

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：57102

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23300279

研究課題名(和文)食品成分機能性・安全性評価用 in vivoスクリーニング法の開発

研究課題名(英文)Development of in vivo function and safety screening method for food ingredient

研究代表者

富永 伸明 (TOMINAGA, NOBUAKI)

有明工業高等専門学校・その他部局等・教授

研究者番号：30227631

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円、(間接経費) 4,290,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、新規機能性食品成分および安全性評価のための線虫の成分既知の合成培地を用いた in vivo試験法の開発を行った。本評価系で、抗酸化作用を持つクエルセチンなどのフラボノイド化合物の培地への添加は線虫の成長に有利な効果を示すこと、銅、亜鉛などの微量元素を欠如すると繁殖が顕著に抑制された。さらに、医薬品インスリンと血糖降下作用が期待されているバナジウムの複合影響を評価したところ、遺伝子の発現変化を測定することで、形質として現れない影響を評価することができ、複合することでバナジウムの毒性が増強される可能性が示唆された。このことは、本評価系が有効な手法であることを示すものである。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed a novel evaluation method of functional material and food safety screening using *Caenorhabditis elegans* as model organism and synthetic medium. We could make a synthetic medium which was made from given ingredients and could cultivate *C. elegans* from egg to adult. Then we evaluated flavonoids quercetin, rutin which are known as anti-oxidative property. Growth rate of *C. elegans* was increased by addition of these materials to medium. Demands of trace elements were also determined. Depletion of Copper or Zinc was induced significant loss of fecundity. Moreover we evaluated the effects of insulin and vanadium. The results indicated that the toxicity of vanadium was stimulated by an addition of insulin. We could show that this screening method developed by this study was well work for not only screened for function of food ingredient but also for evaluation of complex effects of food and medicine.

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：食品 生理活性 マイクロアレイ 機能性 解析・評価

1. 研究開始当初の背景

食品成分の機能性は、食習慣に基づいた経験から予想され、効果を試験するために作られた酵素反応の測定や培養細胞試験を用いた *in vitro* 試験系および動物投与による *in vivo* 試験系で確認されている。しかし、*in vitro* 試験系、培養細胞試験の効果は、実際に吸収・代謝等の体内で起こる事象が反映されない。また、動物実験では特殊な栄養状態になり、現実的ではないことがしばしば見られる。一方、「食品」という安心感から一般的に安全性が高いと考えられがちであるが、代謝能力が衰えている老人や病人などが効果に対する期待感から摂取する傾向が強く、過剰摂取や服用している薬との相互作用等の危険性がある。最近では、健常人でも健康志向の高まりや誤った予防医学の理解から、過剰摂取が懸念される。

以上の事は、これら食品成分等の物質が生物に及ぼす機能性および摂取の安全性をスクリーニングレベルで的確に評価する方法の開発は、安全・安心だけでなく、新規機能性成分の開発には必要・不可欠であると考えられた。

2. 研究の目的

本研究は、申請者が開発している線虫合成培地に改良を加え、より安定した線虫の培養を可能にし、合成培地で培養した線虫の遺伝子発現状態を定量する安全性評価系および繁殖速度の変化等の表現系を指標とした評価系を確立する。さらに、食品に含まれる機能性成分に反応する遺伝子を線虫全ゲノム DNA マイクロアレイおよびリアルタイム PCR により、同定・選択を行い、食品成分等の機能性・安全性新規評価法の基盤技術を確認することを目的とした。

3. 研究の方法

液体合成培地の作製

Grace 昆虫細胞培養用基本培地に微量金属、ビタミン、核酸等の栄養素をクリーンベンチ内でろ過滅菌して添加した。作製した培地は密封し、冷蔵庫で保存した。

液体合成培地による線虫の培養と体長測定

クリーンベンチ内で12穴プレートに2.4.1で作製した液体合成培地 2 ml を加え、ゲンタマイシン 2 μ l、ペニシリン-ストレプトマイシン-アムホテリシン B 懸濁液(PSAB)20 μ l を添加した。そこに種々濃度になるようにフラボノイド化合物、インスリン、パナジウム等を添加し、同調した線虫の卵約 100 個を入れ、20 のインキュベータで培養した。顕微鏡カメラで各条件最低 27 匹をランダムに、数日おきに顕微鏡カメラで撮影し、体長を測定した。

遺伝子およびタンパク質発現解析

液体合成培地 8 ml に同調した線虫の卵約 2 万個を加え、20 で 3 日間培養した。回収し

た線虫を二次元電気泳動および DNA マイクロアレイの試料とした。

DNA マイクロアレイは、線虫の 6000 遺伝子を搭載した 12K Custom アレイ (Ecogenomics) および CYP 類に特化したカスタムアレイを使用した。

4. 研究成果

食品成分機能性評価法 (抗酸化物質)

フラボノイド系の抗酸化物質であるクエルセチンとその配糖体であるルチンについて検討を行った。線虫はすべての培地で成長が確認できた。コントロールは 1 か月間培養後の平均体長はおおよそ 600 μ m になり、他の培地と比較すると一番小さい値となった。ルチン群では、培養開始後はコントロールと差が見られず、濃度差による成長の差も認められなかった。培養を続けると、0.01 mM では最後までコントロールと有意な差が見られなかったが、0.1 mM、1 mM において 26 日目から有意な体長差が見られ、1 か月間培養後の平均体長はおおよそ 700 μ m であった。一方、0.01 mM クエルセチンは、初めのうちはコントロールと体長の差は見られなかったが、20 日目からコントロールと成長に差が現われ、1 か月間培養後の平均体長はおおよそ 800 μ m まで成長した。0.05 mM、0.1 mM では、培養 1 週間ほどでコントロールと成長に有意差が認められ、さらに 1 か月間培養後の平均体長はおおよそ 900 μ m になり線虫の成長に対して促進する効果を示した (Fig. 1)。以上の結果より、クエルセチン、ルチンは線虫の成長を促進させる働きがあると考えられ、その効果は容量依存性があることも分かった。特にクエルセチン、その作用が強く物質特異性があることが明らかになった。

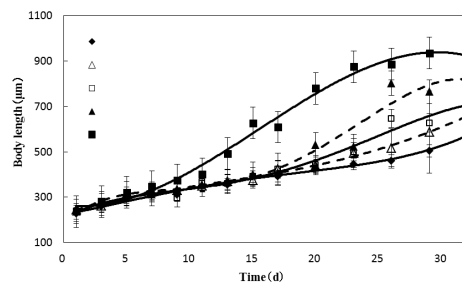


Fig. 1 Growth rate of *C. elegans* grown in the liquid synthetic medium containing various Quercetin and Rutin concentration

そこで抗酸化との関係を調べる目的で、トコフェロールについても調査を行った。トコフェロール群は、成長速度及び体長においてコントロールとの差は確認できず、濃度の違いによる成長の差も見られなかった (Fig. 2)。平均成長速度はコントロールが 4.62 μ m/d、0.02 mM トコフェロールが 5.57 μ m/d、0.1 mM トコフェロールが 5.22 μ m/d、0.2 mM トコフェロールが 4.31 μ m/d であり、全く有意差は認められなかった。このことは、フラボノイド化合物に見られた、成長促進の機能性は、単に抗酸化ということではなく、フラボノイド化合物は、特有の機能性を持つことを示唆する。

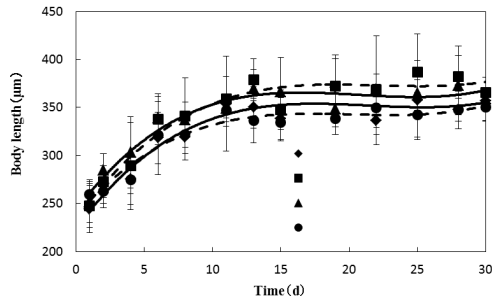


Fig. 2 Growth rate of *C. elegans* grown in the liquid synthetic medium containing various Tocopherol concentration

以上の結果は、本評価系が食品成分の機能性評価法として有効な手法であることを示すだけでなく、この手法で新たな機能性を見出すことができることを示すものである。遺伝子発現についても調査し、本評価系については、特許出願を行っている。

医薬品とサプリメントの複合影響について (インスリンとバナジウム) バナジウムとインスリンの単独暴露

液体合成培地を用いて、線虫の体長を指標とし、バナジウムとインスリンの影響を調査した。バナジウム添加による培養結果を Fig. 3 に示す。線虫はすべての培地で成長が確認でき、培養後 1 日目の体長はいずれの条件でも 250 µm 前後であった。観察最終日の 22 日目において、100 µM バナジウムでは約 400 µm まで成長し、コントロールとの体長の違いはほとんど見られなかった。一方、500 µM バナジウムでは 8 日目からコントロールと比べ、有意に体長の伸長が減少し、22 日目の体長は約 350 µm と短かった。致死に至る個体はほとんどなかったが、成長抑制が起きたことから、バナジウムの毒性が現れたと考えられる。500 µM は高濃度であるが、長期暴露による致死毒性は現れなかった。

同様に、インスリンの影響について調査した結果を Fig. 4 に示す。すべての暴露条件において、線虫はコントロールと同様に成長し、23 日目に約 600 µm まで成長した。線虫のインスリンシグナル経路は代謝や成長、寿命などに関わると報告されており、インスリン暴露により成長速度に影響が出ると予想したが、今回の実験でその影響は見られなかった。

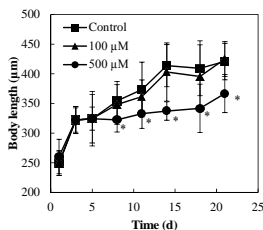


Fig. 3 Effects of vanadium in liquid synthetic medium on growth of *C. elegans* (*: $p < 0.05$)

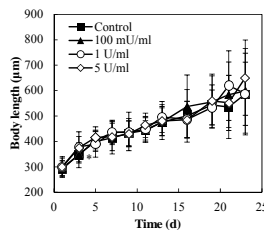


Fig. 4 Effects of insulin in liquid synthetic medium on growth of *C. elegans* (*: $p < 0.05$)

バナジウムとインスリンの複合暴露

サプリメントとしてのバナジウムは、インスリンに相加的に作用し、インスリン感受性を改善するという報告を基にその効果が期待されている。そこで、複合影響のテーマとして、両物質の複合暴露による成長への影響を調査した。体長測定結果を Fig. 5 に示す。Control と比較し、100 µM バナジウム、100 mU/ml インスリンでほとんど変化はないが、500 µM バナジウムで 20 日目の体長は短かった。バナジウムとインスリンの同時暴露において、500 µM バナジウムのときのみ有意な成長の遅れが現れた。バナジウムとインスリンを同時に暴露することによるはたらきを強める影響は確認できず、バナジウム単独と同様な毒性のみが現れた。

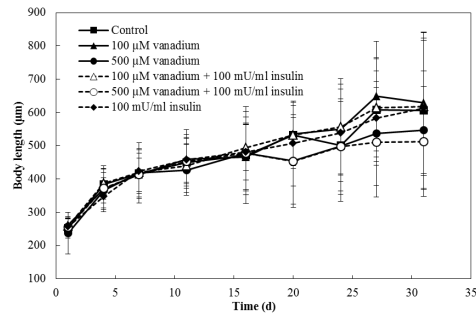


Fig. 5 Growth of *C. elegans* in the liquid medium with vanadium and insulin (*: $p < 0.05$)

そこで、さらに詳細な影響について分子レベルでの評価を行った。二次元電気泳動によりタンパク質発現を調査した結果を Fig. 6 に示す。銀染色により検出したタンパク質スポットをコントロールと各暴露条件を比較したところ、矢印で示す発現量の変化したスポットが確認できた。スポット 6, 7, 8 はバナジウムとインスリン単独暴露に共通しており、スポット 2, 3, 4 はバナジウム、スポット 5 はインスリンに特異的だった。バナジウム、インスリンで同じスポットの変化が確認できたことから、両物質が線虫に対して共通の作用を及ぼすことが示唆された。一方、スポット 2, 3, 4, 5 のように、それぞれの物質に特異的なスポットの増減も検出されたことから、バナジウムとインスリンが分子レベルで異なる影響を与えることも考えられた。また、同時暴露において、バナジウムまたはインスリン単独と共通するスポット 5, 7, 8 が検出されたが、スポット 1 は同時暴露でのみ消失した。

インスリンはチロシンのリン酸化を促進、バナジウムは脱リン酸化酵素を阻害する。そこで、タンパク質のリン酸化状態について合わせて調査した。各条件での解析結果を Fig. 7 に示す。電気泳動画像と重ねて示すが、各画像を比較するとそれぞれの条件で共通するスポットおよび特徴的なスポットが多数存在することが分かる。

以上の結果は、成長等の形質には影響が現われていないが、暴露による影響は、タンパク質のリン酸化レベルにも現われ、シグナル

が伝えられ、遺伝子の発現およびタンパク合成レベルでの影響を及ぼしてことを示すものであり、遺伝子発現の状況を調査する必要が高いことを示唆する。

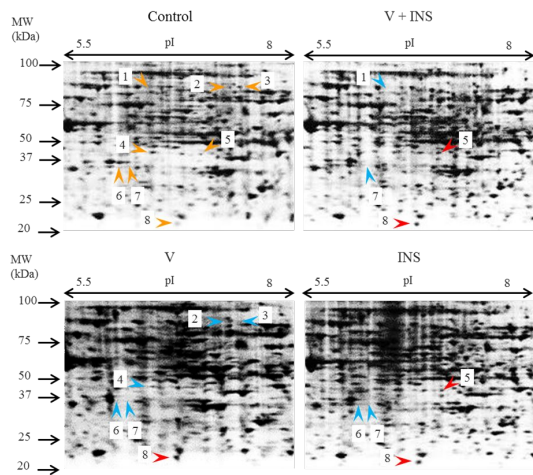


Fig. 6 Comparison with proteins of *C. elegans* detected by silver stain

V: 500 μM vanadium, INS: 100 mU/ml insulin

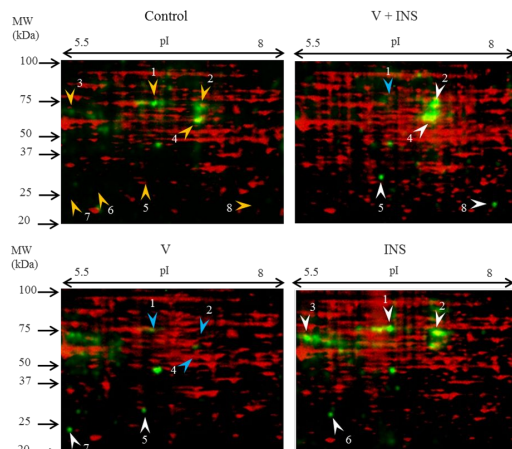


Fig.7 Comparison with phosphoproteins detected by Phos-tag biotin

V: 500 μM vanadium, INS: 100 mU/ml

そこで、一度に多くの遺伝子の発現解析が可能なDNAマイクロアレイによる解析を行った。線虫の約1万5000個あるといわれるゲノム遺伝子の中から、6000遺伝子を調べたところ、有意に下降した遺伝子がバナジウムで2つ、インスリンで1つ、同時暴露で6つ検出され、上昇した遺伝子はなかった (Table 2)。インスリン様遺伝子 *daf-2* 等の増減が起きると予想したが、これら遺伝子の発現量は変わらなかった。線虫はヒトインスリンに应答するが、内在性のインスリン様物質 *INS-1* に比べて应答が弱いことが報告されている。また、今回の研究からもヒトに投与されるよりも高濃度のインスリン暴露でも1世代目において線虫の成長や繁殖に影響を及ぼさないことから、インスリン様遺伝子の大きな変動は見られなかったと考えられる。

発現変動した遺伝子を線虫統合データベースにより調査したところ、成長や繁殖の阻害に関わる遺伝子が見つかった。RNAiにより *rpl-4* の発現を抑制すると、生殖不能な子孫を産み、繁殖数が減少することが報告されて

いる。また、*lgg-2* や *sqt-3* の抑制は胚性致死や幼虫段階での早期致死を引き起こす。これら遺伝子はバナジウム暴露で下降傾向を示し、同時暴露でさらに発現下降した (Table 2)。このことは、バナジウムとインスリンの同時暴露によって繁殖数の減少や成長遅延が起こる可能性があることを示唆するものである。今後さらなる詳細な検討が必要であるが、インスリンの投与を受けている場合にバナジウムの摂取は何らかの影響が現われる可能性が高いことが示唆された。

以上の結果より、遺伝子発現の変化を指標にすることで、形質に現れる以前に影響を適切に評価できることを示すものであり、さらに複合影響を評価できたことは、本評価系が機能性だけでなく、安全性を考慮した系として有用であることを示唆するものである。

Table 1 The response genes which expression levels were changed by vanadium and insulin

Gene	Description	Expression ratio against Control			Regulation		
		V	INS	V + INS	V	INS	V + INS
<i>col-54</i>	Collagen	0.45*	0.82	0.41*	↓	→	↓
<i>cyn-6</i>	Cyclophilin	0.75	0.85	0.46*	→	→	↓
<i>grl-21</i>	Ground-like (grd related)	0.50	0.84	0.44*	→	→	↓
<i>lgg-2</i>	LC3, GABARAP and GATE-16	0.56*	1.01	0.47*	→	→	↓
<i>rpl-4</i>	Ribosomal protein, large subunit	0.80	1.08	0.48*	→	→	↓
<i>sqt-3</i>	Squat	0.42*	0.74	0.32	↓	→	→
<i>srt-74</i>	Serpentine Receptor, class I	1.26	0.44*	1.08	→	↓	→
<i>wrt-10</i>	Warthog (hedgehog-like)	0.60*	0.86	0.47*	→	→	↓

総括

本研究では、線虫の培養が可能な合成液体培地を開発し、線虫をモデル生物とした食品成分の機能性および安全性を総合的に評価できる評価法の有効性を示すことができ、当初の目標を達成することができた。今後、さらに遺伝子発現解析等分子レベルの分析を詳細に進め、新規機能性評価として利用について検討して行く。

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 1 件)

Inokuchi A, Nihira M, Minakoshi M, Yamamoto R, Ishibashi H, Tominaga N, Arizono K, "Comparative study of the biological effects of antimicrobials, triclosan and trichlorocarbon, for *C. elegans*", Journal of Environment and Safety, 5(2) in press
doi:daikankyou.E14RP0201

〔学会発表〕(計 7 件)

荒巻愛世, 富永伸明, 有園幸司
液体合成培地を用いた線虫 *C. elegans* の in vivo 評価系による Cu の影響評価
第 17 回日本環境毒性学会研究発表会 (鹿児島)

Tominaga N, Furukawa R, Yamashita S, Yamaguchi A, Arizono K
Effects of PFOA and fluorotelomer alcohol

on *Caenorhabditis elegans* reproduction
SETAC Asia Pacific 2012(Kumamoto)

椋島李歩, 富永伸明
バナジウムの線虫 *C. elegans* に対する影響
平成 24 年度日本農芸化学会および日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部合同大会(鹿児島)

椋島李歩, 富永伸明
バナジン酸とインスリンによる線虫 *C. elegans* の応答遺伝子探索
第 50 回化学関連支部合同九州大会(北九州)

椋島李歩, 隈本宗一郎, 山口明美, 富永伸明, 有園幸司, 中村浩, 内田雅也
線虫合成培地を用いた銅・亜鉛の生体影響
第 19 回日本環境毒性学会研究発表会(東京)

椋島李歩, 富永伸明, 山口明美, 中村浩, 内田雅也
バナジウムの線虫 *C. elegans* による in vivo 評価
平成 25 年度日本農芸化学会関西・中四国・西日本支部合同大会(広島)

椋島李歩, 富永伸明, 山口明美, 中村浩, 内田雅也, 有園幸司
バナジウムとインスリンの線虫 *C. elegans* による複合影響評価
日本内分泌攪乱物質学会第 16 回研究発表会(東京)

[産業財産権]
出願状況(計 1 件)

名称: 線虫培養培地およびそれを用いた被検物質の評価法
発明者: 富永伸明
権利者: 独立行政法人国立高等専門学校機構
種類: C12N 1/10
番号: 特願 2013-080689
出願年月日: 2013 年 4 月 8 日
国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富永伸明(有明工業高等専門学校・物質工・教授)

研究者番号: 30227631

(2) 研究分担者

有園幸司(熊本県立大学・環境共生・教授)

研究者番号: 70128148

(3) 連携研究者

松野哲也(有明工業高等専門学校・電子情報・教授))

研究者番号: 80243921

山口明美(有明工業高等専門学校・支援センター・技術職員)

研究者番号: 90399262