

2023 年度北陸大学特別研究助成【 基盤的研究 】 報告書

北陸大学長殿

所属・職名 薬学部・准教授
氏名 佐藤 安訓

研究課題名：微量栄養素がもたらすエピジェネティックな機能変化の実証スキームの構築

申請額：1,000,000 円

研究成果の概要

エピジェネティクスは塩基配列の変化を伴わない遺伝子発現制御機構である。近年、この機構に多くの微量栄養素が関与することが分かってきた。しかし実際の生体内において微量栄養素がエピジェネティクスを介して作用をもたらすのかはほとんど分かっていない。そこで本研究は、生体内で微量栄養素がエピジェネティクスを介して作用することを実証するスキーム構築を目的とした。生体試料としてヒト培養表皮を用いて詳細な条件検討を行い、微量栄養素がエピジェネティクスを介した作用を持つのか判定するステージ 1 を構築した。次に、それぞれの微量栄養素が有する作用のうち、エピジェネティクスを介した作用をリスト化するステージ 2 および生体内で行われていることを実証するステージ 3 を構築した。今後、構築した実証スキームを公開・周知することで、多くの研究者の手で様々な微量栄養素についてエピジェネティクスを介した作用が明らかになることが期待できる。

研究目的

研究開始時の背景・着想に至った経緯などを含めて目的を記入して下さい。

近年、老化に伴うエピジェネティクスの乱れが、癌や生活習慣病、神経変性疾患や炎症性疾患など様々な疾患の発症や増悪化に関与することがわかってきた(Cavalli G et al. Nature. 2019)。コンピューターを用いたドッキングシミュレーションや *in vitro* 研究から、ビタミンやミネラルなどの微量栄養素はエピジェネティクスの基盤となる化学反応に関与することが判明している(Nur SM et al. Crit Rev Food Sci Nutr. 2021)。しかし実際の生体内で微量栄養素がエピジェネティクスを介してどのような作用をもたらすかはほとんど明らかでない。また多数存在する微量栄養素ひとつひとつを検証することは多大な労力と時間を必要とする。そこで本研究は、生体内で微量栄養素がエピジェネティクスを介して機能変化をもたらすことを実証するスキーム構築を目的とする。この実証スキームを構築して公開することで、エピジェネティクスを介した作用を持つ微量栄養素の発見が可能となる。更には研究者が研究に取り組むための心理的障壁や物理的障壁の除去につながり、微量栄養素とエピジェネティクス研究の活性化の一助になることが強く期待できる。

研究の方法

研究目的である実証スキーム構築には、スキームを構成する 3 つのステージの確立を必要とする。以下にステージごとの確立方法を記載した。

ステージ 1『エピジェネティクスを介した作用の有無判定』

ステージ 1 はエピジェネティクスを介して作用を発揮し得る微量栄養素を探索する。そこで、エピジェネティクスの代表機構である DNA メチル化の変化の有無を検証できる DNA メチル化ドットブロット法を様々な生体試料に適用できるように、エピジェネティックな変化の検出が困難なヒト培養表皮を試料として実験条件を検討した。

ステージ 2『エピジェネティクスを介した作用のリストアップ』

ステージ 2 は微量栄養素がエピジェネティクスを介してどのような作用を起こすのか明らかにする。そこで微量栄養素の作用のうちエピジェネティクスを介した作用を判別するための実験条件や解析手法を探索した。

ステージ 3『エピジェネティクスを介した作用の実証』

ステージ 3 ではリストアップした作用が生体内で行われているか実証する。そこでエピジェネティクスが関与する可能性が高い作用について検証方法を作製した。

研究成果	引用文献は文末に<引用文献>として記入して下さい。
以下にステージ別に研究成果を示す。	
ステージ1『エピジェネティクスを介した作用の有無判定』	
<p>エピジェネティクスを介した変化を検出するのに最低限必要な DNA 量を調べるため、DNA 量を段階希釈後にドットブロット法を行った。その結果 DNA 量 125 ng から 500 ng までの範囲で直線性を認めた。このことから変化の検出には最低限 125 ng の DNA が必要であることがわかった。次に 125 ng の DNA を抽出するのに必要な組織量を検討した。市販の DNA 抽出キットを用いて添付文書の方法に従って DNA を回収した結果、ヒト培養表皮を 8 mg 使用時に 200 ng の DNA を回収できた。また測定により得られた回帰式から 125 ng の DNA を抽出するのに必要な組織量は 3.1 mg と推定した。これらの結果は血液、細胞などでも DNA 抽出に必要な検体量は極微量で済むことを示しており、研究者にとって貴重な検体の有効利用につながる。</p>	
<p>さらに吸光度 A260/A230 の比が異なる DNA サンプルを用いて、フェノールなどの核酸抽出試薬の混入がドットブロット法に与える影響を検討した。その結果、A260/A230 = 1.4~1.6 と核酸抽出試薬の混入が極めて高い DNA サンプルでもドットブロット法で検出することができた。組織の保存安定性について、-80℃で長期間保存していた試料を DNA 抽出後、ドットブロット法で検証した。その結果、少なくとも -80℃で 1.4 年間保存していた組織でも検出することができた。また -80℃で 4 ヶ月間保存していた DNA サンプルでもドットブロット法で検出することができた。これらの結果は、研究者の実験計画立案を容易にし、手技が不慣れでも実験に支障を来たしにくいことを示唆している。</p>	
<p>以上の結果を、実証スキームステージ1の公開情報として構築した。研究者はこのステージ1を参考にすることでエピジェネティクスを介して機能変化を起こし得る微量栄養素の探索が可能となる。</p>	
ステージ2『エピジェネティクスを介した作用のリストアップ』	
<p>一般的な組織や細胞についてエピジェネティクスに関与する酵素である <i>DNMT</i> 遺伝子および <i>TET</i> 遺伝子の siRNA を用いた遺伝子発現抑制条件をまとめた。そして実際に <i>TET</i> 遺伝子の発現を抑制する siRNA を導入した結果、DNA メチル化が変化したことを確認した。また遺伝子発現網羅解析および続く遺伝子エンリッチメント解析も行い、作用のリストアップ化も可能なことを確認した。研究者はこのステージ2の情報を参考にして実験を行うことで、エピジェネティクスを介した作用のリストアップ化が可能となる。</p>	
ステージ3『エピジェネティクスを介した作用の実証』	
<p>ステージ2でリストアップしたエピジェネティクスを介した作用について、実際に表現型として生体に表れているか実証が必要となる。そこでエピジェネティクスが関与する可能性が高い作用の検証方法を探索し、実証スキームステージ3の公開情報としてまとめた。</p>	
主な発表論文等	論文・学会・HP 等の発表があれば、項目ごとに記入して下さい。
【公開 HP 情報】	
「Epigenetics Research」 https://epigenetics-research.jimdosite.com	
<p>※上記アドレスは、ホームページの認知度向上とインターネット検索時の SEO(Search Engine Optimization, 検索エンジン最適化)対策のため、現時点では予告無しに変更する可能性がある。</p>	
【論文・学会】	
<p>今後、多くの研究者に周知する目的で日本薬学会や日本ビタミン学会で発表を予定している。</p>	

経費

費目別内訳	消耗品費	旅費	備品費	その他	計
	917,896	65,020	0	16,131	999,047

主な備品の内訳(1品又は1組もしくは1式の価格が10万円以上のもの)

品名	仕様	数量	単価	金額	納期
					年 月
					年 月
					年 月

組織

分担・協力者	氏名	所属・職位	役割