

DNA マイクロアレイを用いた 食品機能性評価

はじめに

食品の機能として、生命活動を維持するための栄養機能(一次機能)及び味覚・嗅覚など感覚機能(二次機能)は、従来からよく知られていましたが、最近では、健康維持・疾病予防に関わる生体調節機能(三次機能)が注目されています。その評価のため、様々な生化学的な実験手法が開発され、種々の素材の機能性を簡便・迅速に探索(スクリーニング)することが出来るようになってきました。

その次のステップとして、スクリーニング試験によって見出された効果がどのような作用メカニズムで機能しているのかエビデンス(科学的根拠)を得る必要があります。そのための有効な解析手法の一つに DNA マイクロアレイがあります。今回は、DNA マイクロアレイについての解説や、食品機能性解析評価の実例などについてご紹介します。

オミックス解析^{*1}とトランスクリプトミクス

食品機能性研究にあたり、しばしばオミックス解析という手法が用いられます。オミックス解析にはトランスクリプトミクス(遺伝子発現の網羅的解析)、プロテオミクス(タンパク質の網羅的解析)及びメタボロミクス(代謝物を対象とした網羅的解析)という手法が用いられております。近年、分析機器やデータ解析技術が飛躍的に向上し、多くの物質を一斉に解析することが可能となり、代謝物を対象としたメタボロミクスに注目が集まっております。しかしながら、タンパク質や代謝物に先駆けて変動する遺伝子を捉えることが可能なトランスクリプトミクスは今もなお重要な意味があります。トランスクリプトミクス解析の手法の一つである DNA マイクロアレイは、DNA が相補的な配列を持った核酸と対を形成する特性を利用した検出法であり、mRNA^{*2}の発現量を網羅的に検出することができるツールになります。

DNA マイクロアレイとは

近年、ヒトをはじめ多くの動物、植物の全 DNA 配列が決定されました。その結果、その遺伝子配列だけでなく、発現パターンを網羅的に解析する必要性が高まり、DNA マイクロアレイの技術開発が大きく進んできました。今では数多くの遺伝子発現解析に使用されている DNA マイクロアレイですが、10 年程前までは再現性、感度、高価な検査費用が課題でした。これらの課題を解決すべく、標識キットやオリゴヌクレオチドプローブの最適化、検出装置の高感度化、さらに次世代型であるフォーカスタレイ(後述)などの登場により、安価で短時間に高感度な遺伝子発現解析が可能になりました。さらに、熟練した技術者が実験することにより高精度なデータが得られることから、新規遺伝子マーカーの検索や遺伝子発現プロファイル比較の手法として、DNA マイクロアレイは現段階で最適なものであると考えられます。

DNA マイクロアレイ解析試験の流れ

DNA マイクロアレイ解析試験の簡単な流れを図-1 に示しました。まず、機能性成分を添加した培養細胞または動物組織から mRNA を抽出します。抽出された mRNA を鋳型として、cDNA^{*3} を合成・精製し、増幅・ラベル化を行い、mRNA の配列に相補的な標識された RNA を合成します。次に、フラグメント処理を行い、DNA マイクロアレイにハイブリダイゼーション^{*4} します。ハイブリダイゼーション後の DNA マイクロアレイを検出器で読み取り、画像データを作成します。得られた画像データから、解析ソフトウェアにより、各スポットの蛍光シグナルの強度を数値データに変換します。数値データはバックグラウンドの減算、ノーマライゼーション^{*5} などの処理を行い、特異的に発現変動している遺伝子群を解析します。このように、機能性成分による刺激などの条件下において特異的に発現している遺伝子群を解析することで、作用メカニズムの解明が可能となります。この時、これらの機能性成分による刺激に対して、mRNA は必要なときに必要なだけ産生されるため、遺伝子解析にあたり最適な時間を見つけておくことが肝要です。

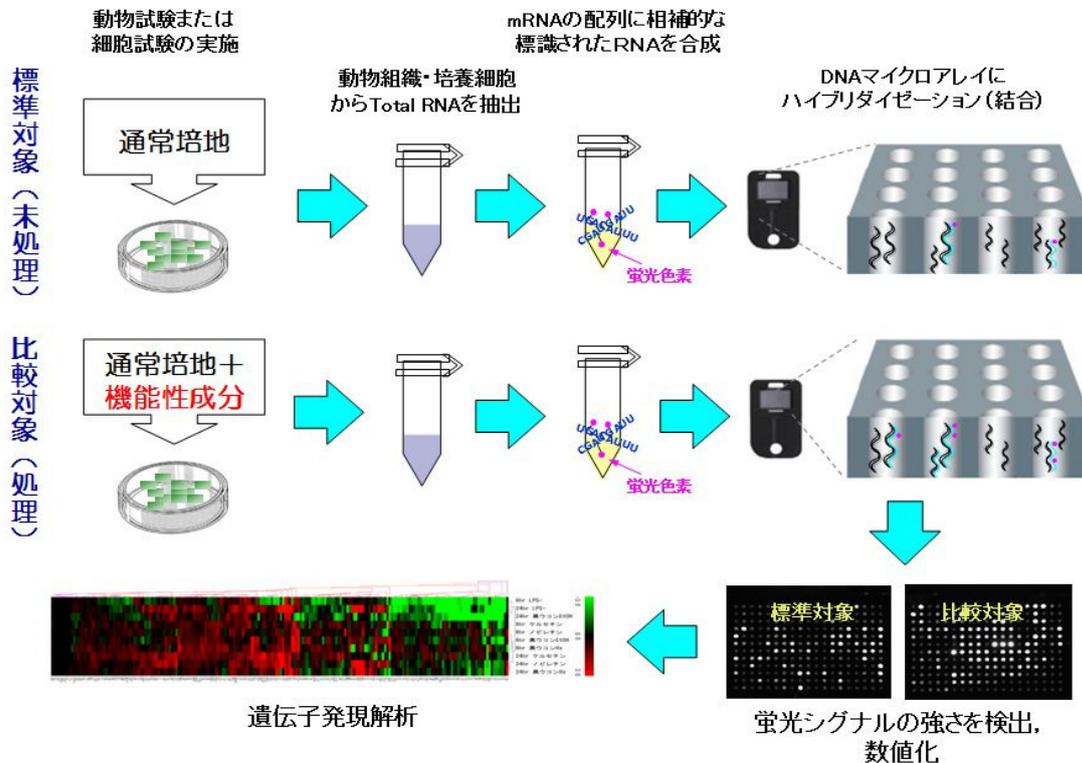


図-1 DNA マイクロアレイ試験の流れ

フォーカストアレイとは

DNA マイクロアレイというと 2 万以上の遺伝子が搭載されたスクリーニングアレイを用いた網羅的解析が一般的でした。昨今、数百から数十程度の特定の遺伝子を、高精度に解析できるフォーカストアレイへのニーズが高まってきています。主に基礎研究の分野で広く用いられてきたスクリーニングアレイは解析結果の信頼性よりも網羅性が重視されてきましたが、フォーカストアレイは、これら遺伝子群の働きをより詳細に調べる「検査」や「診断」に使用されるため、高い再現性、信頼性が要求されます。スクリーニングアレイと比較したフォーカストアレイの特徴を表-1 に示しました。

表-1 フォーカストアレイの特徴

	スクリーニングアレイ	フォーカストアレイ
遺伝子数	数万～数千	数百～数十
価値	全体概略網羅性	詳細情報信頼性
目的・用途	網羅解析・一次スクリーニング	特定解析・汎用検査
経済性	高価	安価
解析の難易度	遺伝子数が多いため比較的高い	遺伝子数が少ないため比較的低い
地図にたとえると	国土全図	市街地図

弊財団では三菱レイヨン株式会社製フォーカスト DNA アレイ『ジェノパール®』を導入しています。『ジェノパール®』は従来型の平板上表面に DNA が固定された二次元アレイとは異なり、体積のある三次元高含水ゲル中にキャプチャープローブ DNA*6 を分散して固定しているため、DNA 同士の「静電的反発によるハイブリダイゼーション効率の低下」などを招くことなく、多くのキャプチャープローブ DNA を搭載することができます。このキャプチャープローブ DNA は、分子運動性がフレキシブルであることから、ハイブリダイゼーション反応時に必要な「分子のコンホメーション*7 変化」が容易となっています。

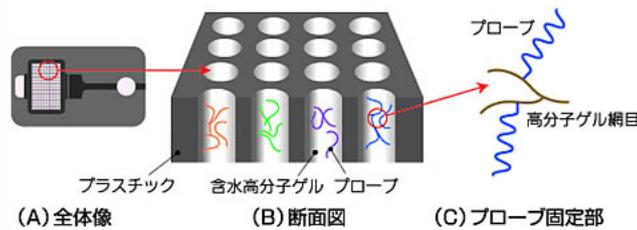


図-2 『ジェノパール®』の構造

これにより、正確なデータを再現性良く取得することができ、信頼性、操作性、経済性を兼ね備えた次世代型の DNA マイクロアレイになります。

また、ジェノパール®による遺伝子発現解析結果は、他の手法である定量 PCR による結果と良い相関を示します。図-3 は、マウス細胞へ LPS 刺激を与えた際の遺伝子発現の変動について、ジェノパール® (アレルギーチップ) と定量 PCR 法の 2 手法で解析し、その結果を比較したものです。両手法から得られた発現パターンはよく一致しており、その発現差データ (\log_2 ratio) の相関は、 $R^2=0.87$ と高い値を示しました。

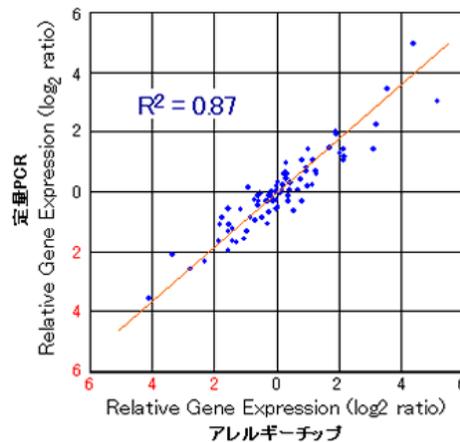


図-3 アレルギーチップと定量 PCR による発現差の比較

これまでに『アレルギーチップ』，『メタボリックチップ』，『酸化ストレス・アンチエイジング』など，その用途に合わせて様々なフォーカスト DNA アレイが開発され，商品化されております（表-2）。

表-2 『ジェノパール®』製品リスト

アレイタイプ	生物種	遺伝子数	使用用途
アレルギー	マウス	205	アレルギー抑制効果の機能性成分解析
	ヒト	209	
メタボリック	マウス	195	脂質代謝，糖代謝などメタボリックシンドローム研究
	ヒト	194	
自然免疫	マウス	208	ウイルス・細菌感染症への免疫応答研究
	ヒト	183	
酸化ストレス・アンチエイジング	マウス	213	紫外線や化学物質による老化に関する研究
	ヒト	219	
食品感受性評価	マウス	125	食品や医薬品がターゲットにする受容体研究
	ヒト	127	
皮膚	マウス	132	化粧品素材の安全性評価や皮膚の抗老化メカニズムに関する研究
	ヒト	139	
美白	マウス	159	美白成分の作用メカニズム解析
	ヒト	160	

DNA マイクロアレイを用いた食品機能性評価試験の実例

春ウコン（正式名称：キョウオウ）は，根茎の切り口は濃い黄色で苦味が強いのが特徴ですが，沖縄県などでは健康維持を目的として食用されており，免疫レベルを高くする効果が経験的に知られています。そこで，単球細胞と自然免疫チップを用いて，春ウコンの持つ免疫賦活作用に関わる遺伝子発現変動を調べました。

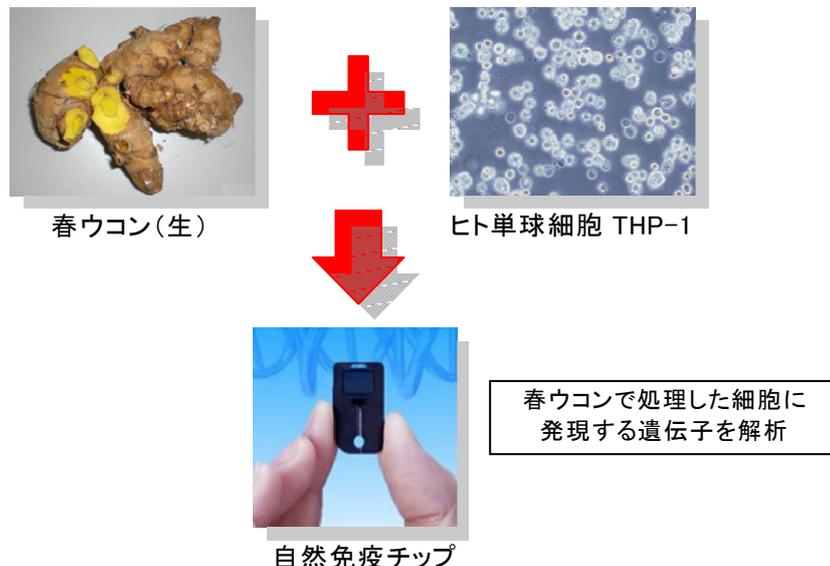


図-4 自然免疫チップとヒト単球細胞 THP-1 を用いた春ウコンの機能性評価

春ウコンの熱水抽出液で刺激したヒト単球細胞 THP-1 細胞から RNA を抽出し、DNA マイクロアレイ解析を実施しました。結果を表-3 に示します。全 183 遺伝子のうち、未刺激に対し 4 倍以上 (Log2 値で 2 以上) 発現上昇した遺伝子は 22 遺伝子あり、NF- κ B^{*8} 関連、インターフェロン^{*9} 関連、インターロイキン^{*10} 関連など自然免疫に関わる遺伝子群が発現上昇しておりました。データマイニング^{*11} の手法の一つであるクラスタリング解析^{*12} の結果から、すでに自然免疫を賦活するとの報告のある、昆布等の褐藻類等に含まれるフコイダンと類似した発現変動を示したことから、春ウコン熱水抽出液は、遺伝子レベルで単球細胞を活性化し、自然免疫を賦活している可能性が考えられました。今後、動物を用いた評価や臨床試験を行うことにより、効果を確認するとともに、関与成分を同定する等のエビデンスを取得することにより、春ウコンの機能性はより明確なものとなっていきます。

表-3 DNA マイクロアレイの解析結果

遺伝子	フコイダン	春ウコン
IL12B	5.8	5.4
IL6	4.9	5.3
TICAM1	2.1	5.1
SOD2	4.6	4.9
CXCL6	3.6	4.4
IL8	3.2	3.8
BCL3	4.2	3.7
TNFAIP3	3.7	3.6
IFIT1	2.7	3.6
RELB	3.8	3.4
NFKBIA	3.3	3.2
TNF	2.9	3.0
DDX58	2.8	2.8
NFKB2	3.4	2.7
STAT4	2.1	2.6
MX1	2.2	2.5
CXCL10	4.0	2.5
NFKBIZ	2.5	2.2
NOD2	2.2	2.1
NFKBIE	1.8	2.1
TRIM22	0.6	2.0
NFKB1	2.4	2.0

未刺激に対し、Log2 値が 2 以上発現変動した遺伝子

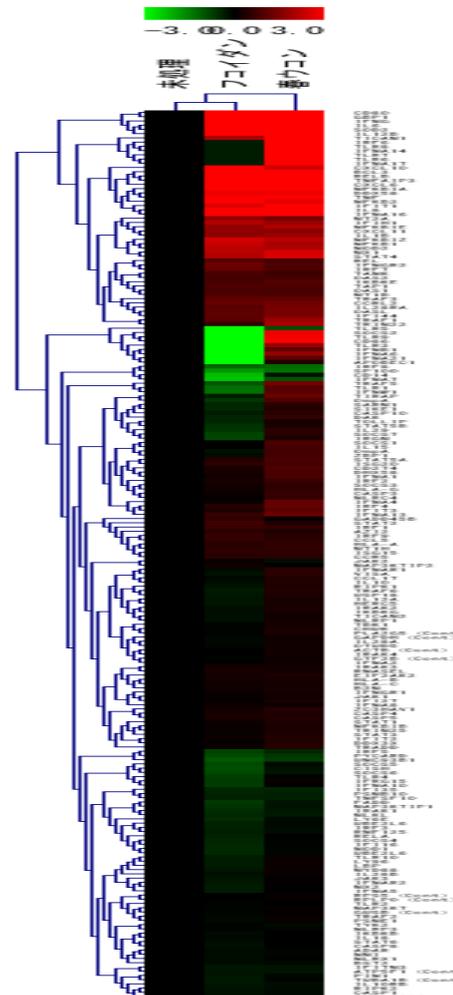


図-5 クラスタリング解析の結果

おわりに

DNA マイクロアレイを用いることで、機能性食品成分による多くの生命現象を解析することが可能になります。弊財団では、培養細胞や動物組織を用いた DNA マイクロアレイ解析試験を受託しております。それぞれの食品の機能性評価において適した実施条件を探索し、適切なメカニズム評価を行ってまいります。今後はさらに、作用物質の同定技術を整備し、機能性評価試験を多方面からサポートをしていく所存です。お気軽にご相談ください。

用語解説（出現順）

*1 オミックス解析

生物における分子全体の変動を探索し、生命現象を包括的に調べる解析手法のこと。

*2 mRNA

メッセンジャーRNA ともいう。タンパク質合成過程に必要な、アミノ酸の配列に対応する塩基配列をもつリボヌクレオチドのこと。

*3 cDNA

相補 DNA ともいう。mRNA の塩基配列と相補配列をもつ DNA で mRNA を鋳型に RNA 依存 DNA ポリメラーゼを用いて合成される。

*4 ハイブリダイゼーション

核酸（DNA または RNA）の分子が相補的に複合体を形成すること

*5 ノーマライゼーション

=正規化：データ等々を一定のルール（規則）に基づいて変形し、利用しやすくすること。

*6 キャプチャープローブ DNA

mRNA の塩基配列と相補配列をもつ DNA プローブのこと。

*7 コンホメーション

=立体配座：単結合についての回転や孤立電子対を持つ原子についての立体反転によって相互に変換可能な空間的な原子の配置のこと。

*8 NF κ B

免疫反応において中心的役割を果たす転写因子の一つであり、急性および慢性炎症反応や細胞増殖、アポトーシスなどの数多くの生理現象に関与している。

*9 インターフェロン

ウイルス増殖の阻止や細胞増殖の抑制、免疫系および炎症の調節などの働きをするサイトカインの一種。

*10 インターロイキン

白血球が産生する免疫応答の調節に関与する物質。T 細胞やマクロファージの増殖・活性化、B 細胞の分化、インターフェロン分泌促進などの作用を示す。

*11 データマイニング

大量に蓄積されたデータを解析し、その中に潜む項目間の相関関係やパターンなどを探し出す手法のこと。DNA マイクロアレイでは、実験で得られる膨大な情報量の中から統計学的に有意なデータを抽出し、クラスタリング解析、パスウェイ解析^{*13}などの手法が活用される。

*12 クラスタリング解析

クラスタリングとは、内的結合と外的分離が達成されるようなクラスと呼ぶ部分集合に、データの集合を分割すること。つまり、個々サンプル間または群間で似ているものを集めて分類し、その中から意味のあるものを発見する解析手法のこと。

*13 パスウェイ解析

発現が変動している遺伝子群に特定の遺伝子群が濃縮しているかどうかを判定する遺伝子ネットワーク解析のこと。

参考資料

- 1) 野島博編：DNA チップとリアルタイム PCR，講談社(2006)
- 2) 藤渕航編：マイクロアレイ統計解析プロトコール，羊土社（2008）
- 3) 三菱レイヨン株式会社 『ジェノパール®』ホームページ：<http://www.mrc.co.jp/genome/>
（『ジェノパール®』は三菱レイヨン株式会社の登録商標です。）