

食品成分の網羅的な機能性評価法

江藤 望^{1,2*}・山森 一人³・永濱 清子²・榊原 陽一^{1,2}
 西山 和夫¹・吉原 郁夫³・水光 正仁^{1,2}

食品の生体調節機能に関する研究は国際的な規模で展開されつつあるが、食品成分の多様な生体調節機能の評価するためには、生体調節機能ごとに個別の試験を実施する必要があり、多くの労力と時間を要する。そこで筆者らは、食品の複数の生体調節機能について複数の測定系を用いて評価するのではなく、一度のウェットな実験によるデータから複数の生体調節機能を *in silico* で推定することを試みている¹⁻³⁾。

食品の機能性評価

食品成分による疾病予防 食品による疾病予防の可能性は、日本においてもいくつかの疫学研究で報告されている。まず、果物の高い消費量は、循環器疾患リスクの低減と関連していること、および全果菜類の摂取量と食道扁平上皮がん発症リスクの低減との間に因果関係のあることが前向きコホート研究で知られている^{4,5)}。また、ケースコントロール研究と前向きコホート研究の評価のためのメタ分析研究により、果菜類の摂取ががんの発症リスクを低減させることが示唆されている⁶⁾。さらに、果菜類は、植物由来のポリフェノールを豊富に含んでいるが、さまざまな疾病でポリフェノールの予防効果は、疫学研究や臨床研究、および動物やヒト細胞株を用いた実験研究によっても、広く支持されている⁷⁾。

評価項目の多様性 科学的根拠に基づいた疾病予防や健康増進効果の期待される新しい食品成分を探索することは、一般消費者だけでなく食品産業界にとっても興味あるところである。しかしながら、評価すべき生体調節機能の種類は少なくない。実際のところ、何らかの生体調節機能を有する化合物は、複数の機能を持つことがある。たとえば、お茶に含まれるカテキン類は、がん予防効果⁸⁾、循環器疾患予防効果⁹⁾、抗酸化あるいは酸化促進活性¹⁰⁾、抗肥満、抗糖尿病効果¹¹⁾、抗炎症作用¹²⁾など多岐にわたる作用を持つことが報告されている。特定の生体調節機能に着目した食品成分のスクリーニング

では、その成分の他の機能を見逃してしまうであろう。それゆえ、一次スクリーニングでは、多項目にわたる生体調節機能を広く評価することが望まれる。しかしながら、生体調節機能毎に異なる測定系を準備する必要があり、スクリーニングの作業量は膨大なものとなる。できるだけ多くの評価法を統合し、少ない実験で多くの評価項目を得る方法が求められていた。

複数の評価法に共通するインデックス 食品成分の評価方法を大別すると、マウスやラットを用いた *in vivo* 試験と培養細胞を用いた *in vitro* 試験とがある。一次スクリーニングとして *in vitro* 試験を実施し、候補化合物について、*in vivo* 試験で効果を実証し、再度、*in vitro* 試験でメカニズムの解明へと進むことも多い。疫学研究からヒントを得て *in vivo* 試験から開始することもある。筆者らは、食品成分の一次スクリーニング用途として、*in vitro* 試験結果を網羅的に推定出来るようなシステム開発を目指した。しかし、統合すべき複数の *in vitro* 試験間には、応答を検出する細胞や化合物の作用時間、および活性の測定方法などで共通点がほとんどない。そこで、食品成分（化合物）と各生体調節機能との関係を計算科学の技術で関連づけることを模索した。

インフォマティクスを利用した化合物の機能性評価

機構論的モデリング 化合物の生体調節機能についてインフォマティクスを用いて推定する方法としては、機構論的モデリング法と経験論的モデリング法とがある¹³⁾。前者は、化合物の分子構造と生体調節機能の鍵となるタンパク質や遺伝子との関係を論理的に規定し、適合性を計算する方法である。これを実現するためには、いくつかの要件が満たされなければならない。まず、当然のことではあるが、ターゲットとの結合を計算する必要上、成分の分子構造が明らかでなければならない。次に、生体調節機能を司っている機構が分子レベルで明らかでなければならない。最後に、生体調節が唯一の機構

*著者紹介 宮崎大学農学部応用生物科学科（准教授） E-mail: neto@cc.miyazaki-u.ac.jp

¹宮崎大学農学部応用生物科学科、²宮崎県産業支援財団、³宮崎大学工学部情報システム工学科

によって調節されている必要がある。こうした諸条件を満たせば、機構論的モデルは頑強性が高いことが期待され有用であろう。しかし、生体調節機能を有する食品成分のスクリーニング用途において上記の条件を満たすのは、むしろ例外的であり、複数の成分が含まれる食品の生体調節機能といった高次の複雑系における現象には適応しにくい。

経験論的モデリング これに対して経験論的モデリング法は、実験結果を通してモデルを構築するため、理論的な取扱いが出来ない場合にも適応可能である。例として、薬学分野で昔からよく研究されている定量的構造活性相関モデリングがある。これは、化合物の分子構造を構造記述子として数量的に表現し、薬理作用との関係を多変量解析するもので、ケモインフォマティクスとも呼ばれる(図1)。多変量解析法には重回帰分析や部分最小二乗法等の線型モデルや後述する人工ニューラルネットワーク(ANN)などの非線形モデルが利用される。

この場合、当然ながら化合物の構造情報が明らかでなければならぬ。しかし、食品成分の生体調節機能を評価する際、必ずしも被験化合物の構造情報が明らかでない場合も多い。食品素材や加工品の機能を測定する場合、被験物は食品からの粗抽出物であり、つまり混合物であることがほとんどであるため、被験化合物の情報をそのままでは数値化できないのである。

化合物情報の変換 そこで、筆者らは被験化合物の情報を別のインデックスに変換することにした。食品成分をヒト培養細胞に添加すると、それに応じて細胞内タ

ンパク質の発現に変動を生ずるが、その発現変動パターンを測定することで、被験化合物の情報を置き換えたのである(図1)。

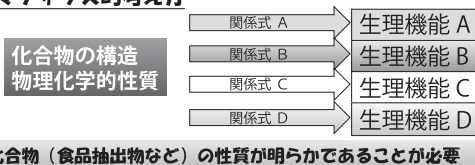
こうすることで、食品成分の化合物としての性質(構造情報など)が不明であっても細胞に与える影響を数値化できる。また、ある化合物の生体調節機能は、生体の、つまりは細胞内のタンパク質発現(あるいは活性化)に影響を及ぼした結果と見ることもできる。したがって、細胞内タンパク質発現変動パターンと生体調節機能との関係をモデリングできれば、被験化合物による細胞内タンパク質の発現量を検出することで、生体調節機能が計算できることになる。さらに、複数の生体調節機能に関してモデリングできれば、タンパク質発現量の測定という一つの実験を行うだけで、計算により複数の生体調節機能を推定することが可能となるであろう。筆者らは、ANNを用いて、こうした予測問題に取り組んだ。

評価プログラムの開発

実際の評価プログラムは、以下のステップで作成した。概要を図2に示す。

実測値の収集 まず、35種類の食品成分および薬剤をヒト培養細胞に添加し、図2に示す13種類の細胞内タンパク質(マーカータンパク質)の発現変動をELISAで測定し、データベース化した。次に、同じ食品成分および薬剤について既知の方法で9種類の生体調節機能を測定し、データベース化した。測定項目は、がん細胞増殖抑制作用、抗ウイルス(抗HCV)作用、抗

ケモインフォマティクスの考え方



本論文の考え方(バイオインフォマティクスの)

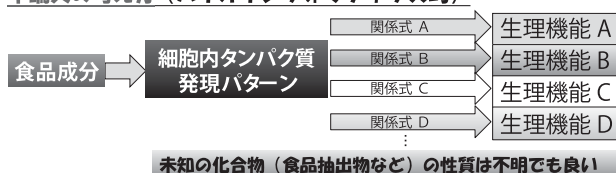


図1. 化合物情報がない場合のモデリングイメージ

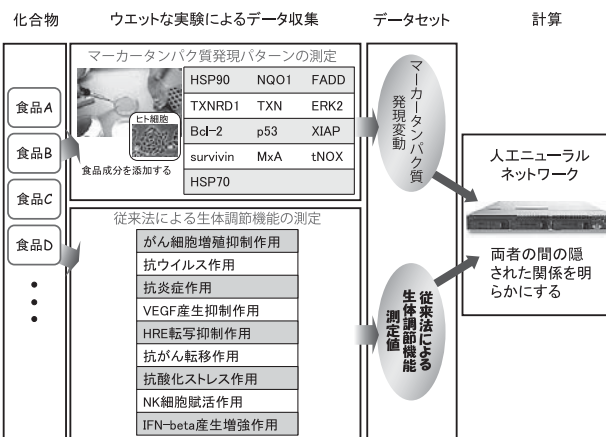


図2. 食品機能性評価プログラムの開発概要

炎症作用, 血管新生抑制作用 (VEGF産生抑制作用, HRE転写抑制作用), 抗がん転移作用, 抗酸化ストレス作用, ナチュラルキラー細胞賦活作用, インターフェロン β 産生増強作用, の各生体調節機能である。

データの計算的割り増し 後述するANNの学習には, 重みの数に応じて入力データが必要となる。ウェットな実験だけで必要なデータ数を揃えるのは困難であったので, データを合成することにした。ある化合物による13種類のマーカータンパク質発現量の値と, 9種類の生体調節機能の実測値に対し, それぞれ異なるホワイトノイズを付加した。ノイズの大きさは, 実測値の変動係数の範囲内であるので, 実際に発生しうる実験誤差を模倣した形になる。実測データの10倍量の合成データを作成しデータセットとした。

人工ニューラルネットワーク マーカータンパク質の発現変動と生体調節機能の実測値との間に隠された関係をANNによって抽出した。ANNは, 脳神経回路の一部を単純な数学的モデルとして再構成したものであり, 非常に複雑なデータから意味のあるパターンを抽出することに長けている¹⁴⁾。従来から金融や気象の分野で盛んに利用されていたが, 食品生化学分野での応用はさほど進んでいなかった。ANNは, ニューロンの接続方法によって分類できるが, 筆者らは, 階層型ネットワークを利用した。構造を図3に示す。これはニューロンを層状に並べ, 前の層から次の層へ方向にのみ信号が伝わるネットワークであり, フィードバック, ループがな

い。各層の間には「重み」と呼ばれる係数を付けており, 出力を調節している。

また, 学習方法としては, 誤差逆伝播法 (バックプロパゲーション) を用いた¹⁵⁾。これは, ANNの至適化を教師付き学習により行うものだ。マーカータンパク質の発現変動をANNの入力信号とすると, 生体調節機能の推定値がANNの出力信号となる。この結果を教師信号 (生体調節機能の実測値) と比較し, 誤差が最少となるように, 重みを修正する。本研究では, 誤差が10%以下に収束するか, 繰り返し回数が4万回に達するまで学習を行った。

推定精度 ANNの学習に用いなかったデータをテストデータとし, 推定精度の検証に用いた。一般的には, cross-validationを行うことが多いが, 本ANNプログラムのバックプロパゲーションでは, 重みを逐次更新しているため, 計算時間の問題からcross-validationを完全な形で行うことが難しい。そこで, より厳しい検証条件となるが, 学習データにはまったく含まれない食品粗抽出物によるデータを多数テストデータに加えた (学習データは精製された化合物のみで構成)。実際の運用に即した形にしたのである。図4は, 例として抗ウイルス活性のANNを用いた推定値と実測値とを比較して推定精度を示したものである。RMSEのラインは, 予測能力の誤差の程度を表しており, 間隔の狭い方が良い。 $r^2=0.741$ であり工学系で見られるANNのように高水準で推定に成功しているわけではないが, 活性の大まかな

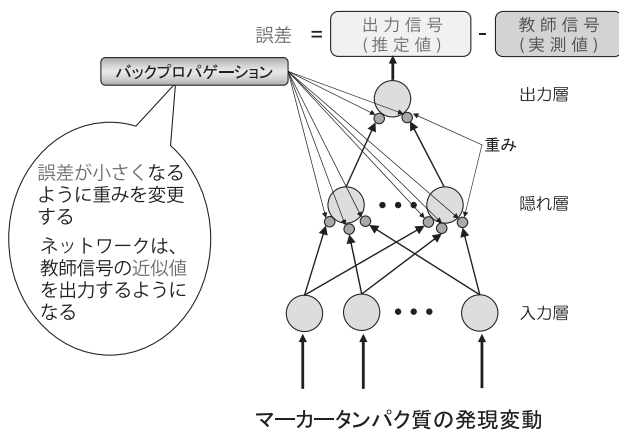


図3. ニューラルネットワークの構造と学習法

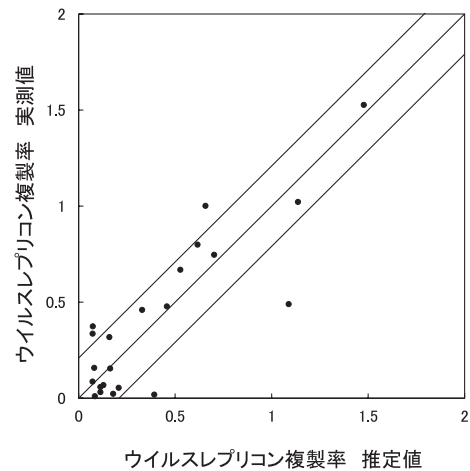


図4. 抗ウイルス作用の推定値と実測値の比較. 3本のラインのうち外側の2本がRMSEの範囲を示す。

程度は推定できるレベルにあるとあって良いだろう。特に、学習データにはまったく含まれていないタイプの食品粗抽出液を用いて検証したことを考慮すると、一次スクリーニング用の評価系としては充分であると考えている。現在、各方面から依頼された食品粗抽出物や精製化合物について本システムで機能性を推定したところ、新たな機能性が示唆され、従来法による検証実験でも確認されている。今後、本システムが網羅的な各種生体調節機能の一次スクリーニング法として育っていくことが期待される。

おわりに

ANNは、実験データによる学習を基本とするので、本質的には内挿的な予測しかできない。しかし、精製化合物だけでなく、粗抽出物などの多様な試料に対するデータを蓄積することで、ある程度、短所を克服出来ると思われる。短所以上に、分子機構が不明な、あるいは複数の機構が絡み合っている生体調整機能に対しても適用可能であるという利点は大きいであろう。

本研究は、科学技術振興機構の支援の下、宮崎県地域結集型共同研究事業の一環として実施された。

文 献

- 1) Nagahama, K. *et al.*: *J. Clin. Biochem. Nutr.*, **41s**, 167, (2007).
- 2) Eto, N. *et al.*: *Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects*, **16**, 371 (2010).
- 3) Nagahama, K. *et al.*: *J. Agric. Food Chem.*, **59**, 8575 (2011).
- 4) Takachi, R. *et al.*: *Am. J. Epidemiol.*, **167**, 59 (2008).
- 5) Yamaji, T. *et al.*: *Int. J. Cancer*, **123**, 1935 (2008).
- 6) Riboli, E. and Norat, T.: *Am. J. Clin. Nutr.*, **78**, 559S (2003).
- 7) Scalbert, A. *et al.*: *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **45**, 287 (2005).
- 8) Chen, D. *et al.*: *Histol. Histopathol.*, **23**, 487 (2008).
- 9) Hodgson, J. M. and Croft, K. D.: *Mol. Aspects Med.*, **31**, 495 (2010).
- 10) Lambert, J. D. and Elias, R. J.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **501**, 65 (2010).
- 11) Thielecke, F. and Boschmann, M.: *Phytochemistry*, **70**, 11 (2009).
- 12) Singh, R., Akhtar, N., and Haqqi, T. M.: *Life Sci.*, **86**, 907 (2010).
- 13) Yamashita, F. and Hashida, M.: *Drug Metab. Pharmacokin.*, **19**, 327 (2004).
- 14) Papadopoulos, G., Edwards, P. J., and Murray, A. F.: *IEEE Trans. on Neural Network*, **12**, 1278 (2001).
- 15) Rumelhart, D. E., Hinton, G. E., and Williams, R. J.: *Nature*, **323**, 533 (1986).