

サブテーマ 2 : 食の機能性活用のための基盤技術の開発**小テーマ 2-1: がん予防を目指した食品機能性評価法の開発****a) ハイスループット食品機能性評価法の確立とその検証**

サブテームリーダー 宮崎大学農学部：教授 水光正仁

研究従事者 宮崎大学農学部：准教授 西山和夫、准教授 江藤望、准教授 榊原陽一

宮崎県産業支援財団：研究員 永濱清子、研究員 岩田喬子、研究員 内田飛香、

技術スタッフ ハリシユクマール

研究の概要、新規性及び目標**①研究の概要**

食品機能性の評価は、実験動物を用いた *in vivo* 試験、ヒトによる摂食試験によって有効性を明らかにする必要があります。しかし、最初から *in vivo* 試験やヒトの摂食試験により評価するには、多大な費用、時間および労力を要する。そのため、簡便で精度の高い一次スクリーニングの開発が求められている。本研究は、食品の持つ多様な生理機能を細胞内のマーカータンパク質の発現パターンを測定することにより、一度の測定で同時に複数の生理機能を評価可能なシステムを構築することを目的として行った。

まず、既知の食品成分や薬剤について、培養細胞に作用させたときの細胞内のマーカータンパク質の発現パターン測定と従来法による生理機能の測定を行い、それらの結果をデータベース化した。次に、生理機能値とマーカータンパク質の発現パターンとの関係に関連付けるモデルを、各々の生理機能ごとにニューラルネットワークを用いて構築した。これにより、未知試料を培養細胞に作用させた時に得られたマーカー発現パターンから、複数の生理機能の値を同時に推定することを可能とした。

②研究の独自性・新規性

本研究のように食品の機能性を評価するためにマーカータンパク質の発現パターンと生理機能値の間の未知の関係に着目し、それらの関係を情報工学の手法を用いてモデル化することにより、一度に複数の生理機能値が推定可能な評価システムを構築した例は他にはない。また、食品の機能性を評価するために、細胞応答に基づいた *in vitro* 実験と情報科学的解析を組み合わせた例は他にはなく、独自性・新規性に富んでいる。さらに、特許が成立していることから、新規性は明らかである。

③研究の目標

ウイルス発がん予防に関連した生理機能を評価可能なハイスループット食品機能性評価法を開発する。

- ・フェーズⅠ：ハイスループット食品機能性評価法の基盤技術を確立する。
- ・フェーズⅡ：評価可能な生理機能の項目を追加し、測定系の小型化を検討する。
- ・フェーズⅢ：生活習慣病予防に関連する生理機能を評価項目に追加し、受託解析に向けた基盤技術を確立する。

研究の進め方及び進捗状況

1) データベースの構築

A) マーカータンパク質の発現パターン：

マーカータンパク質を選定し、選定したマーカータンパク質に対する ELISA 系を構築する。構築した ELISA 系を用いて、食品成分、薬剤及び宮崎県産農産品抽出物で処理した培養細胞中のマーカータンパク質発現パターンを測定し、データベース化する。（達成率 100%）

B) 生理機能の測定データ：

マーカータンパク質発現量のデータに対応した食品成分、薬剤及び農産品抽出物について生理機能 10 種類のデータを収集し、データベース化する。（達成率 90%）

2) ニューラルネットワークの構築

データベースを構築した生理機能 10 種類について、ニューラルネットワークを構築する。（達成率 85%）

3) 評価システムの検証

宮崎県産農産品抽出物を用いて、生理機能 10 種類について検証をする。（達成率 80%）

4) マーカータンパク質測定系の小型化の検討

マーカー測定系を ELISA 系から、抗体アレイや抗体ビーズへの変更を検討する。（達成率 70%）

主な成果**具体的な成果内容：**

基本的な概念については、「高スループット機能性評価法、プログラム、及び装置」として 2008 年 7 月に特許が成立している。

1) データベースの構築

A) マーカータンパク質の発現パターン：

14 種類のマーカータンパク質を選定し（プロテオーム解析より 2 種類、DNA マイクロアレイ解析より 1 種類、文献情報より 11 種類）、サンドイッチ ELISA 系を構築した。構築した ELISA 系を用い、食品成分または、薬剤 30 種類（各 3 濃度）と宮崎県産農産品抽出物 21 種類（各 2 濃度）について、細胞種 2 種類（HepG2、Jurkat）のデータを収集し、データベース化した。

B) 生理機能の測定データ：

マーカーデータに対応した、食品成分、薬剤について生理機能 10 種類（がん細胞増殖抑制活性、C 型肝炎ウイルス（HCV）複製抑制活性、抗酸化ストレス活性、抗炎症活性、血管新生抑制活性（血管内皮増殖因子（VEGF）産生抑制活性、低酸素応答配列（HRE）転写抑制活性）、がん転移抑制活性、ナチュラルキラー細胞賦活活性、インターフェロン産生促進活性、HCV セリンプロテアーゼ阻害活性）及び、農産品抽出物に

- ついて生理機能 9 種類（インターフェロン産生促進活性以外）のデータを収集し、データベース化した。
- 2) ニューラルネットワークの構築
データベースを構築した生理機能 10 種類のうち、8 種類（インターフェロン産生促進活性、HCV セリンプロテアーゼ阻害活性以外）について、ニューラルネットワークを構築した。その際、ニューラルネットワーク構築のために、生理機能ごとに、より良い食品成分データの組合せ条件を検討し、各々の生理機能ごとに最良の組合せを見出した。インターフェロン産生促進活性については、予備試験でニューラルネットワークの構築が可能であることを確認した。
- 3) 評価システムの検証
宮崎県産農産品抽出物を用いて、生理機能 8 種類について、評価システムによる推定値と実測値とを比較することにより検証した。その結果、生理機能によって若干の差が認められるものの、本システムを用いて、同一のマーカータンパク質発現パターンから、一度に 8 種類の生理機能が推定可能であることを検証することができた。
- 4) マーカータンパク質測定系の小型化の検討
抗体ビーズと抗体アレイによる ELISA との比較を行ったところ、ELISA 系より、細胞処理スケールが約 1/12 ~ 1/2000 に縮小され、測定時間も ELISA の 1/3 に短縮されることが確認された。汎用性を考慮し、96well 型抗体アレイを中心に検討を進めてきた結果、27 種類のマーカーが測定可能であることを確認できた。しかし、アレイのロット間で、データにバラツキが見られた。マーカー測定系の小型化は、受託解析を進める上でも必要であるため、今後、さらに検討を進めていく必要がある。

特許件数： 2

論文数： 2

口頭発表件数： 5

研究成果に関する評価

1 国内外における水準との対比

国内外において、ハイスループットな食品機能性評価法の研究は進行しているが、本研究のように、マーカータンパク質の発現パターンから一度に複数の食品の生理機能値が推定可能な評価システムを構築した例は過去になく、新規性・独創性の高い研究となっている。

2 実用化に向けた波及効果

本研究では、ウイルス発がん予防に特化した食品機能性評価システムとして開発を進めてきたが、同様の原理を活用することにより、生活習慣病をはじめとする多くの疾病予防効果を有する食品評価システム並びに、探索へと応用展開することが可能である。さらに、本システムは一度の測定で複数の生理機能を推定できるため、機能性食品のスクリーニングを迅速化することができ、新製品開発の期間短縮が期待できる。

残された課題と対応方針について

推定可能な生理機能をニーズの高い生活習慣病予防に関連する生理機能にも広げ、研究を進める。受託解析を実施する上で、マーカータンパク質測定系の小型化が必要となってくるため、96well 型抗体アレイによる検討を早急に実施したい。

	JST 負担分 (千円)							地域負担分 (千円)							合計
	15年度	16年度	17年度	18年度	19年度	20年度	小計	15年度	16年度	17年度	18年度	19年度	20年度	小計	
人件費	684	9,643	18,326	7,123	7,865	3,402	47,043	0	10,700	5,200	0	8,650	8,650	33,200	80,243
設備費	16,202	22,593	20,840	0	0	0	59,635	0	0	0	0	0	0	0	59,635
その他研究費 (消耗品費、 材料費等)	1,850	22,988	20,900	9,406	5,853	1,000	61,997	0	0	0	0	1,365	1,365	2,730	64,727
旅費	11	173	646	350	440	124	1,744	0	0	0	0	285	285	570	2,314
その他	54	92	64	494	557	239	1,500	0	0	0	0	150	150	300	1,800
小計	18,801	55,489	60,776	17,373	14,715	4,765	171,919	0	10,700	5,200		10,450	10,450	36,800	208,719

代表的な設備名と仕様 [既存 (事業開始前) の設備含む]

JST 負担による設備：プレートウォッシャー (大日本製薬)、プレート分注機 (大日本製薬)、吸光プレートリーダー (モレキュラーデバイス: Emax)

地域負担による設備：マルチパーパスプレートリーダー (テカン: Genius)