

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660107

研究課題名(和文)食品機能研究を革新する酵素活性一斉分析技術の開発

研究課題名(英文) THE ESTABLISHMENT OF HIGH-THROUGHPUT ANALYSIS SYSTEM OF MULTIPLE ENZYME ACTIVITIES FOR THE PROMOTION OF NUTRI-OMICS STUDY.

研究代表者

加藤 久典 (Kato, Hisanori)

東京大学・総括プロジェクト機構・教授

研究者番号：40211164

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：食や栄養分野において、代謝制御の中心を担う酵素の生体内での活性を広範に把握することは重要と言える。しかしながら酵素活性測定は多くは手作業であるため複数酵素を分析する際には相当な時間と労力を要する。そこで申請者は生化学自動分析装置による酵素活性の一斉分析系の構築を目指した研究を行い、ラット肝臓を用いて16種類の栄養代謝関連酵素を自動で迅速に測定可能であることを示した。また、DNAマイクロアレイ解析を行い、遺伝子発現と酵素活性との応答の違いについても示した。

研究成果の概要(英文)：In nutrition study, it is essential to capture the metabolic profile at the level of enzyme activity. However, the measurement of multiple enzyme activity is generally time-consuming and requires a lot of work. Therefore we aimed to establish an easy and rapid method to analyze multiple metabolic enzyme activities using a high-throughput spectrophotometer. Our experiment in rats under feeding/fasting conditions showed that multiple metabolic enzyme activities (at least 16 enzymes) can be measured by rapid and automated method using the high-throughput spectrophotometer. Also, we showed the differential response between the changes of enzyme activity and gene expression.

研究分野：分子栄養学

キーワード：酵素活性 一斉分析 網羅解析 食品 ハイスループット

1. 研究開始当初の背景

近年のニュートリゲノミクス研究は、トランスクリプトーム、プロテオーム、メタボローム等の解析を通じて、栄養因子に対する複雑系な生命応答を明らかにしてきた。メタボロームに関していえば、生体内の代謝物の動態は様々な酵素の総合的な活性状態にほぼ依存すると言える。プロテオミクス、メタボロミクスの両者は、最近の技術の進歩により網羅性が増してきたが、いわゆる定量プロテオミクスでは、酵素についても「量」についての情報しか得られず、「活性」そのものについての議論はできない。すなわちメタボロームとプロテオームの間に、「酵素活性」というギャップが存在するのである。栄養学研究者は、これまで単一または少数の酵素活性を対象として、栄養因子による酵素活性への影響を明らかにしてきたが、遺伝子発現解析のような網羅的あるいは一斉に分析する試みは皆無であった。一方で、最近のテクノロジー進歩はめざましく、様々なハイスループット技術による各種生体分子の網羅解析が登場し著しい進化を続けている。こうした技術は既に臨床現場において疾患マーカー酵素の自動迅速測定に応用されているが、同じ原理に基づくハイスループットな解析が細胞内で代謝調節を担う様々な酵素の活性測定にも適用可能と考えられる。そこで本研究は、ハイスループット技術を活用することで、酵素活性の網羅的および自動化測定を実現し、当該研究分野の革新的な発展を後押ししたいと考え、本研究を着想するに至った。

2. 研究の目的

臨床現場で汎用される生化学自動分析装置において、既報の分析条件が適用可能な 16 種類の栄養代謝関連酵素を迅速且つ自動測定可能であることを示す。そして従来法により得られた結果と比較し、再現性を有する事を確認する。また酵素活性解析に用いた検体に対してトランスクリプトーム解析を適用し酵素活性との比較を行う。

3. 研究の方法

成長期 Wistar 系雄ラット (n=5) を、自由摂食群と 24 時間絶食群に分け、処置終了後に肝臓組織を採取して分析用の酵素源サンプルとした。酵素活性は、臨床用生化学自動分析装置 BIOLIS 24i (図 1) を用いて分光学的に

検出し、検出波長などの実験条件は既報に従って行った。すなわち、酵素源サンプルを一定温度にて平衡化した後に各酵素に特異的な基質を加え、時間当たりの生成物の増減を観察した。なお、酵素活性は粗抽出液中の総タンパク質量あたりの値として算出したが、この値も自動分析装置を用いた測定が可能であった。



図 1 本研究に用いた臨床用生化学自動分析装置 (Biolis 24i)

解糖系・脂質代謝・TCA 回路の代表的な酵素を中心に複数のサンプルに対して自動分析装置による測定と従来法による測定を行い、再現性を確認した後、自動分析を 16 種類の酵素に対して行った。本研究で分析対象とした酵素は栄養代謝研究において鍵となる酵素、すなわち GK (glucokinase), FAS (fatty acid synthase), IDH (isocitrate dehydrogenase), ACC (acetyl-coenzyme A carboxylase), CS (citrate synthase), PK (pyruvate kinase), G6PD (glucose-6-phosphate dehydrogenase), CPT (carnitine palmitoyltransferase), HAD (hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase), LDH (lactate dehydrogenase), ALT (alanine aminotransferase), AST (aspartate aminotransferase), ALP (alkaline phosphatase), CK (creatine kinase), LAP (leucyl aminopeptidase), および AMY (amylase) であった。

続いて、酵素活性測定に用いたものと同じのラット肝臓検体を用いて DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行い、酵素活性の結果と比較した。マイクロアレイ解析は肝臓より取得した RNA を群毎にプールし Affymetrix 社 GeneChip (Rat genome 230 2.0 array) に供した。解析には Affymetrix 社が提供する GeneChip Operating Software (GCOS) を使用し、All probe set で

の normalization を行った後 2 群間比較を行った。GCOS により Increase あるいは Decrease と判定されたプローブを変化ありと判断して比較解析に用いた。使用したアレイチップは上記 16 種全ての酵素をコードする遺伝子に対するプローブが搭載されており、酵素活性変化と遺伝子発現変化の比較が可能であった。

4. 研究成果

(1) 従来法との比較

取得した摂食および絶食ラットの肝臓サンプルを用いて、従来法と生化学自動分析による酵素活性の値を比較したところ、検証に用いた 7 種類の酵素 (FAS, ACC, PK, CS, G6PD, GK, IDH) においては両手法間で高い相関 ($R^2=0.9-0.99$) が認められた。これにより自動分析による酵素活性測定の妥当性について一定の確認ができた。

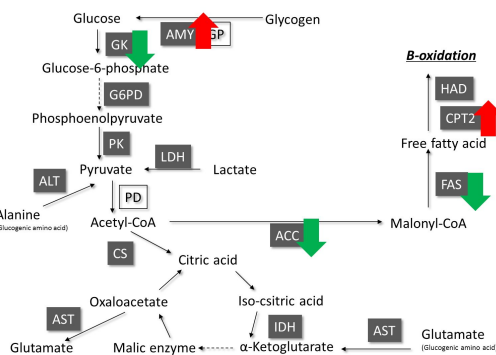


図 2 絶食時に有意に活性が変化した酵素 (矢印)

(2) 酵素活性の一斉分析

上述の 16 種類の酵素に対して自動分析装置を用いて 24 時間絶食ラット肝臓の酵素を一斉分析した。自動分析に要した時間は試薬準備時間を含めわずか 4 時間であり、迅速な測定が可能である事が示された。

酵素活性値 (\log_2) は自由摂食群と比べて 24 時間絶食群において GK で -2.8 倍 ($p<0.001$)、ACC で -1.3 倍 ($p<0.001$)、FAS で -1.5 倍 ($p<0.05$) の低下、AMY で 0.9 倍 ($p<0.05$)、CPT2 で 0.5 倍 ($p<0.05$) の増加が観察された。すなわち解糖系、脂肪酸合成系の抑制、および脂肪酸酸化系の促進を示す結果

を得た (図 2)。これらの応答は既報の絶食の対する応答と一致していた (図 3)。一方、既報において絶食により酵素活性変化への影響を受けない事が示されている CS および PK は、本研究においても群間で有意な差が認められなかった。

(3) 酵素活性と遺伝子発現の比較

群間で酵素活性の有意な変化が観察された 5 つ酵素のうち ACC、FAS、GK、CPT2 の遺伝子発現はいずれも酵素活性と同じ方向に顕著に変化していた (図 3)。遺伝子レベルで変化が観察されなかった CS は、酵素活性も群間で差は認められなかった。一方、G6PD、PK、LDH は遺伝子発現レベルでは顕著に減少していたが、酵素活性は群間で有意差は認められなかった。これらの事から、遺伝子発現変化が必ずしも酵素活性変化と連動するわけではない事が示された。

Enzyme Symbol	Enzyme activity	Previous reports (pubmed)	Microarray	The role of enzyme
FAS	↓	↓	↓	key enzyme which regulates the biosynthesis of fatty acids
ACC	↓	↓	↓	key enzyme which regulates the biosynthesis of fatty acids
CS	-0.2	No change		the first step of the citric acid cycle
IDH	-0.04	N/A		the third step of the citric acid cycle
GK	↓	↓	↓	the first step of glycolysis
PK	-0.2	No change	↓	catalyse the final step in glycolysis
G6PD	0.2	↓	↓	the first step in pathway that converts glucose to ribose-5-phosphate
CPT2	↑	↑	↑	transfer the long-chain fatty acid into the mitochondria
HAD	0.3	N/A	↑	converting medium and short-chain fatty acids to the major source of energy
LDH	-0.2	↑	↓	the conversion of pyruvate and lactate
ALT	-0.4	↑		catalyses the conversion of L-alanine and 2-oxoglutarate to pyruvate and L-glutamate
AST	-0.1	N/A		catalyses the transfer from alanine to ketoglutarate to form pyruvic acid and glutamate
ALP	-0.6	N/A		catalyses the hydrolysis of phosphate monoesters
CK	-0.03	N/A		the conversion of creatine and consumes ATP to create PCr and ADP
AMY	↑	↑	↓	an enzyme that breaks down starch
ChE	-0.2	N/A		catalyze the hydrolysis of the acetylcholine
LAP	0.1	N/A		catalyze the hydrolysis of leucine residues of protein

図 3 酵素活性と遺伝子発現変化の比較

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

Saito K. and Kato H. The Establishment of High-Throughput Analysis System of Multiple Enzyme Activities for the Promotion of Nutri-Omics Study, 12th Asian Congress of Nutrition, JAPAN (2015)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 久典（KATO, Hisanori）
東京大学・総括プロジェクト機構・特任教授
研究者番号：40211164

(2) 研究分担者

（ ）

研究者番号：

(3) 連携研究者

（ ）

研究者番号：