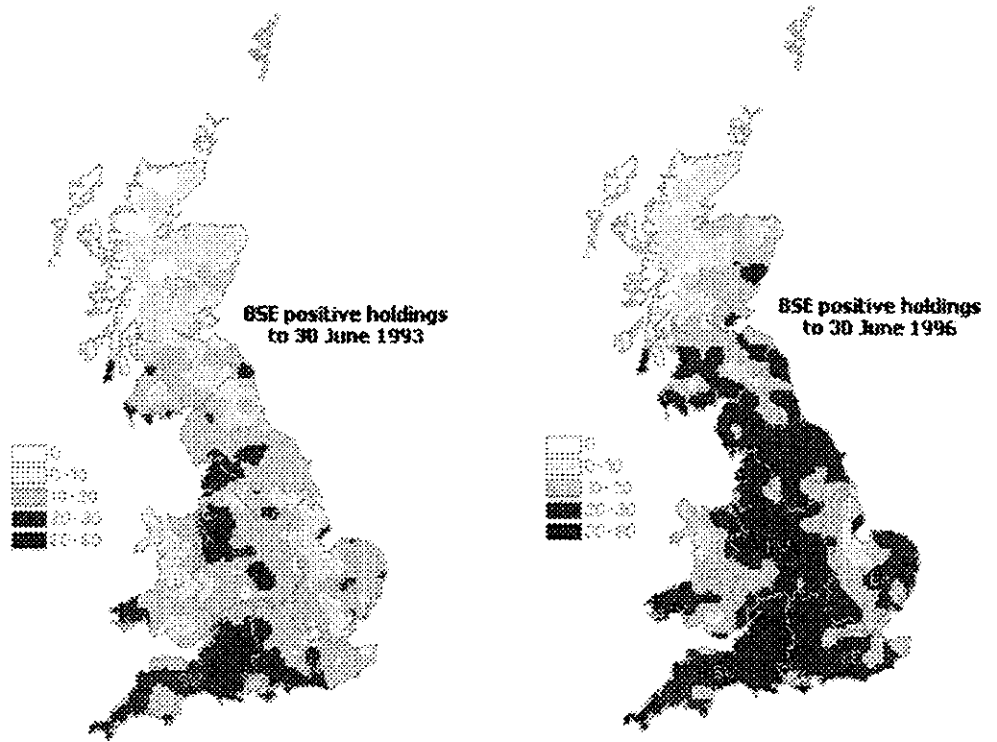


图1



厚生労働科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）  
分担研究報告

マイクロアレイ解析による分析の検討

分担研究者 藤井陽一 名古屋市立大学大学院・薬学研究科 助教授

【研究要旨】

従来、大豆油に比べて菜種油を与えた群の SHRSP ラットは、血小板数減少、腎障害、脂質代謝異常などを伴う寿命短縮作用を示すことが明らかとなっている。これに関連すると思われる血液関連遺伝子、コレステロール代謝に関わる数種遺伝子の発現低下が認められた。また、狂牛病の菜種関与説に対応すると思われる二価金属イオン関連遺伝子、プリオンやアミロイド蛋白関連遺伝子の発現低下(一部上昇)が認められた。さらに、これまで推定されていなかった一価イオンチャネル関連遺伝子、ステロイドホルモン合成関連遺伝子、免疫関連遺伝子、細胞増殖関連遺伝子、各種プロテアーゼ類、エネルギー代謝、タンパク合成系に関わる多くの遺伝子の発現低下(一部発現上昇)が認められた。これらの結果は、菜種の有害因子についていくつかの作業仮説を生み、今後の研究に大きな示唆を与えた。

A. 研究目的

菜種油あるいは大豆油を与えた SHRSP ラットについて肝臓で発現している遺伝子をマイクロアレイ法で比較し、有害因子の作用機構を探り、本体の解明に役立て、かつ簡便測定法として使える可能性を探ることを、目的とした。

B. 研究方法

菜種油 (canola)、あるいは大豆油を粉末飼料 (CE2) に 10%(w/w)の割合で添加し、4週齢の脳卒中易発症性 (SHRSP) ラットに与えた。16 週齢まで飼育後、肝臓を採取し、そこから TRIZOL 試薬 (Invitrogen) を用いて total RNA を抽出した。抽出した total RNA は DNase I 処理して精製をした。逆転写反応によって得られた cDNA を Atlas Glass Fluorescent Labeling Kit (Clontech) を用いて Cy 3 および Cy 5 で蛍光標識した。これを Atlas Glass Microarrays Rat I にハイブリダイズしたもののについて、GTMAS SCAN II (日本レーザ

電子) により蛍光強度を読み取った。得られたデータは GenePix pro 3.0 (Axon Instruments) もしくは Array-Pro Analyzer (Media Cybernetics) によって解析した。なお、逆転写反応以降の操作は日本レーザ電子に委託をした。

(倫理面に対する考慮) 本実験は名古屋市立大学薬学部実験動物倫理委員会の承認を得て行われた。

C. 実験結果

1 枚に 3887 個の遺伝子が載っている DNA チップを用いて解析した結果、肝臓において菜種油群が大豆油群に対して発現量が 2 倍以上のものが 451 個、逆に大豆油群の方が菜種油群に比べて発現量が 2 倍以上のものが 893 個見られた。

これら遺伝子の生理的意義に関する解析は始まったばかりであるが、一部は下記のように要約できる。

肝臓での発現が2倍以上上昇している遺伝子 (canola/soybean)

(カッコ内は差がなかった関連遺伝子)

【イオンチャネル関連】

- 2844 Kチャネル (Task3)  
451 Na/H アンチポーター  
2372 イオン トランスポーター regulator 1

【メタル関連】

- 3532 トランスフェリン

【ホルモン関連】

- 2696 プロラクチン様タンパク F  
228 オルニチンアミノトランスフェラーゼ  
2013 酸化性 17β-HSD、type 6  
3182 17β-HSD 1  
734 3-oxo-5α steroid 4-DH  
(3514 ヒドロキシステロイド 3α-HSD)

【免疫関連】

- 2030 アデノシン デアミナーゼ  
987 PGF 受容体  
2311 linker of T-cell receptor pathways  
3449 サイトカイン誘導性 SH2 含有タンパク 3  
3448 T細胞受容体δ鎖

【細胞増殖関連】

- 1908 アポトーシス誘導因子  
2053 Gタンパクシグナル 14 制御因子  
3413 成長分化因子-9B

肝臓での発現が3分の1以下に低下している遺伝子 (canola/soybean)

【イオンチャネル関連】

- 374 Kチャネルタンパク (slowly activating)  
433 Na/胆汁酸コトランスポーター  
455 溶質キャリアーfamily 1、  
1361 Kチャネル modulator タンパク 2  
1637 Kチャネル、M、β 1  
3100 K (Voltage-gated) チャネル

【二価金属イオン関連】

- 557 セレノプロテイン P  
1672 小脳型 Ca 結合タンパク  
2066 Sec7?  
2074 フェリチン サブユニット H

【アミロイド関連】

- 2994 serum amyloid P-component  
3244 amyloidβ (A4) 前駆体タンパク-binding、family B  
3554 prion protein, structural

【ホルモン関連】

- 2021 ヒドロキシステロイド 17β DHase  
3158 “” type 2  
3778 ヒドロキシステロイド 3β-Dhase  
731 CYP P450 XVII(hepatic steroid hydroxylase)  
3095 estis enhanced gene transcript  
3860 アンドロゲン 結合タンパク (1084 androgen receptor X1.01)  
(2313 androgene-responsive mRNA clone, pSv1)  
(185 sex hormone binding globulin or androgen binding protein)  
(2032 甲状腺ホルモン応答タンパク)  
(735 aromatase)  
2966 5-LPX 活性化タンパク

【血液関連】

- 2211 補体 9  
2419 seminal vesicle protein 4  
3796 platelet factor 4  
【免疫関連】  
1967 サイトカイン受容体様タンパク  
2211 補体 9  
2229 TNFα II  
3361 linker for activation of T cells  
3640 Ig δ heavy chain constant region  
3799 Ig active lambda 2-like chain

【細胞増殖関連】

- 717 Forkhead 様転写因子 BF1  
1245 F(fibroblast)GF  
1331 FGF17  
1294 アクチンフィラメント結合タンパク  
1328 インスリン様 GF 結合タンパク 1  
1518 BarH クラス転写因子  
1562 タンパクホスファターゼ 1 B  
1581 Gα-i2

3140	GTP 結合タンパク ragB
1693	中性スフィンゴミエリナーゼ
1723	growth accentuating protein
1870	タンパクチロシン ホスファターゼ F
1912	ミスマッチ修復タンパク
2016	インスリン受容体基質-3
2056	レチノイン酸受容体 $\alpha$
2091	DNA ポリメラーゼ $\beta$
2800	DNAase II
2097	PPAR $\delta$
2131	受容体型タンパク質チロシン ホスファターゼ
3050	BDNF(brain derived neurotrophic factor)
3103	シアル酸転移酵素 5
3765	N-アセチルグルコサミン転移酵素 V
3484	オルニチン脱炭酸酵素 antizyme
<b>【プロテアーゼ】</b>	
540	コラーゲナーゼ
602	セリンプロテイナーゼ インヒビター
1441	プロコラーゲン C-プロテイナーゼ
1748	キモトリプシン B
1750	protein convertase subtilisin
1789	マトリックス メタロプロテイナーゼ
1816	プロテアソーム $\alpha 3$
3561	カルボキシエステラーゼ
3771	カテプシン J

#### D. 考察

肝臓のマイクロアレイ解析の結果と従来の観察結果との関連がいくつかの例でみられた。

##### Na, K-チャネル発現抑制

従来: Na, K-ATPase の上昇が見られていた。マイクロアレイ解析により、数種の一価イオンチャネル関連遺伝子の発現低下が見られた(K チャネルの 1 種は上昇)。これが原因なのか、あるいは想定されるステロイドホルモン代謝異常の結果か、いう点が問題となる。血液イオンバランスの測定などにより、遺伝子発現変化とのかかわりをより深く解明することが必要である。

二価金属イオンとプリオン、アミロイドタ

#### **【エネルギー代謝】**

624	フラクトース-2,6-ビスホスファターゼ
685	CPT
1038	アセチル CoA トランスポーター
1097	UCP2
1950	ピリドキサーール キナーゼ
2140	ピリドキシン 5 'P オキシダーゼ
3664	quinoid dihydropteridine reductase
1987	putative peroxisomal 2,4-dienoyl-CoA reductase
3614	adenylate kinase
3649	ステアロイル-CoA 不飽和化酵素
3678	fumarate hydratase
3689	ATP citrate lyase (アセチル CoA 産生)

#### **【タンパク合成】**

835	リボソームタンパク L12
3058	リボソームタンパク L29
3718	リボソームタンパク S13

#### **【コレステロール代謝】**

HMG-CoA	合成酵素
HMG-CoA	還元酵素
ファルネシル転移酵素	
スクアレンエポキシダーゼ	
2040	2,3-オキシドスクアレン:ラノステロール シクラーゼ

##### ンパク

従来: プリオン病と菜種の関連性が示唆されていた (BSE の栄養説、小野寄ら)。この解析により、二価金属イオン、アミロイドタンパク、プリオンタンパクの遺伝子発現低下が認められた。BSE の菜種関与説をより深く究明する必要がある。

##### ステロイドホルモン合成酵素

従来: エストラジオールレベルの低下が推測されていた。大豆などのイソフラボン、daizain、は植物エストロゲンとして注目されているが、ステロイド合成を抑制することも明らかにされた (IC50 は  $\mu\text{M}$  オーダー)。

したがって、daizain などの有効性について全動物レベルの評価を広げる必要があるが、キャノーラにも類似の物質が存在する可能性が強くなった。一方、副腎皮質ステロイドホルモン、性ホルモンなどの異常が、これまでに観察された多くの生理効果を説明しうるかもしれない。

#### 血液・免疫関連

従来:血小板数の減少が新生豚、各種ラットで観察されていた。本会席でも血小板関連遺伝子発現の減少がみられた。血小板分化の過程に異常はないか、など調べる必要がある。

#### エネルギー代謝・タンパク合成

### E. 結論

マイクロアレイ解析の結果は、より正確な方法で確認する必要がある。しかし、多くの遺伝子の発現を検索することにより、菜種油(canola)が大豆油に比べ、生命現象の多くの面で重大な影響を与えていることが明らかとなった。この結果に基づき、有害因子の主作用について、いくつかの作業

#### 論文

Yamamoto T, Omoto S, Mizuguchi M, Mizukami H, Okuyama H, Okada N, Saksena N, Brisbe EA, Otake K and Fujii YR (2002) Double-stranded nefRNA interferes with human immunodeficiency virus type 1 replication. *Microbiol Immunol*

### F. 健康危険情報

どのような形での広報が適切か、検討す

### G 研究発表

なし

本解析でリボソームタンパクの発現減少〔2種〕、B6の代謝異常、糖新生、TCA サイクル、脂肪酸合成、脂肪酸β酸化、ATP 産生、プロテアーゼ類の遺伝子発現低下などが明らかにされた。これらは当初、推測できていなかった分野であり、今後、生化学的に研究を進める必要がある。

以上、マイクロアレイ解析は予備的な試験であり、適切な手段でこれらの遺伝子発現量の変化をより正確に、定量的に示す必要があるが、これらの解析結果は、微量有害因子について多くの示唆を与えた、と考える。

仮説が得られた。また、プリオン病の菜種関与仮説を支持するいくつかの遺伝子発現の差が認められた。今後、マイクロアレイ解析を他の組織にも応用し、接触期間の影響を追うことによって、より簡便なアッセイ系となりうるか否かを検討する必要がある。

46:809-817

Omoto S, Okuyama H and Fujii Y (2003) The effect of trans activator, Bel-1 in feline foamy virus to its promoter regions. *J Gen Virol* (in press)

る必要がある。

分担研究報告書

菜種油微量成分の化学的解析

分担研究者 永津明人 名古屋市立大学大学院薬学研究科 講師

【研究要旨】

菜種油を分子蒸留したところトリグリセライド以外の微量成分をはっきりTLC上で確認できるレベルまで濃縮できることがわかった。また、これらの画分に含まれていることが予想されるトコフェロール類の検出・定量法を確立した。

A. 研究目的

菜種油は現在広く使われている油であるが、奥山らの研究から自然発症高血圧ラットにおいて寿命を短縮させる作用があることが明らかとなっている。その活性本体を明らかにしなければならないが、寿命という活性を指標とした分離操作は現実的に不可能である。そこで、菜種油中の微量成分を一つ一つ明らかとし、寿命短縮作用の候補物質を絞り込むことを目的として研究を行う

B. 研究方法

菜種油の大部分はトリグリセリドであり、油をそのままクロマトにかけるのは現実的でない。ある程度精製され、製品化された油中の成分は極性的にもトリグリセリドに近く分配操作での分離も難しい。そこで、分子蒸留法を用いて分子量で分離し、微量成分をある程度濃縮したものを原料にして、クロマトを用いた分離操作を行うことにした。

C. 研究結果

菜種油（40 kg）の分子蒸留（258°C, 0.002 torr）を行い、留分を約 900 g 得た。留分の成分構成の概略を TLC で観察したところ、トリグリセリドがいちばん大きな割合を示したものの、他の化合物は濃縮されており、この後クロマトで分離できる状態になっていることがわかった。また、TLC 上のスポットでも十数個の化合物が確認された。

これと並行して、油に多く含まれていることがわかっていくトコフェロール類の検出方法を確立しておいた。文献既知の方法と同様であったが、HPLC のア

ミドカラムを用いることで、保持時間と検量線を作成した。

現在、留分を充分量確保して分離操作を行う準備を進めている。

D. 考察

分子蒸留により微量成分が濃縮できることが明らかとなり、油中の微量成分分離に非常に有効であることがわかった。また、トコフェロールの検出を容易にできるようにしたことから、微量成分の中でも割合が多いとされるこれらの成分を除外して考えることが容易となった。

E. 結論

油中の微量成分の探索として油を分子蒸留したところ、微量成分を濃縮することができ、多くの微量成分の存在を確認した。これらの分離と構造解析を次年度以降継続する。

F. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表 なし

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

## Report on Cooperative Research on the Safety of Vegetable Oils.

Prepared by \_\_\_\_\_  
Nimal Ratnayake

### Purpose

The primary purpose of the cooperative research on the safety of vegetable oils is to identify the factors in canola and other vegetable oils that shorten the life span of stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSP).

### Visit to Japan

In order to exchange ideas and to discuss future research direction on the safety of vegetable oils, Dr. Nimal Ratnayake visited Japan from March 10 to 20, 2003. The visit was organized by Prof. Harumi Okuyama (Nagoya City University). During this visit, Dr. Ratnayake had fruitful discussions with all the members of the cooperative research team on the safety of vegetable oils. A summary of the discussions is given belows.

#### 1. Nagoya City University

On March 10, 11, 12, and 17, Dr. Ratnayake had discussions with Prof. Harumi Okuyama and his graduate students as well as with Associated Professors Akito Nagatsu and Yoichi Fujii on the toxic effect of canola oil, corn oil, olive oil, and plant sterols + stanols on SHRSP rats. In addition to these discussions, on March 17, Dr. Ratnayake presented a lecture on Health Canada's research on dietary fats to the Faculty and graduated students of the Department of Pharmaceutical Sciences. Dr. Ratnayake explained that fats high in plant sterols and stanols have a significantly life shortening effect on SHRSP rats. During the discussions it became clear that in addition to plant sterols, another minor component (or components) in the non-saponifiable matter in some vegetable oils also affected the life span of SHRSP rats. Prof. Okuyama's research group is directly focusing on the identification of presumed minor toxic factor. Also ideas were exchanged on the fractionation of canola oil and preparation of canola oil devoid of plant sterols.

During his stay at Nagoya City University, Dr. Ratnayake had the opportunity to discuss with Prof. Okuyama on current thinking on the association of dietary fats with

coronary heart disease. It appears that large intake of n-6 polyunsaturated fatty acids (specifically linoleic acid) and lack of n-3 fatty acids in the diet might be important contributory factors for the development of coronary heart disease.

In addition to above discussions, Dr. Ratnayake had discussions with Prof. Kikuo Onozaki on factor that might contribute to the development of BSE in cattles. Prof. Onozaki suspects that excess use of canola meal in cattle feeds may have an influence on prion production. This could be an interesting subject for further research.

#### 2. Hatano Research Institute

On March 13, Dr. Ratnayake and Mr. Kenjiro Tatematsu (a graduated student of Prof. Okuyama) visited Dr. Naoki Ohara at the Hatano Research Institute, Food and Drug Safety Center (Hatano, Kanagawa). Possible mechanisms of life shortening effect of plant sterols were discussed. Dr. Ohara currently collaborating with Prof. Okuyama's research group in evaluating toxicity of a canola oil fraction prepared by super critical carbon dioxide extraction. In addition to the above discussions, Dr. Ratnayake presented a seminar on trans fatty acids, canola oil and plant sterols to the staff of the Hatano Research Institute.

#### 3. Kyushu University

On March 18, Dr. Ratnayake visited Professor Katsumi Imaizumi and Ikuo Ikeda (Laboratory of Nutritional Chemistry, Kyushu University), views were exchanged on the safety of canola oil and margarines fortified with plant sterols and stanols for SHRSP rats, phytosterolemic patients and hypercholesterolemic subjects. Current research at both Health Canada and Kyushu University suggests that SHRSP rat may be a suitable model for phytosterolemia and for studying biological and nutritional effects of increased tissue accumulation of plant sterols. Prof. Imaizumi is very much interested in pursuing further research to identify and evaluate the presumed minor toxic components of canola and olive oils. In this visit also, Dr. Ratnayake presented a lecture on overview of dietary fat research at Health Canada to staff and graduate students of the Laboratory Nutritional Chemistry of Kyushu University.

#### Acknowledgement

Dr. Nimal Ratnayake is grateful to Mr. Keiichi

Okura (President, Japan Food Hygiene Association) for providing a JFHA Fellowship to travel to Japan. Dr. Ratnayake would also like to thank Prof. Harumi Okuyama for organizing the visit to Japan and for his kind hospitality. Mr. Kenjiro Tatematsu is specially thanked for his kind assistance and helpful discussions.

March 20, 2003

Senior Research Scientist  
Nutrient Research Division  
Food Directorate, Health Canada  
PL2203C, Banting Building, Ottawa, Ontario,  
K1A 0L2, Canada