

文部科学省

都市エリア産学官連携促進事業 十勝エリア

平成18年度共同研究成果報告書

財団法人 十勝圏振興機構

# DNAマイクロアレイ法を用いた食品機能性評価システムの構築

## I. 平成18年度の目標

本事業の他の共同研究課題では、ポテトペプチド、ソバ・マメ類スプラウト、長いもなどの農産物の、特定の食品機能性（食品成分の生理作用）を科学的に解明する研究が行われている。これによって北海道十勝地方の特産物のさらなる高付加価値化を図るとともに、未利用部分からの新規機能性食品素材の開発を目指している。

本研究WGは特定の機能だけではなく、多数の機能性について一度に網羅的に評価するために、DNAマイクロアレイ法を採用し、十勝産農畜産物を評価するシステムを構築・利用してきた。前年度までにこのシステムを用いて、スイートコーン、ポテトペプチドを与えた実験動物における遺伝子発現をDNAマイクロアレイで解析し、既知生理作用のメカニズム解明と新たな機能を探索できることを確認した。今年度は、この解析をさらに多くの農作物や副産物に適用する。具体的には、ソバスプラウト、長いもについてマイクロアレイ解析を行い、既知の生理作用のメカニズム解明と新機能の探索を行う。また、前年度の研究によって、癌遺伝子やストレス関連遺伝子の発現低下をひき起こすことが解ったスイートコーンについて、実際に腫瘍の抑制効果を確認する動物実験を行う。さらに、前年度の研究でワイン製造後の副産物であるブドウ圧搾粕（パミス）に多様な生理機能を持つ成分オレアノール酸が多量に含まれることが解ったので、パミスおよびオレアノール酸の機能をマイクロアレイで解析する。

DNAマイクロアレイを用いた解析は、一度に多くの遺伝子発現を知ることができ、効率的な方法ではあるが、1回当たりの実験のコストが高いため、多検体を使った解析は難しい。今年度、本研究WGでは培養細胞を用いて機能性素材をスクリーニングする方法を確立し、このスクリーニングで選ばれた素材をマイクロアレイ解析へと進めるシステムを構築する。また、食品開発従事者が研究で得られた成果を利用するためのデータベースのプロトタイプを作成する。

## II. 実験方法

### 腫瘍移植マウスにおけるスイートコーン投与試験

4週齢雌性ICR系(SPF)マウスを7日間予備飼育して実験に供した。マウスは予備飼育期間および実験期間を通して室温  $24 \pm 3$  °C、相対湿度  $55 \pm 15$  %のSPF動物飼育室(照明時間7時~19時、換気回数18回/時)で2~3匹/ケージにおいて飼育した。MF粉末飼料(オリエンタル酵母)と滅菌蒸留水をそれぞれ自由に与えた。スイートコーン(日本缶詰)を凍結乾燥させ、粉碎機によってパウダー状にしたものをMF粉末飼料と均一に混合し、最終添加量が0.04%、0.2%、1%および5%となるように調製した。これらの調製飼料は粉末給餌器(CL-0921、日本クレア)にて、腫瘍移植前1週間および、自由に与えた。なお、対照群にはMF粉末飼料のみを自由に与えた。Ehrlich腫瘍細胞株(微生物化学研究会附属創薬医科学研究所から分与)をICR系マウスで継代維持(腹水型)したものを使用した。腹水型で継代維持したマウスの腹水を採取した後、滅菌生理食塩液で希釈し $8 \times 10^6$ 細胞/ml濃度の腫瘍細胞浮遊液を作製した。この細胞浮遊液の0.25 mlをマウスの鼠径部皮下に移植した( $2 \times 10^6$ 細胞/マウス)。なお、腫瘍細胞移植日をday 0とし移植後2週間上記と同様の飼料を与えた。

### 高脂肪食投与マウスに対するワイン圧搾滓(パミス)およびオレアノール酸の影響

ブドウを、除梗・破碎し、7日間、アルコール発酵を行った後、圧搾した粕を天日乾燥させたものを実験材料として用いた。乾燥・粉末化したパミス試料からエタノール抽出物(POE)を得た。POEの82%が脂質成分で、そのうちOAが11%を占めていた。4週齢のSD系ラット(雄)に、AIN93Gを準拠とした普通食[NF]、高脂肪食[HF]、HFにOAを添加した[HF+OA]食、およびHFにPOEを添加した[HF+POE]食(表1)をペアフィーディング法により4週間摂食させた。ラット飼育期間終了後、エーテル麻酔後に開腹してから心臓穿刺により血液を採取し、血漿を分離して脂質分析を行った。

## マウスに対する長いも投与試験

4週齢雄性BALB/C系統マウスを7日間予備飼育して実験に供した。マウスは予備飼育期間および実験期間を通して室温23±2℃、相対湿度40±10%の動物飼育室（照明時間7時～19時）で飼育した。6匹/ケージで飼育し、飼料および水を自由に与えるようにした。3種類の加工を行った長いも（生、ボイル、ドラムドライ）を凍結乾燥させ、粉碎機によってパウダー状にしたものをAIN-93M配合飼料のアルファ化コーンスターチの半分または全部を長いもパウダーで置き換えカロリーベースで等しくなるように調製した。これらの調製飼料を4週間、自由に与えた。なお、対照群にはAIN-93M配合飼料のみを自由に与えた。

表1. パミスおよびオレアノール酸投与食餌組成(g/100g)

	NF	HF	HF+OA	HF+POE
Conr starch	34.8	-	-	-
Milk casein	23.6	23.6	23.6	23.6
-Corn starch	13.2	8.4	8.3	7.9
Sucrose	10.0	28.8	28.8	28.8
Soybean oil	7.0	7.0	7.0	7.0
Lard	-	20.8	20.8	20.8
Cellulose powder	6.4	6.4	6.4	6.4
Mineral mix(AIN-93G)	3.5	3.5	3.5	3.5
Vitamin (AIN-93M)	1.0	1.0	1.0	1.0
L-Cystein	0.3	0.3	0.3	0.3
Choline bitartrate	0.2	0.2	0.2	0.2
‡ Butylhydroquinone	0.001	0.001	0.001	0.001
OA	-	-	0.05	-
POE	-	-	-	0.45
Calorie (kcal/100g)	389	493	493	493

## ラットに対するソバスプラウト投与試験

スプラウトWGの項を参照。この動物の肝臓からTotal RNAを抽出し、アレイ実験に供した。

## 培養細胞を用いた機能性物質のスクリーニング

理研細胞バンクよりヒト単球由来ガン細胞(THP-1細胞)、ヒト大腸ガン細胞(CACO-2、COLO-320、LoVo、CoLo-TC)を購入し、単球由来ガン細胞は10%牛胎児血清を含むRPMI1640培養液、また大腸ガン細胞については10%牛胎児血清を含むDMEM培養液を使用し、5%CO<sub>2</sub>、37℃の条件で培養した。1×10<sup>6</sup>個の細胞に対して、炎症惹起物質LPS (Sigma)は100 ng/mlの濃度で、また各種農産物抽出物は1 mg/mlの最終濃度になるように培養液中に添加した。添加処理後16時間で培養上清を集めELISA用のサンプルとし、また細胞はPBSで洗浄後、1000 xg、5分の遠心により集め、RNAiso (TaKaRa)を用いてtotal RNAを抽出した。

炎症性サイトカインについての発現レベルを調べるため、ヒト遺伝子データベースにある遺伝子配列をそれぞれIL-1a、IL-6、IL-8、TNFαについて調べ、さらにコントロール遺伝子としてGAPDHの配列をもとにそれぞれを特異的に増幅するプライマーセットを作成し、これらを用いてTaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0 (TaKaRa)によりRT-PCRを行った。培養液中に放出されたIL-8量の測定はHuman IL-8 Quantikine Immunoassay kit (R&D Systems)を用いたELISA法により測定した。

## DNAマイクロアレイ解析

各器官及び細胞から抽出したtotal RNAをもとに、逆転写酵素を用いてcDNAを合成し、さらに試験管内転写を行うことによりcRNAを合成した。この際、ビオチン標識されたUTPを取り込ませることによりcRNAにビオチンラベルした。ビオチンラベルcRNAをCodelink マイクロアレイ (Amersham Biosciences) に対して一晩ハイブリダイズさせた。アレイを洗浄後、Cy5-ストレプトアビジンで染色を行い、さらに洗浄した後、ArrayWorx (Applied Precision)でスキャンし、蛍光強度を数値化した。

マイクロアレイデータ解析用ソフトウェア GeneSpring (Silicon Genetics)を用いてデータの標準化および統計解析を行い、さらにパスウェー解析、発現パターンのカテゴリー分けを行った。以上の解析から、変動する代謝経路やシグナル伝達系を予測した。

## Ⅲ. 結果および考察

### 1. スイートコーンの抗腫瘍効果

Ehrlich結節腫瘍を移植したマウスを用いて、スイートコーンの投与による体重および摂食量の影響を調べた。試験飼育期間を通じて、対照群、スイートコーン0.2%投与群、スイートコーン5%投与群間において体重に有意差は見られなかったが、摂食量においては対照群、スイートコーン5%投与群に摂食量の減少傾向がみられたが、スイートコーン0.2%投与群では増加傾向にあった。腫瘍移植後14日目まで腫瘍容積を測定した結果、対照群、スイートコーン投与群間で有意な差はみられ

なかった。一方、14日目の腫瘍重量を測定したところ、対照群とスイートコーン0.2%投与群との間に有意な差( $p < 0.05$ )が確認された(図1A、B)。対照群では腫瘍重量が2.50 gであるのに対し、スイートコーン0.2%投与群では1.58 gであり、腫瘍重量は対照群の約63%に減少していた。しかし、対照群とスイートコーン5%投与群間においては腫瘍重量に有意な差は確認できなかった。

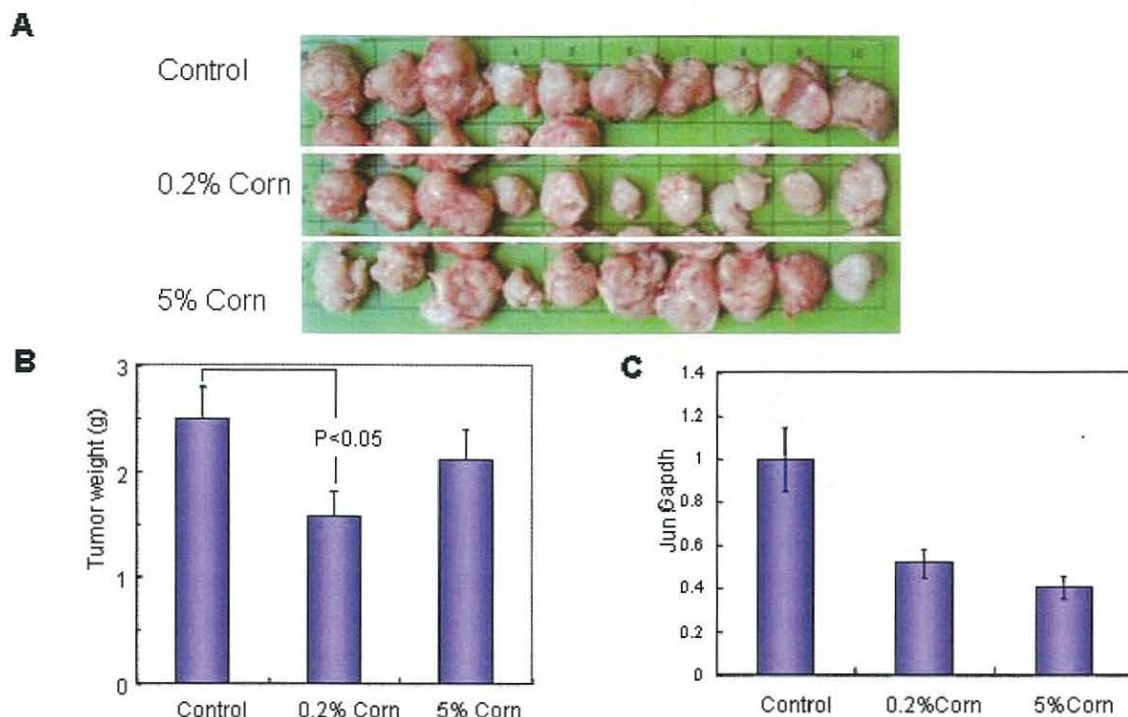


図1 スイートコーンの抗腫瘍効果

A 摘出された腫瘍の写真

B 腫瘍重量

C がん遺伝子 Jun の発現 (RT-PCR)

腫瘍移植マウスの肝臓におけるスイートコーン投与による影響を遺伝子発現の面から明らかにするために、DNAマイクロアレイ解析を行った。対照群と腫瘍増殖抑制効果の見られたスイートコーン0.2%投与群間の比較では、遺伝子発現の変動が大きかったため2倍以上変動する遺伝子を対象に解析した。スイートコーン0.2%投与により2倍以上変動した遺伝子は1125遺伝子あり、そのうち869遺伝子は下方制御され、279遺伝子は上方制御された。細胞増殖シグナルである、Signal transducer and activator of transcription 2 (Stat2)、Signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3)といった Janus kinase-signal transducer and activator of transcription (JAK-STAT)シグナル伝達経路に関わる遺伝子群(12遺伝子)や Transforming growth factor, beta 1 (Tgfb1)、Mitogen activated protein kinase kinase 1 (Map2k1)などのMAPKシグナル伝達経路(10遺伝子)に関わる遺伝子群の発現量に減少がみられた。細胞増殖シグナルの遺伝子発現レベルの低下に関連して、Polymerase, delta2, regulatory subunit (Pold2)、Polymerase, delta4 (Pold4)といったDNA合成に関連した遺伝子群(3遺伝子)や、細胞内小器官の構成に関わる遺伝子も影響を受けており、ミトコンドリア、小胞体、ゴルジ体の構成に関わる遺伝子群(21遺伝子)は減少したものが多かった。また、代謝に関わる遺伝子に変動が多く見られ、Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 7 (Eif3s7)、Eukaryotic translation initiation factor 2B, subunit 4 delta (Eif2b4)などタンパク質の合成に関わる遺伝子群(9遺伝子)やGalactose-4-epimerase UDP (Gale)、Succinate dehydrogenase complex, subunit C (Sdhc)など炭水化物代謝に関わる遺伝子群(10遺伝子)、Crat、ATP citrate lyase (Acl)など脂質代謝に関わる遺伝子群(12遺伝子)と代謝全般にわたって、発現量は減少していた。一方、対照群とスイートコーン5%投与群間の比較で、スイートコーン5%投与により1.5倍以上変動した遺伝子は1101遺伝子あり、そのうち822遺伝子は下方制御され、279遺伝子は上方制御された。ストレス応答に関連した遺伝子発現において、Siah2、

Ubiquitin-conjugating enzyme E2S (Ube2s) などユビキチンサイクルに関連した遺伝子(10遺伝子)、Hsp70、Dnajb4といった分子シャペロンに関連した遺伝子群(9遺伝子)、小胞体ストレスマーカーに関連したDdit3、Eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 3 (Eif2ak3)、Partial homocysteine-inducible、ER-stress-inducible、ubiquitin-like domain member 1 (Herpud1)の遺伝子発現量は減少していた。また、Suppressor of cytokine signalling-1 (Socs1)、Thymoma viral proto-oncogene 3 (Akt3)などインスリンシグナルに関連した遺伝子群(9遺伝子)や、Jun oncogene (Jun; 図1C)、Dusp6などJNK経路に関連した遺伝子群(11遺伝子)の発現量は増加および減少していた。古典的なMAPK経路に関連した、Neuroblastoma ras oncogene (Nras)、Protein phosphatase 3、catalytic subunit、gamma isoform (Ppp3c)、Fibroblast growth factor 11 (Fgf11)の遺伝子発現量は増加していた。

スイートコーン0.2%投与群において有意な腫瘍増殖抑制効果が確認できた。しかし、スイートコーン5%投与群では腫瘍増殖抑制効果はみられず、スイートコーン濃度に依存的な腫瘍増殖抑制効果でないことが示された。スイートコーンに含まれるフィトグリコーゲン (Sasaki et al., 2003)やカロテノイド類の一種であるルテイン(Park et al., 1998)においても特定の濃度で腫瘍増殖抑制効果が示されている。フィトグリコーゲンやルテイン以外にもスイートコーンは抗腫瘍効果を示す成分を含んでおり、これらの成分がスイートコーンという複合体においても働きを示す可能性が考えられる。

腫瘍増殖抑制効果のみられたスイートコーン0.2%投与群の肝臓では、Stat2、Stat3といったJAK-STATシグナル伝達経路やTgfb1、Map2k1といったMAPKシグナル伝達経路に関わる遺伝子の発現レベルが低下していた。これらのシグナル伝達は細胞増殖を誘導することがわかっている。細胞の増殖が抑制されていることを裏付けるものとして、細胞内に存在する小器官のミトコンドリア、小胞体、ゴルジ体を構成する遺伝子の発現量が減少していた。腫瘍を移植した個体では、腫瘍増殖が進行するにつれて肝臓の肥大やタンパク質量が増加することや(Pain et al., 1984)、肝臓を部分切除した後の肝再生率が高くなることが明らかになっている(Altun and Ozalpan, 2004)。スイートコーン0.2%投与群では、細胞増殖関連の遺伝子発現レベルの低下と共に、タンパク質合成に関連した遺伝子の発現量が減少していた。これらのことから、スイートコーン0.2%投与群では細胞増殖抑制効果とタンパク質合成低下の相乗効果による腫瘍の抑制が考えられる。その他の影響として、炭水化物代謝や脂質代謝に関連した遺伝子の発現量が減少していた。腫瘍を移植したマウスではDNA合成量が増加することがわかっており(Morgan and Cameron, 1973)、アルカリホスファターゼやチロシンアミノトランスフェラーゼの酵素量が大幅に増加することが示されている(Kojima and Sakurada, 1976)。スイートコーン0.2%投与群においても、DNA合成に関連する遺伝子のうち3遺伝子に発現レベルの低下がみられた。また、アルカリホスファターゼ遺伝子の発現量が0.2倍に減少、チロシンアミノトランスフェラーゼ遺伝子の発現量が0.41倍に減少していた。これらのことから、スイートコーン0.2%投与群では、腫瘍増殖のみならず肝臓の細胞増殖や各種代謝が抑制されたと考えられる。古典的MAPK経路に関連する遺伝子発現レベルは上昇傾向にあった。また、インスリンの添加により、ヒトメラノーマ細胞の増殖率が高まることがわかっている(Furlanetto et al., 1993)。このことから、スイートコーン5%投与群ではJNK経路の抑制効果が大きいいためインスリンの働きが改善され、JNK経路以外の細胞増殖シグナルの影響が強まったのではないかと考えられる。スイートコーンに含まれるフェルラ酸では、p38 MAPK経路を抑制し、Aktを活性化することが報告されており(Jin et al., 2005)、スイートコーンにおいてもこのフェルラ酸の効果が発揮された可能性が考えられる。今後インスリンの作用を含めた腫瘍抑制効果を明らかにするためには、スイートコーン投与時の腫瘍におけるJNKやインスリン受容体のキナーゼ活性等をタンパク質レベルで確かめる必要があると考えられる。

## 2. マイクロアレイ解析によるソバスプラウトの機能の探索

### 1) ソバスプラウトを投与したラットで発現変動する遺伝子群

ソバスプラウトを投与したラット肝臓で1.5倍以上発現が変動する遺伝子群を調べた結果、ソバ品種によって変動遺伝子数に大きな違いがあることがわかった。キタワセソバ(普通ソバ)では発現

量が増加した遺伝子が45、減少した遺伝子が16であった。これに対しダッタンソバの北系1号では増加したのが135遺伝子で、減少したのが3遺伝子であった。一方、同じダッタンソバでも、北系9号では発現量が増加した遺伝子が16で減少したものが978と圧倒的に多くなっていた。同じダッタンソバでもルチンなどのポリフェノール含量や種類、およびその他の成分に差があり、遺伝子発現にもその差が反映したのかもしれない。すべてのソバスプラウトに共通して発現が増加したのがFlavin containing monooxygenase 5 (FM05)である。この遺伝子がコードしているのはNADPH依存的酸化反応を触媒するフラボエンザイムで、異物代謝酵素として働くことが知られている。ソバスプラウト投与で薬物代謝系の一部が活性化することが予想された。また、ダッタンソバスプラウトだけで発現が上昇する遺伝子には、スプラウトWGで昨年度報告されたCYP7a1とそれ以外にCYP4a14があった。CYP7a1はコレステロールを胆汁酸に変換する代謝経路の初発反応の酵素で、これが亢進していることはダッタンソバを投与すると、コレステロールの代謝が進み、胆汁酸に代謝され排出されていると考えられる。また、CYP4a14は、脂肪酸のオメガ酸化に関わる酵素である。主要な経路ではないが

脂肪酸の分解に関わる経路を活性化している可能性が示唆された。北系1号だけで発現が上昇するものの中では、異物代謝系の遺伝子群が多く含まれていた(図2)。解毒系第1相の中心的な役割を果たすCYP2e1およびエポキシド加水分解酵素(Ephx1)、アルコール脱水素酵素ADH1などの発現が上昇していた。また、第2相のグルタチオン抱合に関わるGSTa1およびグルタチオン合成の初発段階の律速酵素であるグルタミン酸システイン連結酵素(Gclc, Gclm)の発現も上昇していた。このことから、ダッタンソバ北系1号のスプラウトは他のスプラウトよりもよりデトックス機能を高める効果がある可能性が示された。一方、北系9号のスプラウトを投与した場合に、リボソームタンパク質をコードする遺伝子11種類の発現が低下していた。さらに、翻訳開始に関わるE1aの発現も低下しており、リボソーム機能およびタンパク質合成が低下していることが予想される。また、北系9号投与では、ATP合成酵素6種類の低下も見られ、エネルギー生産も低下していることが予想された。

## ii) アセトアミノフェンによる肝障害に対するソバスプラウトの効果

動物に対するアセトアミノフェン(AAP)投与は肝障害のモデルとして用いられる。AAPを大量投与するとグルタチオンがAAPとの反応に消費されて枯渇し、肝毒性を発症する。AAP投与がラットに及ぼす影響をマイクロアレイで調べたところ、2倍以上発現が上昇する遺伝子の中には、CYP450(Cyp4a14, Por)、グルタチオンの合成・代謝に関わる遺伝子群(Gclm, Gclc, Gsr, GstYb4, Gstm1, Gstp2)、グルクロン酸抱合に関わる遺伝子群(Udpgr2, Ugt1a6)などがみられ、異物代謝系第1相、第2相ともに活性化していることが予想された。一方、0.5倍以下に発現が低下する遺伝子の中には、解糖系や脂質代謝に関わる遺伝子群が存在しており、AAPにより肝臓機能が低下していることを反

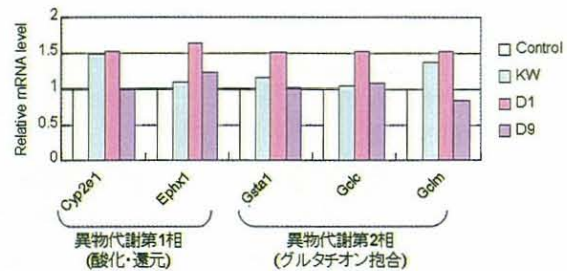


図2. ソバスプラウトによる異物代謝系遺伝子の発現誘導

異物代謝系遺伝子の発現をマイクロアレイによって解析した結果。

KW:キタワセソバ(普通ソバ)、D1:北系1号(ダッタンソバ)、D9:北系9号(ダッタンソバ)

表2. アセトアミノフェンで発現変動する遺伝子のソバスプラウト投与による回復  
マイクロアレイ解析によると、AAP投与により2倍以上変動する遺伝子の数は222。各数値は、そのうち正常値(-AAP)との差が50%以内に入ってきた遺伝子数。

Normalized by buckwheat administration

(2 fold change => in 50% difference)

AAP+BW	Kitawase	D1	D9
Up→Normal	32	24	16
		(Aldoa, Atp5b, Srm, etc.)	
Down→Normal	54	68	41
		(Cyp7a1, GSTm3, GPT, etc.)	
Total	86	92	57

映していると思われた。発現が変動する遺伝子数は、増加・減少合わせて222であった。

AAPと同時にスプラウトを投与したときに、222遺伝子のうちのいくつかはAAP非投与時(正常時)の発現量と比較して50%以内の差に収まるようになるかを調べた(表2)。その結果、キタワセソバでは86、北系1号では92遺伝子が正常時と比較して50%以内のレベルに回復した。北系9号では57遺伝子と少なかったが、前述の2品種同様遺伝子発現パターンが正常レベルに近づいた。発現が正常化した遺伝子の中には、解糖系に関わるアルドラーゼや、コレステロール代謝に重要なCYP7a1などが含まれていた。また、炎症性サイトカインのTNF $\alpha$ の発現はAAPによって上昇したが、スプラウト投与で減少した。昨年度、スプラウトWGでは肝障害の指標となるGPTおよびGOTの値がスプラウト投与で正常値に近くなることを報告しているが、今回の結果より肝臓の機能に関わる遺伝子の発現も正常化していることが明らかとなった。そして、その正常化の度合いは、遺伝子の数から判断するとキタワセソバや北系1号でその効果が高いことを示していると考えられる。

### 3. マイクロアレイ解析による長いもの機能の探索

長いも(生長いも、ボイル、ドラムドライ)を飼料に添加し、マウスに4週間投与した結果、摂食量、体重、肝臓重量、副睾丸脂質等に有意差は見られなかった。肝臓を摘出しTotal RNAを抽出してマイクロアレイ解析を行った。その結果、生の長いも投与のマウスにおいて、免疫関連遺伝子の発現誘導が見られた(図3)。抗原のプロセッシングに関わるプロテアソーム(Psm2)や抗原提示に関わるクラスII MHC分子をコードする遺伝子(H2-Aa, H2-Ea, H2-Eb1, H2-Q1)が、生の長いもを投与されたマウスでは、通常の飼料を投与したものと比較して1.5倍以上に発現が上昇していた。また、これらの転写を制御するRegulatory factor X-associated protein (Rfxap)の発現も上昇しており、これによってマクロファージやB細胞による抗原プロセッシング、抗原提示が活性化していることが考えられる。また、白血球の走化性に関わるケモカイン類(CC CXC両ファミリー)の発現誘導が見られ、生態防御に必要な白血球の組織浸潤が促進される可能性が考えられる。最近、青森県と弘前大学の共同研究で、長いもにはインフルエンザ予防効果があると報告されていることから、今後はこの免疫活性化の機能を確かめていく必要がある。また、免疫を賦活する作用の裏では、アレルギーを引き起こ

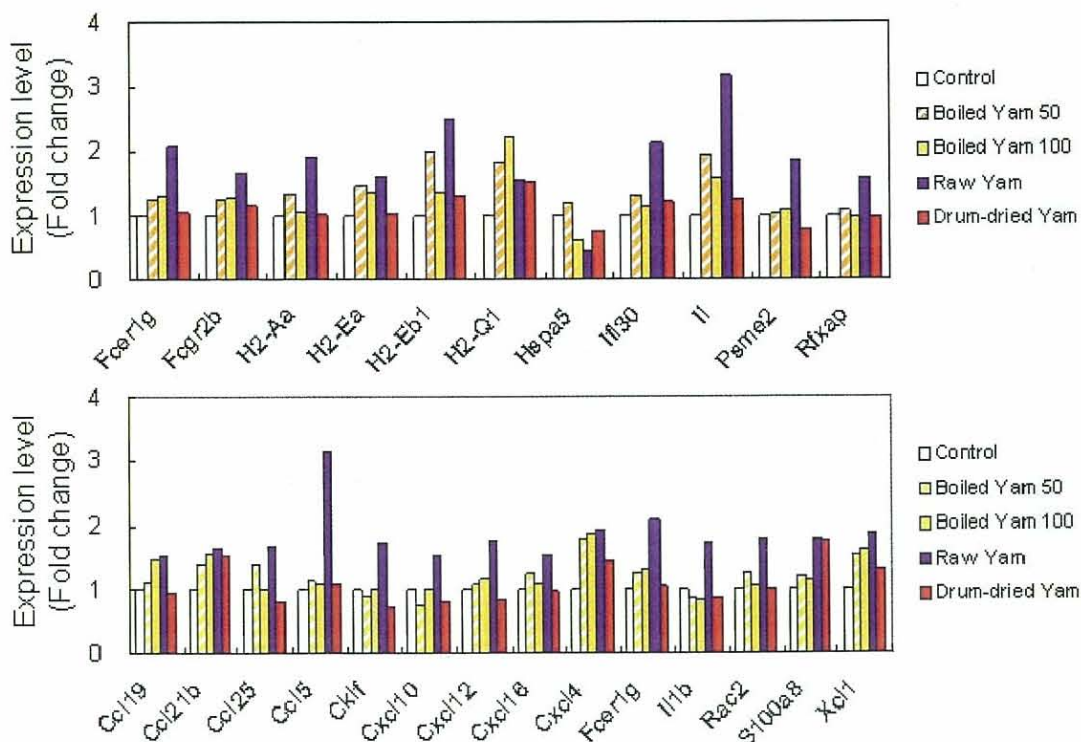


図3. 長いもを投与したマウス肝臓の遺伝子発現

マイクロアレイで長いもを投与したときの変動遺伝子を調べた結果。上段は抗原プロセッシングと抗原提示関連、下段はサイトカインおよびケモカイン遺伝子。

す可能性もあることも今後留意していく必要がある。アレルギー反応を起こしやすい人は遺伝子発現のパターンから見ると、熱をかけた長いもをとったほうが好ましいと推測される。加熱加工した長いもの機能性については、現在のところ探索中である。

#### 4. ワイン圧搾滓（パミス）の食品機能性

##### i) パミス中のオレオノール酸含量

赤ワイン圧搾滓であるパミスは機能性食品素材として有効利用する技術開発を目指している。昨年度の研究結果から、十勝池田町産ブドウのパミス中に、様々な健康機能が報告されているオレオノール酸 (OA) が著量 (乾燥パミス 1g 当り 12mg) 存在していることを見出した。本年度は、パミス中の OA 量の産地・品種間の異同を調査した (表3)。乾燥パミスからのエタノール抽出物の収率は、赤5品種では7%から11%、白3品種では21%から37%であり、白品種で高値であった。これは、発酵前に圧搾する白品種では、パミス中に多くの糖質が残存するためであると考えられた。しかし、乾燥パミス中の OA 量は、赤品種では0.4%から1.4%、白品種では0.3%から1.1%と品種間の量的違いはあるものの、赤および白品種間での差は見られなかった。また、パミスから果皮のみを分離して分析したところ、パミス中の OA 含量の違いは、パミスの果皮の構成割合 (OA はブドウ果皮に含まれる成分) と果皮中の含量によって特徴付けられることが分かった。パミス中の OA 量が最も高い清見種では、果皮の構成割合が65%と高く、また果皮中の含量も1.9%と高値であった。また、データには示していないが、山梨県産および秋田県産の生食用ブドウの果皮中の OA 量は、清舞種と同程度であることも確認した。さらに、食品からの OA の数少ない供給源であるレーズンを分析した結果、OA 量は新鮮重量当り 0.05% 程度であった。以上の結果から、パミス中には OA が品種や産地に関わらず存在しているが、白品種には糖質が多く残存していることから乾燥処理などのハンドリング性が困難であることや腐りやすいことも予想され、赤品種のパミスが食品素材として有望であると判断される。

表3 パミスおよびPOE中のオレオノール酸含量 (重量%)

品種	(POE 収率)	POE	パミス	乾燥 (果皮 果皮 構成)
山ブドウ	(10)	4	0.4	1.7 (30)
山幸	(7)	8	0.6	1.8 (44)
清舞	(9)	5	0.5	1.7 (36)
清見	(8)	18	1.4	1.9 (65)
ツバイゲルトレーズ	(11)	7	0.7	1.1 (65)
ケルナー	(37)	2	0.6	0.7 (47)
バックス	(25)	1	0.3	0.2 (63)
モリオ	(21)	6	1.1	1.2 (50)
マスカット				

POE, Pomace Oil Extract; OA, Oleoic Acid

##### ii) パミス抽出物およびオレオノール酸の抗高脂血症効果

OA は、抗ガン作用、抗菌活性あるいは抗炎症作用などの多彩な機能性を有することが知られている。本年度は、パミス抽出物およびそれに含まれるオレオノール酸の抗高脂血症効果を動物実験で検証し、その作用機序を DNA マイクロアレイで解析した。乾燥・粉末化したパミス試料からエタノール抽出物 (POE) を得た。POE の 82% が脂質成分で、そのうち OA が 11% を占めていた。4週齢の SD 系ラット (雄) に、AIN93G を準拠とした普通食 [NF]、高脂肪食 [HF]、HF に OA を添加した [HF+OA] 食、および HF に POE を添加した [HF+POE] 食をペアフィーディング法により 4週間摂食させた。OA 群および POE 群では、HF 群と比べて飼育期間中体重の減少が観察されたが、OA 群のみが統計的に有意であった。血漿を分離して脂質分析を行った結果、OA および POE 群では血漿中のトリグリセリドとリン脂質量が有意に減少していた (図4)。一方、コレステロール含量には顕著な効果は認められなかった。このことから、OA および OA 含有 POE の抗高脂 (トリグリセリド) 血症効果が実証された。

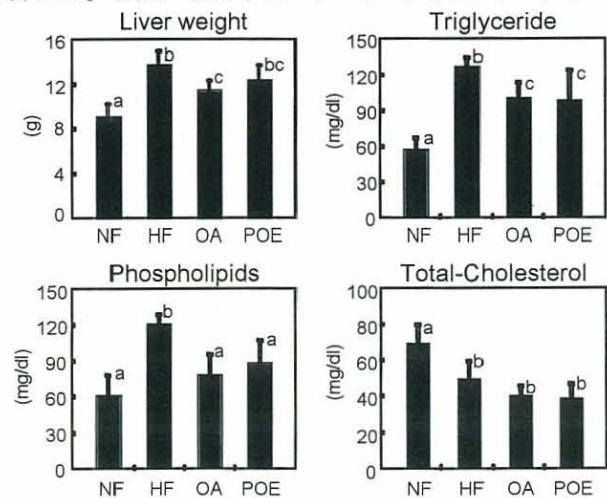


図4 肝臓重量と血漿中の脂質含量



次に、HF群を対照としてOAおよびPOE群の遺伝子発現量（肝臓由来）の変動をDNAマイクロアレイによって比較した。スキャンされた全スポットからフラグスポットと機能未知の遺伝子を除外し、4889の遺伝子を抽出した。コントロールHF群に対する遺伝子発現変動の強度毎に分類した遺伝子数の分布を図5に示す。OAおよびPOE群に共通してほとんど変化しなかった（1.2倍未満）遺伝子は1942個で全体の40%であった。また、両群で共通した発現強度を示した遺伝子は2849個で全体の58%を占めた。このことから、本実験におけるPOE投与による遺伝子の発現変動は、その多くがPOEに含まれるOAに起因する可能性が示唆された。一方、POEのみで遺伝子の発現変動（1.2倍以上）が認められた遺伝子数は1024で、OAのみの569を大きく上回り、POEに含まれるOA以外の成分の関与によるものと推測される。さらに、1.5倍以上発現変動した遺伝子を機能カテゴリー（KEGG PATHWAY）毎に分類すると、Insulin signaling、AdipocytokineおよびDiabetesに関連した遺伝子の発現変動が多いことが分かった（表4）。さらに、これらのパスウェイではPOE群において変動した遺伝子はOA群よりも2倍程度多く存在していた。また、脂質代謝関連ではないが、POE群ではガン関連の遺伝子発現変動がとくに多く認められ、OA以外のポリフェノール成分などの関与が示唆される。

次に、遺伝子発現解析からOAおよびPOE投与によるラットの抗高脂血症メカニズムを推定した（図6）。脂肪酸合成系遺伝子では、脂肪酸合成の律速酵素であるAccやFasなどの発現が低下しており、とくにPOEで顕著であった。さらに、解糖系からグリセロール-3-リン酸を合成するGpdh、グリセロール-3-リン酸からグリセロ脂質を合成するGpaなどのトリグリセリド合成系遺伝子の発現が低下していた。これらの現象は、肝臓において脂質合成系酵素遺伝子の転写を制御しているSREBP-1の発現低下を介していると考えられる。また、SREBP-1はLXRの標的遺伝子であることから、LXRアイソザイムの発現変動も何らかの関与をしているものと思われる。SREBP-1は小胞体膜上でSCAPとINSIGと結合しているが、活性化のためにINSIGが遊離してSREBP-SCAP複合体がゴルジ体へと移動すると、そこでS1PとS2Pとに分割され、核へと移動して転写因子として作用する。この機構は一般にはコレステロールセンシング機構とされているが、INSIGおよびS1Pの発現低下が観察されており、脂質合成系においても同様のSREBP-1転写調節機構があるものと推測される。以上の結果から、脂質合成系遺伝子およびその転写制御因子の発現抑制により、血中の脂質含量が低下したものと結論付けられた。

一方、肥満状態では一般にインスリン抵抗性が惹起されるが、試験群では糖新生系や炎症性サイトカイン関連の遺伝子発現が低下していること、またIrs-2やレプチンの発現が上昇していること、

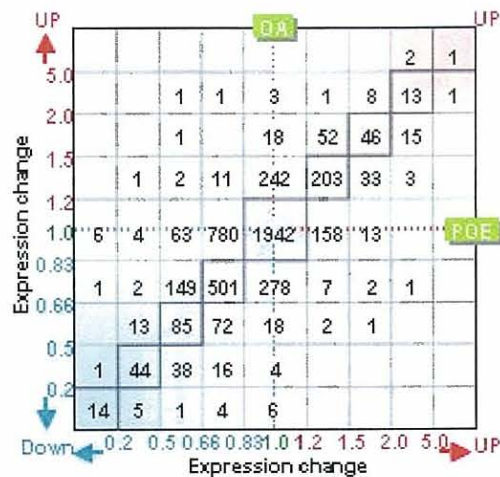


図5. 発現変動強度により分類されたOAおよびPOE群間の遺伝子の分布  
数値は高脂肪食を比較対象にした相対発現量。

表4 1.5倍以上発現変動した機能カテゴリー別の遺伝子数

PATH CODE	Functions	OA		POE	
		UP	Down	UP	Down
rno04910	Insulin signaling pathway	10	18	10	23
rno04920	Adipocytokine signaling pathway	6	15	6	18
rno03320	PPAR signaling pathway	3	7	3	9
rno04940	Type I diabetes mellitus	8	15	8	15
rno04930	Type II diabetes mellitus	10	6	11	7
rno00010	Glycolysis / Gluconeogenesis	5	8	5	6
rno00620	Pyruvate metabolism	4	2	3	3
rno00020	Citrate cycle (TCA cycle)	2	0	2	1
rno00071	Fatty acid metabolism	3	2	4	3
rno00561	Glycerolipid metabolism	4	5	5	7
rno00564	Glycerophospholipid metabolism	4	6	6	3
rno00100	Biosynthesis of steroids	1	1	1	3
rno00120	Bile acid biosynthesis	2	1	3	4
rno02010	ABC transporters - General	4	8	3	7
rno00480	Glutathione metabolism	1	1	2	0
rno00980	Metabolism of xenobiotics by CYP3	2	2	2	1
rno04110	Cell cycle	5	8	7	11
rno05212	Pancreatic cancer	5	16	4	19
rno05210	Colorectal cancer	7	13	7	18
rno05216	Thyroid cancer	4	5	4	4
Total		91	139	96	162

KEGG PATHWAY

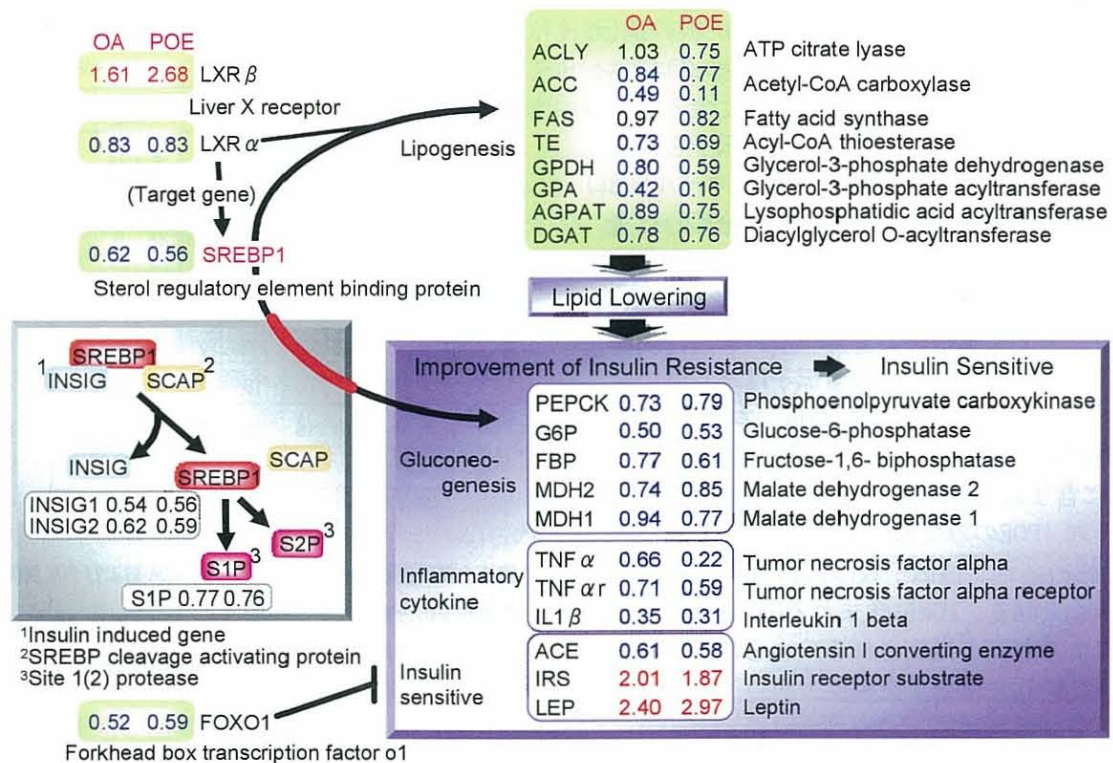


図6 DNAマイクロアレイ解析から推定された抗高脂血症効果のメカニズム

さらにはフォークヘッド転写因子FOXO1の発現が低下していることなどから、OAおよびPOE投与はインシュリン感受性を亢進する可能性が示唆された。また、インスリンはAccやHMG-CoA還元酵素を活性化させ、脂肪酸やコレステロール合成を高める作用もあることから、遺伝子の発現解析だけでは検証できない酵素活性レベルでの高脂血症抑制機構があるかもしれない。今後、OAが上述の転写因子にどのような機構で作用するのか、また経口摂取した際の体内動態などについて、さらなるアレイ解析や培養細胞系を用いた検討など行う必要がある。

## 5. 培養細胞を用いた機能性物質のスクリーニング系の確立と抗炎症性物質の探索

4種類の大腸ガン細胞について炎症性サイトカインの発現を調べたところ、LoVo ではIL-1・とIL-8の発現が見られ、CACO-2とCoLo-TCでIL-8の発現が認められたが、IL-6とTNF・はいずれの細胞でも確認されなかった。LPSに対する応答性はCACO-2とCoLo-TCで顕著であり、特にCoLo-TCにおいて強い発現誘導が認められた。

そこで次に、CoLo-TCとTHP-1についてLPSによる炎症誘導に対する各種農産物抽出物の影響を比較した。農産物抽出物としては小豆、ビートの煮汁、ポテトペプチド、長いも、ソバsprautの抽出物について検討した。その結果、IL-8遺伝子発現の顕著な抑制はソバspraut抽出物においてのみ確認され、他の農産物抽出物では認められなかった。また、ソバsprautの影響は、ELISAによるIL-8放出量についても同様の結果が得られ、CoLo-TCでのみ顕著な放出抑制が認められた。また、DNAマイクロアレイにおいてもLPS添加によりIL-8の遺伝子発現が選択的に上昇し、その上昇をソバspraut抽出物が抑制することが確認された。

さらに、このLPS刺激誘導したCoLo-TCを用いて、ソバspraut抽出物中の活性成分を検索した。ソバsprautは抗酸化活性を持つ各種フラボノイドを含有することからこれらフラボノイド精製品を購入し、IL-8発現抑制効果と抗酸化活性とを比較検討した(図8)。その結果、ルチンとビテキシンで弱いIL-8発現抑制効果が認められたが、ソバsprautに含まれるこれらフラボノイドの含量から考えるとこれでは説明がつかない。また、抗酸化活性の強い他のフラボノイドにはIL-8発現抑制効果が全く認められなかったことから、抗酸化とは異なる機構により抗炎症効果が表れていると考えられる。

以上の結果から、LPS 刺激誘導したCoLo-TCを用いたスクリーニング系は、すでに論文等で紹介されているLPS刺激誘導したTHP-1を用いた系では見落としてしまうような機能性物質を検索する上で有用なものであり、新しいスクリーニング系でもあることから特許性のあるものと考えている。また、十勝農産物のスクリーニングでもソバスプラウトに抗炎症性効果が期待できる物質が含まれる可能性が得られたことは大きな意義があると考えている。現時点ではその物質的同定には至っていないが、このスクリーニング系を用いることで今後明らかにできると確信している。また、この物質が抗酸化とは異なるメカニズムにより炎症を抑えることが期待されることから物質が同定されればこの点についても特許性があると考えている。

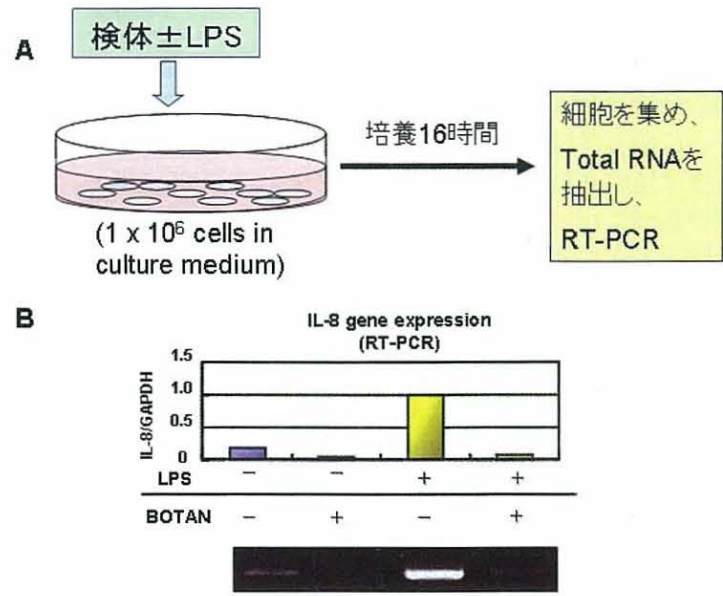


図7. 培養細胞を用いた機能性物質のスクリーニング系  
 A スクリーニングの概略。さまざまな細胞を試した結果CoLoTC細胞を選択。  
 B ソバ(品種ボタン)の抽出物のIL-8発現の抑制作用

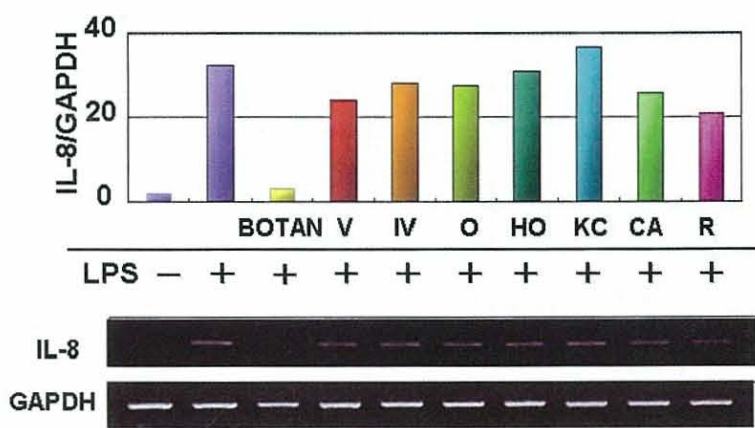


図8. 各種フラボノイドのIL-8発現に対する影響  
 V=ピテキシン、IV=イソピテキシン、O=オリエンチン、HO=ホモオリエンチン、KC=ケラシアニン、CA=クロロゲン酸、R=ルチン

## 平成18年度の研究実績

今年度の目標達成率 75% (自己評価)

全体の研究進捗に関しては、部分的に遅れが見られるが概ね計画通りと考えている。スイートコーンに関しては、腫瘍抑制効果の実証とそれを説明するアレイデータが得られたことから、目標は達成されたと考えている。また、パミスに関しても、抗高脂血症効果およびアレイデータに基づく作用メカニズムの予測が完了し、日本製粉がこれを製品化する方向で動いていることは、大きな成果である。これらについては、学会発表をすでに済ませており、現在論文発表を準備しているので、目的を達成できたと考えている。ソバsprアウトのアレイ解析については、解毒系の亢進と、AAPによって引き起こされる肝障害からの保護作用が遺伝子レベルで明らかになった。今後は毒物代謝の亢進を実証する実験を行い、学会および論文での成果発表を行わなければならない。長いもに関しては、まだアレイデータが出たばかりで、詳細な解析が年度内にできていないが、生の長いもに免疫賦活作用を持つ可能性が示された。これについては、予想される生理機能を確認する実験について来年度に更に行う必要がある。培養細胞を用いた機能性スクリーニング系に関しては、当初の目標はほぼ達成され、ソバsprアウト抽出物についても、今後に繋がるポジティブなデータが得られたことから高く評価して良いと考える。しかし、問題点としては業績が出ていないということであり、特許出願と論文、学会発表等まとめる作業を進める必要があると考えている。データベース構築については、実験データ整理の遅れによって本年度実施することができなかつたので、来年度可及的に行う。

全体にわたって、学会発表は行われているが、論文による成果発表が遅れている。マイクロアレイの結果だけで論文や特許としてまとめられないのが主な原因と考えられる。他のWGと共同して研究を推進し、論文発表を行っていかなければならないと考えている。

### 論文

Liyanage R, Han KM, Watanabe S, Shimada K, Sekikawa M, Ohba K, Tokuji Y, Ohnishi M, Fukushima M. Potato peptide raise HDL cholesterol level and modulate lipid metabolism in rats. British Journal of Nutrition, submitted.

### 学会発表

発表テーマ： Ehrlich結節腫瘍に対するスイートコーンの増殖抑制効果

学会名等： 平成18年度 日本農芸化学会 北海道・東北支部会

開催地： 札幌市

発表： 平成18年11月11日

発表者名： 得字圭彦 (帯畜大)

発表テーマ： 高脂肪食投与ラットにおけるワイン圧搾滓抽出物の抗高脂血症効果

学会名等： 平成18年度 日本農芸化学会 北海道・東北支部会

開催地： 札幌市

発表： 平成18年11月11日

発表者名： 佐々木岳 (帯畜大)

特許出願 なし

### その他

今年度までアレイ実験に用いていたGEヘルスケア社のCodelink Bioarrayが、2007年3月をもって販売終了となったため、今後別システムを使った解析を考えなくてはならなくなった。

#### IV. 平成19年度の計画

##### DNAマイクロアレイを用いた十勝産農畜産物の機能性の評価

これまでのアレイ解析で見出してきた可能性のある素材の機能に関しては表現型として実証する動物実験を行う。表現形として機能がわかっているものに関しては、アレイ解析を行いその作用メカニズムを明らかにする。スイートコーンに関してはストレスに関する表現形を確認する試験を行う。長いもに関しては、長いもWGの研究で大腸がん抑制効果が確認されたので、これについてマイクロアレイ解析を行う。

##### 遺伝子発現情報・機能性の統合データベース化

今までアレイ解析を行ってきた膨大なデータを整理し、機能性情報と統合して、食品開発従事者が利用しやすい形態のデータベースを構築する。

##### 食品機能性評価用DNAチップの試作と利用

今までの本WGの研究や、他のグループによる機能性研究のデータをもとに、食品の機能性と密接に関連する遺伝子を選び出し、これをスポットした低価格なフォーカスDNAチップを試作し、試験的に利用する。

##### 機能性食品素材の開発

オレオノール酸を多く含むワイン搾りかす「パミス」に、血中の中性脂肪を下げる効果が見出されたので、これを含有するサプリメントを試作し、その効果を確かめる。