

DNAマイクロアレイによる特産品の機能性研究 —都市エリア産学官連携促進事業における十勝エリアの試み—

帯広畜産大学畜産学部 得字 圭彦、大西 正男
城西大学薬学部(帯広畜産大学産学連携教授) 和田 政裕

はじめに

北海道十勝地方は、広大な耕地と牧草地をもつ日本有数の農業地帯で、畜産・酪農・畑作などが盛んな地域である。豆類、ジャガイモ、麦類、甜菜、ナガイモ、ソバなどの畑作物、牛肉、鶏肉、鶏卵、牛乳などの畜産物が多く生産されている。大規模農業を主体としたこの地域は生産性が高く、また品質の面でも定評があり、十勝ブランドの乳製品や、川西ながいも、大正メークインなど全国的な知名度を誇る農畜産物も多い。しかし、WTOおよびFTAの締結などにより、貿易の自由化が推進され安価な農産物が海外から大量に輸入されると、今後価格競争力で国内産の農畜産物は苦戦を強いられていく可能性がある。このため、安全性や機能性などの付加価値を高めることが求められてきた。

2005年度より、とから財団・北海道・帯広市が文部科学省の「都市エリア産学官連携推進事業」に採択され、「機能性を重視した十勝産農畜産物の高付加価値化に関する技術開発」の共同研究がスタートした。帯広畜産大学が中核研究機関となり、農業・食品産業技術総合研究機構北海道農業研究センター、北海道立畜産試験場、北海道立根釧農業試験場、北海道立十勝圏食品加工技術センターなどの地元研究機関、さらに地元の食品産業界との協力のもとに、以下の5つの研究サブテーマが進行している(図1)。①馬鈴薯からの有用ペプチドの生産技術開発、②ソバ・豆類の健康機能性スプラウトの生産技術開発、③長いもを利用した機能性食品の開発、④ナチュラルチーズの高品質化と安全性確保技術

の開発、⑤DNA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。①から④までは、特定の食品素材が決まっており、それらについての機能性研究、高品質化、及び安全性確保の研究である。これに対し、⑤の課題では全ての素材・地場の特産品を対象として、近年発達してきた遺伝子発現の網羅的解析法であるマイクロアレイを用いて、機能性の研究評価を行っている。

1. 地元特産物の機能性評価へのDNAマイクロアレイの活用

食品の機能性を調べる上で重要となるのは、その食品がもつ機能を調べるために最適なアッセイ系を選択することである。ある有効成分が多く含まれる食品なら、その成分の効き目がもっとも明確になるような実験系を用いればよい。しかし、新規の素材や伝承や民間療法などに用いられてきた食品などについては、何に対してどのように効くのかを調べるための「取っ掛かり」が少ないため、特定のアッセイ系に絞り込むと何も結果が得られない可能性がある。また、農畜産物や加工食品は多数の物質からなる混合物であるために、それらがもつ生理機能は多様であり、その評価は単純に構成成分の機能の総和としてではなく、成分同士が拮抗的作用や相乗効果などを考え合わせなくてはならないことから、非常に複

雑である。そのような場面で威力を発揮するのがDNAマイクロアレイである。ゲノム上にコードされている数万個という遺伝子の発現変動を一度に把握できるので、これをもとに器官や細胞における代謝、シグナル伝達、免疫応答など複数の生体の活動を間接的にモニターできる。食品機能性研究にこれを用いることにより、アッセイ系に依存しないで、網羅的に生理作用の予測や作用メカニズムの解明に近づくことができる。

マイクロアレイを食品機能性研究に利用する際に、2タイプの活用法が考えられる(図2)。一つは、食品のある機能がすでにわかっているがその作用メカニズムが不明な場合、マイクロアレイでその機能に関連する遺伝子群の発現変動を網羅的に解析し、作用機作を予想するというものである。近年「トクホ」をはじめとする健康食品には、その効果の科学的エビデンスが求められており、作用メカニズムの解明にマイクロアレイが威力を発揮する。もう一つは、機能が未知のものについて、まず経口投与や培養細胞への添加実験を行い、マイクロアレイ

図1 都市エリア産学官連携推進事業十勝エリアの共同研究テーマ

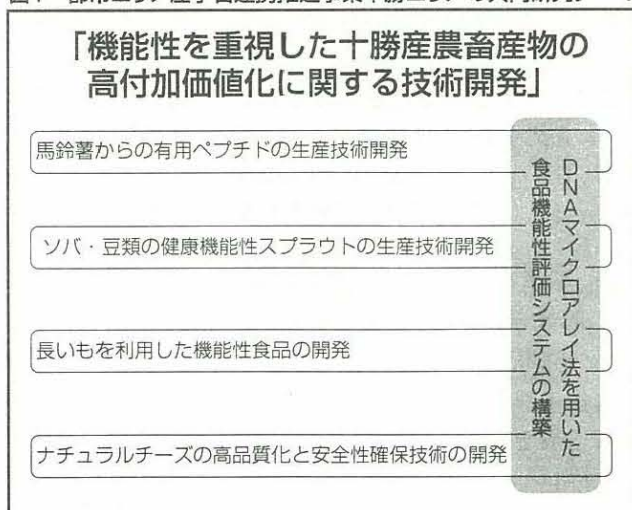
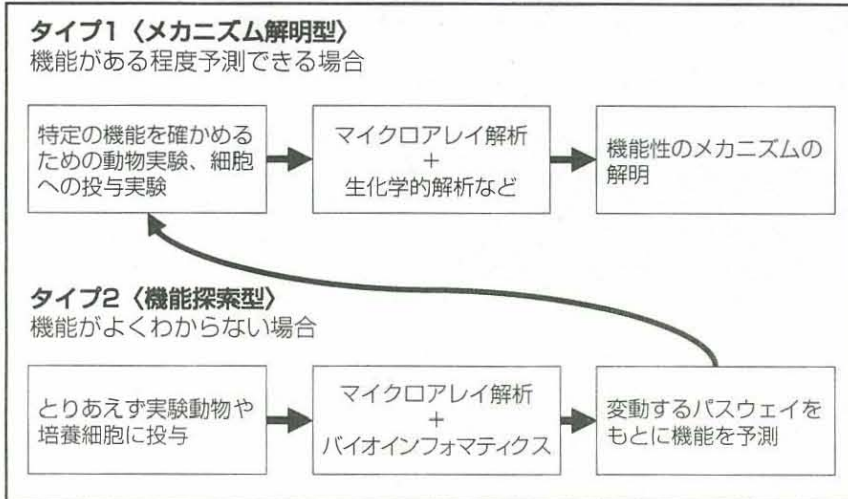


図2 食品機能性研究へのDNAマイクロアレイ活用法



で遺伝子発現を網羅的に調べ、発現変動遺伝子を「群」として扱い、特定の生理機能、代謝、シグナル伝達などに関わる遺伝子群ごとの動きから、機能をバイオインフォマティクス（生命科学情報）に基づいて推定するというものである。この機能に関する作業仮説のもとに、実証する研究へと発展させることができる。

十勝エリアでは、サブテーマを担当する各グループで研究する食品素材について、並行してマイクロアレイ解析を行うことによって情報を交換し、より効率的に食品機能を解明、探索しようと試みている。私達は、同一実験区の複数個体由来のRNAを等量ずつプールして、プローブの標識反応を行い、これをアレイにハイブリダイゼーションする方法で実験を行っている。この方法では、アレイの繰り返し実験は行わないので、発現量の変動に関して統計的有意性を十分には評価できないが、発現変動遺伝子を変動倍率（Fold change）で絞り込むことにより、ある食品を与えたときに起こる応答に関わる遺伝子群をスクリーニングすることは可能である。私達は、GEヘルスケア社のCodellink Bioarray を用いてアレイ実験を行い、得られたデータをGeneSpring（Silicon Genetics社）にて標準化後、フラグ・生データ値・変動倍率等によりフィルタリングを行い、発現変動する遺伝子群を抽出した。抽出された遺伝子群をもとに、GeneSpringのGOオントロジー・ブラウザー（抽出された遺伝子群と、遺伝子機能をもとに

て分類した遺伝子群との相関を見出すソフトウェアの機能）やKEGG（Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes）を用いて変動する遺伝子群に関わる代謝やシグナル伝達などを検索し、生理作用のメカニズムの予想や新規機能の探索を行った。なお、関連するパスウェイの遺伝子発現は、個体ごとに定量的RT-PCRを行い確認している。

2. 十勝産農作物の食品機能性

北海道はジャガイモ生産日本一を誇り、十勝地方においても主要な農作物となっている。ジャガイモは生食用やポテトチップスなどに加工されるもの以外に、デンプンの材料となるものがある。デンプン製造過程で発生する廃液中にはタンパク質が多く含まれており、最近まで未利用のまま廃棄処理されていた。近年、ダイズペプチド、ラクトペプチドなど食品に含まれるペプチドの機能性研究が注目されており、これらに様々な生理活性があることが明らかになってきた。十勝の芽室町に工場を持つコスモ

食品(株)は、デンプン製造廃液から酵素を使ってポテトペプチドを製造する方法を開発した。帯広畜産大学の福島教授らのグループは動物への投与実験を行い、血漿中の中性脂肪とコレステロールを低下させることを見出した²⁾。このラット肝臓の遺伝子発現をDNAマイクロアレイで解析した結果（図3）、脂肪酸合成系遺伝子群の発現の低下と、コレステロール輸送体遺伝子の発現には亢進がみられた。一方、コレステロールの合成・代謝には顕著な変化が見られなかった。糞便中へのコレステロール及び中性脂肪の排出が促進されていたこと²⁾と合わせて、肝臓での脂肪酸合成の低下が、血中コレステロール及び中性脂肪の低下に寄与していると考えられる。脂肪酸合成系遺伝子の多くがSREBP1c転写調節因子によって制御されることが知られているが、マイクロアレイのデータからこのSREBP1cの発現量の低下が確認されたことから、ポテトペプチドはSREBP1cの上流の遺伝子に働きかけることにより、脂肪酸合成を低下させていると考えられる。この研究の場合、血中脂肪やコレステロールの低下作用という機能があらかじめ解っていたので、図2のタイプ1の手法でアレイデータを活用することができた。

図3 ポテトペプチドを投与したラットの脂質関連遺伝子の発現

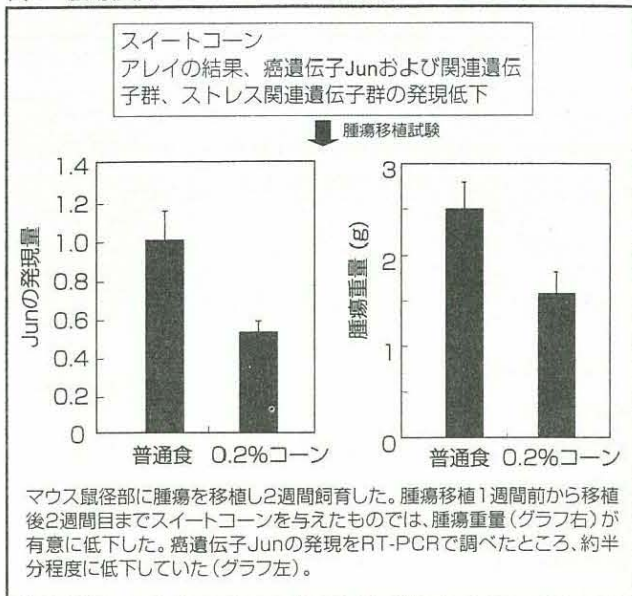
ポテトペプチド
血中コレステロールや中性脂肪を低下
糞中への脂質の排出促進

↓ DNAマイクロアレイ解析（肝臓）

	ポテトペプチド	ダイズペプチド
脂肪酸合成		
Fasn	0.52 ↓	0.71
Acaa1	0.64 ↓	0.75
Hadhsc	0.66 ↓	0.88
Echs1	0.38 ↓	0.95
Pecr	0.49 ↓	0.71
rELO2	0.28 ↓	0.43 ↓
Fads1	0.42 ↓	0.82
Scd2	0.71	1.04
トリグリセリド合成		
Gpam	0.17 ↓	0.58 ↓
Dgat2	0.60 ↓	0.89
脂質代謝の転写制御		
Srebp1c	0.62 ↓	0.77
コレステロール排出		
Abcg1	1.55 ↑	0.86

DNAマイクロアレイでポテトペプチドおよびダイズペプチドを投与したラットの肝臓の遺伝子発現を比較した結果。数値は普通食と比較したときの遺伝子発現倍率(Fold change)を示す。

図4 腫瘍移植マウスにおけるJun遺伝子の発現と腫瘍重量



次に、機能が未知の食材にマイクロアレイを適用した場合を、スイートコーンを例に紹介する。スイートコーンは十勝地方の代表的な作物で、生食用としてはもちろん缶詰、冷凍食品、スープなど様々な加工品も作られている。スイートコーンはデンプン、脂質のほかに、カロテノイドや葉酸、亜鉛、食物繊維などを多く含む食品で、優良な栄養源である。私達は、十勝の芽室町にスイートコーン加工場を持つ日本罐詰(株)との共同研究で、マウスに対して14日間および28日間スイートコーンを投与する実験を行い、肝臓におけるマイクロアレイ解析を行った(図4)。その結果、癌遺伝子として知られるJunおよびその関連遺伝子の発現が低下することが判った³⁾。JunはFosとともにAP-1転写調節因子として働き、細胞増殖に関わるサイクリン

のときのマイクロアレイ解析の結果、Junの低下のほかに、MAPキナーゼおよびJAK-STAT経路に関わる遺伝子群の低下も起こっていたことから、これらが相乗的に働いて癌細胞の増殖を抑制したと推測された。このスイートコーンの例のように、機能未知の食材に関しても、マイクロアレイによってその食品機能性を探索することができる(タイプ2)。

3. 今後の展望

上記の食品以外にも、ソバスプラウト、長いも、ワイン搾りかすなどについて、動物への投与実験およびDNAマイクロアレイ解析を行って、遺伝子発現変動のデータをもとにいくつかの新規機能やその作用機作が明らかにされつつある。マイクロアレイ解析によって新規機能が予測され

た食品素材については、その機能性を確認するための動物実験を行っている。将来的には今回の事業で得られたアレイデータをもとに、機能情報と統合したデータベースを構築し、十勝エリアの食品産業従事者が新規機能性食品の開発や、既存製品の機能性情報として活用できることを目指している。

なお、今回の成果は、帯広畜産大学の福島道広教授、木下幹朗講師、柚木恵太博士、佐山晃司科学技術コーディネーターの協力のもとに得られたものである。この場をお借りして厚くお礼を申し上げる。

<参考文献>

- 1) 松本一朗, 阿部啓子: 化学と生物, 45, 246-251 (2007)
- 2) 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. 投稿中(2007)
- 3) 得字圭彦, 秋山恭子, 柚木恵太, 木下幹朗, 和田政裕, 大西正男: 日本農芸化学会2006年度大会講演要旨集, 131 (2006)
- 4) 得字圭彦, 秋山恭子, 柚木恵太, 木下幹朗, 小林仁司, 和田政裕, 大西正男: 日本農芸化学会平成18年度北海道支部・東北支部合同支部会講演要旨, 36 (2006)

<著者略歴>

得字圭彦(とくじ よしひこ)
帯広畜産大学畜産学部助教
95年 帯広畜産大学大学院畜産学研究所修士課程修了
99年 東京大学大学院理学系研究科博士課程後期修了 博士(理学)
00年 帯広畜産大学畜産学部助手
現在に至る