

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月10日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23650462

研究課題名（和文）DNA マイクロアレイを用いて食品の味質に関与する遺伝子を見出す

研究課題名（英文）Search for genes related to taste substances using DNA microarray analysis

研究代表者

朝倉 富子 (ASAKURA TOMIKO)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・特任教授

研究者番号：20259013

研究成果の概要（和文）：DNA マイクロアレイを用いて発現遺伝子を網羅的に解析し、プレハーベストにおける食材の品質関連因子を推定することを目的とし、研究対象としてはダイズを用いた。ダイズの主要貯蔵タンパク質組成のうち、グリシニンのサブユニットのほとんどを欠失した品種における種子の成分解析と、DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現プロファイルを解析した。その結果、欠失ダイズでは遊離アミノ酸の含有量が著しく増大した。また、数種の種子成熟期発現タンパク質、グルタチオンSトランスフェラーゼおよびアスコルビン酸パーオキシダーゼの発現が上昇していた。

研究成果の概要（英文）：Above 70% of storage proteins of soybean were composed with \cdot -coglycinine and glycinine. Characterisation of seed components and global gene expression analysis was performed with most-glycinine-deficient cultivar, Nanahomare. The constituents of seed were almost the same as those of control cultivar, Tmahomare, but free amino acid contents were highly increased in Nanahomare. The gene expression in developing seeds were not so different. Some seed maturation proteins and two stress related genes, glutathione S-transferase and ascorbate peroxidase, were more expressed in Nanahomare.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|-------|-----------|---------|-----------|
| 交付決定額 | 2,900,000 | 870,000 | 3,770,000 |

研究分野：食生活学

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：DNA マイクロアレイ・味・大豆・米

1. 研究開始当初の背景

食品には三つの機能がある。第一番目は、「栄養機能」、第二に「嗜好的機能」、第三番目は「生体調節機能」である。第一番目の栄養機能は、栄養素を与えるという食品の最も重要な機能であり、栄養学をはじめとする幅広い研究の対象となってきた。また、第三番目の生体調節機能は、一次機能である栄養機能とリンクしつつ、栄養素以外の食品成分が

身体の生理機能を調節する働きを有するという食品の新しい概念に基づくものである。現在、食品の機能性を様々な方向から研究する試みが行われている。食品研究の立場からは、食品を摂取した生物で生じる生理変化を遺伝子変動として捉えるニュートリゲノミクスが、食品の一次機能と三次機能の評価のためのツールとして威力を発揮している。一方で、食品の二次機能に関わる研究は、オミ

クス研究の対象とはされてこなかった。しかし、食品成分の網羅的解析は食品の二次機能評価において重要な意味を持ち、食材の生産、加工などと関連のあるオミクス研究が求められるようになってきた。

2. 研究の目的

食材の品質（特においしさの要因）を遺伝子から解析することを目指した。食品化学及び調理科学分野における食品研究は、最終生産物の成分分析に専ら頼ってきた。しかし、食品は極めて複雑な複合系であり、評価が難しい。本申請研究は、DNA マイクロアレイを用いて発現遺伝子を網羅的に解析し、プレハーベストにおける食材の味質あるいは、栄養素関連因子の変動を推定する新しい試みである。具体的には、DNA マイクロアレイを用いて発現遺伝子を網羅的に解析し、プレハーベストにおける食材の味質関連因子を推定することを目的とする。研究対象としてはダイズを用いた。

ダイズは世界中で最も生産量の多いマメ科の種実で、タンパク質、脂質、糖質を含み、その他にも鉄分、カルシウムなど、ミネラルも多く含む、栄養価が高い食品である（図1）。

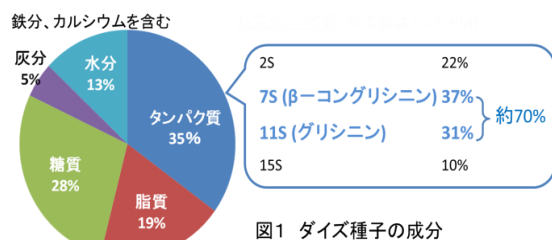


図1 ダイズ種子の成分

完熟種子から抽出された油脂は食用油として利用される。植物性タンパク質としてはアミノ酸スコアが高く、優良な食糧種実である。全ゲノム解析が *Glycine max* については、終了している。ダイズの主要な貯蔵タンパク質は7Sのβコングリシニンと11Sのグリシニンで両者でタンパク質の約70%を占める。

グリシニンとβコングリシニンのアミノ酸組成を比較すると、グリシニンには含硫アミノ酸や必須アミノ酸の一つであるトリプトファンが含まれるのに対し、βコングリシニンにはこれらのアミノ酸が非常に少なく、栄養的にβコングリシニンは劣るとされてきたが、近年βコングリシニンが血中のグルコースの取り込みや血中脂質含有量に影響を与えるというデータが出され、βコングリシニンが注目されるようになってきた。このようなβコングリシニンの生理効果が報告され、βコングリシニンを効率よく

抽出できる大豆が求められ様になった。

3. 研究の方法

本研究計画では、タンパク質、脂質の含有量の異なる品種を用いた解析を行った。ダイズタンパク質は豆腐などのゲル化食品の生産において、重要な役割を持つ。沈降係数によって分画されるタンパク質、7S, 11S, 2Sのうち、ゲル化に大きく関与するのは11Sである。11S欠失の品種が育種栽培されているが、主要タンパク質が大きく欠失した品種において他の種子成分がどのように変化するかを遺伝子レベルから探索した。また、種子の成熟過程における発現遺伝子についても解析を行った。各ステージのサンプルからRNAを抽出し、アフィメトリックス社のプロトコルに従ってcRNAを合成し、ハイブリダイゼーション、解析を行った。用いたジーンチップはアフィメトリックス社のrice genome arrayで、約57,000のダイズ関連遺伝子が搭載されている。得られたデータはDFWアルゴリズムによって正規化し、発現パターンの類似性によるクラスター解析へ供した。

4. 研究成果

ななほまれば、大豆の主要タンパク質であるグリシニンのほとんどを欠失しているために相対的に7Sのβコングリシニン含有比率が高くなっている品種である。7Sと親品種タマホマレのほまれを取って「ななほまれ」と名付けられた。対照として親品種であるタマホマレとななほまれの未熟な莢、未熟豆（豆2mm、5mm）枝豆（最大サイズであり脱水直前のもの）をサンプルとし、DNAマイクロアレイ解析に供した。

ななほまれとタマホマレのタンパク質組成を示した写真である。βコングリシニンにはα'、α、βの3種類のサブユニットがある。親品種のタマホマレとななほまれのタンパク質の組成を比較すると、グリシニンのサブユニットのうちG3を除くすべてのサブユニットが欠失していた（図2）。

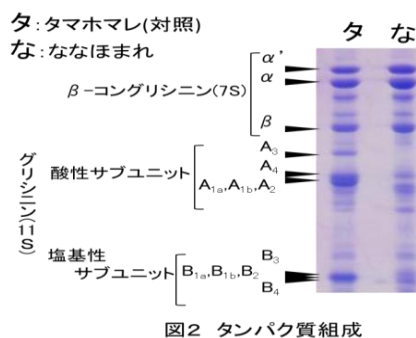


図2 タンパク質組成

主要タンパク質の片方を欠損した大豆の他の成分が変化しているかを調べた。ななほまれは主要貯蔵タンパク質であるグリシニンサブユニットをほとんど欠失しているにも拘わらず粗タンパク質含有量は親品種のたまほまれとわずか2%しか減少しておらず、その他の成分の成分である脂質、糖質はほとんど変わらなかった(表1)。

表1 種子の成分組成

| | 対照 タマホマレ | ななほまれ |
|-----------|-------------|-------|
| 粗タンパク質(%) | 43.3 | 41.3 |
| 脂質(%) | 19.9 | 20.6 |
| 糖質(%) | 22.7 | 22.2 |

しかし、遊離アミノ酸量を調べたところ、ななほまれではタマホマレの1.8倍にも増加していた。特にアルギニンの増加率は高く、2.3倍になっていた(表2)。

表2 種子の遊離アミノ酸含有量

| 遊離アミノ酸 (mg/100g) | 対照 タマホマレ | ななほまれ |
|---------------------|-------------|-------|
| 全遊離アミノ酸 | 404 | 726 |
| アルギニン | 208 | 464 |
| リジン | 7 | 11 |
| ヒスチジン | 2 | 7 |
| フェニルアラニン | 3 | 3 |
| チロシン | - | 2 |
| ロイシン | 3 | 3 |
| イソロイシン | 3 | 4 |
| メチオニン | 1 | 1 |
| バリン | 3 | 6 |
| アラニン | 9 | 13 |
| グリシン | 2 | 3 |
| プロリン | 3 | 5 |
| グルタミン酸 | 58 | 70 |
| セリン | 1 | 1 |
| アスパラギン酸 | 54 | 81 |
| トリプトファン | 45 | 50 |
| シスチン | - | - |
| スレオニン | 2 | 2 |

遊離のアルギニンが増加したことは、2つの視点から意味のあることと考えられる。種子生理の面からは、発芽に必要とされる窒素をアミノ酸側鎖の中で、もっとも多く保有しているアルギニンを多くすることで確保する。また、食品化学的側面からは、遊離アミノ酸の増加が食味に関わる可能性がある。特にアルギニンは、他の味を増強する働きがあり、遊離のアルギニン量の増加は、食味へ影響を与える可能性が高い。

DNAマイクロアレイ解析によって、発現する遺伝子を網羅的に解析した。まず、豆の成長段階のどの時期において遺伝子の発現が大きいかを解析した。その結果、豆のサイズが大きく変化するステージにおいて遺伝子の発現変動が大きいことがわかった。

(図3)

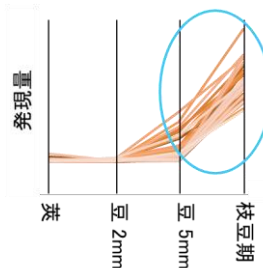
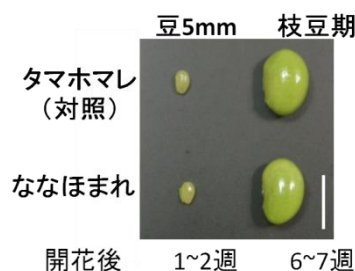
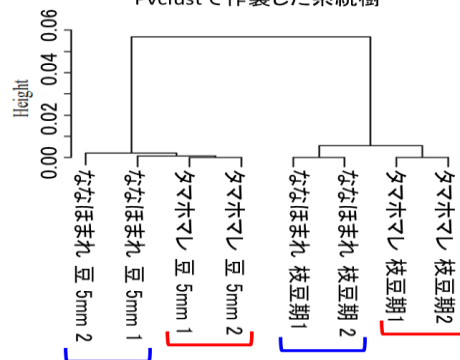


図3 登熟期における発現遺伝子の変動

そこで、豆5mmと枝豆サイズ(最大サイズ)になった時のタマホマレおよびななほまれで発現している遺伝子を比較した。その結果、成長段階ごと、品種ごとにクラスターを形成することがわかった(図4)。

図4 DFW法で正規化を行いPvclustで作製した系統樹



2つの品種間で発現量に有意に差があった遺伝子の数を示す。対照群に比べてななほまれで発現がFDR(False discovery rate)が0.05未満の遺伝子数は、豆5mmではタマホマレ(対照) < ななほまれは17遺伝子、タマホマレ(対照) > ななほまれ72遺伝子、枝豆期(最大サイズの登熟種子)では、タマホマレ(対照) < ななほまれは52遺伝子、タマホマレ(対照) > ななほまれ15遺伝子であった。これらの遺伝子のうち、機能が分かっているものを表3にまとめた。

表3 2品種間で発現量に有意な差のある遺伝子

FDR<0.05で有意に遺伝子発現量に差のある遺伝子でNETAffxに記載されているもの
対照: タマホマレ グリシニン欠失ななほまれ

| ななほまれ>対照 | ななほまれ<対照 |
|---|---|
| 種子成熟タンパク質 24 kDa seed maturation protein(枝豆期) 35 kDa seed maturation protein(枝豆期) Seed maturation protein PM22(枝豆期) Dehydrin-like protein / Maturation-associated protein(枝豆期) | グリシニンサブユニット遺伝子 Glycinin G1(豆5mm・枝豆期) A2B1a precursor(G2)(豆5mm・枝豆期) Glycinin G5(枝豆期) |
| ストレス関連 Ascorbate peroxidase(豆5mm・枝豆期) Glutathione S-transferase GST 14(枝豆期) | その他 Hsp23.9(豆5mm) Nodulin-26 / SPCP1 protein(枝豆期) |
| その他 Hsp23.9(枝豆期) Basic 7S globulin isoform(枝豆期) Ca2+-binding EF hand protein(枝豆期) Diacylglycerol acyltransferase 1b(枝豆期) | |

ななほまれではグリシニンの各サブユニットをコードする遺伝子発現が著しく低いあるいは、検出されなかった。一方でグリシニン以外の種子成熟期に発現するタンパク質では発現が高くなっていった。特記することとして、各種のストレスに関与する酵素、アスコルビン酸ペルオキシダーゼやグルタチオントランスフェラーゼの発現量がななほまれで上昇していたことである。主要貯蔵タンパク質の欠失によるものか、遊離アミノ酸の過剰蓄積に要るものなのか原因に関しては今後の検討課題である。しかし、2つの品種の発現遺伝子を比較した結果、貯蔵タンパク質の組成が大きく変化しても、発現する遺伝子はほとんど影響を受けないことがわかった。しかしながら、機能未知の遺伝子としてジーンチップに搭載されている分子の中にグリシニン欠失によって引き起こされている可能性もあり、今後の検討が必要である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計7件)

- ① Asakura, T., Global gene expression profiles in developing soybean seeds, *Plant physiol. Biochem.*, 査読有、52、2011、147-153、
dx. doi. org/10. 1016/j. plaphy. 2011. 12 . 007
- ② Yamamoto, K., Genetic tracing of the gustatory neural pathway originating from Pkd113-expressing type III taste cells in circumvallate and foliate papillae, *J. Neurochem.*, 査読有、119、2011、497-506、DOI:10. 1111/j. 1471-4159. 2011. 07443. x
- ③ Koizumi, A., Human sweet taste receptor mediates acid-induced sweetness of miraculin, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 査読有、108、2011、

16819-1682410. 1073/pnas. 1016644108

④ Nakajima, K., Identification and Modulation of the Key Amino Acid Residue Responsible for the pH Sensitivity of Neoculin, a Taste-Modifying Protein, *PLoS One*, 査読有、6、2011、274-278、DOI:10. 1002/ffj. 2073

⑤ Asakura, T., Analysis of the interaction of food components with model lingual epithelial cells: the case of sweet proteins, *Flavour Fragr. J.*, 査読有、26、2011、274-278、DOI:10. 1002/ffj. 2073

⑥ Nakajima, K., Non-acidic compounds induced the sweetness of neoculin a Taste-Modifying Protein, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 査読有、75、2011、1600-1602、DOI:10. 1271/bbb. 110081

⑦ Nakajima, K., Koizumi A, Iizuka K, Ito K, Morita Y, Koizumi T, Asakura T, Shimizu-Ibuka A, Misaka T, Abe K, Non-acidic compounds induced the sweetness of neoculin a Taste-Modifying Protein, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 査読有、75、2011、1600-1602 DOI: 10. 1271/bbb. 110081

[学会発表] (計6件)

- ① 本間亮丞、チーズの苦味抑制活性とその起因となる遊離脂肪酸の解析、日本農芸化学会 2012年度大会、2012年3月23日、京都女子大学 (京都)
- ② 金田康平、味覚修飾タンパク質ネオクリンのシステインバリエント作製とその機能解析、日本農芸化学会 2012年度大会、2012年3月23日、京都女子大学 (京都)
- ③ 阿部美樹、アカゲザル味覚関連遺伝子群の茸状・有郭乳頭株味蕾における発現解析、日本農芸化学会 2012年度大会、2012年3月24日、京都女子大学 (京都)
- ④ 松田龍星、ヒト上皮ナトリウムチャンネル活性化剤S3969の蛍光膜電位測定による活性評価、日本農芸化学会 2012年度大会、2012年3月24日、京都女子大学 (京都)
- ⑤ 養田直倫、シロイヌナズナ由来シグナルペプチドペプチダーゼ (AtSPP) の過剰発現株を用いた網羅的遺伝子発現解析、日本農芸化学会 2012年度大会、2012年3月24日、京都女子大学 (京都)

[図書] (計2件)

- ① 朝倉富子、社団法人生命科学振興会「医と食」編集部、味覚受容体、2011、56

②朝倉富子 阿部啓子、三共出版株式会社、
コメのアスパラギン酸プロテアーゼ機能
解析と食品加工への応用一、2012、341

〔その他〕

ホームページ等

[http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/tastescie
nce/index.html](http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/tastescience/index.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

朝倉 富子 (ASAKURA TOMIKO)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・特
任教授

研究者番号：20259013