

DNA マイクロアレイ解析を用いた沖縄伝統野菜 ニガナ (*Crepidiastrum lanceolatum*) の食品機能性評価

真野 博^{*1}, 清水 純¹, 任 良 燦¹, 中谷 祥 恵¹
野口 有 希¹, 増田 和 成², 和田 政 裕¹

(2005年6月8日受付; 2006年1月14日受理)

要旨: DNA マイクロアレイ解析法を用いることで、沖縄伝統野菜ニガナ (*Crepidiastrum lanceolatum*) を摂取させた実験動物の肝臓では、遺伝子発現パターンが大きく変動していることを明らかにした。特に、ニガナは強力なエリスロポエチン (EPO) 遺伝子発現誘導活性を有していることがわかった。このことから、ニガナの摂取は体内のEPOタンパク質産生を上昇させる可能性が考えられた。さらに、Potential Free Energy (pF) 1.5, pF 1.8, pF 3.0の条件で灌水量を調節し、成分量(栄養成分や硝酸態窒素)を変化させ、品質を改良したニガナを作製した。3種類のニガナのうち pF 1.5の灌水量条件で栽培したニガナは、硝酸態窒素含量およびカリウム含量が比較的少なく、その他のビタミンやミネラル含量は他と同程度であったが、EPO 遺伝子誘導活性が最も高かった。本研究の結果、食品を投与した実験動物を用いたDNA マイクロアレイ解析は、食品の新たな品質設計技術の一部として有用であると考えた。

キーワード: DNA マイクロアレイ解析, ニガナ, 野菜, 食品機能, マウス

「いわゆる健康食品」を含む機能性食品の市場は、近年、急速に拡大している¹⁾。これを一過性のものとせず、今後も成長を維持させるためには、科学的根拠(エビデンス)に基づいた機能性食品を普及させていく必要がある。

食毒性を含む食品の機能性の評価は、試験管内解析、細胞・動物実験、ヒト試験など *in vitro* から *in vivo* の評価法まで多彩なアッセイ手法がある²⁻⁴⁾。しかし、そのほとんどが、限定された機能の評価を行うものであり、複数の機能を一度に評価するのは困難である。また、これまでの手法では、まったく機能未知な食品の効能・効果や食毒性を評価するには、多くの時間と労力が必要である。

近年、栄養学研究をハイスループットな遺伝子工学的な手法で研究するニュートリゲノミクスが着目されている⁵⁾。DNA マイクロアレイ技術は、この手法の一つで、遺伝子発現情報の解析に利用されている^{6,7)}。1枚のDNA マイクロアレイチップには、1万から数万種類の遺伝子情報が搭載されている。すなわち、ヒトやマウスのゲノム遺伝子サイズは数万個であるため、1回のDNA マイクロアレイ解析で全ゲノムの遺伝子発現情報の解析も可能となる^{8,9)}。

各臓器、各組織の細胞は、同一の遺伝情報を有してい

るが、遺伝子発現パターンが異なるため、それぞれ固有の細胞として機能している。また、個体レベルでは、一個人の遺伝子情報は一つであるが、健康状態と疾病罹患状態では、遺伝子の発現パターンが異なる。そのため遺伝子発現パターン解析は、生物学・医学分野で重要であると考えられている。標的遺伝子の発現を一つ一つ解析するノザン解析法やRT-PCR法が良く用いられている。一方、DNA マイクロアレイ解析法では簡便に網羅的な遺伝子発現パターン解析が可能になった^{6,7)}。また、DNA マイクロアレイ解析は、従来のアッセイ手法と比較して、予想や推測に拠る部分が少ないことも利点の一つとしてあげられる。

本研究では、食品品質設計技術への応用を目標に、DNA マイクロアレイ解析を行った。DNA マイクロアレイ解析による食品機能評価が実用化すれば、機能性食品の客観的・合理的な科学的根拠を明らかにし、機能性食品市場の成長を支える基盤技術の一つになると期待できる。本研究においては、DNA マイクロアレイ解析による遺伝子発現情報に基づいた農産物機能解析を行い、その結果を農産物の栽培技術開発に反映させることを目的とした。農産物については、健康と食生活に関する情報の豊富な沖縄伝統野菜のニガナに着目した。

ニガナ(沖縄名)の和名はホソバワダン (*Crepidias-*

* 連絡者・別刷請求先

¹ 城西大学薬学部医療栄養学科 (350-0295 埼玉県坂戸市けやき台 1-1)

² 株式会社荏原製作所 (108-8480 東京都港区港南 1-6-27)

trum lanceolatum) で、キク科アゼトウナ属に属している。和名のニガナとは別種である。ニガナは、畑の周りなどに自生している野草の一つで、汁や白和えにして食べられている¹⁰⁾¹¹⁾。味は非常に苦く、その青汁は熱冷ましの民間療法としても用いられる¹²⁾。現在では、島内細葉系在来種として栽培され、市場でも流通している。

本実験では、挿し木苗を用い液肥栽培したニガナの食品機能性を評価した。今後さまざまな食品の機能性評価へ応用することを考え、実験動物は小型でヒトのモデルとして良く利用されている正常マウスを用い、サンプル投与は経口単回投与とした。すなわち、ニガナ葉部を凍結乾燥後、純水に懸濁し、マウスに強制経口投与した。投与4時間後、マウス肝臓の遺伝子発現情報をDNAマイクロアレイで解析し、その結果から、ニガナの食品機能性を検討した。

実験方法

1. ニガナおよびホウレンソウの通常水耕栽培

ニガナおよびホウレンソウの栽培は沖縄県宮古島で行った。ニガナ供試品種は島内細葉系在来種を用いた。ホウレンソウ供試品種はサンクストを用いた。水耕栽培方法は、佐久間¹³⁾および加藤ら¹⁴⁾の方法に準じて行った。栽培試験はガラス室で行った。パミスサンドを用い、液肥は1,000 L 当たり、大塚ハウス1号1,500 g・大塚ハウス2号1,000 gを標準濃度とし、灌水量をPotential Free Energy (pF) 1.8に設定し自動灌水した。通常可食する大きさに成長したところで収穫し、実験に用いた。

2. ニガナの栽培条件の検討

水耕栽培による作物の品質改良法は、Summers *et al.*¹⁵⁾、Kimura *et al.*¹⁶⁾の方法に準じて行った。島内細葉系在来種ニガナの5-8 cmのランナーをパミスサンドに挿し木し、4週間後に栽培ベッドに定植した。液肥は1,000 L 当たり、大塚ハウス1号1,500 g・大塚ハウス2号1,000 gを標準濃度とした。試験区は、pF 1.8区(標準区)、pF 1.5区、pF 3.0区とした。試験区はpFセンサーによる自動制御(30分に1回、1回1分30秒)による灌水法で行った。pFは土壌などの固体から水を引き離すエネルギーすなわち土壌保水力を示し、通常の植物が生育しやすい条件はpF 1.8(標準)といわれ、pF 1.8に比較してpF 1.5は灌水量が多く、pF 3.0は乾燥している¹⁷⁾。栽培開始後、12週間で収穫した。生育は、葉長、葉幅、葉数、SPAD値(葉緑素含量)、収量を測定した¹⁶⁾。

収穫したニガナ葉部は、財団法人日本食品分析センターに依頼し、水分、タンパク質、脂質、灰分、炭水化物、エネルギー、硝酸態窒素、ナトリウム、リン、鉄、カルシウム、カリウム、マグネシウム、銅、亜鉛、ビタミンA(カロテン)、ビタミンB₁、ビタミンB₂、ビタミンB₆、アスコルビン酸、ビタミンE、ビタミンK、

葉酸、ナイアシンを分析した。各試験区のニガナは採集後、損傷葉を除去後、無作為に1 kg 選択し、これを細切、均質化後、縮分し各成分の分析につき30-60 gを使用した。

3. ニガナ粉末およびホウレンソウ粉末の作製法と実験動物投与法

試料の調整法や投与法はShimizu *et al.*¹⁸⁾の方法に従った。ニガナおよびホウレンソウの葉部は、損傷葉を除去後、無作為に選択し1 kgを使用した。それぞれ-80°C冷凍庫で凍結後、凍結乾燥機(Freezone 12 Stopping Tray Dryer, Labconco)で凍結乾燥した。凍結乾燥したニガナとホウレンソウはブレンダー(DLC-7G, Cuisinart)で粉碎後、150 μm apertureの篩(Testing-Sieve, Tokyo Screen)を通過した粉末を試料とした。このニガナ粉末あるいはホウレンソウ粉末を縮分後、純水で5% (w/v) 懸濁液を作製し、C57BL/6Jマウスに150 μL 経口投与した(乾燥粉末として0.3 g/kg)。

動物実験のスケジュールはMano *et al.*¹⁹⁾およびKato *et al.*²⁰⁾の方法に準じて行った。実験動物は、8週齢雄C57BL/6Jマウスを用いた。マウスを3日間、固形飼料(MF:オリエンタル酵母)で飼育し、実験前日は12時間絶食させた。ニガナ懸濁液、ホウレンソウ懸濁液あるいは比較対照群として純水を、経口胃ゾンデを用い150 μL投与した。投与後は、飲料水(純水)のみを自由摂取させ絶食とし、4時間後に頸椎脱臼法で屠殺した。動物実験は、総理府の「実験動物の飼育及び保管等に関する基準」および城西大学生命科学研究センターの「動物実験に関するガイドライン」に従って行った。

4. 臓器からのRNA抽出

動物臓器からのRNAの抽出および定量はMano *et al.*¹⁹⁾の方法に従った。屠殺直後、臓器を摘出し、Trizol試薬(Invitrogen)を用い、定法に従って、RNAを抽出した。総RNAはジエチルピロカーボネート(DEPC)処理した超純水に溶解し、260 nmと280 nmで吸光度を測定し定量した。

5. DNAマイクロアレイ解析法

DNAマイクロアレイ解析法はAffymetrix社およびEndo *et al.*²¹⁾、Kato *et al.*²²⁾の方法に準じて行った。同一群の5匹のマウスから抽出した総RNAを等量ずつ混合し、DNAマイクロアレイ解析に用いた。混合したそれぞれのRNAサンプルは、T7 promoter region配列を連結したオリゴdTプライマーで逆転写し、RNase H処理後、dsDNAsを作製した(SuperScript Choice System, Invitrogen)。その後、dsDNAsからピオチン化核酸で*In vitro* RNA転写を行った(Enzo Biochem, Farmingdale)。合成したcRNAは、スピンカラムで精製した(RNeasy Mini Kit, Qiagen)。精製したcRNAは94°C 35分間の加熱で断片化し、それぞれ15 μgを定法に従って、Murine Genome U74Av2 array(Affymetrix)にハイブリダイズさせた。ハイブリダイズ後、Fluidics

station 400 (Affymetrix) で洗浄し、結合している RNA をストレプトアビジン標識後、蛍光標識抗ストレプトアビジン抗体で検出した。アレイ情報は Affymetrix scanner (Affymetrix) で測定し、Genechip 解析ソフト (Affymetrix) で数値化した。解析処理は、Spotfire Decision Site 7.1 for Functional Genomics (Spotfire) を用いた。各群のマウス肝臓の遺伝子発現量の値は、純水投与群のコントロール値と比較した。

6. RT-PCR 解析法

RT-PCR 解析は、常法に従って行った。逆転写は Mano *et al.*²³⁾ の方法で、総 RNA を用い、SuperScript III (Invitrogen) と Oligo d(T) プライマーを用い逆転写し、cDNA を作製した。この cDNA を用い、ExTaq ポリメラーゼ (TAKARA) で PCR を行った。PCR の条件およびコントロール遺伝子のプライマーの設計は Mano *et al.*²⁴⁾ の方法に従った。コントロール遺伝子の Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAP) は、(GAPDH5'; TTGACCTCAACTACATGG, GAPDH3'; ATGAGGTCCACCACCCTG) のプライマーを用い、(94°C・1 min—58°C・1 min—72°C・3 min) の条件を、25 サイクルで PCR を行い、電気泳動後、871 bp の DNA 断片を検出した。Erythropoietin (EPO) は、Dame *et al.*²⁵⁾ の方法に準じて、(mrEPO-F; GTTCTGGAGAGGTA-CATCTT, mrEPO-R CTGTGAGTGTTCGGAGTG-GA) のプライマーを用い、(94°C・1 min—58°C・1 min—72°C・3 min) の条件で、40 サイクルで PCR を行い、電気泳動後、339 bp の DNA 断片を検出した。電気泳動後、画像解析ソフト Image J (NIH) で処理し数値化した。

実験結果

1. ニガナ投与およびホウレンソウ投与による肝臓遺伝子発現パターンの変化

DNA マイクロアレイ解析の結果、通常の水耕栽培で作製したニガナあるいはホウレンソウ投与により、マウス肝臓のさまざまな遺伝子の発現量が変化することが分かった。Table 1 に示すように、今回調べた 12,621 個の遺伝子のうち、コントロールマウスでは 5,046 個、ニガナ投与マウスでは 4,778 個、ホウレンソウ投与マウスでは 5,318 個の遺伝子が、肝臓での発現が検出された。ニガナ投与では、純水投与と比較して 163 個の遺伝子の発現量が 2 倍以上に増加し、296 個の遺伝子の発現量が 0.5 倍以下に減少した。また、ホウレンソウ投与では、113 個の遺伝子の発現量が 2 倍以上に増加し、43 個の遺伝子の発現量が 0.5 倍以下に減少した。

さらに、各遺伝子をいくつかのカテゴリーに分類し、発現量が 2 倍以上あるいは 0.5 倍以下に変動した遺伝子数を Table 1 に示した。カテゴリーの後ろのカッコ内の数字は本 DNA マイクロアレイチップ上に搭載されている、各カテゴリーに含まれる遺伝子の数である。ストレ

Table 1 Numbers of genes whose expressions were up- or down-regulated compared with control (water) at least twofold in the liver of mouse fed with nigana or spinach.

| Genes (12621) | c (water) | Nigana | Spinach |
|---------------------|-----------|--------|---------|
| Expressed | 5046 | 4778 | 5318 |
| Up-regulated | — | 163 | 113 |
| Down-regulated | — | 296 | 43 |
| Stress (31) | | | |
| Up-regulated | — | 2 | 0 |
| Down-regulated | — | 2 | 0 |
| Energy (11) | | | |
| Up-regulated | — | 1 | 0 |
| Down-regulated | — | 0 | 0 |
| Transcription (821) | | | |
| Up-regulated | — | 19 | 4 |
| Down-regulated | — | 19 | 22 |
| Inflammatory (52) | | | |
| Up-regulated | — | 1 | 0 |
| Down-regulated | — | 2 | 5 |
| Cell cycle (240) | | | |
| Up-regulated | — | 10 | 4 |
| Down-regulated | — | 3 | 7 |
| Ribosomal (151) | | | |
| Up-regulated | — | 0 | 0 |
| Down-regulated | — | 2 | 0 |

スやエネルギーに関与する遺伝子の発現は、顕著に変化しなかった。遺伝子発現・転写にかかわる遺伝子の発現は、ホウレンソウ投与マウスおよびコントロールマウスと比較してニガナ投与マウスにおいて顕著に増加している遺伝子数が多く、ニガナ投与マウスおよびホウレンソウ投与マウスにおいてコントロールマウスと比較して減少している遺伝子が認められた。免疫にかかわる遺伝子の発現は顕著に変化しなかった。細胞周期にかかわる遺伝子の発現は、ニガナ投与マウスで増加、ホウレンソウ投与マウスで減少する遺伝子が多かった。恒常的に発現していると考えられているリボソーム関連の遺伝子の発現は顕著に変化しなかった。

また、増殖因子と造血因子の遺伝子発現情報を Table 2 に示した。数値は純粋投与のコントロールマウスの遺伝子発現量を 1 としたときの各群のマウスの遺伝子発現量を相対強度値で示している。多くの遺伝子はコントロールと比較し、2 倍以内の変動であった。しかし、エリスロポエチン (EPO) のみが、ニガナ投与でコントロールと比較して 5.3 倍増加していた。ニガナは、マウス肝臓の EPO の遺伝子発現量を顕著に増加させる可能性が高いと考えた。

2. ニガナ栽培条件の検討ならびに収量・成分比較

通常水耕栽培のニガナに EPO mRNA 発現誘導活性があることがわかったので、栽培方法を改良することで、EPO mRNA 発現誘導活性の高いニガナの作出を試

Table 2 Relative gene-expression levels compared with control (water) in the liver of mouse fed with nigana or spinach.

| Gene | Nigana | Spinach |
|---------------|--------|---------|
| Growth factor | | |
| HGF | 1.4 | 1 |
| IGF | 0.83 | 0.9 |
| EGF | nd* | nd |
| TGF β_1 | nd | nd |
| TGF β_2 | nd | nd |
| TGF β_3 | 1.8 | 0.87 |
| TGF α | 1.1 | 0.7 |
| Hematopoiesis | | |
| CSF1 | 1.6 | 1.3 |
| G-CSF | 1 | 0.83 |
| GM-CSF | nd | nd |
| EPO | 5.3 | 1.3 |
| TPO | 0.97 | 0.45 |

* nd, not detected. HGF, hepatocyte growth factor; IGF, insulin-like growth factor; EGF, epidermal growth factor; TGF, transforming growth factor; CSF, colony stimulating factor; G-CSF, granulocyte-colony stimulating factor; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony stimulating factor; EPO, erythropoietin; TPO, thrombopoietin.

みた。

栽培期間 (12月-翌年3月) の気温および日照時間は、はじめ低温、寡日照であったが、生育後半は、気温、日照時間ともに平年なみに推移した。平均気温は、18-25°Cの間を推移していた。日照時間に関して、前半は4時間以下の日が65%であったが、後半は4時間以上の日が65%以上あった。

生育状況は、生育前半は葉長、葉幅、葉数、SPAD値ともに、各区で大きな差はなかったが、生育後半から差が生じはじめた。最終的な収量は、pF 1.5区 (13.94 kg/m²) が多く、pF 1.8区 (13.80 kg/m²)、pF 3.0区 (9.65 kg/m²) の順となった。

各区のニガナの成分値を Table 3 に示した。各区のニガナのエネルギー、タンパク質、脂質、炭水化物、灰分など一般成分の含量に大きな差はなかった。ミネラル類は、pF 3.0区のニガナで高い傾向があったが、鉄含量はpF 1.5区のニガナが最も高く、カリウム含量はpF 1.5区が最も低かった。ビタミン類は、各区で大きな差はなかったが、カロテン、ビタミンK、アスコルビン酸の含量はpF 1.8区のニガナが最も高かった。一方、硝酸態窒素は、pF 3.0区のニガナが最も高濃度であった。

3. EPO mRNA 発現誘導活性が高いニガナ

DNA マイクロアレイ解析で、EPO 遺伝子の発現量がニガナ投与マウスの肝臓で顕著に増加していることがわかった。そこで、栽培条件を変更してニガナを栽培し、EPO mRNA 発現誘導活性の高いニガナの作出を試

Table 3 Nutrients contents in the nigana cultured in three irrigation-rate conditions (pF 1.5, 1.8 and 3.0).

| | pF 1.5 | pF 1.8 | pF 3.0 |
|-----------------------------------|--------|--------|--------|
| Energy (kcal/100 g) | 30 | 45 | 35 |
| Water (g/100 g) | 89.6 | 85.7 | 87.4 |
| Protein (g/100 g) | 1.1 | 1.7 | 1.1 |
| Lipid (g/100 g) | 1.1 | 1.3 | 1.2 |
| Carbohydrate (g/100 g) | 5.2 | 8.5 | 6.1 |
| Ash (g/100 g) | 2 | 2.3 | 2.7 |
| Sodium (mg/100 g) | 138 | 115 | 151 |
| Potassium (mg/100 g) | 668 | 831 | 936 |
| Calcium (mg/100 g) | 194 | 240 | 289 |
| Magnesium (mg/100 g) | 40.4 | 46.3 | 57.2 |
| Phosphorus (mg/100 g) | 72.7 | 89.9 | 99 |
| Iron (mg/100 g) | 2.03 | 0.97 | 1.18 |
| Zinc (μ g/100 g) | 200 | 231 | 244 |
| Copper (μ g/100 g) | 66 | 95 | 125 |
| Carotene (μ g/100 g) | 3690 | 4850 | 3650 |
| Vitamin E (mg/100 g) | 7.3 | 9.2 | 10.3 |
| Vitamin K (μ g/100 g) | 544 | 662 | 552 |
| Thiamine (mg/100 g) | 0.06 | 0.08 | 0.06 |
| Riboflavin (mg/100 g) | 0.1 | 0.14 | 0.09 |
| Niacin (mg/100 g) | 0.71 | 0.68 | 0.71 |
| Vitamin B ₆ (mg/100 g) | 0.24 | 0.28 | 0.37 |
| Folate (μ g/100 g) | 62 | 73 | 57 |
| Ascorbic acid (mg/100 g) | 12 | 26 | 11 |
| N-NO ₃ (mg/100 g) | 220 | 110 | 330 |

みた。実験は、DNA マイクロアレイ解析と比較して安価に解析できる RT-PCR 法で行った。また、遺伝子発現量が普遍的なことが知られている Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAP) を標準遺伝子とし、純水を投与したマウスをコントロールとした。

マウスの肝臓の EPO mRNA と GAP mRNA を、RT-PCR 法で増幅し、電気泳動後、Image J (NIH) で数値化し、EPO mRNA 量を GAP mRNA 量で除し、純水を投与したコントロールの値を1とし、相対強度としてグラフに示した (Figure 1)。

RT-PCR 法は定量的でないが、DNA マイクロアレイ解析と同様に、通常水耕栽培条件である pF 1.8 区のニガナを投与したマウスの肝臓で、コントロールに比較して EPO mRNA 量が増加していることが確認できた。さらに、灌水量の多い pF 1.5 区ならびに灌水量の少ない pF 3.0 区のニガナを投与したマウスの肝臓では、コントロールあるいは pF 1.8 区のニガナを投与した場合と比較しても、EPO mRNA 量が顕著に増加していた。一方、いずれのニガナの投与でもマウスの腎臓においては、EPO mRNA 量は変動していなかった (Data not shown)。

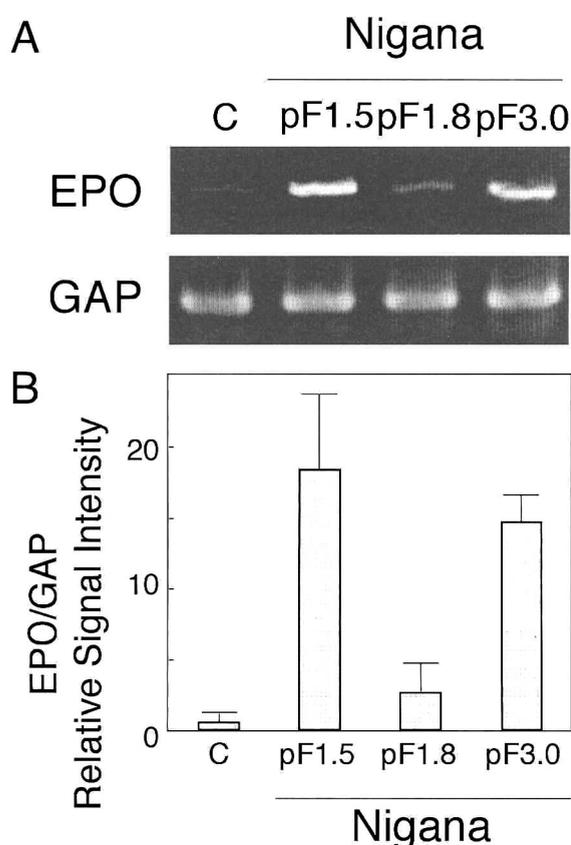


Figure 1 The mRNA levels of EPO in the liver of mouse fed with the cultured nigana.

(A) RT-PCR analysis of EPO mRNA in the liver. (B) Relative signal intensity calculated after measurement with “Image J”. Mean and SD of triplicate samples are shown.

考 察

DNA マイクロアレイ解析は、1度で数万個の遺伝子発現情報を取得可能な手法である。この数万個は、ヒトやマウスなどの哺乳動物のゲノムサイズと同等である。このため、DNA マイクロアレイ解析は、機能がまったく未知の食品の機能性を網羅的に検索・評価可能であると考えられる。

本研究ではDNA マイクロアレイ解析を用いることで、沖縄県在来作物ニガナが、一般的な葉菜類のハウレンソウと比較して、肝臓におけるEPO mRNA発現量を顕著に増加させることを発見した。EPOは、赤血球系前駆細胞の増殖と分化を促進し、末梢血中の赤血球数を調節する因子である²⁶⁾。また、現在では、腎不全患者では、組換え体EPOが腎性貧血の治療薬として用いられている²⁷⁾。EPO遺伝子は腎臓や肝臓で発現していることが報告され、肝臓は胎児のみならず成体でも骨髄と同様に、造血臓器の一つと考えられている²⁵⁾。本研究において、肝臓でニガナが誘導したEPO遺伝子発現は、体内の赤血球の増殖・分化に影響している可能性が考えられる。特に、ニガナが肝臓でEPO mRNA発現誘導

活性を示したことは、腎不全患者での利用を考えるとおおいに意義があると考えられる。

未だ不明な点が多いものの、野菜のもつ生理機能として、栄養素の供給源のみでなく、抗酸化性、発がん予防機能、免疫賦活性、抗アレルギー性などが着目され始めている²⁸⁾。また、ハウレンソウの栽培条件を変化させることにより、ハウレンソウ自身の遺伝子発現レベルが変化し²⁹⁾、ハウレンソウに含有されるカロテン含量が変化する¹⁶⁾ことも報告されている。本研究ではFigure 1に示すように、灌水量を変更することで、ニガナのEPO mRNA発現誘導活性を高めることができた。EPO mRNA発現誘導活性はpF 1.5およびpF 3.0の条件で栽培したニガナで高かった。また、pF 1.5とpF 3.0の条件で栽培したニガナを比較すると、一般的に摂取量が低い方が良いとされる硝酸態窒素および腎障害者で摂取を制限した方がよいとされるカリウムの値はpF 1.5で栽培したニガナで低値であった。その他のミネラルも、pF 3.0と比較すると、pF 1.5の条件で栽培したニガナで低値の傾向を示したが、カロテン、ビタミンE、ビタミンK、ビタミンB₁、ビタミンB₂、ナイアシン、葉酸、ビタミンCの含量は顕著な差はなかった。以上のことから、現時点では、EPO mRNA発現誘導活性の高いニガナを栽培するにはpF 1.5が適していると考えられる。

ニガナによる、EPO遺伝子発現誘導機序を考えると、これまで栄養素として鉄³⁰⁾、ビタミンA³¹⁾および葉酸³²⁾がEPO遺伝子発現を誘導することが報告されている。本研究において、EPO mRNA発現誘導活性の高いニガナに含まれる鉄、ビタミンAおよびその前駆体のカロテン、葉酸の含量は必ずしも高値ではなかった。さらに、ニガナのEPO mRNA発現誘導活性と今回測定した栄養素の濃度に、相関の高いものはなかった。このことから、ニガナのEPO mRNA発現誘導には、これら一般的な栄養素が関与している可能性は低いと考えられる。一般的な栄養素以外では、乳中のカルニチンがEPO mRNA発現誘導活性を有していることが報告されている³³⁾。しかし、カルニチンは動物性食品に多く含まれているが、植物性食品には含まれない。本研究で見出したニガナのEPO mRNA発現誘導活性は、どのような成分により惹起されているか不明であるが、今後、フラボノイド類などに着目した、活性本体の同定にも興味もたれる。

ビタミンA²⁰⁾や甲状腺ホルモン¹⁹⁾などの栄養素や生理活性物質を投与した動物において、代謝を介さず、その物質が直接的に遺伝子発現に影響を与える場合は、その物質の投与1時間後ですみやかに特定遺伝子の発現パターンが変化しはじめ、4時間後には最大変化に到達し、20時間後には通常レベルに回復しはじめることが報告されている。本研究では、研究の端緒として、ニガナ単回経口投与4時間後の肝臓における遺伝子発現パターンを解析した。また、本研究では、体重1 kg当た

りニガナ乾燥粉末として0.3 gを単回経口投与した。これは、体重50 kgのヒトではニガナ乾燥粉末15 gに相当する。生のニガナ植物体(可食部)の水分含量を約90%とすると、体重50 kgのヒトが150 gの生のニガナを一度に摂取することになる。葉菜類の摂取としては、多めであるが十分可能な範囲と考えられる。しかし、ニガナは沖縄で食経験があるが、長期間摂取による効果やその安全性は十分検証されているとはいえない。今後、ニガナ投与の経時的変化や投与量に関する解析に興味をもたれ、ニガナの長期摂取による安全性などを十分に調べる必要があると考えられる。

本研究の遂行にあたり、懇切なご指導を賜りました東京大学大学院農学生命科学研究科阿部啓子教授ならびに松本一朗助教授、サントリー株式会社木曾良信博士に深く感謝申し上げます。ニガナ、ホウレンソウの栽培は、沖縄県農業試験場宮古支場において行われました。また、本研究は、平成14年度農林水産省食品産業技術開発支援事業「DNAマイクロアレイ解析による食品の品質設計技術の開発」に関する研究の一環として実施したものであります。

文 献

- 宮川直樹 (2004) 食品の効果評価法の開発と健康食品・保健機能食品の動向. *食品工業* **47**, 61-7.
- 国場幸史, 須賀泰世, 梶浦正俊, 須賀哲也 (2003) 機能性食品のEBMに根ざした研究方法. *機能性食品と薬理栄養* **1**, 201-6.
- Shimizu T (2003) Health claims on functional foods: The Japanese regulations and an international comparison. *Nutr Res Rev* **16**: 241-52.
- Arai S (1996) Studies on functional foods in Japan. *Biosci Biotechnol Biochem* **60**: 9-15.
- Muller M, Kersten S (2003) Nutrigenomics: goals and strategies. *Genetics* **315**: 315-22.
- Schena M, Heller RA, Theriault TP, Konrad K, Lachenmeier E, Davis RW (1998) Microarrays: Biotechnology's discovery platform for functional genomics. *Trends Biotechnol* **16**: 301-6.
- Pollack JR, Perou CM, Alizadeh AA, Eisen MB, Pergamenschikov A, Williams CF, Jeffrey SS, Brown PO (1999) Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays. *Nat Genet* **23**: 41-6.
- Craig Venter J, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Xiao C (2001) The sequence of the human genome. *Science* **291**: 1304-51.
- Bassett JDE, Eisen MB, Boguski MS (1999) Gene expression informatics—It's all in your mine. *Nat Genet* **21**: 51-5.
- 照屋正映, 市場俊雄, 喜屋武裕子 (2003) 沖縄地域の薬用植物資源の高度利用に関する研究. 沖縄県工業技術センター研究報告 **5**, 85-90.
- Masuda T, Oyama Y, Yamamoto N, Umebayashi C, Nakao H, Toi Y, Takeda Y, Nakamoto K, Kuninaga H, Nishizato Y, Nonaka A (2003) Cytotoxic screening of medical and edible plants in Okinawa, Japan, and identification of the main toxic constituent of *Rhodea japonica* (Omoto). *Biosci Biotechnol Biochem* **67**: 1401-4.
- 上江洲栄子, 嘉手苺英子, 高橋千栄子, 菊池佑二 (2001) 1名の女性被験者の血液流動性に対するイカ墨汁摂取の影響. *医学と生物* **143**, 19-21.
- 佐久間青成 (1997) 露地に設置可能な簡易養液栽培装置. *農林業協力専門家通信* **17**, 1-13.
- 加藤忠司, 小沢 聖, 青木和彦, 山西弘恭 (1994) 冬期ハウス栽培野菜の低温処理による各種ビタミン含有量の向上. *東北農業研究* **47**, 317-8.
- Summers P, Weretilnyk EA (1993) Choline synthesis in spinach in relation to salt stress. *Plant Physiol* **103**: 1269-76.
- Kimura M, Rodriguez-Amaya DB (2003) Carotenoid composition of hydroponic leafy vegetables. *J Agric Food Chem* **51**: 2603-7.
- 松坂泰明 (1978) 土壌物理測定法, 第4版, (土壌物理性測定法委員会編), p. 134-7. 養賢堂, 東京.
- Shimizu J, Wada-Funada U, Mano H, Matahira Y, Kawaguchi M, Wada M (2005) Proportion of murine cytotoxic T-cell is increased by high-molecular weight fucoidan extracted from Okinawa Mozuku (*Cladosiphon okamuranus*). *J Health Sci* **51**: 394-7.
- Mano H, Mori R, Ozawa T, Takeyama K, Yoshizawa Y, Kojima R, Arao Y, Masushige S, Kato S (1994) Positive and negative regulation of retinoid X receptor gene expression by thyroid hormone in the rat. *J Biol Chem* **269**: 1591-4.
- Kato S, Mano H, Kumazawa T, Yoshizawa Y, Kojima R, Masushige S (1992) Effect of retinoid status on α , β , and γ retinoic acid receptor mRNA levels in various rat tissues. *Biochem J* **286**: 755-60.
- Endo Y, Fu Z, Abe K, Arai S, Kato H (2002) Dietary protein quantity and quality affect rat hepatic gene expression. *J Nutr* **132**: 3632-7.
- Kato H, Kimura T (2003) Evaluation of the effects of the dietary intake of proteins and amino acids by DNA microarray technology. *J Nutr* **133**: 2073S-7S.
- Mano H, Kimura C, Fujisawa Y, Kameda T, Watanabe-Mano M, Kaneko H, Kaneda T, Hakeda Y, Kumegawa M (2000) Cloning and function of rabbit peroxisome proliferator-activated receptor δ/β in mature osteoclasts. *J Biol Chem* **275**: 8126-32.
- Mano H, Nakatani S, Aoyagi R, Ishii R, Iwai Y, Shimoda N, Jincho Y, Hiura H, Hirose M, Mochizuki C, Yuri M, Im RH, Funada-Wada U, Wada M (2002) IF3, a novel cell-differentiation factor, highly expressed in murine liver and ovary. *Biochem Biophys Res Commun* **297**: 323-8.

- 25) Dame C, Sola MC, Lim KC, Leach KM, Fandrey J, Ma Y, Knopfle G, Engel JD, Bungert J (2004) Hepatic erythropoietin gene regulation by GATA-4. *J Biol Chem* **279** : 2955-61.
- 26) Lin FK, Suggs S, Lin CH (1985) Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* **82** : 7580-4.
- 27) Eschbach JW, Egrie JC, Downing MR (1987) Correction of the anemia of end-stage renal disease with recombinant human erythropoietin. Results of a combined phase I and II clinical trial. *New Engl J Med* **316** : 73-8.
- 28) 東 敬子 (1999) 野菜の生理機能と機能性成分. 農業技術 **54**, 325-9.
- 29) Lee DJ, Zeevaart AD (2002) Differential regulation of RNA levels of gibberellin dioxygenases by photoperiod in spinach. *Plant Phys* **130** : 2085-94.
- 30) Weissgarten J, Modai D, Oz D, Chen LZ, Marcus O, Dishi V, Galperin E, Averbukh Z (2001) Vitamin B₆ therapy does not improve hematocrit in hemodialysis patients supplemented with iron and erythropoietin. *Nephron* **87** : 328-32.
- 31) Semba RD, Kumwenda N, Taha TE, Mtimavalye L, Broadhead R, Garrett E, Miotti PG, Chipangwi JD (2001) Impact of vitamin A supplementation on anaemia and plasma erythropoietin concentrations in pregnant women: a controlled clinical trial. *Eur J Haematol* **66** : 389-95.
- 32) Teschner M, Kosch M, Schaefer RM (2002) Folate metabolism in renal failure. *Nephrol Dial Transplant* **17** : 24-7.
- 33) Bellinghieri G, Santoro D, Calvani M, Mallamace A, Savica V (2003) Carnitine and hemodialysis. *Am J Kidney Dis* **41** : 116-22.

J Jpn Soc Nutr Food Sci **59** : 177-183 (2006)

Original Paper

DNA Microarray Technology Evaluation of the Effects of Dietary Intake of Nigana (*Crepidiastrum lanceolatum*), an Edible Plant in Okinawa

Hiroshi Mano,^{*1} Jun Shimizu,¹ Im Ryang Hyok,¹ Sachie Nakatani,¹ Yuki Noguchi,¹ Kazunari Masuda,² and Masahiro Wada¹

(Received June 8, 2005 ; Accepted January 14, 2006)

Summary : DNA microarray technology was used to evaluate the effect of dietary intake of nigana (*Crepidiastrum lanceolatum*), an edible plant in Okinawa, on gene-expression pattern in the liver. The expression levels of several genes were changed in the liver of mice that consumed nigana or spinach. Whereas dietary intake of spinach and water did not affect the mRNA level of erythropoietin (EPO), intake of nigana induced gene expression of EPO in the mouse liver. To produce high-quality vegetables, we changed the growth conditions for nigana. Three irrigation rates (potential free energy; pF 1.5, 1.8, and 3.0) were used for nigana hydro culture. The irrigation conditions affected the contents of nutritional factors in nigana as well as the level of expression of the EPO gene in the liver of mice that ingested the plant. The pF 1.5 condition did not afford the highest levels of nutrients. However, the low levels of potassium and nitric acid found under this condition was a positive aspect, as these chemicals are known to be unfavorable factors in vegetables. The greatest induction of EPO mRNA at pF 1.5 was also beneficial. These findings indicate that the application of DNA microarray technology to experimental animals ingesting a specific dietary component is useful for producing high-quality food.

Key words : DNA microarray, nigana, edible plant, functional food, mouse

* Corresponding author

¹ Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University, 1-1 Keyakidai, Sakado, Saitama 350-0295, Japan

² EBARA Corporation, 1-6-27 Kohnan, Minato-ku, Tokyo 108-8480, Japan