

## 第4章 子実体及び廃培地の培養細胞系を主とした

### 食品の機能性評価

#### 4-1 はじめに

これまでの検討において、焼酎粕・デンプン粕を利用して栽培したヤマブシタケ子実体のマクロファージ細胞に対する抗炎症作用を評価したところ、焼酎粕培地で特徴的な作用が認められた。今回はその作用機序に関する情報を得るため、炎症に関連する遺伝子の変動をDNAチップにより解析することとした。

#### 4-2 試験方法

##### a) 細胞培養

RAW264 マウスマクロファージ様細胞株(RIKEN BANK)を細胞培養液(10%牛胎児血清含有 DMEM 培地)で継代維持し試験に用いた。

##### b) 検討検体

3種類の培地(A.焼酎粕・でん粉粕培地、B.焼酎粕培地、C.標準培地)を用いて栽培したヤマブシタケ子実体<sup>1)</sup>を用いた。

##### c) 試料溶液の調製

各栽培条件における子実体の凍結乾燥品につき 100mg/mL の濃度で熱水抽出し、遠心上清をろ過滅菌して試料溶液を調製した。最終濃度 5mg/mL となるように細胞培養液で希釈し試験した。

##### d) 抗炎症作用の評価

炎症モデルとして RAW264 細胞にリポ多糖体(LPS)を加え、試料による 24 時間培養後の上清中 NO 産生に対する抑制作用を評価した。なお NO は NO<sub>2</sub> イオンとして Griess 試薬により測定した<sup>2)</sup>。

##### e) DNA チップ解析

上記の上清 NO 測定時の細胞を回収し RNA を抽出した。この RNA を増幅・蛍光標識した後、マウスアレルギーチップジェノパール(209 遺伝子搭載、三菱レイヨン)を用いて、炎症関連の遺伝子を中心に発現量を比較した<sup>3)</sup>。

#### 4-3 結果と考察

DNA チップ解析に用いた細胞回収時の培養上清中の NO 産生率は、焼酎粕・でん粉粕培地 81%、焼酎粕培地 52%及び標準培地 70%と、焼酎粕培地に最も強い抑制作用が見られた。この条件において、十分な蛍光シグナルを与え、かつ LPS(+)コントロールに対して、いずれかの栽培条件で 2 倍以上又は 1/2 以下の発現変動を示した 28 遺伝子に注目した(表 4-1、図 4-1、図 4-2)。主な機能に基づいた分類別には、炎症(11 遺伝子)、アポトーシス(3)、細胞増殖系(6)、免疫応答(6)及びチャンネル輸送(2)の遺伝子に変動を認めた。LPS(+)条件において、ほとんどの遺伝子(27)の発現は増強し、低下したのは炎症促進に係る *Ltb* のみであった。参考として示した LPS(-)対照との比較から、LPS 刺激により炎症

系遺伝子の発現上昇が誘導されていることが確認できた。

培地条件の比較の観点から、標準培地に対して際立った変動を示したのは(図 4-2 の濃色バー)、炎症 7 遺伝子(Cxcl2、Il1a、Il6、Ltb、Procr、Ptgs2、Socs3)、アポトーシス 1 遺伝子(Ier3)、細胞増殖系 2 遺伝子(Tgfb1、Jak3)及び免疫応答 2 遺伝子(Cd83、Igtb)であった。これらの多くが上昇する中で Tgfb1 と Jak3 の 2 遺伝子のみは低下を示した(図 4-2)。

本 DNA チップ解析は、LPS 刺激により活性化・炎症状態としたマウス由来のマクロファージ様株化細胞に対する抗炎症作用機序の探索を目的としたものである。従って実際の血液・組織のような種々の細胞間の相互作用を含む *in vivo* 状態を反映したものではない。またマウスとヒトの動物種間の遺伝子の差が存在する点にも注意を要する。さらに実験条件として、ジェノパールがファイバースライス式の DNA チップであり、通常のスポット式に比べ再現性は高いとされてはいるものの<sup>3)</sup>、今回の各測定ポイント数は n=1 であり、ある程度の変動要因を含んだ結果であることも考慮する必要がある。

RAW264 細胞の LPS 刺激による炎症モデルにおいて抗炎症作用を評価する場合、刺激後 3 時間の細胞を回収する場合が多く、炎症初期の遺伝子変動を調べることに焦点を絞ったアプローチと言える<sup>4),5)</sup>。これに対して、ここでは、表現型として刺激後 16 時間以降に産生する NO の抑制作用を指標としており、炎症初期応答に続く二次的あるいは遅延型の細胞の応答も含めた、より広範囲な作用機序に関する情報を得ることを目的としている。そのため、NO 測定と同じ刺激後 24 時間のタイミングで回収した細胞に対して DNA チップ解析を実施したものである。

従って、これまで報告されているような炎症初期に顕著に誘導される炎症性サイトカイン類に対する抑制作用はほとんど見られず、抑制方向に動いたのは Ltb と Socs3 の 2 遺伝子のみであった(図 4-1)。Ltb(Lymphotoxin B)は、炎症性サイトカイン TNF $\alpha$  の受容体に結合し TNF $\alpha$  様の働きを示すことから、炎症抑制(NO 産生抑制)的に作用したことと一致する。また炎症性サイトカインを抑制的に制御する Socs3(サイトカイン抑制シグナル分子 3)の発現亢進も、やはり抗炎症作用として理解できる。

一方、LPS 刺激下の活性化マクロファージに対して、さらに炎症を促進する方向の動きを示した遺伝子は、白血球などの細胞の遊走を促す C3(補体成分 3)や一連のケモカイン(Ccl8、Cxcl2、Cxcl9)、B 細胞はじめ免疫系細胞の分化・増殖に係わるサイトカイン; Il1a、Il6、血液の抗凝固・血栓溶解作用に関係する Procr(蛋白 C 受容体)及び血管拡張、細胞遊走促進等に働くプロスタグランジンの主合成酵素である Ptgs2(プロスタグランジンエンドペルオキシド合成酵素); 別名 COX2(シクロオキシゲナーゼ 2)であった。これらの遺伝子の動きは NO 産生抑制作用との関連性は低いが、炎症性サイトカイン誘導に続く次の生体防御段階として、細胞の分化・増殖や遊走性、あるいは抗体産生能を増強する動きと捉えることができる。

また、NO 産生に直接係わる NOS2(誘導型 NO 合成酵素)が抑制ではなくむしろ亢進に動いている点に関しては、ヤマブシタケ子実体の NO 産生抑制作用が遺伝子発現レベルではなく、蛋白酵素レベルの作用によることを示している可能性もある(例えば酵素活性の阻害に対するネガティブフィードバックとして遺伝子発現が上昇)。

アポトーシスの関係では、アポトーシス促進に働く Atf2(活性化転写因子)の上昇を認める中、TNF $\alpha$  や p53 等により誘導されアポトーシスから細胞を保護する Ier3(最初期遺伝

子3)やJund(Junファミリー関連遺伝子)と言った遺伝子の上昇も同時に見られる。

細胞の増殖・分化については、Csf2(コロニー刺激因子2)、Il11(インターロイキン11)、Rel(細網膜内皮症癌遺伝子)、Tgfb1(トランスフォーミング増殖因子ベータ1)、Rheb(Ras類似遺伝子ファミリーメンバーb)、Spp1(分泌リン酸化蛋白；別名オステオポンチン)と言った遺伝子の上昇を認めた。また細胞シグナル伝達に働くJak3(Janus kinase 3)及びPtk2b(PTK2蛋白チロシンキナーゼ)の上昇傾向も見られた。

これら細胞の保護、増殖・分化に対する促進作用は、炎症性サイトカイン刺激に対する二次的な現象も含まれていると考えられるが、いずれにしてもヤマブシタケ子実体に、このような細胞機能を増強する働きがあることは注目に値する。

細胞間の相互作用や抗原提示に重要な働きを持つCD83(細胞表面抗原83)、インターフェロンγ(IFNγ)誘導性免疫に必須のFcgr1(IgG高親和性Fc受容体)、IFNγに誘導されマクロファージ防御系に作用するIgtb(IFNγ誘導GTPase)及びB細胞や樹状細胞の活性化を促すSema4d(セマフォレインファミリーメンバー)と言った免疫応答遺伝子の上昇が見られ、やはり抗炎症作用とは別の次元でも生体防御系を活性化の可能性が示唆された。

その他、細胞膜輸送に関係して、水分子の輸送チャンネルAqp1(アクアポリン1)及びATP分解による代謝レベル亢進に働くイオンチャンネルAtp1a2(ATPase、N+/K+輸送)の発現上昇を示した。これらの動きは炎症・活性化状態の細胞に対してエネルギー及び水分を供給して細胞機能を保持するための動きと考えられる。

標準培地(C)に焼酎粕とでん粉粕を加えた培地(A)及び焼酎粕のみを加えた培地(B)の3条件間で、上記の遺伝子の変動を比較した(図4-2)。(A)及び(B)の両培地ともに、標準培地よりも発現が明らかに変動(log<sub>2</sub>値で概ね倍の開き)したものは、Cxcl2、Il6、Procr、Ptgs2、Ier3及びCD83の6遺伝子(全て上昇)であり、(A)焼酎粕+でん粉粕培地のみで変動したものは、Il1a(上昇)、Socs3(上昇)及びJak3(低下)の3遺伝子、(B)焼酎粕培地のみで変動したのは、Ltb(低下)、Tgfb1(低下)及びIgtb(上昇)の3遺伝子であった。

このようにDNAチップ解析により、培地組成の違いを反映した特徴的な遺伝子発現パターンを確認できたことは、今度のさらなる作用機序あるいは成分の特定に向けて意義深いことである。

表 4-1 ヤマブシタケ子実体の DNA チップ解析において変動を示した遺伝子一覧

遺伝子	説明	登録番号	代表的な機能	分類
C3	Complement component 3	NM_009778	急性炎症時に合成亢進、防御系細胞を炎症局所に誘導	1. IP
Ccl8	CCケモカイン8(マクロファージ炎症性蛋白2α)	NM_021443	白血球などの遊走を引き起こし炎症誘導に働く	1. IP
Cxcl2	CXCケモカイン2(マクロファージ炎症性蛋白2α)	NM_009140	白血球などの遊走を引き起こし炎症誘導に働く	1. IP
Cxcl9	CXCケモカイン9(IFNg誘導性モノカイン)	NM_008599	IFNgにより誘導されるケモカインで白血球の遊走等に関わる	1. IP
Il1a	インターロイキン1α	NM_010554	炎症時の急性期蛋白誘導、免疫系細胞の増殖促進	1. IP
Il6	インターロイキン6	NM_031168	造血、炎症反応で重要、IL8,MCP1,ICAM1の発現亢進、B細胞の抗体産生細胞への分化促進	1. IP
Ltb	Lymphotoxin B (LTβ)	NM_008518	TNFα受容体に結合し同様の作用を示す、構造も類似しておりLTαと3量体を形成	1. IP
Nos2	Nitric oxide synthase 2, 誘導型, Mφ (iNOS)	NM_010927	マクロファージにおけるIL12, IFNg等の自然免疫サイトカインの作用に必須のNOを産生	1. IP
Procr	蛋白C受容体, 内皮性	NM_011171	プロテインC(VK依存性の血液の抗凝固、血栓溶解作用)に対する受容体	1. IP
Ptgs2	prostaglandin-endoperoxide synthase2 (COX2)	NM_011198	炎症を促進するプロスタグランジンの合成主酵素で血管拡張、細胞遊走にも作用	1. IP
Socs3	サイトカイン抑制シグナル分子3	NM_007707	サイトカイン抑制的に制御、SOCS3はT細胞のIL12産生を抑制しTh2優位に導く	2. IS
Atf2	活性化転写因子2 (MAPK活性化)	NM_009715	cAMP応答配列蛋白、炎症・ストレスにより活性化、細胞増殖抑制、アポトーシス誘導	3. AP
Ier3	immediate early response 3	NM_133662	TNFα等誘導アポトーシスから細胞を保護 (in vivoでの蛋白産物は未特定)	4. AS
Jund	Jun-proto-oncogene 関連遺伝子d1	NM_010592	JUN(AP1)ファミリーに属しAP1の構成要素、p53誘導アポトーシスに対して抵抗性	4. AS
Csf2	コロニー刺激因子2(顆粒球-Mφ)	NM_009969	マクロファージ等造血系前駆細胞の増殖・分化に必須の因子	5. CE
Il11	インターロイキン11	NM_008350	間質(結合組織)細胞が産生しリンパ球新生・造血作用に関与	5. CE
Rel	Reticuloendotheliosis oncogene	NM_009044	リンパ球新生、分化に係るREL/NFKBファミリーの転写因子	5. CE
Tgfb1	transforming growth factor beta1	NM_011577	細胞増殖、分化、接着、遊走等、多機能かつ促進or抑制の両面に関与	5. CE
Rhob	Rasホモログ遺伝子ファミリーメンバーB	NM_007483	DNAダメージ後の形質転換細胞に対するアポトーシスを媒介、細胞の接着性、増殖にも影響	5. CE/AP
Spp1	分泌リン酸化蛋白(オステオポンチン)	NM_009263	細胞接着、遊走、細胞性免疫の制御に関与するサイトカイン様作用、IL12,IFNg誘導	5. CE/IM
Jak3	Janus kinase 3	NM_012855	JAKファミリーに属するTyrosin kinaseで細胞内シグナル伝達に関与	6. SI
Ptk2b	PTK2蛋白チロシンキナーゼ2b	NM_172498	Ca誘導性イオンチャンネル制御、MAPKシグナル活性化	6. SI
Cd83	Cd83抗原	NM_009856	リンパ球活性に続く細胞間相互作用、抗原提示に重要な役割	7. IM
Fcgr1	Fc受容体, IgG高親和性1 (CD64)	NM_010186	IFNg反応性領域を含む免疫応答に必須の受容体	7. IM
Igtp	インターフェロンγ誘導GTPase	NM_018738	IFNgにより誘導されるGDPaseで異物に対するMφの防御系に働く	7. IM
Sema4d	セマフォレリンファミリーのメンバー	NM_013660	T細胞に発現し、B細胞及び樹上細胞の活性化促進	7. IM
Aqp1	Aquaporin 1	NM_007472	最初に同定された細胞内への水分子の輸送チャンネル	8. CH
Atp1a2	ATPase, N+/K+ transporting, α 2 pp	NM_178405	代謝レベル亢進(ATP分解)、心筋収縮への関与	8. CH

・栽培条件の異なるヤマブシタケ子実体のいずれかにおいて、LPS処理有コントロールに対して2倍または1/2以下の発現変動を示した28遺伝子を示した  
 ・遺伝子の機能及び分類については、GenomNet <[http://www.genome.jp/ga/jn\\_dbget\\_ja.html](http://www.genome.jp/ga/jn_dbget_ja.html)>, GeneCards<<http://www.genecards.org/>>等を参考にした

1. IP: 炎症促進
2. IS: 炎症抑制
3. AP: アポトーシス促進
4. AS: アポトーシス抑制
5. CE: 細胞増殖、分化、接着、遊走
6. SI: シグナル伝達
7. IM: 免疫応答
8. CH: チャンネル輸送

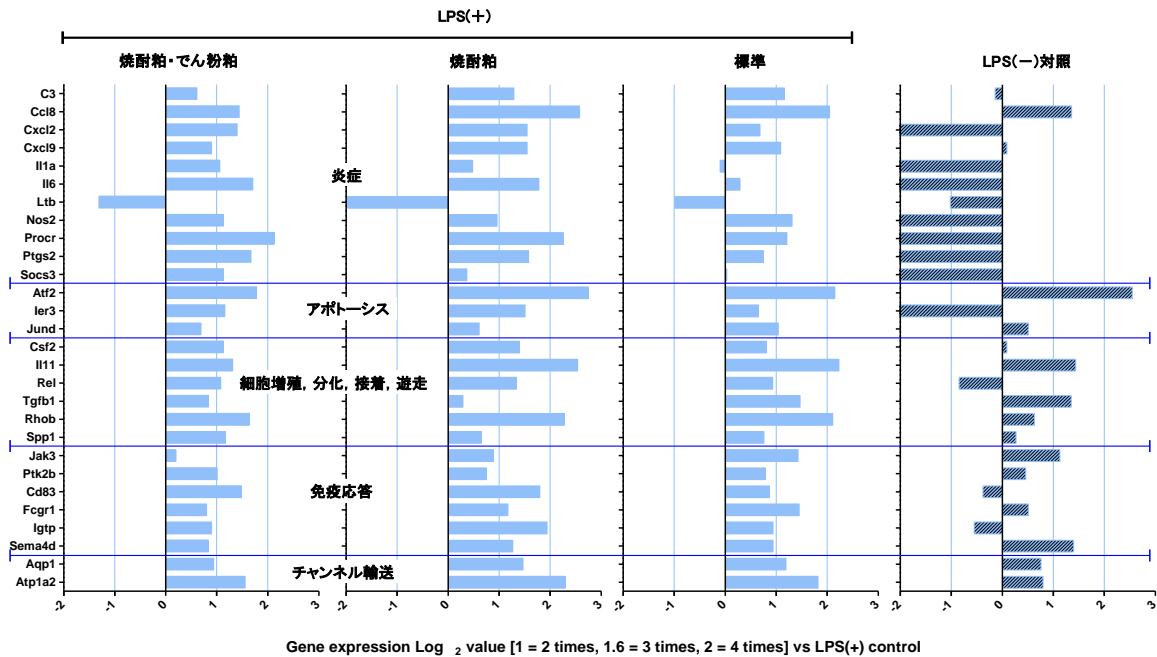


図 4-1 ヤマブシタケ子実体の DNA チップ解析結果(全体像)

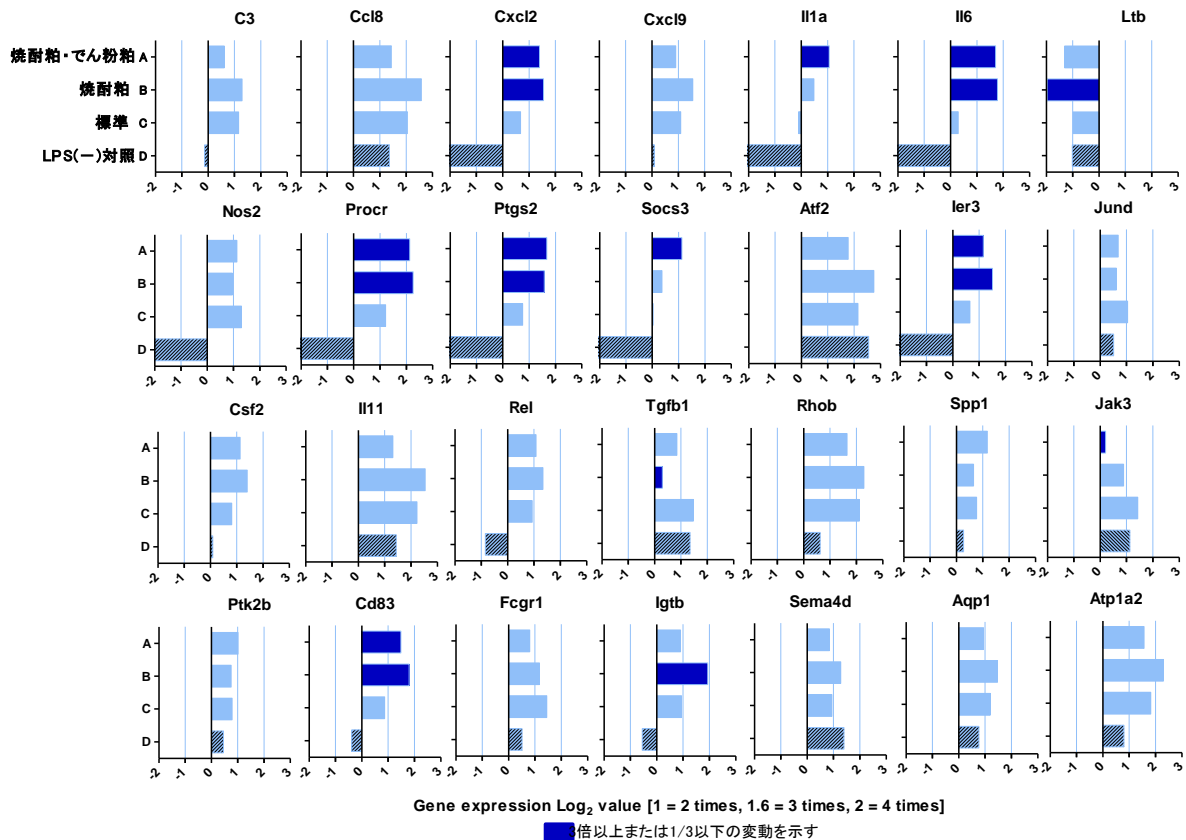


図 4-2 ヤマブシタケ子実体の DNA チップ解析結果(遺伝子個々の比較)

#### 4-4 おわりに

焼酎粕やでん粉粕の成分がヤマブシタケ子実体に取り込まれる過程で、初期の抗炎症作用以外にも、細胞の増殖・分化・遊走や免疫応答に係わる様々な遺伝子の発現に影響を与えることが、今回の DNA チップ解析により初めて明らかとなった。なかでも、焼酎粕培地で特徴的な低下を示した、*Ltb*(炎症性サイトカイン TNF $\alpha$  様作用)及び *Tgfb1*(細胞機能の多機能制御)あるいは上昇を示す *Igtb*(IFGg により誘導される生体防御系)などは、これまであまり注目されてこなかった遺伝子であり、今後、新たな研究への展開が期待される。

#### 参考文献

- 1) 山内正仁, 八木史郎, 山田真義, 山口昭弘, 増田純雄, 山口隆司. 食品廃棄物を培地材料に利用することによるきのこ(ヤマブシタケ)の機能性向上効果. 土木学会環境工学研究フォーラム論文集 2010
- 2) 宝寄山裕道, 野田遊. マクロファージ系培養細胞を用いた鶏卵由来成分の免疫賦活機能評価法. 北海道立畜産試験場研究報告, 25, pp16-23, 2003.
- 3) 地紙哲哉, 福島達伸. DNA チップを用いた食品素材の機能性評価～精密解析に適したフォーカストアレイ「ジェノパール」. 食品と開発, 43(10), pp47-49, 2008
- 4) Kobori M, Nakayama H, Fukushima K, et al. Bitter ground suppresses

lipopolysaccharide-induced inflammatory responses. *J Agric Food Chem* 56, 4004-4011, 2008

5)Chen J, Uto T, Tanigawa S, et al. Microarray-based determination of antiinflammatory genes targeted by 6-(methylsulfinyl)hexyl isothiocyanate in macrophages. *Experimental and Therapeutic Medicine* 1, 33-40, 2010