

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
d) バイオマーカー探索技術の確立

サブテーマリーダー 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 江藤望、准教授 榊原陽一
 宮崎県産業支援財団：研究員 岩田喬子、研究員 内田飛香
 南日本酪農協同(株)：課長代理 竹下正彦
 雲海酒造(株)：研究員 森永浩通

研究の概要、新規性及び目標

①研究の概要

細胞は生理活性物質やストレスにตอบสนองして細胞内のタンパク質発現プロファイルを変化させるので、食品成分をはじめとする生理活性物質の細胞に対する影響を細胞内のタンパク質量の変化として検出することができる。そこで抗ウイルス活性やがん細胞増殖抑制活性、抗炎症作用などの生理活性をもった既知の化合物で細胞を処理し、細胞の応答を遺伝子およびタンパク質の両面から解析し、抗酸化作用や抗ウイルス作用などの機能性が評価できるバイオマーカー候補を探索した。遺伝子の解析には DNA マイクロアレイを使用し、タンパク質の解析は蛍光ディフュレンシャル二次元電気泳動を基盤としたプロテオーム解析により実施した。蛋白質の同定は、型質量分析装置を用いてペプチドマスフィンガープリント (PMF) 法にて行った。

②研究の独自性・新規性

生理活性評価に有用な新規のタンパク質を発見することができる。
 バイオマーカーの遺伝子発現およびタンパク質合成の制御機構を明らかにすることができる。
 蛍光ディフュレンシャル解析により定量性の高い内部標準法による解析ができる。
 独自の蛍光色素を用いることで、蛍光ディフュレンシャル解析のコストを大幅に削減できる。
 酸化傷害タンパク質を特異的に解析できる方法により、タンパク質の酸化の程度を直接評価できる。
 クラスター解析により、生理活性物質の作用機構に関する情報を提供することができる

③研究の目標

- ・フェーズⅠ：DNA マイクロアレイ解析およびプロテオーム解析基盤の確立。
 新規プロテオーム解析技術の開発。
 ウイルス発がん予防の評価に有用な新規のバイオマーカータンパク質を見出す。
- ・フェーズⅡ：ウイルス発がん予防の評価に有用な新規のバイオマーカータンパク質の作用機構を明らかにする。
 酸化傷害タンパク質特異的プロテオーム解析技術の開発
 食品成分 50 種のプロテオーム解析結果をクラスター解析し、プロテオーム解析による機能性評価を検討。

研究の進め方及び進捗状況

培養細胞 (Jurkat, HL-60, Huh-7, HepG2) を生理活性が既知の化合物(食品機能性成分)で処理し、その結果生じる細胞の応答を遺伝子およびタンパク質に関して解析した。発現の変化した遺伝子は DNA マイクロアレイにて解析し、タンパク質はプロテオーム解析により分析した。プロテオーム解析に関しては、新規プロテオーム解析技術として蛍光ディフュレンシャル二次元電気泳動法(後述の榊原メソッド、特許申請)を開発し、この方法による発現プロテオーム解析および質量分析計によるタンパク質の同定を行った。現在までに各既知化合物において食品の機能性特異的に変化するマーカー候補を複数個選出できている。さらに、酸化傷害タンパク質特異的プロテオーム解析技術としてカルボニル化タンパク質特異的なプロテオーム解析法を開発した。この方法は、抗酸化食品の評価を行う際に、従来の化学的な抗酸化作用 (DPPH ラジカル消去活性など) と異なり、細胞中で生じたタンパク質の酸化傷害の程度を直接解析できる画期的な方法である。このように、従来の発現プロテオーム解析 (タンパク質の発現量の比較) から進歩し、タンパク質の修飾 (タンパク質の質の比較) を解析する方法にいち早く着目した。また、二次元電気泳動のスポット解析データは、従来個々に発現量のパラメーターとして利用されてきた、それをまとめてクラスター解析することで、個々のスポットデータのみでは決して得られないプロテオームと食品成分の構造の相関などが示された。

主な成果

具体的な成果内容:

- 1) IC3-OSu および IC5-OSu を用いた新規蛍光ディフュレンシャル二次元電気泳動法を開発し、内部標準法による定量性の高い技術を確立した。この技術に関しては、特許申請を行った。さらに、学会 (ヒトプロテオーム機構大会) におけるランチョンセミナーを活用して技術の普及活動を積極的に行った。
- 2) 上述の新規蛍光ディフュレンシャル二次元電気泳動法によりバイオマーカー候補タンパク質として、thioredoxin reductase1、D-3-phosphoglycerate dehydrogenase、glutathione reductase、phosphoserine aminotransferase、glycyl-tRNA synthetase、tryptophanyl-tRNA synthetase、phosphoserine aminotransferase、6-phosphogluconate dehydrogenase などが明らかとなった。
- 3) ヒドラジドタイプの IC-Dye を用いたカルボニル化タンパク質特異的二次元電気泳動を開発した。この方法は、従来の DNPH およびピオチンヒドラジドを用いた方法と比較して、定量性が良く、操作も簡便になった。感度に関しては、同程度の結果が得られた。
- 4) 上述のカルボニル化タンパク質特異的二次元電気泳動を用いて、Alpha-enolase、

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, 60kDa heat shock protein など 10 種のタンパク質を関連するバイオマーカー候補として同定した。その結果、糖代謝に関与するもの、酸化ストレス防御に関与するものが同定された。また、食品成分の抗酸化作用（タンパク質の酸化傷害を軽減する効果）を評価できることが示された。

5) prohibitin, SP-100 等多くのマーカー候補蛋白質を提案できた。また、interferon と ribavirin による相乗効果の原因の一つに PI3K/mTOR 経路にあることを明らかにした。このことを基にサブテーマ 1-1 グループのデータマイニングを行った結果、インターフェロンとリバビリンとの併用効果の検出方法および検出キットに関する特許出願につながった。

6) 食品成分 50 種のプロテオーム解析データによるクラスター解析を実施した。その結果、基本構造が近い食品成分や機能が近い食品成分のクラスターが形成された。このことより、プロテオームと食品成分の構造や機能に相関があることが判明した。その結果は、イタリアで開催された国際学会で招待講演として報告した。また、2009 年 3 月開催予定の日本農芸化学会において大会シンポジウム（プロテオミクスから見た食と健康、世話人代表：榊原陽一）において発表予定である。

特許件数: 2

論文数: 7

口頭発表件数: 33

研究成果に関する評価

1 国内外における水準との対比

蛍光ディフュージョン二次元電気泳動に関しては、従来の方法によるコストを 1/100 程度に軽減できる画期的な方法である。ヒトプロテオーム機構大会におけるランチョンセミナーの後に、数件の技術指導に関する問い合わせがあった。実際に我々の方法を導入した研究者の意見としても、非常に高い評価が得られている。

2 実用化に向けた波及効果

先願の特許による制限から、キット化は困難と判断した、しかしながら研究手法としては画期的なもので既に広く普及しており（東京都老人総合研究所、九州大学、山口大学、鹿児島大学、川崎医科大学、名城大学ほかにて既に実施されている）、科学の発展に大きく貢献できるものと確信する。酸化傷害タンパク質を標的とした蛍光ディフュージョン解析も同様の特許による制限を受ける、しかしながらこちらは新規の蛍光色素を開発していることから、色素単体での販売およびそれにともなっておりこちらの方法も広く普及する可能性が十分にある。

残された課題と対応方針について

得られた成果を早急に論文としてとりまとめる。食品の機能性を標的に研究開発を行ってきたが、安全性評価のためのバイオマーカー探索技術としても有用と考えられるため、そちらへの展開を検討する。蛍光標識試薬、二次元電気泳動用試料調製キットなどを開発できるシーズがあり、具体的に試薬メーカーと製品化を視野に置いた共同研究が必要である。

	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	0	0	0	5,295	3,151	3,402	11,848	0	0	0	1,500	1,260	1,260	4,020	15,868
設備費	0	0	0	0	3,873	0	3,873	0	0	0	0	0	0	0	3,873
その他研究費 (消耗品費、 材料費等)	1,000	1,828	2,500	13,929	3,044	2,500	24,801	0	0	0	1,000	500	500	2,000	26,801
旅費	0	0	0	270	280	134	684	0	0	0	0	0	0	0	0
その他	27	46	32	403	323	239	1,070	0	0	0	0	0	0	0	1,070
小計	1,027	1,874	2,532	19,897	10,671	6,275	42,276	0	0	0	2,500	1,760	1,760	6,020	47,612

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: DNAシーケンサー (Beckman Coulter)、DNAマイクロアレイ (Affymetrix)、
地域負担による設備: リアルタイム PCR (Applied Biosystems)、超遠心分離器 (日立: CP70)、バイオクロマト (Amersham Bioscience: AKTA FPLC)