状では未開拓のままである。一方、生体調節機能に着目した植物由来生理活性成分「ファイトケミカル」の研究では、ポリフェノール、カロテノイド、テルペノイド、含硫化合物、機能性多糖、機能性脂質などが大部分を占め、ノンコーディング RNA などの機能性 RNA 成分に着目した研究事例は皆無に近い。そのため、機能性 RNA (miRNA) 成分に着目した食品機能学研究は、従来研究とは一線を画するものであり、既存の学術体系に捉われない、機能性植物素材・食品の生体調節機能を紐解く新たな研究の方向性を提示できる挑戦的な価値がある。

我々は、これまでにメタボロミクス技術の一つであるメタボリック・プロファイリング法により、様々な緑茶品種の多種成分の量比バランス(代謝物プロファイル)を明らかにしてきた。抗がん作用をはじめとした機能性の違いで緑茶品種の成分プロファイル、特に、ポリフェノール成分が大きく異なると共に、機能性に寄与する成分および機能性を高める成分同士の組合せを複数見出してきた。本成果は、緑茶と有効成分を豊富に含む他の食品との食べ合わせの提案や機能性の高い優秀な品種開発にもつながる。もしも、このような緑茶中の有効成分の最適な制御方法を見出すことができれば、機能性育種や新たな機能性食品の開発への応用展開も期待できる。最近、植物の二次代謝産物であるポリフェノール代謝(生合成系)の多段階制御に複数の miRNA が関与する事例が報告され、こうした知見がポリフェノールを質的・量的に調節する栽培条件の最適化に応用展開される可能性が指摘されている。しかしながら、こうした研究は植物科学の視点で展開されており、いわゆる、食品科学・健康科学の視点で生体調節作用と関連づけた報告事例は極めて少なく、一部の miRNA が動物体内で作用する可能性が指摘されている。そのため、もしも、一連の植物由来機能性 RNA(miRNA)が動物において生体調節作用を示すか否かをより包括的に解明できれば、植物の付加価値をさらに高めることができる。このような研究の展開は、生物学的視点で、実態が不明瞭である植物-動物間の界を超えた機能性 RNA の“ふるまい”に対する何らかの示唆を得られるかもしれない。

### 2. 研究の目的

機能性 RNA の一種である miRNA は遺伝子機能を負に制御し、様々な生命現象や疾患制御に関わるが、食餌性の植物 miRNA を含むノンコーディング RNA 成分が食品由来の生体調節因子として機能するか否かは不明な点が多い。本研究では、食餌性植物が有する生体調節作用に対する機能性 RNA(miRNA)の役割を解明すべく、生体調節作用を有する代表的な食餌性植物の miRNA 発現プロファイルと生体調節作用と連動する特徴的な miRNA-mRNA 制御構造の一端を明らかにすることを目的とした。そのため、緑茶(*Camellia sinensis* L.)の miRNA 発現プロファイルを次世代シーケンス解析により取得し、その機能制御に関わる可能性のある生体側の標的 mRNA を見出すと共に、関連する生物学的イベント・シグナル伝達経路の解明を試みた。

### 3. 研究の方法

本研究では、食餌性植物が有する潜在的な生体調節作用を機能性 RNA(miRNA)に着目して解明するために、多彩な生体調節作用を有し、かつ申請者の研究実績のある緑茶(*Camellia sinensis* L.)に着目し、それらの miRNA 発現プロファイリングを行うと共に、その機能制御に関わる生体側の mRNA を明らかにすることとした。

【1】緑茶(*Camellia sinensis* L.)の miRNA 発現プロファイルの取得：次世代シーケンス解析により緑茶(抹茶)由来 miRNA の包括的解析を行い、データベース検索により個々の miRNA の標的遺伝子の探索を行った。

【2】緑茶(*Camellia sinensis* L.)由来 miRNA の動物細胞における吸収性評価：緑茶由来 miRNA が生体において生理活性を発揮する際にその吸収性が問題となってくる。そこで、腸管モデル細胞(腸管上皮細胞様に分化したヒト結腸がん細胞株 Caco-2)を用いて緑茶由来 miRNA の簡便な吸収性評価を行った。

【3】生体側の標的 mRNA 発現プロファイリングおよび関連するシグナル伝達経路の探索：緑茶由来 miRNA の生理作用として、近年、増加の一途を辿っている非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH)における炎症・線維化に対する抑制作用に着目し、その作用の基本となる肝星細胞(ヒト肝星細胞株 LX-2)の活性化(線維化誘導)時の包括的な mRNA 発現変動の解析を行った。次世代シーケンス解析により線維化誘導時の肝星細胞における mRNA 発現プロファイルを取得し、それら遺伝子のパスウェイ解析により変動したシグナル伝達経路の予測を行った。

#### 4. 研究成果

##### 【1】代表的な機能性植物(緑茶)中の miRNA 発現プロファイリング

本研究では緑茶 (*Camellia sinensis* L.) の一種である抹茶を解析対象とした。次世代シーケンス解析により異なる3種類の抹茶に存在する miRNA の包括的な発現プロファイルを得た。各種抹茶の全体の総リード数は7,590,204 (品種A)、10,405,857 (品種B)、12,114,873 (品種C)であった。そのうち、アノテーションされた miRNA の総リード数(/100万リード)は1,230 (品種A)、1,209 (品種B)、360 (品種C)であった。リード数の高い代表的な miRNA についてリアルタイム PCR 法による発現量解析を行い、品種の違いによりユニークな miRNA 発現パターンを示すことが明らかとなった。また、抹茶に含まれる代表的な miRNA の標的遺伝子を探索するため、miRNA-A に関して KEGG Enrichment Pathway Analysis を行った結果(図1)肝線維化や炎症に関連する疾患関連遺伝子が標的となる可能性を見出した。

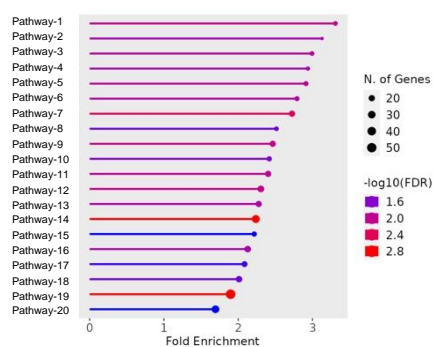


図1. 抹茶由来 miRNA-A が標的とする可能性のある遺伝子の KEGG Enrichment Pathway Analysis

##### 【2】動物培養細胞における抹茶由来 miRNA 吸収性の評価

腸管上皮細胞様に分化したヒト結腸がん細胞株 Caco-2 の管腔側(腸管側)に、抹茶サンプル(品種A)を添加・培養した後に基底膜側培地(血管側)への抹茶由来 miRNA の透過性をリアルタイム PCR 解析により検討した。その結果、代表的な4種類の抹茶由来 miRNA が基底膜側培地側で検出され、抹茶由来 miRNA が腸管細胞レベルで吸収されることを見出した。

##### 【3】動物培養細胞における線維化関連 mRNA の包括的解析

抹茶由来 miRNA の標的探索により、肝線維化関連遺伝子を標的とする可能性が示された。抹茶由来 miRNA の生体調節作用(肝線維化抑制作用)を明らかにする上で、基礎的な情報となる動物側の mRNA 発現様式を把握するため、線維化誘導時のヒト肝星細胞株 LX-2 を用いて次世代シーケンス解析による mRNA のプロファイリングを試みた。その結果、検出された mRNA の総数 13,149 種類のうち、有意に発現上昇したものが 345 種類 ( $FC \geq 2$ ,  $Q$  値  $\leq 0.01$ ) (図2)、発現低下したものが 491 種類 ( $FC \leq 0.5$ ,  $Q$  値  $\leq 0.01$ ) (図3)認められた。発現上昇した mRNA のうち、肝線維化の病態形成に関わる数種類の遺伝子は、代表的な抹茶 miRNA の標的候補遺伝子と重複しており、これらを標的とすることで抹茶由来 miRNA が生体調節作用を発揮しうる可能性を見出した。

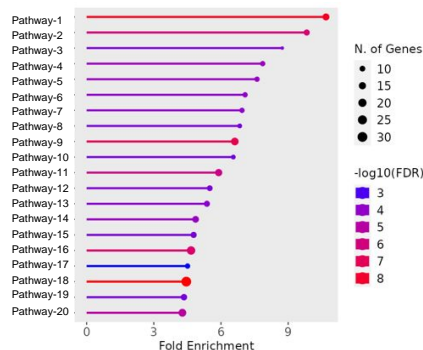


図2. 線維化誘導した LX-2 細胞内で発現上昇した遺伝子の KEGG Enrichment Pathway Analysis

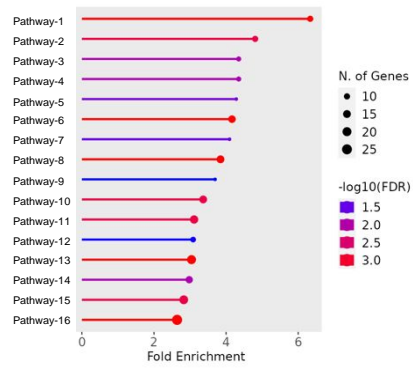


図 3. 線維化誘導した LX-2 細胞内で発現低下した遺伝子の KEGG Enrichment Pathway Analysis

## 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 2件）

1. 著者名 Fujimura Y, Kumazoe M, Tachibana H.	4. 巻 27
2. 論文標題 67-kDa Laminin Receptor-Mediated Cellular Sensing System of Green Tea Polyphenol EGCG and Functional Food Pairing.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 5130
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/molecules27165130.	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 Kumazoe M, Ogawa F, Hikida A, Shimada Y, Yoshitomi R, Watanabe R, Onda H, Fujimura Y, Tachibana H.	4. 巻 13
2. 論文標題 Plant miRNA osa-miR172d-5p suppressed lung fibrosis by targeting Tab1.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 2128
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-29188-6.	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 Murata M, Marugame Y, Yamada S, Lin I, Yamashita S, Fujimura Y, Tachibana H.	4. 巻 49
2. 論文標題 Circulating miRNA profiles in mice plasma following flavonoid intake.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Mol. Biol. Rep.	6. 最初と最後の頁 10399-10407
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11033-022-07918-9.	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4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 渡邊凌矢, 井上千尋, 熊添基文, 藤村由紀, 立花宏文.
2. 発表標題 植物マイクロRNAの脂質代謝関連遺伝子発現調節作用
3. 学会等名 第59回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡邊凌矢, 井上千尋, 熊添基文, 藤村由紀, 立花宏文.
2. 発表標題 食品由来マイクロ RNA のコレステロール合成酵素発現調節作用
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度西日本支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 村田希, 丸亀裕貴, 藤村由紀, 立花宏文.
2. 発表標題 ラボノイドの摂取により変化する血中マイクロ RNA の発現解析
3. 学会等名 第27回日本フードファクター学会年次学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉富廉, 熊添基文, 藤村由紀, 立花宏文.
2. 発表標題 緑茶カテキン EGCG の肝臓における環状 RNA 発現調節作用.
3. 学会等名 第27回日本フードファクター学会年次学術集会
4. 発表年 2022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
---------	---------