

食の安全・安心プロジェクト

研究概要集

平成 23 年 2 月 23 日

プロジェクトリーダー 阿部 啓子
財団法人 神奈川科学技術アカデミー

目次

1. 基本構想	(1)
2. 全体計画と遂行方針	(1)
3. 研究体制及び組織	(2)
4. 研究成果の概要	(4)
4. I 食品の健康機能評価とニュートリゲノミクス	(4)
4. II アレルゲンを指標とした新たな評価系の構築と安全・安心な農水産物生産システムの創生	(6)
5. 課題及び今後の展望	(7)
6. 業績	(8)

<研究項目>

脂質・糖質代謝異常モデル動物の肝臓における遺伝子発現に及ぼす桑葉摂取の影響	1
モデル動物を用いた食品素材のニュートリゲノミクスによる有効性および安全性評価	5
メープルシロップを例とする常用嗜好食品の健康機能性・安全性評価	13
ラット肝臓遺伝子発現プロファイル解析による鉄摂取量安全性基準のアセスメント	15
ゲノミクス手法を用いた細胞形質転換因子および抑制因子の探索	23
アレルゲンを指標とした新たな評価系の構築と「安全・安心」な農水産物生産システムの創生	29

総 括

プロジェクトリーダー 阿部啓子

1. 基本構想

本プロジェクトは、食品成分の生体への栄養・生理学的働き（機能性）と安全性を遺伝子栄養学的解析（ニュートリゲノミクス）により網羅的に評価することを目的としている。具体的には、私たちの健康の維持に寄与する栄養素の安全性を摂取量との関連から解析する。また、本年、食品廃棄物であるものから新技術法により生み出された新食品素材の機能性、神奈川県産食品の機能性・安全性、発がんプロモーション抑制成分のスクリーニングなどのテーマを対象とした評価を行う。さらに、最近増加する食物アレルギーの機作の解明と予防に向けた研究も行う。

医薬品と違って食品は多様な成分から構成される複合系であり、発現する機能も決して単純ではない。にもかかわらず、従来、食品機能の解析は、研究者ごとに特定の生理生化学的パラメーターの解析のみに局限することが多く、食品のトータル機能を包括的に解析する研究は皆無に近かった。しかも最近、機能性に加えて安全性をも評価対象とすることの必要性が国際的に強調されるに及び、食品の価値をいっそう多角的に把えることが必須となり、これを実施し得る新しい方法論の導入が待望されていた。

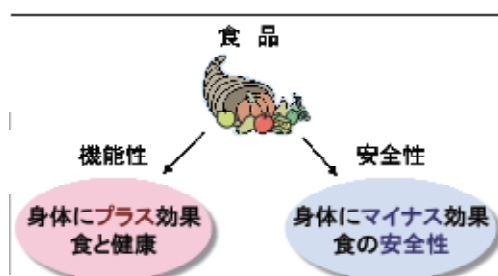


図1 食品には時として相反する2つの事象がある

近年、ゲノム情報を利用して食品の“プラス効果”と“マイナス効果”（図1）を、DNA マイクロアレイというチップを用い、遺伝子レベルで予知する新科学が誕生した。ニュートリゲノミクスと呼ばれるこの科学は、複雑多岐な混合系である食品の栄養素が生体に与えるトータルな作用を網羅的に事前評価する上に、きわめて有効な方法論である（図2）。

本プロジェクトは、「食の安全・安心」の科学的エビデンスを解明することによって評価システムを構築する神奈川県の産学公が一体となり、神奈川県民の食生活に寄与すると共に、地域産業の活性化に貢献すると期待される。



図2 ニュートリゲノミクス

2. 全体計画と遂行方針

本プロジェクトは、食品素材の機能性ならびに安全性の科学的エビデンスをニュートリゲノミクスにより提示することを目的に行った（図3）。Affymetrix 社製 DNA マイクロアレイ装置ならびにアジレント社製マイクロチップ型電気泳動装置を用いて、KAST、県衛生研、産技センターは5プロジェクトのニュートリゲノミクス実験を実施した。また、食物アレルギーの解明・予防を目的とする研究を実施した。

【研究テーマⅠ 食品の健康機能評価とニュートリゲノミクス】

(1)機能性評価研究

- ① 脂質・糖質代謝異常モデル動物の肝臓における遺伝子発現に及ぼす桑葉摂取の影響（衛生研）
- ② モデル動物を用いたニュートリゲノミクスによる食品素材の有効性及び安全性評価（産技セ・衛生研）
- ③ メープルシロップを例とする常用嗜好食品の健康機能性・安全性評価（KAST）

(2)安全性評価研究

- ① ラット肝臓遺伝子発現プロファイル解析による鉄摂取量安全性基準のアセスメント（KAST）
- ② ゲノミクス手法を用いた細胞形質転換因子の探索（衛生研）

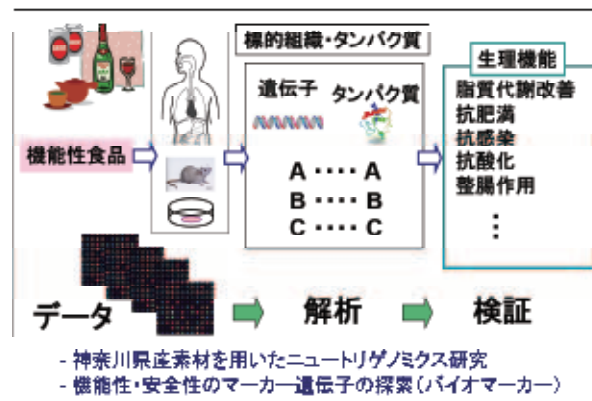


図3 ニュートリゲノミクスによる食品の機能性・安全性評価

【研究テーマⅡ アレルゲンを指標とした新たな評価系の構築と安全・安心な農水産物生産システムの創生】

植物アレルゲン制御技術、各種農産物のアレルゲンスクリーニング、高度アレルゲン検査システムの構築、アレルゲン検出法の基礎的検討、農水産物の低アレルゲン化などの食物アレルギーの解明を行った（図4）。

カテゴリー	サブテーマ
生産 保存	1. 植物アレルゲン制御技術の開発
	2. アレルゲン低減化を目指した栽培方法の開発
検査 解析	3. 高度アレルギー検査システムの構築
	4. プロテーム技術を利用したアレルゲン解析システムの開発
予防・治療	5. 農水産物の低アレルゲン化と積極的治療への応用

図4 カテゴリー別サブテーマ

3. 研究体制及び組織

本プロジェクトは、プロジェクトリーダー：阿部啓子、研究顧問：東京農業大学客員教授 荒井綜一、地域連携顧問：衛生研究所長 今井光信（平成21年より玉井拙夫）でスタートした。研究は2つのプロジェクトから成り、Ⅰ食品の健康機能評価とニュートリゲノミクス、Ⅱアレルゲンを指標とした新たな評価系の構築と安全・安心な農水産物生産システムの創生、から成り、研究リーダーはそれぞれ阿部啓子と板垣康治が務めた（図5）。

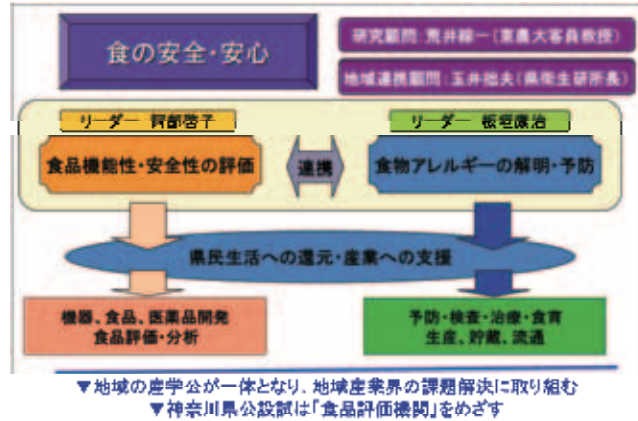


図5 食品機能性・安全性のゲノム解析による評価と食物アレルギーの解明・予防

参加機関は図6にあるようにテーマIはKAST：阿部啓子、亀井飛鳥（常勤研究員）、渡部由貴（常勤研究員）、中村美智子（研究補助）、衛生研究所：小林征洋、宮澤真紀、小島尚、大森清美、産業技術センター：荒木真由美、廣川隆彦、青木信義、廣井哲也、瀬戸山央、大澤利幸、農業技術センター：曾我綾香、久保深雪、小泉明嗣、浅田真一、東京大学：佐藤隆一郎教授、加藤久典教授、清水謙多郎教授、京都府立医科大学：吉川敏一教授、および企業（株MHB：細山浩）。

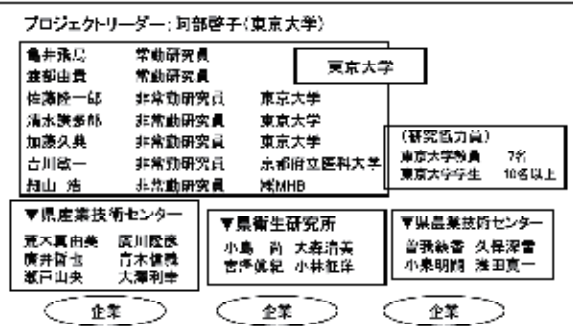


図6 プロジェクトI 研究体制

テーマIIはKAST：板垣康治、衛生研究所、共同研究先として図7に示すように、横浜国立大学、日本大学、横浜市立大学で実施した。また、複数の県内企業が試料提供等に協力した。

研究責任者	サブテーマ	研究目的	主任研究者	協力機関
生産・保存	1. 遺伝子レベルでのアレルギーの発現	・アレルゲン検出技術の開発 ・アレルゲン生成抑制効果をもつる生物特等の探査 ・アレルゲン生成を伴う農産物のリスク評価システムの構築	平塚和之 (横浜国立大)	・神奈川県衛生研究所 ・神奈川県農業技術センター ・神奈川県こども医療センター ・横浜市立大学(国、産) ・日本大学 ・企業
	2. アレルゲン低減化を目的とした栽培方法の開発	・アレルゲン性の低い品種の選抜/育種 ・低アレルゲン化のための栽培方法の検討 ・アレルゲン検出技術のフィールドへの応用	岸上弘明 立石 亮 (日本大)	・神奈川県衛生研究所 ・神奈川県農業技術センター ・横浜国立大学 ・神奈川県こども医療センター ・横浜国立大学(国、産)
検査・診断	3. 遺伝子レベル検査システムの構築	・地域における食物アレルギー検査体制の向上と診療への活用 ・近将来的な遺伝子レベル検査システムの検討	板垣康治 (KAST)	・神奈川県衛生研究所 ・神奈川県こども医療センター ・横浜市立大学(国、産)
	4. フローム技術を利用したアレルゲン解析システムの開発	・アレルゲンシークリング法の確立とデータ解析の作成	平野 久 (横浜市大)	・神奈川県衛生研究所 ・神奈川県こども医療センター ・横浜市立大学(国、産)
予防・治療	5. 農産物の低アレルゲン化と特効的治療への応用	・低アレルゲン化食品の技術開発と実用化に向けた検討 ・臨床評価による有効性の検討	板垣康治 (KAST)	・神奈川県こども医療センター ・横浜市立大学(国、産) ・慶応義塾大学 ・東京農業大学 ・JAかむがわ ・横浜農業協会の ・山崎エッセイ、他

図7 プロジェクトII 研究体制

4. 研究成果の概要

4.1 食品の健康機能評価とニュートリゲノミクス

(1) 機能性評価研究

①脂質・糖質代謝異常モデル動物の肝臓における遺伝子発現に及ぼす桑葉摂取の影響

高トリグリセリド血症または高コレステロール血症を呈する病態ラットに桑葉または桑葉抽出物を投与して効果を調べるとともに、肝臓におけるトランスクリプトーム解析によりその作用機序を明らかにした（図8）。

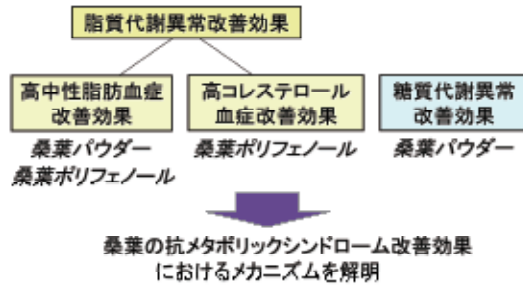


図8 桑葉の機能性

▼ 高トリグリセリド血症に対する桑葉の効果

高脂肪食摂取ラットに桑葉乾燥粉末（パウダー）を強制経口投与すると、コントロールにくらべ血中トリグリセリド値の上昇抑制、インスリン値の上昇抑制が観察された。これは、肝臓における脂肪酸代謝のβ酸化系関連の遺伝子発現が上昇することに起因した。

▼ 高コレステロール血症に対する桑葉ポリフェノール画分の効果

高コレステロール食摂取マウスに桑葉ポリフェノール画分を給水させると、コントロール（水を給水）にくらべ、血中総コレステロール値および肝障害マーカー（GOT, GPT, LDH）値の有意的低下が観察された。これは桑葉ポリフェノールによる肝臓のコレステロール合成系遺伝子群の低下から生じることが推定された。

桑葉（パウダー、ポリフェノール画分）に脂質代謝異常を改善する機能があることを評価した。今後、糖質代謝異常の改善機能についても検討し、桑葉の抗メタボリックシンドローム効果を評価し、そのメカニズムの全容を解明する。

②モデル動物を用いた食品素材のニュートリゲノミクスによる有効性および安全性評価

県産技センターで開発・生産した亜臨界水処理オカラの機能性をニュートリゲノミクスにより評価した。オカラ亜臨界水処理液中（図9）に含まれる分子量5 kDa以下と300 kDa以上の画分に高い抗酸化活性が認められた。そこで処理液を高脂肪食給餌ラットに自由摂水させると、対照群（水）にくらべ血中トリグリセリド濃度が有意に低下した。また、



図9 オカラ亜臨界水処理物（SCW）の調整方法

血中の遊離脂肪酸濃度も減少傾向にあった。次にラット肝臓のニュートリゲノミクス解析を実施した結果、発現増加する遺伝子および減少する遺伝子それぞれ300ほど抽出された。しかしこれらの遺伝子の機能を解析した結果、脂質代謝に関連する発現変動は見られなかった。したがって、血中脂質値の抑制理由として、遺伝子発現を伴うのではなく、その腸管吸収が減少した可能性が示唆された。高コレステロール食をマウスに給餌したところ、高コレステロール食による肝機能の低下をオカラSCWが緩和することがわかった。また、亜臨界水処理により可溶化したオカラ液の *in vitro*

系における評価では、高い抗酸化を示し、未利用資源から機能性食品素材が創出された。

③メープルシロップを例とする常用嗜好食品の健康機能性・安全性評価

カナダ産メープルシロップはスクロースなど糖を約65%とその他ポリフェノールに富む食材である。これらを摂取したラットでは同量のスクロースを含む食事を摂取するときにくらべ、臓器障害が緩和される可能性が示唆された。

(2) 安全性評価研究

①ラット肝臓遺伝子発現プロファイル解析による鉄摂取量安全性基準のアセスメント

栄養素、食品成分の摂取が生体に及ぼす影響について、基礎データの蓄積を目的とし、研究を実施した。必須栄養素のうちマイクロ栄養素のひとつである鉄に着目し、鉄欠乏、鉄過剰が引き起こす生体の変化について、その分子メカニズムの解明を目的とした実験を実施した。

▼鉄欠乏のニュートリゲノミクス (図10)

長期間(17日)の鉄欠乏により「貧血」という明確な指標をもつラットにおいて、鉄の貯蔵臓器であり、様々な代謝の中心臓器である肝臓を対象としたトランスクリプトーム解析を実施したところ、鉄の欠乏は肝臓の脂質代謝や糖代謝に影響を引き起こす他、アミノ酸代謝やアポトーシス系にも生理的影響を及ぼすことが明らかになった。次いで貧血を伴わない鉄欠乏状態(貧血予備群)のモデルを用いて解析した。その結果、3日間の短期鉄欠乏ラットの肝臓の遺伝子発現は、糖代謝や、ヘモグロビンなどの酸素運搬系が変動していた。

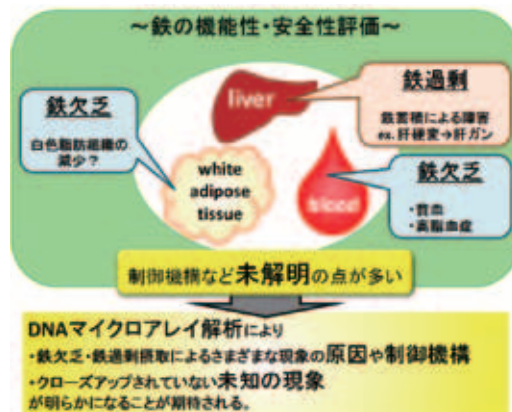


図10 鉄の機能性・安全性評価について

▼鉄過剰のニュートリゲノミクス

鉄過剰摂取ラット肝臓の遺伝子発現は、モノカルボン酸代謝、糖代謝、脂質代謝、酸化還元、刺激応答が変動していた。

鉄をモデルとした本研究は、栄養素の摂取量と安全性を遺伝子発現レベルで解析するニュートリゲノミクスで評価することが可能であることを示した。

②ゲノミクス手法を用いた細胞形質転換因子の探索

化学物質による多段階発がんの機構において、発がんプロモーションは、腫瘍形成を回避するための重要な過程である。衛生研大森らが開発した Bhas42 細胞形質転換試験法は、発がんプロモーション活性を高感度に検出することが可能である。本研究では、Bhas42 細胞形質転換試験法を用いて、発がんプロモーションマーカー遺伝子、ならびに発がんプロモーション抑制マーカー遺伝子を探索する(図11)。

Bhas42 細胞形質転換試験では、5種の化合物(食品添加剤 Comp A、発がんプロモーション活性化剤 P-1, P-2, P-3, P-4 発がんプロモーション非活性化剤 P-5)で処理したところ、P-5群を除き、他の4種化合物では、有意なフォーカス形成が認められた。また処理後24時間後の Bhas42 細胞の DNA マイクロアレイ解析を行った結果、無処理群(コントロール)にくらべ、Comp A, P-1, P-2, P-3, P-4 の遺伝子発現プロファイリングは異なったクラスターを形成していた。発がんプロモーションの活性化メカニズムの一端が解明された。

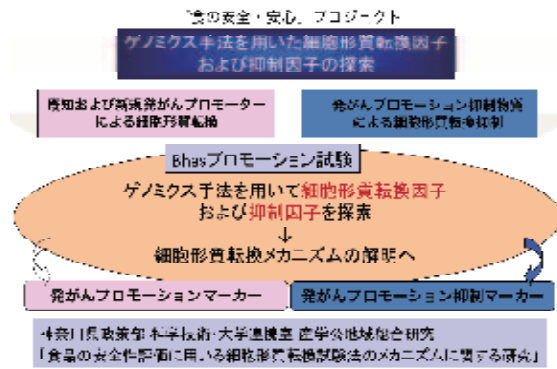


図 11 Bhas42 細胞形質転換試験法を用いた発がんプロモーション機構の解析

4. 11 アレルゲンを指標とした新たな評価系の構築と安全・安心な農水産物生産システムの創生

本プロジェクトでは、テーマ2として、食物アレルギーの解明・予防について取り上げ、生産保存、検査解析、予防・治療の3つのカテゴリーおよび5つのサブテーマを構成し、食品の生産から流通までを通して一貫したアレルゲン制御技術の開発を目標に研究を実施した。

●生産保存

(1) 植物アレルゲン制御技術の開発

植物由来のアレルゲンの多くは、防御応答に関連するタンパク質に由来することが知られている。すなわち病虫害等の刺激により防御応答遺伝子が発現誘導され、蓄積される防御応答タンパク質が食品アレルゲンとして認識されることが示されている。本研究では、発光レポーターを利用した植物の遺伝子発現モニタリングに関する研究に取り組み、植物に病害抵抗性を誘導する化合物を探索する評価系の開発を行った。



図 12. *PDF1.1* プロモーターおよび *PDF1.2* プロモーターとホタルルシフェラーゼ融合遺伝子を利用した発光モニタリングシステム

(2) アレルゲンの低減化を目指した栽培方法の開発

低アレルゲン性キウイフルーツの育種を目指した基礎的検討において、キウイフルーツの主要なアレルゲンであるアクチニジンの品種間の蓄積量を調べた。その結果、アクチニジンの蓄積量は品種間において明確な違いがみられ、含有量の少ない品種をキウイフルーツアレルギーを示す患者に摂取させたところ、アレルギー反応が引き起こされなかった例が示された。さらに低アレルゲン性キウイフルーツの育種を視野に入れ、品種間のアクチニジンの差異を、遺伝子レベルで詳細に解析した。

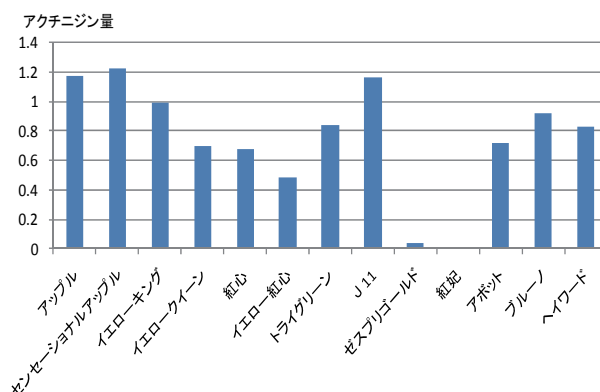


図 13. キウイフルーツの品種間におけるアクチニジン含有量

●検査解析

(3)高度アレルギー検査システムの構築

より精度の高いアレルギー検査システムの構築を目指し、医療機関と共同で、一般の血液検査などでは解析が困難な、マツノミ、オーツ麦、カシューナッツなどの特殊なアレルギーの解析をおこなった。また、成人患者の多い魚介類アレルギーについて、魚介類の主要なアレルギーであるパルブアルブミンを指標とし、約130種類の魚類のパルブアルブミン含有量を解析し、魚類アレルギーのデータベースを構築した。

(4)プロテオミクスを利用したアレルギー解析システムの開発

神奈川県で生産量が多く、果実の中で最も発症頻度が高かったキウイフルーツと、従来から主要な食物アレルギーとして知られる小麦を対象に、アレルギーの同定とエピドープの解明を目指した研究を実施した。キウイフルーツに関しては、主要なアレルギーであるアクチニジンについて、精製後プロテアーゼで消化したペプチドを分離・精製し、患者抗体との反応を調べ、エピドープ部位の同定をおこなった。小麦に関しては、SDSゲル電気泳動や二次元電気泳動により700種類以上のタンパク質スポットを検出した。またウエスタンブロッティングにより、小麦アレルギーの検出を行った。

●予防・治療

(5)農水産物の低アレルギー化と積極的治療への利用

農水産物のアレルギー性について検証し、低アレルギー化法について検討した。特に魚介類の主要アレルギーであるパルブアルブミンを、水さらしによる除去(すりみ)、タンパク質分解酵素を用いた分解(エキス)、高温加熱による変性(レトルト)により、魚肉を低アレルギー化し、魚アレルギー治療食としての可能性を検討した。その結果、いずれの方法も低アレルギー化に有効であることが明らかになった。

5. 課題及び今後の展望

はじめに述べたように、食品の機能性および安全性を1つの事象の表裏一体のものとして捉え、とくにニュートリゲノミクスを共通技術として駆使し、“食と健康”の命題の解決に寄与することは21世紀の国際的焦点課題である。にもかかわらず、これに関する新知見を社会に提供し、また関連技術を民間に指導し得る公共の機関は内外に存在しないといつて過言ではない。とりわけ、民間からの研究委託に応じ、さらには各大学からの卒論生・大学院生の派遣、委託を受け入れる力量のあるセンターの構築は、県内からはもちろん、国内からも国外からさえも待ち望まれていることは、県内外の食品企業幹部、さらには内閣府食品安全委員会担当高官らの一様に唱道するところである。

このような背景からKASTにて本プロジェクトがその第一歩を踏み出し、公共試作開発ラボ機能の構築を行い、間もなく一応の終了をみる。これは、上記の目標へ向かっての“かけがえなき重要な第一歩”である。したがって3年終了後も本事業を実質的に継続させることの必要性を強調したい。この可能性を想定してKAST、衛生研と産技センターはすでに研究を連携させ、人的交流を深めている。これを単に担当者レベルにおいてではなく、連携室主導による機関レベルで実現すべく公式に合意し、取り決め措置を交付しておくことが強く望まれる。

謝辞

本報告書に記載した研究は、プロジェクトに参加いただいた方々、そして業績として記した多くの共同研究者の方々のご協力の賜物である。物心ともにご支援、お励ましいただいた前理事長・藤嶋 昭先生、現理事長・馬来義弘先生をはじめとするKASTの方々ならびにKASTを支える神奈川県民の皆様にご心から感謝いたします。

6. 業績

【原著論文】

1. Okubo, S., Asakura, T., Okubo, K., Misaka, T., Akita, T., and Abe, K. Neoculin, a taste-modifying sweet protein, accumulates in ripening fruits of cultivated *Curculigo latifolia*. *J. Plant Physiol.* 165, 1964-1969 (2008).
2. Okada, S., Misaka, T., Tanaka, Y., Matsumoto, I., Ishibashi, K., Sasaki, S., Abe, K. Aquaporin-11 knockout mice and polycystic kidney disease animals share a common mechanism of cyst formation. *FASEB J.* 22, 3672-3684 (2008).
3. Narukawa, M., Kitagawa-Iseki, K., Oike, H., Abe, K., Mori, T., and Hayashi, Y. Characterization of umami receptor and coupling G protein in mouse taste cells. *Neuroreport.* 19, 1169-1173 (2008).
4. Ito, K., Sugawara, T., Shiroishi, M., Tokuda, N., Kurokawa, A., Misaka, T., Makyio, H., Yurugi-Kobayashi, T., Shimamura, T., Nomura, N., Murata, T., Abe, K., Iwata, S., Kobayashi, T. Advanced method for high-throughput expression of mutated eukaryotic membrane proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 371, 841-845 (2008).
5. Ohmoto, M., Matsumoto, I., Yasuoka, A., Yoshihara, Y., and Abe, K. Genetic tracing of the gustatory and trigeminal neural pathways originating from T1R3-expressing taste receptor cells and solitary chemoreceptor cells. *Mol. Cell. Neurosci.* 38, 505-517 (2008).
6. Shimizu-Ibuka, A., Nakai, Y., Nakamori, K., Morita, Y., Nakajima, K., Kadota, K., Watanabe, H., Okubo, S., Terada, T., Asakura, T., Misaka, T., and Abe, K. Biochemical and Genomic Analysis of Neoculin Compared to Monocot Mannose-Binding Lectins. *J. Agric. Food Chem.* 56, 5338-5344 (2008).
7. Nishinoaki, M., Asakura, T., Watanabe, T., Kunizaki, E., Matsumoto, M., Eto, W., Tamura, T., Minami, M., Obata, A., Abe, K., and Funaki, J. Applying an *Aspergillus saitoi* protease preparation to soybean curd for modification of its functional and rheological properties. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72, 587-590 (2008).
8. Koyama, S., Hata, S., Witt, C., Ono, Y., Lerche, S., Ojima, K., Chiba, T., Doi, N., Kitamura, F., Tanaka, K., Abe, K., Witt, S., Rybin, V., Gasch, A., Franz, T., Labeit, S., and Sorimachi, H. Muscle RING-Finger Protein MuRF1 as a Connector of Muscle Energy Metabolism and Protein Synthesis. *J. Mol. Biol.* 376, 1224-1236 (2008).
9. Nakai, Y., Hashida, H., Kadota, K., Minami, M., Shimizu, K., Matsumoto, I., Kato, H., and Abe, K. Up-regulation of Genes Related to the Ubiquitin-Proteasome System in the Brown Adipose Tissue of 24-h-fasted Rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72, 139-148 (2008).
10. Motoyama, K., Nakai, Y., Miyashita, T., Fukui, Y., Morita, M., Sanmiya, K., Sakakibara, H., Matsumoto, I., Abe, K., Yakabe, T., Yajima, N., and Shimoi, K. Isolation stress for 30 days alters hepatic gene expression profiles, especially with reference to lipid metabolism in mice. *Physiol. Genomics.* 37, 79-87 (2009).
11. Narita, Y., Ohta, S., Suzuki, K., Nemoto, T., Abe, K., and Mishima, S. Effects of long-term administration of royal jelly on the pituitary weight and gene expression in middle-aged female rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73, 431-433 (2009).
12. Yamashita, H., Nakagawa, K., Hosoi, Y., Kurokawa, A., Fukuda, Y., Matsumoto, I., Misaka, T., and Abe, K. Umami taste dysfunction in patients receiving radiotherapy for head and neck cancer. *Oral Oncol.* 45, e19-23 (2009).
13. Suzuki, Y., Minami, M., Suzuki, M., Abe, K., Zenno, S., Tsujimoto, M., Matsumoto, K., and Minami, Y. The Hsp90 inhibitor geldanamycin abrogates colocalization of eIF4E and 4E-T into stress granules and association of eIF4E with eIF4G.

- J. Biol. Chem.* 284, 35597-35604 (2009).
14. Aizawa, K., Matsumoto, T., Inakuma, T., Ishijima, T., Nakai, Y., Abe, K., and Amano, F. Administration of tomato and paprika beverages modifies hepatic glucose and lipid metabolism in mice: a DNA microarray analysis. *J. Agric. Food Chem.* 57, 10964-10971 (2009).
 15. Maeda, N., Onimura, M., Ohmoto, M., Inui, T., Yamamoto, T., Matsumoto, I., and Abe, K. Spatial differences in molecular characteristics of the pontine parabrachial nucleus. *Brain Res.* 1296, 24-34 (2009).
 16. Ishii, S., Misaka, T., Kishi, M., Kaga, T., Ishimaru, Y., and Abe, K. Acetic acid activates PKD1L3-PKD2L1 channel—A candidate sour taste receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 385, 346-350 (2009).
 17. Yamamoto, T., Takemura, M., Inui, T., Torii, K., Maeda, N., Ohmoto, M., Matsumoto, I., and Abe, K. Functional organization of the rodent parabrachial nucleus. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1170, 378-382 (2009).
 18. Sakurai, T., Misaka, T., Nagai, T., Ishimaru, Y., Matsuo, S., Asakura, T., and Abe, K. pH-Dependent inhibition of the human bitter taste receptor hTAS2R16 by a variety of acidic substances. *J. Agric. Food Chem.* 57, 2508-2514 (2009).
 19. Nakamura, A., Fujiwara, S., Matsumoto, I., and Abe, K. Stress repression in restrained rats by (R)-(-)-linalool inhalation and gene expression profiling of their whole blood cells. *J. Agric. Food Chem.* 57, 5480-5485 (2009).
 20. Kamei, A., Watanabe, Y., Ishijima, T., Uehara, M., Arai, S., Kato, H., Nakai, Y., and Abe, K. Dietary iron deficiency induces a variety of metabolic changes and even apoptosis in rat liver: a DNA microarray study. *Physiol. Genomics* 42, 149-156 (2010).
 21. Yao, R., Yasuoka, A., Kamei, A., Kitagawa, Y., Tateishi, N., Tsuruoka, N., Kiso, Y., Sueyoshi, T., Negishi, M., Misaka, T., and Abe, K. Dietary Flavonoids Activate the Constitutive Androstane Receptor (CAR). *J. Agric. Food Chem.* 58, 2168-2173 (2010).
 22. Fukasawa, T., Kamei, A., Watanabe, Y., Koga, J., and Abe, K. Short-chain fructooligosaccharide regulates hepatic PPAR α and FXR target gene expression in rats. *J. Agric. Food Chem.* 58, 7007-12 (2010).
 23. Kondo S, Xiao JZ, Satoh T, Odamaki T, Takahashi S, Sugahara H, Yaeshima T, Iwatsuki K, Kamei A, Abe K. Antiobesity effects of bifidobacterium breve strain B-3 supplementation in a mouse model with high-fat diet-induced obesity. *Biosci Biotechnol Biochem.* 74, 1656-61 (2010).
 24. Kobayashi Y, Miyazawa M, Kamei A, Abe K, Kojima T. Ameliorative effects of mulberry (*Morus alba* L.) leaves on hyperlipidemia in rats fed a high-fat diet: induction of fatty acid oxidation, inhibition of lipogenesis and suppression of oxidative stress. *Biosci Biotechnol Biochem.* 74, 2385-2395 (2010).
 25. Itoh, N., Itagaki, Y., Kurihara, K. Rush specific oral tolerance induction in school-age children with severe egg allergy : one year follow up. *Allergology, International* 59, 43-51 (2010).
 26. Maehashi, K., Matano, M., Irisawa, T., Uchino, M., Itagaki, Y., Takano, K., Kashiwagi, Y., Watanabe, T. Primary structure of potential allergenic proteins in Emu (*Dromaius novaehollandiae*) egg white. *J. Agric. Food Chem.* 58, 12530-36 (2010).
 27. Fukutomi, Y., Itagaki, Y., Taniguchi, M., Saito, A., Yasueda, H., Nakazawa, T., Hasegawa, M., Hiroyuki Nakamura, and Akiyama, K. Rhinoconjunctival sensitization to hydrolyzed wheat protein in facial soap can induce wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *J. Allergy Clin. Immunol.* (2010).

28. Oda, Y., Ueda, F., Kamei, A., Kakinuma, C., Abe, K. Biochemical investigation and gene expression analysis of the immunostimulatory functions of an edible Salacia extract in rat small intestine. *Biofactors*. in press
29. 中河原怜子、相原道子、小島尚、板垣康治、池澤善郎. プリックテストによるアナフィラキシーを生じたナッツアレルギーの抗原解析. *アレルギーの臨床*, 31, 62-65, 2011.

【総説・解説・書籍】

1. Abe, K. Studies on taste: molecular biology and food science. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72, 1647-1656(2008).
2. Arai, S., Yasuoka, A., and Abe, K. Functional food science and food for specified health use policy in Japan: state of the art. *Current Opinion in Lipidology* 19, 69-73 (2008).
3. 亀井飛鳥, 阿部啓子, *Nutrition Reviews* 日本語版: 栄養学レビュー (出版元: ILSI Japan), *Nutrition Reviews*, Volume 66, Number 6, Page 321-325, 2008 (翻訳)
4. Abe, K. Genomics for Food Functionality and Palatability, in "Food Factors for Health Promotion" *Forum of Nutrition* 61 (ed. Yoshikawa, T.) Karger AG, pp. 1-9 (2009).
5. 板垣康治「食物アレルギーの解析と低アレルギー化への展開」*生物物理化学*, 第53巻、2号 (2009)
6. 板垣康治「キウイによるOASは、品種や熟によりアレルギー症状の頻度に違いがありますか？」*アレルギー疾患*, 第5巻、3号 (2009)
7. 板垣康治「魚アレルギーの主なアレルギー分子はなんですか？青身魚と白身魚の間にはアレルギー性に違いはありますか？」*アレルギー疾患*, 第5巻、3号 (2009)
8. 亀井飛鳥, 渡部由貴, 中井雄治, 阿部啓子, 「ニュートリゲノミクス」*食品機能素材IV*, 第1編 第4章, page 38-46, 2010
9. Kobayashi, Y, Miyazawa, M, Kojima, T. The use of *Morus alba* L. (mulberry) and *Eucommia ulmoides* (Tochu) leaves as functional foods: a promising approach in the management of hyperlipidemia. *Journal of Traditional Medicines*. 27, 225-230 (2010).
10. 板垣康治、他 (日本水産学会監修、塩見一雄・佐伯宏樹編集)「魚介類アレルギーの科学：魚介類アレルギーの低減化」(加工過程における低減化) (2010)
11. 板垣康治、他 (中村丁次、板垣康治 他編集)「食物アレルギーAtoZ」第2章、page 43-46, 77-78, (2010)

【口頭発表】

1. 阿部啓子「機能性食品とニュートリゲノミクス」第8回酵素応用シンポジウム 2008年6月 名古屋
2. 伊藤直香、犬尾千聡、高増哲也、栗原和幸、板垣康治「鶏卵に対する急速特異的経口耐性誘導療法の成功例」第20回日本アレルギー学会春季臨床大会 2008年6月 東京
3. 伊藤直香、犬尾千聡、高増哲也、栗原和幸、板垣康治「鶏卵に対する急速特異的経口耐性誘導療法」第61回臨床アレルギー研究会 2008年7月 東京
4. 板垣康治「食物アレルギーの解析と治療・予防へのアプローチ」第61回臨床アレルギー研究会 2008年7月 東京
5. Nanri, T., Sugiyama, S., Hirano, H., Kosuge, Y., Itagaki, Y. 「Epitope analysis of kiwi fruits allergen actinidin」 17th Meeting of Methods in Protein Structure Analysis 2008.8 Sapporo Japan
6. 深井むつみ、中塚理子、倉田香織、杉山久仁子、小島尚、板垣康治「マダラの調理前処理によるアレルギーの低

- 減化」日本調理科学会平成 20 年度大会 2008 年 8 月 名古屋
7. 板垣康治「食の安全性と食品の選択」平成 20 年度産業・情報技術指導者養成研修【家庭 I-1】 2008 年 8 月 横浜
 8. 板垣康治「食物アレルギーと食育」食指導関係職員研修会（横須賀市教育委員会主催） 2008 年 8 月 横須賀
 9. 阿部啓子「食と健康の新しい科学を探る」健康ながの 21 2008 年 9 月 長野
 10. 阿部啓子「食品研究とニュートリゲノミクス」神奈川バイオ人材養成事業 未来を拓くバイオ・医療産業の徹底研究 第 2 回バイオ技術と食品 2008 年 9 月 厚木
 11. 深井むつみ、倉田香織、杉山久仁子、板垣康治「水産発酵食品のアレルゲンの低減化」第 55 回日本栄養改善学会学術総会 2008 年 9 月 鎌倉
 12. 南里智洋、杉山さとみ、平野久、小菅友里、小島尚、犬尾千聡、高増哲也、栗原和幸、板垣康治「キウイアレルギーの解析と医療への展開」日本社会薬学会第 27 年会 2008 年 9 月 東京
 13. 倉田香織、深井むつみ、土橋朗、小島尚、板垣康治「アレルギー性を指標とした食情報のデータベース化と食教育への活用」第 18 回日本医療薬学会年会 2008 年 9 月 札幌
 14. Keiko Abe「Functional food science and genomics— Looking back and ahead —」 5th Nestlé International Nutrition Symposium 2008.10 Switzerland
 15. 阿部啓子「食効を立証するニュートリゲノミクス（栄養ゲノム科学）」第 17 回伝承医薬食素材研究会セミナー 2008 年 10 月 東京
 16. 亀井飛鳥「タンパク質栄養悪化がラット皮膚遺伝子発現プロファイルに及ぼす影響の解析」第二回日本アミノ酸学会学術大会 2008 年 10 月 東京
 17. 荒井綜一「食の安全プロジェクト」平成 20 年度神奈川県ものづくり技術交流会 大学研究成果技術移転フォーラム 2008 年 10 月 海老名
 18. 深井むつみ、倉田香織、杉山久仁子、小島尚、板垣康治「高温加圧調理における魚類アレルギーの低減に関わる因子の検討」第 29 回日本熱物性シンポジウム 2008 年 10 月 東京
 19. Fukai,M.,Sugiyama,K.,Ito,M.,Kurata,K.,Dobashi,A.,Inuo,C.,Kurihara,K.,Itagaki,Y. 「Japanese traditional fermented sea food—as a low allergic food —」 5th World fisheries Congress 2008.10 Yokohama Japan
 20. Kurata,K.,Dobashi,A.,Kurihara,K.,Itagaki,Y. 「Characterization of parvalbumin in 128 species of fishes using Monoclonal Anti parvalbumin IgG and allergenic patient serum 」 5th World fisheries Congress 2008.10 Yokohama Japan
 21. 板垣康治「食物アレルギーを予防するために」相模原市立総合学習センター事業 2008 年 10 月 相模原
 22. 板垣康治「食物アレルギーの解析と低アレルギー化への展開」第 59 回日本電気泳動学会総会シンポジウム 2008 年 11 月 相模原
 23. 小林征洋、熊坂謙一、宮澤真紀、小島 尚「高脂肪食負荷ラットに対する桑葉の脂質代謝改善効果」第 54 回神奈川県公衆衛生学会 2008 年 10 月 横浜
 24. 阿部啓子「ニュートリゲノミクスと機能性食品科学」ちばパイオ交流フォーラム 2008 年 11 月 千葉
 25. 板垣康治「食物アレルギーと食育」座間市教育研究会給食部研究会 2008 年 11 月 座間
 26. 猪又直子、高野藍子、池澤善郎、板垣康治「韓国伝統美容キュウリパックによる接触蕁麻疹の 1 例」第 38 回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会 2008 年 11 月 大阪
 27. 綾部原子、猪又直子、前田修子、桐野実緒、竹川恵、池澤善郎、板垣康治「クルミによるアナフィラキシーショックの 1 例」第 38 回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会 2008 年 11 月 大阪
 28. 泉佳菜子、相原道子、繁平有希、山根裕美子、桐野実緒、池澤善郎、板垣康治「チーズによるアナフィラキシー

- の1例」第38回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会 2008年11月 大阪
29. 高増哲也、宮川政昭、伊藤直香、犬尾千聡、栗原和幸、板垣康治「グリーンとゴールドを区別して評価したキウイフルーツアレルギーの例」第58回日本アレルギー学会秋季学術大会 2008年11月 東京
 30. 深井むつみ、倉田香織、犬尾千聡、高増哲也、栗原和幸、板垣康治「8種の卵白における抗原交差性に関する検討」第58回日本アレルギー学会秋季学術大会 2008年11月 東京
 31. 倉田香織、土橋 朗、深井むつみ、小島尚、板垣康治「魚肉中の部位によるパルプアルブミン含有量の検討」第58回日本アレルギー学会秋季学術大会 2008年11月 東京
 32. 南里智洋、倉田香織、高増哲也、栗原和幸、板垣康治「キウイアレルギー患者5例のアレルゲン解析」第58回日本アレルギー学会秋季学術大会 2008年11月 東京
 33. 小林征洋、宮澤真紀、小島尚「食の安全・安心プロジェクト ～健康増進・疾病予防に向けての衛生研究所の取り組み～」かながわ科学技術フェア2008 2008年11月 横浜
 34. 阿部啓子「(1)食品のおいしさ感覚—その最新科学をさぐる (2)機能性食品の新しい評価法—ニュートリゲノミクス」ヒューマン・サステナビリティ・プロジェクトセミナー 2008年12月 東京
 35. 伊藤直香、犬尾千聡、高増哲也、栗原和幸、板垣康治「鶏卵に対する急速特異的経口耐性誘導療法のその後～維持は可能か?～」第45回日本小児アレルギー学会 2008年12月 横浜
 36. 板垣康治「神奈川県における食物アレルギーの実態について」給食施設種別講習会(学校・児童福祉施設、神奈川県厚木保健福祉事務所主催) 2008年12月 厚木
 37. 小林征洋「最近の話題(2)機能性食品をめぐる衛研の動き」平成20年度公衆衛生実務者研修 2009年1月 茅ヶ崎
 38. 阿部啓子「ニュートリゲノミクス研究の展開」KAST代謝生化学講義 2009年3月 川崎
 39. 亀井飛鳥「鉄欠乏食がラット肝臓遺伝子発現プロファイルに及ぼす影響」日本農芸化学会 2009年度大会 2009年3月 福岡
 40. 板垣康治「加工過程における低減化」平成21年度日本水産学会春季大会シンポジウム 2009年3月 東京
 41. Keiko Abe「Taste Molecular Biology and New Food Chemistry」Achems 2009 31st Annual Meeting & IFF Award 受賞講演 2009.4 USA
 42. Soichi Arai「Outlook on the Science of Functional Food」10th Anniversary of the Danone Institute of Japan (DIJ) 2009.5 Tokyo
 43. Soichi Arai「Science and Policies on Functional Foods— Present Status and Beyond —」東京農業大学 外国人教育セミナー 2009.5 Tokyo
 44. 阿部啓子「はじめに —寄付講座第I期の成果と第II期の展望」東京大学 ILSI Japan 寄付講座“食品の機能予測とニュートリゲノミクス” 2009年5月 東京
 45. 阿部啓子「食品機能性・安全性評価—ニュートリゲノミクス—」食品機能と健康ビジョン研究会 2009年5月 東京
 46. 亀井飛鳥「食餌性鉄欠乏が肝臓の遺伝子発現に及ぼす影響」東京大学 ILSI Japan 寄付講座「機能性食品ゲノミクス」公開シンポジウム 2009年5月 東京
 47. 亀井飛鳥「鉄欠乏食を摂取したラット肝臓のトランスクリプトーム解析」第63回日本栄養・食糧学会大会 2009年5月 長崎
 48. 泉佳菜子、相原道子、繁平有希、山根裕美子、桐野実緒、池澤善郎、板垣康治「チーズによるアナフィラキシーの1例」第21回日本アレルギー学会春季臨床大会 2009年6月 岐阜

49. 前田修子、猪又直子、磯野祐士、高野藍子、藤田浩之、池澤善郎、板垣康治「NSAIDs による増強効果でアナフィラキシーに発展した梅干アレルギーの 1 例」第 21 回日本アレルギー学会春季臨床大会 2009 年 6 月 岐阜
50. 板垣康治「食物アレルギーの理解」平成 21 年度アレルギー研修（神奈川県立保健福祉大学実践教育センター主催） 2009 年 7 月 横浜
51. 板垣康治「食物アレルギーと食育 ～神奈川県の実態調査から見えたこと～」平成 21 年度 第 2 回栄養管理講習会（神奈川県三崎保健福祉事務所主催） 2009 年 7 月
52. 中河原怜子、相原道子、猪又直子、池澤善郎、板垣康治「カシューナッツのプリックテストで全身性アレルギー症状を生じた 1 例」第 14 回日本ラテックスアレルギー学会 2009 年 7 月 東京
53. 河野真純、松倉節子、蒲原 毅、中河原怜子、池澤善郎、板垣康治「大豆食品によるアナフィラキシーの 1 例」第 14 回日本ラテックスアレルギー学会 2009 年 7 月 東京
54. 板垣康治「食の安全性と食品の選択」平成 21 年度産業・情報技術等指導者養成研修【家庭 I - 1】（文部科学省主催） 2009 年 7 月
55. 阿部啓子「食品の味—どうして味がわかるの？—不思議な味」川崎市西梶ヶ谷小学校 2009 年 9 月 川崎
56. Keiko Abe 「Evaluation of Food Functionality and Safety— Nutrigenomics」 Canada 農務省 2009.9 Canada
57. Keiko Abe 「Functional food factors that activate nuclear receptor —polyphenol and lignan」 Canada 農務省 2009.9 Canada
58. Keiko Abe 「Maple Syrup」 Canada 農務省 2009.9 Canada
59. Keiko Abe 「Nutrigenomics— Iron」 Canada 農務省 2009.9 Canada
60. Keiko Abe 「Nutrigenomics— Cancer」 Canada 農務省 2009.9 Canada
61. Asuka Kamei 「Effects of dietary iron deficiency on the gene expression profile in rat liver」 The 19th International Congress of Nutrition (ICN) 2009.10 Thai
62. 板垣康治「データベース化に向けた魚類アレルギーの解析と調理・加工による低減化」第 56 回日本栄養改善学会学術総会自由集会 2009 年 9 月 札幌
63. 荒井綜一「科学を基盤とする医食同源と機能性食品—その未来像をさぐる」食品インフォマティクス・フォーラム 2009 年 10 月 東京
64. 阿部啓子「機能性食品の新しい評価法— ニュートリゲノミクス」慶應義塾大学薬学部公開講座 B 2009 年 10 月 東京
65. 阿部啓子「機能性食品研究の新しい方法論 — ニュートリゲノミクス」富山和漢医薬学総合研究所特別セミナー 2009 年 10 月 富山
66. 阿部啓子「食と健康のゲノミクス—栄養欠乏、異物代謝、アロマセラピーを例にして抗酸化への間接的寄与をさぐる」第 3 回 Antioxidant Unit 研究会 2009 年 10 月 東京
67. 阿部啓子「ニュートリゲノミクスによる食品の機能性・安全性の評価」（財）木原記念横浜生命科学振興財団 第 2 回 バイオビジネス・パートナーリング 2009 年 10 月 横浜
68. 亀井飛鳥「食品の機能性・安全性評価 — DNA マイクロアレイ解析」平成 21 年度神奈川県ものづくり技術交流会 バイオ技術フォーラム 2009 年 10 月 海老名
69. 小島尚、小林征洋、宮澤真紀「桑葉のメタボリックシンドローム基礎疾患への効果」平成 21 年度神奈川県ものづくり技術交流会 2009 年 10 月 海老名
70. 小島尚、小林征洋、宮澤真紀「産学公協同研究におけるニュートリゲノミクスによる食品機能性評価への取り組み」第 46 回全国薬事指導協議会総会 2009 年 10 月 佐賀

71. 小林征洋、宮澤眞紀、小島尚「ニュートリゲノミクスによる食品機能性の評価系の確立～桑葉の脂質代謝改善効果における作用メカニズムの解明を例に～」第55回神奈川県公衆衛生学会 2009年10月 横浜
72. 板垣康治「食物アレルギーからみる食育～魚類アレルギーから食選択を考える～」食生活改善講演会（横須賀市保健所主催） 2009年10月 横須賀
73. 板垣康治「植物アレルギーの解析と育種への応用」バイオジャパン2009 2009年10月 横浜
74. 板垣康治「食物アレルギーの最新情報」平成21年度栄養教諭・学校栄養職員研修講座（神奈川県教育委員会主催） 2009年10月
75. 板垣康治「食物アレルギーの現状～食物アレルギーと食育～」第39回日本栄養・食糧学会北海道支部 アレルギーフォーラム in 札幌 2009年10月 札幌
76. 板垣康治「食物アレルギーの現状と対応」現代的教育ニーズ取組支援プログラム（東京農業大学生物産業学部主催） 2009年10月
77. 中河原玲子、相原道子、猪又直子、板垣康治、池澤善朗「ナッツ類のプリックテストでアナフィラキシーを生じた1例」第59回日本アレルギー学会秋季学術大会 2009年10月 秋田
78. 小林征洋、宮澤眞紀、小島尚「食品素材の機能性を探る－食品素材の機能性解明に関する研究」かながわ科学技術フェア2009 2009年10月 横浜
79. 阿部啓子「食品研究とニュートリゲノミクス」KAST第3回バイオ技術と食品 2009年11月 神奈川
80. 阿部啓子「味覚研究に魅せられて」東京大学ホームカミングデイ 2009年11月 東京
81. 阿部啓子「“食と健康”の先端研究－その現状を探る The Frontiers of the Studies on "Food for Health"—State of the Art」ネスレ栄養科学会議 Nestlé Nutrition Council. Japan 2009年11月 東京
82. 阿部啓子「“食”－その文化と先端科学栄養性・機能性・安全性そして嗜好性を分子レベルで解き明かす」東京大学EMP社会人講義 2009年11月 東京
83. 小林征洋、宮澤眞紀、亀井飛鳥、阿部啓子、小島尚「高トリグリセリド血症ラット肝臓における遺伝子発現に及ぼす桑葉摂取の影響」日本薬学会第3回食品薬学シンポジウム 2009年11月 大阪
84. Morita,A., Inomata,N., Kondo,M., Shirai,T., Itagaki,Y., Ikezawa,Z. “Occupational contact urticaria syndrome caused by handling lettuce and chicory: cross-reactivity between lettuce and chicory”, The 17th International Contact Dermatitis Symposium in Kyoto , 2009.11.7
85. 板垣康治「中学生の食と食物アレルギー」厚木市立森の里中学校主催講演会 2009年11月 厚木
86. 阿部啓子「機能性食品の効能・効果の検証－安全性・嗜好性をも考慮に入れて－」東京大学ジェロントロジー講義新しい可能性を考える：食 2009年12月 東京
87. 阿部啓子「食品の機能性評価とニュートリゲノミクス」平成21年度日本食品科学工学会 関東支部大会 2009年12月 東京
88. 板垣康治「食物アレルギーの現状と農水産物の低アレルギー化へのアプローチ」平成21年度日本食品化学工学会 関東支部大会 2009年12月 東京
89. 板垣康治「食物アレルギー」臨床栄養の実践（㈱チーム医療主催） 2009年12月 東京
90. 小林征洋「桑の葉茶のメタボリックシンドローム予防・改善効果」平成21年度神奈川県衛生研究所調査研究発表会 2010年1月 茅ヶ崎
91. 板垣康治「食物アレルギーの解析と低アレルギー化への応用」日本食品衛生学会『第12回特別シンポジウム』 2010年1月 東京
92. 板垣康治「魚類アレルギー～アレルギーのデータベース化と治療・予防への活用～」第29回大田区小児喘息勉強会

強会 2010年2月 東京

93. 亀井飛鳥「短期鉄欠乏食がラット肝臓遺伝子発現プロファイルに及ぼす影響」日本農芸化学会 2010 年度大会
2010年3月 東京
94. 荒木真由美、廣川隆彦、廣井哲也、大澤利幸、小林征洋、小島尚、阿部啓子「肥満モデルラットにおけるオカラ
亜臨界水処理液の効果」日本農芸化学会 2010 年度大会 2010年3月 東京
95. 小林征洋、宮澤眞紀、小島尚「桑葉フラボノイド画分の高コレステロール食給餌マウスに対する肝保護作用」日
本薬学会第 130 年会 2010年3月 岡山
96. 小峰由美子、渡邊美砂、小原明、佐地勉、板垣康治「魚アレルギー除去食の指標としての特異的 IgE 抗体、プリ
ックテストの有用性」第 27 回 日本小児難治喘息アレルギー疾患学会 2010年5月 東京
97. 河野真純、松倉節子、今井満ちる、中河原怜子、蒲原毅、三浦陽、板垣康治、池澤善郎「大豆食品による成人発
症のアナフィラキシーの 2 例」第 22 回 日本アレルギー学会春季臨床大会 2010年5月 大阪
98. 今井満ちる、松倉節子、中河原怜子、蒲原毅、板垣康治、池澤善郎、森雅亮、相原雄幸「乳児期より魚アレルギ
ーを有し幼児期に摂取可能となった小児の 1 例」第 22 回 日本アレルギー学会春季臨床大会 2010年5月 大
阪
99. 亀井飛鳥「タンパク質栄養悪化がラット肝臓に及ぼす影響の統合オミクス解析」第 64 回 日本栄養・食糧学
会大会 2010年5月 徳島
100. 亀井飛鳥「食品の機能性・安全性評価ツールとしての DNA マイクロアレイ」第 64 回 日本栄養・食糧学
会大会 学術集会 (サテライトシンポジウム) 2010年5月 徳島
101. 渡部由貴「メープルシロップの健康機能性評価 –ラットに投与した結果の解析」第 64 回 日本栄養・食糧学
会大会 2010年5月 徳島
102. 亀井飛鳥「食品の機能性・安全性評価ツールとしての DNA マイクロアレイ」新潟大学、大学院セミナー 2010
年6月 新潟
103. 荒木真由美、小林征洋、廣川隆彦、廣井哲也、小島 尚、大澤利幸、阿部啓子「高脂肪食ラットにおけるオカラ
亜臨界水処理液の効果」東京都産業技術研究センター平成 22 年度研究発表会 2010年6月 東京
104. Nakagawara,R., Kohno,M., Matsukura,S., Imai,M., Kanbara,T., Miura,Y., Itagaki,Y., Ikezawa,Z. “A case of anaphylaxis
caused by soybean sprout”, 9th Meeting of German-Japanese Society of Dermatology , 2010.6 Germany
105. 亀井飛鳥「食の安全・安心プロジェクトについて」KAST-ドイツ交流 2010年7月 川崎
106. 荒木真由美他「高脂肪食ラットにおけるオカラ亜臨界水処理液の効果」千葉県産業支援技術研究所 平成 22 年
度研究成果発表会 2010年7月 千葉
107. 亀井飛鳥「遺伝子発現変動からみた鉄欠乏の安全性リスク評価」首都大学、大学院セミナー 2010年7月 東
京
108. 松倉節子、板垣康治、今井満ちる、前田修子、中河原怜子、相原道子、蒲原毅、池澤善郎「パパイン酵素入り洗
顔料による接触蕁麻疹とワサビによるアナフィラキシーを合併した 1 例」ラテックスアレルギー・OAS フォーラ
ム 2010 第 15 回ラテックスアレルギー研究会 2010年7月 横浜
109. 小林征洋、中河原怜子、小島 尚、板垣康治「アレルギーを起こす食物は何？」平成 22 年度神奈川県衛生研究
所施設公開 2010年7月 茅ヶ崎
110. 小林征洋「桑葉、杜仲葉の新しい切り口での研究～ニュートリゲノミクスによる機能解析～」第 27 回和漢医薬
学会学術大会 2010年8月 京都
111. 板垣康治「食中毒と食物アレルギー」平成 22 年度産業・情報技術等指導者養成研修【家庭 I - 1】(文部科学

省主催) 2010年8月 東京

112. 荒木真由美他「県立機関の事業紹介」(産業技術センターとしてポスター展示) BioJapan2010 2010年9月 横浜
113. 板垣康治「食物アレルギー最新事情 ～食生活と食物アレルギーについて～」平成22年度保健衛生研修(平塚保健福祉事務所主催) 2010年9月 平塚
114. 立石亮、中村拓耶、板垣康治、浅田真一、青木隆、渡辺慶一、井上弘明「キウイフルーツ品種間におけるアクチニジン蓄積量の違いとその特徴」日本園芸学会平成22年度秋季大会(大分大学) 2010年9月
115. 板垣康治「食物アレルギーについて」平成22年度管内公衆栄養推進研修会(帯広保健所主催) 2010年10月 北海道
116. 小林征洋、宮澤真紀、荒木真由美、廣川隆彦、廣井哲也、青木信義、大澤利幸、小島 尚「杜仲茶および桑葉茶の抗メタボリックシンドローム効果 - DNA マイクロアレイを用いた作用機序の解明」平成22年度神奈川県ものづくり技術交流会 2010年10月 海老名
117. 小林征洋「桑茶の高中性脂肪血症に対する予防効果～桑の葉が余分な脂肪を燃焼させる～」平成22年度神奈川県衛生研究所公開セミナー 2010年10月 茅ヶ崎
118. 板垣康治「変革期を迎えた食物アレルギー ～安全・安心な農水産物の開発に向けて～」平成22年度神奈川県衛生研究所公開セミナー 2010年10月 茅ヶ崎
119. 板垣康治「食物アレルギーの現状 ～食物アレルギーと食育～」平成22年度秋期全道栄養士研究大会職域研修会 2010年10月 札幌
120. 小林征洋、宮澤真紀、小島 尚「食品素材の機能性を探る桑の葉茶のメタボリックシンドローム予防効果」かながわ科学技術フェア2010 2010年11月 横浜
121. 金山けい、宮澤真紀、小島尚、板垣康治「キウイフルーツの品種によるアレルギー(アクチニジン)の差異に関する検討」第56回神奈川県公衆衛生学会 2010年11月 横浜
122. 福富友馬、谷口正実、齊藤明美、安枝浩、中澤卓也、長谷川真紀、秋山一男、板垣康治「洗顔石鹸中の加水分解小麦に対する接触性感作が原因となり発症した経口小麦アナフィラキシーの5例」第66回臨床アレルギー研究会 2010年11月 東京
123. 福富友馬、板垣康治、谷口正実、齊藤明美、安枝浩、中澤卓也、長谷川真紀、秋山一男「加水分解小麦への経皮粘膜感作に関連して発症した小麦アナフィラキシー症例の感作パターンの特徴」第60回日本アレルギー学会秋季学術大会 2010年11月 東京
124. 板垣康治「食物アレルギーをいかに解析するか - 基礎と臨床の連携による食物アレルギー治療へ向けたアプローチ」第47回日本小児アレルギー学会 2010年12月 横浜
125. 金山けい、宮澤真紀、小島尚、板垣康治「キウイフルーツ主要アレルギーの品種による性状の違い」日本薬学会第130年会 2011年3月 静岡
126. 荒木真由美、廣川隆彦、小林征洋、小島尚、宮澤真紀、青木信義、廣井哲也、瀬戸山央、大澤利幸、亀井飛鳥、阿部啓子「高コレステロール食給餌マウスにおけるオカラ垂臨界水処理液の効果」日本農芸化学会2011年度大会 2011年3月 京都
127. 亀井飛鳥、渡部由貴、荒井綜一、阿部啓子「鉄過剰摂取がラット肝臓遺伝子発現プロファイルに及ぼす影響」日本農芸化学会2011年度大会 2011年3月 京都
128. 渡部由貴、亀井飛鳥、中井雄治、荒井綜一、阿部啓子「メープルシロップの健康機能性に関する研究」日本農芸化学会2011年度大会 2011年3月 京都

【特許】

1 件

【共同研究】

7 件

プロジェクト参加者一覧

〔氏名〕	〔役職〕	〔参画期間〕
阿部 啓子	プロジェクトリーダー/東京大学・特任教授	2008年4月～2011年3月
板垣 康治	グループリーダー/北海道文教大学・准教授	2008年4月～2011年3月
亀井 飛鳥	常勤研究員	2008年4月～2011年3月
渡部 由貴	常勤研究員 (研究協力員)	2009年4月～2011年3月 2008年4月～2009年3月)
荒井 綜一	研究顧問/東京農業大学・客員教授	2008年4月～2011年3月
今井 光信	地域連携顧問/神奈川県衛生研究所・所長	2008年4月～2009年3月
玉井 拙夫	地域連携顧問/神奈川県衛生研究所・所長	2009年4月～2011年3月
佐藤 隆一郎	非常勤研究員/東京大学・教授	2008年4月～2010年3月
清水 謙多郎	非常勤研究員/東京大学・教授	2008年4月～2010年3月
加藤 久典	非常勤研究員/東京大学・特任教授	2008年4月～2010年3月
吉川 敏一	非常勤研究員/京都府立医科大学・教授	2008年4月～2010年3月
細山 浩	非常勤研究員/(株)エム・エイチ・ビー代表取締役	2008年4月～2011年3月
中村 美智子	研究補助員	2008年4月～2011年3月
金山 けい	研究補助員	2010年4月～2011年3月
阿生山 萌	研究協力員	2008年4月～2011年3月

田村 倫子	研究協力員	2008年4月～2010年3月
黒川 あずさ	研究協力員	2008年4月～2011年3月
藤澤 宣子	研究協力員	2009年4月～2010年3月
桐原 彩	研究協力員	2010年4月～2011年3月
小島 尚	共同研究者/神奈川県衛生研究所	2008年4月～2011年3月
宮澤 眞紀	共同研究者/神奈川県衛生研究所	2008年4月～2011年3月
大森 清美	共同研究者/神奈川県衛生研究所	2008年4月～2011年3月
小林 征洋	共同研究者/神奈川県衛生研究所	2008年4月～2011年3月
青木 信義	共同研究者/神奈川県産業技術センター	2010年4月～2011年3月
大澤 利幸	共同研究者/神奈川県産業技術センター	2008年4月～2011年3月
廣井 哲也	共同研究者/神奈川県産業技術センター	2008年4月～2010年3月
廣川 隆彦	共同研究者/神奈川県産業技術センター	2008年4月～2011年3月
荒木 真由美	共同研究者/神奈川県産業技術センター	2008年4月～2011年3月
瀬戸山 央	共同研究者/神奈川県産業技術センター	2010年4月～2011年3月
曾我 綾香	共同研究者/神奈川県農業技術センター	2008年4月～2011年3月
青木 隆	共同研究者/神奈川県農業技術センター	2009年4月～2011年3月
浅田 真一	共同研究者/玉川大学・准教授	2008年4月～2009年3月
平塚 和之	共同研究者/横浜国立大学・教授	2008年4月～2011年3月

井上 弘明	共同研究者/日本大学・教授	2008年4月～2011年3月
立石 亮	共同研究者/日本大学・准教授	2008年4月～2011年3月
平野 久	共同研究者/横浜市立大学・教授	2008年4月～2011年3月

研 究 報 告

脂質・糖質代謝異常モデル動物の肝臓における 遺伝子発現に及ぼす桑葉摂取の影響

小林 征洋、宮澤 眞紀、小島 尚／神奈川県衛生研究所

1. はじめに

桑はクワ科の植物で、古くから葉、根皮、果実が解熱、鎮咳去痰、鎮痛などの目的に利用されてきた。最近では、桑葉を用いたお茶が健康食品として広く親しまれている。

近年の研究から桑葉の血糖値降下作用、血圧降下作用、抗酸化作用、血中脂質降下作用などが科学的に確認されている。桑葉に含まれている 1-デオキシノジリマイシンは、腸管における糖質吸収を阻害することで血糖値降下作用を示す [1]。一方、桑葉が含有するγ-アミノ酪酸やケルセチンは血圧降下作用に関与している [2, 3]。桑葉に多く含まれるフラボノイド類には抗酸化作用が認められ [4]、LDL の酸化を防ぐことで粥状動脈硬化巣の形成を抑制する [5]。桑葉には血中トリグリセリドおよび血中コレステロールの上昇抑制効果が認められており、食物繊維のほかにフラボノイド類も関与しているものと予想されている [6]。しかし、桑葉の高脂血症の進行抑制効果における作用機序については解明されていない。そこで本研究では高トリグリセリド血症または高コレステロール血症を呈する病態ラットに桑葉または桑葉抽出物を投与して効果を調べるとともに、肝臓におけるトランスクリプトーム解析によりその作用機序を明らかにすることを目的とした。

2. 実験と結果

2. 1. 高トリグリセリド血症に対する桑葉の効果

2. 1. 1. 実験動物

Wistar/ST 雄ラットを、普通食を給餌した 1 群および高脂肪食（粗脂肪分 14%）を給餌した 4 群に分けた。高脂肪食群のうち 3 群には桑葉乾燥粉末を 250、500 または 1000 mg/kg 体重/日となるように週 6 回の強制経口投与を行った。6 週間後に血液生化学検査を行った後、肝臓を摘出してトランスクリプトーム解析を行った。

2. 1. 2. 血液成分に及ぼす桑葉の影響

普通食群と比較して高脂肪食群では血中トリグリセリド値の上昇が認められたが、500 mg/kg 桑葉投与群では上昇が有意に抑制されていた。また、他の桑葉投与群でも血中トリグリセリド値上昇の抑制傾向が認められた（図 1）。一方、血中インスリン値は高脂肪食摂取により有意に上昇したが、250 および 500 mg/kg 桑葉投与群では正常値まで低下していた（図 1）。なお、血糖値は全群間で差がみられなかった（図示せず）。

2. 1. 3. 肝臓の遺伝子発現に及ぼす桑葉の影響

高脂肪食のみの群と比較して桑葉投与群（500 mg/kg 体重/日）で血中トリグリセリドおよびインスリンの上昇が有意に抑制されたことから、これら 2 群の肝臓におけるトランスクリプトーム

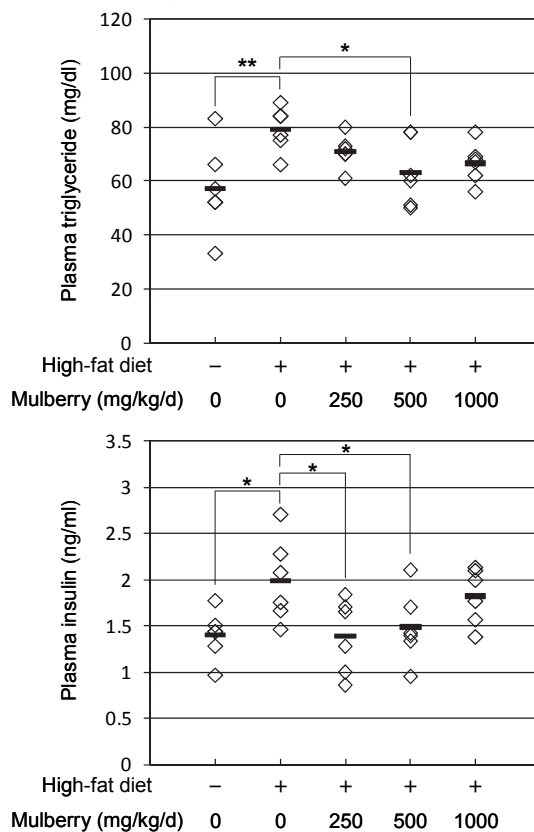


図 1. 高脂肪食給餌ラットの血中トリグリセリドおよびインスリン値に及ぼす桑葉摂取の影響。
— 平均値, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

解析を行った。

その結果、桑葉摂取は脂質および糖質代謝に影響を及ぼしていた（図2）。脂肪酸代謝においては長鎖脂肪酸のβ酸化に関与する遺伝子群の発現量が桑葉投与により増加していた。すなわち、脂肪酸のミトコンドリアへの輸送を担う *Cpt1a* や、ミトコンドリアおよびペルオキシソームにおけるβ酸化の律速段階を触媒する *Acox1*、*Acox2*、*Acadl* および *Acadm* の発現量が桑葉投与により増加していた。また、β酸化の第2、第3および第4段階における触媒酵素や各種異性化酵素も桑葉により発現量が増加していた。このことから、桑葉は飽和および不飽和脂肪酸のβ酸化を促進することが分かった。一方、極長鎖脂肪酸のω酸化に重要な *Cyp4a2* および *Cyp4a3*、分岐脂肪酸のα酸化の律速酵素である *Phyh* の遺伝子発現量も桑葉投与により増加していることから、桑葉はβ酸化のみならずα酸化およびω酸化も亢進することが分かった。また、発現量変動のあった脂質代謝関連遺伝子の多くは転写因子であるペルオキシソーム増殖因子活性化受容体（PPAR）αまたはPPARδの標的遺伝子であった。

一方、糖新生に関与する *G6pc*、*Pc1*、*Pfkfb1*、*Tpi1* および *Gpt1* の遺伝子発現量は桑葉投与により減少していた。さらに、桑葉はグリコーゲンからの糖生成を行う *Pygl* 遺伝子も下方制御した。このことから、桑葉は糖の合成を抑制することによりインスリン抵抗性を改善しているものと考えられた。

2. 2. 高コレステロール血症に対する桑葉ポリフェノール画分の効果

2. 2. 1. 実験試料

桑葉乾燥葉を水抽出後、等量のメタノールを加えて可溶化部を回収した。これを陰イオン交換樹脂（Amberlite IR-120B [H⁺]）処理し、非吸着部を回収した。さらにポリスチレン系合成吸着剤（ダイヤイオン HP20）処理における吸着物を回収し、桑葉ポリフェノール画分として以下の実験に使用した。

2. 2. 2. 実験動物

C57BL/6 Cr Slc 雄マウスに高コレステロール食（コレステロール 2%、コール酸 0.4%）を給餌し、水道水および 0.1 または 1.0 mg/ml 桑葉ポリフェノール画分を給水させた。投与開始から4週間後に血液生化学検査を行い、肝臓を摘出してトランスクリプトーム解析を行った。

2. 2. 3. 血液成分に及ぼす桑葉ポリフェノール画分の影響

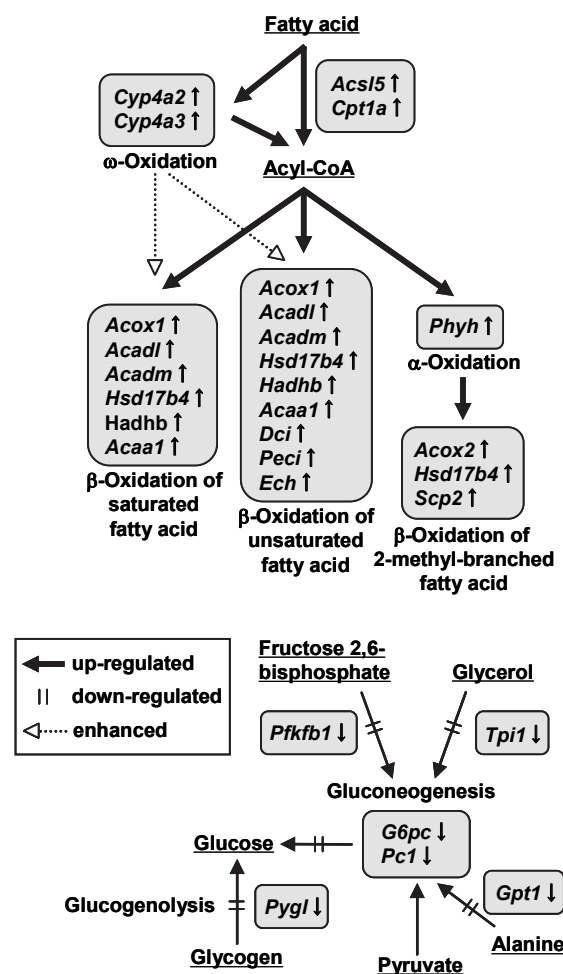


図2. 脂質・糖質代謝経路および桑葉投与により発現量に変動（↑，増加；↓，減少）した遺伝子。

水道水群と比較して 1.0 mg/ml 桑葉ポリフェノール群では血中総コレステロール値が有意に低く、0.1 mg/ml 投与群でも低下傾向にあった（図3）。肝機能パラメーターは、水道水群と比較して血中グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ（GOT）値および血中グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ（GPT）値が両桑葉ポリフェノール群で、血中乳酸脱水素酵素（LDH）値が 0.1 mg/ml 投与群で有意に低い値を示した（図3）。

2. 2. 4. 肝臓の遺伝子発現に及ぼす桑葉ポリフェノール画分の影響

水道水群と比較して 1.0 mg/ml 桑葉ポリフェノール群で血中総コレステロール値および各種肝機能パラメーターが有意に低値を示したことから、これら2群の肝臓におけるトランスクリプトーム解析を行った。その結果、桑葉ポリフェノール投与によりステロイド代謝が抑制されることが判明した。図4にコレステロール合成経路を示す。桑葉ポリフェノール投与群ではコレステロール合成における律速段階を司る *Hmgcr* 遺伝子の

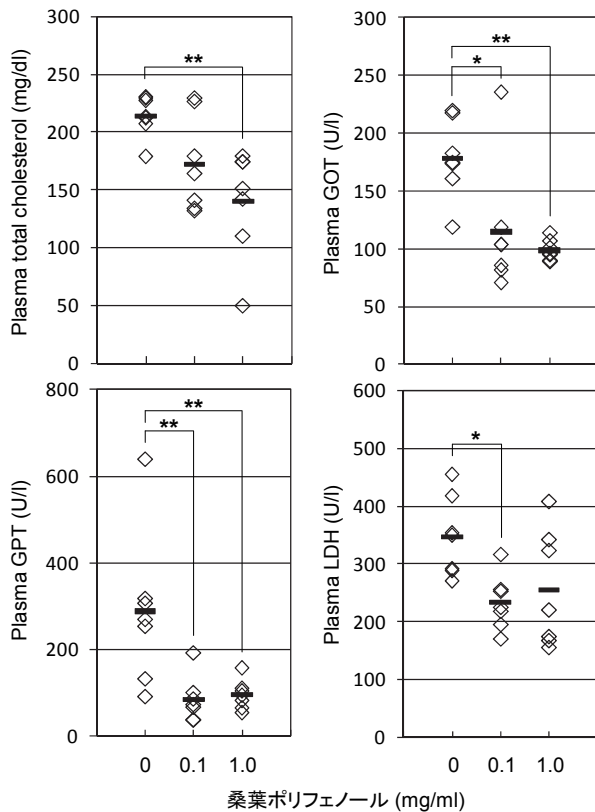


図3. 高コレステロール食給餌マウスの血中パラメーターに及ぼす桑葉ポリフェノール投与の影響。
— 平均値, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

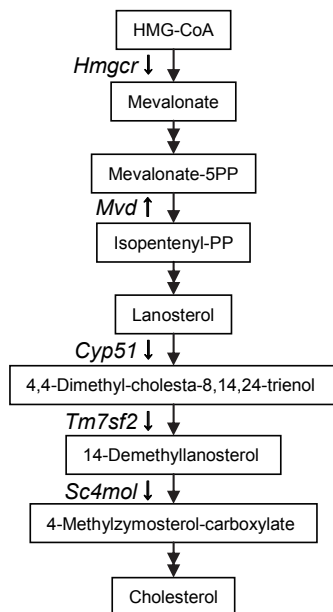


図4. コレステロール合成経路および桑葉投与により発現量が変動(↑, 増加; ↓, 減少)した遺伝子。

発現量低下が確認された。また、lanosterol から 4-methylzymosterol-carboxylate の合成の各段階の触媒酵素をコードする *Cyp51*、*Tm7sf2* および *Sc4mol* の遺伝子発現量も桑葉ポリフェノールの投与により減少していた。これらのことから、桑葉投与群ではコレステロールの合成抑制が起きていると考えられた。

3. 考察及び今後の展望

一つ目の研究により、桑葉には高脂肪食摂取に伴う血中トリグリセリド値上昇に対する抑制効果があることが確認できた。さらに、トランスクリプトーム解析により、桑葉の摂取が脂肪酸の α 、 β および ω 酸化を促進することにより上記の効果を発揮していることが判明した。桑葉は脂質異化における司令塔分子として機能している PPAR α および PPAR δ を活性化して脂肪酸酸化を促進しているものと考えられる。桑葉はケルセチンを豊富に含んでいるが[6, 7]、ケルセチンには PPAR α および PPAR δ に対する活性化能があるため、桑葉の血中トリグリセリド低下作用には少なくともケルセチンが関与しているものと考えられる。

二つ目の研究では、桑葉ポリフェノール投与によるコレステロール代謝異常の進行抑制効果を確認することができた。また、桑葉ポリフェノールには肝臓保護作用もあることが判明した。桑葉はケルセチンを多く含むが[6, 7]、ケルセチンには高コレステロール血症の改善効果があることが報告されている[8]。このことから、桑葉ポリフェノール投与による病態の進行抑制効果の一部にはケルセチンが関与しているものと考えられる。

本研究により、桑葉のもつ高脂血症進行抑制効果のメカニズムを解明することができた。また、これまでの知見からフラボノイドの一種であるケルセチンが生理活性成分の一つであると予想された。今後、ケルセチンなど桑葉中の成分に焦点を当てた研究が必要であるだろう。

〔参考文献〕

1. C. Miyahara, et al., J Nutr Sci Vitaminol, 50, 161-4 (2004).
2. 佐藤修二ら, 機能性食品に関する共同研究事業報告, 1, 45-50 (1992).
3. J. Duarte, et al., Br J Pharmacol, 133, 117-24 (2001).
4. K. Doi, et al., Biol Pharm Bull, 23, 1066-71 (2000).
5. B. Enkhmaa, et al., J Nutr, 135, 729-34 (2005).
6. 土井佳代ら, 日本栄養・食糧学会誌, 52, 85-90 (1999).
7. B. Enkhmaa, et al., J Nutr, 135, 729-34 (2005).
8. Juźwiak, S., Pharmacol Rep, 57, 604-9 (2005).

モデル動物を用いた食品素材のニュートリゲノミクスによる有効性および安全性評価

荒木 真由美、廣川 隆彦、青木 信義、廣井 哲也、瀬戸山 央、大澤 利幸
/神奈川県産業技術センター

1. はじめに

オカラは大豆から豆腐を製造する際に副生し、その産出量は全国で年間約 70～74 万トン（湿重量）^{1,2)}にも及ぶと推定される。オカラには、大豆由来の蛋白質や脂肪が多く残留しており、繊維質も多い。その一部は食用に供される他、飼料としても利用されているが、多くは産業廃棄物として処分されている。廃棄物としては水分を 70%以上含んでいることや変敗しやすいこと、さらには比較的小規模かつ多数の事業者が広く分布しているためにオカラの品質に違いがあること、収集に労力や時間を要すること等が、資源としてオカラを利用するための課題となっていた。しかしながら、2001 年に食品リサイクル法が施行され、食品製造業者には、食品製造時に発生する廃棄物の再利用や活用が義務づけられており、豆腐製造業者もオカラの活用への取り組みが求められている。

一方、大豆については、大豆蛋白や大豆由来ペプチドが抗酸化性^{3,4)}や ACE 阻害活性⁵⁾、血中及び肝臓中脂質の低減⁶⁻⁹⁾などの機能性を示すことが以前より報告されている。大豆由来の蛋白質や繊維質などが多く残留しているオカラは、これらの成分が持つ機能性を活用した食品素材への展開が期待できる。

最近、高脂血症、高血圧、糖尿病、肥満などの生活習慣病の合併症、いわゆるメタボリックシンドロームが問題となっている。これらの生活習慣病の病態が慢性化すると活性酸素が増大し、活性酸素は直接¹⁰⁾或いは低比重リポ蛋白(LDL)の酸化¹¹⁾を介して動脈硬化を発症させると考えられている。通常、体内ではスーパーオキシド・ディスムターゼ(SOD)などの抗酸化酵素やビタミンが、活性酸素を分解して無害化する働きや脂質の過酸化を防ぐ働きをして健康を維持している。喫煙¹²⁾などによって酸化ストレスが増大したり、加齢によってこれらの抗酸化能が低下すると、生活習慣病が悪化したりするといわれている。抗酸化物質を食品の形で取り入れることは、生体内の抗酸化力を高め、健康を維持、改善するために有効であると考えられている。

様々なバイオマス資源から有用物質を得る技術の一つとして、反応性に優れる亜臨界水処理が注目されている。図 1 に、水の状態図を示した。水の臨界点(374.2°C、22.1 MPa)以上の高温、高圧の水を超臨界水と呼び、超臨界に達しない程度 of 高温高圧の水を亜臨界水と呼ぶ。亜臨界水は、超臨界水より分解速度は緩やかだが、なお強い分解力

を有し、バイオマス資源からのペプチドやオリゴ糖などの分解生成物の回収に適している¹³⁾。例えば、亜臨界水によるオカラタンパク質の分解は、様々なペプチドを産生し、その中には抗酸化性を示す新たな機能性ペプチドが存在することが期待できる。

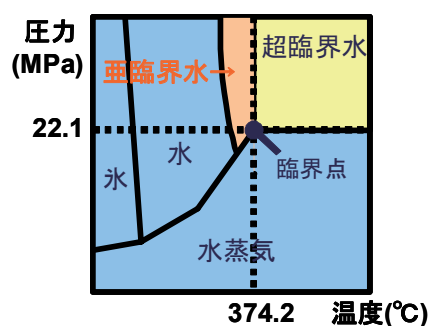


図 1 水の状態図

当センターではバイオマス資源から有用物質を得る技術として亜臨界水処理技術を利用してオカラの液化が可能であること¹⁴⁾やオカラ亜臨界水処理液が、*in vitro*で抗酸化性を有することを報告してきた¹⁵⁾。本研究は、ニュートリゲノミクスの手法を活用してオカラ亜臨界水処理液の機能性及びその作用機構を解明することを目的としたものである。

2. 実験と結果

2. 1. 亜臨界水によるオカラの液化

2. 1. 1. 脱脂オカラの調製

試料に用いた乾燥オカラ粉末は大山豆腐(株)より入手した。オカラに残留する脂質は、亜臨界水分解の段階で遊離し、生成物を可溶分と不溶分に分離する際の妨げとなるので、まず、超臨界二酸化炭素抽出装置((株)AKICO)により、超臨界二酸化炭素でオカラを脱脂処理した。

脱脂前後におけるオカラの成分組成を表 1 に示す。脱脂オカラは、脂質が 4%、タンパク質が約 31%、炭水化物が約 58%を占めている。

表 1 脱脂前後におけるオカラの主な成分 (%)

	炭水化物	蛋白質	脂質	灰分	水分
脱脂前	53.6	28.7	11.6	3.6	2.5
脱脂後	58.1	31.2	4.0	4.0	2.7

2. 1. 2. 脱脂オカラの亜臨界水処理

亜臨界水処理は、連続式超臨界水反応装置（日本分光（株））を用いて行った。装置の構成を、図2に示した。亜臨界水処理には、脱脂オカラを純水で3% (w/v) に調製したスラリーを用いた。予熱水と脱脂オカラスラリーを同量送液し、すなわち反応部内のスラリー濃度を約1.5% (w/v)、反応条件は、温度320℃、圧力25MPa、時間約13秒とした。

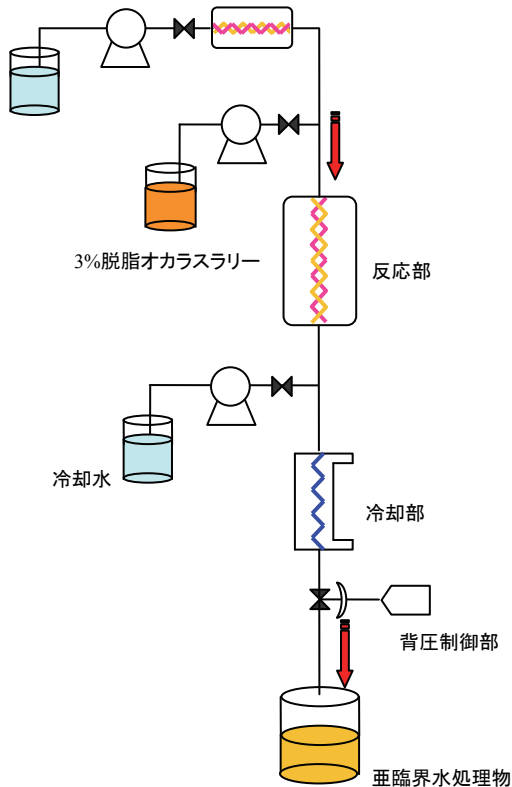


図2 連続式超臨界水反応装置の構成図

得られた亜臨界水処理物を遠心分離し、上清と沈殿物とに分けた。上清を0.2 μm フィルターでろ過したものをオカラ亜臨界水処理液（以後、オカラ SCW とする）として、以後の実験に使用した。

投入したオカラに対する上清及び沈殿物の絶対乾燥重量から、処理後の可溶分率 (%) 及び不溶分率 (%) を求めた。可溶分率と不溶分率を100 から減じた値をロス分率 (%) として算出し、ガス化或いは低沸点の物質に変換されたものとして扱った（全て w/w%）。生成物のうち可溶分率約50%、不溶分率約10%、ロス分率約40%であった。

2. 2. オカラ亜臨界水処理液の *in vitro* における生理活性の評価

SOD Assay Kit-WST (同仁化学研究所 (株)) と 96well マイクロプレートを用い、450 nm における吸光度をマイクロプレートリーダー (バイオラッド (株)) で測定した。反応阻害率が50%となる試料濃度 (IC₅₀) を求め、試料の SOD 様抗酸化性 (SOD 活性) を評価した。IC₅₀ の値が低いほど、抗酸化性が高い。オカラ SCW の SOD 活性 (IC₅₀) は 0.07

mg/mL であった。

オカラ SCW を限外濾過膜を用いて、5 kDa 未満、5~30 kDa、30~300 kDa、300 kDa 以上の4つの画分に分子量分画し、各画分の SOD 様抗酸化活性を調べた (図3) とところ、分子量5 kDa 未満の低分子量画分と分子量300 kDa 以上の高分子画分が高い活性を示した。

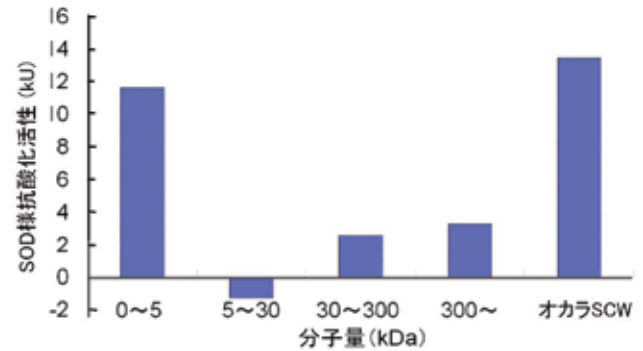


図3 各分子量画分の SOD 様抗酸化活性

2. 3. オカラ SCW を投与した高脂肪食給餌ラットに対する影響 (1)

オカラ SCW を高脂肪食給餌ラットに投与し、8週間に渡り、摂水量及び体重、血中トリグリセリド値の経時変化を検討した。

2. 3. 1. 実験

5週齢の雄性 Fisher F344/N ラット (日本エスエルシー (株)) を用いた。飼料として高脂肪食 (Quick Fat; 粗脂肪分14%、脂肪カロリー比32%; 日本クレア (株)) を与え、2週間の予備飼育の後、2群 (n=6) に分けた。コントロール群 (C 群) には水道水を、オカラ SCW 投与群 (O 群) にはオカラ SCW を、それぞれ自由摂取させ、8週間飼育した。飼育期間中、ケージ毎 (2又は3個体/1ケージ) の水或いはオカラ SCW の摂水量を測定した。2週間毎に体重測定と採血を行い、富士ドライケム 7000i (富士フィルム (株)) により血漿の生化学検査を行った。富士ドライケムスライド TG-PⅢを用いて血漿中のトリグリセリド濃度を測定した。実験データは、Student の t 検定により2群を比較し、P 値が0.05未満の場合に有意であると判断した。

2. 3. 2. 動物投与実験結果

実験期間中における一匹当たりの総摂水量及び体重の変化を検討したところ、O 群では、C 群に比べて1割ほど摂水量が抑制された。しかし、体重については実験期間中、ほぼ同様に増加し、二群間に有意な差は認められなかった。

図4に、0週での値を100%とした血漿中トリグリセリド濃度 (トリグリセリド相対濃度) の変化を示した。実験開始2週間後にC群とO群で有意な差が見られ、C群でトリグリセリド濃度が大きく上昇したのに対し、オカラ SCW 投与群では上昇の度合いが小さく抑えられた。2週から4週

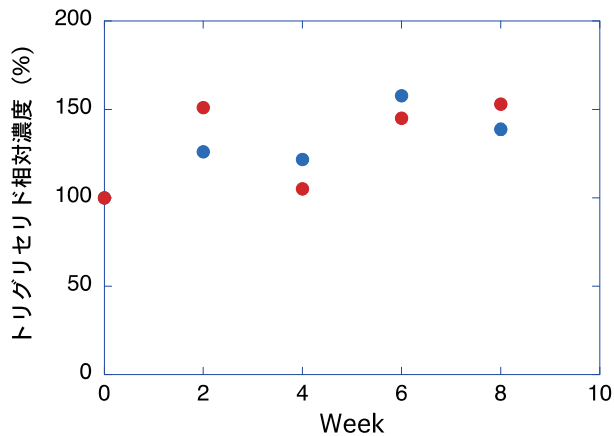


図 4 血漿中トリグリセリドの経時変化 (0 週での値を 100%とした。C 群 ●、O 群 ●)

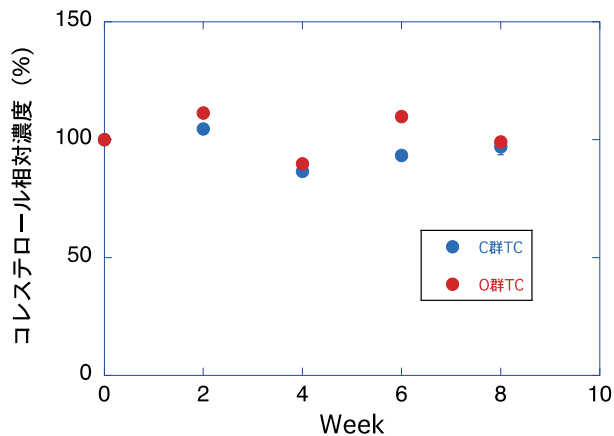


図 5 血漿中コレステロールの経時変化 (0 週での値を 100%とした。C 群 ●、O 群 ●)

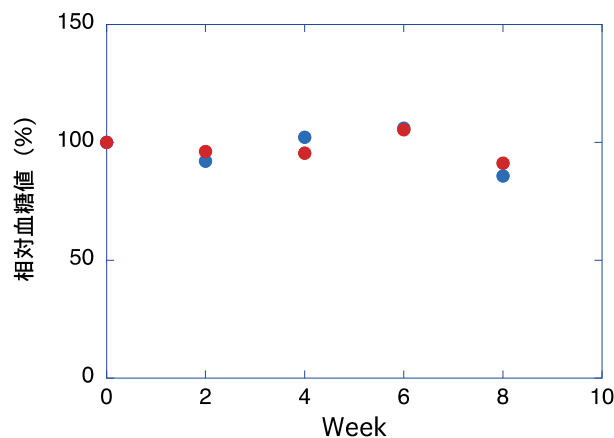


図 6 血糖値の経時変化 (0 週での値を 100%とした。C 群 ●、O 群 ●)

間後の変化は、O 群はほぼ横ばいだったが、C 群では大きく低下し、有意な差は無くなった。6 週以降は両群ともほぼ同様に推移し、有意差は無かった。血漿中コレステロール (図 5) に関しても、図 4 と同様に初期の値に対する相対値を示した。実験期間中、二群の総コレステロール値に有意な差は観察されなかったが、概ねオカラ SCW 投与群が低い傾向で推移した。HDL-C については図を割愛するが、両群に有意な差は見られなかった。一方、また、血糖値 (図 6) についても、C 群と O 群はほぼ同様に推移し、有意な差は認められなかった。

2. 4. オカラ SCW を投与した高脂肪食給餌ラットに対する影響 (2)

2. 4. 1. 実験

実験には、7 週齢の雄性 Fisher F344/N ラット (日本エスエルシー (株)) を用い、2 群に分けて使用した。両群とも、普通食と水道水で 1 週間、予備飼育を行った後、前項と同じ高脂肪食 (Quick Fat、日本クレア (株)) を給餌し、コントロール群 (C 群、n = 10) には水道水を、オカラ SCW 投与群 (O 群、n = 11) にはオカラ SCW を自由摂水させた。1 週間毎に採血を行い、2. 3 と同様に血漿中のトリグリセリド濃度を測定し、また NEFA C-テストワコー (和光純薬工業 (株)) を用いて遊離脂肪酸濃度を測定した。4 週間目の採血を行った 2 日後にそれぞれ 7 匹を解剖し、血清および肝臓を採取した。肝臓はメタノールクロロホルム法により脂質を分画後、トリグリセリド E-テストワコー (和光純薬工業 (株)) を用いてトリグリセリド濃度を測定した。また、Kikugawa らの方法¹⁶⁾を参考にして血清中のチオバルビツール酸反応性物質 (TBARS) 濃度を測定した。4 週間後の解剖を行わなかったラットについては、飼育を継続し、9 週目まで体重や血漿中トリグリセリドの濃度を測定した。実験データは、Student の t 検定により 2 群を比較し、P 値が 0.05 未満の場合に有意であると判断した。

2. 4. 2. 結果

2. 3 の実験では、予備飼育期間に高脂肪食を与え、予め負荷を与えた状態で動物実験を開始したが、本実験では、予備飼育期間には普通食を与え、高脂肪食とオカラ SCW の投与を同時に開始し、特段の負荷が無い状態からオカラ SCW の効果を観察することにした。

体重については、前項の実験と同様、両群ともほぼ同様な体重の増加を示し、有意な差は認められなかった。4 週目以後に飼育を継続した個体についても、体重の差は観察されなかった。

一方、血漿中のトリグリセリドについては、3 週目まではオカラ SCW 群とコントロール群でほぼ同様に推移し、有意な差は認められなかったが、4 週目にオカラ SCW がコントロール群に比べて有意に低い値を示した。4 週以後、継続を飼育した匹数が少ないものの、解剖せず飼育を継続した 9 週目までオカラ SCW がコントロール群に比べて低い傾向が継続した。また、解剖した 2 群各 7 匹のラットについて、血漿中の遊離脂肪酸及び肝臓中のトリグリセリド濃度

とコレステロール濃度を測定した(表2)。血漿中の遊離脂肪酸濃度は、コントロール群に対し、オカラ SCW 投与群は約80%程度の低い濃度となり、有意な差が認められた。肝臓中のトリグリセリドとコレステロールについては、いずれも有意ではないもののコントロール群に比べてオカラ SCW 群で約20%程度低い値となり、血漿中の遊離脂肪酸とほぼ同様の傾向が見られた。

表2 オカラ SCW 投与が種々の生化学パラメータに及ぼす影響

	[O 群の値]/[C 群の値] (%)
血漿中遊離脂肪酸濃度	81
肝臓中トリグリセリド	81
肝臓中コレステロール	78

大豆蛋白には、従来から血漿中トリグリセリド濃度の低減効果が報告⁶⁻⁹⁾されており、その作用機序の一つとして、脂肪酸の分解酵素である Acetyl-CoA oxidase の発現を活性化することが提案されている⁸⁾。そこで、オカラ SCW の脂質代謝改善の効果のメカニズムについて検討するため、実験に使用したラットの肝臓中の Acetyl-CoA oxidase の量を測定した(表3)。両群に有意差は無かったものの、O 群は C 群と比較して10%程度高い値を示した。

表3 オカラ SCW が肝臓中の Acetyl-CoA oxidase 活性に及ぼす影響

	[O 群の値]/[C 群の値] (%)
Acetyl-CoA oxidase 活性	112

2.2で述べたように、オカラ SCW は *in vitro* での評価において高い抗酸化性を示しており、動物実験においても抗酸化性に関する知見を得るため、血漿中の TBARS 濃度を検討した(表4)。血清中の TBARS 濃度については、トリグリセリド濃度と同様に有意差はないもののO群でC群より20%ほど低い傾向が見られた。

表4 オカラ SCW が血漿中の TBARS 濃度に及ぼす影響

	[O 群の値]/[C 群の値] (%)
TBARS 濃度	77

2.4.3. 遺伝子発現の測定と解析

2.2.1の各群3匹を選択して、RNAiso Plus (タカラバイオ(株))とポリトロンホモジナイザーを用いて肝臓から total RNA を抽出した。total RNA は RNeasy Mini Kit ((株)QIAGEN)を用いたスピンカラム処理及びエタノール沈殿により精製した。

GeneChip® One-Cycle Target Labeling and Control Reagents 及び GeneChip® Hybridization, Wash and Stain

Kit (Affymetrix (株))を用い total RNA 中の mRNA を鋳型としてビオチニル化 cRNA を調製、断片化後、GeneChip® Rat Genome 230 2.0 array (Affymetrix(株))へのハイブリダイゼーションを行った。反応終了後、洗浄し、チップ基盤上のオリゴ DNA とハイブリダイズした cRNA をストレプトアビジン結合の蛍光色素で染色した後、GeneChip® Scanner 3000 7G System (Affymetrix(株))を用いて全遺伝子発現量を測定した。

得られた全遺伝子(31,099 probe set)の発現強度測定データ (CEL data) を、統計解析環境 R を利用して、Micro Array Suite (MAS5)アルゴリズムで正規化した。発現強度が弱い probe set を除く目的で、全個体の平均発現強度が100以上である probe set を選別した。各群の平均発現強度について t 検定を行い、p 値が 0.05 未満の probe set を選抜した。この probe set について、インターネット上の解析ツールである The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) Bioinformatics Resources (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>)を用いた annotation enrichment analysis を行った。すなわち、probe set に付随する Biological Process 情報について Functional Annotation Chart による Enrichment 解析を行い、危険率の指標であるフィッシャーの正確確率検定の変法にて導き出された P-Value が 5% 未満であった項目を選抜した。

Enrichment 解析の結果、発現が増加した遺伝子では、アルコール代謝、薬物への応答、タンパク質のリン酸化などの因子の濃縮度が高く、発現が減少した遺伝子では脂肪酸代謝、代謝物前駆体とエネルギー生成、ATP 合成共役プロトン輸送、酸化的リン酸化、細胞内高分子複合体の集合などの因子の濃縮度が高かった。

2.5. オカラ SCW のマウス肝機能に与える影響

2.5.1. オカラ SCW の高コレステロール食給餌マウスへの投与実験

オカラ SCW の肝機能への影響についてさらに評価するため、高コレステロール食給餌マウスへの投与実験を実施した。オカラ SCW は、320℃、25MPa、14.4 秒の条件で調製したもの(固形分濃度 0.4%)を使用した。

5 週齢の雄性 C57BL/6 CrSlc マウス (日本エスエルシー(株))を用い、3 群に分けて飼育した。普通食である CE-2 (日本クレア(株))と水道水で 5 日間予備飼育した後、高コレステロール食群(以下、C 群)及びオカラ SCW 群(以下、O 群)には高コレステロール食である D15001 (コレステロール 2%、コール酸 1%、ヤシ油 5%、日本クレア(株))を給餌すると共に、高コレステロール食群には水道水を、オカラ SCW 群にはオカラ SCW を自由摂水させ、6 週間飼育した。コントロールとして、普通食群(以下、N 群)は CE-2 と水道水で飼育した。6 週間後の体重を測定し、解剖、心臓から採血した。肝臓重量を測定後、組織の一部を RNAlater 処理し、冷凍保存した。コレステロール E-テストワコー (和光純薬工業(株))を用いて肝臓中コレステ

ロール濃度を測定し、富士ドライケム 7000i（富士フィルム（株））を用いて血漿中の総コレステロール、HDLc、トリグリセリド、GOT、GPT、ALP、LDH、総ビリルビン（TBIL）の測定を行った。実験データは、Tukeyの多重比較検定により3群間の比較を行い、P値が0.05未満の場合に有意であると判断した。

2. 5. 2. 体重、肝臓の所見および生化学検査

N群のマウスの肝臓は赤い正常な色であったが、C群では白みがかかった色を呈し、O群では両群の中間の色であった。また、高コレステロール食投与の二群において胆嚢の肥大とコレステロール結晶と思われる固体の析出が見られたが、C群と比較するとO群ではその数は少なかった。N群およびO群における体重及び肝臓重量の変化を表5に示した。表5では、N群に対して有意に増加あるいは減少した場合にそれぞれ「+」または「-」、さらにC群とO群間で有意な差が認められた場合に程度の大きい方を「++」または「--」と表記した。表5では、高コレステロール摂取により、C群で体重の低下と肝臓重量の増加が生じたが、オカラSCWの摂取により、体重の低下は抑制され、肝臓重量はC群と同様であった。O群ではコレステロール食による体重の減少が有意に抑制されたが、肝臓重量の増加についてはC群と有意な差はなかった。

表5 体重と肝臓重量に対する高コレステロール食及びオカラSCWの影響

	C群	O群
体重	--	-
肝臓重量	+	+

N群に対し、- 減少、--著しく減少、+増加、++著しく増加

その他の肝機能関連の血漿の生化学検査の結果を表6に示した。N群とC群を比べると、総コレステロール、GOT、GPT、LDH、ALPについて値の著しい上昇が見られ、血漿中トリグリセリド値は低下した。C群とO群を比較すると、いずれの値もコレステロールによる変化がオカラSCW飲水により、緩和される傾向が観察され、すなわち、GOT、GPT、LDHは低下した。同様に、ALPについても、O群は低下傾向であった。血漿中トリグリセリドや血漿中ALPの上昇についてもC群とO群で有意な差は認められなかったが、

表6 体重と肝臓重量に対する高コレステロール食及びオカラSCWの影響

	C群	O群
血漿中総コレステロール	+	+
血漿中トリグリセリド	-	-
血漿中GOT	++	+
血漿中GPT	++	+
血漿中LDH	++	+
血漿中ALP	+	+

N群に対し、- 減少、--著しく減少、+増加、++著しく増加

緩和傾向は観察された、肝臓重量、肝臓中コレステロール、血漿中コレステロール、血漿中HDLc、血漿中TBILへのオカラSCWの影響はなかった。

2. 5. 3. DNAマイクロアレイによる評価

高コレステロール食を給餌したマウスの肝臓を試料として、オカラSCWの効果を検討した。2. 5. 1. のC群及びO群から各群3匹を選択して、2. 4. 3. と同様の試薬とマルチビーズショッカー（安井器械（株））を用い、肝臓からtotal RNAを抽出、精製した。Quick-Amp Labeling Kit（1カラー）（Agilent Technologies（株））を用い、total RNA中のmRNAを鋳型として増幅、Cy3ラベル化した。Expression Hybridization Kit（Agilent Technologies（株））を用い、Whole Mouse Genome Array（4x44K）とハイブリダイズ後、洗浄してAgilent microarray scannerにてスキャンした。得られた画像をFeature Extraction Software（Agilent Technologies（株））で数値化後、GeneSpring（Agilent Technologies（株））で75 percentile法により正規化した。正規化したデータはExcelでt検定を行い、p値が0.05未満のprobe setを選抜した。以降、2. 4. 3. と同様に行った。

高コレステロール食を投与し、水道水を摂取したC群と比較すると、発現が上昇あるいは、減少した遺伝子のうち、因子の濃縮度が高かった機能項目は以下のとおりであった。

●発現上昇

- ・器官発達
- ・炎症応答
- ・有機酸代謝
- ・脂質代謝
- ・アルコール代謝
- ・ncRNA代謝
- ・グルタチオン代謝

●発現減少

- ・ncRNA代謝
- ・有機酸代謝
- ・ケトン代謝
- ・アミン代謝
- ・脂質代謝
- ・グルタチオン代謝
- ・翻訳制御
- ・アルコール代謝
- ・タンパク質局在

また、O群において、コレステロール合成の律速酵素に関する遺伝子やコレステロールから胆汁酸への生合成経路の初期段階を触媒する酵素に関する遺伝子の発現が共に上昇していた。その他、脂肪酸合成の律速酵素に関する遺伝子の発現が上昇していた。

一方、脂肪酸の代謝経路であるβ酸化の律速酵素に関する遺伝子の発現が減少していた。

3. 考察及び今後の展望

3. 1. オカラ亜臨界水処理由来高分子生理活性物質の評価

我々のグループは、オカラSCWがSOD様抗酸化活性を示すことを報告している¹⁵⁾。本研究では、抗酸化活性がどのような物質によるものかを明らかにするため、いくつかの検討を行った。本研究で調製したオカラSCWのSOD活性(IC₅₀)は0.07 mg/mLであった。緑茶に相当する程度のSOD活性と見積られる。さらに、オカラSCWを分子量分画し、

各分子量画分のSOD様抗酸化活性を検討したところ、単位重量あたりの活性は低分子量画分と高分子量画分で高いことがわかった。各画分の分子量を考慮すると、分子量300 kDa以上の高分子量画分が、1分子あたりの抗酸化能が非常に高いことが推測される。低分子量の画分の抗酸化性は、イソフラボン等や様々なペプチドに由来することが推測されるが、このような高分子量で高い抗酸化性を示す物質は非常に興味深い。高い抗酸化性を示す高分子量の物質としては、ペクチンやポリフェノール-高分子複合体が想定されるので、ペクチン及びポリフェノールの分析を試みた。ポリフェノールはカテキン相当量として、ペクチンは、ペクチナーゼ作用後のガラクトツロン酸として、それぞれ分析したところ、高分子量画分にどちらも含まれていることがわかった。

また、オカラの亜臨界水処理の際に高温下での反応によって、オカラ中の大豆蛋白質と糖類からメラノイジンが生成する可能性がある。モデル実験として、大豆蛋白質とペクチンを予め混合してから亜臨界水処理した試料(試料A)と大豆蛋白質とペクチンをそれぞれ別個に亜臨界水処理した後混合した試料(試料B)の2つについて、メラノイジンが強い吸収を示す450 nm以下の吸光度とSOD様抗酸化活性を比較した。その結果、試料Aで吸光度が高く、SOD様抗酸化活性が高い傾向が見られた。すなわち、大豆蛋白質とペクチンが共存している場合、亜臨界水処理によってメラノイジンが生成することを示唆する結果となった。

ペクチンやポリフェノール、メラノイジンに関するこれらの検討では、具体的な成分の特定には至っていないが、オカラを亜臨界水で処理する際に高分子量の様々な抗酸化性物質が生じ、オカラSCWの高い抗酸化性に寄与していることが強く示唆された。

3. 2. 高脂肪食給餌ラットに対するオカラSCWの影響(1)

動物実験では、オカラSCWによって、摂水量が若干抑制されることがわかった。本実験では摂餌量を測定していないが、体重への影響は見られなかったため、摂餌量に対するオカラSCWの影響はないものと思われる。

高脂肪食摂取に伴うラットの血漿中のトリグリセリド濃度の上昇に対して、一時的に抑制効果があることが観察された。投与実験の期間全体のトリグリセリド濃度の変化に注目すると、コントロール群に比べオカラSCW投与群では変動が小さかった。コントロール群では、高脂肪食によってトリグリセリド濃度が大きく上昇し、その後ホメオスタシスが働き、トリグリセリド濃度が低下したことが推測される。すなわち、オカラSCWの摂取によって血中トリグリセリド濃度の急激な上昇を抑え、それにより生活習慣病の一つである高トリグリセリド血症の進行を遅らせることができる可能性がある。

本実験では、コレステロール値や血糖値についても検討したが、これらの値については、オカラSCWの効果は確認されなかった。

3. 3. 高脂肪食給餌ラットに対するオカラSCWの影響(2)

前項の実験では、予備飼育期間に高脂肪食を与え、予め実験動物に負荷を与えた後にオカラSCWの投与を開始した。これに対し、本項では、予備飼育期間に普通食を与えた後、高脂肪食とオカラSCWの投与を同時に開始し、高脂肪食の負荷が無い状態からオカラSCWの効果を観察することによって、メタボリックシンドローム等の予防に対する効果を検討することにした。本実験においては、各群10匹程度で実験を開始し、4週間後に各群7匹を解剖したが、残りのラットについては9週目まで飼育して採血し、血液検査を継続した。従って、4週目以後の実験については各群とも個体数が少ない条件で得られた結果である。

前項と同様、体重についてはオカラSCWの影響は無く、摂水量については若干の抑制が観察された。血漿中のトリグリセリド値は、4週目に有意にオカラSCW群が低い値となり、採血の2日後に解剖した。飼育を継続した動物の血液検査結果を見ると、4週目以後も血漿中のトリグリセリド値は引き続きオカラSCW群が低い結果が続いた。4週目に解剖した動物の血漿中の遊離脂肪酸濃度や肝臓中のトリグリセリド、コレステロール値はいずれも約20%程度SCW群が低い結果となった。大豆由来の蛋白質、特に β -conglycininについて、従来から脂質代謝の改善効果が報告されている⁸⁾。本研究でオカラSCWのGPC分析を行ったところ、亜臨界水処理条件で分子量分布に違いがあるものの、本研究の動物実験に使用したオカラSCWについては、分子量50kDa以下の成分が検出されるのみであった。このことから、 β -conglycininやそのサブユニットが残留していることはなく、おそらく様々なペプチドに分解していることが示唆された。 β -conglycininの脂質代謝の改善のメカニズムとしては、肝臓中のAcetyl-CoA oxidaseの発現が増加することが報告⁸⁾されており、本研究でも、ラットの肝臓中のAcetyl-CoA oxidaseの発現測定を行った。有意差は無かったものの、オカラSCW投与群ではコントロール群に比べて10%程度高い値を示した。ただし、後述のDNAマイクロアレイによる検討においては、Acetyl-CoA oxidaseに関する明確な遺伝子発現の変化は認められなかった。

*in vitro*での評価において、オカラSCWが高い抗酸化性を示すことが、2.2で述べた実験や我々の研究¹⁴⁾で明らかになっている。本実験で観察された血中トリグリセリドの上昇抑制が抗酸化性による効果なのかどうかを検討する実験として、血中の過酸化脂質濃度を調べたところ、有意差はないものの、やはり20%程度TBARS濃度がオカラSCW群で低い結果となり、抗酸化性が一つの原因であることが示唆された。

3. 4. 高脂肪食給餌ラットに対するオカラSCWの影響(3) —遺伝子発現

高脂肪食給餌ラットに対してオカラSCWを摂取させることにより、コントロール群と比較して血漿中トリグリセリド濃度及び遊離脂肪酸濃度、肝臓中トリグリセリド量が

抑制される傾向を示した。これらの結果から、オカラ SCW は体内の脂質濃度を抑制する効果があることが明らかになった。一方、DNA マイクロアレイによる評価結果からは、オカラ SCW 摂取による脂肪酸代謝関連遺伝子の発現亢進は見られなかった。このことから、オカラ SCW による脂質濃度抑制の理由としては、脂質の代謝亢進でなく、食物繊維の効果などによって、腸管からの脂質吸収を抑制することが考えられる。

3. 5. 高コレステロール食給餌マウスに対するおけるオカラ SCW の影響

高コレステロール食を投与した場合、肝臓が肥大するとともに白く変色し、また、血液検査の結果からも肝機能が悪化したことがわかった。高コレステロール食によって体重の減少も認められ、このメカニズムは明確ではないが、高コレステロール食によって引き起こされた肝機能の悪化が体重減少の間接的な原因である可能性がある。オカラ SCW を投与すると、体重の低下や肝臓の変色等がいずれも軽減される傾向が認められたが、肝臓の肥大については、効果が認められなかった。高橋らが、0.5%のコレステロールを含む餌を与えたラットに対してオカラを与え、その効果を検討している⁷⁾が、高橋らの研究では、コレステロール食による肝臓の肥大は認められておらず、本研究のコレステロール量大きな負荷となって肝臓の肥大を引き起こしているものと考えられる。肝臓中及び血漿中のコレステロール濃度もオカラ SCW の効果は認められず、また、血漿中トリグリセリド濃度は高コレステロール食によって低下した。前述の高橋らの研究でも、オカラの摂取により血漿中のトリグリセリドが低下することが報告されているがこのトリグリセリド濃度の低下のメカニズムはわかっていない。

肝機能のパラメータである、GOT、GPT、LDH、ALP の悪化については、いずれも高コレステロール食による影響を軽減しており、オカラ SCW を摂取することによる効果が認められた。

DNA マイクロアレイを用いて、ラット肝臓の遺伝子発現を検討したところ、脂質代謝関連遺伝子の発現が変動していた。オカラ SCW 投与群において、コレステロール合成の律速酵素に関する遺伝子と、コレステロールから胆汁酸への生合成経路で重要な役割を果たす遺伝子の発現が共に上昇していたことから、高コレステロール食を与えたマウスにおいて、オカラ SCW はコレステロールを胆汁酸に変換して体外に排出することを促進し、肝臓の負担を軽減していることが推測される。また、オカラ SCW に含まれる食物繊維が、コレステロールなどの脂質の吸収を阻害する可能性もあり、これも肝臓の負担を軽減し、高コレステロール食を原因とする肝機能の低下を抑制していた可能性もある。

3. 6. 今後の展望

本研究により、*in vitro* での様々な評価と DNA マイクロアレイによる評価を含む動物実験により、オカラ SCW の

機能性が明らかになってきた。オカラ SCW は高い抗酸化性を示しており、本研究では高分子量の成分に着目してペクチン由来の抗酸化成分を推定した。低分子量画分にも抗酸化性物質が含まれており、今後、低分子量の抗酸化成分を検討することで、有用な物質が見つかることを期待される。

オカラ SCW は、高コレステロール食を投与したマウスに対して、過度のコレステロール摂取の影響を緩和し、肝機能の維持に有意な効果を示した。DNA マイクロアレイの結果から、そのメカニズムとしては、胆汁酸合成の促進によってコレステロールの代謝を活発にしていることが推定された。今後、オカラ SCW の機能性をさらに検証するため、オカラ SCW 中の食物繊維量やリパーゼ阻害活性を詳しく検討するとともに、DNA マイクロアレイによって評価したいと考えている。

当センターでは、本研究プロジェクトに参加することによって蓄積された食品の機能性評価に関する知見を生かし、新たな機能性食品素材を開発することに取り組むとともに、食品関連企業の支援に役立てていく予定である。

【参考文献】

1. 「有機廃棄物資源化大事典」, 有機質資源化推進会議編, 農山漁村文化協会, pp.199 (1997) .
2. 渡辺篤二, 農林水産研究ジャーナル, **17** (8), 6 (1994) .
3. H. -M. Chen, K. Muramoto, and F. Yamauchi, *J. Agric. Chem.*, **43**, 574 (1995).
4. Asako Takenaka, H. Annaka, Y. Kimura, H. Aoki, and K. Igarashi, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **67** (2), 278 (2003).
5. 山内文男, 陳俊榮, 村本光二, 岩淵せつ子, 浅野三夫, 末綱邦男, 大豆たん白質研究会会誌, **15**, 22(1994).
6. 福田満, 杉原好枝, 伊藤みどり, 堀内理恵, 浅尾弘明, 日本食品科学会誌, **53** (4), 195(2006).
7. 高橋時夫, 宮澤陽夫, 藤本健四郎, 金田尚志, 日本栄養・食糧学会誌, **39** (5), 377(1986).
8. T. Moriyama, K. Kishimoto, K. Nagai, R. Urade, T. Ogawa, S. Utsumi, N. Maruyama, and M. Maebushi, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68** (2), 352 (2004).
9. H. Aoki, K. Kimura, K. Igarashi, and A. Takenaka, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70** (4), 843 (2006).
10. D. G. Harrison, *J. Clin. Invest.*, **100**(9), 2153(1997).
11. M. E. Haberland, D. Fong, and L. Cheng, *Science*, **241**, 215(1988).
12. Y. Yamaguchi, S. Matsuno, S. Kagota, J. Haginaka, M. Kunitomo, *Atherosclerosis*, **156**, 109(2001).
13. 廣川隆彦, フードケミカル, 6月号, 39(2008).
14. 廣川隆彦, 廣井哲也, 青木信義, 村上小枝子, 産業技術センター研究報告, **13**, 53 (2007) .
15. 廣川隆彦, 廣井哲也, 青木信義, 村上小枝子, 竹中哲夫, 日本食品科学工学会第54回大会(口頭発表, 2007)
16. K. Kikugawa, T. Kojima, S. Yamaki, H. Kosugi. *Anal. Biochem.*, **202**, 249(1992).

メープルシロップを例とする常用嗜好食品の 健康機能性・安全性評価

渡部 由貴

1. 背景

メープルシロップはサトウカエデなどの樹液を濃縮した甘味料で、世界シェアの約8割がカナダ産のものである。メープルシロップにはグレードが存在し、収穫時期が早く、透過率の高いものからエキストラライト、ライト、ミディアム、アンバー、ダークの5段階に格付けされている(図1)。それぞれ、色や香りが少しずつ異なる。いずれのグレードであってもメープルシロップは日常的に使用される甘味料である。

炭水化物を単糖に分解し、小腸への吸収に働く酵素(α -グルコシダーゼ)の活性を、カエデ樹液が阻害するという *in vitro* 実験の報告がある(1)。このことから、メープルシロップに生体内での血糖値を下げる効果が期待されるが、その摂取が生体に及ぼす影響についての *in vivo* 実験の報告はない。本研究では、メープルシロップの健康機能性評価のため、ラットにこれを与える実験を行った。今回実験に使用したグレードはミディアムであり、日本でも菓子などによくつかわれている、ポピュラーなものである。

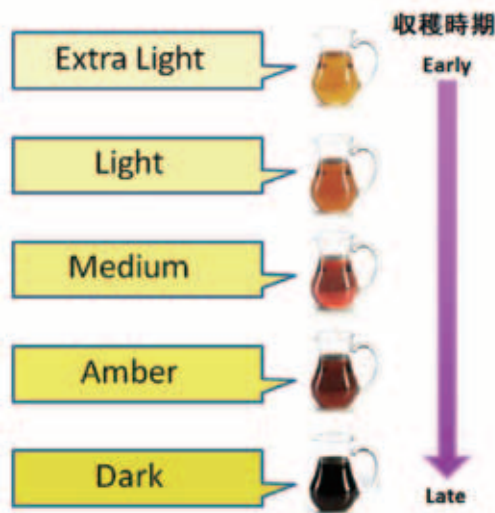


図1. メープルシロップのグレード

メープルシロップの組成はスクロース 66.2%、グルコース 0.5%、フルクトース 0.3%であり、全体の約70%がこれらの糖で、約30%が水である(図2)そのほかにポリフェノール(2)、ミネラル、アミノ酸等が微量含まれている(図2)。本研究室では、この微量成分の健康機能性に着

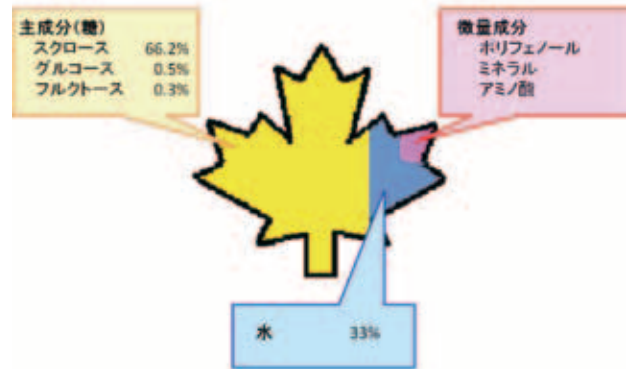


図2. メープルシロップの配合比

目した。微量成分の同定、単離が现阶段では困難であるため、次の方法にて評価を行うことにした。メープルシロップの糖と水と、同じ配合比の砂糖水溶液を作成、砂糖水溶液とメープルシロップをそれぞれ混ぜた粉餌を調製し、ラットに給餌して、その2つを比較する実験を行った。これによりメープルシロップの固有成分の機能性が解明できると考えたからである(図3)。

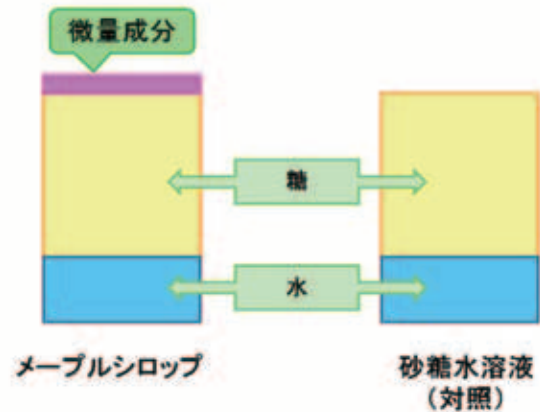


図3. メープルシロップ食と砂糖水溶液食

2. 実験と結果

げっ歯類の成長用標準飼料である AIN-93G をベースに、メープルシロップまたは砂糖水溶液を 20%混ぜた餌を作製した。前者をメープルシロップ食、後者を砂糖水溶液食とした。まず、ラットがメープルシロップ食や砂糖水溶液食を好むかどうかを明らかにするための実験を行った。続いて、その結果を検証するための実験を行った。

2. 1. 1. 動物飼育

Wistar 系雄性ラット 3 週齢 (n = 3) を、4 日間の予備飼育後、2 群に分け、それぞれにメープルシロップ食と砂糖水溶液食を 11 日間与えた。16 時間絶食後、12 日目に解剖を行った。頸動脈から血液を採取し、血糖値や中性脂肪などの血中成分は 31 項目について測定した。2 群間の統計的な差は Student' s t-test によって確認した。p < 0.05 を統計的に有意であると判断した。

2. 1. 2. 結果

メープルシロップ食群と砂糖水溶液食群の 2 群間で体重、総摂食量に差はなかった。このことから、ラットはスクロース同様、メープルシロップも好んで食べることがわかった。

血中成分のうち、臓器障害時に上昇するマーカー分子の一部が、砂糖水溶液食群に比べ、メープルシロップ食群で有意に減少していた。

2. 2. 1. 動物飼育

動物飼育の条件は 2-1 と同様に行い、各群ラット数を増やして (n = 8) 実施した。血中成分は 31 項目について測定した。2 群間の統計的な差は Student' s t-test によって確認した。p < 0.05 を統計的に有意であると判断した。

2. 2. 2. 結果

メープルシロップ食群と砂糖水溶液食群の 2 群間で体重、総摂食量に差はなかった (図 4)。

血中成分のうち、2-1 と同様の臓器障害マーカー分子が、砂糖水溶液食群に比べ、メープルシロップ食群で有意に減少していた。

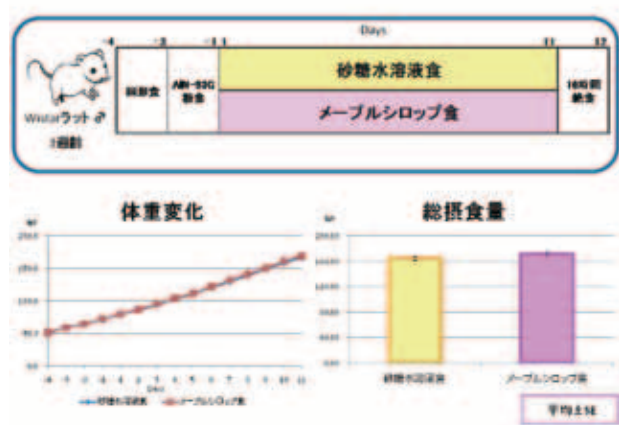


図 4. 動物飼育詳細と結果

3. 考察

血中成分の解析結果から、メープルシロップに臓器障害緩和作用があることが示唆された。

現段階では、臓器障害緩和作用に関与する成分やその作用機構などは不明である。しかし、主成分である糖と水の比率を模倣した砂糖水溶液を比較対象としたことから、臓

器障害緩和作用はメープルシロップの微量成分であるポリフェノール、ミネラル、アミノ酸等の単体成分、もしくは複数の成分による相互作用 (相加、相乗、拮抗作用) によって生じた現象であると考えられる。

臓器障害緩和作用はラットの食事の 20% をメープルシロップに置き換えて摂取することで初めて明らかになった作用である。しかし、ラットが摂取したメープルシロップの量を人間の食生活に置き換えると、非常に多くの量を摂取することになる。食事量から換算すると 100~200 g、体重当たりに換算すると 50 kg の人で 1 kg という量である。この量のメープルシロップを毎日摂取するのは困難である。そこで現在、メープルシロップの水溶性画分 (糖や水) をほぼ除去した、ブタノール抽出物 (2) を用いた実験も検討中である。ブタノール抽出物はメープルシロップの約 0.7% を占める。これにメープルシロップと同様の機能性が確認されれば、機能性成分のみを濃縮して摂取することが可能となり、サプリメントや、他の食品への応用が期待できる。

今回明らかになった臓器障害緩和作用は、ラットの臓器等に負荷をかけずに得られたが、臓器障害緩和作用を検証するためには、臓器に負荷をかけて、障害を誘導した状態で、同様の効果が得られるかを調べる必要がある。そして、メープルシロップ内の有効成分を同定することも、今後の課題である。

This project was supported by the Conseil pour le développement de l'agriculture du Québec (CDAQ), with funding provided by Agriculture and Agri-Food Canada's Advancing Canadian Agriculture and Agri-Food (ACAAF) program. The Federation of Quebec Maple Syrup Producers participated in the collection and donation of maple syrup samples from Quebec and Canada.

この研究は、カナダ農務・農産食品省のカナダ農務・農産食品推進プログラム (ACAAF) から財政的援助をうけたケベック農業開発評議会 (CDAQ) からの援助によるものです。ケベック・メープル製品生産者協会は、ケベックおよびカナダのメープルシロップをサンプルとして集め、提供しました。

1. 生理活性フェノール性化合物およびそれを含有してなる食品
特開 2006-8523 (P2006-8523A)
特願 2004-183433 (P2004-183433)
2. Liya Li, Navindra P. Seeram *J Agric Food Chem.* 58(22):11673-11679.(2010)

ラット肝臓遺伝子発現プロファイル解析による

鉄摂取量安全性基準のアセスメント

亀井 飛鳥

1. はじめに

鉄はマイクロ栄養素の1つであり、酸素の運搬担体として、また様々な酵素の補欠分子として、生体機能を正常に保つために必須のミネラルである。鉄は摂取量の低下などによって欠乏した状態が続くと、やがて貧血に至る。一方で、過剰に蓄積すると貯蔵臓器に酸化ダメージを与えることが知られている。すなわち、鉄が欠乏状態、過剰状態のいずれの場合にも、身体はダメージを受ける。

鉄の摂取量が低下することで起こる鉄欠乏や、鉄の過剰摂取が身体に及ぼす影響についての研究はこれまでも実施されている。しかし、様々な代謝系や細胞機能への影響を網羅的に解析した報告はほとんどない。つまり、鉄欠乏や鉄過剰状態において、これまで着目されていない代謝系や細胞機能においても変化が起こっている可能性がある。鉄の摂取量が低下すること、また摂取量が過剰になることの安全性を評価するためには、この未解明の代謝系や細胞機能の変化も含めた総合的な解析が必須であると考えられる。そこで我々は、鉄欠乏あるいは過剰状態での生体内変化を総合的に評価することにした(図1)。総合評価の手法として、DNAマイクロアレイを用いた網羅的なトランスクリプトーム解析を採用した。

ると、まず、肝臓などの臓器に貯蔵されている鉄が優先的に利用され、減少する。これに応答し、血清中のTIBC(総鉄結合能)が増加し、フェリチンが減少するが、ヘモグロビンは正常値を保ったままである。この状態を「貧血のない鉄欠乏」とよぶ。一方、この鉄欠乏状態が続くと、貯蔵鉄の減少に引き続いて血中のヘモグロビン量が低下し、「貧血」に至る(鉄欠乏性貧血)。

鉄欠乏性貧血時には、血清や肝臓の脂質プロファイルに変動があることが報告されており、鉄欠乏により、高脂血症を発症する可能性を示唆する結果や、血清中の中性脂肪、リン脂質、LDL+VLDL コレステロール量、肝臓で総脂質、中性脂肪、リン脂質量が増加する結果が報告されている

(1)。しかしこれらの変化は、飼育条件によって異なる結果となっており、その機構について十分な情報が得られているとは言い難い。また、鉄欠乏により、ミネラルバランスが変動し(2)、これによって脂質過酸化が亢進し、ダメージを与えることが示されている(2、3)。このように、鉄欠乏時には、鉄貯蔵の中心臓器である肝臓において、様々な代謝変動が起こり得る。

1. 2 鉄過剰の生理作用

鉄は、小腸における吸収が厳密に制御されているため、過剰に経口摂取した場合には、その多くが吸収されずに排泄される。一方、一旦吸収されると、積極的に排除する機構が存在しないため、肝臓などの臓器内に蓄積されていく。臓器に蓄積する鉄の多くは、フェリチンタンパクと結合して安定な状態で存在するが、一部はタンパク質と結合しない不安定鉄(自由鉄)として存在する。不安定鉄は、Fenton反応によりヒドロキシルラジカルを産生して酸化ストレスを誘導し、臓器にダメージを与える。鉄が過剰になると、この不安定鉄が増し、種々の臓器不全を引き起こす。C型肝炎などの肝疾患においても肝臓内鉄過剰蓄積が認められ、肝硬変、肝がんのリスクファクターのひとつとなる。鉄過剰は、上記のような疾患や鉄剤の過剰摂取のほか、輸血などによっても引き起こされる。

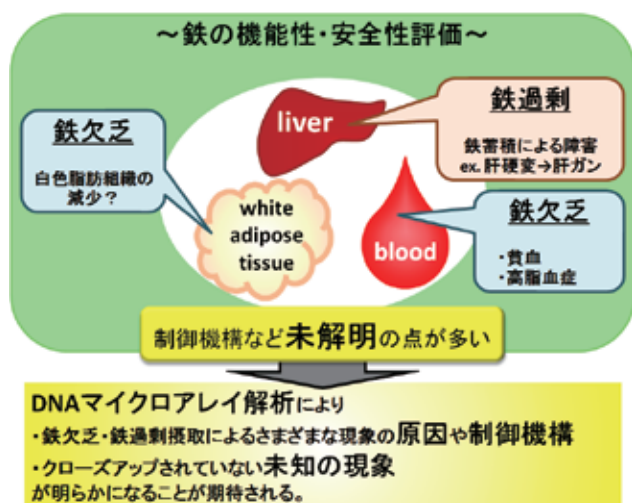


図1 鉄の機能性・安全性評価について

1. 1 鉄欠乏の生理作用

摂取量の低下や臓器からの出血などにより鉄が欠乏す

1. 3 DNA マイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析

生命現象を、タンパク質合成のセントラルドグマにおける流れから解釈すると、遺伝子DNAはその生物固有の情報を持ち、この遺伝子DNAを転写したmRNA(トランスクリ

プト)を翻訳してタンパク質(プロテイン)が作られる。タンパク質が酵素であれば、代謝産物(メタボライト)が生成されることになる。それぞれの群を特に、トランスクリプトーム、プロテオーム、メタボロームと呼ぶ(図2)。

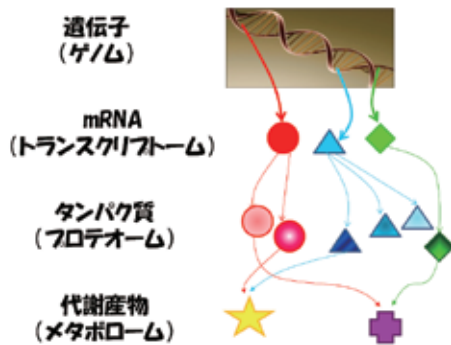


図2 セントラルドグマ

生体内で起こる変化を多角的に解析する手法として、網羅性の高い DNA マイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析がある。これは、細胞内で発現する数万種の転写産物(mRNA)量を網羅的に解析するもので、mRNA 量の変化の内容を解読することで、これから起こる生体の変化を予測しようという手法である。

DNA マイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析は、ニュートリゲノミクス(栄養ゲノム科学)の観点から食品や食品成分の健康機能性評価(4-8)や、栄養素欠乏の安全性評価(9)に広く活用されている。

鉄欠乏時の生体内の変化のトランスクリプトーム解析として、鉄の吸収活性の高い十二指腸や空腸をターゲットとした報告はあるが(10、11)、肝臓に関する報告はない。一方、食餌性鉄過剰が身体に及ぼす影響について、脳(12)、心臓や筋肉(13)を対象にした網羅的な遺伝子発現解析の報告はあるが、鉄の主要貯蔵臓器である肝臓を対象とした研究報告はない。

肝臓は様々な代謝の中心的な臓器である。また、鉄は代謝に関わる一部の酵素の活性に関与している。すなわち、鉄の量の変動は、肝臓を中心にして生体の代謝に大きな影響を及ぼすと考えられる。前述(1.1)のように、鉄欠乏時には肝臓を中心とした脂質代謝関連の変動が報告されているが、その他の代謝とあわせて総合的に解析することで、鉄欠乏が身体に及ぼす影響への理解が深まると考えられる。鉄過剰についても同様である。

2. 実験と結果

2.1 鉄欠乏食摂取 17 日

鉄欠乏が生体に及ぼす影響を明らかにする目的で、ラットの鉄欠乏食を与える実験を行った。鉄欠乏食摂取開始 17 日目には、ラットは貧血を呈していた。重度の鉄欠乏状態を総合的に評価するため、肝臓の網羅的な遺伝子発現解析を実施した。

2.1.1 方法

a) 動物実験

3 週齢の雄性 SD ラットを約 1 週間の予備飼育の後、2 群に分け、それぞれ異なる食餌(実験食と総称)を摂取させた。成長期のげっ歯類用の標準調製飼料である AIN93G 食および AIN93G から鉄(クエン酸鉄)のみを除去した鉄欠乏食である。AIN93G 食(鉄含量 48 ppm)を与える群を通常食群(n = 6)、鉄欠乏食(鉄含量 3 ppm 未満)を与える群を鉄欠乏食群(n = 7)とした。なお、鉄欠乏食群は通常食群に比べて摂食量が低下することから、摂取エネルギーや他の栄養素の摂取量の違いの影響を除くために、通常食群は鉄欠乏食群の前日平均摂食量を摂取させた(Pair-feeding の実施)。飼育環境は 8 時~20 時を明期とする 12 時間明暗サイクルとし、気温は $24 \pm 1^{\circ} \text{C}$ 、湿度は $40 \pm 5\%$ にて制御した。実験食摂取開始後 13 日目より 9 時~17 時の 8 時間制限給餌を開始し、17 日目に 1.5 時間の摂食後、麻酔下にて解剖を行い、頸動脈より採血後、肝臓を摘出した。血液からは血清あるいは血漿を採取した。血清あるいは血漿、さらに肝臓の一部を用いて成分分析を行った。体重および成分分析結果の統計的な差を Student's t-test により確認し、 $P < 0.05$ を統計的に有意であると判断した。また、肝臓より TRIzol Reagent (Invitrogen 社)の定法に従って total RNA を抽出した。

b) DNA マイクロアレイ実験

DNA マイクロアレイは Affymetrix 社の Rat Genome 230 2.0 Array を用いた。Rat Genome 230 2.0 Array には約 30,000 の転写産物情報が搭載されている。肝臓より抽出した total RNA は、Affymetrix 社の定法に従って DNA マイクロアレイ用に調製し、データを取得した。なお、DNA マイクロアレイ実験は各群 n = 4 にて実施した。

得られたデータ(CEL データ)に対し、採用する正規化(summarization, normalization)手法の検討を行った。この点が本プロジェクトの特徴の一つである。通常、Affymetrix 社の DNA マイクロアレイを使用する際、装置付属のコンピュータに搭載されているソフトウェアには GCOS (GeneChip® Operating Software) あるいは AGCC (Affymetrix® GeneChip® Command Console® Software) があるが、GCOS では Micro Array Suite (MAS5)、AGCC では Robust Multiarray Average (RMA)、Probe Logarithmic Intensity Error (PLIER)、MAS5 が正規化アルゴリズムとして採用されている。実験者は、これらの中から自分の実験に最適な正規化アルゴリズムを選択する。現在、バイオインフォマティクスの発展に伴い、Affymetrix 社の DNA マイクロアレイに適用される正規化アルゴリズムに関してはいくつも報告されている。本プロジェクトでは上記アルゴリズムのほかにもいくつかのアルゴリズムによる正規化を「R」(<http://www.r-project.org/>)という統計環境下にて実行し、比較検討を行っている。

本研究では、Distribution Free Weighted method (DFW) にて正規化を行ったデータを解析に採用した。正規化データの全体像を把握するため、階層的クラスター解析を実施した。

続いて、2群間で発現変動の度合いが高い遺伝子を抽出する目的で、2群間比較解析を実施した。今回は Weighted Average Difference (WAD)法という統計手法を選択した。WADにて比較解析を行い、通常食群に対して鉄欠乏食群で発現が増加した600、減少した500の合計1100の転写産物を抽出した。転写産物は各々タンパク質をコードしており、タンパク質にはそれぞれ機能がある(未解明のものも含む)。例えば、代謝に関わる酵素もタンパク質から成り立っているし、皮膚に多く存在するコラーゲンもタンパク質そのものである。今回、変動の度合いが高い転写産物(上記の増加した600と減少した500)中にどのような機能を持つものが濃縮されているかを明らかにするため、我々はオンラインツール DAVID Bioinformatics Resources (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>)による解析を行った。本研究では、Functional Annotation Toolを用いた Gene Ontology という概念に基づく濃縮度解析を実施した。Gene Ontologyは、遺伝子の機能情報を、生物種を超えて統一して記述するための語彙を管理するものであり、Biological Process(生物学的プロセス)、Cellular Component(細胞の構成要素)、Molecular Function(分子機能)の3つのカテゴリーからなる。今回、Gene OntologyにおけるBiological Processに基づく解析を実施した。

2. 1. 2 結果

a) 飼育期間中の体重、血中、肝臓中成分の変化

飼育期間中、2群間で体重差は認められなかった(表1)。血中のヘモグロビン量の測定を実施した(図3)ところ、実験食摂取開始から徐々に鉄欠乏食群における値が低下し始めた。実験食開始17日目の生体は、ヘモグロビン濃度が通常の40%程度にまで低下した、いわゆる「鉄欠乏性貧血」の状態であった。なお、TIBC(総鉄結合能)の有意な上昇、血清鉄量、肝臓中鉄量の有意な降下が認められ、鉄欠乏状態であることを裏付ける結果となった。

表1. 体重、肝臓重量、ヘモグロビン、血清鉄、肝臓鉄量

Group	n	Body weight	Liver weight	Liver iron	Hemoglobin	Serum iron	TIBC
		g	g	pg/g wet tissue	g/dl	μg/dl	μg/dl
Pair-fed group	6	194.5 ± 1.2	9.0 ± 0.3	101.8 ± 5.6	14.4 ± 0.4	247.0 ± 29.0	574.7 ± 18.8
Iron-deficient group	7	198.5 ± 5.7	7.9 ± 0.4*	66.0 ± 3.6**	6.1 ± 0.2**	35.0 ± 3.4**	674.0 ± 13.0*

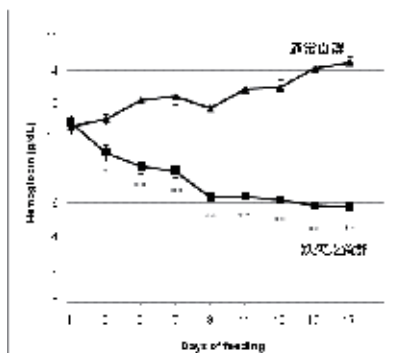


図3 飼育期間中の血中ヘモグロビン量変化

Mean ± SE

n = 6(通常食群), n = 7(鉄欠乏食群)

*: P<0.05, Student's t-test, **: P<0.01, Student's t-test

b) DNA マイクロアレイ実験データ

階層的クラスター解析の結果、2群間で2つの異なるクラスターを形成することが明らかになった(図4)。これはすなわち、2群間の肝臓における遺伝子発現パターンが異なることを示す結果である。

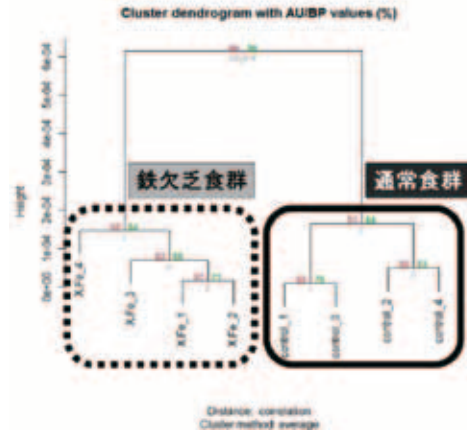


図4 鉄欠乏食群および通常食群のDNA マイクロアレイデータの階層的クラスター解析結果

XFe_○: 鉄欠乏群の個体, control_○: 通常群の個体

2群間の発現比較解析を行い、発現変動した遺伝子群に対して Gene Ontology (GO) に基づく濃縮度解析を行った結果、発現増加した転写産物には免疫応答、刺激応答、コレステロール代謝、カルボン酸代謝、細胞死などに関わる遺伝子が、減少には脂質代謝に関わる遺伝子が濃縮されていることが明らかになった(表2、3)。

表2. 発現増加した遺伝子の Gene Ontology (GO) に基づく濃縮度解析結果

GO_ID	Term	FDR-corrected p-value
0002376	immune system process	8.18E-06
0019882	antigen processing and presentation	1.63E-06
0048002	antigen processing and presentation of peptide antigen	1.83E-06
0002474	antigen processing and presentation of peptide antigen via MHC class I	1.73E-06
0006955	immune response	1.05E-04
0050896	response to stimulus	1.62E-04
0006950	response to stress	4.95E-03
0006952	defense response	2.35E-04
0002526	acute inflammatory response	1.32E-03
0006954	inflammatory response	1.78E-04
0009611	response to wounding	9.95E-05
0009605	response to external stimulus	9.98E-05
0008152	metabolic process	
0006629	lipid metabolic process	6.57E-03
0008610	lipid biosynthetic process	9.82E-03
0044255	cellular lipid metabolic process	3.00E-04
0008202	steroid metabolic process	1.01E-07
0006694	steroid biosynthetic process	1.89E-04
0016125	sterol metabolic process	3.07E-07
0016126	sterol biosynthetic process	1.00E-04
0008203	cholesterol metabolic process	1.16E-05
0006066	cellular alcohol metabolic process	1.45E-06
0006082	organic acid metabolic process	7.70E-04
0019752	carboxylic acid metabolic process	6.97E-04
0009987	cellular process	
0007165	signal transduction	
0007249	I-kappaB kinase/NF-kappaB cascade	6.40E-03
0016265	death	
0006915	apoptosis	
0051402	neuron apoptosis	1.09E-03
0065007	biological regulation	
0050793	regulation of developmental process	
0043523	regulation of neuron apoptosis	3.28E-03
0043525	positive regulation of neuron apoptosis	1.92E-03
0048518	positive regulation of biological process	1.81E-03
0045787	positive regulation of progression through cell cycle	7.31E-03
0050794	regulation of cellular process	
0050806	positive regulation of synaptic transmission	7.88E-03
0051239	regulation of multicellular organismal process	

各カテゴリーの最下層の Term に色付けた。

表 3. 発現減少した遺伝子の Gene Ontology (GO) に基づく濃縮度解析結果

GO_ID	Term	FDR-corrected p-value
0006082	organic acid metabolic process	2.59E-09
0019752	carboxylic acid metabolic process	4.20E-09
0032787	monocarboxylic acid metabolic process	1.83E-06
0006631	fatty acid metabolic process	1.13E-04
0044255	cellular lipid metabolic process	2.80E-04
0006629	lipid metabolic process	2.47E-04
0008610	lipid biosynthetic process	6.68E-03

各カテゴリーの最下層の Term に色付けした。

濃縮度の高い GO Term に属する遺伝子リストは表 4、5 に記載した。

以上の遺伝子発現解析結果から、貧血時の肝臓では、脂質代謝、コレステロール代謝のみならず、糖代謝、アミノ酸代謝といった栄養素代謝系が相互に関連した変動 (図 5) や小胞体ストレス誘導性のアポトーシスといった細胞機能の変化 (図 6) が起こっていることが明らかになった。

表 4. 濃縮度の高い GO Term 別 発現増加遺伝子リスト

Gene Title	Public ID
Cholesterol metabolic process	
Sterol biosynthetic process	
3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A synthase 1	NM_017268
3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase	BM390399
isopentenyl-diphosphate delta isomerase	NM_053539
farnesyl diphosphate synthetase	NM_031840
squalene epoxidase	NM_017136
cytochrome P450, subfamily 51	NM_012941
24-dehydrocholesterol reductase	BF417479
sterol-C4-methyl oxidase-like	NM_080886
NAD(P) dependent steroid dehydrogenase-like	BF407232
cytochrome P450, family 7, subfamily a, polypeptide 1	NM_012942
insulin induced gene 1	NM_022392
insulin induced gene 2	AA851803
Carboxylic acid metabolic process	
Amino acid metabolic process	
glutamate-ammonia ligase (glutamine synthetase)	NM_017073
serine dehydratase	NM_053962
glutamic pyruvic transaminase 1, soluble	NM_031039
glutamate oxaloacetate transaminase 1, soluble	D00252
argininosuccinate lyase	NM_021577
Gluconeogenesis	
glucose-6-phosphatase, catalytic	NM_013098
phosphoenolpyruvate carboxykinase 1, cytosolic	BI277460
Acute inflammatory response	
complement component 1, s subcomponent	D88250
complement component 1, r subcomponent	BI292425
complement component 4, gene 2	BI285347
complement component 6	A1045191
Apoptosis	
caspase 3, apoptosis related cysteine protease	U84410
caspase 12	NM_130422
Neuron apoptosis	
BCL2/adenovirus E1B 19 kDa-interacting protein 3	NM_053420

表 5. 濃縮度の高い GO Term 別 発現減少遺伝子リスト

Gene Title	Public ID
Fatty acid metabolic process	
Lipid biosynthetic process	
fatty acid synthase	NM_017332
stearoyl-coenzyme A desaturase 1	J02585
fatty acid desaturase 1	NM_053445
fatty acid desaturase 2	NM_031344
sterol regulatory element binding factor 1	AF286470

DNA マイクロアレイの解析結果を受け、肝臓や血清中の成分測定を実施し (表 6)、鉄欠乏食摂取開始 17 日目の肝臓における代謝の相関図を作成した (図 5)。

表 6. 肝臓および血清中成分測定結果

	n	Pair-fed group	Iron-deficient group
		6	7
Liver			
Total cholesterol	mg/g wet tissue	3.7 ± 0.2	2.6 ± 0.1**
Triacylglycerol	mg/g wet tissue	11.8 ± 0.8	8.0 ± 1.1*
Total bile acid	vg/g wet tissue	25.6 ± 1.4	32.4 ± 3.3
Serum			
Total cholesterol	mg/dl	70.3 ± 5.0	48.1 ± 3.1**
Triacylglycerol	mg/dl	73.0 ± 4.4	61.6 ± 11.9
Glucose	mg/dl	125.2 ± 6.9	145.6 ± 4.8*
Insulin	ng/ml	2.3 ± 0.4	5.1 ± 1.2*

Mean ± SE

n = 6 (通常食群), n = 7 (鉄欠乏食群)

*: P<0.05, Student's t-test, **: P<0.01, Student's t-test

栄養素代謝系に関しては、①脂肪酸合成の抑制、分解の亢進に伴う肝臓中 TG の減少 (脂肪酸代謝)、②コレステロール合成および異化の亢進や、それに伴う肝臓、血清中のコレステロール量の低下 (コレステロール代謝)、③血漿乳酸、ビルビン酸量の増加と糖新生の亢進に伴う血糖値の上昇 (糖代謝)、④グルタミン代謝や尿素サイクルの変動に伴うアンモニア除去作用の発現 (アミノ酸代謝) などが代表的な変動であった。

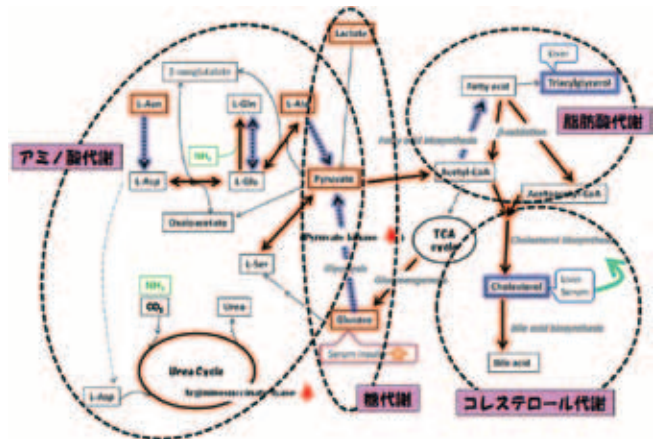


図 5 鉄欠乏食摂取 17 日目の肝臓における栄養素代謝系の変動

細胞機能の変化については、分子シャペロンである熱ショックタンパク質の発現減少が認められ、これに伴う折りたたみ不全タンパク質の蓄積が予測された。さらにそれを起因とした小胞体 (ER) ストレスの誘導が予測され、それを裏付けるように小胞体ストレス誘導性のプロテアーゼである Caspase 12 と、アポトーシス実行の酵素である Caspase 3 の発現増加が見出された (図 6)。

さらに、コレステロール異化の律速酵素である Cyp7a1 (cytochrome P450, family 7, subfamily A, polypeptide 1) や Caspase 12 をタンパク質レベルで評価したところ、CYP7A1 は増加、CASPASE12 は活性型、不活性型ともに増加しており、遺伝子発現変化と関連した結果であった。以上の研究の詳細は文献 (14) に掲載した。

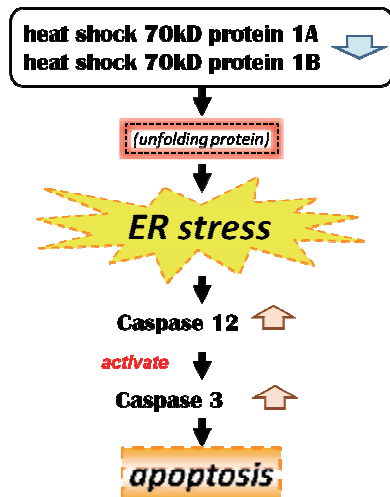


図6 鉄欠乏食摂取17日目の肝臓における小胞体ストレスによるアポトーシスの誘導

2. 2 鉄欠乏食摂取3日

1. 2に記載したように、出血や摂取不足によって鉄が欠乏すると「臓器貯蔵鉄の減少」という段階を経て「貧血」に至る。すなわち、鉄不足によってもたらされる症状には「貧血のない鉄欠乏」と「鉄欠乏性貧血」とが存在する。その発生頻度については、日本人女性の約2~4割が「貧血のない鉄欠乏」、約1割が「鉄欠乏性貧血」といわれている(15)。1. 4に記載した鉄欠乏食摂取開始17日目は「鉄欠乏性貧血」の評価であった。ここでは、日本人女性において、より頻度の高い「貧血のない鉄欠乏」の評価を目的とし、短期間の鉄欠乏食摂取が肝臓に及ぼす影響のトランスクリプトーム解析を実施した。

2. 2. 1 方法

a) 動物実験

3週齢の雄性SDラットを約1週間の予備飼育後、2. 1と同様に通常食群(n=6)、鉄欠乏食群(n=6)の2群に分け、通常食群は鉄欠乏食群に対してPair-feedingさせた。予備飼育4日目より9時~17時の8時間制限給餌を開始し、実験食摂取期間中も時間制限給餌を継続した。実験食摂取開始後3日目に、1.5時間の摂食後、麻酔下にて解剖を行い、頸動脈より採血後、肝臓を摘出した。血液からは血清あるいは血漿を採取した。血清あるいは血漿、さらに肝臓の一部を用いて成分分析を行った。体重および成分分析結果の統計的な差をStudent's t-testにより確認し、 $P < 0.05$ を統計的に有意であると判断した。また、肝臓よりTRIzol Reagent (Invitrogen社)の定法に従ってtotal RNAを抽出した。

b) DNAマイクロアレイ実験

DNAマイクロアレイはAffymetrix社のRat Genome 230 2.0 Arrayを用いた。肝臓より抽出したtotal RNAは、Affymetrix社の定法に従ってDNAマイクロアレイ用に調製し、データを取得した。なお、DNAマイクロアレイ実験

は各群n=5にて実施した。

得られたデータ(CELデータ)に対し、採用する正規化(summarization, normalization)手法の検討を行い、Robust Multiarray Average (RMA)にて正規化を行ったデータを解析に採用した。

続いて、2群間で有意に発現変動した遺伝子を抽出する目的で、2群間比較解析を実施した。今回はRank Productsという統計手法を選択し、通常食群に対して鉄欠乏食群で発現が増加した91、減少した186の合計277の転写産物を抽出した。これらの転写産物に対し、Gene OntologyのBiological Process(生物学的プロセス)に基づく濃縮度解析を実施した。

2. 2. 2 結果

a) 飼育期間中の体重、血中、肝臓中成分の変化

飼育期間中、2群間で体重差は認められなかった。血中成分のうち、鉄欠乏食摂取開始3日目の生体は、ヘモグロビン量に差がなく(図7)、TIBC(総鉄結合能)の有意な上昇、血清フェリチン、血清鉄量の有意な降下が認められ、「貧血のない鉄欠乏」であることが明らかになった(図8)。なお、肝臓中の鉄量は60%程度の低下傾向を示した($P = 0.055$)。

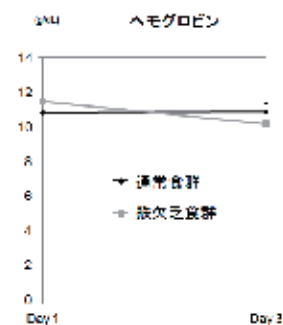


図7 飼育期間中の血中ヘモグロビン量変化

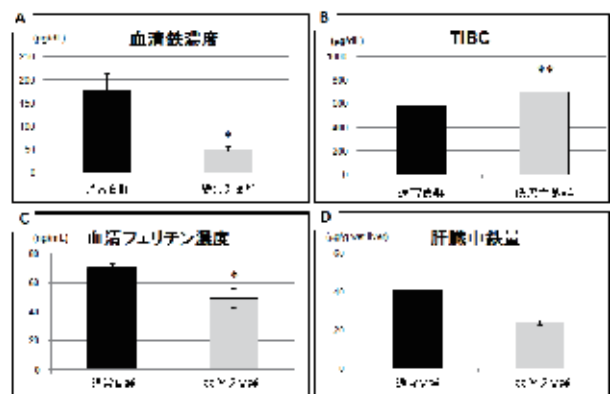


図8 血清鉄、TIBC、血清フェリチン濃度および肝臓中鉄量

A: 血清鉄、B: TIBC、C: 血清フェリチン、D: 肝臓中鉄
Mean \pm SE

n=6(通常食群), n=6(鉄欠乏食群)

*: $P < 0.05$, Student's t-test

** : $P < 0.01$, Student's t-test

b) DNA マイクロアレイ実験データ

階層的クラスター解析の結果、2群間で2つの異なるクラスターを形成することが明らかになった(図9)。このことから、2群間の肝臓における遺伝子発現パターンが異なることが示唆された。

続いて2群間の発現比較解析を行った結果、変動 probe sets には、糖代謝、脂質代謝、有機酸・細胞内ケトン代謝、薬物応答、細胞外刺激応答、酸化還元、酸素運搬に関する遺伝子が濃縮されていることが明らかになった。

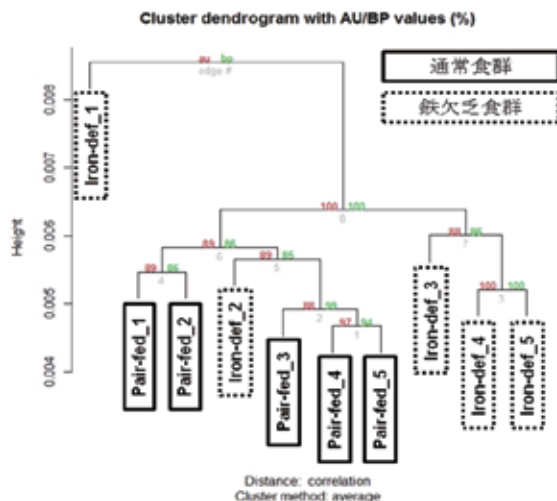


図9 短期間の鉄欠乏食群および通常食群のDNAマイクロアレイデータの階層的クラスター解析結果

短期間の鉄欠乏で発現変動した probe sets と、2.1で実施した長期間の鉄欠乏で発現変動した probe sets とを比較した。その結果、短期間の鉄欠乏で発現変動した probe sets のうち、約4割が短期・長期で共通、約4割が短期のみ、約2割が短期・長期で逆転したことが明らかになった。なお、動物飼育からの完全繰り返し実験の結果、貧血のない鉄欠乏を呈すること、肝臓のDNAマイクロアレイデータは2群間で異なるクラスターを形成することについて同様の結果を得た。以上より、鉄欠乏食(3 ppm)摂取わずか3日目で、通常食(48 ppm)摂取動物と比較して「貧血のない鉄欠乏」になること、さらにその時の肝臓では多くの遺伝子の発現量が変動していることが確認された。

2.3 鉄過剰食摂取9日

鉄は小腸における吸収の制御によって体内への過剰蓄積が起こりにくく、これまでの鉄過剰に焦点を当てた研究は、C型肝炎などの病態における肝臓への鉄過剰蓄積に関するものが主であった。現在、サプリメント剤などの普及により、容易に鉄の補給が可能となっていることを考慮すると、食事からの鉄過剰摂取が身体に及ぼす影響について、検証しておくことは必須であると考えた。そこで、通常の10倍の鉄を添加した食餌を与える実験を行い、鉄過剰食摂取開始9日目の肝臓の遺伝子発現解析を行った。

2.3.1 方法

a) 動物実験

3週齢の雄性SDラットを4日間の予備飼育の後、AIN93G食(鉄含量48 ppm)を与える通常食群(n=7)、AIN93G食に鉄を添加した食餌(鉄含量500 ppm)を与える鉄過剰食群(n=7)の2群に分けた。各群、自由摂食、自由飲水とした。実験食摂取開始後8日目の夜から絶食の後、麻酔下にて解剖を行い、頸動脈より採血後、肝臓を摘出した。血液からは血清あるいは血漿を採取した。血清あるいは血漿、さらに肝臓の一部を用いて成分分析を行った。体重および成分分析結果の統計的な差をStudent's t-testにより確認し、P<0.05を統計的に有意であると判断した。また、肝臓よりTRIzol Reagent(Invitrogen社)の定法に従ってtotal RNAを抽出した。

b) DNA マイクロアレイ実験

DNA マイクロアレイはAffymetrix社のRat Genome 230 2.0 Arrayを用いた。肝臓より抽出したtotal RNAは、Affymetrix社の定法に従ってDNA マイクロアレイ用に調製し、データを取得した。なお、DNA マイクロアレイ実験は各群n=6にて実施した。

得られたデータ(CELデータ)に対し、採用する正規化(summarization, normalization)手法の検討を行い、DFWにて正規化を行ったデータを解析に採用した。

続いて、2群間で有意に発現変動した遺伝子を抽出する目的で、2群間比較解析を実施した。今回、Rank Productsという統計手法を選択し、通常食群に対して鉄欠乏食群で発現が増加していた205、減少していた198の合計403の転写産物を抽出した。これらの転写産物に対し、Gene OntologyのBiological Process(生物学的プロセス)に基づく濃縮度解析を実施した。

2.3.2 結果

a) 飼育期間中の体重、血中、肝臓中成分の変化

飼育期間中、2群間で体重、摂食量に差は認められなかった。血清TIBCの有意な降下および血中ヘモグロビンの有意な上昇が認められた(図10)他には、血中生化学パラメータの変化は認められなかった。

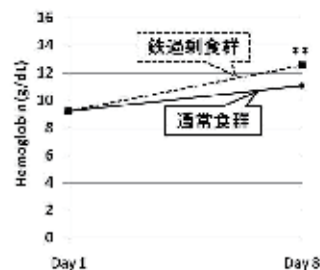


図10 飼育期間中の血中ヘモグロビン量変化

Mean ± SE
n=7(通常食群), n=7(鉄過剰食群)
**; P<0.01, Student's t-test

b) DNA マイクロアレイ実験データ

階層的クラスター解析の結果、2群間で2つの異なるクラスターを形成することが明らかになった(図11)。このことから、2群間の肝臓における遺伝子発現パターンが異なることが示唆された。

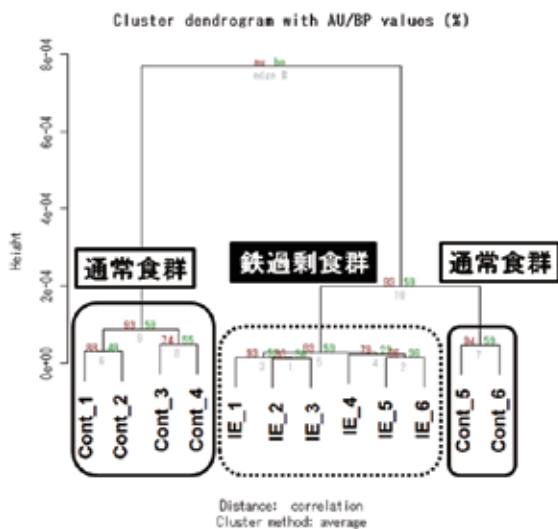


図11 鉄過剰食群および通常食群のDNAマイクロアレイデータの階層的クラスター解析結果

IE_O: 鉄過剰食群の個体、cont_O: 通常食群の個体

続いて2群間の発現比較解析を行った結果、変動 probe sets には、モノカルボン酸代謝、糖代謝、脂質代謝、酸化還元、刺激応答に関する遺伝子が濃縮されていることが明らかになった。

3. 考察及び今後の展望

本研究により、鉄欠乏食摂取17日目の鉄欠乏性貧血の肝臓において、脂質代謝、糖代謝に関わる因子の遺伝子発現が変動していることが確認された。これらの代謝は、これまでに代謝産物量あるいは酵素活性や酵素の遺伝子発現が変動することがそれぞれ報告されていたが、遺伝子発現変動が同時に起こっていることが明らかになった。また、これまでに報告のない、アミノ酸代謝やアポトーシスに関わる因子の変動も見出した。この結果は、鉄が生体内の代謝に対して多岐にわたり、直接的あるいは間接的に影響を及ぼしていることを示すものである。

一方、鉄欠乏食摂取3日目という貧血を伴わない鉄欠乏状態の肝臓において、糖代謝、ヘモグロビン代謝、脂質代謝、コレステロール代謝に関わる因子の遺伝子発現が変動していることが確認された。これらの代謝系は鉄欠乏食摂取17日目にも変動することが見出されたが、一部の代謝系は同様の、また一部の代謝系は異なる変動であることが明らかになった。

冒頭にも記載したが、日本人女性の約2~4割が貧血を伴わない鉄欠乏状態であるといわれているが、本研究では、貧血を伴わない鉄欠乏状態の肝臓において様々な代謝系

の変動が起こりつつあることが明らかになった。このことはすなわち、「貧血」という明確な指標がない症状であっても、生体にとって好ましくない反応が起こり始めていることを示唆するものだと考えられる。

また、本研究は、DNAマイクロアレイによるトランスクリプトーム解析の「網羅性」という特性を大いに活用した好例である。鉄欠乏食摂取3日目と17日目で変動した遺伝子リストを比較したことにより、鉄欠乏食の摂取期間すなわち体内の鉄の欠乏状態の違いによって、同じ変動を示す代謝系、異なる変動を示す代謝系、一過的に変動を示す代謝系があることを明らかにし、体内鉄量の減少度合いに応じて様々な生体が変化することを見出したものである。

鉄の過剰摂取という観点からは、血中成分のうちヘモグロビン、血清TIBCを除く生化学パラメータは変化していなかったが、表現型の差がわずかなものであっても、鉄の貯蔵臓器である肝臓の遺伝子発現は様々な変動していることが示された。

日本における鉄摂取の推奨量は、年齢、性別により異なるが、成人男性で10mg、女性で12mgである。これに対し、摂取量の上限は約4倍の40mgとされている。今回行った実験では、通常食の10倍の鉄過剰食を摂取させたが、今後、鉄所要量を通常の5倍、2.5倍と段階的に減らしながら鉄過剰食摂取の影響を観察し、鉄過剰摂取の安全性を評価することが課題だと考えている。また、貧血時に処方される鉄剤は1日当たり50~210mgと多量であることを考慮し、貧血時の鉄過剰摂取の安全性評価を実施することも重要である。

本研究は、身体に必須の栄養素である鉄を例にして、摂取量の安全性を解明することを目的として実施した。それにより、鉄の摂取量や摂取期間の違いに対し、生体が機敏に反応することが明らかになった。すなわち、これまでに危険視・重要視されていなかった「貧血のない鉄欠乏」状態や「鉄の過剰摂取」した場合においても、遺伝子発現レベルでは実に多くの代謝系、細胞機能に変化が見られるという結果である。今後さらに、鉄摂取量を段階的に設定した実験を行い、データを蓄積することで「鉄の摂取量と安全性」への理解を深めることができると考えている。また、本研究は鉄を題材にしたが、その他のミネラルやビタミンにも摂取量不足、過剰の問題の全貌が未解明のまま残されているものが多い。本研究と同様の方法は他の多くの重要な栄養素の摂取安全性基準のアセスメントにも適用し得るため、今後、他の栄養素へと視野を広げた研究を実施し、情報を蓄積することで、より安全・安心な食生活のための基盤としたい。

本研究を実施するにあたり、神奈川県衛生研究所、神奈川県産業技術センター、東京大学、東京農業大学の皆様のご協力をいただきました。この場を借りてお礼申し上げます。

【参考文献】

1. Sherman A. R. et al. *J Nutr.* **108**:152-62 (1978)
2. Uehara M. et al. *J Nutr Biochem.* **8**:385-391 (1997)
3. Knutson M. D. et al. *J Nutr.* **130**:621-628 (2000)
4. Kobayashi Y. et al. *Biosci Biotechnol Biochem.* **74**:2385-2395 (2010)
5. Oda Y. et al. *BioFactors.* (2010) in press
6. Kondo S. et al. *Biosci Biotechnol Biochem.* **74**:1656-1661 (2010)
7. Fukasawa, T. et al. *J. Agric. Food Chem.* **58**:7007-7012 (2010)
8. Yao, R. et al. *J. Agric. Food Chem.* **58**: 2168-2173 (2010)
9. Endo Y. et al., *J Nutr.* **132**:3632-3637 (2002)
10. Collins J. F. *Biol Res.* **39**:25-37 (2006)
11. Collins J. F. et al. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* **288**:G964 (2005)
12. Johnstone D. et al. *Neurochem Int.* **56**:856-863 (2010)
13. Rodriguez A. et al. *BMC Genomics.* **8**:379 (2007)
14. Kamei A. et al. *Physiol Genomics* **42**:149-156 (2010)
15. 日本鉄バイオサイエンス学会 治療指針作成委員会編, 鉄材の適正使用による貧血治療指針, (2009)

ゲノミクス手法を用いた細胞形質転換因子

および抑制因子の探索

大森 清美／神奈川県衛生研究所

1. はじめに

化学物質の発がん性を予測するための試験法として、Ames 試験などの遺伝毒性試験（変異原試験）が経済協力開発機構（Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD）や日米 EU 医薬品規制調和国際会議（International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, ICH）などの多くのテストガイドラインに採用されている。しかし、これらの遺伝毒性試験では検出できない発がん物質が少なからず存在することが問題となっており、そのような非変異がん原性物質の多くは、発がんプロモーターであることも予測されている。化学物質による多段階発がんの機構において、発がんプロモーションは、腫瘍形成を回避するための重要な過程である。しかしながら、発がんプロモーターを検出するための高感度かつ汎用性の高い試験法が存在しなかったことから、これまで発がんプロモーション活性の評価はほとんど行われてこなかった。そこで、大森らは神奈川県政策局（旧政策部）総合政策課の重点基礎研究において、非変異がん原性物質ならびに発がんプロモーター検出のための細胞形質転換試験法である Bhas42 細胞形質転換試験法を開発した（図 1）¹⁾。Bhas42 細胞形質転換試験法は、多数の非変異がん原性物質ならびに発がんプロモーターを高感度に検出することが可能であり^{1, 2)}、試験結果の室内再現性も良好であることから³⁾、公的な試験法ガイドラインとして認定されることが期待されている。

この Bhas42 細胞形質転換試験法は、既知発がん物質および既知発がんプロモーターの細胞形質転換活性と、動物実験等での発がん性もしくは発がんプロモーション活性との相関性が高いことが確認されている¹⁾。そのほか、種々の化学物質について Bhas42 細胞形質転換試験を行っており、発がんプロモーションステージにおいて細胞形質転換活性を示す物質が明らかになっている⁴⁾。しかしながら、細胞形質転換のメカニズムに関する研究データは稀少であり、Bhas42 細胞での形質転換フォーカスの形成に関わる因子は不明のままにある。

そこで、Bhas42 細胞での形質転換メカニズムを明らかにすることを目的とし、遺伝子発現の網羅的解析手法であるトランスクリプトミクスを用いることにより、Bhas42 細胞における形質転換因子の探索を行っている。平成 20 年度は、国内で使用が不許可であるがアジア諸国および欧米等では使用が許可されている食品添加物（Comp. A）について、Bhas42 細胞への処理時間および解析法等の実験条件の検討を行った。平成 21 および 22 年度は、その実験条件をもとに、Comp. A および既知発がんプロモーター 5 種各々の処理により発現が変動する遺伝子について DNA マイクロアレイ解析を行った。

本研究の結果は、Bhas42 細胞形質転換試験法の有用性の裏付けとして、また細胞形質転換メカニズムの解明につながる重要な成果となるものと考えられる。

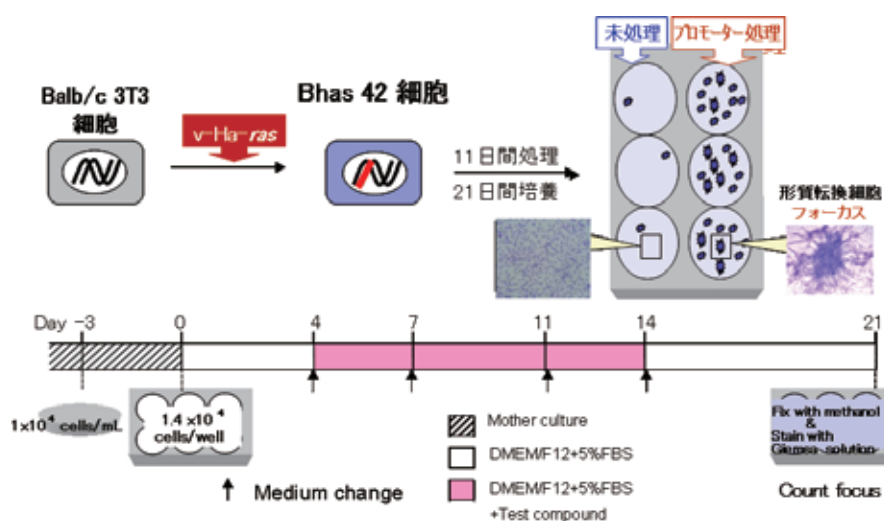


図 1 Bhas42 細胞形質転換試験

2. 実験と結果

2. 1 Bhas42 細胞形質転換試験

DF5F 培地を用いて、Bhas42 細胞の 7×10^3 cells/mL 胞浮遊液を調製し、1 ウェルあたり 2 mL ずつ 6 ウェルプレートに播種した。細胞播種 4 日、7 日、10 日後に被験化学物質を添加した DF5F と培地交換し (1 濃度群あたり 6 ウェル)、14 日後に被験化学物質を添加していない DF5F 培地と交換した。播種 21 日後にメタノールで固定し、5%ギムザ染色液で染色を行った。なお、溶媒対照群は 0.1%ジメチルスルフォキシド (DMSO)、陽性対照群は 12-*O*-tetradecanoyl phorbol-13-acetate (TPA) 20 ng/mL で処理を行った。

ギムザ染色により濃い紫色に染まった細胞集団について、実体顕微鏡を用いて細胞を観察し、(a)細胞は紡錘形をなして周囲の細胞とは異なる細胞形態を示す (spindle-shaped)、(b)ランダムな配列で互いに交差している (criss-cross)、(c)積み重なりあって細胞が増殖している (piling-up)、(d)細胞質が塩基性(濃い紫色)に強く染まっている (basophilic)、(e)フォーカス部位の細胞数が 50 個以上である、これらの特徴を有するものを形質転換フォーカスとしてカウントした。

溶媒対照群のフォーカス数に対する、被験化学物質処理群のフォーカス数の有意差検定は、Dunnett 検定 (片側、 $p < 0.05$) を用いた。

被験化学物質として、Comp. A および既知発がんプロモーター 5 化合物 (P-1~5) について Bhas42 細胞形質転換試験を行った (図 2)。その結果、Comp. A および既知発がんプロモーター 4 化合物 (P-1~4) は、いずれも溶媒対照群の 2 倍以上のフォーカス数を示し、陽性であった。しかし、既知発がんプロモーター P-5 については、P-4 と化学構造が類似した化合物であるにも係わらず、Bhas42 細胞形質転換試験では溶媒対照群の 2 倍未満のフォーカス数であり、陰性結果となった。

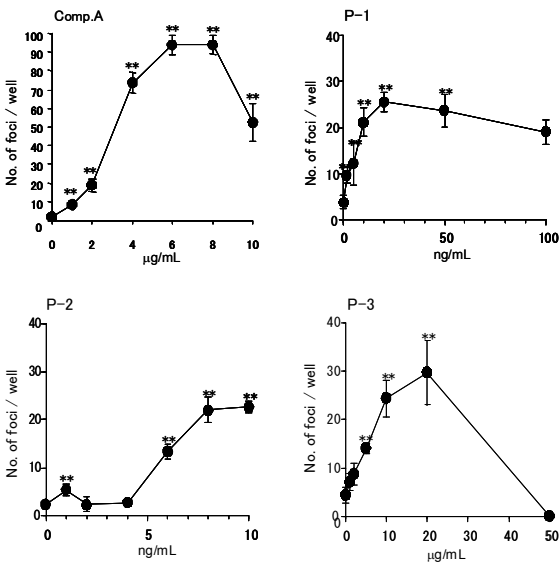


図 2 Bhas42 細胞形質転換結果

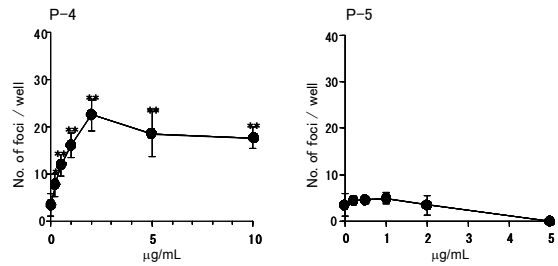


図 2 Bhas42 細胞形質転換結果(つづき)

2. 2 DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析

2. 2. 1 RNA 試料の抽出精製

DNA マイクロアレイにより遺伝子発現の解析を行う場合には、被験化学物質処理による明らかな反応が認められた濃度のうち、できる限り低濃度で処理を行うことが望ましい。そこで、Comp. A については、2 µg/mL、P-1 は 5 ng/mL、P-2 は 6 ng/mL、P-3 は 10 µg/mL および P-5 は 3 mmol/mL で処理を行うこととした。P-4 については、P-5 と比較検討を行うため、P-5 と同一濃度、すなわち 3 mmol/mL で処理を行うこととした。

Bhas42 細胞形質転換試験と同様に、凍結保存細胞を融解後、前培養を行い、6 ウェルプレートに細胞を播種した 4 日後に、被験化学物質を添加した DF5F と培地交換し (1 濃度群あたり 6 ウェル)、24 時間後に 1 プレートずつ RNA 抽出用の細胞溶解液を調製した。すなわち、細胞を観察した後 (図 3-1~7)、1 ウェルあたり 2 mL の PBS (-) 緩衝液で 3 回洗浄し、ISOGEN (ニッポンジーン社) に細胞を溶解した。各 1 プレート (6 ウェル) 分の細胞溶解液を 1 本のチューブにまとめて 1 抽出 ($n = 1$) とした。キアゲン社のプロトコールに従い細胞溶解液をクロロホルムで分配し、RNA をイソプロパノールで沈殿後、75%エタノールで洗浄し RNA を抽出した。さらに RNeasy® Mini kit (キアゲン社) を用いて、キアゲン社のプロトコールに従いトータル RNA を精製した。得られたトータル RNA 試料について、RNA 濃度測定および Agilent 2100 パイオアナライザによりクオリティー評価を行った。以上の凍結保存細胞の融解から RNA 試料の抽出精製について、繰り返し 3 回操作を行い、それぞれ 1 回分を $n = 1$ として、被験化学物質ごとに $n = 3$ の試料について以下の実験を行った。

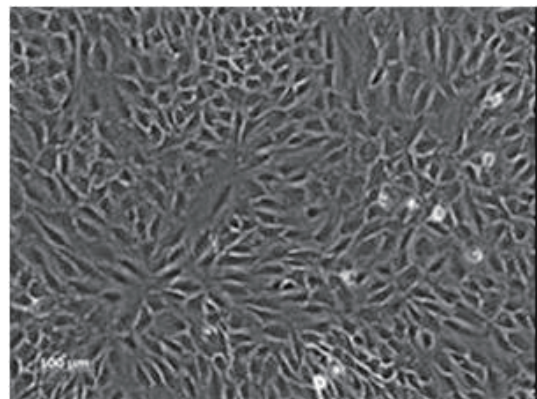


図 3-1 DMSO

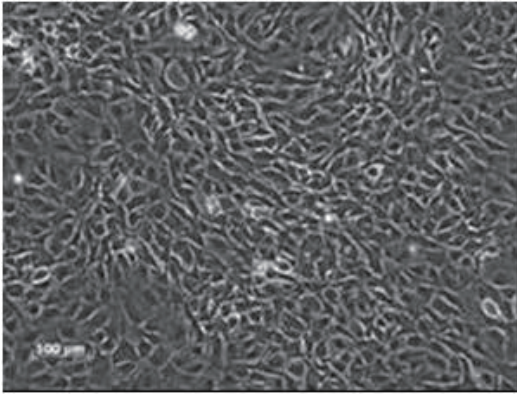


図 3-2 Comp.A

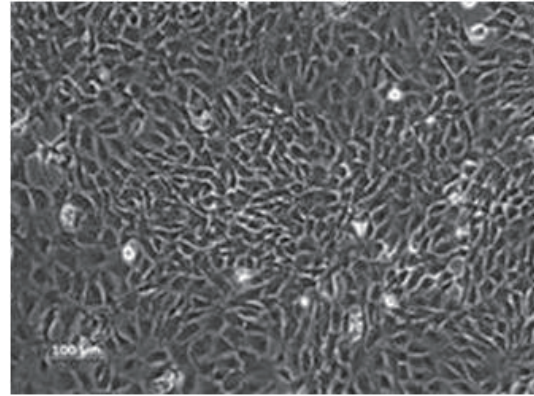


図 3-6 P-4

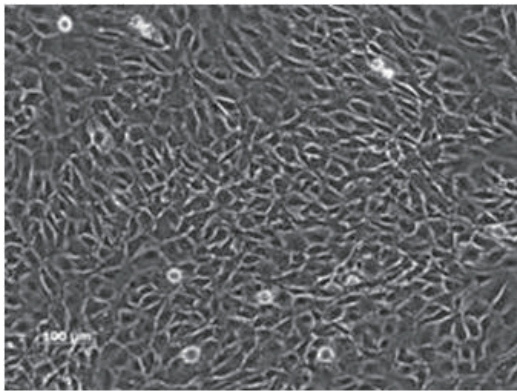


図 3-3 P-1

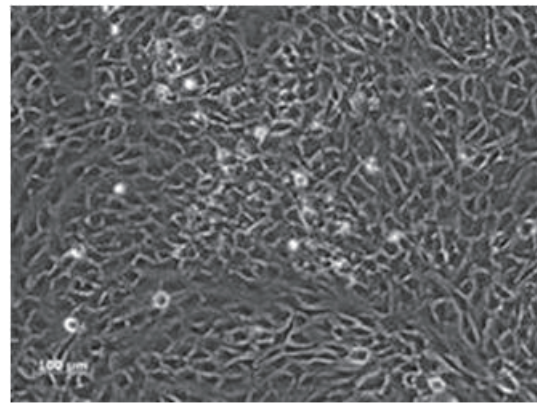


図 3-7 P-5

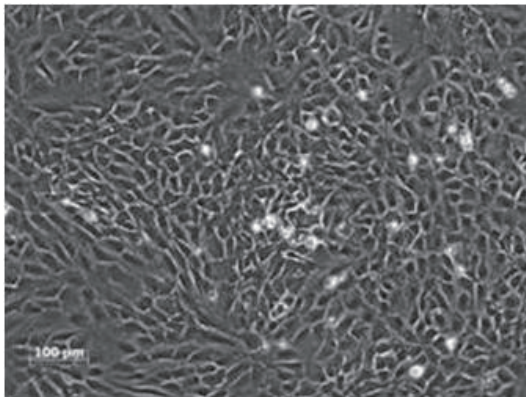


図 3-4 P-2

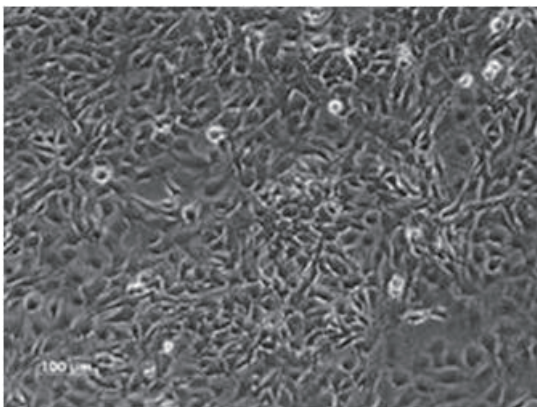


図 3-5 P-3

2. 3. DNA マイクロアレイ分析およびデータの解析

精製後のトータル RNA について、3' IVT Express Kit (アフィメトリクス社) を用いて、cDNA に逆転写後、ラベル化 aRNA を調製し、精製した後、フラグメンテーションを行った。GeneChip Hybridization, Wash, and stain Kit (アフィメトリクス社) の試薬と混合し、Mouse Genome 430 2.0 アレイ (アフィメトリクス社) に注入後、45°C で 16 時間、ハイブリダイゼーションを行った。

ハイブリダイゼーションの終了後、アレイの中の溶液を除去し、同キットを用いて Fluidics Station 450 (アフィメトリクス社) で洗浄および染色後、Gene Chip Scanner 3000 (アフィメトリクス社) を用いてマイクロアレイ分析を行った。

まず、披験化学物質として Comp. A 処理群および溶媒対照として DMSO 0.1% 処理群のマイクロアレイデータ (各 n = 3) について、DFW、MAS5、RMA および qFARMS により正規化し、溶媒対照群と披験化学物質との間で階層的クラスタ解析を行った。その結果、DFW により正規化を行った場合が、2 群間で最も大きく異なるクラスタを形成した (図 4-1)。

次に、披験化学物質として既知発がんプロモーター 5 化合物 (P-1~5) 処理群および溶媒対照として DMSO 0.1% 処理群のマイクロアレイデータ (各 n = 3) について、それぞれ DFW、MAS5、RMA および qFARMS による正規化を行い、溶媒対照群と披験化学物質との間で 2 群間比較解析を行

った。その結果、qFARMS により正規化を行った場合においてのみ、5 化合物すべてにおいて、異なるクラスターを形成した。

さらに、5 種の既知発がんプロモーター (P-1~5) 処理群および DMSO 0.1% 処理群のマイクロアレイデータ

(各 n = 3) の計 6 群について、クラスター解析を行った結果、Bhas42 細胞形質転換試験で陽性を示した Comp. A および既知発がんプロモーター 4 化合物 (P-1~4) 処理群は、DMSO 0.1% 処理群との間にクラスターを形成し、Bhas42 細胞形質転換試験で陰性であった既知発がんプロモーター P-5 処理群は、DMSO 0.1% 処理群との間にクラスターを形成しなかった (図 4-2)。

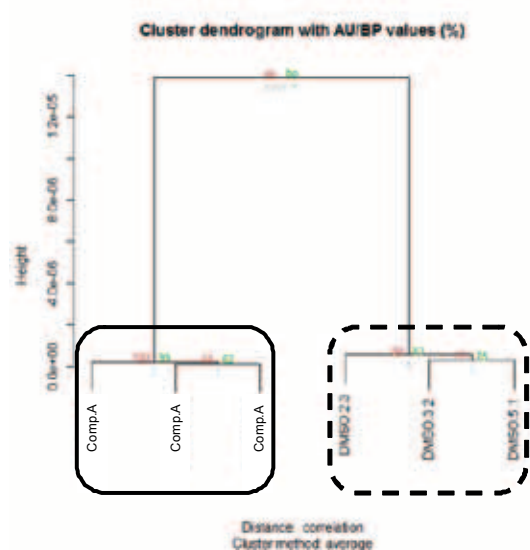


図 4-1 Comp.A のクラスター解析結果

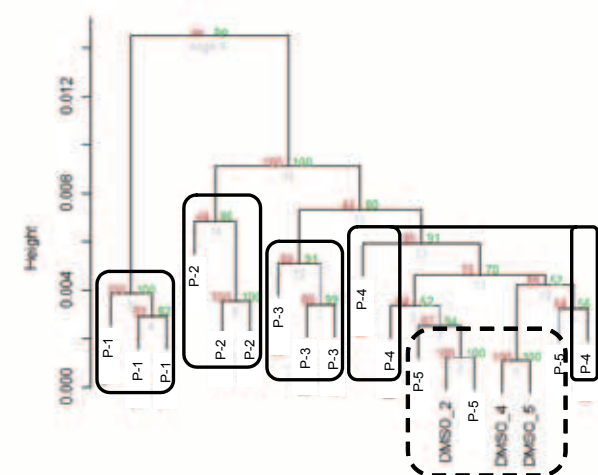


図 4-2 既知発がんプロモーター (P-1~5) 処理群および溶媒対照 (DMSO) 処理群のクラスター解析結果

これらのマイクロアレイデータのクラスター解析の結果から、5 種の既知発がんプロモーターおよび新規に発が

んプロモーター活性が予測される Comp. A の Bhas42 細胞形質転換試験におけるフォーカス形成能と mRNA の発現変動との間に、強い関連性があることが示唆された。

また、披験化学物質 (Comp. A および既知発がんプロモーター 5 化合物) 処理群および DMSO 0.1% 処理群のそれぞれの正規化データについて、Rank Products により DMSO 0.1% 処理群に対して各披験化学物質処理群で有意 (FDR $p < 0.05$) に mRNA の発現が増大したプローブセットおよび減少したプローブセットを抽出し、オンラインツール DAVID (The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) Bioinformatics Resources により、Pathway (KEGG) に基づく Enrichment 解析を実施した。その結果、発現が増大した遺伝子のパスウェイについては、Bhas42 細胞形質転換試験で唯一陰性を示した P-5 処理と Bhas42 細胞形質転換試験で陽性であった他の披験化学物質の処理との間に共通性は全く無かった。そして、新規に発がんプロモーション活性が予測される Comp. A は、既知発がんプロモーター P-1 と共通するパスウェイが 19 認められ、2 化合物以上で共通するパスウェイ 28 経路のうち、約 2/3 で Comp. A および既知発がんプロモーター P-1 が共通であった (表 1)。また、Bhas42 細胞形質転換試験結果で陽性である披験化学物質 5 種で共通していたパスウェイには、発がんメカニズムに係わることが報告されているパスウェイが多く含まれていた。

表 1 溶媒対照群に対して mRNA 発現が有意に変動したパスウェイの共通性

0.05 UP						
	P-1	P-2	P-3	P-4	P-5	Comp.A
P-1		1	6	3	0	19
P-2	9		5	4	0	0
P-3	2	3		7	0	3
P-4	5	6	6		0	2
P-5	5	9	5	6		0
Comp.A	4	3	3	7	4	

0.05 DOWN

3. まとめ及び今後の展望

以上、披験化学物質処理群として Comp. A および既知発がんプロモーター 5 種 (P-1~5)、溶媒対照群として 0.1% DMSO により処理を行った Bhas42 細胞について、完全繰り返し実験 3 回の RNA 試料 (各 n = 3) から、mRNA の発現変動を DNA マイクロアレイにより分析を行った。その結果、各披験化学物質処理群と溶媒対照群との 2 群間比較解析およびパスウェイ解析のいずれにおいても、Bhas42 細胞形質転換試験結果で陰性であった披験化学物質は、陽性であった披験化学物質とは、クラスター形成および濃縮度の高いパスウェイが大きく異なることが明らかとなり、Bhas42 細胞における DNA マイクロアレイ分析による mRNA 発現変動の解析結果と形質転換フォーカスの形成結果は関連性があることが示唆された。また、Bhas42 細胞形質転換試験結果で陽性である披験化学物質 5 種で共通して

いたパスウェイには、発がんに係わることが報告されているパスウェイが多く含まれていた。

本研究は、神奈川県政策部総合政策課における地域科学技術振興事業、産学公地域総合研究費により実施した。

【参考文献】

1. K. Ohmori, K. Sasaki, S. Asada, N. Tanaka, M. Umeda, *Mutation. Research*, 557, 191-202 (2004)
2. Environment directorate, Organization for Economic Co-operation and Development. *OECD Environmental health and safety publications series on testing and assessment*, No.31, August 18, (2007).
3. K. Ohmori, M. Umeda, N. Tanaka, H. Takagi, I. Yoshimura, K. Sasaki, S. Asada, A. Sakai, M. Asakura, H. Baba, Y. Fushiwaki, S. Hamada, N. Kitou, T. Nakamura, Y. Nakamura, H. Oishi, S. Sasaki, S. Shimada, T. Tsuchiya, Y. Uno, M. Washizuka, S. Yajima, Y. Yamamoto, E. Yamamura, T. Yatsushiro, *Alternatives to Laboratory Animals*, 33, 619-639 (2005)
4. K. Ohmori, Y. Kawamura, *Food Additives and Contaminants*, 26(4), 568-373 (2009)

アレルギーを指標とした新たな評価系の構築と

「安全・安心」な農水産物生産システムの創生

板垣 康治

1. はじめに

現在、国民の3人に1人は何らかのアレルギー症状を有しているといわれている。アレルギー疾患の一つである食物アレルギーは、ヒトが生きていくために必須である食品によって起きるため、その他のアレルギー疾患以上に対応も難しく、深刻な問題となっている。一方、これまでは、これといって有効な治療法がなく、「除去して治るのを待つ」消極的な対応しか施されていなかったが、最近、「食べて治す」積極的な治療法が導入されて、食物アレルギー治療も変革期を迎えている。

我々の生活は、科学技術の進歩とともに非常に便利になった。農水産業分野においても、農作物の品種改良、食品加工技術、貯蔵・流通技術など大きな発展を遂げた。その結果、病虫害に強い新たな品種が開発され、四季を問わず、食べたい食品を入手することができ、新鮮な状態を維持したまま長期保存も可能となった。しかしながら、植物にとって自分を守る生体防御因子が、アレルギーとなっていることや、収穫後、長期保存中のリンゴにおいて、特定のアレルギーが増加しているという報告もある。また、診断・治療においても、アレルギーを特定しないまま、過剰に除去されている現状も踏まえて、本研究では、食品の生産から消費までを通して一貫したアレルギー制御技術を開発し、得られた成果を農水産業の振興、化学・食品工業分野における商品開発、知財取得に結び付けるとともに、医療分野における検査技術の向上、積極的治療などへ活用することにより食物アレルギーの予防、治療へ貢献することを目標とした。

1. 1 研究戦略

本研究テーマは、3つのカテゴリー、5つのサブテーマ

カテゴリー	サブテーマ
生産 保存	1. 植物アレルギー制御技術の開発
	2. アレルギー低減化を目指した栽培方法の開発
検査 解析	3. 高度アレルギー検査システムの構築
	4. プロテーム技術を利用したアレルギー解析システムの開発
予防・治療	5. 農水産物の低アレルギー化と積極的治療への応用

から構成されており、それぞれのサブテーマの研究リーダーは必ずしも食物アレルギーを専門とする研究者ばかりではないが、それぞれ専門とする分野においては、わが国を代表する研究者である。したがって、異分野の研究者がアレルギーをキーワードとして研究チームを組織することにより、これまでにない、ユニークで斬新な研究成果の創出が期待される。また、個々のサブテーマは独立性を維持しながら連携が図られることにより、境界領域での新たな成果も得られることが想定される。以下に、各サブテーマの概要を示す。

1) 植物アレルギー制御技術の開発 (研究責任者: 平塚和之; 横浜国立大)

- ・農産物の生産、貯蔵、流通過程におけるアレルギーの蓄積を抑制する技術を開発する。
- ・アレルギーとなるタンパク質の発現を特異的に制御する方法の確立を目指す。
- ・アレルギータンパク質の発現を制御する物質を探索する。

2) アレルギー低減化を目指した栽培方法の開発 (研究責任者: 井上弘明、立石 亮; 日本大)

- ・野菜、果物の品種間におけるアレルギー量の比較
- ・アレルギーを制御することを目的とした育種・栽培法について、遺伝子、タンパク質レベルで検討する。
- ・神奈川県の特産物 (落花生、キウイフルーツ、かんきつ類、トマトなど) について、アレルギー性を指標とした新たな付加価値を賦与した育種を目指すことにより、差別化を図る。

3) 高度アレルギー検査システムの構築 (研究責任者: 板垣康治; 北海道文教大学)

- ・検査会社で解析できない食物アレルギーの解析
- ・アレルギー解析情報のデータベース化と治療・予防への活用
- ・地域におけるアレルギー検査システムのモデル構築

4) プロテーム技術を利用したアレルギー解析システムの開発 (研究責任者: 平野 久; 横浜市立大)

- ・アレルギーの確定、及びアレルギーエピトープの同定をプロテオーム技術により高精度に行う方法を確立する。
- ・確立した方法によって、アレルギー治療への応用を図る。

5) 農水産物の低アレルゲン化と積極的治療への利用

(研究責任者：板垣康治；北海道文教大学)

- ・低アレルゲン化水産食品の開発とアレルギー治療への活用
- ・低アレルゲン性農産物のアレルギー治療、及び予防への利用

1. 2 研究計画

各サブテーマについて、1年次は基盤技術の確立、2年次は確立した技術によるデータ集積、3年次は2年次の結果に基づいて、それぞれ最終的な目標の達成を目指す。

初年度：

- ・遺伝子発現抑制をモニタリングできる新規システム構築
- ・各種農産物のアレルゲンスクリーニング
- ・小麦、キウイ、トマトなどについて、ターゲットとするアレルゲンを選定して、エピトープ解析、アイソフォームのアレルゲン性解析等の基礎的な検討
- ・特殊な症例におけるアレルゲン検出法の基礎的検討
- ・農水産物の低アレルゲン化技術の確立 他

次年度：

- ・アレルゲン遺伝子の発現抑制を指標とした化合物ライブラリースクリーニング系の開発と評価
- ・品種別アレルゲン性の検証
- ・栽培条件（加塩、ヒートショック、灌水制御など、ストレスを与える栽培法との比較）がアレルゲンの消長に及ぼす影響
- ・アレルゲンエピトープの同定、アイソフォームのアレルゲン性の検討
- ・アレルゲン検出法の選定、患者血清によるデータの集積
- ・低アレルゲン化食品のヒトでの負荷試験の実施 他

最終年度：

- ・低アレルゲン性キウイフルーツの育種を目指した基礎的検討を中心とした研究の推進と今後に向けた課題の整理
- ・各サブテーマに関して、研究成果をまとめ、雑誌等へ投稿するとともに、研究責任者の主導のもとで、公的研究助成金の獲得など研究の発展を模索する。

2. 実験と結果

2. 1 植物アレルゲン制御技術の開発

食品由来アレルゲンの健康への影響に関心が高まっている。現状では、それらを含有する食品を「避ける」ことが主な対応方法である。植物由来のアレルゲンの多くは防御応答に関連するタンパク質に由来することが知られている。すなわち、病虫害による刺激で防御応答遺伝子が発現誘導され、防御応答タンパク質の蓄積がおこり、それらが食品アレルゲンとして認識されることが示されている。

我々は、植物の遺伝子発現モニタリングに関する研究に取り組み、植物の防御応答遺伝子発現制御に関する研究を実施してきた。一連の研究により、発光レポーターを利用

した植物に病害抵抗性を誘導する化合物の探索・評価方法を確立した。

○発光レポーターを用いた化合物等の評価システムの高度化

我々はホタルルシフェラーゼ (firefly luciferase: Fluc) を高等植物の遺伝子発現モニタリングのレポーターとして用いる方法について、その黎明期より着手し、遺伝子発現制御に関する研究に応用し成果を上げてきた。また、タバコ由来の防御応答性遺伝子プロモーターと Fluc の融合遺伝子を導入したシロイヌナズナを用いることで、ハイスループットな抵抗性誘導剤の評価・探索が可能であることを示してきた。それらの実績を背景として、以下の研究開発に取り組んだ。

・化合物評価に有用な発光レポーター融合プロモーターの探索と評価

先行研究によって、我々は複数の病害応答に関連する情報伝達系に対応した遺伝子発現モニタリングシステムが構築可能であることを示してきた。しかし、それらのうちマルチウェルプレートを用いたハイスループットスクリーニング (High-throughput screening: HTS) に対応可能なものはタバコ *PR-1a* 遺伝子プロモーターのみであり、サリチル酸 (SA) を介した誘導抵抗性発現のモニタリングは可能であるが、エチレン (ET)、ジャスモン酸 (JA) 系のマーカーとして有用なシロイヌナズナの *PDF1.2* 遺伝子あるいは *MPK3* 遺伝子プロモーターを用いた系では、芽生えを用いた場合では十分な発現誘導を観察することができず、マルチウェルプレートによる HTS 系を実施することが出来なかった。そこで、病害応答性遺伝子のうち、芽生えでも比較的高発現する遺伝子について検討し、シロイヌナズナ由来の *PDF1.1* と *VSP1* 遺伝子プロモーターについて詳細に調べた。さらに、植物は病原感染等に対抗する手段として、防御応答遺伝子である抗菌性タンパク質を発現するが、それらの多くはアレルゲンとして作用することが知られている。そこで本研究では、アレルゲン蓄積のモニタリング系として、防御応答遺伝子発現の非破壊的検出方法の開発を行っている。平成 21 年度はアレルゲン遺伝子の発現制御を指標とした化合物ライブラリースクリーニング系の開発を目標とした。これまでの研究により、病害応答性遺伝子の *PR-1a* 遺伝子プロモーターを用いた系が、大規模な化合物スクリーニングに適した特性を有することを見出し、それを活用した化合物ライブラリースクリーニングを平成 20 年度から継続して実施した。また、病傷害応答性遺伝子発現制御のもう一つの重要な情報伝達系である、ジャスモン酸 (Jasmonic acid: JA) 経路に関与する化合物等のハイスループットモニタリング系について検討し、*VSP1* 遺伝子プロモーターを用いた系が有効であることなどを明らかにした。さらに、新規なストレス応答性遺伝子についてもプロモーターを単離し、それらの特性を調べた。また、アレルゲンレベル低減の方策として、低濃度のサルチル酸 (Salicylic acid: SA) 存在時のみ *PR-1a*

遺伝子プロモーターを誘導する化合物の探索も開始した。ストレス応答全般のモニタリング系として有用であると考えられる解毒系酵素遺伝子であるシロイヌナズナの *CYP81D1* ならびに *GSTU7* 遺伝子のプロモーターについても化合物評価系への応用を前提とした特徴付けを行った。

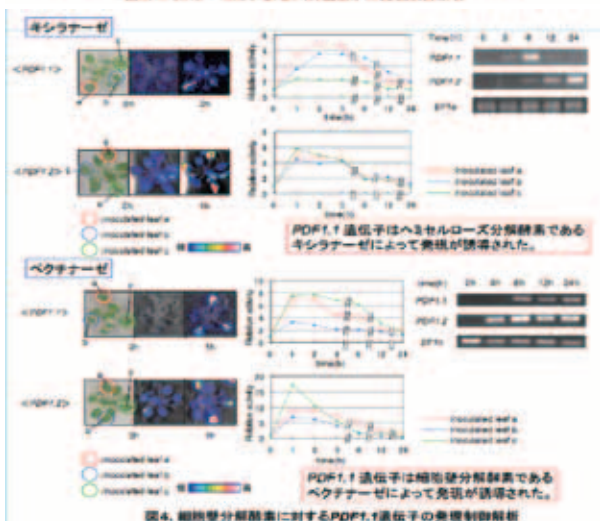
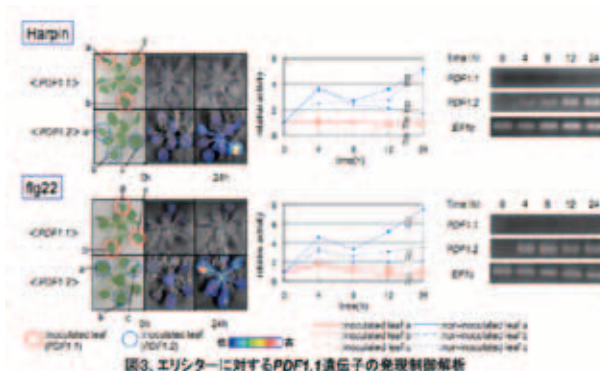
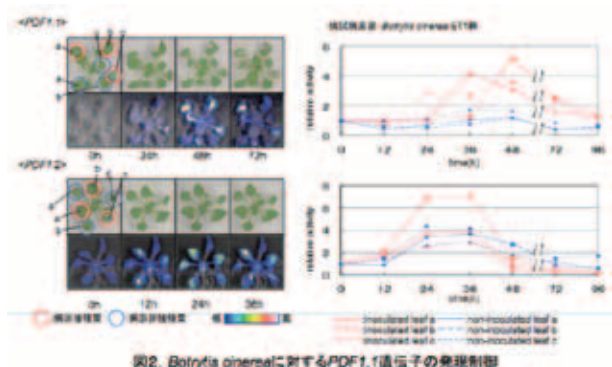
今回あらたに *PDF1.1*, *VSP1*, *CYP81D* および *GSTU7* 遺伝子のプロモーターを単離し、それらの応答性について調べた。

・ *PDF1.1* 遺伝子プロモーターの特徴付け

シロイヌナズナのゲノムDNAから単離した *PDF1.1* 遺伝子の約 1 kb, *PDF1.2* 遺伝子の約 1.5 kb のプロモーターを含む領域をホタルルシフェラーゼ遺伝子に連結した融合遺伝子をそれぞれ作成し、アグロバクテリウム法を用いてシロイヌナズナとタバコに導入し、形質転換植物体を得た。非侵襲的な発光モニタリングにより、プロモーターの応答性を詳細に調べたところ、*PDF1.1* プロモーターは発芽種子特異的な発現を示すことが明らかとなった(図1)。また、各種ストレス処理に対する *PDF1.1* プロモーター活性の挙動は mRNA の蓄積パターンとよく一致し、*PDF1.2* 遺伝子のそれとは異なる病害応答性と組織特異性を示すことが明らかとなった。また、タバコに導入した場合においてもシロイヌナズナ *PDF1.1* 遺伝子プロモーターは同様な発現特異性を有することから、その制御機構の保存性は高いことが示唆された。



さらに、灰色かび病菌 (*Botrytis cinerea*: BC), 野菜類軟腐病菌 (*Erwinia carotovora*: EC) などの病害刺激、エリシター処理のほか、サリチル酸(SA)あるいはジャスモン酸(JA)などの植物アレルゲン誘導刺激としても重要な化合物を含む各種処理を試みた。その結果、*PDF1.1* プロモーターはBCおよびECの接種に対しては明瞭な応答性を示したが(図2)、SAおよびJA、SA経路依存的に防御応答遺伝子(アレルゲン遺伝子)を活性化するエリシター(Flg22, Harpin)には応答しなかった(図3)。しかし、ペクチナーゼおよびキシラナーゼなどの細胞壁分解酵素に対しては明瞭な発現誘導が認められた(図4)



これらの結果は、*PDF1.1* プロモーターが、SAおよびJAなどの病害応答刺激伝達経路とは異なる情報伝達経路を用いて病害応答性遺伝子発現制御されていることを強く示唆している。*PDF1.1* プロモーターが有するこのような発現特性は、SA系およびJA系と独立した病害応答性遺伝子発現機構のモニタリング系として注目される。本研究課題においては、*PDF1.1* プロモーターの誘導あるいは抑制を目安とした化合物スクリーニング等に活用されることが期待される。そのような化合物は、既存の防御応答遺伝子を活性化せずに病害抵抗性をもたらす、すなわちSAまたはJA誘導性の、多くのアレルゲン遺伝子を活性化せずに、一定の病害抵抗性を付与することが可能となることが期待できる。従って、*PDF1.1* プロモーターの利用は、低アレルゲン化に貢献する全く新しいタイプの植物活性化剤の開発に大きく貢献する可能性もある。

2. 1. 2 *VSP1* 遺伝子プロモーターの特徴付け

シロイヌナズナ由来の *Vegetative storage protein 1* (*VSP1*) 遺伝子はダイズの貯蔵タンパク質である *VSP* のアミノ酸配列の相同性から同定された。この *VSP1* 遺伝子はJA / ET 経路で誘導される *Plant defensin 1.2* (*PDF1.2*) 遺伝子とともに JA 経路のマーカー遺伝子として汎用されている。その発現は *PDF1.2* 遺伝子と同様に病害や傷害により誘導されるほか、花器官や若い果実などでも特異的に誘導されることが分かっている。このことから、*PDF1.2*

遺伝子とは異なった特徴的な挙動を示す遺伝子であることが窺われる。

VSP1 遺伝子のプロモーター領域にホタル由来のルシフェラーゼ遺伝子 (*F-luc*) を結合したコンストラクト (*VSP1::F-luc*), 内部標準として 35S プロモーターにウミシイタケ由来のルシフェラーゼ遺伝子 (*R-luc*) を結合させたコンストラクト (*35S::R-luc*) を作成した。これらのプラスミドを付着させた金粒子をタバコ培養細胞 (BY-2) にパーティクルガンにより打ち込むことで一過的形質転換体を作出した。その後、デュアルルシフェラーゼアッセイ系を用いて発光を測定した。JA 処理による *VSP1* 遺伝子プロモーターの誘導活性は *F-luc*, *R-luc* の相対値で評価した。同様のことを *PDF1.2::Fluc*, *35S::R-luc* について行った。その結果, *VSP1* 遺伝子プロモーターが既存の *PDF1.2* と比較して良好な JA 応答性を示す可能性が示唆された (図 5)。

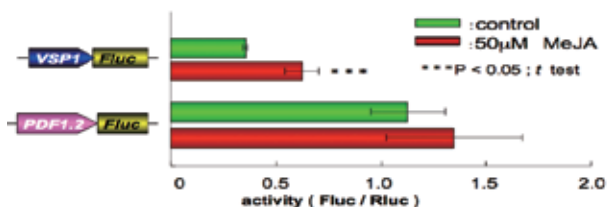


図 5. *VSP1* 遺伝子と *PDF1.2* 遺伝子プロモーターの遺伝子銃を用いた一過性発現による比較。

次に, そのレポーターカセットを T-DNA ベクターに挿入したものをアグロバクテリウム法でシロイヌナズナに導入し, 得られた形質転換体を選抜して良好な JA 応答性を示すことを確認し, 発芽直後の幼植物体においても明瞭な JA 応答性を示すことが判明した (図 6, 図 7)。

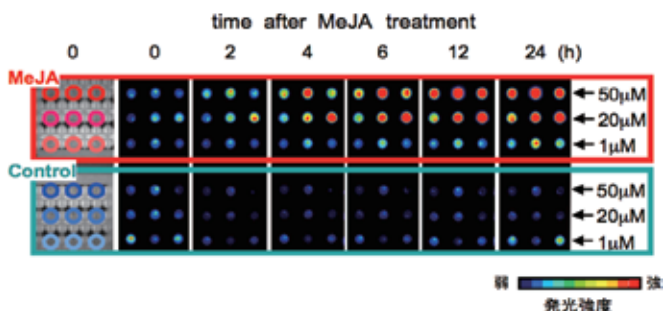


図 6. *VSP1* 遺伝子プロモーターの幼植物体におけるジャスモン酸メチルによる発現誘導観察。

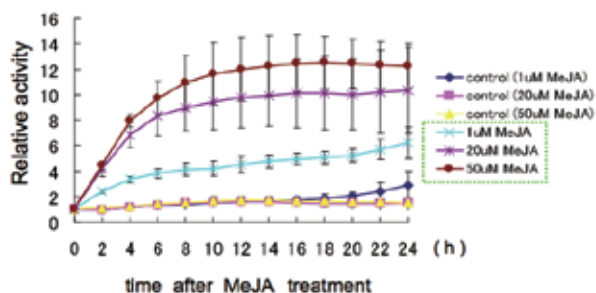


図 7. *VSP1* 遺伝子プロモーターのジャスモン酸メチルによる発現誘導の定量観察。

さらに, *VSP1* プロモーターは JA 応答性プロモーターとして汎用されている *PDF1.2* プロモーターと比較して, より強く, 長時間にわたる発現誘導が観察可能なことが判明した。この特性は, 発芽種子においても顕著であり, 特に 96 穴マルチウェルプレートを用いたハイスループットアッセイにも適応可能であることが示された。さらに内在遺伝子の発現パターンとも良く一致することが示された (図 8)。

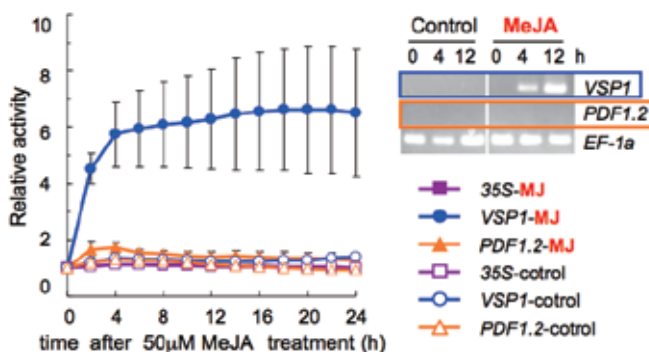


図 8. *VSP1* 遺伝子プロモーターと *PDF1.2* 遺伝子および CaMV35S プロモーターとのジャスモン酸メチルによる発現誘導比較。右上図は RT-PCR による内在遺伝子の発現検出

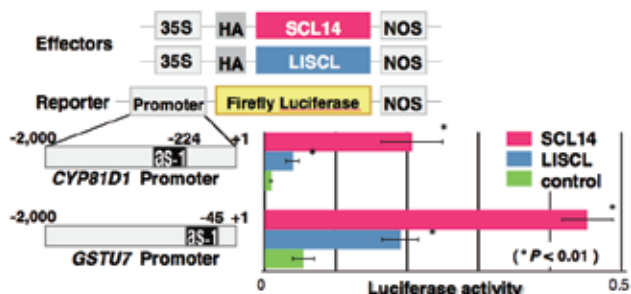


図 9. *SCL14* あるいは *LISCL* 遺伝子の同時導入による *CYP81D1* ならびに *GSTU7* 遺伝子プロモーターの発現誘導比較

○タバコ *PR-1a* 遺伝子プロモーターを用いた発現阻害モニタリング系の構築

SA 誘導性の酸性 PR タンパク質はアレルゲンとなることが知られており、その発現誘導を最小限に抑える技術は食品アレルゲンの管理にも有用であると考えられる。そこで、タバコ *PR-1a* 遺伝子プロモーターの発現誘導を特異的に阻害する活性を検出可能な系の構築を試みた。

これまでに我々が構築してきた実験系では、発現誘導の検出は容易であっても、遺伝子発現の特異的抑制は、細胞毒性による発現抑制と区別がつかず、その検出は困難であった。そこで、内部標準として、カリフラワーモザイクウイルスの 35SRNA プロモーター (CaMV35S) に、発光波長帯が異なるヒカリコメツキ由来赤色発光型ルシフェラーゼ遺伝子 (CBR) を連結したものをを用いることで、そのような問題が回避可能であると考えた (参考文献 3)。その結果、細胞毒性を示す化合物等の活性を、35S プロモーターの阻害活性としてモニター可能な系を構築することに成功し、実際に *PR-1a* 遺伝子プロモーターの阻害活性を検出可能であることを確認することが出来た。

タバコ *PR-1a* 遺伝子プロモーターの発現抑制を観察するには、*PR-1a::F-luc* を導入したシロイヌナズナの SA 処理時の発光を目安にして実施可能であるが、処理した化合物が毒性を有する場合にも同様に *PR-1a::F-luc* の発現抑制として観察されてしまい、結果として膨大な偽陽性が出現することが予想される。そこで、内部標準として、35S プロモーター領域と赤色発光型ルシフェラーゼ遺伝子 (CBR) を結合したコンストラクト (*35S::CBR*) を用いることにした。

・赤色発光ルシフェラーゼを内部標準とするシロイヌナズナの作製

まず、*35S::CBR* を導入したシロイヌナズナを作製した。それを花粉親として、*PR-1a::F-luc* を導入したシロイヌナズナと交配し、得られた種子の後代から CBR と F-luc の両方の遺伝子をホモに有する系統を選抜した。また、SA 処理により、明瞭な *PR-1a::F-luc* の発現誘導が観察可能であることを確認した。

・実験条件の検討

代表的な SA 誘導性遺伝子発現の阻害剤としては、植物ホルモンの一種であるアブシシン酸 (ABA) が挙げられる。そこで、ABA 処理による *PR-1a* プロモーターの発現抑制について検討した。具体的には、ABA 処理後の 24 時間後に *35S::CBR* × *PR-1a::F-luc* の種子をマルチウェルプレートに播種し、春化処理後にルシフェリンを加え、24 時間後に ABA を処理し、さらに 24 時間経過後に SA を処理した。発光は光子カウンティングカメラを用いて行い、赤色発光と緑色発光をフィルターにより分離してデータを取得した。*PR-1a* プロモーターの転写活性は F-luc 活性と CBR 活性の相対値として計測、評価した。その結果、濃度依存的に *PR-1a* プロモーターの転写抑制がおこることが確認でき

た。

・384 穴プレートを用いたスクリーニング系の改良

これまでのスクリーニング系は 96 穴プレートをもちいた方法であったが、より一層のハイスループット化とコストダウンを目的として、384 穴プレートを用いた HST 系の構築を試みた。その結果、1 ウェルに 1 粒の配置で、60μl の液量で実施可能であることが判明した。この方法では、スペースが 4 分の 1、使用する化合物量は半分以下に節約が可能で、しかも精度の低下は殆ど無いことが示された。

○化合物ライブラリーからの有用化合物探索

前述した一連の実験系開発と並行して、化合物ライブラリーを用いた有用化合物探索を実施した。具体的には、*PR-1a* または *VSPI* 遺伝子プロモーターの条件的誘導活性を示す化合物と、それぞれの誘導抑制活性を示す化合物の探索を試みた。

・タバコ *PR-1a* 遺伝子プロモーターを用いた条件的防御応答誘導活性を有する化合物の探索

PR-1a の誘導が殆ど観察出来ない低濃度の SA を処理し、さらに化合物を処理した場合に明瞭な発現誘導が見られるものを選抜した。具体的には、96 穴プレートに *PR-1a::F-luc* を導入したシロイヌナズナの種子を 3 ないし 4 粒播種し、春化処理後にルシフェリンと化合物ライブラリーを加え、同時または一定時間後に低濃度 SA を添加し、その後の発現誘導を SA 無処理区と比較して誘導活性を評価した (図 10, 11)。

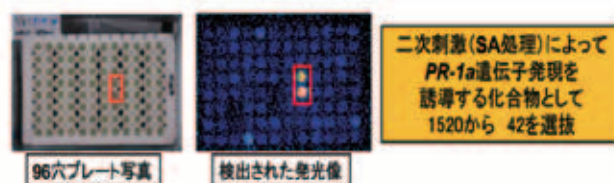
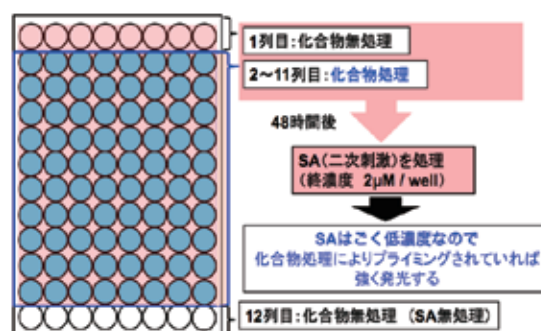


図 10 二次刺激によって *PR-1a* 遺伝子発現を誘導する化合物のスクリーニング

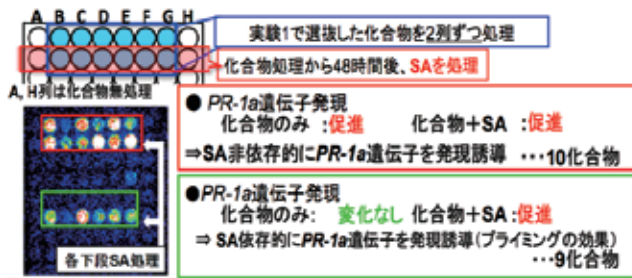


図 11. 選ばれた化合物の SA 処理要求性の確認

選ばれた化合物のうち 2 種類について炭疽病菌接種によりそれらの病害防除効果を検討した。具体的には、SA 処理あるいは既知の抵抗性誘導剤としてその高い SAR 誘導能が示されている benzothiadiazole (BTH) あるいは beta-aminobutyric acid (BABA) を比較対照として、RT-PCR 法により病原菌の生育抑制を指標とした活性評価を試みた。その結果、両化合物ともに抵抗性誘導活性が検出され、一方は SA、BABA よりも高い防除効果を示した(図 12)。この結果は、下図の「化合物 2」が当初の探索目的に適う性状を有する化合物であることを示唆している。

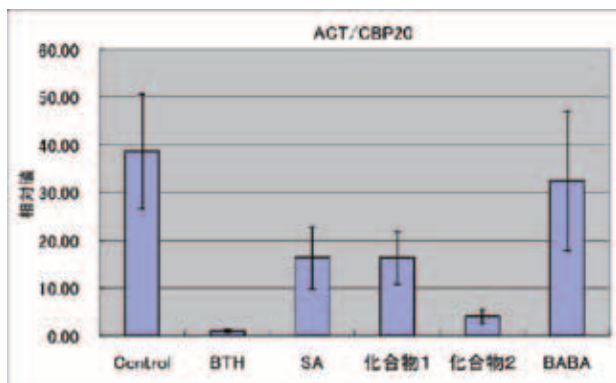


図 12. 選ばれた化合物の病害防除効果試験

各化合物を処理後に病原菌を接種し、4 日後に全 RNA を抽出し、各サンプル中の炭疽病菌由来 mRNA (ACT) と植物体由来 mRNA (CBP20) を RT-PCR 法により定量し、それらの存在比を求めた。各データは 4 回の独立した実験の平均値。

・デュアルカラーシフェラーゼアッセイを用いた化合物ライブラリーからの有用化合物探索

作製した *PR-1a* 遺伝子特異的な発現抑制を観察可能なシロイヌナズナを用いて、化合物ライブラリーからの *PR-1a* 発現誘導抑制活性を示す化合物の探索を試みた。具体的には、96 あるいは 384 穴プレートに播種したシロイヌナズナ種子にルシフェリンと化合物を処理し、24 時間後に SA を加えた後の発光を連続モニタリングした。*PR-1a* 遺伝子プロモーター活性抑制効果を指標として約 3000 化合物をスクリーニングした結果、31 種類の候補化合物が得られた。さらにそれらの比較検討を進めたところ、SA 誘導性遺伝子発現の抑制効果を示す化合物として知られている ABA と比較して、より高い発現抑制効果を示す化合物が数種類同定された(図 13, 14, 15)。

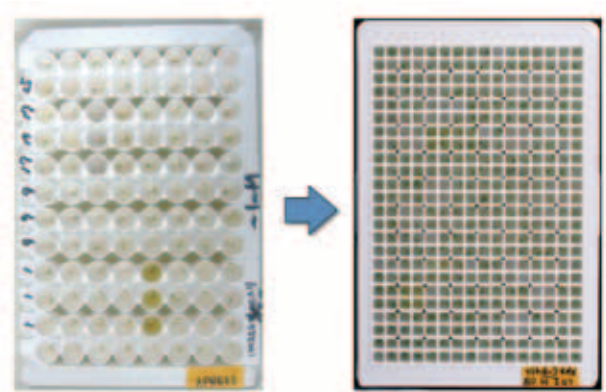


図 13. 384 穴マルチウェルプレートによるハイスループット化 96 穴プレートと比較して、子葉が直立し、比較的斉一な形状で生育するので再現性も良い。

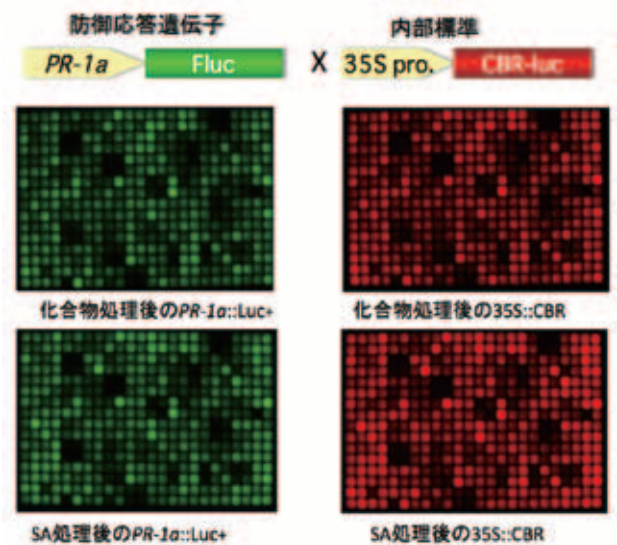


図 14. 384 穴マルチウェルプレートを用いたデュアルカラーアッセイによる遺伝子発現モニタリング

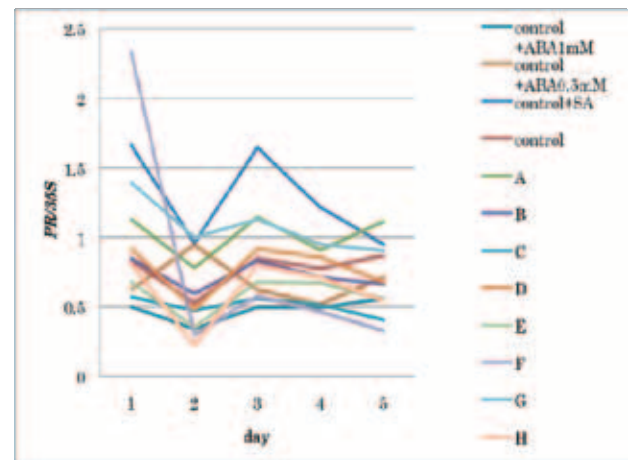


図 15. 選ばれた化合物群および ABA の *PR-1a* 遺伝子プロモーターの発現抑制試験

化合物 C と F は ABA 処理よりも強い発現抑制効果を示している。

2. 2 アレルゲン低減化を目指した栽培方法の開発

食物アレルギーは、食物を摂取した時にそこに含まれる物質を人の免疫系が異物と認識し、過剰に反応する疾患である。周知のとおり食物アレルギーは、現在、大きな問題となっている。その中で、野菜や果物を摂取した時に起こるアレルギー症状は、口腔アレルギー症候群（OAS、Oral Allergy Syndrome）であり、消化管の入り口である口腔粘膜とその周囲の粘膜組織において生じる即時型のアレルギー症状を示す。多くの場合、野菜や果物を摂取してから15分以内に、口腔、口唇、咽頭部の痒みや刺激感、あるいは閉塞感が出現し、その後速やかに消失する。しかしながら、それに引き続き、蕁麻疹や喘息、腹痛、嘔吐等の全身症状を呈し、まれにアナフィラキシーショックに至ることもあるとされている。果物類によるOAS症状は、最初、シラカバ花粉症患者のリンゴOASとして見つかった。すなわち、シラカバ花粉とリンゴ果肉組織に含まれるタンパク質の構造上の類似性から交差反応を示したことによる。このような交差反応性を示すタンパク質がリンゴのほかにも様々な野菜・果物類で認められている。特にシラカバ花粉症とは、バラ科の果実でその交差性が認められている。また、日本ではスギ花粉によるアレルギー患者数が最も多いとされているが、スギ花粉の主要アレルゲンとアミノ酸配列の相同性が部分的に高いタンパク質がトマトから見つかった。また、ブタクサ花粉症とはウリ科野菜（メロン、スイカ、キュウリ、ズッキーニ等）との交差性が認められている。このように多くの野菜や果物が食物アレルギーの原因となり得る状況にある。このような状況から神奈川県衛生研究所は、野菜・果物類に対するアレルギーの実態調査を行った。その結果、トマトに対するアレルギー患者はヤマイモアレルギーに続き第2位であり、また、果物類では、キウイフルーツ患者が最も多く、次いで、メロン、モモに対する患者が多かった（図16）。

多種多様な果実類において、一部の果実におけるアレルゲンの同定やその含量については明らかにされているものの、それらが果実種の間で共通性を示すものであるかどうかについては不明な点が多い。また、野菜や果物は、その植物種としての違いに加えて、多種多様な品種が作出され、流通・消費されている。したがって、果実種のみならず品種間におけるアレルゲン性の違いについても考慮すべきであるが、それについても不明な点が多い。多種多様な果実類においてこのような観点からアレルゲン性を評価することは、アレルギー患者の果物摂取に有効な情報を与えることが可能となる。本研究では、バラ科の果実を摂取するとアレルギー反応を示す患者の血清を用いて、同じバラ科果樹類のモモを材料として、その交差反応性を調査し、アレルゲン性物質のバラ科果樹類間における共通性について検討した。また、品種間におけるアレルゲン性の評価としてキウイフルーツおよびトマトを用いた。キウイフルーツについては、主要アレルゲンの蓄積が品種間で明らかに異なることが示されたため、将来の育種に応用することを視野に入れ、その蓄積機構についてさらに研究を進め

た。一方、アレルゲン性は、果実の成熟ステージや栽培環境によっても変化する可能性が示唆されている。アレルゲンの低減化を目指した栽培方法の開発のため、トマトを異なった環境下で栽培し、アレルゲン性の動態について検討を行った。

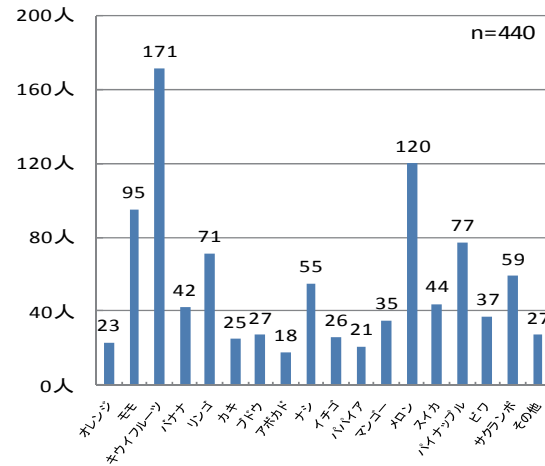


図16. 神奈川県衛生研究所によるアレルギーの実態調査。

キウイフルーツ；アレルゲン性タンパク質の発現機構について、キウイフルーツの主要アレルゲンであるアクチニンに着目し、mRNA および genomic DNA の構造解析を実施し、アレルゲン性タンパク質の発現機構について明らかにすることを試みた。キウイフルーツは多糖類の混入が多く、純度の高い核酸が得られにくい状況にあったが、種々の方法を検討し、実験に耐えうる純度の核酸の抽出に成功した。近年、キウイフルーツを含むマタタビ属には10個の異なるアクチニジンのmRNAが類似した成熟タンパク質をコードしていることが確認され、そのうち、キウイフルーツには酸性のアクチニン（Act 1a）と新たに蓄積量が極めて少ない塩基性のアクチニン（Act 2a）が存在することが確認された。すなわち、ゲノム上にも2種類のアクチニン遺伝子の存在が示された。一方、品種間で蓄積量に差異を示すアクチニンがどちらの遺伝子にコードされているのかについては明確ではない。蓄積量の品種間差を検討するにあたり、最初に、2種のアクチニン遺伝子の発現をRT-PCRによって調べた。実験に供したすべての品種（ハイワード、ブルーノ、ゼスプリゴールド、片浦イエロー、紅妃）で、Act 2a 遺伝子の発現が認められたが、Act 1a は紅妃のみ発現が確認されなかった。紅妃だけではなく、ゼスプリゴールドもアクチニン含有量が少ないことが明らかとなっているが、異なったメカニズムによる制御を受けている可能性を示唆するものである。さらにゲノミックPCRにより両アクチニン遺伝子の存在を調べた結果、すべての品種でAct 1a と Act 2a の遺伝子を持つことが示された。以上の結果から、少なくとも紅妃ではアクチニン（act 1a）が発現レベルで制御されていることが明らかとなった。

○果実の品種間におけるアレルギー性の評価

品種間におけるアレルギーの評価には、果物アレルギー患者数の最も多かったキウイフルーツ果実を用いて行った。また、主要な野菜として周年栽培・供給のために品種改良が進み、多くの品種が作出されているトマト果実を用いた。

・キウイフルーツ品種間における主要アレルギーの動態

キウイフルーツ果実にはシステインプロテアーゼに分類されるアクチニジンが多く蓄積し、果実中の全タンパク質の約半分を占めるといわれており、主要なアレルギーの一つとして認識されている。神奈川県はキウイフルーツの全国生産の約5%を占め、低アレルギー品種の育成が望まれている。神奈川県農業技術センター及び県下で栽培されているキウイフルーツ12品種（‘アップル’、‘センセーションナルアップル’、‘イエローキング’、‘イエロークイーン’、‘紅心’、‘イエロー紅心’、‘トライグリーン’、‘ゼスプリゴールド’、‘レインボーレッド（紅妃）’、‘アボット’、‘ブルーノ’ならびに‘ヘイワード’）を用いた。キウイフルーツにアレルギー反応を示す患者血清を用いて、ELISA及びウェスタンブロットにより品種間における抗原量の評価を行った。

・トマト品種間における主要アレルギーの動態

トマトは日本のみならず世界的にみても主要な果菜類であり、品質向上と病害抵抗性を付与するために様々な品種が開発されている。日本では、昭和30年ごろから周年栽培が盛んになり、それに伴って、複合病害抵抗性を持つ品種が多数開発された（表1）。トマトに含まれるアレルギー性タンパク質の挙動を調べるために、病害抵抗性を比較的持たない旧品種から最新の品種12種類（‘ハウス桃太郎’、‘桃太郎はるか’、‘桃太郎ゴールド’、‘麗容’、‘新愛知’、‘Sanzana’、‘Roma’、‘世界一’、‘ポンテローザ’、‘フルティカ’、‘イエローオーレ’ならびに‘キャンドルライト’）を用いて、キウイフルーツ同様に、トマトアレルギーの患者血清を用いてウェスタンブロットによってその動態を評価した。

・栽培方法によるトマト果実のアレルギー性の変化

近年、トマト栽培では、品質の向上を目指した新しい栽培方法がとりいれられている。例えば、果実の糖度を高める高糖度栽培がある。高糖度トマトの需要は高く、また、高値で取引される。一般的には、遮根シートによる根域制限栽培、海水（塩）を利用した浸透圧ストレス栽培、隔離床での節水栽培、培養液の浸透圧を調整した溶液栽培等により、高糖度化が図られている。また、病害防除のために、一時的に植物体を高温下に置くヒートショック法が開発されている。これらの新栽培技術がアレルギータンパク質の蓄積にどのような影響を与えているのかについて検討した。実験には、小型の矮性トマトである‘Micro Tom’を用いた。植物育成用のユニット内で気温25℃、明期を16時間、暗期8時間の条件により育苗ポットで栽培し、

開花後30日の果実を収穫し分析に供した。主な栽培は慣行法にしたがったが、灌水制限栽培では、開花後、水ポテ

表1. 実験に供したトマト品種の特徴。

品種名	特徴	開発者
ハウス桃太郎	高糖度、高品質	ハウス桃太郎
桃太郎はるか	高糖度、高品質	ハウス桃太郎
桃太郎ゴールド	高糖度、高品質	ハウス桃太郎
麗容	高糖度、高品質	ハウス桃太郎
新愛知	高糖度、高品質	ハウス桃太郎
Sanzana	高糖度、高品質	ハウス桃太郎
Roma	高糖度、高品質	ハウス桃太郎
世界一	高糖度、高品質	ハウス桃太郎
ポンテローザ	高糖度、高品質	ハウス桃太郎
フルティカ	高糖度、高品質	ハウス桃太郎
イエローオーレ	高糖度、高品質	ハウス桃太郎
キャンドルライト	高糖度、高品質	ハウス桃太郎

ンシャルが-1.4MPaになるように灌水量を調節した。また、塩ストレスとして1%のNaCl水溶液を水の代わりに灌水した。病害防除に効果があるとされているヒートショック栽培では、開花後に昼間1時間、栽培施設内の温度を45℃に上昇させて栽培した。これらの果実について、血清を使い、同様にイムノブロットによりアレルギータンパク質の動態について調査した。

・アクチニジンのアイソフォームの解析

本研究によりキウイフルーツでは、その主要なアレルギーであるアクチニジンタンパク質の蓄積量が品種間によって著しく異なることが明らかにされた。最近になって、アクチニジンにはクロマトグラフィー上で分離される2つのアイソフォームが存在し、その割合が品種間で異なることが示された。そこで、キウイフルーツ果実からアクチニジンアイソフォームを精製し、各アイソフォームのN末端のアミノ酸配列をエドマン法により解析し、その一次構造を比較した。

・アクチニジンの遺伝子構造の解析

アクチニジンの蓄積量に著しい差異のみられた品種を用いて、そのゲノムおよびcDNA構造について解析を行った。既報のアクチニジンの遺伝子配列を基にプロモーターの上流ならびに下流部分を増幅するプライマーを設計し、ゲノミックPCRによって数品種のキウイフルーツのアクチニジン遺伝子の増幅を試みた。その結果、プロモーターの上流部分に変異がある可能性が示されたので、Tail-PCRによって、変異部分を含むプロモーター領域のクローニン

グを行った。一方、果実より RNA を抽出し、RT-PCR により品種間におけるアクチニジン遺伝子の発現について調べた。以下に、それぞれ得られた結果を示す。

○バラ科果樹類におけるアレルゲン性タンパク質の同定

・各種果樹類におけるアレルゲン性の評価

近年、果物由来のアレルゲンによるアレルギー患者数が増大傾向にあることは、神奈川県衛生研究所が行った実態調査によって明らかにされている。日本における主要な果物であるリンゴ、モモ、サクランボ、セイヨウナシ、ニホンナシ、ウメ、アンズ、プラム等は、日本を代表する落葉果樹類であり、これらはすべてバラ科果樹類に分類される。バラ科果樹類における果実のアレルゲンについてその実態調査を行うため、モモを材料に調査を行った。バラ科の果実を摂取後に OAS を発症する患者のうち、REST 法によりカバノキ科の花粉、さらに、リンゴ、モモ、イチゴ等のバラ科果実に陽性反応を示す患者の血清を用い、モモ果実から抽出したタンパク質のうち患者が認識するアレルゲンアレルゲンの低減化を目指した育種・栽培法について、トマト、およびキウイフルーツをモデルとして研究を実施している。バラ科の果実にアレルギー反応を示す患者のうち、花粉症を併発し、さらに、一部のバラ科果実から抽出されたタンパク質に陽性反応を示す患者血清を得た。モモ果実からは塩や界面活性剤等を用いた数種の方法でタンパク質を抽出したが、いずれの方法でも抽出したタンパク質には低分子から高分子までの種々のタンパク質が含まれていた。ELISA によって、今回用いた血清がモモの抽出液中のタンパク質に反応するかどうかについて検討したところ、健常者の血清もモモの抽出液と反応を示した。しかしながら、これには濃度依存性はみられなかった。一方、患者血清は抽出液の濃度に依存した反応が示された。そこで、患者の認識するアレルゲンタンパク質の分子量を特定するためにイムノブロットを行った。その結果、様々な抽出方法によって得られたモモ抽出液の全てにおいて、分子量約 23kDa のタンパク質が検出された。しかしながら、その反応性は非常に低かった (図 17)。

モモからのタンパク質の抽出は界面活性剤や変成剤によって効果的に行われたが、イムノブロットによって検出

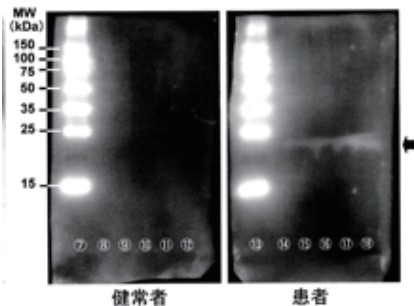


図 17. モモ果実抽出溶液中に含まれるアレルゲンのイムノブロットによる検出。写真左は健常者、右はアレルギー患者。矢印は反応した 23kD のタンパク質を示す。

された低分子タンパク質は比較的温和な条件で抽出される水溶性タンパク質であることが明らかとなった。一次構造の解析や諸性質の検討のために多くのタンパク質が必要とされたが、抽出タンパク質の SDS-PAGE の結果とイムノブロットの結果を比較すると、全抽出タンパク質に占める 23kDa のタンパク質の割合は非常に低く、また、種々の濃縮方法を試みたが、何らかの粘性のある夾雑物、おそらく多糖類が同時に濃縮され、その除去が困難であり、以後の解析を進めることができなかった。分子量からのみの推定であるが、抗菌活性を有し、PR-5 群に分類されるアレルゲンタンパク質として、Thaumatococcus protein (TLP) が挙げられる。これまで、モモからは TLP は未同定であるが、同じバラ科のリンゴでは Mal d2 タンパク質 (分子量 31kDa) が TLP であると報告されている。また、モモと近縁のサクランボでも Pru av2 (分子量 23kDa) が TLP であると報告されている。以上の結果から、患者血清の反応性は低いものの、モモの抽出液に見出された 23kDa のタンパク質も TLP である可能性が示唆された。

○品種間におけるアレルゲンタンパク質の蓄積量の違い

キウイフルーツは厚生労働省が定める表示推奨 18 品目の一つで、神奈川県衛生研究所が行った食物アレルギー実態調査では、果物類で最も患者数が多いことが示されている (図 16)。キウイフルーツには数多くの品種が存在し、また、神奈川県は全国栽培の約 5% の生産量がある。キウイフルーツの主要なアレルゲンはアクチニジンであることから、アクチニジンの品種間差異について検討した。おもな食用のキウイフルーツには *Actinidia deliciosa* と

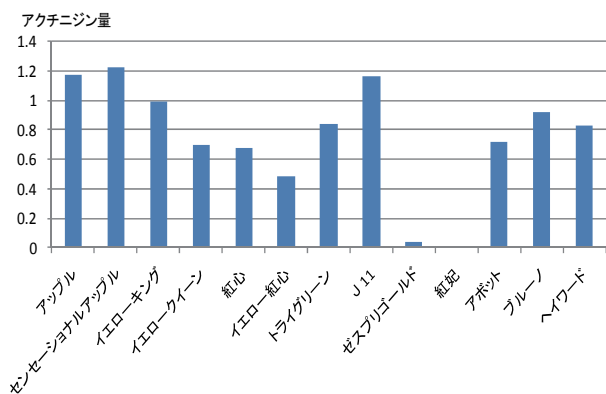


図 18. キウイフルーツの品種間におけるアクチニジン含有量の違い。ELISA 法による果肉 1g 当たりのアクチニジン含有量 (mg) を示した。含有量は品種間で異なっていた。

A. chinensis の 2 種が知られている。両者におけるアクチニジン含量を ELISA 法およびイムノブロットにより比較したところ、*A. deliciosa* 種では高い蓄積がみられ、*A. chinensis* 種では品種間で蓄積量に差異が認められた (図 18)。すなわち、*A. deliciosa* に属する ‘ヘイワード’、‘アボット’、‘ブルーノ’ ならびに *A. chinensis* に属する ‘アップル’、‘イエローキング’、‘紅心’ 等の間ではア

クチニジン含有量にほとんど差異は認められなかった。一方、‘ゼスプリゴールド’ および ‘紅妃’ (いずれも *A. chinensis* に属する) では、アクチニジン含有量は極めて低かった。また、別の報告では、‘ゼスプリゴールド’ にはアクチニジンの蓄積がみられない (検出感度以下) とされているが、今回作成した抗体はより高感度にアクチニジンを検出することができ、‘ゼスプリゴールド’ にも極微量のアクチニジンが蓄積していることも明らかとなった (図 18)。

品種間におけるアレルゲンの動態について、野菜としてトマトを用い、旧来並びに現在の品種について調査した。トマト種子は現在そのほとんどが F1 ハイブリッドであり、‘ハウス桃太郎’、‘桃太郎はるか’、‘桃太郎ゴールド’、‘麗容’ がこれに該当する。旧固定種として ‘新愛知’、‘世界一’、‘ポンテローザ’、また、赤色系のイタリアン品種として ‘Roma’、‘Sanzana’、さらに、中玉系の品種として最近開発されたまた ‘フルティカ’、‘イエローオーレ’、‘キャンドルライト’ を用いた (表 1)。10 名のトマトアレルギー患者の血清を使って、各果実より抽出したタンパク質溶液に対してイムノブロットを行った。4 名の患者血清が約 148kDa のタンパク質に陽性反応を示し、そのうち 2 名の患者血清が約 86kDa のタンパク質とも陽性反応を示した。しかしながら、これらは既知のアレルゲン性タンパク質と認識されていないものであった。トマトのアレルゲンであるプロフィリン (14kDa) と ns-LTP (12kDa) に強い反応性を示した患者血清を次の実験に使用した。すべてのトマト品種で約 11.2kDa のタンパク質と陽性反応を示した。また、‘ハウス桃太郎’、‘桃太郎はるか’、‘麗容’、‘新愛知’、‘Sanzana’ ならびに ‘世界一’ では、約 86kDa のタンパク質とも陽性反応を示した (図 19)。トマトの育種過程においては、食味の向上のみならず、耐病性の付与がなされている。耐病性にかかわる因子 (タンパク質) の中にはアレルゲン性との関連が指摘されているものもある。しかしながら、今回用いた品種間においては品種の違い、すなわち耐病性の付与とアレルゲン性との間に明確な相関はみられなかった。

○栽培方法によるトマト果実のアレルゲン性の変化

生育中の灌水量を制限することによって、果実糖度の高いトマトを作出することが可能であり、最近の消費者の嗜好から多く用いられている栽培技術である。極端な灌水制限を行った場合には、植物体にかかなりのストレスがかかり、ストレス誘導性の遺伝子発現が生じることも知られている。本実験では灌水量の制限と、塩水を灌水することによる浸透圧ストレスによる栽培で糖度の上昇を試みた。また、病害抵抗性付与のための栽培技術として、一時的に栽培環境を高温下におくヒートショック栽培を行った。これらの栽培方法がアレルゲンタンパク質の蓄積にどのような影響を与えているのかについて検討した。

コントロールと比較して水分ストレス (灌水制限法、塩水灌水法) を与えたトマト果実では約 36kDa のタンパク質が

増加し、ヒートショック法では約 36kDa と約 29kDa のタンパク質が増加した。約 36kDa のタンパク質を精製し N 末端側のアミノ酸配列を解析した結果、ペクチンエステラーゼであることが示された。したがって、灌水制限法と塩水灌水法で栽培したトマト果実中にはペクチンエステラーゼの蓄積が増大し、また、ヒートショック栽培ではペクチンエステラーゼに加えて約 29kDa のタンパク質の蓄積が増大することが示された。トマトアレルギーを持つ患者血清を用いたイムノブロットでは、灌水制限法、塩水灌水法で栽培されたトマト果実で約 42kDa、36kDa ならびに 29kDa のタンパク質と陽性反応がみられた。これらのうち、約 42kDa および 29kDa のタンパク質は健康者からの血清においても陽性反応が示された (図 19)。このことから、約 36kDa のタンパク質、すなわちペクチンエステラーゼは、水分ストレスによってその蓄積量が増大することが示された。ペクチンエステラーゼは果実細胞壁のペクチンの脱エステル化に働き、その後、ペクチン加水分解酵素 (ポ

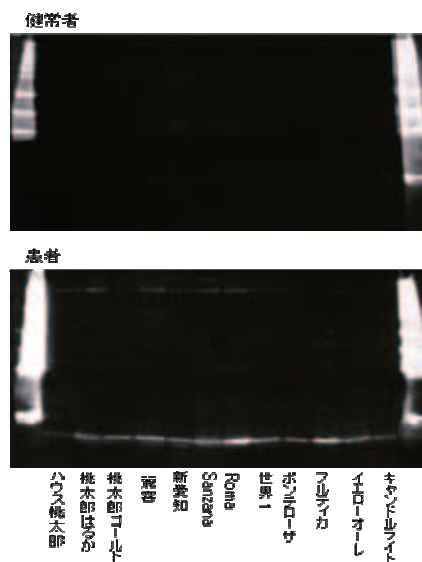


図 19. トマトの品種間におけるアレルゲンタンパク質含有量の違い。すべてのトマト品種で約 11.2kDa のタンパク質と陽性反応を示した。

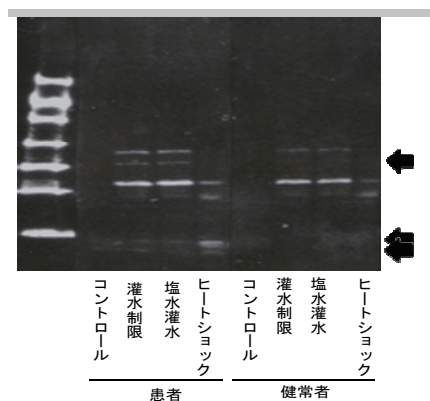


図 20. トマトの栽培条件の違いによるアレルゲンタンパク質の動態。

リガラクトナーゼ)が作用する環境を作り出す酵素であるが、本酵素タンパク質はトマトの主要なアレルゲンとしても認識されている。また、すべての栽培方法で検出されていた 11.2kDa、13.1kDa のタンパク質に対して、ヒートショック法で栽培した果実では強い陽性反応が見られた(図 20)。つまり、病害抵抗性を向上させるヒートショック栽培では約 13kDa のタンパク質を増加させることが確認された。検出された約 13kDa のタンパク質に相当するアレルゲンはプロフィリンと ns-LTP であり、ns-LTP は抗菌作用をもっている。したがって、水分ストレスを与えた栽培方法ではペクチンエステラーゼタンパク質を増大させ、また、ヒートショック栽培では ns-LTP と予想されるタンパク質が増加し、相対的にアレルゲン性が増加した可能性が示された。今回、用いた品種はインキュベーター内で栽培可能な矮性品種であり、食用品種とは果実品質が異なっている。今後は、主要な食用品種で、かつ、ハウスや温室で実際にこのような栽培環境で栽培されたトマト果実を用いて検討する必要がある。

○キウイフルーツのアクチニジンの諸性質

アクチニジンの含有量には品種間で差異があることが示された。最近、アクチニジンについて、クロマトグラフィー上で分離されるアイソフォーム (A1 及び A2) が存在し、その比率が品種間で異なることや、ゲノム上に 2 つのアイソザイムが存在するとの報告がなされている。また、アレルゲンタンパク質の蓄積が品種間で顕著に異なることから、育種によってアクチニジンを含まないキウイフルーツが作出できる可能性がある。そこで、アクチニジン諸性質およびその蓄積機構を明らかにするために遺伝子レベルでの検討を行った。

・アクチニジンのアイソフォームの分画と一次構造の解析

ここでは、クロマトグラフィー上で分離される 2 種類のアイソフォーム (A1 および A2) の一次構造について解析した。2 つのアイソフォームは陰イオン交換クロマトグラフィーの塩溶出時のグラディエントを緩やかにすることで分離される(図 21)。分離された 2 つのアイソフォーム (A1 および A2) について、抗アクチニジン抗体で精製を確認した(図 22)。しかしながら、2 つのアイソフォームの N 末端のアミノ酸配列を調べた結果、少なくとも 20 残基において同一であることが示された。最近、キウイフルーツの EST 解析を行っているグループがその情報解析を行い、*A. deliciosa* と *A. chinensis* では、アクチニジンをコードする遺伝子は 2 つのアイソザイムとしてゲノム上に存在し、それぞれ、酸性アクチニジンと塩基性アクチニジンをコードすると報告している。我々が分画したアイソフォームはともに酸性アクチニジンであり、ゲノム上に存在する 2 種のアクチニジンとは異なるものであることが明らかとなった。クロマトグラフィー上で分画される 2

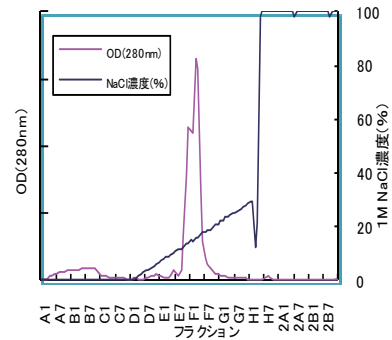


図 21. 陰イオン交換クロマトグラフィーによるアクチニジンアイソフォームの分離。

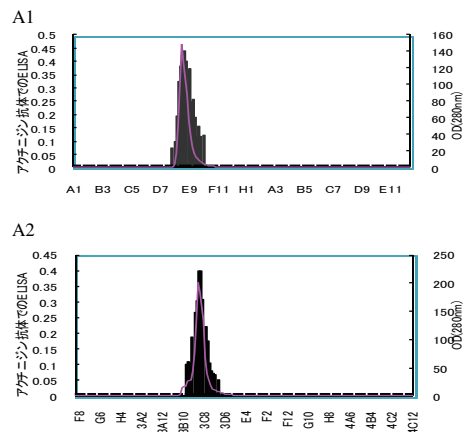


図 22. 分離されたアイソフォームの ELISA 結果。(上図 A1、下図 A2)

種類のアイソフォームは、その構成比が品種間で異なることから、本研究結果とあわせて考えると酸性アクチニジンは翻訳後に品種間で異なる修飾を受けている可能性が考えられた。ただし、これがアレルゲン性にどのように関わっているのかは不明であり興味を持たれる。

・プロモーター領域の解析

近年、キウイフルーツを含むマタタビ属には 10 個の異なるアクチニジンの mRNA が類似した成熟タンパク質をコードしていることが確認され、そのうち、*A. deliciosa* および *A. chinensis* には酸性のアクチニジン (Act 1a) と新たに蓄積量が少ない塩基性のアクチニジン (Act 2a) が存在することが確認された(前述のアイソフォームの報告とは異なる)。すなわち、ゲノム上にも 2 種類のアクチニジン遺伝子の存在が示された。キウイフルーツから核酸を抽出したが、当初は多糖類の混入が多く、純度の高い核酸が得られにくい状況にあった。その後、種々の方法を検討し実験に耐える純度の核酸の抽出に成功した。

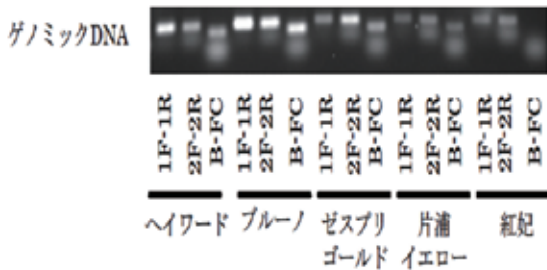


図 23. ゲノミック PCR によるアクチニジン遺伝子の増幅。ゲノミック PCR により両アクチニジン遺伝子の存在を調べたところ、全ての品種で *Act1a* と *Act2a* の遺伝子を持つことが示された。1F-1R では *Act1a* が、2F-2R では *Act2a* が増幅される。B-FC は *Act1a* のプロモーター領域を増幅するプライマー。

各品種（‘ヘイワード’、‘ブルーノ’、‘ゼスプリゴールド’、‘片浦イエロー’ならびに‘紅妃’）を用いてゲノミック PCR を行い、両アクチニジン遺伝子の存在を調べたところ、全ての品種で *Act1a* と *Act2a* の遺伝子を持つことが示された（図 23）。また、既報のアクチニジンの塩基配列情報（‘ヘイワード’、*Act1a*）を基にプロモーター領域を増幅するプライマーを作成した。その結果、アクチニジンの蓄積がほとんどみられない‘ゼスプリゴールド’ではプロモーターの上流部分が増幅されなかった（図 24）。すなわち、‘ゼスプリゴールド’では *Act1a* のプロモーターの一部が‘ヘイワード’とは異なっていることが示された。また、同様にアクチニジンの蓄積がほとんど見られない‘紅妃’についてもプロモーター領域の変異が確認された。Tail-PCR によって、‘ゼスプリゴールド’および‘紅妃’のプロモーター領域のクローニングを行った。ともに、プロモーターの上流部分が‘ヘイワード’の *Act1a* プロモーターとは異なる配列を含んでいた。しかしながら、プロモーター配列の変異は、転写開始点よりおよそ 1kb 上流から顕著であることから、このプロモーター領域の変異が実際の遺伝子発現にどの程度貢献しているかについて今後調べていく必要がある。

・アクチニジン遺伝子の品種間における発現の差異

2 種のアクチニジン遺伝子の発現について RT-PCR 法により確認した。用いた全ての品種（‘ヘイワード’、‘ブルーノ’、‘ゼスプリゴールド’、‘片浦イエロー’ならびに‘紅妃’）で *Act2a* の遺伝子発現は認められたが、‘紅妃’のみ *Act1a* の遺伝子発現は認められなかった（図 25）。

以上の結果から、少なくとも‘紅妃’ではアクチニジン（*Act1a*）が発現レベルで制御されていることが明らかとなった。また、‘ゼスプリゴールド’では mRNA の蓄積が確認され、プロモーター領域の違いでは説明できない別の要因があると考えられた。何らかの翻訳後制御が働いている可能性があると考えられる。‘紅妃’および‘ゼスプリゴールド’ではともにアクチニジンの蓄積量が低いことが示

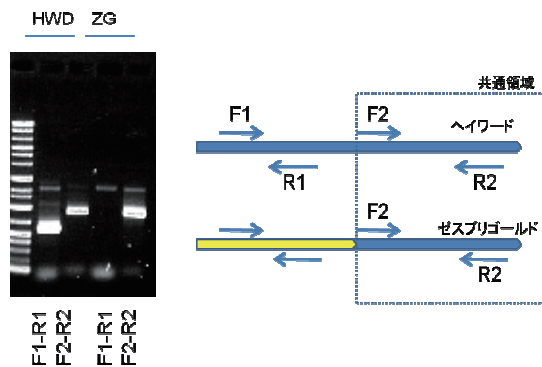


図 24. *Act1a* のプロモーター配列を基に gPCR を行った。‘ゼスプリゴールド’（ZG）では、プロモーター領域の上流が既知のものとは異なる可能性が示された。

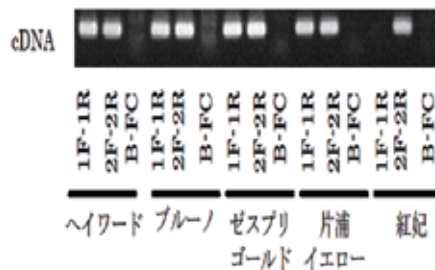


図 25. RT-PCR によるアクチニジン遺伝子の発現解析。全ての品種で *Act2a* 遺伝子の発現がみられたが、‘紅妃’では *Act1a* の発現がみられなかった。1F-1R では *Act1a* が、2F-2R では *Act2a* が増幅される。B-FC は *Act1a* のプロモーター領域（ゲノム DNA）を増幅するネガティブコントロール。

されているが、品種間で異なったメカニズムによる制御を受けている可能性が示された。

2. 3 高度アレルゲン検査システムの構築

医療機関（横浜市立大学、神奈川県立こども医療センター等）と共同で、より精度の高いアレルゲン検査システムの構築をめざした検討を実施した。また、検査会社などで解析できないアレルゲン解析を医療機関とともに実施した。さらに、魚類の主要アレルゲンであるバルブアルブミンを指標としてデータベース化を進めた。

○特殊なアレルゲンの解析

現在、食物アレルギーの検査としては、患者の血液中に存在する抗原特異的 IgE 抗体価を調べる方法が一般的である。本法は、簡便かつ安全性が高いことから広く全国の医療機関で利用されている。しかし、実際の症状と検査結果に乖離がみられる、あるいは検査できる食品が限られているという問題もある。食べるものすべてがアレルゲンになりうるという現状を背景に、高度医療機関には、一般の

血液検査では明らかにすることができない症例が数多く存在している。そこで、本研究では神奈川県内の医療機関（神奈川県立こども医療センター、横浜市立大学医学部など）と連携して、検査機関では対応が困難な症例について解析を試みた。

・ マツノミアレルゲンの解析

マツノミが原因でアレルギーを発症した例は、国内はもちろん、海外においても報告が少ない。そこで、横浜市立大学医学部皮膚科と共同で、アレルゲンの解析を試みた。その結果、図 26 に示したように、93 kD 付近にアレルゲンと思われるバンドを確認した。現在、同定すべく精製を進めている。

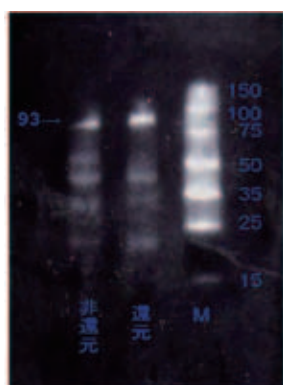


図 26. ウェスタンブロットングによるマツノミアレルギー患者血清のアレルゲン解析

・ オーツ麦アレルギーの解析

本症例は、神奈川県立こども医療センターとの共同研究によりアレルゲン解析を実施した。5 種類の抽出法によって調製したオーツ麦の抽出液を使用して患者血清のアレルゲンを解析した結果、35 kD、および 59 kD 付近に陽性と思われるバンドが確認された（図 27）。

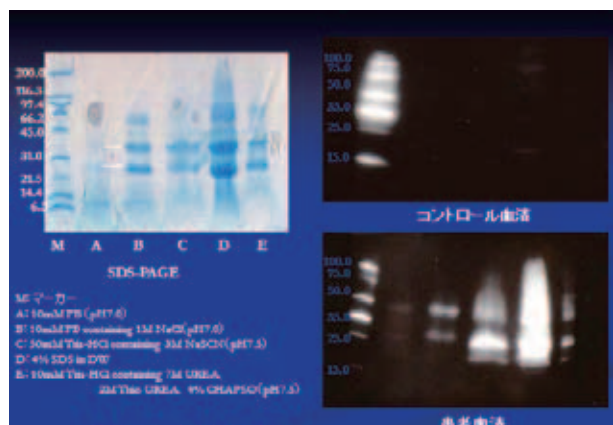


図 27. オーツ麦抽出液別 Immunoblotting

・ その他

キュウリ、雑穀、納豆、カシューナッツなどのアレルゲン解析を実施し、日本アレルギー学会などに

おいて症例報告を行った。

○魚類アレルゲンのデータベース化

魚介類は、我が国では古くから重要なたんぱく質供給源となっており、現在でも 40% を魚介類から摂取している。一方、魚介類アレルギー患者も多く、特に成人では、第 1 位を占めている。特に魚類は、我が国では非常に多くの種類が捕獲され、食用として利用されている。その種類は 300 種以上といわれているが、そのうち、約 130 魚種について、魚類の主要なアレルゲンであるバルブアルブミン含有量を網羅的に抗バルブアルブミン抗体を用いた ELISA 法によって定性解析を行った。その結果、特に軟骨魚類に属するカスベ（エイの一種）、ヨシキリザメなどで抗原性が低いことが示唆された。

2. 4 プロテオーム技術を利用したアレルゲン解析システムの開発

食物アレルギーは小児から成人まで認められるが、その大部分は乳児期に発症し、小児期に年齢と共に寛解していく。小児型食物アレルギーは、年齢別では 1 歳前後に最も多く認められる。卵、牛乳、小麦、大豆が主要アレルゲンとなっている。小児型の特徴は、自然に耐性の獲得が行われることで、大部分の症例で年月の差はあっても時間と共に寛解していく。すなわち、1 歳時に食物アレルギーと診断されてもそのうちの 9 割は遅くとも小学校入学時までは自然寛解するといわれる。

小児型食物アレルギーに対して成人型食物アレルギーでは、アレルゲンが魚類、エビ、カニ、果物などの場合が多く、年をとっても耐性を獲得していくことが少ない。また、近年報告が増えている新しい食物アレルギーのひとつに「口腔アレルギー症候群（OAS）」がある。これは成人の女性に多いとされ、原因抗原としては果物（キウイ、メロン、モモ、パイナップル、リンゴなど）や野菜が知られている。口腔内の症状だけの場合が多いが、ショック症状を呈することもある。欧米では以前からシラカバの花粉との交叉反応性が指摘されており、シラカバの自生地域に多く認められていた。日本でも花粉症との関連性が考えられている。

神奈川県衛生研究所アレルギー研究プロジェクトの板垣らの研究において、果物の中で最も発症頻度が高いのはキウイであり、果物アレルギー患者の 7 割を占めていることが明らかにされた。そこで、本研究では、このキウイと、従来から主要な食物アレルゲンとして知られる小麦を対象にして、アレルゲンの同定とエピトープの解明を目指した研究を行った。

○キウイアレルゲンの解析

キウイはマタタビ科マタタビ属の落葉蔓性植物である。果肉は緑色のゼリー状で、中に黒い種子が放射状に並んでいる。味は甘味と爽やかな酸味がある。また、近年ではニュージーランド産を中心に、ゴールドキウイと呼ばれる果肉が黄色い品種も出回っている。キウイ果汁中最も量の多

タンパク質はアクチニンと呼ばれるシステインプロテアーゼ (EC 3. 4. 22. 14) で、全体のタンパク質の40~50%を占める。パパイヤに含まれるパパイン、パイナップルに含まれるブロメラインも同様なシステインプロテアーゼである。このプロテアーゼは、乳タンパク質の分解、苦味の発生、食肉軟化作用、肉の消化の促進などに係わる。このアクチニンは、アレルゲンとしてすでに報告されている。そこで本研究では、アクチニンが研究の対象としたキウイアレルギー患者のアレルゲンであるかどうかを検証すると共に、アクチニンのエピトープの解析を行った。

・実験材料

グリーンキウイ品種ヘイワードとゴールドキウイ品種Hort-16Aの果肉を緩衝液中で磨砕し、遠心してタンパク質粗抽出液を調製した。この粗抽出液から陰イオン交換クロマトグラフィーによりアクチニンを分離精製した。一方、アレルゲン量の品種間差異を調べるため、グリーンキウイ3品種、ヘイワード、ブルーノおよびアボット、ゴールドキウイ7品種、センセーションアップル、アップル、イエローキング、イエロー紅心、紅心、J-11およびトライグリーンをSDS-PAGEに用いた。

・ELISAによるアレルゲン活性の解析方法

グリーンキウイにのみアレルギーのある6名、グリーン、ゴールドキウイともに症状の出る5名の計11名の患者 (表2) と健常者の血清を用いてELISA法によってアレルゲン活性を調べた。この際、患者血清を50倍希釈で、また、二次抗体 (蛍光抗ヒトIgE抗体) を1000倍希釈で用いた。

・抗体認識機構の検証方法

アレルゲンタンパク質を塩酸グアニジン処理、または、熱処理によって変性させた後に患者抗体と反応するかどうかによって、抗体が配列と構造のどちらを認識しているかを調べた。

・エピトープ部位同定の方法

精製したアクチニンをトリプシンおよび *S. aureus* V8プロテアーゼで消化した結果生じたペプチドを、逆相カラムを用いた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により分離した。各画分を回収し、エピトープ解析に用いた。アクチニンペプチドと患者抗体との反応を阻害 ELISA 法によって調べた。免疫反応が見られた画分を、ナノ液体クロマトグラフィーエレクトロスプレーイオン化四重極飛行時間型質量分析装置 (nanoLS-ESI-Q-TOF MS) により分析を行い、質量スペクトルを得た。質量スペクトルから SWISSPROT データベースを用いてペプチドを同定した。

・結果

陰イオン交換カラムにより精製したアクチニンとの反応性を検討した結果、11人のキウイアレルギー患者中3名がアクチニンを主なアレルゲンとしていることが判明した (図29)。アクチニンを塩酸グアニジン処理、または、熱処理によって変性させた後に患者抗体と反応するかどうか調べたところ、患者中1名の抗体がアクチニンの立体構造を変性させた状態においても反応することが判明した (図30) ので、この患者血清を使用し、エピトープ部位の解析を行った。

表2 11名の患者アレルギー症状の有無

患者コード	TO-1	TO-18	TO-44	TO-56	TO-58	TO-59	TO-60	TO-63	TO-64	TO-63	TO-70
ヘイワード (グリーン)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hort-16A (ゴールド)	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-

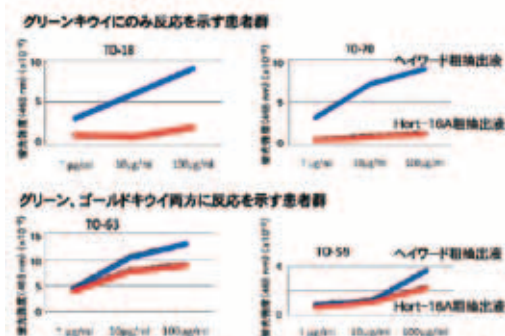


図28 キウイアレルギー患者のグリーンキウイおよびゴールドキウイへのアレルギー反応

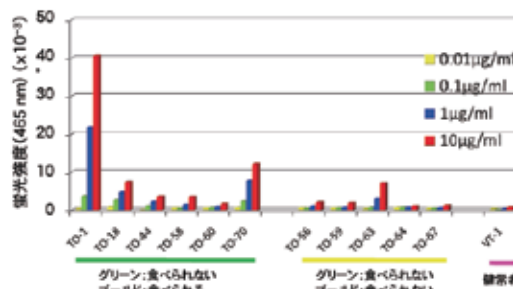


図29 アクチニンに対する患者血清の反応性

グリーンキウイにのみアレルギー症状を示す患者群の血清はアクチニンに対して濃度依存的に反応する。ゴールドキウイも食べられない群でもアクチニンに対して反応性を示す患者が見られる (TO-58, 59, 63)。両方のキウイが食べられない患者のアレルゲンは、アクチニンとそれ以外のタンパク質がアレルゲンである。

まずペプチダーゼによりアクチニンを酵素消化し、その消化物全体に対して反応性を検討した結果、リジレンドペプチダーゼおよびV8プロテアーゼ消化物には抗体との反応が認められた。この2種類の酵素消化物を、逆相カラムを使用した高速液体クロマトグラフィーにより分離し、そのペプチド画分について阻害ELISA法により検討を行った。その結果、3本のペプチドが候補として検出され、質量分析によって同定された (図31)。アクチニンの表面上にあること親水性の高い部位であり3本とも立体構造上近い位置にあることが示唆された。

キウイ 10 品種についてアクチニン含量を調べたところ、アクチニン含量にはかなり大きな変異があることがわかった (図32)。このことから通常の交雑育種によってアクチニン含量を低減させることができる可能性があると考えられた。

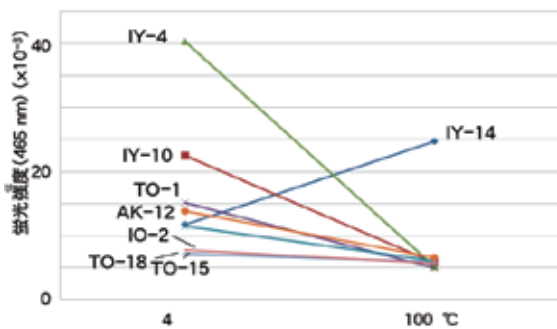


図 30 温度による構造変化が IgE 結合性に及ぼす影響
タンパク質を高温で変性させてもアレルギー反応が低下しない患者がいる。

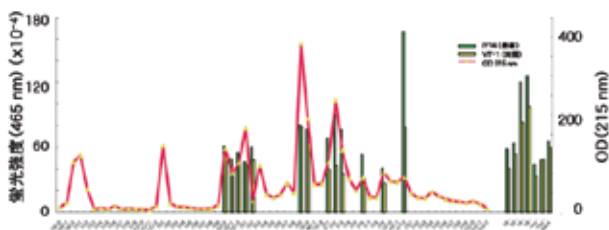


図 31 配列エピトープの解析

精製したアクチニンを *S. aureus* V8 プロテアーゼで消化した結果生じたペプチドを、逆相カラムを用いた HPLC により分離した。各画分を回収し、ELISA によって抗体との反応性を調べた。

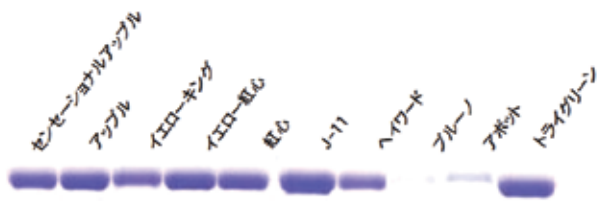


図 32 キウイアクチニンの SDS-電気泳動パターンの品種間差異

○小麦アレルゲンの解析

現在、卵、牛乳について小麦が主要アレルゲンになっている。小麦では、グルテン（グルテニンやグリアジン）、 α アミラーゼインヒビターなどがアレルゲンとして知られている。小麦アレルギーの症状としては湿疹や蕁麻疹がよく見られる。また、アトピー性皮膚炎、下痢、動悸やくしゃみなどの症状が表れることも知られている。アナフィラキシーショックという全身症状が出る場合もある。本研究では、研究対象とした小麦アレルギー患者のアレルゲンが何かを明らかにすると共に、そのエピトープを同定することを目的とした。

・実験材料

小麦品種 Chinese Spring の種子を緩衝液中で磨砕し、遠心してタンパク質粗抽出液を調製した。これを SDS-PAGE および二次元電気泳動試料として用いた。

2.2.2. 小麦種子タンパク質の電気泳動による分離と質量

分析装置による同定の方法

小麦種子からタンパク質を抽出し、SDS ゲル電気泳動や二次元電気泳動によって分離した。また、二次元電気泳動で分離された主要スポットにどのようなタンパク質が含まれているか質量分析装置を用いて明らかにした。

・ウエスタンブロッティングによるアレルゲン活性の解析方法

小麦アレルギー患者と健常者の患者血清を用いてウエスタンブロッティングによってアレルゲン活性をもったタンパク質を調べた。

・結果

小麦の種子のアレルゲンタンパク質を検出し、そのエピトープを同定することを目的として、まず小麦アレルギー患者抗体を調製した。ついで小麦品種 Chinese Spring の種子からタンパク質を抽出し、SDS ゲル電気泳動で明瞭に分離する方法を確立した。小麦タンパク質と SDS を含む陰極電極液が直接接触しないようにして電気泳動を行うことが明瞭な分離パターンを得るために重要であることがわかった。さらに二次元電気泳動によって種子タンパク質を明瞭に分離する方法の確立も目指した。その結果、1 回の二次元電気泳動で 700 種類以上のタンパク質スポットを検出することができるようになった（図 33）。二次元電気泳動で分離された主要スポットにどのようなタンパク質が含まれているかについては質量分析装置を用いて明らかにした。現在、SDS ゲル電気泳動や二次元電気泳動で分離し、アレルギー患者抗体を用いたウエスタンブロットによってアレルゲンの同定を進めている（図 34）。

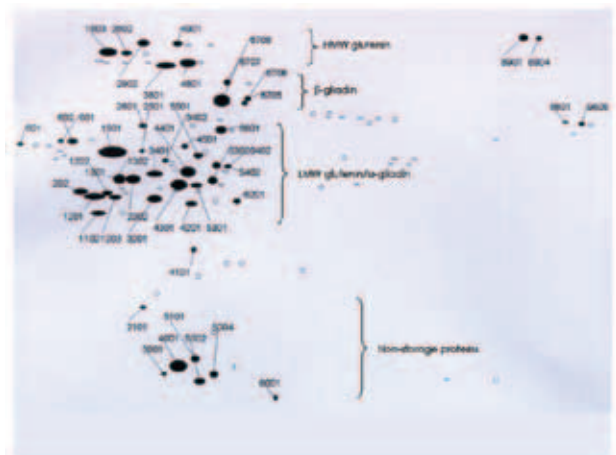


図 33 小麦種子タンパク質の二次元電気泳動

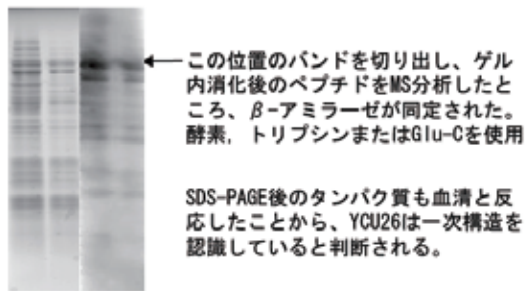


図34 SDS-PAGEとウエスタンブロットングによる小麦種子アレルゲンの検出。1. 2. SDS-PAGE : 3. 4. ウエスタンブロットング : 一次抗体, 血清 (YCU26) 10mL : 二次抗体, 抗ヒト IgE 抗体 : 検出。ECL plus (GE Healthcare)

2. 5 農水産物の低アレルゲン化と積極的治療への利用

農水産物のアレルゲン性について検証し、アレルゲン性の低い品種を選定する、あるいは農水産物の低アレルゲン化法について検討し、免疫療法に活用することを目標とする。

水産物については、魚類の主要アレルゲンであるパルブアルブミンを水さらしによる除去 (すりみ)、食品製造用のたんぱく質分解酵素による分解 (エキス)、高温・高圧加熱処理による変性 (レトルト) により魚肉を処理した結果、いずれの方法においても低アレルゲン化が確認された。またデータベース化を目指した魚種別アレルゲン量の網羅的解析によって、アレルゲン性が低いと推定される魚類 (マカスベ; エイの1種) について、医療機関において負荷試験を実施した結果、協力いただいたすべての患者が摂取可能であった。

3. 考察及び今後の展望

3. 1 植物アレルゲン制御技術の開発

ホタルルシフェラーゼ遺伝子 (Fluc) は、1980年代にそれがレポーター遺伝子として遺伝子発現モニタリングに使用可能であることが示されてから既に四半世紀が経過している。その間に、幾多の改良が重ねられ、ウミシイタケルシフェラーゼと組み合わせたデュアルルシフェラーゼアッセイ等が開発され、それらは動植物を問わず、転写制御の研究に汎用されるに至っている。また、Flucの際立った特徴として、非破壊的な遺伝子発現の連続モニタリングが可能であることが挙げられる。それは、基質であるDルシフェリンの低毒性と、組織浸透性によるところが大きいと思われるが、その特徴を活かして、これまでに動物の生体観察やシロイヌナズナの変異体の単離等に活用され成果を上げてきた。

近年急速に研究開発が進み、レポーター遺伝子としての汎用性とバリエーションが広がった蛍光タンパク質と比

較すると、レポーターとしての感度と定量性において、発光レポーターが圧倒的に優れていると考えられる。さらに、励起光の照射が不要であることから、検出機器類の問題があるものの、侵襲性が低いという点においても発光レポーターが優れていると思われる。これらの特徴を活かして、Flucは細胞レベルでの化合物スクリーニングにおいても用いられ、ハイスループットスクリーニング系の構築に寄与している。

本研究により、発光レポーターを導入した植物が化合物スクリーニングに有効であることが示された。本研究の特徴は、培養細胞等を用いるのではなく、植物個体を丸ごと用いていることにある。これにより、代謝後にはじめて作用するような化合物の活性評価等にも適応可能であることなど、細胞レベルのアッセイ系と比較して多くの有利な点が出てくる。

一方、化合物スクリーニング等にルシフェラーゼレポーターを使用する際に注意すべき点として、化合物がルシフェラーゼ活性そのものに作用する可能性をつねに考慮する必要がある。本研究の過程においても、ルシフェラーゼ活性阻害剤が見いだされている。

VSP1 遺伝子プロモーターは、JA誘導性遺伝子発現のモニタリング系として優れていることが明らかとなった。本研究においては十分な化合物スクリーニングの実施には至らなかったが、候補化合物は複数取得されつつあり、今後も継続して誘導剤および阻害剤のスクリーニングを継続し、有用化合物の同定を実施したいと考えている。すでに実用レベルで卓効をしめす薬剤が複数開発されているSA系誘導化合物とは異なり、JA系を制御することにより作用する植物保護剤は殆ど報告されていないので、*VSP1* 遺伝子プロモーターを用いた評価系には期待が持たれる。また、JA系の抑制により、傷害誘導性のアレルゲン遺伝子の発現を低減させることが可能となるかもしれない。そのような資材が開発されれば、運搬・流通における傷害に起因するアレルゲンレベルの上昇を低減するといった用途への応用が考えられる。

本研究で取り扱ったプロモーターのうち、*PDF1.1*、*CYP81D1*ならびに*GSTU7*遺伝子については、化合物スクリーニングに応用するまでには至らなかった。しかし、今後はそれらを利用した化合物ライブラリースクリーニングを実施することで、多くの有益な植物活性化剤や、複合ストレス耐性を制御する化合物が見いだされることが期待される。前述したように *PDF1.1* 遺伝子プロモーターを指標とすることで、これまでに前例がないタイプの抵抗性誘導剤が開発出来る可能性がある。一方、*CYP81D1*ならびに *GSTU7* 遺伝子プロモーターを使ったスクリーニング系では、除草剤耐性を誘導する、「herbicide safener」とよばれる化合物の探索が可能となることが期待される。そのような活性を示す化合物は、抵抗性誘導剤同様にバリエーションが限られており、探索のニーズが大きい分野でもある。

これまでに作製したプロモーター・ルシフェラーゼ融合遺伝子を複数同時に用いて、化合物評価を実施するスクリーニング系も迅速な化合物の特徴付けには有効であると

考えられる。そのようなアプローチは、特にある化合物と類似の活性を有するものを探索する場合は威力を発揮すると思われる。

発現阻害モニタリング系による新規化合物の探索では、前述のとおり、ルシフェラーゼ活性の阻害は容易に起こり、発光活性が全く検出されない試験区がかなりの割合で出てくる。しかし、本研究では内在対照として、構成的に発現する CaMV35S プロモーターに赤色発光ルシフェラーゼを連結したもの (35S-CBR) を用いているので、細胞毒性あるいはルシフェラーゼ阻害の結果として防御応答遺伝子 (=アレルゲン遺伝子) の発現抑制がおこっている可能性が高いものについては簡単に排除することができた。この点は、これまでのアッセイ系では対応できていなかった点であり、本研究の推進による大きな成果のひとつであると考えられる。しかし、内在対照の 35S-CBR が発現阻害を受けている場合でも、依然として当該化合物が発現制御に関与する可能性は否定できない。これらの化合物の活性評価には、化合物濃度を変えて再度詳細に調べる必要がある。実際に、細胞毒性や、ルシフェラーゼ阻害等を考慮した場合、少なくとも 4 倍希釈シリーズを 5 段階程度で試験する必要があると考えられる。

本研究で見いだされた候補化合物については、特に「化合物 2」は病原菌接種試験においても明瞭な防除活性を示したことから、当初の探索目標とした化合物の性状を満たすものであると考えられる。すなわち、BTH や SA などの、当該化合物処理により直ちに防御応答遺伝子が発現誘導されるタイプの抵抗性誘導剤とは異なり、病原感染によって初めて強い防御応答遺伝子の発現誘導がおこるという「プライミング」作用による防除効果を現すタイプの化合物であると考えられる。従って、病原非感染時には防御遺伝子 (=アレルゲン) の誘導はおこらないので、BTH 等の抵抗性誘導剤と比較して、アレルゲンレベルの低減に大きく寄与することが期待できる。実際に、圃場レベルで使用されることを考えると、このタイプの抵抗性誘導剤が最もニーズがあり、実用化される可能性が高いと思われる。今後は、この化合物の作用について詳細に検討し、より大きいレベルの試験を行い、可能であれば実用化に繋げたいと考えている。具体的には、ある程度のデータを取得できた時点で知財化し、提携相手を見つけたのちに、圃場試験や安全性評価等の次の段階へ進むことを想定している。

一方、発現抑制活性を示すタイプの化合物は防御応答を抑制する活性を示すので、生産現場での使用は限定される考えられる。しかし、閉鎖系植物工場等では病原感染のリスクは非常に低いので、有効に使用できる可能性がある。また、青果物のポストハーベスト処理等には利用可能かもしれない。何れも先例がないので、今後はより多くの候補化合物を選抜し、各種の試験を実施して行く必要があると考えられる。

3. 2 アレルゲン低減化を目指した栽培方法の開発

モモ果実のアレルゲン性評価では、バラ科果樹類に共通のアレルゲンである Thaumatin like protein と分子量の等しいアレルゲンタンパク質を検出した。このことは、何らかのバラ科果樹の果実に対してアレルギーを示す患者が、他のバラ科果実に対しても同様の症状を引き起こす可能性があることを示すものである。バラ科果樹果実によるアレルギーは花粉症との関係が示されていることから注意が必要である。しかしながら、今回の交差反応性は極めて低いものであり、全ての患者がこのような交差反応性を示さない可能性も十分に考えられる。交差反応性を示したタンパク質の同定や多数の患者血清を用いた調査が必要と考えられる。

果樹や野菜の品種間におけるアレルゲンタンパク質の蓄積量の違いについて、野菜ではトマト、果樹ではキウイフルーツを使って調査した。トマトは品質向上に加えて、耐病害抵抗性を付与する育種が継続されており、多数の品種が存在し、それらは常に世代交代されている。病害抵抗性に関わるタンパク質の中にはアレルゲンとして認識されているものが存在する。したがって、現在のトマト育種の方向がアレルゲンタンパク質の蓄積方向に向かっている可能性がある。本研究では、現在ではほとんど栽培が行われていない旧品種から最新の品種までを用いて、患者血清を用いたイムノブロットを行った。その結果、品種改良に伴う明確なアレルゲンタンパク質の蓄積は認められなかった。スギ花粉症のアレルギー患者がトマトタンパク質に交差反応を示すことが知られているが、その一部は成熟に伴って発現するタンパク質であることも知られている。したがって、病害抵抗性を向上させる品種改良では、これらのアレルゲン性タンパク質には影響を与えなかったことが推測される。今回は 1 名の患者血清を用いて調査を行ったが、今後は、もう少し広範囲に調査を行う必要がある。

一方、キウイフルーツに関しては、品種間におけるアレルゲンタンパク質の蓄積量に明確な違いがみられた。キウイフルーツ果実の主要なアレルゲンはアクチニジンであり、果実の可溶性タンパク質の半分を占めている。一般的に食用とされるキウイフルーツのうち、*A. chinensis* に属する品種間で、蓄積量の著しい差異がみられた。本研究結果を踏まえて、キウイフルーツアレルギーを示す患者に、その含有量が少ない「ゼスプリゴールド」を摂取させたところ、アレルギー反応が引き起こされなかった例が示された。これは、患者の食生活の向上につながる成果と言える。

キウイフルーツは神奈川県においても全国生産の 5% を占め、県の農業技術センターでも品種改良が行われている主要な果樹の一つである。育種は主に交雑によって行われるが、*A. delisiosa* と *A. chinensis* 間の交雑も可能であることから、これらの低アクチニジン品種を利用した品種改良も視野に入れる必要がある。今回、アクチニジン含量の極めて少なかった「ゼスプリゴールド」は黄色の果肉で、近年消費が増大傾向にある。また、「紅妃」は赤色系の果肉で、今後の需要増大が見込まれている。これらを母本とした育種は既に開始されているが、果樹の場合、結果年齢に達するまでの期間が長く、果実に特異的に蓄積されるア

クチニジンの有無が明らかになるには長い年月が必要である。遺伝子レベルでその蓄積の差異が説明できれば育種年限の短縮にも貢献できる。本結果から、アクチニジンの遺伝子本体は調べた品種の中では普遍的に存在していることが示された。しかしながら、アクチニジンの蓄積がほとんどみられない 2 品種の間でもそのメカニズムは異なっているようである。‘紅妃’の場合、転写レベルでの発現抑制が認められ、また、‘ゼスプリゴールド’では、翻訳後制御が生じていることが示された。プロモーター活性の検定やタンパク質の修飾について今後検討する必要がある。育種現場で利用できる情報を得るにはまだしばらく時間がかかりそうであるが、このような基礎的知見の積み重ねが今後の研究の発展として重要と考えられる。

3. 3 高度アレルギー検査システムの構築

本研究では、高度医療機関と共同で、一般的な検査では解析できない様々なアレルギーの解析を試みた。その結果、これまでに報告されていない新規と思われるアレルギーの存在も示唆された。これまでのアレルギー解析は、主として食品レベルでの解析にとどまっていたが、アレルギーとなるタンパク質は原因食品に含まれるタンパク質のなかで、ごく一部である。したがって、今後はタンパク質レベルでの解析が望まれており、実際に研究段階ではあるが、主要なアレルギーについては、タンパク質レベルでの解析が行われ始めている。タンパク質レベルで解析することによる利点として、個々のタンパク質の物理化学的性質にもとづいて、アレルギーの除去や分解、変性などといった方法による低アレルギー化が期待できる。さらに抗原決定部位、すなわちエピトープを解析することにより、たとえば、B cell epitope を破壊し、T cell epitope が保存されたペプチドを調製することができれば、現在は、原因食品そのものを使って行われている免疫療法において、より症状発現のリスクが軽減され、患者に対する負担も少なくなる。

3. 4 プロテオーム技術を利用したアレルギー解析システムの開発

本研究で、アクチニジンアレルギーとしている患者の中に立体構造を認識してアレルギー反応を起こしている患者がいることが示唆された。キウイアレルギー患者は、口腔内アレルギー症候群と呼ばれる口腔内の痒みおよびのどの痒みを主な症状としている。立体構造を認識する場合、消化管内での消化が進んでいない状態でアレルギー反応が起こっていることが示唆される。従って、この場合は、タンパク質の分解あるいは変性によって低アレルギー化を行うことができる可能性がある。

一方、配列を認識してアレルギーを発症している患者では、消化管で分解された後でもアレルギーとして機能している可能性がある。これにより症状が重篤化することも考えられる。アレルギーのエピトープを明らかにすることができたので、今後、これを利用した、あるいは、エピトープに対する抗体を利用したアレルギー治療の可能性を検討できるかも知れない。また、エピトープを改変した食品

の作出も考えられる。

一方、本研究で二次元電気泳動によって小麦の種子タンパク質を分離し、分離されたタンパク質を質量分析装置で同定した。また、ウェスタンブロッティングによって小麦アレルギーを検出できることを示した。従って、これら 2 種類の手法を用いて、小麦アレルギーを網羅的に解析できると考えられた。キウイのアレルギーの研究で明らかのように、アレルギー患者によってエピトープの特徴が必ずしも同一ではない可能性が大きい。従って、患者ごとにアレルギーを検出できる簡便迅速な分析システムを開発することは極めて重要である。本研究で、その基盤ができたと思われる。

3. 5 農水産物の低アレルギー化と積極的治療への利用

魚類の主要アレルギーであるパルブアルブミンを水さらしによる除去（すりみ）、食品製造用のたんぱく質分解酵素による分解（エキス）、高温・高圧加熱処理による変性（レトルト）により魚肉を処理した結果、いずれの方法においても低アレルギー化が確認された。特にタンパク質分解酵素によって魚肉を分解し、アレルギー性を低減する方法では、特定の酵素を使用することによって、B cell epitope が消失され、さらに T cell epitope は残存していることが確認されており、次世代の免疫療法の確立に寄与できる可能性が示され、今後のさらなる研究の発展が期待されている。

また、魚類アレルギーのデータベース化についても、今後は、各魚種について、より正確にアレルギー量を測定し、さらに個々の魚種について、患者の協力のもと、負荷試験などによってアレルギー性を確認して臨床現場で活用できるデータベースの構築が期待される。

食の安全・安心プロジェクト研究概要集

平成23年2月23日発行

発行 財団法人神奈川科学技術アカデミー

川崎市高津区坂戸3-2-1 / 〒213-0012

TEL. (044)819-2031

印刷 株式会社ポートサイド印刷

●無断転載・複製を禁じます。

