

表2 ラット肝臓における遺伝子発現へのハーブの影響
(DNA μ アレイ: Down Regulated)

	カバ		セイヨウオトギリソウ		セイヨウカノコソウ	
	Ratio	Description	Ratio	Description	Ratio	Description
1	0.155	PREDICTED: seizure related 6 homolog (mouse) (Sez6)	0.098	alpha-2-macroglobulin (A2m) [NM_012488]	0.130	hepcidin antimicrobial peptide (Hamp) [NM_053469]
2	0.155	PREDICTED: SH3 and cysteine rich domain 3 (predicted) (Stac3_predicted) [XM_343222]	0.121	stearoyl-Coenzyme A desaturase 1 (Scd1) [NM_139192]	0.220	AA901299 UI-R-A1-dp-b-10-0-UI.s1 UI-R-A1 cDNA clone UI-R-A1-dp-b-10-0-UI 3' similar to gi
3	0.188	ornithine aminotransferase (Oat) [NM_022521]	0.146	PREDICTED: SH3 and cysteine rich domain 3 (predicted) (Stac3_predicted) [XM_343222]	0.244	PREDICTED: growth arrest and DNA-damage-inducible 45 gamma (predicted) (Gadd45g_predicted) [XM_237999]
4	0.206	PREDICTED: similar to hypothetical protein MGC42105 (predicted) (LOC310376) [XM_227081]	0.205	lipocalin 2 (Lon2) [NM_130741]	0.268	ferritin, heavy polypeptide 1 (Fth1) [NM_012848]
5	0.210	hepcidin antimicrobial peptide (Hamp) [NM_053469]	0.250	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 9 (Hsd17b9) [NM_173305]	0.283	C-reactive protein, petaxin related (Crp) [NM_017096]
6	0.235	alpha-2-macroglobulin (A2m) [NM_012488]	0.252	carbonic anhydrase 3 (Ca3) [NM_019292]	0.307	PREDICTED: plasminogen (Plg) [XM_574314]
7	0.247	PREDICTED: solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 11 (predicted) (Slc16a11_predicted) [XM_213334]	0.274	collagen C-proteinase enhancer protein (Pcolce) [NM_019237]	0.316	AA851185 EST193953 Normalized rat placenta, Bento Soares Rattus sp. cDNA clone RPLAD56 3' end, sequence [AA851185]
8	0.253	secretory leukocyte peptidase inhibitor (Slpi) [NM_053372]	0.300	WDNM1 homolog (LOC360228) [NM_001003706]	0.321	PREDICTED: cellular repressor of E1A-stimulated genes (predicted) (Creg_predicted) [XM_213921]
9	0.255	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1 (Hmgcs1) [NM_017268]	0.301	similar to hypothetical protein FLJ13448 (MGC109115) [NM_001009671]	0.321	PREDICTED: SH3 and cysteine rich domain 3 (predicted) (Stac3_predicted) [XM_343222]
10	0.255	solute carrier family 13 (sodium-dependent dicarboxylate transporter), member 3 (Slc13a3) [NM_022866]	0.307	thyroid hormone responsive protein (Thrsp) [NM_012703]	0.325	BF289858 EST454449 Rat Gene Index, normalized rat, cDNA clone RGIHL42, sequence [BF289858]

表3 視床下部における遺伝子発現へのセイヨウカノコソウの影響
(DNA μ アレイ: ジアゼパムとの比較)

Description	Valerian/Control		Diazepam/Control	
	No.	Ratio	No.	Ratio
leukotriene B4 12-hydroxydehydrogenase (Ltb4dh) [NM_138863]	1	9.105	11309	1.836
similar to ATP synthase lipid-binding protein, mitochondrial precursor (ATP synthase proteolipid P1) (ATPase protein 9) (ATPase subunit C) (LOC288738) [XM_222276]	2	6.817	1437	3.846
similar to zero beta-1 globin (MGC72973)[NM_198776]	3	6.533	8449	2.196
Q6I7T7 (Q6I7T7) NADH dehydrogenase subunit 6, partial (9%) [TC539069]	4	6.110	36472	1.104
echinoderm microtubule associated protein like 2 (Emi2) [NM_138921]	5	6.045	3483	3.140
splicing factor, arginine/serine-rich 5 (Sfrs5) [NM_019257]	6	5.894	3845	3.046
ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit c (subunit 9), isoform 1 (Atp5g1) [NM_017311]	7	5.643	4244	2.950
PREDICTED: similar to Ac1147 (LOC310926) [XM_227769]	8	5.612	42517	1.025
PREDICTED: similar to cDNA sequence BC022133 (LOC362399) [XM_575607]	9	5.583	11643	1.799
similar to 1810034B16Rik protein (predicted) (RGD1306222_predicted) [NM_001009962]	10	5.370	9468	2.059
hemoglobin alpha, adult chain 1 (Hba-a1) [NM_013096]	11	5.342	4999	2.792
myelin basic protein (Mbp)[NM_017026]	12	5.340	74	5.810
aldolase A (Aldoa) [NM_012495]	13	5.237	4606	2.875
Unknown	14	5.101	2423	3.430
RAB15, member RAS oncogene family (Rab15) [NM_198749]	15	5.019	17121	1.467

表4 海馬における遺伝子発現へのセイヨウカノコソウの影響
(DNA μ アレイ: ジアゼパムとの比較)

Description	Valerian/Control		Diazepam/Control	
	No.	Ratio	No.	Ratio
transthyretin (Ttr) [NM_012681]	1	2.495	4	4.594
potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 13 (Kcnj13) [NM_053608]	2	2.255	16	3.752
Normalized rat embryo, Bento Soares Rattus sp. cDNA clone RGIAP52 5' end, mRNA sequence [AW142560]	3	1.966	14	3.867
UI-R-BO1-aga-h-06-0-UI 3' [BE102060]	4	1.909	42	3.282
PREDICTED: similar to cornichon-like protein (predicted) (LOC361705) [XM_341989]	5	1.887	533	2.530
vesicle-associated membrane protein 2 (Vamp2) [NM_012663]	6	1.821	1144	2.395
Q9VWW2 (Q9VWW2) CG6123-PA (GH13094p), partial (3%) [TC5556985]	7	1.789	119	2.868
kidney-specific membrane protein (Tmem27) [NM_020976]	8	1.778	499	2.541
PREDICTED: similar to potential ligand-binding protein (LOC309100) [XM_219490]	9	1.758	271	2.667
BM389289 UI-R-DZ0-cko-f-18-0-UI.s1 NCI_GGAP_DZ0 cDNA clone IMAGE:7338356 3' sequence [BM389289]	10	1.679	321	2.631
myelin-associated glycoprotein (Mag) [NM_017190]	11	1.677	579	2.517
PREDICTED: similar to cytokeratin (LOC294853) [XM_215513]	12	1.660	89	2.952
protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 14A (Ppp1r14a) [NM_130403]	13	1.654	438	2.569
insulin-like growth factor binding protein 2 (Igfbp2) [NM_013122]	14	1.653	110	2.890
vesicle-associated membrane protein 2 (Vamp2) [NM_012663]	15	1.641	1144	2.395

表5 1 mg/kg ルテイン投与にともない眼球における
発現量増加(2倍以上)が観察された遺伝子(140個中のトップ20)

DESCRIPTION	EXPRESSION RATIO
Keratin complex 1, acidic, gene 12 (Krt1-12), mRNA [NM_001008761]	20.450
Aquaporin 5 (Aqp5), mRNA [NM_012779]	8.347
Desmoplakin, transcript variant 2 (Dsp), mRNA [XM_001058477]	7.457
mRNA for keratin 14, partial cds [D63774]	6.596
Aldehyde dehydrogenase family 3, member A1 (Aldh3a1), mRNA [NM_031972]	5.650
Ly6/Plaur domain containing 2 (predicted) (Lypd2_predicted), mRNA [XM_216960]	5.566
Desmoplakin, transcript variant 2 (Dsp), mRNA [XM_225259]	5.540
EPS8-like 2 (predicted) (Eps8l2_predicted), mRNA [XM_341958]	4.639
Cystatin E/M (Cst6), mRNA [NM_133566]	3.977
Transketolase (Tkt), mRNA [NM_022592]	3.945
Similar to RIKEN cDNA 1300017J02 (RGD1310507), mRNA [XM_236574]	3.834
Integrin beta 4 (Itgb4), mRNA [NM_013180]	3.564
Similar to chloride channel calcium activated 4 (LOC499721), mRNA [XM_001063517]	3.493
Alcohol dehydrogenase 7 (class IV), mu or sigma polypeptide (Adh7), mRNA [NM_134329]	3.464
Rattus norvegicus alpha-2-macroglobulin (A2m), mRNA [NM_012488]	3.434
Similar to keratin complex 2, basic, gene 6a, transcript variant 2 (LOC683313), mRNA [XM_001065178]	3.413
cDNA clone UI-R-E0-ct-f-03-0-UI 3' similar to gi [AA875633]	3.378
Syndecan 1 (Sdc1), mRNA [NM_013026]	3.293
Procollagen, type V, alpha 2 (Col5a2), mRNA [XM_343564]	3.268
Envoplakin (predicted) (EvpI_predicted), mRNA [XM_221129]	3.196

表5 1 mg/kg ルテイン投与にともない眼球における
発現量低下(1/2以下)が観察された遺伝子(112個中のトップ20)

DESCRIPTION	EXPRESSION RATIO
Tetraspanin 8 (Tspan8), mRNA [NM_133526]	0.194
NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1, subcomplex unknown, 2 (Ndufc2), mRNA [NM_001009290]	0.239
NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 4, 15kDa (Ndufb4), mRNA [NM_001037338]	0.251
Crystallin, beta A1 (Cryba1), mRNA [XM_340846]	0.257
Similar to Acyl-CoA-binding protein (ACBP) (Diazepam binding inhibitor) (predicted) (RGD1564164_predicted), mRNA [XM_341562]	0.259
3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase isomerase type II.2 [rats, liver, mRNA, 2675 nt]. [S63167]	0.263
LRRG00134 mRNA, complete cds. [AY539885]	0.266
rRNA promoter binding protein (LOC257642), mRNA [NM_147136]	0.280
Similar to general transcription factor IIH, polypeptide 5 (predicted) (RGD1560991_predicted), mRNA [XM_577689]	0.282
Similar to 60S ribosomal protein L34 (predicted) (RGD1564055_predicted), mRNA [XM_344177]	0.286
Neprilysin-like peptidase gamma, partial (3%) [TC518066]	0.287
Proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type 3 (Pasma3), mRNA [NM_017280]	0.295
cDNA clone RGIAB40 3' end similar to ribosomal RNA, mRNA sequence [BM986231]	0.298
Similar to chromosome 13 open reading frame 12 (predicted) (RGD1305831_predicted), mRNA [XM_213700]	0.298
Similar to 40S ribosomal protein S16 (predicted) (RGD1559743_predicted), mRNA [XM_236683]	0.299
Ubiquitin protein ligase E3A (predicted) (Ube3a_predicted), mRNA [XM_341867]	0.301
Bento Soares Rattus sp. cDNA clone REMAZ30 3' end, mRNA sequence [AI008579]	0.304
Similar to 40S ribosomal protein S16 (predicted) (RGD1561137_predicted), mRNA [XM_345346]	0.313
Similar to 40S ribosomal protein S16 (LOC686806), mRNA [XM_001074571]	0.314

表7 ルテイン投与の全群において発現量の2倍以上の
亢進または1/2以下の低下が観察された遺伝子

UP REGULATED
Rattus norvegicus keratin complex 1, acidic, gene 12 (Krt1-12), mRNA [NM_001008761]
Rattus norvegicus aquaporin 5 (Aqp5), mRNA [NM_012779]
PREDICTED: Rattus norvegicus desmoplakin, transcript variant 2 (Dsp), mRNA [XM_001058477]
RATRETK Rattus norvegicus mRNA for keratin 14, partial cds [D63774]
Rattus norvegicus aldehyde dehydrogenase family 3, member A1 (Aldh3a1), mRNA [NM_031972]
PREDICTED: Rattus norvegicus similar to keratin complex 2, basic, gene 6a, transcript variant 2 (LOC683313), mRNA [XM_001065178]
DOWN REGULATED
Q9ERK2 (Q9ERK2) Neprilysin-like peptidase gamma, partial (3%) [TC518066]

図1 セイヨウカノコソウによる発現の増大がトップ15位の遺伝子
 (ジアゼパムによる発現の増大との相関)

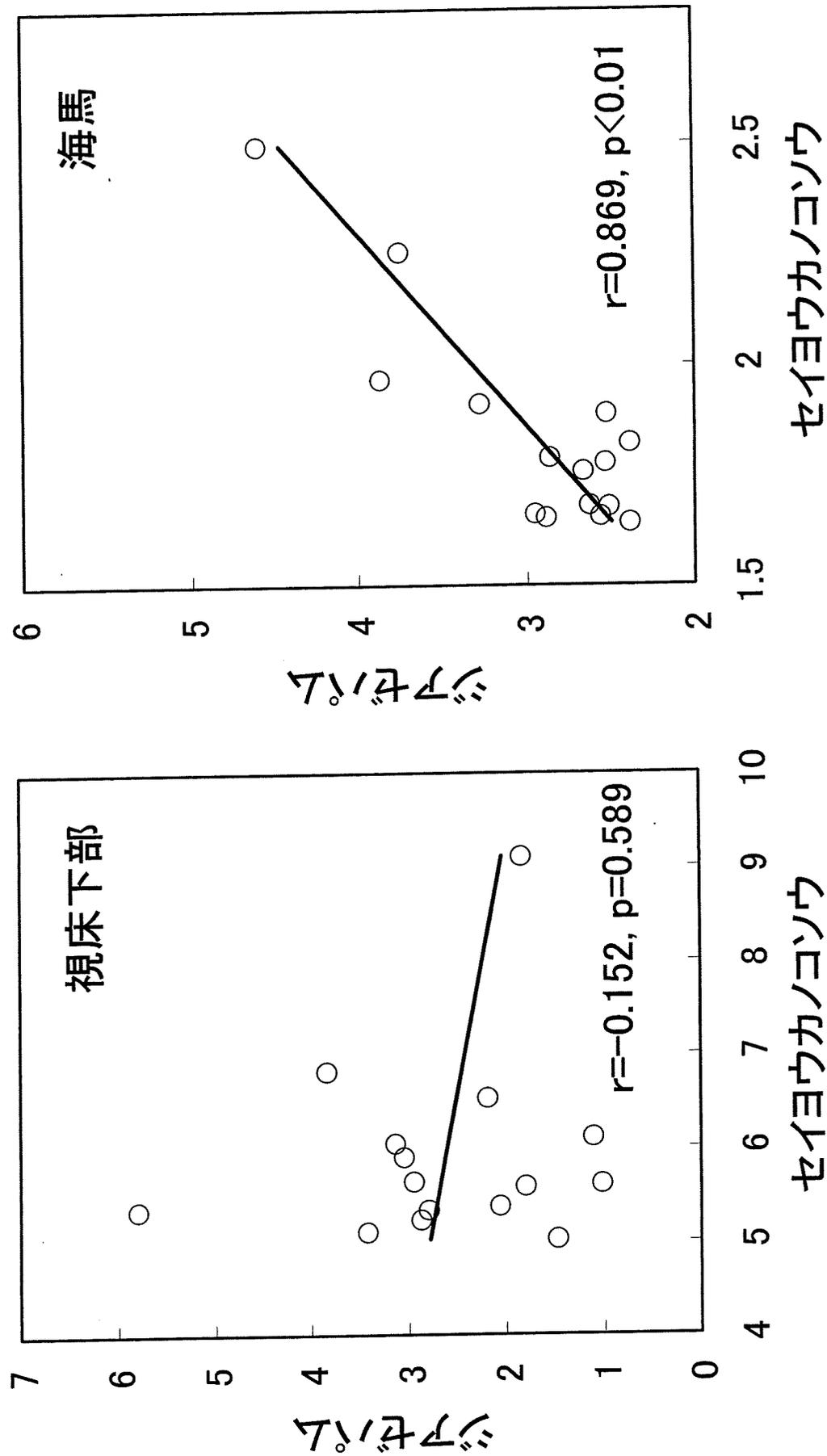
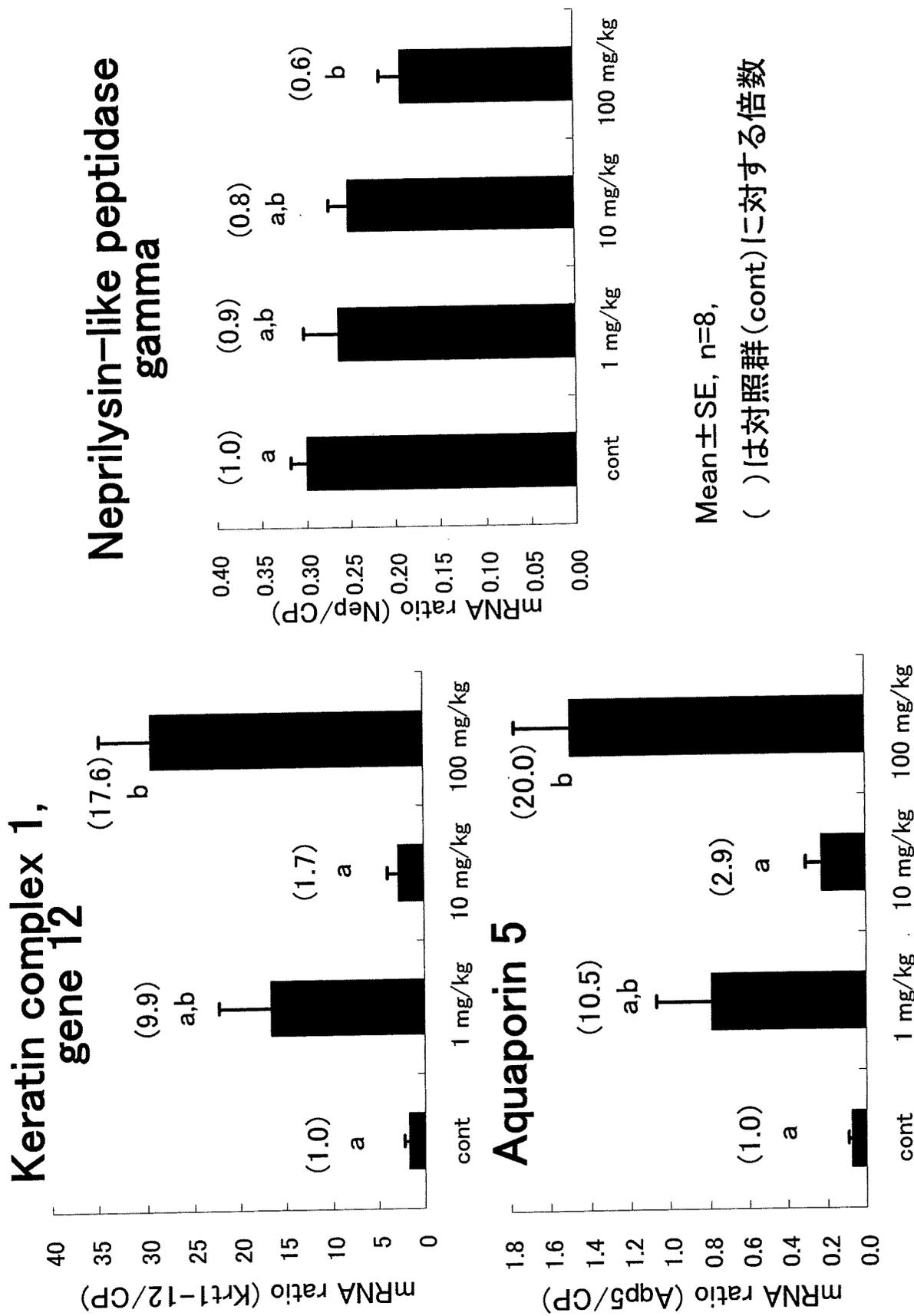


図2 DNA μ アレイで発現量の変化が認められた遺伝子
 — リアルタイムRT-PCRによる解析 —



厚生労働科学研究費補助金(食品の安心・安全確保推進研究事業)
分担研究報告書

特定保健用食品の新たな審査基準に関する研究
自覚可能な身体動態と有効性評価基準の検討

分担研究者 山田和彦 独立行政法人国立健康・栄養研究所プログラムリーダー
研究協力者 廣田晃一 独立行政法人国立健康・栄養研究所
瀧本秀美 独立行政法人国立健康・栄養研究所

研究要旨：自覚可能な身体動態として、「冷え性」女性 37 人を対象に、食品の有効性評価基準としての可能性を検討するために、本人への聞き取り調査、身長・体重・腋下温・DEXA 法を用いた全身骨密度と体脂肪率、サーモグラフィ、超音波による上腕動脈の血流速度・血管径、血漿中ヒスタミン、プロスタグランディン等血中マーカーの測定が行われた結果、冷え性の客観的な指標として、また食品の有効性評価の指標としてのサーモグラフィによる冷水負荷試験の有効性が示唆された。さらに種々の食品について検討していくことで、新しい有効性評価基準とすることが期待できる。

A. 研究目的

冷え性を訴える女性は多い。夏期においても冷房のために体が冷えることなどもその一因と思われる。冷え性は、局所的な疾病ではなく、治療に緊急性を要するものでもないので、従来、特に西洋医学では重要な研究の対象とはされてこなかった。

冷え性は「血の巡りがよくなくて」起こるといわれる。貧血、低血圧、動脈硬化等で末端の毛細血管に血液がとどきにくい場合や、筋肉の発育が悪いため熱発生の機能が不良である場合、女性ホルモンにより影響を受け易い自立神経の乱れによって血管の運動障害が惹起こされている、等の原因が考えられる。

そこで、自覚可能な身体動態として、「冷え性」を対象とし、冷え性を客観的に検出しうるか、また抹消循環に影響を及ぼすようなモデル食品を用いて有効性評価基準になりうるかを検討した。

B. 方法

大学生女子 37 名に、冷え性の自覚、及び生活習慣に関するアンケート調査を行なうとともに、身長・体重・腋下温の測定・DEXA 法を用いた全身骨密度と体脂肪率の測定を行なった。

冷え性に効果があることが期待される有効成分を含む飲料 (A 飲料) またはプラセボ (P 飲料) を摂取して、30 分後及び 10 時間後に 15℃ の冷水に両手を 1 分浸す冷水負荷を行い、その直後から 5 分おきに 30 分間サーモグラフィで両手背の表面温度を測定した。超音波による上腕動脈の血流速度・血管径の測定も行なった。また血漿中ヒスタミン、プロスタグランディン E₂、アドレナリン、ノルアドレナリン、ドーパミン、血清総コレステロール、中性脂肪及びエストラジオールを測定した。

C. 結果

対象者の冷え性の程度を表 1 の「冷え性の診

断基準」に基づいて、無自覚群と自覚群(軽・中・強度)の2群に分けて比較した。

サーモグラフィの冷水負荷試験において、図1に示すように、P飲料摂取後冷え性自覚群は、冷え性無自覚群に比べて有意に両手背皮膚温度の回復が遅かった。

図2に示すように、A飲料摂取30分後には、有意差はなくなり、さらに摂取10時間後にもその効果は継続した。

図3に示すように、測定した血中生理活性物質のうちヒスタミンがA飲料摂取一時間後に有意に低下したほか、プロスタグランジンE₂、アドレナリン、ノルアドレナリン、ドパミンに対しては飲用時の変化が認められなかった。しかし、血中エストラジオールを冷え症無自覚群と自覚群で比較すると、図4上に示すように差を認めた。またこの差は、図4下に示すように、A飲料摂取によって、冷え症自覚群で有意に低下し、無自覚群と同レベルになった。

D. 考察

昨年度の結果から、冷え性自覚群においては、身長体重が無自覚群に比べて有意に低く、最高血圧、最低血圧、脈拍数ともに低い傾向にあった。DEXA法による測定から、骨密度は自覚群で有意に低かった。しかし、これらの身体計測値は短時間で変化するものではないので、冷え性の改善効果を検討する指標としては不適當と考えられた。

血中生理活性物質については、アドレナリンのみが冷え性自覚群において無自覚群より有意に低かった。

本年度の結果から、サーモグラフィによる冷水負荷試験が、「自覚可能な身体動態」としての「冷え性」を数値化し、有効性評価基準に用い得る可能性が示唆されたが、これはアドレナリンの血中濃度が変化することとは連動していなかった。冷え性の原因としては、

抹消循環障害、自律神経失調、新陳代謝機能低下などの種々のものが考えられるが、今回モデルとしたA飲料においては、性ホルモンの変化が関与している可能性が示唆されたことから、ホルモンバランスの変調に働いていることも考えられる。

このように様々な原因によって起こるが症状としては一定のものがある冷え性を、客観的な数値として提示し、それに伴う種々の血中パラメータを同時に測定することで、食品の有効性を評価できる可能性が示唆された。さらに種々の食品について検討していくことで、新しい有効性評価基準となることが期待できる。

E. 結論

サーモグラフィによる冷水負荷試験が、「自覚可能な身体動態」としての「冷え性」を数値化し、有効性評価基準に用い得る可能性が示唆された。即ち、様々な原因によって起こるが症状としては一定のものがある冷え性を、客観的な数値として提示し、それに伴う種々の血中パラメータを同時に測定することで、食品の有効性を評価することが可能であった。さらに種々の食品について検討していくことで、新しい有効性評価基準となることが期待できる。

F. 学会発表

1) 瀧本秀美、廣田晃一、島田光世、磯村晴彦、戸谷誠之；冷え性の自覚と酵素処理ヘスペリジン摂取の影響(I)冷え性群と非冷え性群の身体的特徴，第60回日本栄養・食糧学会大会，2006.05.21，静岡

2) 磯村晴彦、中隈由樹、平山晃守、廣田晃一、瀧本秀美、戸谷誠之；冷え性の自覚と酵素処理ヘスペリジン摂取の影響(II)作用機序に関する検討，第60回日本栄養・食糧学会大会，2006.05.21，静岡

G. 知的財産権の取得状況

なし

表1 冷え性の診断基準

重要項目

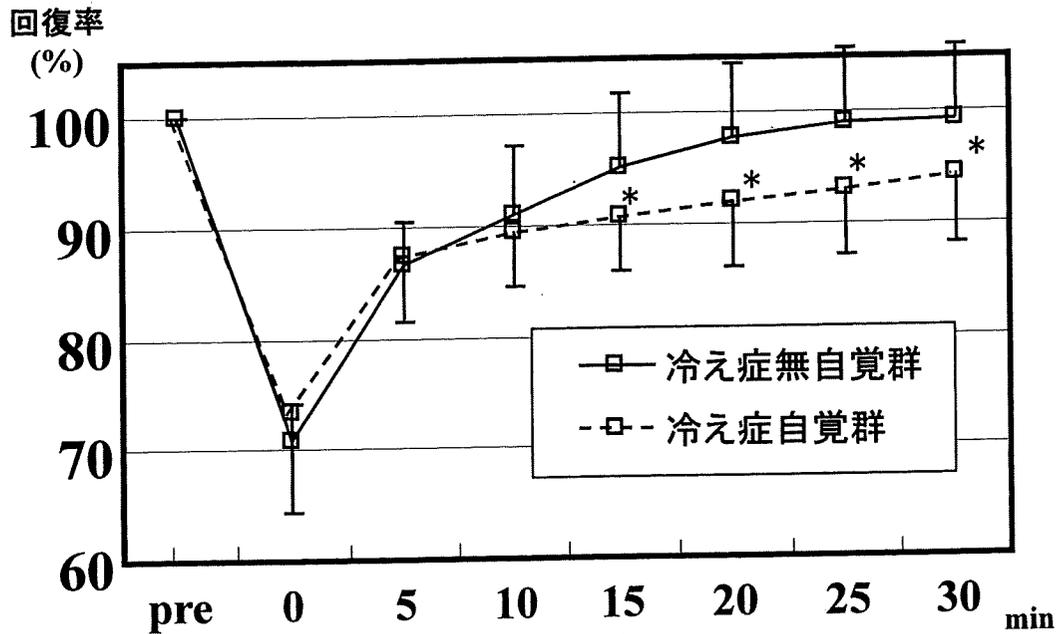
1. 他の多くの人に比べて“寒がり”の性分だと思う。
2. 腰や手足、あるいは身体の一部に冷えがあつてつらい。
3. 冬になると冷えるので電機毛布や電気敷布、あるいはカイロなどを用いるようにしている。

参考項目

1. 身体全体が冷えてつらいことがある。
2. 足が冷えるので夏でも厚いクツ下をはくようにしている。
3. 冷房のきいているところは身体が冷えてつらい。
4. 他の多くの人にくらべてかなり厚着する方だと思う。
5. 手足が他の人より冷たい方だと思う。

※各項目は6ヶ月以上継続していることを前提に重要項目2以上、重要項目1に参考項目2以上、あるいは参考項目4以上を満たすものを冷え症とする。

図1 冷水負荷試験後の両手背皮膚温度の回復率



*: P<0.05 対無自覚群

図2 A飲料摂取後の冷水負荷試験による
両手背皮膚温度の回復率

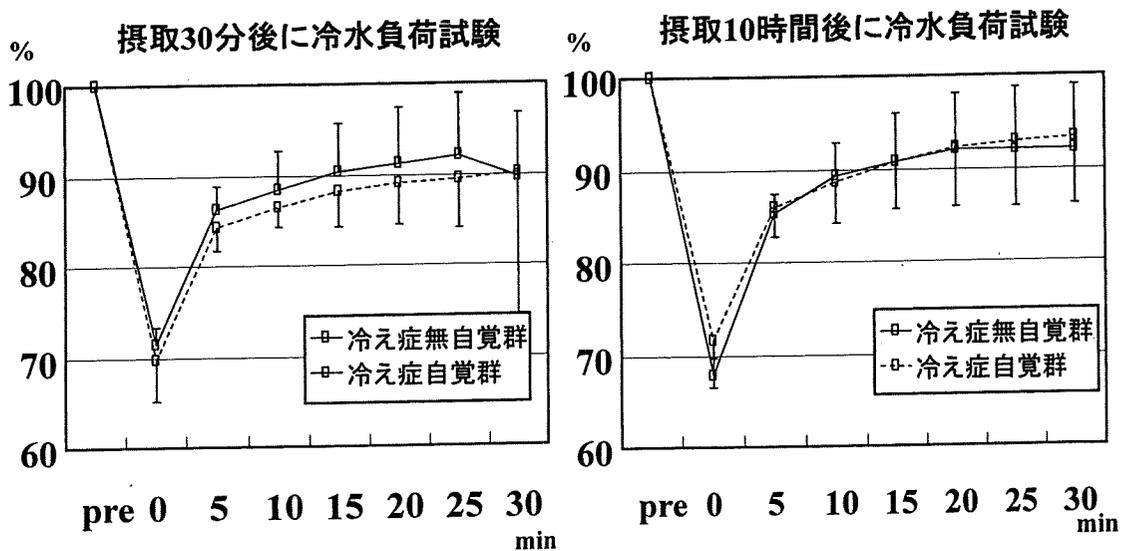
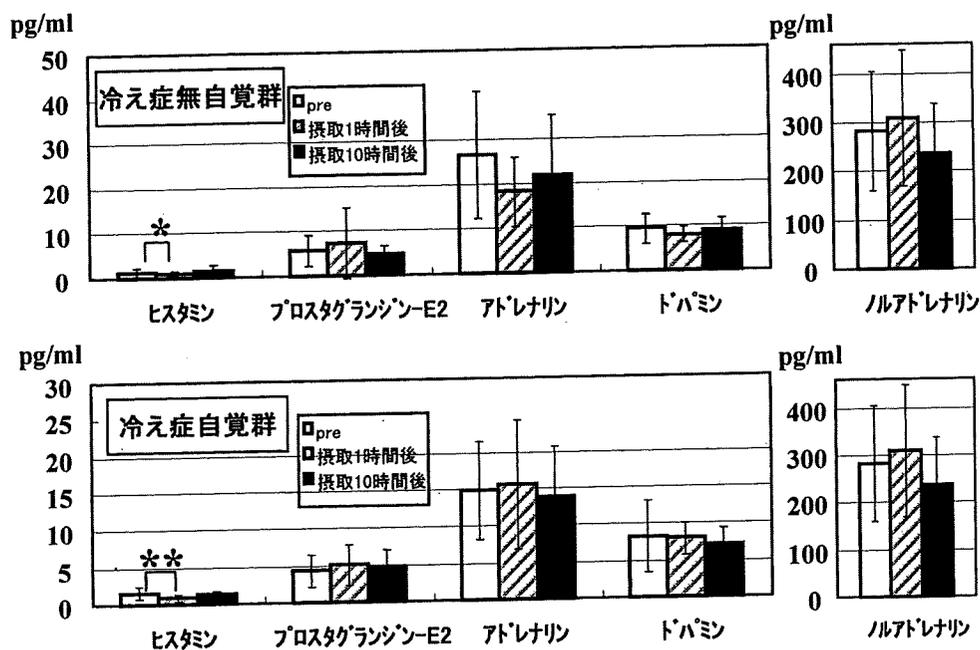
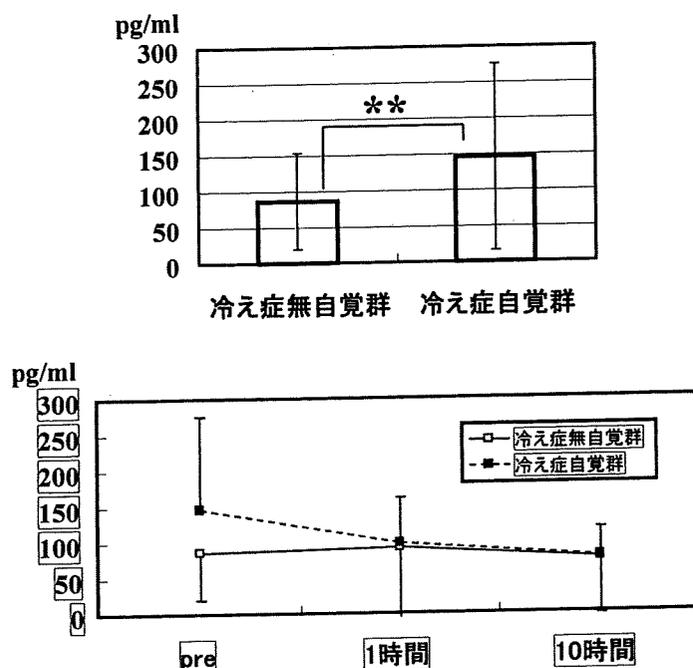


図3 摂取時期別の血中生理活性物質濃度



* : P<0.05 ** : P<0.01

図4 エストラジオールの変化



厚生労働科学研究費補助金(食品の安心・安全確保推進研究事業)
分担研究報告書

特定保健用食品の新たな真摯基準に関する研究
遺伝子レベルの網羅的解析による評価基準の検討
分担研究者 阿部啓子 東京大学大学院農学生命科学研究科

研究要旨：機能性食品の効果を評価する技術として遺伝子発現変動解析（ニュートリゲノミクス）が有効であることを、分離大豆タンパク質（SPI）を用いた事例研究から解析した。

A. 研究目的

大豆は古くから良質なvegetable protein源として日本やその他多くの国において摂取されてきた。数多くの栄養学的な研究から、分離大豆タンパク質（SPI）は、動物性タンパク質よりも血中コレステロール濃度を低下させ、動脈硬化のリスク低減などが注目されている。

分離大豆たんぱく質(SPI)は、7S, 11Sグロブリンのたん白成分に加え、イソフラボン、サポニン、フィチン酸、トリプシンインヒビターといった微量成分で構成されている。これら構成成分が単独あるいは複合的に、降コレステロール作用、抗肥満作用、血中中性脂肪上昇抑制、動脈硬化抑制、抗ガン作用などをもたらすと考えられている。特に脂質代謝改善効果では、SPI摂取による糞中へのステロイド排泄促進や、in vitroおよびin vivoでの遺伝子発現などが報告されている。しかしながら、大豆たんぱく質摂取がどのような分子機構（cascade）によって血中脂質に影響をもたらすのか、については不明な点が多い。

最近、一度に数千もの遺伝子発現を解析できるDNA microarrayを用いた遺伝子発現プロファイルの解析により、栄養・生理機能を遺伝子レベルで網羅的に解析できるようになった。Endo

*et al*はDNA microarrayを用いたラット肝臓の遺伝子発現プロファイル解析から、食餌中12%たんぱく質含量における摂取たん白質の違いが281遺伝子の発現に変化を及ぼしたことを報告している。このように、食餌成分の違いによる遺伝子発現プロファイルの違いから、その成分の栄養機能に関する多くの示唆的情報を得ることができる。

本研究は、食品の栄養学的・生理学的機能を網羅的遺伝子発現像から解析するNutrigenomicsを、SPIを対象として行ったものである。SPIの長期投与により、肝臓において様々な代謝系遺伝子の発現が変化していた。中でも、脂質代謝系遺伝子の変化が多数観察された。

B. 研究方法

実験動物と食餌

モデル動物は5週齢のSPF・S.D.系雄ラット（Japan SLC, Inc. Hamamatsu, Japan）を12匹購入した。タンパク質源として、分離大豆タンパク質（SPI、不二製油（株））、またはコントロールとしてビタミンフリーカゼイン（オリエンタル酵母（株））を購入した。粗たん白質量（crude protein）はケルダール法を用

いて測定した。試験食は AIN-93G 組成に基づき、粗たん白質量として 20% 配合した食餌を用いた (Table 1.)。

飼育条件

全ての動物は、the Japanese Society of Nutrition and Food Science (Law No.105 and Notification No.6 of the Japanese Government) より構成されたガイドラインに基づいて取り扱った。各ラットは温度 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、明暗サイクル (light 0700-1900h) の管理環境下、ステンレスケージで個別飼育した。5 日間の市販ペレット (CRF-1, Oriental Yeast Co., Tokyo, Japan) による予備飼育後、群間の平均体重がほぼ同等になるように群分け (1 群あたり 6 匹) を行い、8 週間の試験食飼育を行った。

血液および肝臓における生化学データ

試験食飼育後、朝 0800 より 6 時間絶食の後にネブタール麻酔下で開腹し、腹部大動脈より採血した。血液はヘパリン処理後、 5°C 、 $1900 \times \text{g}$ で 15 分間遠心分離し、得られた血漿はただちに凍結して血液サンプルとした。肝臓は解剖後ただちに摘出し、各分析に供するまで -80°C で凍結保存した。血液成分はグルコース、中性脂肪、総コレステロールはドライケム 5500 (富士フィルム (株) 製) により分析を行った。肝脂質は Folch *et al* の方法により抽出し、コレステロール、トリグリセリドおよびリン脂質は Sperry & Webb、Fletcher および Feldman & Feldman の方法により測定した。

各測定値は統計ソフトの t 検定を用いて行った (SPSS 10.0J for Windows, SPSS Japan Inc., Tokyo, Japan) ($p < 0.05$)。

C. 研究成果

体重および脂質代謝

SPI および casein 摂食ラットは、ほぼ同じ摂食量であったが、終体重では SPI 摂食群ラットがやや低かった (Table 2.)。体重 100g あたりの肝臓重量は、SPI 群は Casein 群に比べて有意に低い値を示した (Casein group; $3.57 \pm 0.12 \text{g}/100 \text{gBW}$, SPI group; $2.91 \pm 0.06 \text{g}/100 \text{gBW}$, $n=6$)。血中脂質を分析した結果、SPI 食が Casein 食に比べてコレステロールおよびトリグリセリド低減効果をもつことが示された (Table 3.)。血中グルコース濃度に差は見られなかった。血中脂質データが平均値に近い値を示したラットを、SPI および casein 群からそれぞれ 3 匹選択した。肝臓の脂質分析を行った結果、貯蔵コレステロールおよび中性脂肪量には有意差はないが、SPI 群では Casein 群に比べて低い値を示し、また、リン脂質含量は SPI 群で Casein 群に比べて有意に高い値を示した (data not shown)。これらの結果、SPI 長期摂取により、肝臓重量や血中脂質量の減少、肝臓リン脂質の増加など、脂質代謝に大きく影響を与えることが示された。

肝臓における遺伝子発現

SPI 摂取による生体への影響を詳細に調べるため、肝臓から得た mRNA を用いて DNA マイクロアレイ解析を行った。SPI および casein 群それぞれの群内では、遺伝子発現全体の相関係数はいずれも 0.97 以上であり、個体によるバラつきは少ないが ($S1S2=0.973$, $S1S3=0.986$, $S2S3=0.978$, $c1c2=0.992$, $c1c3=0.991$ and $c2c3=0.986$ (S, SPI group; c, casein group)、本研究では、各群 3 個体で再現的な結果が得られた遺伝子のみを解析の対象とした。Table 4. に示すように、全 8740 遺伝子のうち、SPI 群および casein 群の一方でのみ発現する遺伝子はそれぞれ 2 個および 3 個であり、両群で発現している遺伝子は 2905 個であった。一方の群でのみ発現している遺伝子は、生物学的に有意に発現量が

異なる遺伝子と見なした。両群で発現していた2905遺伝子に対して統計的Student's t-testを行ったところ、115遺伝子に発現量の有意差が観察された (Figure 1.)。SPI群で有意に発現量が高い遺伝子は61、低い遺伝子は54で、これら有意差のみられた遺伝子の約33%は発現量の比が1.5倍以上であった。

生物学的に発現量に有意差が観察された合計120遺伝子には、アミノ酸代謝、脂肪酸代謝、ステロイド代謝、抗酸化、免疫、転写制御など、様々な機能に関連した遺伝子が含まれていた (Table 5.)。casein食ラットに較べて、SPI食ラットでは抗酸化やステロイド代謝系遺伝子の発現が高く、細胞増殖関連、構造タンパク質、アミノ酸代謝や脂肪酸代謝系遺伝子群の発現が抑制されていた。

特に、発現量が1.5倍以上異なる遺伝子および一方でのみ発現している遺伝子には、コレステロール代謝や脂肪酸代謝、抗酸化関連因子などが多く、SPI摂取による代謝系への影響は、脂質代謝および抗酸化系に最も顕著に現れていた (Tables 5. and 6.)。このことから、(1)脂肪酸合成系の抑制およびステロイド合成系の促進といった肝臓における脂質代謝系の全体的な変化が、SPI食ラットの血中脂質含量の低下に関与していること、(2)SPI食ラットの肝臓における細胞増殖関連やアミノ酸代謝、構造タンパク質の遺伝子発現の低下は、体重の減少、肝臓重量の増加抑制と関係していることが示唆された。

D. 考 察

網羅的遺伝子発現解析手法であるDNA microarray technologyによって、これまでほとんど行われてこなかった異なる栄養成分の違いを網羅的に捕らえる研究が可能となり、Nutrigenomicsという新しい栄養・食品機能解析分野が開拓しつつある。本研究では、SPI食と

カゼイン食に対するnutrigenomicsを行うことにより、これらタンパク源の長期摂取 (8週間) における生体への影響をglobalに観察することに成功した。

SPI 摂食ラットの肝臓では脂質代謝系遺伝子の発現量の変化が顕著であった。本研究では、ステロイド合成系遺伝子の発現が有意に亢進されたが、逆に血中コレステロール濃度は有意に低減されていた。このことは、ステロイドの体外への排泄が亢進していることを示唆している。実際、飼育開始2週間後には、体外への酸性ステロイド (胆汁酸) および中性ステロイド (コレステロール) 排泄が有意に亢進された (Tachibana *et al*, unpublished data)。これらを考え併せると、SPIのステロイド排泄促進効果は短期間で現れ、その効果は持続され、恒常的に体内コレステロールを低値に保つと考えられる。一方、脂肪酸合成系酵素の遺伝子発現はSPI摂取により有意に減少していた。発現量変化が最大の遺伝子SCD-1も、脂肪酸代謝に関連する遺伝子である²⁰⁾。肥満ラットに大豆タンパク質を与えると、Iritani *et al* が報告しているように脂肪酸合成系のkey enzymesであるFatty Acid Synthase (FAS)、ATP-Citrate Lyase (ACL) およびmalic enzymeの遺伝子発現が低下する。本研究の結果は、key enzymesに加えて、それら以外の脂肪酸合成系酵素の遺伝子発現も抑制されることを示しており、SPIが脂肪酸合成系遺伝子の発現を全体的に抑制し、血中脂質濃度を低下させていることを示唆していた。また、脂肪酸合成系とステロイド合成系はacetyl-CoAで繋がる。したがって、本研究の結果は、acetyl-CoAを介して脂肪酸合成系の抑制とステロイド合成系の促進が密接に関連しており、脂質代謝関連因子が総合的にステロイド排泄促進と血中コレステロール濃度の低減化を担っていることを示したと言える。

E. 結論

分離大豆たん白質 (SPI) の長期摂取が生体に与える影響を、DNA マイクロアレイを用いて遺伝子発現の変化として網羅的に解析した。SPI と Casein を 8 週間摂食させると、血中脂質パラメーターである中性脂肪およびコレステロール値、そして肝臓重量が SPI 摂食ラットで有意に低下した。これらのラット肝臓から Total RNA を抽出し、DNA microarray を用いて遺伝子発現プロファイルを解析した。全 8740 遺伝子のうち、両群ともに発現していた遺伝子は 2905 遺伝子であり、このうち、SPI 摂食ラットにおいて、Casein 摂食ラットに比べて統計学的に有意に発現量が増加していた遺伝子が 61、減少していた遺伝子が 54、合計 115 遺伝子に発現の有意差が観察された。また、一方の食餌群でのみ発現が観察された遺伝子が 5 個存在した。これら合計 120 遺伝子は、エネルギー代謝、抗酸化作用、転写制御因子、脂質代謝に関連する遺伝子であり、特に、脂質代謝に関しては、SPI 群で脂肪酸合成系遺伝子の発現抑制と、ステロイド合成系遺伝子の発現亢進が多数の遺伝子で観察された。これらのことから、SPI 摂取による血中脂質含量の低下などを含むホメオスタシスの変動には、各代謝系の全体的な変化が関与していることが DNA マイクロアレイ解析により明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

Oike, H., Nagai, T., Furuyama, A., Okada, S., Aihara, Y., Ishimaru, Y., Marui, T., Misaka, T., and Abe, K. Characterization of Ligands for Fish Taste Receptors. *J. Neurosci.* in press.

Kiyosaki, T., Asakura, T., Funaki, J., Matsumoto,

I., Arai, S., Misaka, T., and Abe, K. Gliadin, a gibberellin-inducible cysteine proteinase occurring in germinating seeds of wheat, *Triticum aestivum* L., specifically digests gliadin and is regulated by intrinsic cystatins. *FEBS J.* in press.

Fukasawa, T., Murashima, K., Matsumoto, I., Hosono, A., Ohara, H., Nojiri, C., Koga, J., Kubota, H., Kanegae, M., Kaminogawa, S., Abe, K., and Kono, T. Identification of marker genes for intestinal immunomodulating effect of a fructooligosaccharide by DNA microarray analysis. *J. Agric. Food Chem.*, in press.

Honda, S., Aoki, F., Tanaka, H., Kishida, H., Nishiyama, T., Okada, S., Matsumoto, I., Abe, K., and Mae, T. Effects of ingested turmeric oleoresin on glucose and lipid metabolisms in obese diabetic mice: a DNA microarray study. *J. Agric. Food Chem.*, in press.

Aihara, Y., Yasuoka, A., Yoshida, Y., Ohmoto, M., Shimizu-Ibuka, A., Misaka, T., Furutani-Seiki, M., Matsumoto I., and Abe, K. Transgenic labeling of taste receptor cells in model fish under the control of the 5'-upstream region of medaka phospholipase C-beta 2 gene. *Gene Expr. Patterns* 7, 149-157 (2007).

Ohmoto, M., Matsumoto, I., Misaka, T., and Abe, K. Taste receptor cells express voltage-dependent potassium channels in a cell age-specific manner. *Chem. Senses* 31, 739-746 (2006).

Yamashita, H., Nakamura, N., Abe, K., Asakage, T., Ohmoto, M., Okada, S., Matsumoto, I., Hosoi, M., Sasano, N., Yamakawa, S., Ohtomo, K., and Nakagawa, K. Relation

- between acute & late irradiation impairment of four basic tastes and irradiated tongue volume in patients with head and neck cancer. *Int. J. of Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 66, 1422-1429 (2006).
- Kondo, H., Minegishi, Y., Komine, Y., Mori, T., Matsumoto, I., Abe, K., Tokimitsu, I., Hase, T., and Murase, T. Differential regulation of intestinal lipid metabolism-related genes in obesity-resistant A/J versus obesity-prone C57BL/6L mice. *Am. J. Physiol.*, 291, 1092-1099 (2006).
- Narasaka, S., Endo, Y., Fu, Z. W., Moriyama, M., Arai, S., Abe, K., and Kato, H. Safety evaluation of hypoallergenic wheat flour using DNA microarray. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70, 1464-1470 (2006).
- Narita, Y., Nomura, J., Ohta, S., Inoh, Y., Suzuki, K. M., Araki, Y., Okada, S., Matsumoto, I., Isohama, Y., Abe, K., Miyata, T., and Mishima, S. Royal jelly stimulates bone formation: physiologic and nutrigenomic studies with mice and cell lines. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70, 2508-2514 (2006).
- Tamura, T., Terauchi, K., Kiyosaki, T., Asakura, T., Funaki, J., Matsumoto, I., Misaka, T., and Abe, K. Differential expression of wheat aspartic proteinases, WAP1 and WAP2, in germinating and maturing seeds. *J. Plant Physiol.*, in press.
- Oike, H., Wakamori, M., Mori, Y., Nakanishi, H., Taguchi, R., Misaka, T., Matsumoto, I., and Abe, K. Arachidonic acid can function as a signaling modulator by activating the TRPM5 cation channel in taste receptor cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1761, 1078-1084 (2006).
- Ono, Y., Torii, F., Ojima, K., Hayashi, C., Yoshioka, K., Doi, N., Labeit, D., Labeit, S., Suzuki, K., Abe, K., Maeda, T., and Sorimachi, H. Suppressed disassembly of autolyzing p94/CAPN3 by N2A connectin/titin in a genetic reporter system. *J. Biol. Chem.* 281, 18519-18531 (2006).
- Nakajima, K., Asakura, T., Oike, H., Morita, Y., Shimizu-Ibuka, A., Misaka, T., Sorimachi, H., Arai, S., and Abe, K. Neoculin, a taste-modifying protein, is recognized by human sweet taste receptor. *Neuroreport* 17, 1241-1244 (2006).
- Shimizu-Ibuka, A., Morita, Y., Terada, T., Asakura, T., Nakajima, K., Iwata, S., Misaka, T., Sorimachi, H., Arai, S., and Abe, K., Crystal structure of neoculin: insights into its sweetness and taste-modifying activity. *J. Mol. Biol.* 359, 148-158 (2006).
- Nakajima, K., Asakura, T., Maruyama, J., Morita, Y., Oike, H., Shimizu-Ibuka, A., Misaka, T., Sorimachi, H., Arai, S., Kitamoto, K., and Abe, K. Extracellular production of a heterodimeric protein, neoculin, with sweet-tasting and taste-modifying activities by *Aspergillus oryzae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 3716-3723 (2006).
- Hata, S., Koyama, S., Kawahara, H., Doi, N., Maeda, T., Toyama-Sorimachi, N., Abe, K., Suzuki, K., and Sorimachi, H. Stomach-specific calpain, nCL-2, localizes in mucus cells and proteolyzes the b-subunit of coatamer complex, b-cop. *J. Biol. Chem.* 281, 11214-11224 (2006).
- Oike, H., Matsumoto, I., and Abe, K. Group IIA phospholipase A2 is co-expressed with SNAP-25 in mature taste receptor cells of rat circumvallate papillae. *J. Comp. Neurol.* 494, 876-886 (2006).

2.学会発表

3rd International Nutrition Symposium Oct. 26-28 2006 Lausanne, Switzerland (招待講演)

- 28th Annual Meeting of Association for Chemoreception Sciences Apr. 26-30 2006 Sarasota, USA
- 231st ACS National Meeting of Sweetness and Sweeteners Mar. 26-30 2006 Atlanta, USA (招待講演)
- 4th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception July 10-11 2006 Fukuoka, Japan (招待講演)

日本農芸化学会 2007 年度大会：田村倫子、朝倉富子、植村知博、上田貴志、寺内かえで、石塚麻耶、三坂巧、阿部啓子「シロイヌナズナにおける SPP およびそのホモログの同定と発現解析」2007.3.25 東京

日本農芸化学会 2007 年度大会：小山 傑、秦勝志、小野 弥子、尾嶋 孝一、Christian, Witt, Siegfried, Labeit、阿部 啓子、反町 洋之「RING 蛋白質 MURF1 を介した筋細胞エネルギー恒常性維持機構の解析」2007.3.25 東京

日本農芸化学会 2007 年度大会：坂本 康幸、佐藤 記一、藤井 紳一郎、塚原 剛彦、北森 武彦、松本 一郎、阿部 啓子、吉村 悦郎「ナノ構造体上での培養細胞の挙動変化に関する解析」2007.3.25 東京

日本農芸化学会 2007 年度大会：笠原 雅代、應本 真、阿部 啓子、松本 一郎「有郭乳頭における味蕾マーカー遺伝子の発現相関」2007.3.25 東京

日本農芸化学会 2007 年度大会：長井 千草、應本 真、松本 一郎、阿部 啓子「イオンチャンネル遺伝子の発現からみた末梢感覚神経細胞の特性」2007.3.25 東京

日本農芸化学会 2007 年度大会：黒田 久夫、瀬川 修一、高田 善浩、松本 一郎、脇田 義久、栗原 利夫、阿部 啓子、渡 淳二「ホ

ップ水抽出物投与によるマウス肝臓および脾臓の遺伝子発現変動の解析」2007.3.25 東京

日本農芸化学会 2007 年度大会：中井 雄治、端田 寛子、門田 幸二、南 道子、松本 一郎、加藤 久典、阿部 啓子「ラット褐色脂肪組織における遺伝子発現に及ぼす絶食の影響」2007.3.26 東京

日本農芸化学会 2007 年度大会：根元 智子、松本 一郎、岡田 晋治、上原 万里子、荒井 綜一、阿部 啓子、鈴木 和春「マグネシウム欠乏からの回復過程における肝臓の遺伝子発現」2007.3.26 東京

日本農芸化学会 2007 年度大会：岡田 晋治、中村 周吾、阿部 啓子「魚類 T2R 候補遺伝子の網羅的探索」2007.3.26 東京

日本農芸化学会 2007 年度大会：藍原 祥子、阿部 直、安岡 顕人、三坂 巧、岩本 悟志 2、吉田 由紀、渡辺 道子、阿部 啓子「蛍光標識人工餌を用いたメダカの味覚嗜好性の解析」2007.3.26 東京

日本農芸化学会 2007 年度大会：阿部 直、藍原 祥子、三坂 巧、阿部 啓子「メダカ味覚受容体のプロモーター領域の解析」2007.3.26 東京

日本農芸化学会 2007 年度大会：齋藤 佳奈、吉田 由紀、藍原 祥子、安岡 顕人、三坂 巧、岩本 悟志、渡辺 道子、阿部 啓子「PLC β 2 プロモーター誘導によるテタヌストキシン発現メダカの作出と摂食行動解析」2007.3.26 東京

日本農芸化学会 2007 年度大会：永井 俊匡、大池 秀明、岡田 晋治、丸井 隆之、石丸 喜朗、三坂 巧、阿部 啓子「魚類味覚受容体 T2R ファミリーの機能解析」2007.3.26 東京

日本農芸化学会 2007 年度大会：大池 秀明、岡田 晋治、三坂 巧、阿部 啓子「魚類味

覚受容体 T1R の機能解析」2007.3.26 東京
日本農芸化学会 2007 年度大会：應本 真、松本 一朗、吉原 良浩、阿部 啓子「トランスジェニックマウスを用いた甘味・旨味情報伝達経路の解析」2007.3.26 東京
日本農芸化学会 2007 年度大会：黒川 あずさ、大池 秀明、三坂 巧、阿部 啓子「マウス味蕾で特異的に発現する分子マーカーの探索」2007.3.26 東京
日本農芸化学会 2007 年度大会：福田 悠佑、三坂 巧、阿部 啓子「培養細胞を用いたヒト味覚受容体 T1R タンパク質の発現およびその糖鎖修飾部位の解析」2007.3.26 東京
日本農芸化学会 2007 年度大会：高崎 健太郎、三坂 巧、阿部 啓子「アフリカツメガエル卵母細胞を発現系として用いた味覚受容体の機能解析」2007.3.26 東京
日本農芸化学会 2007 年度大会：伊藤 圭祐、森田 悠治、中島 健一朗、朝倉 富子、清水（井深） 章子、丸山 潤一、北本 勝ひこ、三坂 巧、阿部 啓子「味覚修飾蛋白質ミラクリンの麹菌による発現系構築と特性解析」2007.3.26 東京
日本農芸化学会 2007 年度大会：森田 悠治、清水（井深） 章子、寺田 透、朝倉 富子、中島 健一朗、三坂 巧、阿部 啓子「味覚修飾タンパク質ネオクリンの X 線結晶構造解析」2007.3.26 東京
日本農芸化学会 2007 年度大会：古泉 文子、中島 健一朗、森田 悠治、朝倉 富子、三坂 巧、阿部 啓子「味覚修飾タンパク質ネオクリンの受容機構の解析」2007.3.26 東京
日本農芸化学会 2007 年度大会：中島 健一朗、朝倉 富子、古泉 文子、森田 悠治、伊藤 圭祐、丸山 潤一、三坂 巧、北本 勝ひこ、阿部 啓子「ネオクリンの味覚修飾活性の

評価系の構築」2007.3.26 東京

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし