

トランスクリプトミクスによる機能性評価のポイント

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 食品研究部門
小堀 真珠子

【はじめに】

遺伝子発現の網羅解析であるトランスクリプトミクスは、食品成分の作用や作用メカニズムの解明に有用である。正常あるいはモデル動物等に食品または食品成分を摂取させ、組織の遺伝子発現を網羅解析して、食品（成分）を摂取していないコントロールと比較することにより、食品（成分）で変化する遺伝子発現が明らかになる。更に、食品（成分）で変化した遺伝子をパスイ解析すること等により、どのような生理作用に影響を及ぼしたのかを明らかにすることができる。RNA の抽出から DNA マイクロアレイまたは次世代シーケンサーを用いた測定まではキット化されており、データ解析法は多岐にわたることから、本項では、DNA マイクロアレイを用いた機能性評価の実験概要と組織サンプルを準備するにあたってのポイントを述べる。

【実験概要】

1. 動物実験
2. 組織の採取
実験動物（マウス等）を麻酔下で安楽死させ、麻酔後短時間のうちに組織を採取する。
3. total RNA の精製
市販のキット（RNeasy Midi Kit または Mini Kit（QIAGEN）等）を用い、メーカーのプロトコール、注意事項に従って total RNA を精製する。
4. DNA マイクロアレイによる測定
DNA マイクロアレイ（GeneChip Mouse Gene 1.0 ST Array, Mouse Genome 430 2.0 Array（Affymetrix）等）を用い、メーカーのプロトコール、注意事項に従って、精製した total RNA からのサンプル調整、ハイブリダイゼーション、染色、測定を行う。
5. 遺伝子発現解析
統計解析ソフト「R」、GeneSpring（Agilent Technologies）、Ingenuity Pathway Analysis（QIAGEN）等を用いて解析する。

【ポイント・注意点】

1. 動物実験
 - 1) 比較解析により食品成分等の作用を明らかにするためには、各群、5 匹（n=5）以上の測定を行うことが望ましい。
 - 2) 採取する時間帯や種々のストレス等により遺伝子発現が変動するので、目的に応じた、実験計画を立てる。
 - 3) 一晩の絶食や直前の食餌は肝臓等の遺伝子発現に影響を及ぼすことから、2, 3 時間の絶食後に安楽死させる。
2. 組織の採取
 - 1) 現在では殆ど用いられないが、エーテル麻酔は短時間（5-30 分）で肝臓の代謝酵素に影響を及ぼすことが報告されている。また、ペントバルビタールも 1~数時間で代謝酵素の発現に影響を及ぼすことが報告されている。

- 2) 肝臓や脂肪など、比較的均一な組織が適している。不均一な組織では、発現量のばらつきが大きく、統計解析が困難である¹⁾。
 - 3) 肝臓や内臓脂肪の一種である精巣周囲脂肪組織も、部位により機能が異なることが明らかになっている。端の部分を避けて、中央部のなるべく同じ部位を採取する。あるいは検討したい部位に揃えて採取する。
 - 4) 肝臓等の組織は、RNAの安定化試薬である RNeasy RNA Stabilization Reagent (QIAGEN, 76104) に漬ける等して保存する。RNeasy 1ml 当たり 100mg 以下、1片 5mm 以下の組織を入れて、4℃で保存する。4週間以上保存する場合は、4℃で一晩インキュベーションした後、チューブをそのまま-20℃に移して保存するか、組織を RNeasy 溶液から取り出して、-80℃で保存する。
 - 5) 脂肪組織の場合は、RNAの安定化試薬を用いず、液体窒素で凍結し、-80℃で保存する。
3. total RNA の精製
- 1) RNeasy での抽出前に RNA 分離用試薬である TRIzol (ThermoFisher Scientific) で抽出することにより、収率、純度が上がる場合がある。
 - 2) 脂肪組織では、RNeasy Lipid Tissue Midi Kit または Mini Kit (QIAGEN) 等を用いる。組織毎にメーカーのプロトコール、注意事項を参照する。

実験例 1²⁾

C57BL/6J マウスに AIN93G (普通食)、高脂肪、高ショ糖、高コレステロール食 (西洋型食) または 0.05% ケルセチン添加西洋型食 (西洋型食 + ケルセチン) を 18 週間摂取させた後、内臓脂肪組織である精巣周囲脂肪組織の遺伝子発現を DNA マイクロアレイ (Mouse Genome 430 2.0 Array) を用いて解析した。その結果、3 群間で 4657 遺伝子の発現が有意に変動した (N=9, P<0.05 one-way ANOVA)。パスウェイ解析 (Ingenuity Pathway Analysis) により、ケルセチンはメタボリックシンドロームの発症に関与するマクロファージや T 細胞等の免疫細胞の増加に関わる遺伝子発現や活性酸素種の産生に関わる遺伝子発現を抑制すること等が明らかになった²⁾。(図 1)

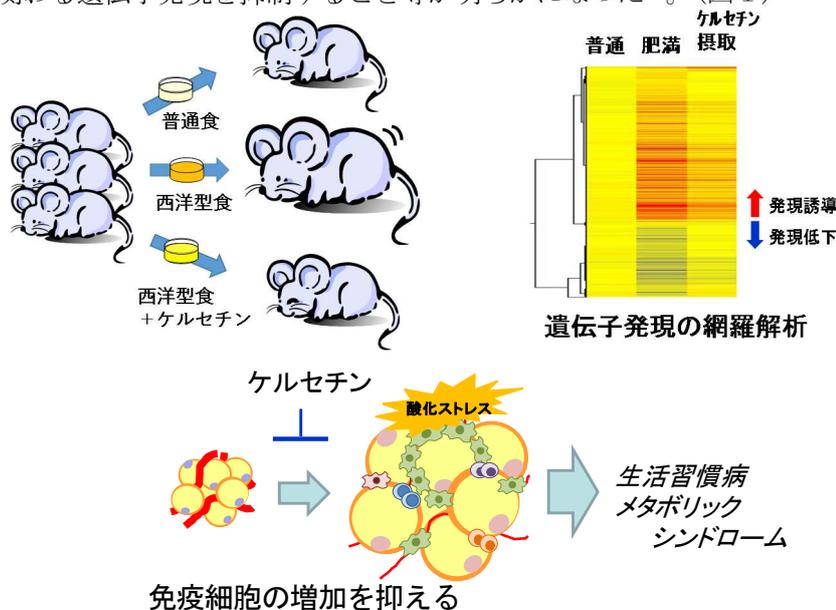


図 1 ケルセチンは精巣周囲脂肪組織の免疫細胞の増加や酸化ストレスを抑制して食餌性肥満モデル

マウスのメタボリックシンドロームを改善する

実験例 2

高コレステロール、高脂肪食の摂取はマウスに脂肪肝を誘導する。C57BL/6J マウスに通常食 (CRF-1, Charles River Laboratories) (図2の正常肝)、高コレステロール、高脂肪食 (脂肪肝) または 0.003%β-クリプトキサンチン添加高コレステロール、高脂肪食 (β-クリプトキサンチン摂取) を 12 週間摂取させた後、肝臓の遺伝子発現を DNA マイクロアレイ (Mouse Genome 430 2.0 Array) を用いて解析した。パスウェイ解析 (Ingenuity Pathway Analysis) の結果等から、β-クリプトキサンチンは、特に炎症を抑制して、脂肪肝を改善すると考えられた³⁾。(図2)

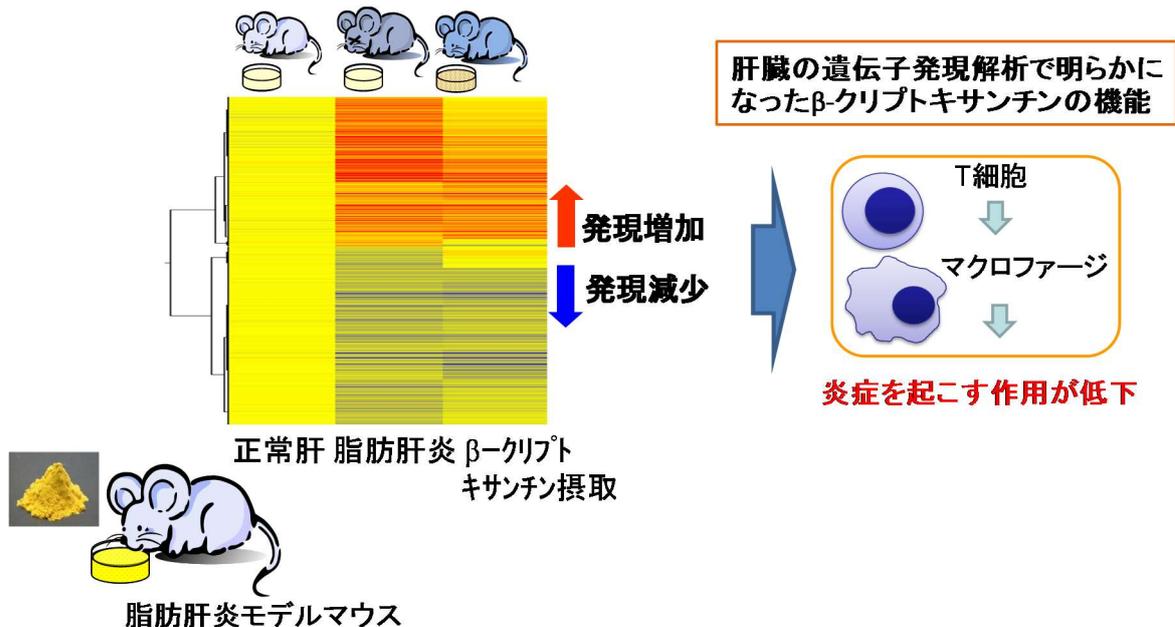


図2 β-クリプトキサンチンは特に炎症を抑えてモデルマウスの脂肪肝を改善する

【おわりに】

DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析による機能性評価の結果は、データベースに収載して公開している⁴⁾。最近では、非コードRNAを含めた解析やmiRNAを解析するためのマイクロアレイ等が販売され、幅広い解析が可能になった。また次世代シーケンサーを用いた解析も多く行われている。

【参考文献】

- 1) Y, Nishide, M, Tadaishi, M, Kobori, Y, Tousen, M, Kato, M, Inada, C, Miyaura, Y, Ishimi, Possible role of S-equol on bone loss via amelioration of inflammatory indices in ovariectomized mice. J. Clin. Biochem. Nutr., 53(1), 41-8 (2013).
- 2) M, Kobori, Y, Takahashi, M, Sakurai, Y, Akimoto, T, Tsushida, H, Oike, K, Ippoushi, Quercetin suppresses immune cell accumulation and improves mitochondrial gene expression in adipose tissue of diet-induced obese mice. Mol. Nutr. Food Res., 60(2), 300-12 (2016).
- 3) M, Kobori, Y, Ni, Y, Takahashi, N, Watanabe, M, Sugiura, K, Ogawa, M, Nagashimada, S, Kaneko, S, Naito, T, Ota, β-Cryptoxanthin alleviates diet-induced nonalcoholic

steatohepatitis by suppressing inflammatory gene expression in mice. PLoS One, 9(5), e98294 (2014).

- 4) ニュートリゲノミクス機能性評価データベース (<http://foodfunction.dc.affrc.go.jp/ja/>)
(Dec. 17, 2016)