

現代日本食と現代米国食を給与したラットの肝臓における 網羅的遺伝子発現解析

誌名	日本栄養・食糧学会誌 : Nippon eiy shokury gakkaiishi = Journal of Japanese Society of Nutrition and Food Science
ISSN	02873516
著者名	都築, 毅 武鹿, 直樹 中村, 祐美子 仲川, 清隆 五十嵐, 美樹 宮澤, 陽夫
発行元	日本栄養・食糧学会
巻/号	61巻6号
掲載ページ	p. 255-264
発行年月	2008年12月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



現代日本食と現代米国食を給与したラットの肝臓における 網羅的遺伝子発現解析

都 築 毅¹, 武 鹿 直 樹¹, 中 村 祐 美 子¹,
仲 川 清 隆¹, 五十嵐 美 樹¹, 宮 澤 陽 夫^{*1}

(2008年2月18日受付; 2008年8月25日受理)

要旨: 日本人の食事は世界から健康食として注目されている。しかし、日本人の食事をニュートリゲノミクス手法を用いて遺伝子発現レベルで、欧米の食事と比較し評価した研究はない。そこで本研究は、「日本食」と「米国食」を飼料としてラットへの給与試験を実施し、DNA マイクロアレイを用いて両食事の肝臓遺伝子発現レベルの相違を網羅的に検討した。日本食 (1999年) と米国食 (1996年) の献立を作成し、調理し、凍結乾燥粉末に調製したものを試験試料とした。ラットに3週間これを摂取させ、肝臓から総 RNA を抽出し、DNA マイクロアレイ分析を行った。その結果、日本食ラットは米国食ラットと比べてストレス応答遺伝子の発現量が少なく、糖・脂質代謝系の遺伝子発現量が多かった。とくに、日本食では摂取脂質量が少ないうえにもかかわらずコレステロール異化や排泄に関する遺伝子の発現量が顕著に増加しており、肝臓へのコレステロール蓄積が抑制された。よって日本食は米国食と比べて、代謝が活発でストレス性が低いことから、日本食の健康有益性が推察された。

キーワード: DNA マイクロアレイ, 日本食, 米国食, ニュートリゲノミクス, ラット

日本人の平均寿命は延び続け、現在では世界で最も長寿の国となった¹⁾。日本人は寿命が長いだけでなく、自立して生活できる期間を示す健康寿命においても世界一である²⁻⁵⁾。日本を世界一の長寿国に導いた要因には、欧米諸国と異なる独自の食生活の影響が大きいと考えられる。日本人の食事は、米を中心として、魚・野菜・大豆などの伝統的な食素材に、肉・牛乳・油脂・果実などが豊富に加わり多様性にあふれている⁶⁾。また、摂取する脂質やたんぱく質は良質で新鮮な水産物の割合が高く、欧米諸国と異なっている⁷⁻⁹⁾。近年、日本人の食事は世界から健康食として注目されている。ヒトを対象とした疫学調査では日本人の食事が健康に好影響を及ぼすことが報告されている。たとえば、ハワイ移民を調査した研究では、日本人は白人に比べて動脈硬化症を発症する年齢は遅いが、ハワイで育った二世は一世である親に比べ動脈硬化の発症が若年化し、三世四世になると白人との差がほとんどなくなると報告されている¹⁰⁾。癌の罹患率を調べた研究でも同様の結果が得られている¹¹⁾。これは、親の世代が日本の食習慣を続けているのに比べ、子どもたちやその孫は米国人の食生活に同化したためと推測されている。同様に日本から米国へ移住した日本人についても、食習慣の欧米化により、癌の罹患率が日本

在住の日本人より増加したことが示されている¹²⁻¹⁴⁾。ブラジルの日系人に至っては、肉中心の食習慣に変化したことで心筋梗塞が増え、さらに平均寿命が17年近くも短くなったと報告されている¹⁵⁻¹⁸⁾。このように、日本人移民が欧米の食事を摂ると生活習慣病が増加し寿命が縮んでしまうという研究報告から、日本人の食事は長寿を導く健康食であると考えられるようになった。しかし、これまでに食事の摂り方を対象とした疫学調査や、食事の中の特徴的な成分についての栄養学的研究は行われてきているが、食事そのものの健康機能をニュートリゲノミクス手法を用いて遺伝子レベルにまで掘り下げて検討した研究は過去に認められない。

そこで本研究では、日本人と米国人の食事摂取調査の成績に基づいて実際に各21食分の食事を調理作製した。これを凍結乾燥し粉碎してラットに3週間与え、ラット肝臓の遺伝子発現をDNA マイクロアレイで解析し、日本食もしくは米国食を摂取したときの肝臓における遺伝子発現レベルの相違を網羅的に調査した。

実 験 方 法

1. 試験飼料の作製

日本人と米国人の国民栄養調査に基づいて、現代の日

* 連絡者・別刷請求先 (E-mail: miyazawa@biochem.tohoku.ac.jp)

¹ 東北大学大学院農学研究科機能分子解析学 (981-8555 仙台市青葉区堤通雨宮 1-1)

表 1 定量 RT-PCR 法で使用するプライマーの塩基配列

遺伝子名	プライマーの配列	
HPRT	Forward (5'-3')	TTGCTCGAGATGTCATGAAGGA
	Reverse (5'-3')	AGCAGGTCAGCAAAGAAGCTTATAG
GADD45a	Forward (5'-3')	GAGCTGTTGCTACTGGAGAAC
	Reverse (5'-3')	CAAATAAGTTGACTTAAGGCAGG
Aldh3a1	Forward (5'-3')	CAGCAAACAGTGGAATTTGGAG
	Reverse (5'-3')	TGAATGAAGAAGCTCACAAGGC
PEX11a	Forward (5'-3')	TACAGTGCCAAGGTCCTGAGTC
	Reverse (5'-3')	CCTTCCTGTCTTGAGCTTGTT
PPAR α	Forward (5'-3')	ACCCGAGAGTTCCTAAAGAA
	Reverse (5'-3')	AATGTCACTGTCATCCAGTT
ACC	Forward (5'-3')	TGCAGGCCAATCCAGAAGTT
	Reverse (5'-3')	AGTGGAAGGATCCTTACAA
CPT1a	Forward (5'-3')	AAGGTGCTGCTCCTA \dot{C} CA
	Reverse (5'-3')	GCCCACCAGGATTTTAGCTT
Crot	Forward (5'-3')	TGAGAATCATACTCGACATTTAACCC
	Reverse (5'-3')	CCAGCACAGGAGTACAAGCCTAT
CYP7a1	Forward (5'-3')	GCTTTACAGAGTGCTGGCCAA
	Reverse (5'-3')	CTGTCTAGTACCGGCAGGTCATT
ABCG5	Forward (5'-3')	CGCAGGAACCGCATTGTAA
	Reverse (5'-3')	TGTCGAAGTGGTGGAAAGAGCT

HPRT, Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase; GADD45a, Growth arrest and DNA-damage-inducible 45 alpha; PPAR α , Peroxisome proliferator activated receptor alpha; PEX11a, Peroxisomal biogenesis factor 11 A; CPT1a, Carnitine palmitoyltransferase 1, liver; Crot, Carnitine O-octanoyltransferase; ACC, Acetyl-coenzyme A carboxylase; Aldh3a1, Aldehyde dehydrogenase family 3, member A1; CYP7a1, Cytochrome P450, family 7, sub-family a, polypeptide 1; ABCG5, ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 5.

本食と米国食の献立を作成した。日本食は、1999年の国民栄養調査を指標にし、『現代(1999年)の日本人が1人1日当たりに摂取する食品、栄養素等を満たす食事』と定義した¹⁹⁾²⁰⁾。同様に、米国食は、Continuing Survey of Food Intakes by Individuals (CSFII) 1996を指標に、『現代(1996年)のアメリカ人が1人1日当たりに摂取する食品、栄養素等を満たす食事』と定義した²¹⁾。ラットへの給与飼料を作製するにあたり、食品の量と栄養素の量を明確にするために、管理栄養士の指導の下に日本人と米国人のそれぞれ1週間分(21食)の献立を作成した。その後、これを調理し、調理した食事は真空凍結乾燥機(東京理化器械(株), FD-550R)で凍結乾燥し、粉碎して、日本食と米国食ごとにそれぞれ攪拌して均一化し、粉食としてラットに与える試験飼料にした。試験飼料の栄養組成(脂質、たんぱく質、水分、灰分、炭水化物、エネルギー)を測定し、実際の値を確認した。脂質はソックスレー抽出法、たんぱく質はケルダール法、水分は常圧加熱乾燥法、灰分は直接灰化法でそれぞれ測定し、炭水化物は総量から脂質、たんぱく質、水分、灰分を差し引き、エネルギーはAtwaterの係数(1g当たりたんぱく質4kcal、脂質9kcal、炭水化物4kcal)を用いて算出した²²⁾。

2. 実験動物と飼育条件

試験飼料の給与実験には4週齢SD系雄性ラット(日

本SLC(株))16匹を用いた。飼育環境は、室温(24±1°C)、明暗周期12時間(明期:8:00-20:00)で行った。すべての操作は、東北大学の実験動物指針に従って行われた。ラットは固形試料(MF, オリエンタル酵母工業(株))で1週間予備飼育し、8匹ずつ2群に分け、日本食(21食分)と米国食(21食分)の二つの試験飼料でそれぞれ3週間飼育した。試験飼料と水は自由摂取とした。試験期間中、体重と食餌摂取量を測定した。解剖方法は、前報に準じて行った²³⁾²⁴⁾。すなわち、飼育期間終了後、ラットは6時間絶食させ、断頭してEDTA採血をし、肝臓を採取した。血液は、速やかに遠心分離して、血漿を分離した。肝臓の一部はRNA抽出用に分取し、残りの肝臓と血漿は試験に使用するまで-80°Cで保存した。

3. 脂質組成の測定

日本食と米国食の脂質代謝に与える影響を調べるために、血漿と肝臓の脂質組成を測定した。脂質組成は、前報に準じて分析した²³⁾²⁴⁾。すなわち、血漿と肝臓のトリアシルグリセロールはトリグリセライドEテストワコー(和光純薬工業(株))を用いて、リン脂質はリン脂質Bテストワコー(和光純薬工業(株))を用いて、総コレステロールはコレステロールEテストワコー(和光純薬工業(株))を用いてそれぞれ測定した。

4. 血漿と肝臓のリン脂質ヒドロペルオキシド (PLOOH) の測定

日本食と米国食の生体へのストレス性を評価するために、酸化ストレスの指標である血漿と肝臓のリン脂質ヒドロペルオキシド (PLOOH) を定量した²⁵⁾²⁶⁾。すなわち、血漿と肝臓から Folch 法で総脂質を抽出し、これを化学発光検出-高速液体クロマトグラフィー (CL-HPLC) に供して測定した。

5. RNA 抽出と DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析

日本食あるいは米国食を給与したラットの肝臓における遺伝子発現量を評価するために、DNA マイクロアレイ分析を行った。ラット肝臓からの RNA 抽出操作は前報と同様に RNeasy Midi Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) を用いた方法で行った²⁶⁾。肝臓から抽出した総 RNA は前報と同様に紫外/可視-吸光スペクトルを用いた方法で定量し、アガロースゲル電気泳動を用いて純度検定した²⁶⁾。RNA サンプルは日本食と米国食群ごとにプールし、それぞれの遺伝子発現を倉敷紡績(株)の DNA マイクロアレイ受託解析にて調べた²⁷⁾。DNA マイクロアレイは、10,399 の遺伝子発現を解析できる CodeLink (UniSet Rat I, Affymatrix, USA) を使用し、遺伝子発現強度を数値化し、日本食ラットと米国食ラットの肝臓における遺伝子発現量を比較した。

6. 定量 RT-PCR 法による遺伝子発現比の確認

DNA マイクロアレイ分析は単回しか行っていない。そのため測定結果が信頼するに足る精度を持つかを確認するために、前報に準じて real-time PCR 装置を用いた定量 RT-PCR 法によってピックアップした遺伝子発現量を測定した²⁶⁾。総 RNA サンプルは cDNA にし、プライマーを加え、さらに DyNAmo SYBR Green qPCR kit (Finnzymes, Espoo, Finland) を用いて PCR 反応を行った。このとき同時に内部標準に *hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase* (HPRT) を用いて遺伝子発現量を補正した。分析装置は real-time PCR system (DNA Engine Opticon™ 2 System, MJ Research Inc., CA, USA) を使用し、SYBR green の蛍光強度によって遺伝子発現量を評価した。プライマーの塩基配列は過去の報告を参考にし、オペロンバイオテクノロジー社にて作製した (表 1)²⁸⁻³⁰⁾。

7. 統計処理

データは平均値±標準誤差で表した。日本食と米国食の2群間の有意差検定は Fisher の分散分析を行い、等分散が認められたものは Student's *t*-test を行い、等分散でないものは Welch Two Sample *t*-test を行った。 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

実験結果

1. 試験飼料の組成

ラットに給与した日本食と米国食の献立表と栄養組成

を、表 2 に示した。献立は 1999 年の日本および 1996 年の米国の国民栄養調査を基に、代表的な食事をそれぞれ 21 食 (7 日分) 作成した (表 2A, 2B)。たとえば、日本食はご飯、刺身、煮物、納豆、味噌汁などで、米国食は、フライドチキン、フレンチトースト、ハンバーガー、コーラなどであった。日本食と米国食は共に国民栄養調査の数値と調理した食事の実測値に大差はなく、再現性よく作成できた。日本食と米国食の 100 g 当たりの栄養組成に大きな違いは認められなかった (表 2C)。

2. 日本食と米国食を与えたラットの体重、摂食量、および脂質組成

日本食と米国食を給与したラットの体重、摂食量、脂質組成を、表 3 に示した。3 週間の給与試験で、日本食ラットと米国食ラットの体重に有意差は認められなかった。平均食餌摂取量は日本食ラットで有意に高値であった。肝臓と血漿の脂質と過酸化脂質濃度は日本食ラットで米国食ラットより低値を示す傾向が認められた。特に肝臓の総コレステロール濃度は、日本食ラットで米国食ラットの約 70% であり、両食餌群間に有意差が認められた。

3. 日本食群と米国食群の発現遺伝子解析

日本食群と米国食群の肝臓から抽出した総 RNA の純度 (A_{260}/A_{280}) は、すべて 1.9-2.1 以内で高い値となった。さらに、アガロースゲル電気泳動の結果より RNA が分解していないことを確認し、日本食群と米国食群の RNA サンプルを DNA マイクロアレイ分析に供した。日本食群と米国食群で発現した遺伝子を図 1 に示した。

結果は、「発現比=日本食群/米国食群」として表した。米国食群と比較して、日本食群の遺伝子発現量が多かった場合は発現比が 1 以上となり、日本食群の遺伝子発現量が少なかった場合は発現比が 1 以下となる。本試験では 2 群間の発現量の比が 1.5 以上もしくは 0.67 以下であれば、遺伝子発現に差があるとした。日本食群と米国食群の発現遺伝子で差が認められたものは解析対象の遺伝子 10,399 個中 565 個だった。そして、表 4 に日本食群と米国食群の遺伝子発現量を比較して差が認められた遺伝子を機能別に示した。差が認められても遺伝子機能が明確でない物は省略した。細胞の生命活動を示すイオンチャンネル/輸送やシグナル伝達関連遺伝子が多く変動しており、食餌の違いにより異なった遺伝子が動いていることや遺伝子発現量に大きな差があることが示された。米国食群と比べて日本食群ではストレス応答に関する遺伝子発現量が低値であった。エネルギー・糖質・脂質代謝に関しては、日本食群で発現量が高値であった。タンパク質代謝や細胞構造/成長/接着関連遺伝子は日本食群で発現が低下していた。よって、日本食群ではストレス性は低くエネルギー消費が高く細胞寿命が長いこと、米国食群ではストレス性は高く細胞の世代交代が促進され細胞寿命が短いことが考えられた。これら遺伝子の中で健康への影響が明確なストレス応答、エネルギー

表 2 日本食と米国食の献立と栄養組成

A 日本食の献立表									
	1 日目	2 日目	3 日目	4 日目	5 日目	6 日目	7 日目		
朝食	ご飯 鮭の塩焼き 冷奴 きのこのホイル蒸し 味噌汁 果物	ご飯 納豆 のり 中華炒め 味噌汁	ご飯 厚焼き玉子 漬物 系こんにゃくの炒め物 しじみのみそ汁	トースト 野菜のスープ 海藻サラダ 牛乳	ご飯 煮魚 大根の煮物 漬物 味噌汁	混ぜご飯 煮魚 さつまいもの煮物 味噌汁	ご飯 揚げ出し豆腐 ひじきの煮物 味噌汁		
昼食	お好み焼き 生野菜 デザート 牛乳	サンドウィッチ ソーセージと ほうれんそうスープ デザート	シーフード スパゲッティ ブロッコリーのソテー コーンスープ	オムライス ポテト 果物 ヨーグルト	ツナサンド サラダ バナナドリンク	かき揚げうどん 蓮根の煮物 おやつ	カルボナーラ 豆のサラダ 紅茶		
夕食	雑炊 焼きなす ツナサラダ リンゴ	カレーライス 野菜の浅漬け ミルクティー	ご飯 さばの味噌煮 ほうれんそうの胡麻和え かぼちゃの煮物	ご飯 切干大根と昆布の和え物 豚肉の生姜焼き 味噌汁	ステーキ丼 ほうれんそうのかき玉汁 粉ふき芋 ビール	ご飯 豆腐の炒め物 切り干し大根の煮付け 白菜のサラダ 果物	ご飯 刺身 若竹汁 里芋田楽 日本酒		
B 米国食の献立表									
	1 日目	2 日目	3 日目	4 日目	5 日目	6 日目	7 日目		
朝食	オートミール チーズ コーヒー	トースト フライドエッグ ヨーグルト コーヒー	フレンチトースト 果物 コーヒー ジュース	コーンミール サラダ 果物 コーヒー	コーンフレーク ジャーマンポテト 果物 紅茶 ミルク ジュース	トルティヤ カリフラワーのソテー コーヒー ミルク	パン レンズマメのスープ サラダ ジュース		
昼食	パン マカロニサラダ 果物 紅茶 キャンディー	ハンバーガー ピクルス リンゴ ミルクティー	パン クラムチャウダー 卵 おつまみ	マフィン ポテトサラダ 低脂肪乳 紅茶	ホットドッグ サラダ 果物 ミルク コーヒー	パン ヒヨコマメのサラダ 果物 紅茶	チュロス ツナサラダ コーヒー		
夕食	パン フライドチキン ポイル野菜 おつまみ コーヒー ビール ダイエットコーラ	白身魚の レモン風味マリネ マッシュポテト 野菜のスープ 果物 ワイン コーラ	ピラフ サラダ コーヒー コーラ	パン ポークビーンズ サラダ デザート コーヒー コーラ	ステーキ ブラマンジェ コーラ	ジャンバラヤ コーヒー コーラ	パン かきフライ ズッキーニの オープン焼き コーラ		
C 日本食と米国食の栄養組成									
	日本食				米国食				
	エネルギー (kcal)	タンパク質 (g)	脂質 (g)	炭水化物 (g)	エネルギー (kcal)	タンパク質 (g)	脂質 (g)	炭水化物 (g)	
国民栄養調査 (1999, 1 日当たり)	1967	78.9	57.9	269.0	USDA CSFII (1999, 1 日当たり)	2005	74.0	74.3	257.9
実測値 (1 日当たり)	1843	80.7	50.0	267.5	実測値 (1 日当たり)	2144	97.2	61.5	300.4
実測値 (100 g 当たり)	442	19.3	12.0	64.1	実測値 (100 g 当たり)	500	20.4	12.9	63.0

A, B は管理栄養士の指導の下, 7 日分 21 食の献立を作成した。日本食は 1999 年の国民栄養調査を, 米国食は 1996 年の USDA Continuing Survey of Food Intakes by Individuals を参考にしてそれぞれ作成した。献立通りに調理したものを凍結乾燥した後, 粉碎してラットへの給餌飼料とした。C は主要栄養価を 1 日当たりの数値および 100 g 当たりで示した。

ギー・糖質・脂質代謝に関する遺伝子について表 5 に示し, さらに詳しく検討した。

日本食群で低値であったストレス応答に関する遺伝子には, 酸化ストレスを消去する *Aflatoxin aldehyde*

reductase (Afar) [日本食群と米国食群の発現比=0.63] や *Urocortin* (Ucn) [0.67], 遺伝子の損傷応答と修復に対して働く *Breast cancer 1* (Brca1) [0.59] や *Growth arrest and DNA-damage-inducible 45 alpha*

表 3 日本食群と米国食群の体重、摂食量および脂質組成

	日本食群	米国食群
体重 (g)	192±5	192±2
0 日目		
21 日目	296±5	282±4
摂食量 (g/day)	17.6±0.2 ^a	16.4±0.2 ^b
血漿トリアシル グリセロール (mg/mL)	1.47±0.08	1.93±0.19
肝臓トリアシル グリセロール (mg/g)	32.8±3.6	40.7±3.7
血漿リン脂質 (mg/mL)	1.23±0.05	1.35±0.09
肝臓リン脂質 (mg/g)	24.8±0.85	25.0±0.67
血漿総コレステロール (mg/mL)	0.46±0.03	0.47±0.03
肝臓総コレステロール (mg/g)	7.8±0.7 ^a	11.3±0.7 ^b
血漿 PLOOH ($\mu\text{mol/mol}$ リン脂質)	32.6±1.4	37.8±4.3
肝臓 PLOOH ($\mu\text{mol/mol}$ リン脂質)	152±15	202±34

平均値±標準誤差, $n = 7-8$. $p < 0.05$ (^a vs ^b).
PLOOH, リン脂質ヒドロペルオキシド。

(GADD45 α) [0.63], 炎症反応で働く *Chemokine (C-X-C motif) ligand 1* (Gro1) [0.59] や *Interleukin 1 receptor, type 1* (IL-1R1) [0.63], 薬物応答の核内受容体である *Aryl hydrocarbon receptor* (Ahr) [0.59] があつた。これらは特定のストレス反応に関わる遺伝子ではなく、さまざまなストレス反応に関わる遺伝子であつた。また、米国食群と比べて日本食群で発現が上昇したストレス応答遺伝子は認められなかつた。よつて、日本食より米国食の方が大きなストレスを受けていることが示唆された。上記遺伝子の代表として GADD45 α を定量 RT-PCR 法で確認すると、日本食群と米国食群の遺伝子発現比が [0.58±0.08] となり、有意な差が確認された (表 6)。

エネルギー代謝系で働く遺伝子として、日本食で転写因子 *Peroxisome proliferator activated receptor alpha* (PPAR α) [1.7] とその標的遺伝子 *Peroxisomal biogenesis factor 11A* (PEX11a) [1.6] の発現が上昇していた。PPAR α は熱産生などエネルギー消費を促進する転写因子である。よつて、米国食より日本食の方がエネルギー消費を促進することが示唆された。PPAR α と PEX11a を定量 RT-PCR 法で確認すると、遺伝子発現比がそれぞれ、[1.62±0.24] と [1.42±0.09] となり、有意な差が確認された (表 6)。また、脂質代謝に係わる β -酸化系の一員である *Carnitine palmitoyltransferase 1, liver* (CPT1a) [1.5] や *Carnitine O-octanoyltransferase* (Crot) [1.9] の発現が上昇していた。CPT1a は転写因子である PPAR α によつて発現が制御されている。このことから、日本食群では PPAR α によつて転写制御されている遺伝子発現が、増加していると考えられた。

表 4 米国食群に対して日本食群の遺伝子発現量の差が 1.5 倍以上あつた遺伝子の機能

遺伝子の機能	発現比	
	↑上昇	↓低下
ストレス応答	0	7
エネルギー・糖質・脂質代謝	14	6
たんぱく質代謝	6	11
イオンチャネル/輸送	14	25
シグナル伝達	16	31
細胞構造/成長/接着	10	17

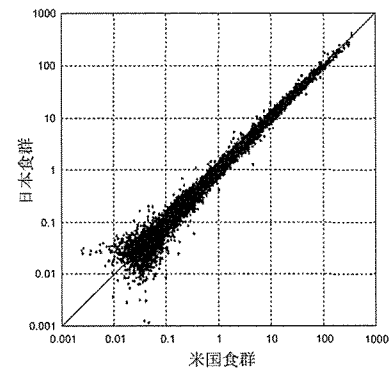


図 1 DNA マイクロアレイ解析結果のスカッタープロット

CPT1a と Crot を定量 RT-PCR 法で確認すると、遺伝子発現比がそれぞれ [1.44±0.17], [2.07±0.09] となり、有意な差が確認された (表 6)。また、マロニル-CoA を介して CPT1a を制御している *Acetyl-coenzyme A carboxylase* (ACC) [2.0] の発現量も上昇していた。ACC を定量 RT-PCR 法で確認すると、遺伝子発現比が [1.4±0.18] となり、有意な差が確認された。

糖代謝に関わる *Aldehyde dehydrogenase family 3, member A1* (Aldh3a1) [2.1] の発現が上昇していた。Aldh3a1 を定量 RT-PCR 法で確認すると、遺伝子発現比が [2.40±0.56] となり、有意な差が確認された (表 6)。さらに糖代謝に関わる *Serine dehydratase* (Sds) [2.1] の発現も上昇していたことから、日本食は米国食より、エネルギー消費が大きいため、糖代謝を促進することが示唆された。日本食群で発現が低下していた *Phosphorylase kinase gamma 1* (Phkg1) [0.23] は、グリコーゲンからグルコースを生成する過程に関わる遺伝子である。よつて、エネルギー消費が大きい日本食群ではグリコーゲンの蓄積量が少ないことが示唆された。

脂質代謝系の遺伝子発現で、先に述べた遺伝子以外では、日本食群で *Cytochrome P450, family 7, subfamily a, polypeptide 1* (CYP7a1) [2.7] とその誘導に働く *Nuclear receptor subfamily 2, group F, member 2* (Nr2f2) [1.5] の発現が高値であつた。特に CYP7a1 は脂質代謝関連遺伝子で最も発現の大きい遺伝子であつ

表5 米国食群に対して日本食群の遺伝子発現量の差が1.5倍以上あったストレス応答関連遺伝子とエネルギー・糖質・脂質代謝関連遺伝子

Genbank ID	発現比	遺伝子名	機能	分類
NM_013149	0.59	Ahr: aryl hydrocarbon receptor	ストレス応答	
NM_012514	0.59	Brcal: breast cancer 1	DNA 損傷応答・修復	
NM_030845	0.59	Gro1: chemokine (C-X-Cmotif) ligand 1	炎症応答	
NM_024127	0.63	GADD45a: growth arrest and DNA-damage-inducible 45 alpha	DNA 損傷応答	ストレス応答 (上昇0/低下7)
NM_013215	0.63	Afar: aflatoxin B1 aldehyde reductase	酸化ストレス応答	
NM_013123	0.63	IL-1R1: interleukin 1 receptor, type I	炎症応答	
NM_019150	0.67	Ucn: urocortin	酸化ストレス応答	
NM_012942	2.7	CYP7a1: cytochrome P450, family 7, subfamily a, polypeptide 1	コレステロール代謝	
NM_031010	2.6	Alox12: arachidonate 12-lipoxygenase	脂質代謝	
NM_031972	2.1	Aldh3a1: aldehyde dehydrogenase family 3, member A1	糖新生	
NM_053962	2.0	Sds: serine dehydratase	糖新生	
NM_022193	2.0	ACC: acetyl-coenzyme A carboxylase	脂質/ピルビン酸代謝	
NM_012563	1.9	Gad2: glutamate decarboxylase 2	糖質代謝	
NM_031987	1.9	Crot: carnitine O-octanoyltransferase	脂肪酸代謝	
NM_013098	1.7	G6pc: glucose-6-phosphatase, catalytic	解糖系	
NM_013196	1.7	PPAR α : peroxisome proliferator activated receptor alpha	脂質代謝	
NM_023104	1.7	LOC65984: acetoacetyl-CoA synthetase	コレステロール代謝	
NM_053487	1.6	PEX11a: peroxisomal membrane protein Pmp26 p (Peroxin-11)	PPAR α 標的遺伝子	
AF102262	1.6	B4galt1: UDP-Gal: betaGlcNAc beta 1,4-galactosyltransferase, polypeptide 1	糖質代謝	
L07736	1.5	CPT1a: carnitine palmitoyltransferase 1, liver	脂肪酸代謝	
NM_080778	1.5	Nr2f2: nuclear receptor subfamily 2, group F, member 2	コレステロール代謝	エネルギー・ 糖質・脂質代謝 (上昇14/低下8)
NM_031573	0.23	Phkg1: phosphorylase kinase gamma 1	グリコーゲン代謝	
NM_021583	0.26	Ptges: prostaglandin E synthase	プロスタグランジン合成	
NM_031557	0.40	Ptgis: prostaglandin I2 synthase	プロスタグランジン合成	
NM_017274	0.59	Gpam: glycerol-3-phosphate acyltransferase, mitochondrial	リン脂質合成	
NM_013190	0.63	Pfkl: phosphofructokinase, liver, B-type	解糖系	
NM_031522	0.67	Neu1: neuraminidase 1	糖質代謝	

エネルギー・糖質・脂質代謝 (上昇14/低下6)。

表6 定量 RT-PCR 法で米国食群に対して日本食群の遺伝子発現量の差が有意であった遺伝子

遺伝子名	日本食群	米国食群
GADD45a	0.56 \pm 0.08 ^a	1.00 \pm 0.16 ^b
PPAR α	1.62 \pm 0.24 ^a	1.00 \pm 0.13 ^b
PEX11a	1.42 \pm 0.09 ^a	1.00 \pm 0.09 ^b
CPT1a	1.44 \pm 0.17 ^a	1.00 \pm 0.11 ^b
Crot	2.07 \pm 0.09 ^a	1.00 \pm 0.14 ^b
ACC	1.47 \pm 0.18 ^a	1.00 \pm 0.05 ^b
Aldh3a1	2.40 \pm 0.56 ^a	1.00 \pm 0.16 ^b
CYP7a1	2.21 \pm 0.26 ^a	1.00 \pm 0.07 ^b
ABCG5	1.79 \pm 0.25 ^a	1.00 \pm 0.12 ^b

平均値 \pm 標準誤差, $n=7-8$. $p<0.05$ (^a vs ^b).

GADD45 a, Growth arrest and DNA-damage-inducible 45 alpha; PPAR α , Peroxisome proliferator activated receptor alpha; PEX11 a, Peroxisomal biogenesis factor 11 A; CPT1 a, Carnitine palmitoyltransferase 1, liver; Crot, Carnitine O-octanoyltransferase; ACC, Acetyl-coenzyme A carboxylase; Aldh3 a1, Aldehyde dehydrogenase family 3, member A1; CYP7 a1, Cytochrome P450, family 7, subfamily a, polypeptide 1; ABCG5, ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 5.

た。この CYP7a1 はコレステロールを胆汁酸に異化する重要な働きを持つ酵素である。CYP7a1 を定量 RT-PCR 法で確認すると、遺伝子発現比が [2.21 \pm 0.26] となり、有意な差が確認された (表6)。さらに、肝臓コレステロール輸送に関わる遺伝子の発現についても検討した。コレステロールの胆細管への排出に働く *ATP-binding cassette, subfamily G (WHITE), member 5 (ABCG5)* の発現量を定量 RT-PCR 法で測定すると、[1.79 \pm 0.25] となり、有意な差が認められた (表6)。このことから、日本食群では米国食群と比べてコレステロールの異化や排泄が促進され、コレステロールが蓄積しにくいことが示唆された。

日本食群では *Prostaglandin E synthase (Ptges)* [0.26] と *Prostaglandin I2 (prostacyclin) synthase (Ptgis)* [0.40] といったプロスタグランジン合成に関わる遺伝子が低下していた。これらはアラキドン酸カスケードの一員で、炎症反応に関わるプロスタグランジン生合成関連遺伝子である。これより、日本食群では米国食群と比べて、さまざまな刺激に対して過敏に炎症反応が起こる可能性が示唆された。

考 察

本研究では、日本食と米国食を比較することで日本の食事が健康上有益であることを遺伝子発現レベルで明らかにした。

日本食群は米国食群と比べて、エネルギー・糖質・脂質代謝系の遺伝子発現が全体的に高く、ストレス応答遺伝子の発現が低かった(表4, 5)。日本食群で転写因子PPAR α とその標的遺伝子(PEX11a, CPT1a)の発現が上昇していた(表6)。PPAR α は脂肪酸の β -酸化など脂肪酸異化を促進する重要な転写因子である³¹⁾³²⁾。このことから日本食群ではPPAR α の活性化を介して標的遺伝子の転写が上昇し、エネルギー消費が促進されていることが示唆された。代謝系が活発になると、特に好氣的代謝では酸化ストレスが増加するが、日本食群ではストレス応答に関する遺伝子発現が低く、ストレス性が低いことが明らかとなった(表4, 5, 6)。実際に、血漿や肝臓の酸化ストレスの指標である過酸化リン脂質量は日本食群で、低い傾向を示した(表3)。米国食で増加したストレス応答遺伝子であるAfar, Ucn, Ahr, Bcr1, GADD45a, Gro1, IL-1R1は、細胞にさまざまな負荷がかかっているときに発現することが知られている³³⁻³⁷⁾。以上より、米国食群は日本食群より酸化ストレスだけでなく、さまざまなストレスを受けていることが示唆された(表6)。

また日本食群ではコレステロールの異化速度を支配するCYP7a1の発現量が有意に上昇していた(表5, 6)。このCYP7a1はコレステロールを胆汁酸に異化する重要な働きを持つ酵素である³⁸⁾。また、日本食群ではコレステロールを胆細管に排出する働きのあるABCG5遺伝子の発現も増加していた(表6)。このことから、日本食は米国食と比べてコレステロールを胆汁酸として排泄する能力が高いことが示唆された。実際に肝臓と血漿の脂質組成はすべての項目で米国食群の方が高い傾向にあり、肝臓コレステロール量は有意な差が認められた(表3)。これより、日本食は米国食と比べてコレステロールを含めた脂質の摂取量は少ないが、コレステロールの異化や排出が促進されて、脂質が蓄積しにくいことが示唆された。さらに、米国食群の方が酸化ストレスを受けていることから(表3)、日本食の方が健康上有益であることが示唆された。

本研究で得られた遺伝子発現量の相違は、日本食と米国食の違いによることは明らかである。両食事に含まれる成分の種類や量の多くが異なるため、原因を特定することは非常に困難である。本研究の結果から考えると、炭水化物、脂質、たんぱく質の量(バランス)は日本食と米国食で顕著な差がなかったことから(表2)、これらの一般栄養成分バランスの差が大きな原因ではなく、質的な違いが原因となっていると考えられた。たとえば、米国食は魚類の摂取量が少ないためn-3系多価不飽

和脂肪酸(EPAやDHAなど)の摂取量は少ない(日本食の約50%)など、両食事の質的な違いは大きい(表2)。

本研究で肝臓におけるエネルギー代謝において日本食と米国食に大きな違いがあったが、全身への影響を調べるには脂肪組織の働きも無視できない。脂肪細胞からはアディポカインといわれる生理活性物質が分泌され全身性に強く影響を及ぼすことが明らかとなっている³⁹⁾⁴⁰⁾。よって、今後これらを考慮に入れることにより、食事の有益性をより正確に評価できると考えられた。

日本の食事は、40年ほど前から大きく変わってきた。供給量からみると、米が半分に減り、肉、油脂類が約5倍になっている⁸⁾。これは日本の食事が高度経済成長期以降、急速に欧米化してきたからである。この欧米化に伴い、脂質を過剰摂取するために動脈硬化症、糖尿病、癌などの生活習慣病が顕著に増加し⁴¹⁾、大きな問題となっている。つまり日本の食事は健康的といわれているが、現代の日本食よりも欧米化前の伝統的な日本食の方がより、健康上有益であると考えられる。このようなことから、近年では欧米型の現代の食生活が見直され、生活習慣病の予防を期待できる伝統的な日本食の価値が評価されている。国内ばかりでなく国外でも生活習慣病の危険回避に有効であるとして、伝統的な日本食が食事療法に取り入れられている。WHOの調査では日本の健康寿命が世界一になった理由として、日本食の脂質の少なさを指摘している²⁾。しかし、WHOは「脂肪分の少ない日本食が心臓疾患を少なくしている。しかし、日本人の食事は近年、脂肪分の多い肉食に変化しつつある」と警告している。つまり、健康寿命が世界一になった背景には伝統的な日本食の効果があり、近年の食事の欧米化によってその効果は妨げられていることを示唆している。確かに日本人の健康寿命を延ばしてきた人々は、伝統的な日本食を食べてきた世代であり、現代の欧米化された食事を食べている世代ではない。このことから、欧米化し生活習慣病の増加を導いた現代の日本食よりも、長寿世界一を導いた伝統的な日本食の方が健康上有益であると考えられた。

本研究では、DNA マイクロアレイを用いて、日本食の有益性を遺伝子発現レベルで評価した。これまで、食事成分や食素材、疫学にて評価されてきた食事の栄養評価が、ニュートリゲノミクス手法によって詳細に評価することができた。この手法は、理想的な栄養バランスを持つ食事や生活習慣病を予防する食事を設計して評価する上で、有効であると考えられた。

文 献

- 1) 厚生労働省(2004)平成16年簡易生命表(Abridged Life Table for Japan 2004), 厚生労働省大臣官房統計情報部編(Statistics and Information Department, Ministers Secretariat, Ministry

- of Health Labour and Welfare). 財団法人厚生統計協会 (Health and Welfare Statistics Association), 東京.
- 2) The World Health Report 2003 (2003) Shaping the Future (World Health Report). World Health Organization, USA.
 - 3) The World Health Report 2000 (2000) Health Systems: Improving Performance (World Health Report). World Health Organization, USA.
 - 4) The World Health Report 2001 (2001) Mental Health: New Understanding, New Hope (World Health Report). World Health Organization, USA.
 - 5) The World Health Report 2002 (2002) Reducing Risks, Promoting Healthy Life (World Health Report). World Health Organization, USA.
 - 6) 農林水産省食糧庁 (1997) データにみる日本の食糧 9, (食糧庁計画流通部計画課編). 農林水産省食糧庁, 東京.
 - 7) 厚生労働省 (2003) 厚生労働省平成15年国民健康・栄養調査報, (健康栄養情報研究会編). 第一出版, 東京.
 - 8) 農林水産省 (2003) 食料需給表 平成15年度, (農林水産省総合食料局食料企画課需給分析班編). 農林統計協会, 東京.
 - 9) Food and Agriculture Organization (2004) Food Balance Sheets 2002 (FAO Statistical Databases). Last updated: 27 August 2004, URL: <http://apps.fao.org/>.
 - 10) Ueshima H, Okayama A, Saitoh S, Nakagawa H, Rodriguez B, Sakata K, Okuda N, Choudhury SR, Curb JD; INTERLIPID Research Group (2003) Differences in cardiovascular disease risk factors between Japanese in Japan and Japanese-Americans in Hawaii: the INTERLIPID study. *J Hum Hypertens* **17**, 631-9.
 - 11) Kolonel LN, Hankin JH, Nomura AM (1986) Multiethnic studies of diet, nutrition and cancer in Hawaii. In: Diet, Nutrition and Cancer, (Hayashi Y, Nagao M, Sugimura T, Takayama S, Tomatis L, Wattenberg LW, *et al.* eds), p. 29-40. Japan Sci Soc Press Tokyo (Japan).
 - 12) Shimizu H, Mack TM, Ross RK, Henderson BE (1987) Cancer of the gastrointestinal tract among Japanese and white immigrants in Los Angeles County. *J Natl Cancer Inst* **78**: 223-8.
 - 13) Shimizu H, Ross RK, Bernstein L, Yotani R, Henderson BE, Mack TM (1991) Cancers of the prostate and breast among Japanese and white immigrants in Los Angeles County. *Br J Cancer* **63**: 963-6.
 - 14) Pike MC, Kolonel LN, Henderson BE, Wilkens LR, Hankin JH, Feigelson HS, Wan PC, Stram DO, Nomura AM (2002) Breast cancer in a multiethnic cohort in Hawaii and Los Angeles: risk factor-adjusted incidence in Japanese equals and in Hawaiians exceeds that in whites. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **11**: 795-800.
 - 15) 古守豊甫, 鷹嘴テル (1986) 長寿村・短命化の教訓. 樹心社, 東京.
 - 16) Shimada A, Kamiyama S, Neto Caminha JA, Moriguchi Y (1981) Regional differences of death from chronic diseases in Rio Grande do Sul, Brazil from 1970 to 1976. *Soc Sci Med [Med Geogr]* **15D**: 187-98.
 - 17) Mizushima S, Moriguchi EH, Ishikawa P, Hekman P, Nara Y, Mimura G, Moriguchi Y, Yamori Y (1997) Fish intake and cardiovascular risk among middle-aged Japanese in Japan and Brazil. *J Cardiovasc Risk* **4**: 191-9.
 - 18) Yamori Y, Miura A, Taira K (2001) Implications from and for food cultures for cardiovascular diseases: Japanese food, particularly Okinawa diets. *Asia Pac J Clin Nutr* **10**: 144-5.
 - 19) 厚生労働省 (1999). 厚生労働省平成11年国民健康・栄養調査報告, (健康栄養情報研究会編). 第一出版, 東京.
 - 20) 大蔵省 (2000) 五訂日本食品標準成分表 科学技術庁資源調査会報告 (第124号), (科学技術庁資源調査会編). 大蔵省印刷局, 東京.
 - 21) U.S. Department of Agriculture (2000) Results from USDA's 1996 Continuing Survey of Food Intakes by Individuals and 1996 Diet and Health Knowledge Survey, URL: <http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/12355000/pdf/Csfi96.PDF>.
 - 22) 磯部由香, 久保さつき, 橘ゆかり, 道家晶子, 本澤真弓, 水野浄子著 (2002) 食品学実験書, 第2版, (藤田修三, 山田和彦編著). 医歯薬出版, 東京.
 - 23) Tsuzuki T, Igarashi M, Komai M, Miyazawa T (2003) A metabolic conversion of 9, 11, 13-eleostearic acid (18:3) to 9, 11-conjugated linoleic acid (18:2) in the rat. *J Nutr Sci Vitaminol* **49**: 195-200.
 - 24) Tsuzuki T, Kawakami Y, Suzuki Y, Abe R, Nakagawa K, Miyazawa T (2005) Intake of conjugated eicosapentaenoic acid suppresses lipid accumulation of liver and epididymal adipose tissue in rats. *Lipids* **40**: 1117-23.
 - 25) Tsuzuki T, Igarashi M, Miyazawa T (2004) Conjugated eicosapentaenoic acid inhibits transplanted tumor growth via membrane lipid peroxidation in nude mice. *J Nutr* **134**: 1162-6.
 - 26) Tsuzuki T, Tokuyama Y, Igarashi M, Miyazawa T (2004) Tumor growth suppression by α -eleostearic acid, a linolenic acid isomer with a conjugated triene system, via lipid peroxidation. *Carcinogenesis* **25**: 1417-25.
 - 27) Tsuzuki T, Kambe T, Shibata A, Kawakami Y, Nakagawa K, Miyazawa T (2007) Conjugated EPA activates mutant p53 via lipid peroxidation and induces p53-dependent apoptosis in DLD-1 colorectal adenocarcinoma human cells. *Biochim Biophys Acta* **177**: 20-30.
 - 28) Hoekstra M, Kruijt JK, Van Eck M, Van Berkel TJ (2003) Specific gene expression of ATP-binding cassette transporters and nuclear hormone receptors in rat liver parenchymal, endothelial, and Kupffer cells. *J Biol Chem* **278**: 25448-53.
 - 29) Ota M, Mori K, Nakashima A, Kaneko YS, Takahashi H, Ota A (2005) Resistance to excessive body weight gain in risperidone-injected rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **32**: 279-87.

- 30) Scott DK, Collier JJ, Doan TT, Bunnell AS, Daniels MC, Eckert DT, O'Doherty RM (2003) A modest glucokinase overexpression in the liver promotes fed expression levels of glycolytic and lipogenic enzyme genes in the fasted state without altering SREBP-1 c expression. *Mol Cell Biochem* **254**: 327-37.
 - 31) Linden D, Lindberg K, Oscarsson J, Claesson C, Asp L, Li L, Gustafsson M, Boren J, Olofsson SO (2002) Influence of peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonists on the intracellular turnover and secretion of apolipoprotein (Apo) B-100 and ApoB-48. *J Biol Chem* **277**: 23044-53.
 - 32) Frederiksen KS, Wulff EM, Sauerberg P, Mogensen JP, Jeppesen L, Fleckner J (2004) Prediction of PPAR-alpha ligand-mediated physiological changes using gene expression profiles. *J Lipid Res* **45**: 592-601.
 - 33) Ellis EM, Judah DJ, Neal GE, Hayes JD (1993) An ethoxyquin-inducible aldehyde reductase from rat liver that metabolizes aflatoxin B1 defines a subfamily of aldo-keto reductases. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 10350-4.
 - 34) Pedersen WA, Wan R, Zhang P, Mattson MP (2002) Urocortin, but not urocortin II, protects cultured hippocampal neurons from oxidative and excitotoxic cell death via corticotropin-releasing hormone receptor type I. *J Neurosci* **22**: 404-12.
 - 35) Gonzalez FJ, Fernandez-Salguero P (1998) The aryl hydrocarbon receptor: studies using the AHR-null mice. *Drug Metab Dispos* **26**: 1194-8.
 - 36) Joo WS, Jeffrey PD, Cantor SB, Finnin MS, Livingston DM, Pavletich NP (2002) Structure of the 53 BP1 BRCT region bound to p53 and its comparison to the Brca1 BRCT structure. *Genes Dev* **16**: 583-93.
 - 37) Tran H, Brunet A, Grenier JM, Datta SR, Fornace AJ Jr, DiStefano PS, Chiang LW, Greenberg ME (2002) DNA repair pathway stimulated by the forkhead transcription factor FOXO3a through the Gadd45 protein. *Science* **296**: 530-4.
 - 38) Jelinek DF, Andersson S, Slaughter CA, Russell DW (1990) Cloning and regulation of cholesterol 7 alpha-hydroxylase, the rate-limiting enzyme in bile acid biosynthesis. *J Biol Chem* **265**: 8190-7.
 - 39) Bouloumie A, Drexler HC, Lafontan M, Busse R (1998) Leptin, the product of Ob gene, promotes angiogenesis. *Circ Res* **83**: 1059-66.
 - 40) Hu E, Liang P, Spiegelman BM (1996) AdipoQ is a novel adipocyte-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem* **271**: 10679-703.
 - 41) 厚生労働省 (2002) 患者調査 (平成 14 年上) 全国編, (厚生労働省大臣官房統計情報部編). 財団法人厚生統計協会, 東京.
-

J Jpn Soc Nutr Food Sci 61 : 255-264 (2008)

Original Paper

DNA Microarray Analysis of Rat Liver after Ingestion of
Japanese and American Food

Tsuyoshi Tsuduki,¹ Naoki Takeshika,¹ Yumiko Nakamura,¹
Kiyotaka Nakagawa,¹ Miki Igarashi,¹ and Teruo Miyazawa^{*,1}

(Received February 18, 2008; Accept August 25, 2008)

Summary : Japanese food is of interest worldwide as healthy food. However, comparison of Japanese food with European and American food has not been performed using DNA microarray analysis. In this study, we examined differences in gene expression levels in the liver of rats fed “Japanese food” or “American food” using a DNA microarray. Two meals were cooked based on a menu of Japanese food and American food. The cooked meals were prepared to a freeze-dried powder and given to rats for three weeks as test diets. Total RNA was then extracted from rat liver and used in DNA microarray analysis. The expression levels of stress response genes were lower in rats fed Japanese food compared to those fed American food, and expression of genes of the sugar and lipid metabolism system was higher in rats fed Japanese food. Expression of genes associated with cholesterol catabolism increased markedly in rats fed Japanese food, although the ingested lipid content was low, and cholesterol accumulation in rat liver was prevented. Therefore, the results suggest that Japanese food is healthy and profitable compared with American food due to activation of metabolism and reduction of stress.

Key words : DNA microarray, Japanese food, American food, nutrigenomics, rat

* Corresponding author (E-mail: miyazawa@biochem.tohoku.ac.jp)

¹ Food and Biodynamic Chemistry Laboratory, Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, Sendai 981-8555, Japan