

「食品の安全性評価用蛍光センサーの開発」

神戸大学 自然科学系先端融合研究環 遺伝子実験センター

今石 浩正

## 1 研究の背景と目的

輸入農産物中の残留農薬や内分泌攪乱作用を有する化学物質、また、ヒト生体内中で代謝活性化を受け毒性化合物に変化する“潜在的危険化学物質”など、多様な食品関連化合物のヒトへの安全性について強い懸念が持たれている。従来の機器分析法や実験動物を用いた安全性試験では、既存の危険化学物質については対応可能であるが、潜在的危険化学物質等の新たな脅威には対応できない。そこで、新しい食品化合物のヒト安全性試験法が望まれている。申請者は、100万種類もの化合物を代謝する事が知られているヒト P450 化合物毒性化酵素に着目し、ヒト P450 化合物毒性化酵素と食品関連化合物の相互作用について酸素センサーによる解析を行ってきた。しかしながら、酸素センサーは感度が低く、取り扱いにも多くの注意を要することから、原理は新しいにも関わらず有効な食品安全性評価手法とは言えなかった。そこで本研究では、食品添加物、機能性食品類、及び、残留農薬などの潜在的危険化学物質と、ヒト P450 化合物毒性化酵素との直接的な相互作用を高感度に検出・評価することが可能な新規蛍光センサーを開発し、バイオインフォマティクス手法を用いたシグナル解析により食品成分の毒性予測評価を行う事を目的とした。

## 2 研究方法・研究内容

本研究では、①ヒト P450 化合物毒性化酵素遺伝子を導入した組換え大腸菌から化合物代謝に関与する 12 種の P450 化合物毒性化酵素を精製した。次に、②P450 化合物毒性化酵素による食品代謝反応を 3 種の蛍光性代謝物の生成により評価可能な食品安全性評価用マイクロタイタープレートを用いて、種々の化学物質がヒト本来の薬物代謝能に対して与える影響を評価した。③また、これらの実験から得られる P450 化合物毒性化酵素と食品関連化合物との競合反応パターンと化合物毒性情報より、ファジー決定木の手法を用いて毒性を予測するための新たな化学物質の毒性予測法の開発を行った。

次に、各項目における具体的な研究内容の詳細を示す。

### ① P450 化合物毒性化酵素の調製と蛍光センサーによる測定

大腸菌用発現プラスミドとして、pCWori を用い大腸菌内へと 12 種類のヒト P450 を発現させた。次に、食品添加物、特定保健用食品及びカビ毒を含む合計 94 種の化合物による蛍光競合反応を網羅的に評価した。P450 酵素と食品関連化合物との競合反応パターンを評価する際の蛍光基質としては、市販の青色、赤色及び緑色の蛍光を持つ P450 用蛍光性基質である Vivid 色素を用いた。

### ② 食品関連化合物の変異原性評価と P450 酵素代謝物の分析

①の方法により明らかになったヒト P450 酵素タンパク質と相互作用する食品関連化合物について、ヒト P450 酵素タンパク質による代謝反応の確認と Umu 試験による変異原性試験を行った。ヒト P450 酵素は多環芳香族化合物を代謝する事が明らかになっている

事から、これらを含む食品関連化合物を解析した。①の方法により作製されたヒト P450 酵素を高発現する組換え大腸菌を培養し、食品関連化合物の代謝活性化反応を評価した。

### ③ ファジー決定木の手法による毒性評価予測モデルの作製

94 種類の化合物をトレーニング化合物とし、変異原性の予測モデルを構築した。化合物の変異原性と、食品関連化合物の毒性評価用蛍光センサープレートから得られる P450 酵素と食品関連化合物との競合反応パターンをもとに、ファジー決定木を用いた毒性予測モデルを構築した。構築されたモデルについて、トレーニング化合物のデータを用いて、適合率、クロスバリデーションの評価を実施し、予測モデルの内部検証を行った。

## 研究成果

### ① P450 化合物毒性化酵素の調製と蛍光センサーによる測定

ヒト 12 種の P450 について、大腸菌内発現を試みた。一例として、CYP2A6 の還元型 CO 差スペクトルの結果を図 1 に示した。以上の結果から、いずれの P450 分子種についても大腸菌内での発現に成功した事が判明した。

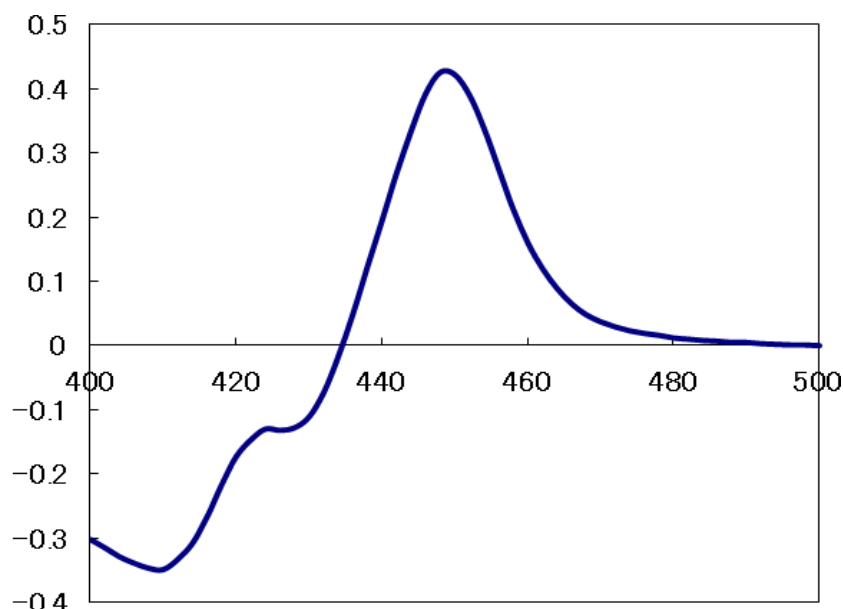


図1 還元型 CO 差スペクトル (CYP2A6)

次に、本 P450 を用いて、蛍光センサーを作製した。一例として、各 P450 を導入した蛍光センサーとケルセチンとの反応パターンについて図 2 に示す。

各 P450 とケルセチンとの反応を評価した結果、異なる P450 間では阻害率に変化が生じることが明らかとなった。本結果は、今回作製した蛍光センサーが、食品関連化合物であるケルセチンを認識し、さらにその認識シグナルを容易な方法で取り出せることを示している。さらに、94 種の食品化合物に対し同様な実験を行なった結果、蛍光センサーにより生じた本シグナルパターンは、各化合物に特異的な特徴のあるパターンを示す事が判明した。

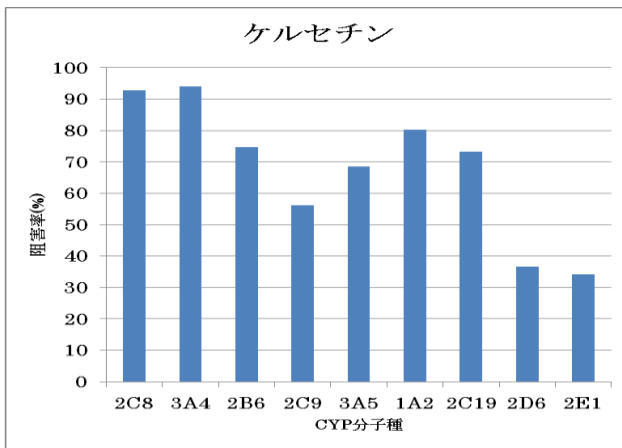


図2 CYP 分子種を横軸に、また、食品成分による阻害率を縦軸に示した。

② 食品関連化合物の変異原性評価と P450 酵素代謝物の分析

次に、食品成分の毒性評価の指標として、Umu 試験を行った。結果を図3に示す。Umu 試験はラットの P450 を用いた短期変異原性試験法であり、評価対象との比較から化合物が変異原性を持つ場合は2以上の値を示すことが明らかとなっている。本実験の結果、110種類の食品成分中には、代謝活性化により毒性を増す化合物が43種類存在することが判明した。

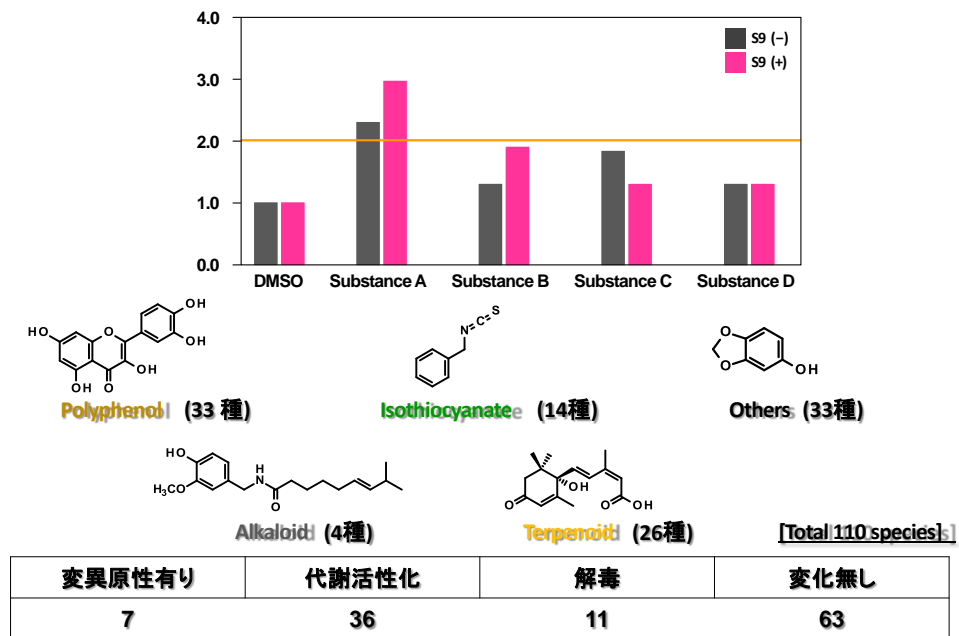


図3

Umu 試験を用いた食品成分の変異原性試験

110種の食品関連化合物について、Umu 試験を行った。S9(-) : ラット S9 無し、S9(+): ラット S9 有り

### ③ ファジー決定木の手法による毒性評価予測モデルの作製と評価

一般的に、複数の連続尺度の変数（本研究では蛍光性の P450 代謝物の生成量）から目的変数（本研究の場合には変異原性値）を説明する式（モデル）を推計するためには、重回帰分析が利用される。しかし、蛍光性の P450 代謝物量にバラつきがあることから、予測値を定量的に特定する重回帰分析の手法は最適な方法とはいえない場合もある。そこで、本研究では、毒性の予測を分類問題に帰着することで決定木による分類を試みた。その結果、重回帰分析を用いたときと比べ、提案手法を用いた場合でも平均誤差が少なくなることが確認できた。また、曖昧性を考慮した提案手法と、境界を明確に持つ単純な決定木、クラスの重複を許す決定木の比較では、提案手法の方が良い結果を示すことが判明した。従って、蛍光センサーから得られたシグナルを用いた食品化合物の毒性評価では、曖昧性を考慮した手法がより良い結果を与えることが明らかとなった。

## 4 生活や産業への貢献および波及効果

ヒトが一生で食する食物量は、重量ベースで約 50 トンと考えられており、例えばとしては新幹線一両分または象 10 頭分にも匹敵するものと考えられている。近年、食の欧米化に伴い従来の日本人では発症例が少なかった大腸がんなどが増えつつあるのも、一説にはこれら大量に摂取する食品成分の欧米化が一因であると考えられている。

本研究では、特に食品成分がヒトへと与える影響を明らかにするために、ヒトにおいて食品などの外来性化合物の代謝に関わる主酵素である P450 に着目し、バイオインフィマティクス手法を取り入れることでヒトに対する食品成分の毒影響を簡便に評価可能な新手法の開発を試みた。

近年では、健康ブームを反映し、富裕層はもとより一般的な消費者まで補助食品として多様なサプリメントを摂取する機会が増えつつある。一般的に、天然物や従来から食習慣のある食品については盲目的に安全であるとの認識が強く、科学的な検証を経て市場へと出されていない物も流通しやすいことが問題化している。このような状況下において、本研究のような簡便な食品安全性評価手法が実用化へと至ることができた場合、食品のみならず多様な化合物の安全性評価へと発展的に応用できることが期待される。