〈平成17年度〉

抗肥満性食品成分の効果的摂取に関する ニュートリゲノミクス解析

加藤久典

(東京大学大学院農学生命科学研究科)

1. 緒 言

近年、様々な機能性食品成分が消費者の注目を 集めているが、なかにはその効果の実験的・理 論的根拠が曖昧なものも含まれている。例えば本 研究では抗肥満活性を有するとされる食品成分の うちカルニチンに着目するが、これは生化学的な 役割は明確である一方でサプリメントとして摂取 した際の効果には具体的な裏づけが乏しく、さら なる情報の蓄積が期待されている。また、本研究 において、大豆タンパク質の単回投与に対する遺 伝子発現の応答についても予備的な結果を取得し た。

ポストゲノム食品・栄養学として注目されているニュートリゲノミクスが発展し、なかでもトランスクリプトーム解析(DNAマイクロアレイ)は、何万もの遺伝子の発現を一度に測定できる手法として、有効性が認められ広範に利用されている。一方で、この研究分野は新しい学問領域であるため発展途上な側面もあり、ゲノミクス解析の特性を活かした効率的な研究アプローチが日々試行錯誤されている。

本研究では、DNAマイクロアレイの威力を最大限に活用し、機能性成分の効果の新しい評価方法を模索することを主な目的とした。具体的には(1) 抗肥満活性を有するとされるL-カルニチンを対象に単回投与による初期応答(3時間及び9時間)からの機能性評価・予測を試みる。(2)参照データベース構築による実験間でのデータ共有・活用

の可能性を探る。

実験は解析対象をカルニチンに絞って行ったが、大豆タンパク質の単回投与に対する遺伝子発現の応答についても予備的な結果を取得した。また今回得られた知見を他の様々な活性を有する成分に幅広く応用し、新しい機能性成分の発見にもつながるよう、方法の確立に特に焦点を絞った。

2. 材料および方法

2.1 動物実験

L-カルニチン (関東化学(株)) を10mg/mlとな るように生理食塩水に溶解し投与サンプルとし た。また同様に大豆タンパク質(不二製油㈱)を 600mg/mlとなるように溶解し投与サンプルとし た。 5 週齢のWistar系雄ラット(日本チャールス リバー(株))を環境に馴化させるため3日間ステン レスケージ内にて個別に飼育した。ケージはコン トロールされた環境条件下(温度21℃±1,照明 8時~18時、湿度55~65%) に置かれ、飼料は市 販ペレット (AIN-93G) を与えた。その際, 飼料 と飲水は随意に採れるようにした。4日目に全て のケージからペレット飼料を抜き取り、ラットを 16時間絶食させた後、投与実験に供した。ラット はカルニチン溶液を 5 mg/100g (wt) となるよ う(大豆タンパク質については300mg/100g(wt)) に経口ゾンデにより胃内に直接投与され,投与3 時間,9時間後に頚動脈採血により屠殺された。 なお、カルニチンのラット胃内投与後の血中濃 度は投与10分後から上昇し40分でピークに達した

後,24時間以上をかけて緩徐に低下することが知られている $^{1)}$ 。採血後は速やかに肝臓を採取し液体窒素を用いて凍結後,解析に用いるまで -80° で保存した。また,生理食塩水を等量投与した群を対照群とし,同様に実験を行った。

2.2 DNAマイクロアレイ解析

TRIzol® reagentを用いて各肝臓組織から TotalRNAを抽出した。続いてAffymetrix社標準 プロトコルにしたがってcDNAを作成後, cRNA を含むHybridization Cocktailを作成した。上 記のHybridization CocktailをGeneChip®(Rat Genome 230 2.0) に添加して, 45℃, 16時間ハ イブリダイズさせたのち、GeneChip Fluidics Station 450を用いてチップの洗浄及び染色を行っ た。最後に、蛍光スキャナーによりチップに搭載 された31099プローブの蛍光強度を検出した。得 られた生データはGCOS (GeneChip Operating System v1.3) を用いてAll probe set間で正規化 後, Comparison解析により対照群との発現量の 比率を算出した。False positive データを減らす ために全ての群においてPresentと判定された遺 伝子プローブ(約15000個)に絞り解析を行った。 またGCOSによる解析の結果、Changeが「I」ま たは「D」(Change p-valueはそれぞれp <0.002, p>9.998) と判定されたもののうち発現変化倍率 が1.41倍以上 (Signal log ratio値で±0.5以上) あっ たものを解析対象とした。対照群と比較してカル ニチン投与3時間後で変動が認められた遺伝子は 334個(増加:259個,減少:75個),9時間後で 変動が認められた遺伝子は342個(増加:236個, 減少:106個) であった。

3. 結果と考察

3.1 Functional Annotation Toolによる解析 L-カルニチンは脂肪のミトコンドリア膜内への 輸送を担い β 酸化に必須であるため,一般にエネ

ルギー生産や脂質異化代謝に重要な役割を果たす 栄養成分と考えられている。我々はマイクロアレ イの特性を活かすため、これらのメカニズムに拘 ることなく全体的な視点から解析を始めた。

マイクロアレイを用いる実験では膨大な遺伝子 発現変化を基に複数の生体応答を一度に捉えるこ とができる反面,まずどの変化に着目して解析す ればよいのかという方向性決定には難点も多い。

我々はまずバイアスの無い機械的な解析によっ てカルニチン刺激によって最も変動した遺伝子 グループを抽出する目的でDAVID - Functional Annotation Tool²⁾ の遺伝子機能分類を適用し た。これは共起性に基づき最も変動の多い遺伝 子を含む機能カテゴリーを発見するためのWEB ツールであり、解析対象をフォーカスするのに 有効である。解析の結果,表1に示すように投 与後3時間及び9時間で減少した遺伝子群につ いて有意な機能カテゴリーが得られた(Fisher' s exact p-value: 0.0001>p)。まず投与後 3 時間 で減少と判定された遺伝子においてはantigen presentationやimmune response, apoptosisなど 免疫応答・細胞増殖に関する機能カテゴリーが 変動している様子が伺えた。生化学的な機能か ら, 脂質代謝との関係で注目されることの多いL-カルニチンであるが、既に免疫調節作用について 多数の報告がなされている^{3~5)}。作用メカニズ ムの詳細については不明なものが多いが、一つの 経路としてL-カルニチンのグルココルチコイド受 容体への刺激を介した免疫調節作用6)が提唱さ れている。一般的にグルココルチコイドは炎症反 応に関与する遺伝子発現を抑制すると言われてお り7,このことも今回の結果を支持している。ま た、ラットへのカルニチン投与がエンドトキシン (lipopolysaccharide) により誘導されるサイトカ イン産生を抑制するという興味深い報告もある。 このように免疫応答の調節はL-カルニチンの重要

表1 Functional Annotation Toolを用いた遺伝子の機能分類

3 hour - downregulated

Term	Count	p-Value
antigen processing	10	3.53E-11
antigen presentation	10	2.42E-10
response to biotic stimulus	20	5.34E-10
defense response	19	2.10E-09
immune response	18	3.91E-09
antigen processing, exogenous antigen via MHC class II	5	1.37E-05
antigen presentation, endogenous antigen	5	1.94E-05
antigen processing, endogenous antigen via MHC class I	5	2.16E-05
antigen presentation, exogenous antigen	5	3.55E-05
negative regulation of apoptosis	6	6.30E-04
negative regulation of programmed cell death	6	6.48E-04
response to other organism	9	7.23E-04

9 hour - downregulated

Term	Count	p-Value
lipid metabolism	12	5.12E-05
cellular lipid metabolism	10	2.74E-04
carboxylic acid metabolism	10	2.88E-04
organic acid metabolism	10	2.98E-04

^{*}Overrepresented gene ontology biological process categories according to DAVID Functianal Annotation Tool (p < 0.0001) for significantly down regulated genes by Carnitine administrated rat liver.

な生理作用の一つであるが、今回の結果から投与 後3時間という早い段階で転写活性に影響を与え る様子を捉えることができた。

一方,カルニチン投与9時間後に減少した遺 伝子群においてlipid metabolism, cellular lipid metabolismに関する機能カテゴリーの遺伝子へ の影響が示唆された。Lipid metabolismに含ま れる遺伝子はcytosolic acyl-CoA thioesterase 1 や mitochondorial acyl-coa thioesterase 1など細 胞内において脂質異化に働く因子であり、これら が増加ではなく抑制されていた事は予想外であっ た。また、これら以外にもカルニチンの脂質異 化代謝に重要なCarnitine transporter, Acyl-CoA synthase, Carnitine O-palmitoyltransferase type I (CPT-1) and Carnitine O-palmitoyltransferase type II (CPT-2), Carnitine acetyltransferase (CRAT) についても変化は小さいものの有意な 減少が認められた。つまり、投与9時間後におけ る脂質異化代謝に関する遺伝子の発現は全体的に は抑制の方向に変化していることが推察された。 ヒト肝ガン細胞HepG2を用いたin vitroの実験で は培地へのカルニチン添加によって4時間という 短時間で濃度依存的なCPT-1, CPT-2, CRATの mRNAレベル上昇が認められるが、一定濃度を 超えた場合には逆に抑制がかかることが示されて いる 9)。今回の実験においても細胞内カルニチン 濃度上昇が脂質分解系経路のネガティブフィード バックを引き起こした可能性が考えられ、これは カルニチンの効果的な摂取方法や摂取量を検討する上で興味深い知見である。

Increaseと判定された遺伝子群に関しては3時間,9時間実験ともに有意な変動(0.0001>p)を示す機能カテゴリーは得られなかった。

以上のように、経口投与実験における Functional Annotaion Toolによるバイアスの無 い解析からカルニチンの生理作用の中でも特に重 要な脂質代謝や免疫調節作用に関する遺伝子の変 動を捕らえることができた。

3.2 発現変動が顕著な遺伝子に着目した解析 続いて発現変化が特に顕著な遺伝子群に着目 した。具体的には3時間あるいは9時間のい ずれかで対照群に比べて2倍以上・2分の1

^{**}No significant categories was obseaved in up-regulated genes.

表2 L-カルニチン投与により顕著に発現が上昇した遺伝子

	3h	9h	Gene Title
1367811 at	NC	2.0	3-phosphoglycerate dehydrogenase
1368223 at	2.0	NC	a disintegrin—like and metalloprotease with thrombospondin type 1
1387493 at	NC	2.0	A kinase (PRKA) anchor protein 5
1398109 at	2.0	1.6	abhydrolase domain containing 2 (predicted)
1370479 x at	NC	2.1	alpha—2u globulin PGCL4
1387985 a at	1.2	2.6	alpha–2u globulin PGCL4
1394948 at	2.1	1.5	Arrestin domain containing 3
1368155 at	2.0	0.5	cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 40
1370387 at	2.1	NC	cytochrome P450, family 3, subfamily a, polypeptide 13
1387874 at	2.1	0.7	D site albumin promoter binding protein
1397205_at	1.3	2.1	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 7 (predicted)
1389105_at	2.0	1.5	dystroglycan 1
1395173_at	NC	2.1	GPI-anchored membrane protein 1 (predicted)
1385423_at	NC	2.1	inner membrane protein, mitochondrial (predicted)
1370728_at	2.0	1.9	interleukin 13 receptor, alpha 1
1387406_at	1.5	2.3	kinase interacting with leukemia-associated gene
1392807_at	2.0	NC	ligase III, DNA, ATP-dependent (predicted)
1369218_at	1.5	2.0	met proto-oncogene
1396465_at	2.3	NC	myotubularin related protein 3 (predicted)
1387283_at	0.8	2.3	myxovirus (influenza virus) resistance 2
1370540_at	2.0	NC	nuclear receptor subfamily 1, group D, member 2
1387981_at	2.0	NC	olfactory receptor 59
1396411_at	NC	2.5	phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic, alpha polypeptide
1371776_at	2.0	1.6	Phosphatidylinositol 3-kinase, regulatory subunit, polypeptide 1
1370746_at	2.0	NC	protein kinase, cAMP dependent, catalytic, beta (predicted)
1371161_at	1.7	2.8	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3B
1380125_at	NC	2.5	Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3B
1384262_at	1.3	2.0	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3B
1398128_at	NC	2.0	REV3-like, catalytic subunit of DNA polymerase zeta RAD54 like
1387193_a_at	NC	2.1	serine protease inhibitor, Kazal type 1
1370714_a_at	2.0	1.7	sialyltransferase 1
1381973_at	2.0	1.7	solute carrier family 25, member 30
1369653_at	2.5	7.0	transforming growth factor, beta receptor II
1394218_s_at	NC	5.7	zinc finger protein, multitype 2 (predicted)

(fold change)

表3 L-カルニチン投与により顕著に発現が減少した遺伝子

	3h	9h	Gene Title
1368272_at	NC	0.5	glutamate oxaloacetate transaminase 1
1368458_at	NC	0.4	cytochrome P450, family 7, subfamily a, polypeptide 1
1368569_at	NC	0.3	aldo-keto reductase family 1, member B7
1369063_at	0.5	0.4	acidic (leucine-rich) nuclear phosphoprotein 32 family, member A
1369063_at	0.5	0.4	acidic (leucine-rich) nuclear phosphoprotein 32 family, member A
1369864_a_at	2.3	0.4	serine dehydratase
1371033_at	0.5	0.8	RT1 class II, locus Bb
1371150_at	NC	0.3	cyclin D1
1371643_at	0.7	0.4	cyclin D1
1383075_at	0.7	0.4	cyclin D1
1383749_at	0.5	NC	ABI gene family, member 3 (predicted)
1387191_at	0.4	1.7	probasin
1387396_at	0.7	0.2	hepcidin antimicrobial peptide

(fold change)

以下に変動したものを全て抽出した(表2,表3)。3.1で得られた結果をもとに脂質代謝・免疫調節・細胞増殖に関する遺伝子を中心に生理機能との関係が明確なものに絞って解析を試みた。我々はまず脂質代謝・薬物代謝に重要な役

割を果たすとされるCytochrome p450ファミリータンパク質に着目したが、そのうち投与3時間後においてCyp2c40、Cyp3a13の発現増加が認められた。Cyp2c40は免疫的炎症反応に重要なアラキドン酸の代謝に関わる酵素である¹⁰⁾。今回

Cyp2c40以外にもアラキドン酸代謝に重要な酵素 arachidonate 12-lipoxygenaseの発現抑制(-1.52倍),代謝産物であるプロスタグランジンの受容体prostaglandin E receptor 3の発現上昇(1.5倍)が観察された。このことからカルニチンの免疫賦活作用の一部がアラキドン酸カスケードへの影響を介している可能性が示唆された。同じく薬物代謝酵素であるCyp3a13については知見が少ないが様々な核内受容体によって発現が制御されること,デキサメタゾンなどの薬剤により顕著に誘導される因子として良く知られている^{11.12)}。前述のようにカルニチンはグルココルチコイドのアゴニストとして作用することが示されおり、Cyp3a1の顕著な発現上昇もこの事実と一致する。

細胞増殖については、3時間及び9時間で顕著に減少した遺伝子の中に細胞周期をG1からS期へ移行するのに必須のCyclin D1が含まれていた。Cyclin D1は多くのがん細胞において異常発現していることから抗ガン剤のターゲットと考えられている因子である¹³⁾。また細胞増殖抑制作

用を持つとして有名なサイトカインTGF- β の受容体及び肝癌抑制作用を持つとされるmet protooncogene(HGF受容体)が特に顕著に増加した。何れも薬剤ターゲットとして,また細胞増殖の調節シグナルとして極めて重要な意味を持つ分子であり,既に知られるカルニチンによる細胞制御機構 14 に新たな知見を提供できた。

3.3 参照データベースの構築と活用について 以上までに得られた結果は膨大なマイクロアレイ解析データのほんの一部に過ぎない。遺伝子発 現変化を取りこぼし無く活用するためには情報共 有を指向した専用のデータベースが必要であると 考えられる。そこでWeb上でのデータ共有を指 向した参照データベースを構築しているが、本研 究において本データベースを大きく改良し、デー タの横断的比較の機能を増強した(図1)。これ によりアレイプラットフォームや研究室間のデー タを相互に比較することが可能になった。本研 究で得られたカルニチン投与による発現プロファ イルもここから閲覧が可能となっている(http://

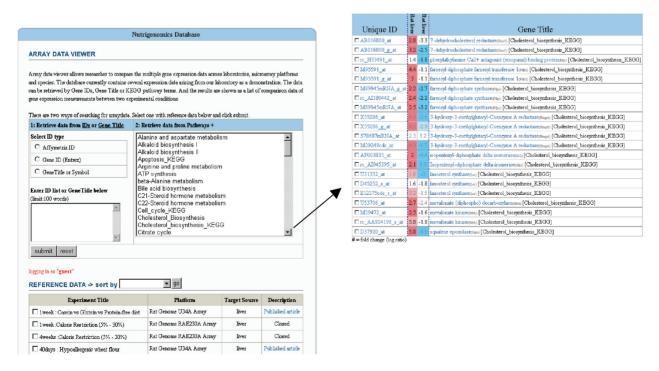


図1 参照データベース 左図は発現プロファイルのデータ検索画面。右図は検索結果を示している。

133.11.220.243/nutdb.html)。また,本報告ではデータは省略したが,ラットに大豆タンパク質を単回投与した際の肝臓の遺伝子発現プロファイルも本研究において得ており,同データベースに搭載している。通常,タンパク質摂取の効果は,週単位の一定期間投与して解析するが,この実験では摂取後数時間での応答を見ている点がユニークといえる。大豆タンパク質も抗肥満作用が知られている食品成分のひとつであり,その効果が遺伝子発現プロファイルレベルでは非常に早く見られることを期待して解析を行った。単回投与では,脂質代謝関連遺伝子のごく一部のみが応答することがわかったが,本データも他の抗肥満成分の効果を比較する場合のリファレンスデータのひとつとして活用が期待される。

また、生理的な意味を持つ遺伝子バイオマーカーセットを予め登録することで、より効率的なデータ解析が実現できると考えられる。例えば本データベースには毒物ゲノミクス研究から得られた肝毒応答遺伝子¹⁵⁾ が登録されており、これらは直感的な操作によって入力(登録)データと比較することができる。

今回実験に用いたL-カルニチンは経口摂取時に は極めて安全性の高いサプリメント素材であり、 経口急性毒性 (LD50≥5g/kg) をはじめ、様々 な毒性試験において安全性が証明されている。そ こで、実際にデータベースに登録された48個の肝 臓毒応答遺伝子(増加:22遺伝子、減少:26遺伝子) をカルニチンの発現データと比較した。その結果, 投与3時間及び9時間と同方向への2倍以上の変 化が認められたものは無く、遺伝子レベルで安全 性を裏づける結果を得た(当研究で行われた肝障 害誘導薬剤投与実験における発現比較では相当数 の遺伝子がこれら毒物バイオマーカーに応答する 事が示されている)。なお今回の実験で肝臓障害 マーカーGOT, GPTは群間に有意差は認められ なかった (Data not shown)。このように、発現 プロファイルは従来の食品安全性評価系を補完す る形でも活用されうると考えられる。今後、様々 な成分や条件で実験データを蓄積し、より多様で 信頼性の高い食品機能評価システムを構築してい く予定である。

3.4 まとめ

今回, Lカルニチンを対象として単回投与実験による新しいトランスクリプトーム解析例を提示できた。食品成分による生体応答は比較的弱くブロードであるため, 観察期間が長期に及ぶ場合も多い。マイクロアレイを用いた解析では僅かで短

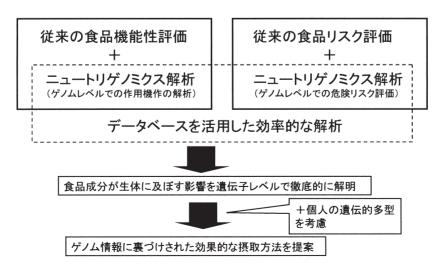


図2 食品成分のニュートリゲノミクス解析

期的な応答を網羅的に検出できるため、今回のような単回投与による解析からも多くの情報を得ることができる。今後、こうした解析に加え、データベースと解析基盤データの整備が進むことで、ゲノム情報を活用した効率的な食品機能の評価が可能になると期待される(図2)。

謝辞

本研究に対し多大なご助成を賜りました財団法 人 浦上食品・食文化振興財団に厚く御礼申し上 げます。

文 献

- 羽鳥泰彦,泉二奈緒美,吉信清夫,重松昭世,L塩化カルニチンの体内運命(第一報),医薬品研究,19(2), 324-340(1988)
- 2) http://david.abcc.ncifcrf.gov/
- 3) Athanassakis I, Mouratidou M, Sakka P, Evangeliou A, Spilioti M, Vassiliadis S. L-carnitine modifies the humoral immune response in mice after in vitro or in vivo treatment. Int Immunopharmacol. 1: 1813-22, 2001
- 4) Mast J, Buyse J, Goddeeris BM. Dietary L-carnitine supplementation increases antigen-specific immunoglobulin G production in broiler chickens. Br J Nutr. 83: 161-6, 2000
- 5) Deng K, Wong CW, Nolan JV. Long-term effects of early-life dietary L-carnitine on lymphoid organs and immune responses in Leghorn-type chickens. J Anim Physiol Anim Nutr (Berl) . 90: 81-6, 2006
- 6) Manoli I, De Martino MU, Kino T, Alesci S. Modulatory effects of L-carnitine on glucocorticoid receptor activity. Ann N Y Acad Sci. 1033: 147-57, 2004
- 7) Fingerle-Rowson G, Koch P, Bikoff R, Lin X, Metz CN, Dhabhar FS, Meinhardt A, Bucala R. Regulation of macrophage migration inhibitory factor expression by

- glucocorticoids in vivo. Am J Pathol. 162: 47-56, 2003
- 8) Winter BK, Fiskum G, Gallo LL. Effects of L-carnitine on serum triglyceride and cytokine levels in rat models of cachexia and septic shock. Br J Cancer. 72: 1173-9, 1995
- 9) Alzbeta G, Elke L, Sylvia B, Alison CA, Alfred L, Reinhold H. . L-Carnitine Regulates mRNA Expression Levels of the Carnitine Acyltransferases = CPT1A, CPT2, and CRAT. An International Journal of Chemistry. 136: 1349-1363, 2005
- 10) Luo G, Zeldin DC, Blaisdell JA, Hodgson E, Goldstein JA. Cloning and expression of murine CYP2Cs and their ability to metabolize arachidonic acid. Arch Biochem Biophys. 357: 45-57, 1998
- 11) Anakk S, Kalsotra A, Shen Q, Vu MT, Staudinger JL, Davies PJ, Strobel HW. Genomic characterization and regulation of CYP3a13: role of xenobiotics and nuclear receptors. FASEB J. 17: 1736-8, 2003
- 12) Down MJ, Arkle S, Mills JJ. Regulation and induction of CYP3A11, CYP3A13 and CYP3A25 in C57BL/6J mouse liver. Arch Biochem Biophys. 457: 105-10, 2007
- 13) Jimenez-Orozco FA, Lopez-Gonzalez JS, Nieto-Rodriguez A, Velasco-Velazquez MA, Molina-Guarneros JA, Mendoza-Patino N, Garcia-Mondragon MJ, Elizalde-Galvan P, Leon-Cedeno F, Mandoki JJ. Decrease of cyclin D1 in the human lung adenocarcinoma cell line A-427 by 7-hydroxycoumarin. Lung Cancer. 34: 185-94, 2001
- 14) Conti P, Reale M, Stuard S, Spoto G, Picerno F, Ferrara T, Placido FC, Barbacane RC, Albertazzi A, Errichi BM. Reduced human lymphocyte blastogenesis and enhancement of adenosine triphosphate (ATP) by L-carnitine. Mol Cell Biochem. 131: 1-8, 1994
- 15) Minami K, Saito T, Narahara M, Tomita H, Kato H, Sugiyama H, Katoh M, Nakajima M, Yokoi T. Relationship between hepatic gene expression profiles and hepatotoxicity in five typical hepatotoxicant-administered rats. Toxicol Sci. 87: 296-305, 2005

A Nutrigenomics Study on the Effective Intake of Anti-Obesity Food Factors

Hisanori Kato

(Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo)

Nutrigenomics technology is about to revolutionize food and nutrition science through its power of comprehensiveness. Of different nutrigenomics methodologies, transcriptome analysis is the primary choice for exhaustively revealing the functionality of food factors. Here we employed DNA microarray technology to probe the mechanisms underlying the anti-obesity effect of carnitine. Rats were administered carnitine through gavage at the dose of 5mg/100gBW and sacrificed after 3 and 9 hours. Their hepatic gene expression profile was obtained and was compared with that of control rats. Functional annotation analysis revealed that many genes related to immune response and cell proliferation were downregulated at 3 hr after carnitine administration. Surprisingly, many genes for enzymes involved in lipid catabolism were down regulated at 9 hr. Another purpose of this study is to facilitate efficient utilization of nutrigenomics data through a unique database. The function of the database was extended to make cross-study comparison easier. The data of the above experiment was put into the database, and comparison was made with many other transcriptomics data. No similarity of the gene expression change was suspected when compared with the effects of hepatotoxic reagents suggesting the safety of the carnitine dose employed in this experiment. The result of the study indicated that transcriptomics approach is highly useful in not only function analysis of food factors but also safety evaluation of them. The combination of DNA microarray technology and the improved database will contribute greatly to the realization of effective use of functional food factors.