

第4章 食品分野への応用

第1節 農作物の健康機能性評価

1. はじめに

近年、国内産の農作物の健康機能性を探索・評価し、付加価値を高める動きが進んでいる。これは、輸入農作物との差別化のための一つの方向性として有効と思われる。食品の機能性を評価するうえでは科学的根拠に基づく評価法が必要である。最近、DNAチップを用いた食品の機能評価法は、ハイスループットかつどのような機能に関しても適用可能な手法として注目されるようになってきた¹⁾。DNAチップを使った食品機能評価は、初期には特定の栄養成分についての評価・研究が主であったが、最近になってより複雑な食品をまるごと評価する研究が現れてきた。本稿では、DNAチップで複数の成分が混合した食品や農作物の評価を行う際の流れ(図

1)と、実際に評価した事例(表1)について紹介する。

2. DNAチップを用いた食品機能評価の特徴

DNAマイクロアレイ解析を食品の機能評価に用いる際の利点は、その網羅性である。従来の機能性評価方法では一つのアッセイ系で調べることが可能なのは少数の特定の機能に限られていた。そのため、多数の機能を網羅的に調べようとすると、多くの手間と費用がかかることが問題であった。DNAチップは数千から数万遺伝子の塩基配列のオリゴDNAが高密度に搭載されている基板またはスライドガラスである。細胞および組織から抽出したRNAを標識したものをDNAチップに対してハイブ

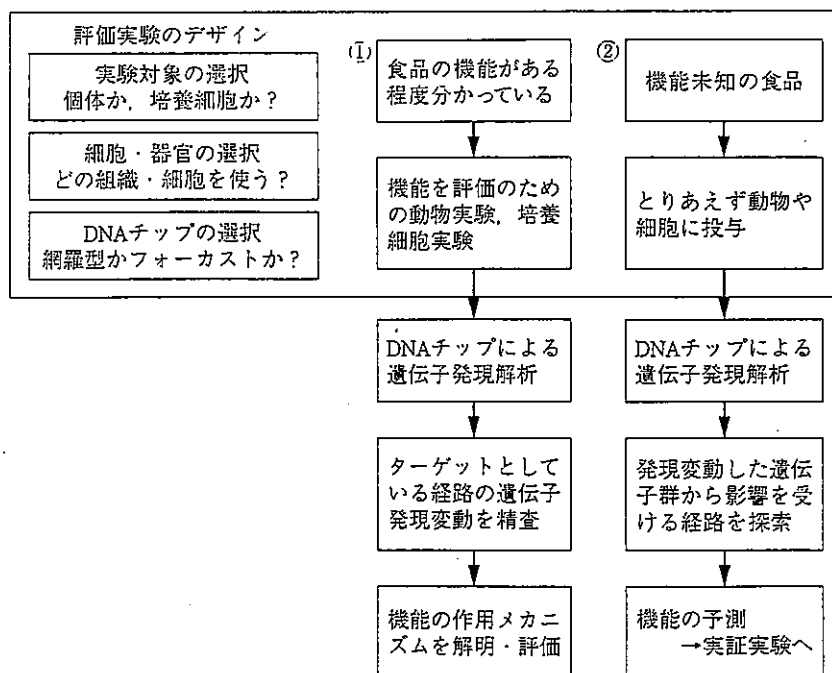


図1 DNAチップを用いた食品機能性評価のフローチャート
①作用メカニズムを解明する場合、②機能性をスクリーニングする場合

表1 DNAチップを用いた農作物・副産物の評価

作物・副産物	おもな遺伝子発現変動	機能性(*は予測された機能)
スイートコーン	Jun↓, β-catenin↓, RB↑, p53↑	腫瘍抑制 ⁶⁾
ソバスプラウト	TNFα↓, IL-1β↓, IL-8↓, CCL2↓	炎症 ¹⁾
ナガイモ	Bok↑, Apaf1↑	大腸腺腫抑制 ³⁾
ニガナ	Epo↑	造血機能促進* ⁷⁾
ローヤルゼリー	Srebf1↓, Cyp7α↑, SQLE↓	コレステロール低下 ⁸⁾
ワインバミス (オレアノール酸)	Irs2↑, Foxo1↓, Lep↑, G6pc↓, Srebf1↓, TNFα↓, IL-1β↓	中性脂肪低下, 抗肥満, インスリン抵抗性改善* ⁶⁾

リダイズ(相補的塩基対形成)させてスキャンすることにより、多数の遺伝子の発現量(mRNA量)を一度に測定すること(トランスクリプトーム解析)が可能である。食品中の機能性成分が生体に効果を及ぼすときには直接または間接的に細胞内の遺伝子発現が変動する。遺伝子発現の変化が種々の生理作用を引き起こし、表現型としての機能性に反映される。したがって、ある食品または成分を動物または細胞に投与したとき、発現量に変動している遺伝子の種類と機能を知ることにより、どのような効果がどのような機構で現れるかを予測・評価することができる。数万遺伝子を搭載するDNAチップでは、大量の遺伝子発現情報が得られるので、生体内のほぼすべての代謝、シグナル伝達、免疫応答などの変化を知ることができ、多種多様な機能性の評価が可能である。

3.

DNAチップを用いた農作物の機能評価の方法と留意点

DNAチップを用いて農作物や食品の機能を解析する場合、基礎生物学や医療・薬学分野の研究に用いる場合と若干異なる点がある。材料や方法、解析の進め方についてこれまでの他の研究グループや筆者らが行ってきた研究から考えられるポイントを以下に挙げる。

(1) 個体を使うか、培養細胞か?

DNAチップは遺伝子発現の変動を網羅的に調べる技術であるが、これを用いて食品や農作物を正しく評価するためには適切な実験デザインの構築が重要である(図1)。基礎生物学、栄養学や医学・薬学分野では、食品や薬の特定の成分を機能評価の対象とすることが主であるので、試験物質を動物に経口

投与する *in vivo* の実験系と培養細胞の培地に添加する *in vitro* の実験系の両方を用いることが可能である。培養細胞は特定の機能に関して簡便かつ精度の高い評価が可能であるが、調べられる機能は限定されるので目的によって使い分けられている。一方、農作物や加工食品の全体(単一成分ではなく食品まるごと)を評価する場合、対象が多数の成分からなる固形物であることが多いため、そのまま *in vitro* の特定の機能性評価法に持ち込むのが難しいときがある。このため、筆者らは多くの場合に動物に農作物や食品を摂食させ影響を調べる *in vivo* の実験を行ってきた。

(2) 解析対象とする器官の選択

食品や農作物を動物に摂食させた場合、次に問題となるのはどの器官のRNAをアレイ解析に供するかである。肝臓はさまざまな代謝系やシグナル伝達、免疫応答が集中している器官であることから、DNAチップを用いた機能性評価で対象とされることが多い¹⁾。実際、筆者らが今まで行った研究で、トウモロコシを経口投与したマウスのさまざまな器官(肝臓、大腸、小腸、脾臓、腎臓、皮膚、脳)のアレイ解析において、発現している遺伝子の数、発現変動する遺伝子の数いずれも肝臓が最も多かった。特定の機能を調べる事が決まっている場合は、消化器機能なら小腸・大腸、免疫機能なら脾臓など、その機能に大きく寄与している器官を選ぶべきである。しかし、多くの遺伝子が働いている器官のほうが、より多くの機能を評価できることから、肝臓を用いることは食品の機能評価においては有利であるようだ。

(3) DNAチップの選択

DNAチップにはその搭載遺伝子数から大きく分けて、網羅型アレイとフォーカストアレイがある。特に調べたい機能が定まっていない場合、網羅型ア

レイで解析する。ほぼすべての遺伝子発現変動を調べることが可能なので、一度に多くの生理作用を対象とする場合や、機能未知のものを調べる時のスクリーニングツールとしても利用できる。既製のチップが Affymetrix 社, Agilent 社, Illumina 社などから販売されている。Affymetrix 社の GeneChip は洗浄・染色などの操作の自動化により安定した結果を得られるが、GeneChip 専用の Fluidics Station (染色・洗浄装置) およびスキャナが必要となる。Agilent 社と Illumina 社は 1 枚のチップで 4 から 12 サンプルの解析が可能で、サンプルあたりのコストが低く抑えられるうえに、汎用アレイスキャナで検出できる。また、各メーカーでカバーしている生物種が異なるので、目的や予算、現有設備にあったものを選べばよいと思う。

一方、免疫応答や脂質代謝など、調べたい機能があらかじめ絞られている場合は、特定の遺伝子群だけを搭載したフォーカストアレイを用いるという選択肢も考えられる。フォーカストアレイは搭載 DNA を数百から数千種に絞ることによって、RT-qPCR に匹敵するようなデータの質的向上とコスト低下を成し遂げている。3 次元的な基板とビーズを用いた DNA チップ研究所(株)・東レ(株)の 3D-Gene[®] (第3編第3章第2節)や、中空糸に DNA を入れて金太郎飴のようにスライスして製造される三菱レイヨン(株)のジェノパール[®] (第3編第3章第5節)などが開発、販売されている。両者とも生活習慣病、がん、アレルギーなど特定機能に関連する遺伝子発現解析への特化と、ユニークな新技術の導入による高感度化で網羅的チップとの差別化を図っている。

(4) 反復実験とプーリング(pooling)

DNA チップが世に出た初期のころは価格が非常に高額であった。近年ようやく多くの研究者が手の届く額になってきたが、解析に必要なスキャナが高価であることから、設備を持たない研究者にとっては専門業者に解析委託することが多く、研究を進めるうえでコストが問題になる。とくに医療・薬学分野に比べて研究開発費が多くない農学・食品分野では、安く効率的に結果を得ることが重要である。一般的にアレイ実験では個体(サンプル)毎にチップを用いて 3 個体以上の反復実験を行うが、同じ実験群の複数個体の RNA を等量ずつプーリングしてアレイ解析を行うと、1 枚のチップでその群の平均的な発現データを得ることができるので、コストを節約する

ことができる²⁾。しかし、プーリングした RNA を用いる場合、生物学的反復が犠牲になるため、データのばらつきについて統計的な検討ができなくなるので注意が必要である。注目する重要な遺伝子については各サンプル(個体)の定量的逆転写 PCR (RT-qPCR) で確認実験、統計解析を行うのが一般的である。筆者らのこれまでの研究では、アレイ解析の結果と RT-qPCR の結果はほとんどの場合相関・一致しており、プーリング・サンプルでも信頼性の高いデータが得られている。

(5) 発現変動遺伝子の抽出

DNA チップから得られた生データは数値化、正規化した後にサンプル群間で比較することになる。群間の遺伝子発現データの変動倍率 (fold change) または t-検定の P 値で閾値を設けて、それ以上のまたはそれ以下の遺伝子群を発現変動遺伝子として抽出してくる。fold change の場合 2 倍以上が一般的であるが、食品全体を投与した場合は機能成分や薬品を与えた場合と異なりその影響が小さく変動遺伝子が少ない場合がある。このような場合、1.75 倍および 1.5 倍などを閾値と低くすることがあるが、この時は実際には変動していない遺伝子も一緒に抽出されることがあるので、結果の解釈には注意が必要である。プーリングした RNA サンプルを用いた実験では t-検定が不可能だが、生物学的反復がある場合は $P < 0.05$ の遺伝子群を抽出するのが一般的である。正規化から変動遺伝子の抽出までの一連のデータ処理は専用のソフトウェアを使用して行うと効率的にできる。市販のソフトウェアとしては GeneSpring (Agilent 社), Spotfire (Spotfire 社), ArrayStar (DNASTAR 社) などがあるが、いずれも高価である。一方、フリーのものでは統計解析ソフト R を用いた Bioconductor (<http://www.bioconductor.org/>) があるがコマンド入力による操作に慣れない人にとっては、親しみにくいかもしれない。

(6) アノテーションのクラスタリングとパスウェイ解析

変動する遺伝子を抽出した後、これら遺伝子産物のアノテーション(注釈)をもとにクラスタリングを行う。Gene Ontology (GO ; <http://www.geneontology.org/>) は世界標準の遺伝子アノテーションカテゴリーで、なかでも機能性評価に主に活用するのは GO Biological Process である。変動遺伝子を GO Biological Process の GO term をもとにクラスターに分

類し、どの機能に関わる遺伝子群がより変動している傾向にあるのかを分析する。前述のソフトウェア GeneSpring などにはこの処理を行う機能が装備されており、統計解析やパイチャート表示、KEGGなどのパスウェー図表示も可能である。WEB上のツールを使うと同様の解析、表示は可能である。Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID ; <http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>)は機能アノテーションによるクラスター化と統計解析が、Pathway Miner(<http://www.biorag.org/index.php>)ではパスウェー表示が可能である。以上のように、発現変動しているクラスターの各遺伝子の機能とその発現増減から生理機能を評価する。具体的な評価の例については以下に述べる(表1)。

4. 農作物の機能性評価の実際

① ナガイモ

ナガイモは生で食される数少ないイモで、我が国においては古来より滋養強壮、消化促進に効果があるといわれている。漢方では山薬といわれ乾燥したものが滋養強壮や止瀉に用いられている。また、これまでに抗酸化活性、トリプシン阻害、腸管ぜん動運動の促進などの消化管に関する機能性が報告されている。筆者らは、十勝圏食品加工技術センターとの共同研究で、ナガイモを経口投与したマウスに、1,2-ジメチルヒドラジン(DMH)を腹腔投与して大腸腺種(ACF)を誘発し、その影響を調べた³⁾。その結果、ナガイモ投与マウスではACFの発症が有意に抑制された。また、この効果は生のナガイモだけではなく加熱調理した場合でも発揮されることが分かった。ACFは大腸がんの前段階であることから、ナガイモには大腸がんの発症を抑える能力があると考えられる。この効果のメカニズムを明らかにするため、DMHとナガイモを投与したマウスとDMHだけを投与したマウスの大腸における遺伝子発現をDNAチップで比較したところ、BCL2-related ovarian killer(Bok)やApoptotic peptidase activating factor 1(Apaf 1/CED 4)などアポトーシスに関わる遺伝子群の発現がナガイモの経口投与によって誘導されることが分かった。このことから、ナガ

イモの大腸腺種抑制効果の一因が異常細胞のアポトーシスの促進によるという可能性が示された。細胞死関連遺伝子の発現誘導は生、加熱いずれのナガイモを投与したマウスでも見られたことから、活性物質は熱に安定な成分であると予想された。この研究のように、農作物の加工法による機能性の変動を評価する場合にも、DNAチップが有効であると考えられる。

② ソバスプラウト

ソバはルチンという抗酸化活性をもつフラボノイドを豊富に含み、体内の活性酸素を除去するのに有効な食物と考えられている。また、近年プロッコリーをはじめとするさまざまな作物の芽生えをスプラウトとして生で食するようになり、ソバに関してもそのスプラウトが生産されている。帯広畜産大学の石井らと北海道農業研究センターの共同研究では⁴⁾ヒト大腸がん細胞 CoLoTC にリポポリサッカライド(LPS)を与える炎症モデル系を用いて、ソバスプラウトのエタノール抽出物に炎症性サイトカイン IL-8 の発現抑制効果があることを見いだした⁴⁾。さらに、マウスの腹腔内に LPS を投与する実験でも、ソバスプラウト抽出物の経口投与により IL-6、TNF- α といった炎症性サイトカインの発現が抑制された。ソバスプラウト抽出物が免疫制御全体に対してどのような影響を与えるのかを評価するために、炎症関連の遺伝子が 209 種搭載されている三菱レイヨンのジェノパール・アレルギーチップを用いて遺伝子発現変動を調べた。その結果、IL-6、TNF- α のほかに IL-1 β 、CCL 2、CCL 4、CCL 5、IFI 204、IFI 35、IFI 47 などの発現が LPS を腹腔投与したマウスの肝臓や脾臓で誘導され、ソバスプラウト抽出物を与えると発現誘導が抑制されることがわかった。このことからソバスプラウト抽出物には LPS によって引き起こされるほとんどの炎症反応を抑える能力があることが明らかになった。このように、評価対象が炎症関連というように絞られている場合は、フォーカスタレイを用いて高感度・高精度の解析を行うことができる。

③ スイートコーン

スイートコーンは炭水化物、脂質を豊富に含んだ作物で、その他にもカロテノイド、フェノール類、食物繊維など健康に良いとされる成分を多く含んでいる。著者らと日本罐詰株式会社の共同研究では、スイートコーンの新たな機能性を探索するため、ス

イートコーンを投与したマウスの肝臓の遺伝子発現をDNAチップで解析した⁵⁾。その結果、転写調節因子、細胞死関連遺伝子、細胞周期に関連する遺伝子群の発現レベルに変動が起きていた。中でも細胞増殖に関連する転写因子 Jun の発現がスイートコーン投与時に低下し、Rb1, p53 といった細胞周期抑制因子の発現が増加することが分かった。また、アポトーシスの促進に関わる Bok, BH3 interacting domain death agonist (Bid) などの発現量も増加しており、細胞増殖抑制と細胞死促進が起こることが予想された。次に、この仮説を確かめるために、スイートコーンを経口投与したマウスにがん細胞を移植したところ、スイートコーン投与群で腫瘍の成長が抑制された。この研究のように、機能未知の作物や食品を動物に投与して新たな機能をスクリーニングする際のツールとしてDNAチップは有効である。

④ ニガナ

城西大学の真野らは荏原製作所と共同で沖縄の伝統野菜であるニガナの機能評価をDNAチップで行った⁷⁾。ニガナはキク科の植物で、沖縄では汁物、白和えなどで食される。また、ニガナ青汁は熱冷ましの民間療法に利用されていた。さまざまな条件下で水耕栽培されたニガナをマウスに経口投与し、肝臓のRNAを用いてマイクロアレイ解析を行った。その結果、ニガナにはエリスロポイエチン(EPO)のmRNA発現量を顕著に誘導することを明らかにした。EPOは赤血球の分化・増殖を制御し、末梢血の赤血球数を調節する。EPOは腎性貧血の治療薬として利用されており、その発現誘導は貧血症に対しては好ましい影響と考えられる。同じ葉物野菜であるホウレンソウではEPOの発現誘導は起こらないことから、この性質はニガナに特徴的なものと考えられる。EPOの誘導能は栽培における灌水条件によって変化し、平均的な栽培条件より灌水量が多い場合と少ない場合にEPO発現誘導能が高くなることが明らかにされた。このように、DNAチップを用いた評価システムでは、活性本体の物質が不明であっても、EPO遺伝子の発現レベルを指標にしてその機能を評価できる。また、機能性を高める作物栽培法の開発への利用という新たな可能性も考えられる。

⑤ ワイン压榨かす(パミス)

DNAチップを用いた機能性評価法は、未利用の

新たな食資源の開発にも役立てることができる。ワインを醸造する際、ブドウを発酵させ压榨すると果皮、種子などの搾りかす(パミス)が発生する。これまでパミスは廃棄されるか、家畜の飼料に混ぜるくらいしかその用途はなかった。帯広畜産大学の柚木らと池田町ブドウ・ブドウ酒研究所、日本製粉の共同研究では、このパミス中にオレアノール酸というトリテルペンが豊富に含まれていて、高脂肪食を投与したマウスにパミスやオレアノール酸を投与すると、血液中の中性脂肪、リン脂質が減少し、体重増加が抑制されることが見いだされた。このメカニズムを明らかにするために、DNAチップを用いてパミスやオレアノール酸を投与したマウスの肝臓の遺伝子発現を調べたところ、インスリン情報伝達系と脂質代謝に関わる遺伝子群の発現量に変動がみられた。脂質合成系の制御に関わるステロール調節エレメント結合因子 Srebf1 の発現がパミス、オレアノール酸いずれの投与でも低下しており、その制御下と考えられる脂質合成関連遺伝子群の発現も低下していた。また、インスリンの情報伝達に関わるインスリン受容体基質 Irs-2 の発現が増加し、フォークヘッド型転写因子 Foxo1 は減少していた。これらによって制御される糖新生関連遺伝子群は低下していた。さらに、摂食抑制や代謝制御に関わるホルモンとして知られるレプチン(Lep)の発現が上昇していた。以上より、パミスやオレアノール酸は脂質代謝の活性化とインスリンの情報伝達の増強により体重増加抑制や脂質代謝改善をひき起こすと考えられた。肥満はインスリンの抵抗性の一因と考えられており、このときTNF α などの炎症性サイトカインの増加が起こる。オレアノール酸は炎症性サイトカイン遺伝子の発現を抑制する効果があることもアレイ解析から示されており、一連の変化はインスリン抵抗性の改善によるものと考えられる。パミスは、現在機能性食品素材としての実用化が検討されている。

5. 今後の展望

これまでの研究では、網羅型の既製DNAのチップを用いた評価が中心であった。その際、膨大な遺伝子発現変動のデータが何を意味するのかを抽出す

るデータマイニングの過程に最も時間がかかる。このプロセスは重要であるにもかかわらず、いまだに人の手と頭脳に依存するところが多く、迅速化・客観化が十分とは言えないのが現状である。これを解決するために、データマイニングによる機能の発見の予測をアシストするコンピュータプログラム・ソフトウェアの開発が進むことが待たれる。また、もう一つの方向性は、メタボリックシンドロームやがん、アレルギーなど特定の機能に絞ったフォーカストアレイの利用である。搭載遺伝子が絞られているのでデータマイニングが迅速に行えるのが強みであると考えられる。データマイニングツールと食品機能評価用フォーカストアレイの発展により、この研究手法が今後活発化するものと思われる。現段階では mRNA のプロファイル解析が主流であるが、今後は miRNA のような機能 RNA 分子やゲノム DNA メチル化パターンが、食品を摂取したときどのように変化するかなども含めた形で総合的に理解・評価できるようなシステムになるのではないかと考えられる。DNA チップを用いた健康機能性の評価が、作物の育種や栽培法、加工法の研究開発に生かされ、さらなる高機能作物・食品が創出

されることが期待できる。

今回紹介した事例のなかで、筆者らが関わったものに関しては文部科学省都市エリア産学官連携促進事業(平成17年~19年)の支援を受けて行った研究である。

【引用・参考文献】

- 1) 阿部啓子: *ILSI Japan*, **95**, 18(2008).
- 2) S. D. Zhang and T. W. Gant: *Bioinformatics*, **24** (24), 4378, (2005).
- 3) 木下幹朗ら: 日本食品科学工学会誌, **55**(6), 270, (2008).
- 4) S. Ishii et al.: *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **72**(12), 3148, (2008).
- 5) Y. Tokuji et al.: *Journal of Food Science*, **74**(7), H 197, (2009).
- 6) K. Yunoki et al.: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**(24), 12052, (2008).
- 7) 真野博ら: 日本栄養・食糧学会誌, **59**(3), 177, (2006).
- 8) M. Kamakura et al.: *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **58**(12), 1683, (2006).

〈得字 圭彦／木下 幹朗／大西 正男〉