

1,2-ジメチルヒドラジン投与マウスにおける大腸腺腫発症に与える 食餌性ナガイモの効果

木下幹朗[§], 柚木恵太, 得字圭彦, 川原美香*, 大庭 潔*, 弘中和憲, 大西正男

帯広畜産大学畜産学部畜産科学科

*北海道立十勝圏地域食品加工技術センター

Prevention of Aberrant Crypt Foci Formation by Dietary Chinese Yam (*D. opposita* THUNB.) in 1,2-Dimethylhydrazine-treated Mice

Mikio Kinoshita[§], Keita Yunoki, Yoshihiko Tokuji, Mika Kawahara*,
Kiyoshi Ohba*, Kazunori Hironaka and Masao Ohnishi

Department of Agricultural and Life Science, Obihiro University of Agriculture
and Veterinary Medicine, Obihiro, Hokkaido 080-8555

*Hokkaido Tokachi Regional Food Processing Technology Center, Obihiro, Hokkaido 080-2462

To clarify the physiological effects of dietary Chinese yam (*Nagaimo*) on colon cancer *in vivo*, the effects of dietary *Nagaimo* on 1,2-dimethylhydrazine (DMH)-induced aberrant crypt foci (ACF) formation in the large intestine of mice were investigated. After 8 weeks of feeding raw or boiled *Nagaimo* and DMH administration, DMH-induced ACF formation was found to be significantly suppressed in the large intestines of all mice. DNA microarray analysis showed that levels of apoptosis-inducing gene expression in the large intestine of animals fed dietary *Nagaimo* were increased in comparison to those fed the control diet. The results of the present study clearly demonstrated that DMH-induced ACF formation was inhibited in the mouse large intestine by dietary *Nagaimo* intake. Daily ingestion of *Nagaimo* may thus serve to suppress colon carcinoma in humans. (Received Dec. 17, 2007; Accepted Feb. 21, 2008)

Keywords: Chinese yam (*Nagaimo*), aberrant crypt foci, colon cancer, 1,2-dimethylhydrazine, DNA microarray

キーワード: ナガイモ, 大腸腺腫, 大腸ガン, 1, 2-ジメチルヒドラジン, DNA マイクロアレイ

ナガイモ (*D. opposita* THUNB) は、ヤマノイモ科ヤマノイモ属 (英名で Yam) に属している草本蔓性の多年草である。ヤマノイモ属の食用種はおよそ 50 種に達しており、一つの属でこれほど多くの種が食用に供されている属は他には無い。ヤマノイモ属の多くは熱帯を起源としているが、ナガイモは温帯地方を起源にしている珍しい種であり、東アジア圏で古くから食されている¹⁾。わが国における主な生産地は北海道、東北および長野県などで、比較的冷涼な地域で栽培されている¹⁾。特に北海道十勝産のナガイモは、近年台湾などへ輸出もされており、その品質の国際的な評価は高い。

ナガイモの食用に供される部分は塊茎部分であり、わが国においては、古来より滋養強壮、消化促進効果を有することが伝承的に言われている。また、ナガイモはデンプン

が非加熱の状態で α 化に近い性状であること、あるいは生状態で独特の食感 (粘性) や風味を示すことなどにより、主に生食として利用されている¹⁾。一方、中国や台湾においてはナガイモの乾燥物ならびに加熱乾燥物が薬効のある作物として珍重され、漢方薬「サンヤク」として用いられており²⁾、その効能は滋養強壮ならびに止瀉 (下痢を抑える) とされている。

ナガイモを含むヤマノイモ属の健康機能性に関する論文はあまり多くはないが、ホモシステイン血症モデルラットにおける食餌性ヤマノイモ属凍結乾燥粉末 (*D. alata*: 主に東南アジアで食用に供されているヤマノイモ属) の抗酸化作用³⁾、ヤマノイモ属の主要な貯蔵蛋白質 (dioscorin)⁴⁾ を用いた試験管内における抗酸化活性⁵⁾、アンジオテンシン変換酵素阻害活性⁶⁾、トリプシン阻害活性⁷⁾、および腸管の蠕動運動活性化⁸⁾、などの種々の機能が報告されている。

一方、近年わが国では大腸ガンを始めとする下部消化器ガンが増加傾向にあり、これは食物繊維摂取量の顕著な減

〒080-8555 北海道帯広市稲田町西 2 線

* 〒080-2462 北海道帯広市西二十二条北 2 丁目 23-10

§ 連絡先 (Corresponding author), kinoshita@obihiro.ac.jp

少や動物性油脂の摂取量の増大など、いわゆる食の欧米化が原因の一つと考えられている。ゆえにそれを防ぐ食材ならびに食品の研究・開発が待たれている。

今回、筆者らは我が国において古来より食習慣がありかつ胃腸虚弱への機能が伝承されているナガイモの大腸ガンの発症予防効果の有無について興味を持ち、1,2-ジメチルヒドラジン (DMH) 投与マウスにおける大腸腺腫 (aberrant crypt foci (ACF)) 発症に与える食餌性加熱および非加熱ナガイモの効果を検討するとともに、遺伝子の異同を DNA マイクロアレイ法を用いて解析した。

実験方法

(1) 飼料用ナガイモの調製

北海道帯広市川西農協より購入したナガイモ (平成 18 年北海道産) を用いた。以下にその加工方法を記す。

生ナガイモ粉: ナガイモ (100 kg) を洗浄した後に表皮を剥離し、スライス、凍結乾燥、および粉碎処理を行って、生ナガイモ粉を作製した。

加熱ナガイモ粉: ナガイモ (100 kg) を洗浄した後に表皮を剥離し、すりおろし、レトルト殺菌機 (100°C で 80 分) で加熱 (中心温度 95~98°C で 25 分)、凍結乾燥、および粉碎処理を行って、加熱ナガイモ粉を作製した。

(2) *in vivo* における大腸腺腫の発症抑制試験

1) 実験動物ならびに試験飼料

4 週齢の BALB/c 雄マウス ((株) 日本クレア) 40 匹を用いた。マウスは購入後、市販固形飼料 (F2 船橋農場) で 1 週間飼育した後、試験飼料に切り替えた。試験飼料は AIN-93G⁹⁾ の処方に基づいて調製した。すなわち、コントロール群 (AIN-93G 食)、生ナガイモ投与群 (AIN-93G+生ナガイモ粉 (25 g/100 g 飼料))、加熱ナガイモ投与群 1 (AIN-93G+生ナガイモ粉 (25 g/100 g 飼料))、および加熱ナガイモ投与群 2 (AIN-93G+生ナガイモ粉 (48 g/100 g 飼料)) の 4 群に分けた。なお、ナガイモ食については、5 訂食品成分表¹⁰⁾ のナガイモの組成を参考にデンプン含量を算出し、AIN-93G のコーンスターチ部分を調製ナガイモ粉末に置き換え、デンプン (炭水化物) の量を統一した。すなわち、生ナガイモ群および加熱ナガイモ投与群 1 の場合 AIN-93G のコーンスターチ部分の 50%、加熱ナガイモ投与群 2 の場合上記の 100% を置換したことになる。また、食餌、飲水は各群とも自由摂取とした。

2) 大腸腺腫 (Aberrant Crypt Foci: ACF) の測定

試験食投与 1 週間後より大腸ガン誘発物質である DMH (1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride) を 30 mg/kg 体重で週 1 回腹腔内投与した。8 週間試験食で飼育した後、24 時間絶食させてから屠殺し、大腸を摘出した¹¹⁾¹²⁾。

摘出した大腸の内容物を滅菌した生理食塩水で洗い出した後、一部 (虫垂最下部より 1 cm 程度) は DNA マイクロアレイ解析に用いるため、RNA 保存試薬 (RNAlater, Am-

bion) に浸潤し、-20°C 以下で保存した。その他の部分は、腸管の片側を縫合糸で結縛した後、4% ホルマリンを注入し、大腸の両端を結縛して大腸が膨潤した状態で 1 昼夜固定した。その後大腸を切り開き、幅と長さを測定した。その後、0.3% メチレンブルーで染色し、顕微鏡下で ACF 数を計測した¹³⁾。

3) DNA マイクロアレイによる大腸発現 mRNA の網羅的解析

2) 項で得られた大腸組織 (虫垂部から約 1 cm) より SV total RNA isolation kit (Promega) を用いて total RNA を抽出、精製し、260 および 280 nm の吸光度と電気泳動により RNA の品質と濃度を確認した。各群内のマウスの total RNA から等量ずつプールしたものをアレイ解析の試料として用いた。Gene Chip® One-Cycle Target Labeling and Control Reagents (Affymetrix) を用いて、total RNA 1 μg を鋳型とした逆転写反応をおこない dsDNA を合成し、これを鋳型とした *in vitro* 転写反応によりビオチン標識 cRNA を合成した。定法に従って、断片化して精製した標識 RNA 15 μg を Mouse Genome 430A 2.0 Array (Affymetrix) にハイブリダイズさせた。Gene Chip® Fluidics Station 450 (Affymetrix) で定法に従って洗浄し、結合している RNA をストレプトアビジン-フィコエリトリンで蛍光染色し、Gene Chip® Scanner 3000 (Affymetrix) でシグナルを検出した。データは Gene Chip® Operating Software (Affymetrix) で数値化した後、Gene Spring GX 7.3 (Agilent Technology) で解析した。

4) 統計処理

統計処理は、一元配置分散分析の後、Scheffe の多重比較検定により行い、危険率 1% 以下を有意差と判定した。

実験結果および考察

(1) マウス大腸における ACF の発症

DMH 投与期間の体重の変化は、全実験群ともに 8 グラム程度の体重の増加が観察された。しかし、コントロール群を含めて各群における有意な体重の変化の差は認められなかった。

コントロールおよび DMH 投与マウスから摘出した大腸内部をメチレンブルー染色した顕微鏡写真を図 1 に示す。通常の大腸の上皮細胞は、メチレンブルーに均一に染色されて一様な絨毛様な形態を示す (Fig. 1A)。一方、ACF はメチレンブルーに強く染色され、かつ肥大化した形態を示す (Fig. 1B)。顕微鏡下で ACF の形態を示す組織の数を計数し、組織単位面積当たりの ACF の発症率を算出した (Fig. 2)。その結果、ACF 数の平均値は、コントロール群で大腸 1 cm² 当たり 28.0 ± 8.2 (平均値 ± 標準偏差) 個であった。一方、加熱ナガイモ投与群 1 では 8.0 ± 3.3 個、生ナガイモ投与群では 9.6 ± 3.7 個であり、試験飼料のコーンスターチ部分を 50% ナガイモに置き換えた群において

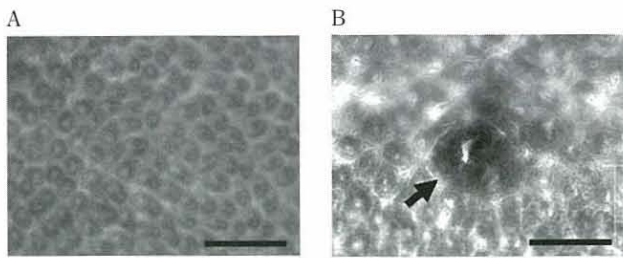


Fig. 1 Aberrant Crypt Foci Formation Induced by DMH in Large Intestinal Villi

A, normal mucosa from an untreated BALB/c mouse ($\times 100$). B, ACF in DMH-treated mouse large intestine (indicated by an arrow) ($\times 100$). (A and B, methylene blue staining.) The bar indicates a distance of $200\mu\text{m}$

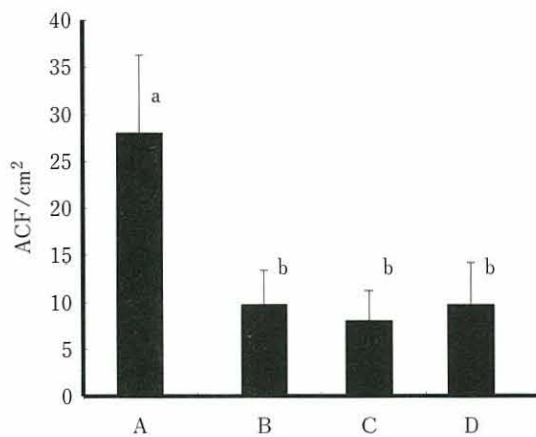


Fig. 2 Effects of Dietary Chinese Yam on DMH-induced Aberrant Crypt Foci Formation in Mouse Large Intestine

A, feeding by AIN-93G; B, AIN-93G with raw-yam powder (25% of diet); C, AIN-93G with boiled-yam powder (25% of diet); D, AIN-93G with boiled-yam powder (48% of diet). Values are means \pm S.D. ($n=7$).

^{a,b} Values with different superscript letters in column differ significantly ($P<0.01$).

ACF の発症が 65% 程度有意に抑制された。また、生ナガイモ粉と加熱ナガイモ粉との間に有意な差は認められなかった。また、加熱ナガイモ粉についてはコーンスターチ部分を 100% 置き換えた加熱ナガイモ投与群 2 では 9.7 ± 4.5 個であり、投与量による有意差も認められなかった。

(2) マウス大腸 mRNA による DNA マイクロアレイ解析
コントロール群と生ナガイモ投与群について大腸部の一部 (虫垂部から約 1cm) より total RNA を抽出し、DNA マイクロアレイ解析に供し、大腸における発現 mRNA の異同を比較した。マウスの機能アノテーションがなされている約 14 000 遺伝子を搭載したチップを用いて解析したところ、ナガイモ投与によって、DMH 投与マウス大腸の mRNA 量は、約 1 400 遺伝子で 1.5 倍以上の増加が認められ (うち 603 遺伝子は 2 倍以上増加)、約 1 300 遺伝子が

Table 1 DNA microarray analysis of large intestine on DMH-treated mice by dietary Chinese yam (raw)

Fold increase (vs control)	Total genes	Map kinase cascade	Wnt signaling cascade
>2.0	603	55	17
1.5~2.0	797	42	17
1.0~1.5	5428	261	94
0.5~1.0	5100	246	93
<0.5	1310	102	28

0.5 倍以下に減少した。大腸ガンの発症の機構としては、多段階説がよく知られている。すなわち、腸管の上皮細胞の Wnt シグナル伝達系が亢進し、異形上皮が発生する。ついで、MAP キナーゼ経路の亢進による異常増殖により ACF が発症し、最後に p53 系の破綻により大腸ガンが発症する¹²⁾。今回用いた DMH によるモデル系はこの発症系に近い実験系であることが知られている¹¹⁾¹³⁾。今回のナガイモ投与試験は 8 週間であり、概ね ACF が発症する飼育期間である。Wnt シグナル伝達系と MAP キナーゼ経路関連遺伝子群の mRNA 量の変動に焦点を当ててみると (Table 1)、Wnt シグナル伝達系では、34 個が 1.5 倍以上の増加 (うち 17 遺伝子は 2 倍以上増加) が認められるとともに、28 個が 0.5 倍以下に減少した。MAP キナーゼ経路では 97 遺伝子が 1.5 倍以上の増加 (うち 55 遺伝子は 2 倍以上増加) が認められるとともに、102 遺伝子が 0.5 倍以下に減少した。また、細胞死、特にアポトーシス誘導に関係する 15 遺伝子の mRNA の増加も認められた (Table 2)。

このように、本研究では DMH 投与マウスにおいて、加熱および非加熱ナガイモ摂取による ACF 発症抑制作用が初めて確認された。本実験はさらに長く試験飼育を続けることにより、大腸ガン発症を誘導することも出来る。今回観察されたナガイモ摂取による ACF 発症抑制の機構については、他の研究グループから報告されている抗酸化活性ならびに腸管の蠕動運動活性化による作用が考えられる⁵⁾⁸⁾。また、ナガイモ中には食物繊維が 1.0~1.4% 含まれており、これは他のイモ類 (ジャガイモで 1.3%、サツマイモで 2.3%) と比較して高い値ではないが、コントロール群よりもナガイモ添加群では繊維量が 1% 程度増加していることから (データ非掲載)、ナガイモ食物繊維による ACF 抑制効果も完全には否定できない。しかし、DMH などの投与による ACF 発症試験において、食物繊維は肯定的¹¹⁾¹⁴⁾ だけでなく否定的な論文¹⁵⁾ も認められる。また、近年の臨床研究においては食物繊維の多量摂取による大腸ガン予防効果については否定的な結果¹⁶⁾ も出ており、今後の検討課題といえる。

今回の実験におけるナガイモの摂取量は、ヒトに換算すると食事によって摂取する炭水化物の概ね 45% 程度をナガイモで摂取することによって効果が現れることになる。

Table 2 Upregulation of apoptosis-related genes in large intestine on DMH-treated mice by dietary chinese yam (raw)

Gene name	Symbol	fold increase (vs control)	Ref. No
Topoisomerase I binding, arginine/serine-rich	Topors	1.50	18
Tial1 cytotoxic granule-associated RNA binding protein-like 1	Tial1	1.90	19
Serine/threonine kinase 3 (Ste20, yeast homolog)	Stk3	1.99	20
SRY-box containing gene 9	Sox9	1.76	21
Protein kinase C, alpha	Prkca	1.55	22
Lectin, galactose binding, soluble 12	Lgals12	2.16	23
Heat shock protein 1 (chaperonin 10)	Hspe1	1.56	24
Apoptotic peptidase activating factor 1	Apaf1	1.55	25
Interferon activated gene 204, 205	Mnda	1.58	26
Programmed cell death 6 interacting protein	Pdcd6ip	1.81	27
CASP8 and FADD-like apoptosis regulator	Cflar	1.51	28
Melanoma antigen, family H, 1	Mageh1	1.55	29
Eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2	Eif2ak2	1.88	30
Seven in absentia 1A, B	Siah1a, b	1.59	31
Bcl-2-related ovarian killer protein	Bok	1.58	32

この摂取量は現在の日本人の場合ではかなり多量と考えられるが、DMH投与自体が6から10週間でマウスの大腸に腺腫をほぼ間違いなく発症させる過酷な実験条件であるため、ヒトの場合、今回の実験で用いた摂取量は必要無いと考えられる。

今回、DNAマイクロアレイによる大腸の全mRNAの評価を行ったが、ナガイモの効果としてWntシグナルならびにMAPキナーゼカスケードについて注目すると、両者ともに際だった経路の遺伝子の減少や抑制に作用する遺伝子の増加などは観察されなかった。このことは、DMH投与マウスにおける赤ワインポリフェノールの効果をDNAマイクロアレイにより機構検証した報告ではWntシグナルならびにMAPキナーゼカスケード経路については記述がない¹⁷⁾ことから、一概に上記の系の低下による減少ではないことが分かった。

一方、アポトーシス誘導に関与する15遺伝子^{18)~32)}のmRNAの増加が今回観察された。DMHによるACF発症後のアポトーシス細胞は、染色法などの違いによって今回は同定できなかった。しかし、DMH投与によるACF抑制効果を有する成分の多くは大腸ガン細胞へのアポトーシス誘導活性の報告³³⁾³⁴⁾があることから、本研究においても、アポトーシス誘導がACFの有意な減少に寄与している可能性も考えられる。また、ナガイモ摂取による免疫系の遺伝子のmRNAの増加も認められ(データ非掲載)、免疫賦活効果による作用も考えられる。

今回、加熱ナガイモと非加熱ナガイモにおける違いについても検討したが、両者ともACF発症抑制効果が認められた。すなわち、ナガイモに含まれる加熱によって機能を消失しない成分がACF発症抑制に関与していることが分かった。今後、他のイモ類(ジャガイモやサツマイモなど)

との比較や、ナガイモの成分毎(たとえば、蛋白質画分)での評価を行い、ナガイモのACF抑制効果の機構について、詳細に解明したいと考えている。

また、現在我が国ではナガイモは主に生食されているが、今後機能性素材として幅広く食品に用いる場合、安全性、保存性などを考慮すると加熱処理は不可欠であると考えられる。今回、大腸ガン発症抑制に関しては加熱したナガイモでも効能が期待できることが示され、機能性食品としての使用の幅が広がると考えられる。

要 約

ナガイモのガンに対する機能性を探索する目的で、1,2-ジメチルヒドラジン投与マウスにおける大腸腺腫(ACF)発症に与える食餌性ナガイモ粉末の効果を検証した。ナガイモ粉末をAIN-93G標準飼料のコーンスターチ部分に100%または50%置き換えて投与したところ、大腸腺腫の発症が有意に抑制された。また、加熱および非加熱の生ナガイモ粉末ともに同様の効果が認められた。DNAマイクロアレイを用いて大腸での遺伝子の異同を調べたところ、ナガイモ投与群ではアポトーシスを誘導する遺伝子群の増加が認められた。

本研究は文部科学省都市エリア産学官連携促進事業「十勝エリア」(機能性を重視した十勝農畜産物の高付加価値化に関する技術開発)の研究課題の一部として行われた。

文 献

- 1) 佐藤一郎, 野菜園芸大百科, 第2版「サトイモ, ナガイモ, レンコン, ウド, フキ, ミョウガ」.(農文協, 東京) pp. 63-78 (2004).
- 2) Hikino, H., Konno, C., Takahashi, M., Murakami, M.,

- Kato, Y., Karikura, M. and Hayashi, T., Isolation and hypoglycemic activity of dioscorans A, B, C, D, E, and F ; glycans of *Dioscorea japonica* rhizophors. *Planta Med.*, **21**, 168-171 (1986).
- 3) Chang, S.J., Lee, Y.C., Liu, S.Y. and Chang, T.W., Chinese yam (*Dioscorea alata* cv. Tainung No. 2) feeding exhibited antioxidative effects in hyperhomocysteinemia rats. *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 1720-1725 (2004).
- 4) Shewry, P.R., Tuber storage proteins. *Ann. Bot. (Lond.)*, **91**, 755-769 (2003).
- 5) Hou, W.C., Lee, M.H., Chen, H.J., Liang, W.L., Han, C.H., Liu, Y.W. and Lin, Y.H., Antioxidant activities of dioscorin, the storage protein of yam (*Dioscorea batatas* Decne) tuber. *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 4956-4960 (2001).
- 6) Hsu, F.L., Lin, Y.H., Lee, M.H., Lin, C.L. and Hou, W.C., Both dioscorin, the tuber storage protein of yam (*Dioscorea alata* cv. Tainong No. 1), and its peptic hydrolysates exhibited angiotensin converting enzyme inhibitory activities. *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 6109-6113 (2002).
- 7) Hou, W.C., Liu, J.S., Chen, H.J., Chen, T.E., Chang, C.F. and Lin, Y.H., Dioscorin, the major tuber storage protein of yam (*Dioscorea batatas* decne) with carbonic anhydrase and trypsin inhibitor activities. *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 2168-2172 (1999).
- 8) Jeon, J.R., Lee, J.S., Lee, C.H., Kim, J.Y., Kim, S.D. and Nam, D.H., Effect of ethanol extract of dried Chinese yam (*Dioscorea batatas*) flour containing dioscin on gastrointestinal function in rat model. *Arch. Pharm. Res.*, **29**, 348-353 (2006).
- 9) Reeves, P.G., Nielsen, F.H. and Fahey, G.C., Jr., AIN-93 purified diets for laboratory rodents : final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J. Nutr.*, **123**, 1939-1951 (1993).
- 10) 科学技術庁資源調査会編, 「5訂食品成分表」(女子栄養大学編集部, 東京), pp. 44-45 (2001).
- 11) Mclellan, E. and Bird, R.P., Effect of disulfiram on 1,2-dimethylhydrazine-induced and azoxymethane-induced aberrant crypt foci. *Carcinogenesis*, **12**, 969-972 (1991).
- 12) Mclellan, E.A., Medline, A. and Bird, R., Sequential-analyses of the growth and morphological-characteristics of aberrant crypt foci - Putative preneoplastic lesions. *Cancer Res.*, **51**, 5270-5274 (1991).
- 13) Aida, K., Kinoshita, M., Tanji, M., Sugawara, T., Tamura, M., Ono, J., Ueno, N. and Ohnishi, M., Prevention of aberrant crypt foci formation by dietary maize and yeast cerebrosides in 1,2-dimethylhydrazine-treated mice. *J. Oleo Sci.*, **54**, 45-49 (2005).
- 14) Ranhotra, G.S., Gelroth, J.A., Glaser, B.K., Schoening, P. and Brown, S.E., Cellulose and calcium lower the incidence of chemically-induced colon tumors in rats. *Plant Foods Hum. Nutr.*, **54**, 295-303 (1999).
- 15) Cameron, I.L., Hardman, W.E. and Heitman, D.W., The nonfermentable dietary fiber lignin alters putative colon cancer risk factors but does not protect against DMH-induced colon cancer in rats. *Nutr. Cancer*, **28**, 170-176 (1997).
- 16) Divisi, D., Di Tommaso, S., Salvemini, S., Garramone, M. and Crisci, R., Diet and cancer. *Acta Biomed.*, **77**, 118-23 (2006).
- 17) Dolara, P., Luceri, C., De Filippo, C., Femia, A.P., Giovannelli, L., Caderni, G., Cecchini, C., Silvi, S., Orpianesi, C. and Cresci, A., Red wine polyphenols influence carcinogenesis, intestinal microflora, oxidative damage and gene expression profiles of colonic mucosa in F344 rats. *Mutat. Res.*, **591**, 237-246 (2005).
- 18) Lin, L., Ozaki, T., Takada, Y., Kageyama, H., Nakamura, Y., Hata, A., Zhang, J.H., Simonds, W.F., Nakagawara, A. and Koseki, H., Topors, a p53 and topoisomerase I-binding RING finger protein, is a coactivator of p53 in growth suppression induced by DNA damage. *Oncogene*, **24**, 3385-3396 (2005).
- 19) Chang, N.S., Hyaluronidase induces murine L929 fibrosarcoma cells resistant to tumor necrosis factor and Fas cytotoxicity in the presence of actinomycin D. *Cell Biochem Biophys*, **27**, 109-132 (1995).
- 20) Dan, I., Ong, S.E., Watanabe, N.M., Blagoev, B., Nielsen, M.M., Kajikawa, E., Kristiansen, T.Z., Mann, M. and Pandey, A., Cloning of MASK, a novel member of the mammalian germinal center kinase III subfamily, with apoptosis-inducing properties. *J. Biol. Chem.*, **277**, 5929-5939 (2002).
- 21) Drivdahl, R., Haug, K.H., Sprenger, C.C., Nelson, P.S., Tennant, M.K. and Plymate, S.R., Suppression of growth and tumorigenicity in the prostate tumor cell line M12 by overexpression of the transcription factor SOX9. *Oncogene*, **23**, 4584-4593 (2004).
- 22) O'Brian, C.A., Protein kinase C-alpha : a novel target for the therapy of androgen-independent prostate cancer? (Review-hypothesis). *Oncol. Rep.*, **5**, 305-309 (1998).
- 23) Hotta, K., Funahashi, T., Matsukawa, Y., Takahashi, M., Nishizawa, H., Kishida, K., Matsuda, M., Kuriyama, H., Kihara, S., Nakamura, T., Tochino, Y., Bodkin, N.L., Hansen, B.C. and Matsuzawa, Y., Galectin-12, an adipose-expressed Galectin-like molecule possessing apoptosis-inducing activity. *J. Biol. Chem.*, **276**, 4089-4097 (2001).
- 24) Samali, A., Cai, J., Zhivotovsky, B., Jones, D.P. and Orrenius, S., Presence of a pre-apoptotic complex of pro-caspase-3, Hsp60 and Hsp10 in the mitochondrial fraction of jurkat cells. *EMBO J.*, **18**, 2040-2048 (1999).
- 25) Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S. and Wang, X., Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, **91**, 479-489 (1997).
- 26) Briggs, R.C., Shultz, K.E., Flye, L.A., McClintock-Treep, S.A., Jagasia, M.H., Goodman, S.A., Boulous, F.I., Jacobberger, J.W., Stelzer, G.T. and Head, D.R., Dysregulated human myeloid nuclear differentiation antigen expression in myelodysplastic syndromes : evidence for a role in apoptosis. *Cancer Res.*, **66**, 4645-4651 (2006).
- 27) Subramanian, L., Crabb, J.W., Cox, J., Durussel, I., Walker, T.M., van Ginkel, P.R., Bhattacharya, S., Dellaria, J.M., Palczewski, K. and Polans, A.S., Ca²⁺ binding to EF hands 1 and 3 is essential for the interaction of apoptosis-linked gene-2 with Alix/AIP1 in ocular melanoma. *Biochemistry*, **43**, 11175-11186 (2004).
- 28) Konopleva, M., Zhao, S., Xie, Z., Segall, H., Younes, A., Claxton, D.F., Estrov, Z., Kornblau, S.M. and Andreeff, M., Apoptosis. Molecules and mechanisms. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **457**, 217-236 (1999).
- 29) Dong, H., Strome, S.E., Salomao, D.R., Tamura, H., Hirano, F., Flies, D.B., Roche, P.C., Lu, J., Zhu, G., Tamada, K., Lennon, V.A., Celis, E. and Chen, L., Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis : a potential mechanism

- of immune evasion. *Nat. Med.*, **8**, 793-800 (2002).
- 30) Caraglia, M., Tagliaferri, P., Budillon, A. and Abbruzzese, A., Post-translational modifications of eukaryotic initiation factor-5A (eIF-5A) as a new target for anti-cancer therapy. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **472**, 187-198 (1999).
- 31) Matsuzawa, S., Takayama, S., Froesch, B.A., Zapata, J.M. and Reed, J.C., p53-inducible human homologue of *Drosophila* seven in absentia (Siah) inhibits cell growth: suppression by BAG-1. *EMBO J.*, **17**, 2736-2747 (1999).
- 32) Yakovlev, A.G., Di Giovanni, S., Wang, G., Liu, W., Stoica, B. and Faden, A. I., BOK and NOXA are essential mediators of p53-dependent apoptosis. *J. Biol. Chem.*, **279**, 28367-28374 (2004).
- 33) Vesper, H., Schmelz, E.M., Nikolova-Karakashian, M.N., Dillehay, D.L., Lynch, D.V. and Merrill, A.H. Jr., Sphingolipids in food and the emerging importance of sphingolipids to nutrition. *J. Nutr.*, **129**, 1239-1250 (1999).
- 34) Perdigón, G., de Moreno de LeBlanc, A., Valdez, J. and Rachid, M., Role of yoghurt in the prevention of colon cancer. *Eur. J. Clin. Nutr.*, **56**, S65-S68 (2002).

(平成 19 年 12 月 17 日受付, 平成 20 年 2 月 21 日受理)
