

博 士 論 文

即席麵に関する食品科学および栄養学的研究

田中 充

目次

主要略語一覧	3
第1章 序論	5
第2章 グルテン構造とフライ麺の油脂含量に関する検討	15
I. 序	16
II. 材料および方法	18
III. 結果	22
IV. 考察	24
V. 図表	26
第3章 タンパク質・脂質・糖質のバランス変化による肝臓および脂肪組織の代謝変化の解析	32
I. 序	33
II. 材料および方法	35
III. 結果	39
IV. 考察	45
V. 図表	48
第4章 即席麺に含まれる味物質・メイラード反応生成物による視床下部一下垂体系を介する脂質代謝調節	72
I. 序	73
II. 材料および方法	75
III. 結果	78
IV. 考察	83
V. 図表	86

第5章 総合討論（総括と今後の展望）	102
--------------------	-----

引用文献	116
------	-----

謝辞	129
----	-----

要旨	130
----	-----

主要略語一覧

本論文に用いた略語を以下に示す。

AGEs:	advanced glycation end-products (最終糖化産物)
BAT:	brown adipose tissue (褐色脂肪組織)
Cga:	glycoprotein hormone alpha polypeptide
DEGs:	differentially expressed genes (有意に発現変動した遺伝子)
ENaC:	epithelial sodium channel (上皮性ナトリウムチャンネル)
FDR:	false discovery rate (偽陽性の割合)
GO:	gene ontology (遺伝子オントロジー)
HEATOX:	heat-generated food toxicants (加熱により生成する有害物質)
HP:	hypothalamus - pituitary (視床下部一下垂体)
H 群:	high fat diet group (高脂肪食投与群)
IPA:	ingenuity pathway analysis
L 群:	low fat diet group (低脂肪食投与群)
MSG:	monosodium glutamate (グルタミン酸ナトリウム)
M 群:	medium fat diet group (中脂肪食投与群)
PFC:	protein・fat・carbohydrate (タンパク質・脂質・炭水化物(の割合))
PPAR:	peroxisome proliferator-activated receptor
SD:	standard deviation (標準偏差)
SEM:	standard error of the mean (標準誤差)
SREBF:	sterol regulatory element binding transcription factor
TCA:	tricarboxylic acid (cycle) (クエン酸回路)
TG:	triglyceride (トリグリセリド・トリグリセロール)

TH: thyroid hormone (甲状腺ホルモン)
TRH: thyrotropin releasing hormone (甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン)
WAT: white adipose tissue (白色脂肪組織)

第 1 章

序論

はじめに

小麦は世界で最も普及している穀物の一つである。世界生産量は年間約 7 億トンにおよび、そのうち約 4.7 億トンが食用として消費されている。日本人は 1 日平均約 90g の小麦粉を食しており、様々な形でほぼ毎日摂取している（長尾、2014）。良質のタンパク質、脂質、ミネラル、ビタミンが含まれ、栄養面で重要な意味をもつと同時に、加工性にも優れ、麵をはじめとする多様な加工品が作られている。

小麦の高い加工特性は、主に生地 of 骨格となるグルテンのネットワーク構造による。小麦粉に水を加え混ねつしドウを作ると、グリアジンとグルテニンの 2 種のタンパク質が相互に絡み合い、SS 結合、水素結合、イオン結合、疎水性相互作用等によってポリマー化し、粘弾性に優れたネットワークが形成される（長尾、2014）。生地中の成分間の相互作用について、多くの可視化技術の応用が検討され、生地構造の可視化が試みられている。例えば、近年細胞や組織等の構造観察に用いられ、非破壊で解像度に優れ三次元情報の再構築が可能な観察手法である共焦点レーザー顕微鏡により、蛍光標識したグリアジンおよびグルテニンに対する各抗体を用いてパン生地の観察が行われた（福留ら、2014）。パン生地のミキシングにおいて、ショートニングは生地中のグルテンに沿って薄膜状に伸展し、グルテン同士の潤滑油の役割を果たすことでパン生地の伸展性が向上することが知られていたが（守屋ら、1992）、その詳細は不明であった。上述の共焦点レーザー顕微鏡観察の結果、グリアジンは糸状の網目構造を取っており、ショートニングは球状の油滴粒子としてグリアジンの組織構造の表面に付着あるいは膜中に取り込まれた状態で分布していること、および、グルテニンはグリアジンよりもやや太い膜状の網目構造を取っており、膜全体にショートニング由来の微小な粒子が分布していることが確認された（福留ら、2014）。また、ごく最近、ナトリウム化合物を含む透明化試薬で小麦粉中の炭水化物を

透明化し、蛍光標識したグルテンの三次元構造を「可視化」する試みも行われた（小川・松村、2016）。ドウの粘弾性に直接的に関与し、できあがる製品の品質を決定づけるグルテンの構造・性質解明は、このような最新技術によってさらに進むことが期待されている。

小麦粉製品としての麺食品の加工技術

グルテンの粘弾性を利用し、パン、中華めん・うどん・パスタ等の麺類、菓子等多種類の小麦製品が作られている。麺は小麦やソバ等の穀粉に水を加えて捏ね、細長い線状に成形後、加熱調理するもので、アジア・欧米を中心に世界中で食されている。日本では、生めん類、乾めん類、即席めん類、マカロニ類、その他に大きく分類され、このうち乾めん類、即席めん類、マカロニ類には JAS 規格が定められている。基本製法としては、混ねつ→圧延→切出しあるいは押し出し成形により生麺が作られ、乾麺等に加工される（Figure 1）。

混ねつの際、小麦粉に対し数%程度の食塩が練水に溶解して使用される。食塩水と混ねつすると、水で混ねつする場合と比較して、グルテンがより強力に形成され、生地は弾力と伸張力が增大することが、ブラベンダーによる生地物性試験から明らかとなっているが（小田、2003）、グルテンと食塩の反応機構の詳細は明らかでなく、上述したグルテン可視化技術により解明されることが望まれる。中華麺製造の場合、食塩水に加えて、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、各種リン酸塩からなるアルカリ塩溶液である「かんすい（梶水または鹹水）」が使用される。グルテンに対する収斂作用、変性効果に加え、アルカリによる小麦粉フラボノイドの黄発色と、特有の風味・食感を出すためである（小田、2003）。

機械製麺では、ソボロ状の生地を複合ロールに通し、麺帯を成形する。次の圧延工程で、麺帯を薄く延ばす。ロール圧延では、複合した麺帯を一度に所定の厚みにまで圧延しようとする、麺帯に力が過度にかかり、形成されたグル

テン組織が破壊されてしまうので、数回に分けて順次圧延された後、切り出されて麺線となる。手延べ素麺や稲庭うどん等では撚延により成形される。また、マカロニ類やスパゲティ類の場合は、生地を押出成形機のダイスから圧力をかけて押し出して成形する。

即席麺の製造・普及

麺線を茹でる、あるいは蒸煮しデンプン糊化後、フライあるいは熱風乾燥等で水分を急速に除去し糊化状態を保持したものが即席麺である (Figure 1)。即席麺の第一号商品は 1958 年に誕生した (「チキンラーメン」・日清食品)。これは、蒸した麺を味付けして油熱で乾燥した製品であり、製麺、蒸熱処理、味付け、油揚げ乾燥という即席麺の製造工程を工業的に確立し、量産を可能にした。折からの高度成長時代の要求ともマッチし、市場拡大とともに品質向上も図られた。1971 年には、カップタイプの製品 (「カップヌードル」・日清食品) が発売された。縦長カップに味付け麺を収納し、凍結乾燥した具材を添えた製品は、加工食品業界に革新をもたらした。容器を例にすると、店頭に並ぶときは包装材料、調理時に湯を注ぐときは調理器具、さらに喫食時には食器となり、容器は 3 つの機能を併せ持つ。1974 年にコンビニエンスストアが登場したこともあり、即席麺は日本人の食生活の中に定着した。

さらに、即席麺はアジアからアメリカ、ヨーロッパ等にまで広がり、地球規模で受け入れられるようになった。特に、1990 年代から途上国での所得水準上昇に伴って消費が急増し、1990 年には 150 億食程度と推定された年間総需要が、2001 年には 500 億食に達し、2012 年には 1,000 億食を突破した (世界ラーメン協会による推定値)。市場拡大の理由は、即席麺が安全・衛生的かつ安価で、簡便性・保存性を有し、美味であるため、国境を越えた普遍的な価値をもつからであると考えられる。また、各地域の食材や味付けに馴染み、各国の伝

統の味と融合したことも挙げられる。

2005年には「宇宙食ラーメン」が、JAXA（宇宙航空研究開発機構）と日清食品により共同開発された（松尾・田中、2008）。軟らかい密閉容器に一口サイズの麺とスープ、具材が封入され、無重力状態でスープがスペースシャトル機内に飛び散らないようにとろみが付けられ、約70℃で湯戻りするよう設計された。

以上の通り、即席麺は世界中の食事、さらには宇宙食としても定番になっている。

本論文の目的

即席麺の誕生から半世紀以上を経て、いくつかの科学的課題が浮上してきた。本研究は下記に示す（1）製造・加工技術の開発、（2）栄養面からの即席麺の品質（成分）検証、（3）機能面からの即席麺の生理効果の解析、について研究を行うことを目的とした。

（1）製造・加工技術の開発

消費者の健康意識の高まりを受けて、低カロリー製品、食物繊維を添加した製品、減塩製品等、健康を意識した即席麺製品の開発が求められている。フライ麺は、フライ処理によって得られる特有の風味が消費者に好ましく受け入れられるが、一方、フライ中に麺は油を多く含むため高カロリーとなる。現在先進諸国では、エネルギーの過剰摂取によると考えられる肥満や糖尿病が問題となっている（WHO 調査、2016）。即席麺は多くの国で消費量が増加しているが、美味しさはそのまま低カロリーの低いフライ麺を求める消費者は少ない。そこで、フライ麺の製造工程におけるグルテンの形成と油脂含量との関係について検討を行った（第2章）。

（2）栄養面からの即席麺の品質（成分）の検証

第 2 章における検討の結果、即席麺中の油脂含量の調節が可能となったことから、第 3 章では、食品に含まれるタンパク質 (P)・脂質 (F)・炭水化物 (C) のバランス (PFC バランス) に着目し、バランス変化に伴う肝臓および脂肪組織における代謝変化を解析した。

PF 比と生活習慣病との関連については、以下のような報告がある (厚生労働省、2015)。炭水化物が多く脂質の少ない組成の食事は、食後血糖値および空腹時トリアシルグリセロール濃度を増加させ、血中 HDL コレステロール濃度を減少させると報告されている (Food and Nutrition Board, 2005; Mensink *et al.*, 2003)。健常者の場合、高炭水化物/低脂質の食事であっても生活習慣病が増加するとの報告はないものの、このような血中脂質パターンが長期間続くと、冠動脈性心疾患のリスクが高まる。そこで、血中 HDL コレステロール、総コレステロール/HDL コレステロールおよびトリアシルグリセロールの血中濃度を適正に保つために、脂肪比率 20% (エネルギー比) 以上が推奨されている (アメリカ・カナダの食事摂取基準、Food and Nutrition Board, 2005)。一定割合の脂質が必要な理由として次のことも挙げられる。極端な低脂質食により、ビタミン A 等の脂溶性ビタミンの吸収が悪くなる (Jayarajan *et al.*, 1980)。食品中の脂質の量はタンパク質量と相関するため、脂質摂取量が少ない場合、十分なタンパク質摂取が難しくなる可能性もある。また、脂質はエネルギー密度が最も高いので、脂質が少ない場合はエネルギーが不足しがちとなる。

一方、炭水化物が少なく脂質の多い組成の食事は、HDL コレステロールを増加させる。また、食後の遊離脂肪酸 (Bickerton *et al.*, 2007) やトリアシルグリセロール (Cohen *et al.*, 1988) が増加する。さらに、このような組成の食事では、穀類に含まれるミネラルが不足し、タンパク質摂取量が多くなり、総死亡率や 2 型糖尿病罹患の増加が懸念されている (Pedersen *et al.*, 2013)。特に肥満の少ない日本人では、脂肪エネルギー比率が高まると、肥満に加えメタボリックシ

ンドローム、糖尿病、冠動脈疾患のリスクが高まることが懸念される。高脂質食摂取は飽和脂肪酸の摂取量を増加し、飽和脂肪酸は LDL コレステロール濃度を上昇させ、冠動脈疾患のリスクを高くする。このような理由から、米国 National Cholesterol Education Program では、ステップ 1 として脂肪エネルギー比率 30%未満、飽和脂肪エネルギー比率 10%未満、コレステロール 300 mg/day 未満、さらにステップ 2 では脂肪エネルギー比率 30%未満、飽和脂肪エネルギー比率 7%未満、コレステロール 200 mg/day 未満を目標としている (Ernst *et al.*, 1988)。

上述のように、食事の PF 比が脂質・コレステロール代謝に直接的に影響し、生活習慣病と密接に関連していることはよく知られていることである。しかし、PF 比を連続的に変化させた時の代謝変化について網羅的に解析した報告は見当たらない。そこで、第 3 章において、食餌の PFC バランス変化がラットの肝臓および脂肪組織における代謝に与える影響をトランスクリプトーム解析によって解明することとした。

(3) 機能面からの即席麺の生理効果の解析

即席麺に限らず、日常我々が摂取する食物には多種多様な調味料や香辛料が含まれている。これらに含まれる物質の中には、口腔内感覚系だけでなく消化管上皮を刺激するものもある。このように香辛料や調味料は、フレーバーを付与するだけでなく、様々な機能を持つものも少なくない。味と栄養素の関わりという点からは、例えば、旨みを呈するアミノ酸であるグルタミン酸はタンパク質の構成成分であり、油脂感やなめらかな食感を与える脂肪は、最も代表的な脂質である。さらに砂糖をはじめとする甘味を有する糖は、炭水化物である。これらの三大栄養素を有する調味料は、食品に好ましさを付与する。薄い濃度の有機酸は酸味があるが嗜好される。有機酸はエネルギー源でもあるが、高濃度になると忌避される。それは、エネルギー源としての認知というより、腐敗

による酸の生成を想起させるからであると考えられている。塩味は、NaCl、KCl等の塩類によってもたらされる。カリウムやナトリウムは体内のミネラルバランスを司る必須栄養素であり、塩味を与える。塩味の場合、低濃度の塩味に対しては嗜好性を示し、高濃度になると忌避される。マウスでは、約 100mM 以下の NaCl に対しては嗜好性を示し、500mM を超えると忌避するようになる (Chandrashekar *et al.*, 2010)。このように、栄養的な特性の有無を味という形で検出・認知していると考えられ、呈味物質が、各々の栄養素としての存在を明示する働きももっている。以上のように、栄養素としての味物質が存在する一方、苦味や渋味を呈するものはほぼすべて非栄養素である。基本五味以外の“味”も口腔内では広義の「味」として体性感覚神経末梢で受容される。

このように考えると香辛料や調味料は、栄養素としてあるいは非栄養素として動物の代謝調節に深く関わる物質群と言える。しかも、我々は食品を各種栄養成分ごとに独立して摂取するのではなく、味物質とともに「食事」として摂取している。にもかかわらず、食事に含まれる多くの味物質が、動物の代謝にどのような影響を与えるのか殆ど解明されていない。そこで、第 4 章では、日常摂取する食品の例として即席麺（「チキンラーメン」）をラットに投与し、食塩と栄養素を同一に調製した対照群と比較することで、代謝変化および代謝産物の変動を解析した。さらに、呈味物質が複合的に中枢神経系を介して脂質代謝を制御している可能性を明らかにするため、視床下部一下垂体、肝臓および白色脂肪組織のトランスクリプトームを DNA マイクロアレイにより解析した。

食品は 3 つの機能、即ち栄養機能、感覚機能（嗜好特性）、生体調節機能をもつ。即席麺も同様に 3 機能を有するが、これまで製品の味・香り等の研究・開発が中心であり、即席麺特有の生体調節機能に関する検討はなされてこなかった。即席麺は、主原料である小麦やパーム油、食塩以外に、調味料成分（グルタミン酸等のアミノ酸と 6-ショウガオール等）を含む。加えて、加熱工程中に

生じるメイラード反応生成物等も無視できない。これら即席麺に含まれる成分全てを対象に生理作用を考究したものは皆無であったが、本章で明らかにした視床下部一下垂体系を介する脂質代謝調節機能は、即席麺の新たな価値として位置づけられる。

以上のように、本研究は、PFC バランス変化に伴う代謝変化の解明のみならず、即席麺の製法および栄養的価値に関して学際的に追究したものである。第2章で提示した油脂含量の低いフライ麺は、消費者の健康維持に具体的に貢献する。第3章ではPFC バランスに注目し、また、第4章の内容は、即席麺およびそれに含まれる味物質の機能性を科学的に証明した製品研究であり、食品科学研究ならびに食品産業の発展の一助となることが期待される。

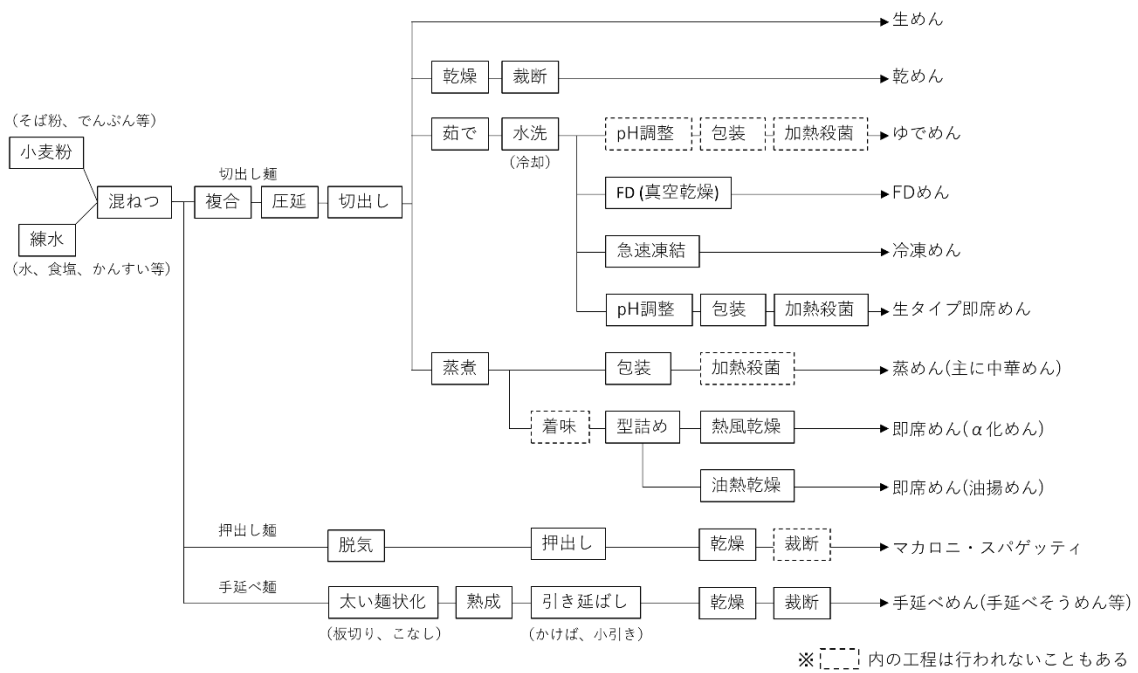


Figure 1: 即席麺製造工程の概略.

(「新・即席めん入門」(日本即席食品工業監修、日本食糧新聞社、1998)を改変)

第 2 章

グルテン構造とフライ麺の油脂含量に関する検討

I. 序

即席麺は、製法の違いによってフライ麺（油揚げめん）とノンフライ麺（ α 化めん）に大別される（p. 14, Figure 1）。フライ麺とノンフライ麺の製法の違いは次の通りである。フライ麺製造では、蒸煮もしくはボイル工程にて生麺を α 化した後、140～150℃の油でフライされ乾燥される。これにより、生地段階で30～40%存在した水分が2～5%になる。一方、ノンフライ麺製造では、熱風乾燥もしくは凍結乾燥により乾燥が行われる（日本即席食品工業、1998）。いずれの場合でも、湯で短時間に可食状態に戻すことが可能である。速く戻すようにするため、また食味食感の向上のための工夫がなされる。食感や色調、風味、原料組成といった麺の性質は製造過程の違いにより製品ごとに異なっている。

これまで即席麺の性質については、小麦粉の品質や製造工程の点から研究されてきた（小田、2003）。特に、フライ温度や原麦の種類、麺帯作製時に添加する材料の種類と量のような幾つかの条件下でのグルテンネットワークの形成について研究が行われてきた（Gulia and Khatkar, 2015）。フライ麺は、高温の油中でフライ処理する過程で α 化と同時に麺内部の水分が蒸発し、多孔質構造となるため、復元性が良い。また、フライ処理によって特有の風味が加わり、ノンフライ麺にない特徴が出る（小田、2003）。フライ麺の風味は消費者に好ましく受け入れられるが、一方でフライ中に麺は油を多く含むために高カロリー食品となる。近年エネルギーの過剰摂取が問題となっている状況下では、嗜好性だけでなく健康を見据えた製品の開発は必須である。嗜好性を保持しつつカロリーの低いフライ麺の開発が求められている。

フライ麺の油脂含量については、これまでいくつか報告がある。例えば、全粒粉を使うと、油脂含量が低下したことが報告されている（Bae *et al.*, 2016）。また、ドウ形成と関係するという報告もあるが、統一見解は得られていない。

即ち、ねかし時間と油脂含量が負の相関があるとの報告がある（Gulia and Khatkar, 2014）一方で、逆に混合時間が増加すると油脂含量が上昇するという報告が同グループからなされており（Gulia and Khatkar, 2013）、不明な点が多い。さらに、グルテン形成とフライ麺の油脂含量との相関性についてはこれまでに報告がなく、詳細に解析する必要がある。

本章では、フライ麺の油脂含量とグルテン形成度が相関することを明確に示した。グルテンネットワークを粗く疎な構造にして油脂含量を低下させる1つの方法として、ロール圧延工程に改変を加え、大量生産スケールにて油脂含量を低減する方法として確立した。

II. 材料および方法

1) 材料

本研究では、市販の準強力小麦粉、タピオカ澱粉、食塩、重合リン酸塩（ポリリン酸ナトリウムを主組成とするもの）、かんすい（炭酸ナトリウムと炭酸カリウムを主組成とするもの）、グルタミン酸ナトリウム、醤油、畜肉エキスを原材料として用いた。

2) 麺の調製

2-1. ミキシング

準強力小麦粉 900g とタピオカ澱粉 100g を混合し、これに 340mL の練水（食塩 15g、かんすい 2.3 g、重合リン酸塩 0.4g を水に溶解し 340mL にメスアップした）を混合し、そばろ状のドウを作製した。

2-2. 麺帯成形

2-2-1. 押し出し麺帯 (Figure 2-1-I) の作製

2-1 で作製したドウを、押し出し機を用いて、230mm×7mm の押し出し幅より約 360g/min の麺帯量を押し出し、厚さ 9mm の麺帯（押し出し麺帯）を作製した。

2-2-2. ロール複合麺帯 (Figure 2-1-II) の作製

同じく 2-1 で作製したドウを、麺帯成形ロールを用いて粗麺帯にした。その後、粗麺帯 2 枚を、複合ロールを用いて複合し、厚さ 9mm の麺帯（ロール複合麺帯）にした。

2-3. 圧延

麺帯は、1～6回圧延し、1mm厚の麺帯にした。

2-3-1. 押し出し麺帯

圧延を以下のように1～6回行い、3種類の麺帯を作製した。

圧延1回（サンプルAの圧延麺帯）：9mmの押し出し麺帯を1回で、9mmから1.0mm厚まで圧延した。

圧延3回（サンプルBの圧延麺帯）：9→2.0→1.5→1.0mm厚まで圧延した。

圧延6回（サンプルCの圧延麺帯）：9→4.0→3.0→2.5→2.0→1.5→1.0mm厚まで圧延した。

2-3-2. ロール複合麺帯

圧延1回（サンプルDの圧延麺帯）：9mmのロール複合麺帯を1回で、9mmから1.0mmまで圧延した。

圧延6回（サンプルEの圧延麺帯）：押し出し麺帯（圧延6回）と同様、9→4.0→3.0→2.5→2.0→1.5→1.0mm厚まで圧延した。

2-4. 切出し

圧延処理で1.0mmの麺厚にした麺帯を角刃（1.5mmP幅）により切断し、「切出し麺線」とした。

2-5. 蒸煮

麺線は、飽和水蒸気（240kg/h、1気圧）を供給した蒸気庫内で2分間蒸煮した。

2-6. 着味

蒸煮処理を行った後、食塩 90g/L、グルタミン酸ナトリウム 13.5g/L、醤油

10ml/L、畜肉エキス 30g/L を含む着味液に麺線を浸漬した。

2-7. フライ乾燥

着味処理を行った後、150℃前後に加温した食用油中に浸漬させ、麺中の水分を蒸発させて麺を乾燥させた。麺の水分は1～3重量%になるようにフライ乾燥させた。

3) 評価

3-1. 麺帯断面および切出し麺線の電子顕微鏡観察

麺帯および麺線をホルマリン液で固定し α -アミラーゼ処理後、電子顕微鏡（日本電子株式会社製 JCM-6000、400倍および60倍）を用いて断面構造の観察を行った。フライ麺の麺線はアセトンを用いて脱脂後、電子顕微鏡（日本電子株式会社製 JSM-6380LA、60倍および400倍）を用いて観察した。

3-2. 切出し麺線の粘弾性

島津製作所製のテクスチャーアナライザ(EZ-Test EZ-S)を使用して200mm/minの速度で麺線を引っ張り、破断までの伸長度(破断点変位)とその引張強度(最大点試験力)を測定した。測定は8回行った。

3-3. 油脂含量

試料の油脂含量はジエチルエーテルを用いソックスレー抽出法により測定した。

3-4. 断面積・細孔数・空隙率

麺線断面積は、フライ麺の麺線断面の電子顕微鏡の画像処理により求めた。

細孔数および細孔面積の合計は、 $100 \mu \text{m}^2$ 以上の細孔を対象として算出した。

また、空隙率は細孔面積の合計および麺線断面積から求めた。

3-5. フライ麺断面の油脂分布

フライ麺線をステンレス刃で切断し、FT-IR イメージングシステム (Perkin Elmer 製 Spotlight400-Spectrum400) を使用して、分解能 16cm^{-1} 、積算回数 2 回の条件で、断面の油脂分布状態を測定した。

3-6. 麺線の α 化 (糊化) 度

麺線をエタノールおよびアセトンを用いて脱脂・脱水処理後、貝沼ら (1981) の方法により α 化度を測定した。

Ⅲ. 結果

1) 麺帯作製方法の違いがグルテンネットワーク形成状態の違いに及ぼす影響

押し出し機を用いた麺帯は、グルテンネットワークの形成が疎な状態の構造であった (Figure 2-2-I)。一方、ロール複合により作成した麺帯は、グルテンのつながりが密となっており、細かいネットワークが観察された (Figure 2-2-II)。

2) 製法の異なるフライ麺の性状

切出し麺線を蒸煮、着味、フライ処理した。A~E のフライ麺について麺線の断面積、細孔数、細孔面積、空隙率および製品の油脂含量を測定した (Table 2-1 および Figure 2-3-II)。断面積および細孔合計面積は $A < D < B < C < E$ の順であり、A が最小、E (通常製法) が最大となった。細孔数もほぼ同様に $A < D < (B, C) < E$ の順で、A が最小、E が最大となった。押し出し麺帯を1回のみ圧延した場合、グルテンネットワークが粗く疎になり、その結果、フライ脱水工程によって水分が放出した後にできる空隙の数、面積が小さくなることを上記のことは示している。空隙率は $A < D < B < C < E$ の順であり、A が最小であった。フライ中に麺に取り込まれる油脂含量は $A < D < (B, C) < E$ の順であり、A が最低となっていた。

フライ麺における油脂の分布を FT-IR を用いて測定したところ、フライ麺線断面写真による空隙の数と面積に対応して、E では麺全体に油が分布していた (Figure 2-4)。最も油脂含量の少ない A では油脂の分布はまばらになっており、分布状態で比べてみることもできる吸収状態の違いにもとづき、麺線内部の油脂が少なくなっている。A と E について、蒸煮後、フライ前の麺線の α 化度を

測定したが有意な差は認められなかった (A: 63.7 ± 0.67 %、E: 64.3 ± 1.30 %)。

3) グルテン形成状態の確認

Figure 2-2 で作成した 2 種類の麺帯を圧延機で 1mm の麺帯厚にまで圧延した。その後、切出し機にかけ麺帯から切出し麺線を作成した。切出し麺線の断面の電子顕微鏡写真を Figure 2-3-I に示す。圧延回数を多くすると、グルテンネットワークは細密になったことから、ロール圧延はグルテンネットワーク形成を促進することが示された。

グルテン形成を評価するために、切出し麺線の物性を測定した (Figure 2-5)。麺線の切断までの伸びは、E の切出し麺線では約 80mm であるのに対し、A の切出し麺線では約 25mm と大きく異なっていた (Figure 2-5-I)。圧延回数を多くすることでより伸びのある麺となったことが示された。また、破断時の引っ張り強度は、E では約 0.12N、A では約 0.08N であった (Figure 2-5-II)。E の切出し麺線の方が破断時に大きな力を必要としたことから、E ではドウが強靱に形成されていたことが示された。

油脂含量は、グルテン形成の弱い A の方が E よりも低かったことから、グルテンネットワークを作らせないことにより油脂含量を低くすることができると結論づけられた。

IV. 考察

ドウの性質や麺の品質は麺帯成形およびロール圧延工程の影響を受ける。麺帯のロール複合およびロール圧延は、グルテンネットワークの形成を促進することが、電子顕微鏡による断面観察からも示された。ロール複合と圧延回数を増やして圧延した、細密なグルテンネットワーク構造を持つ麺 (E) は、フライにより麺線が膨化し、麺線断面積および空隙率が大きくなり、それに伴って油脂含量が高くなっている様子が見られた。一方、押し出し麺帯成形および少ない回数の圧延の組み合わせにより、粗く疎なグルテンネットワーク構造を持つ低油脂麺 (A) は、麺線の膨化が抑制され、麺線断面積および空隙率が小さくなり、油脂含量が低くなっている様子が見られた (Figure 2-3, Figure 2-4)。また、フライ前の麺では、グルテンネットワークの中に糊化した澱粉粒が分散している。糊化澱粉粒に含まれる水分は、フライ時の高温加熱によって蒸発し、それによって生じた空隙の一部が油と置換される。低油脂麺では、麺線断面積および空隙率が小さいことから置換される油の量が少なくなり、麺の油脂含量が低くなったと考えられた。さらに、麺の膨化程度 (空隙率) が小さく、締まった食感になる傾向にあった。

麺の油脂含量はデンプンの α 化度に影響される (Gulia and Khatkar, 2014)。低油脂麺と他の麺とで α 化度に差がなかったことから、油脂含量が低いことに対し、 α 化は関与しないことが示された。即ち、油脂含量が低いのは、グルテンネットワークが弱いことに起因していると考えられた。一般的な麺の製法では、ドウをよく混合してグルテンネットワークを十分に形成させる。伸びのあるドウは麺づくりに最適である。グルテンネットワークが十分に形成されると、特徴的なコシのある食感が麺にもたらされる。一方、低油脂麺はグルテンネットワークが疎ではあるが、即席麺として適切なバランスで湯戻り感と食感を表

現することができた。

日本における小麦粉製品の消費は、第一位の麺が 1,409 千トン、パンが 1,238 千トン（平成 28 年度 農林水産省 麦の参考統計表より）である。すなわち、日本における小麦粉は最も麺に多く加工されている。麺は、製造形態（生麺、乾麺）、加熱方法（茹で、蒸し、油揚げ、熱風乾燥）、成形形態の違い（切出し、押し出し、延ばし）の違い等によって分類される。即席麺は湯で戻すだけで食べることが出来る新しいジャンルの「麺製品」であり、なめらかでかつ適度な歯ごたえをもち、他の麺類と同様日本の食生活に根付いている。本章では、新しい低油脂麺の製法、即ち押し出し麺帯成形と急激な圧延を組み合わせることで、グルテン形成を調節し、従来の即席フライ麺がもつ油で揚げることによる風味を失わず、即席麺の食感を保持した油脂含量の低い麺を創出した。

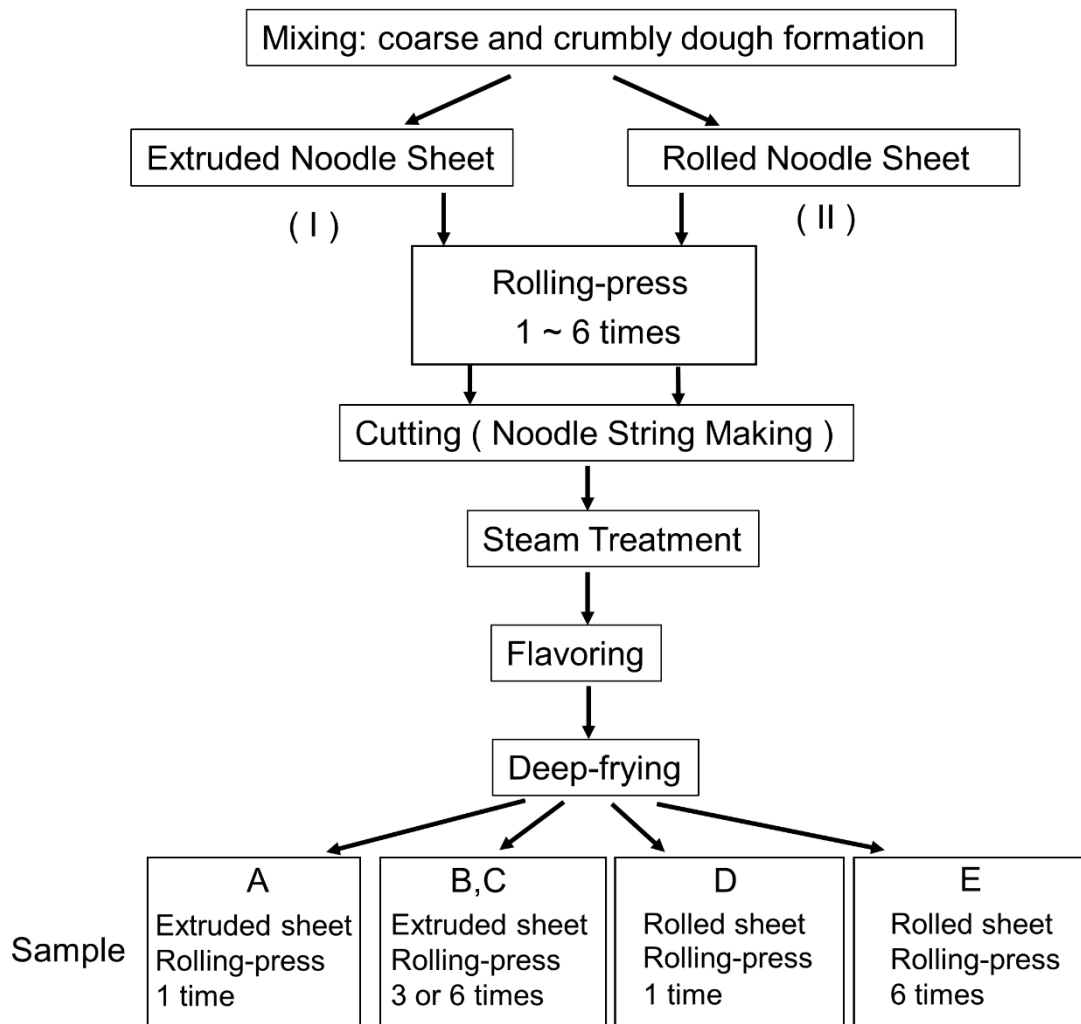


Figure 2-1: Schematic representation of sample preparation.

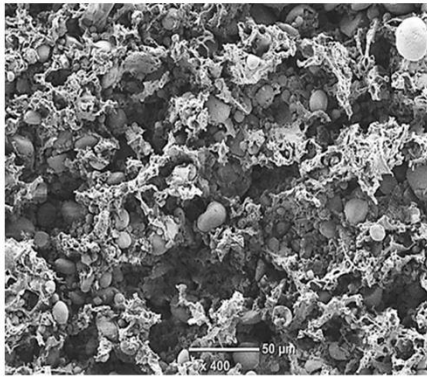
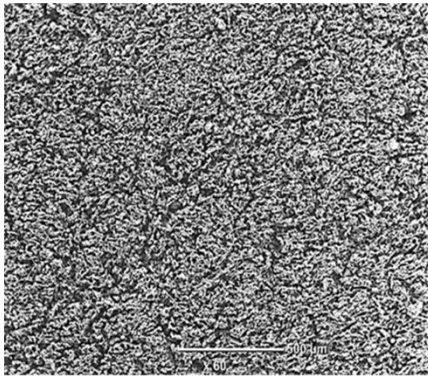
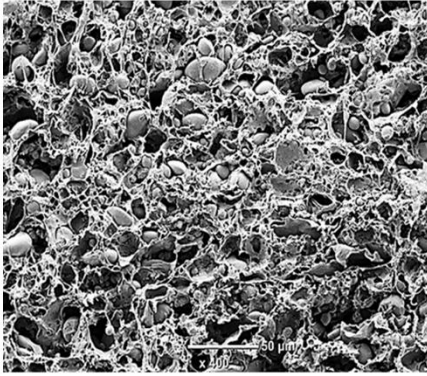
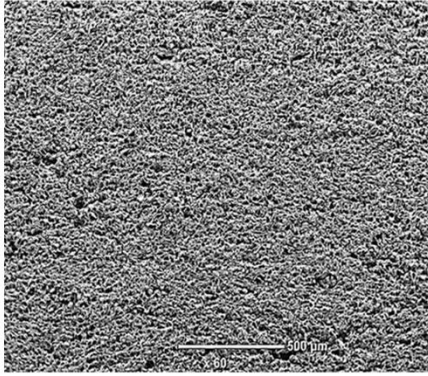
		Cross section	
(I)	Extruded Noodle Sheet	× 400 	× 60 
(II)	Rolled Noodle Sheet	× 400 	× 60 

Figure 2-2: Scanning electron microscope of cross-section of noodle sheets produced by extruder (I) and roller (II).

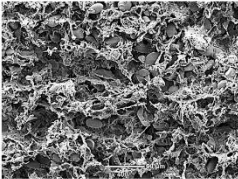
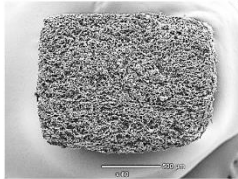
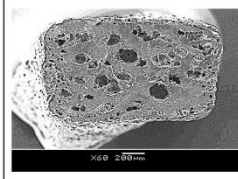
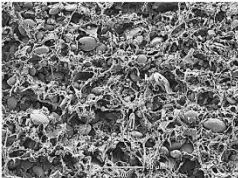
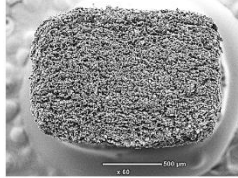
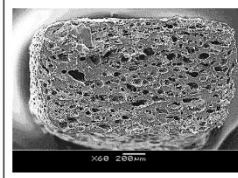
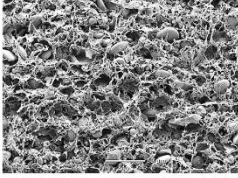
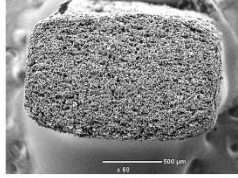
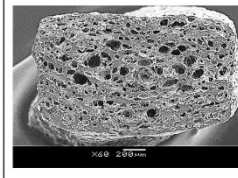
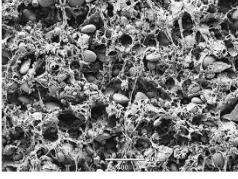
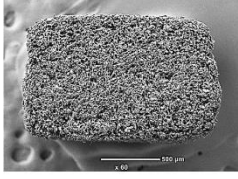
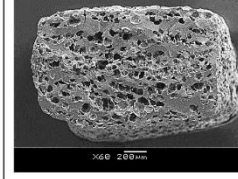
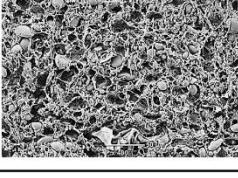
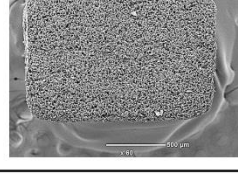
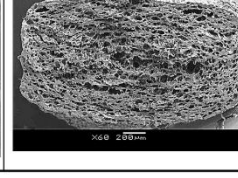
	Noodle sheet Making method	Rolling -press count	(I) Raw cut noodle strings (After rolling-press)		(II) End-product (After deep-frying)
A	Extruder	1	x400 	x60 	x60 
B	Extruder	3	x400 	x60 	x60 
C	Extruder	6	x400 	x60 	x60 
D	Roller	1	x400 	x60 	x60 
E	Roller	6	x400 	x60 	x60 

Figure 2-3: Scanning electron microscope of cross-section of raw cut noodle strings (I) and end-products (II).

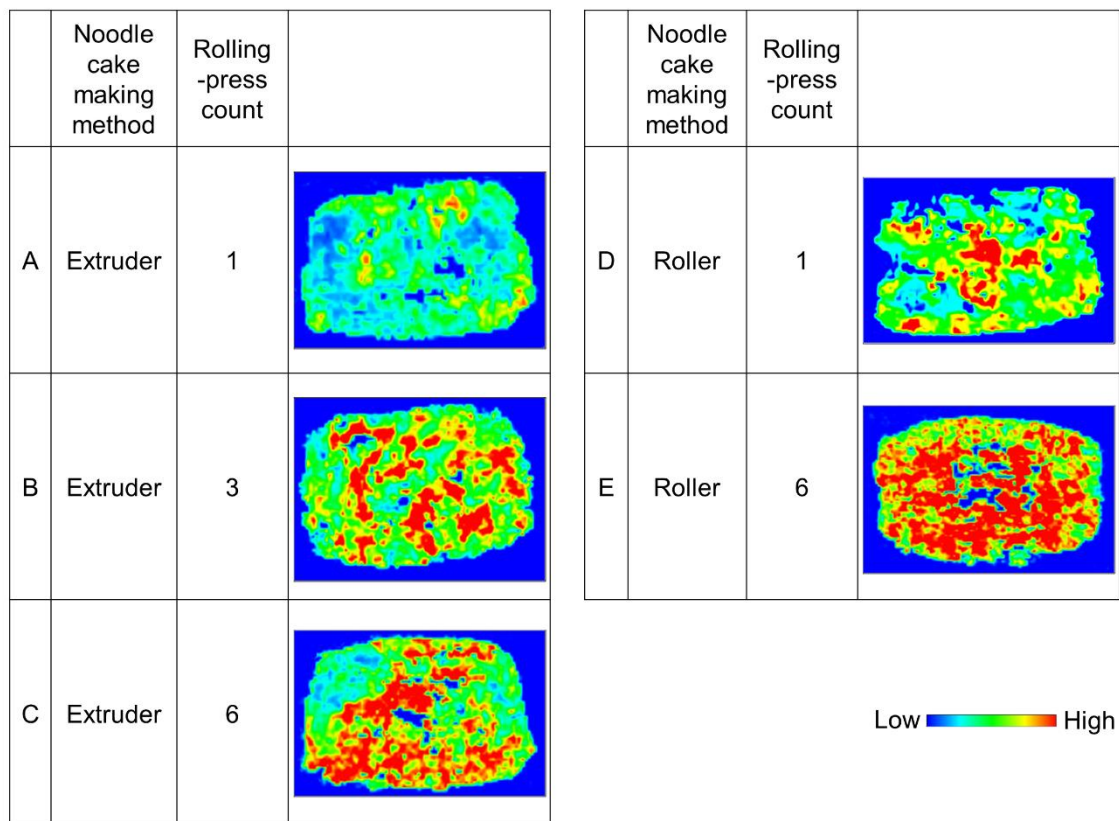
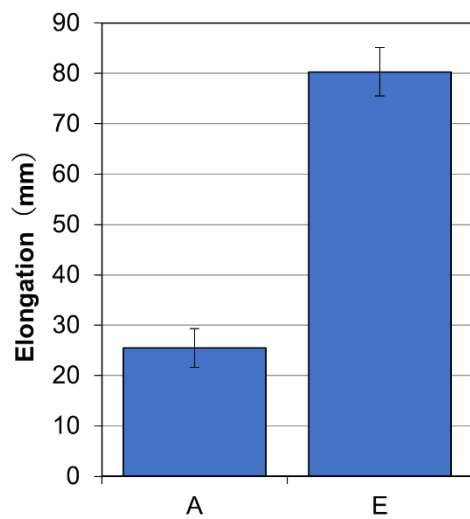


Figure 2-4: FT-IR imaging of fried noodles. Oil distribution of fried noodles are shown (Samples A-E correspond to Figure 2-1).

(I)



(II)

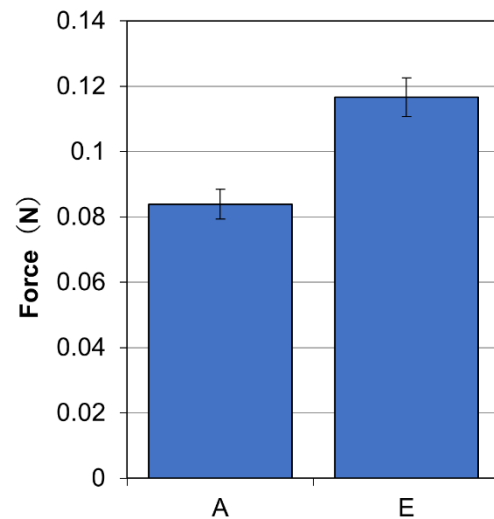


Figure 2-5: Viscoelasticity of raw cut noodle strings (I; elongation at the breaking points, II; tensile strengths at the breaking points) (Samples A and E correspond to Figure 2-1). The data were obtained from each 8 trials (means \pm SD).

Table 2-1: Characterization of fried-noodles made by different procedures.

	Sheet making method	Rolling-press count	Oil content (%)	Cross-sectional area (μm^2) $\times 10^6$	Total void area (μm^2) $\times 10^5$	Void number	Void ratio (%)
A	Extruder	1	11.4	1.49	1.62	153	10.9
B	Extruder	3	14.6	1.74	2.80	354	16.1
C	Extruder	6	14.5	1.79	3.29	352	18.4
D	Roller	1	13.0	1.59	2.31	276	14.6
E	Roller	6	17.2	2.18	6.08	636	27.9

第 3 章

タンパク質・脂質・糖質のバランス変化による
肝臓および脂肪組織の代謝変化の解析

I. 序

前章において油脂含量の低いフライ麺の製造に成功した。しかしフライ麺では、油脂含量をゼロにすることは不可能である。食事中的油脂が生体に与える影響について考察することが、即席麺の普及にも必要であると考え、本章では、食餌の PFC バランス変化が肝臓および脂肪組織における代謝に与える影響についてラットを用いて解析した。油脂含量だけでなく油脂を構成する脂肪酸組成も視野に入れて、炭水化物と脂質の組成比を変えた時の体内変動をトランスクリプトーム解析により明らかにした。

通常の成長期の動物では、タンパク質の比率を 15%以上に維持することが重要である (Even *et al.*, 2003; Itoh *et al.*, 2002; Minana-Solis MeC and Escobar, 2008)。実験用のげっ歯類では、タンパク質が 20% (エネルギー比率) の場合、C:F が 50:30 から 70:10 の範囲の食餌が与えられている (Shahkhalili *et al.*, 2011)。炭水化物と脂質のバランス変化が代謝変動パラメータへどのような影響を及ぼすかについては、植物性油脂 (大豆油やコーン油) か動物性油脂 (牛脂やラード等) かによっても異なる。ラードで調製された高脂肪食 (C:F:P=30:40:20) は、大豆油で調製された高脂肪食よりも、インスリン抵抗性や脂肪肝に悪影響を及ぼすことが示されている (Wang *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2013)。このような違いは、基本的に食餌性脂質の脂肪酸組成の差に起因すると考えられている (Aguila *et al.*, 2003; Crescenzo *et al.*, 2015; Enns *et al.*, 2014; Hanke *et al.*, 2013; Pimentel *et al.*, 2012; Portillo *et al.*, 2001)。特に、多価不飽和脂肪酸が食餌性脂質の生理活性に主たる寄与をしていると考えられている。大豆油は 15%の飽和脂肪酸、55%の多価不飽和脂肪酸を含有する。一方、ラードは 40%の飽和脂肪酸と 10%の多価不飽和脂肪酸を含有する。また、脂肪酸鎖長の違いも脂質代謝に影響を及ぼす。例えば、大豆油とココナッツ油 (1 : 1)

で構成した高脂肪食は、主にココナッツ油で構成した高脂肪食よりも肥満を引き起こしやすいことが報告されている (Deol *et al.*, 2015)。これは、ココナッツ油に含まれる中鎖脂肪酸が、代謝されやすく蓄積されにくいことに起因すると考えられる。

天然の植物油を含む食餌を用いたり、食餌を制限したりする等の穏和な条件下で、炭水化物と脂質のバランスを徐々に変化させたとき、そのトランスクリプトームにどのような効果があるかに関しては、これまでほとんど報告されていない。そこで本章では、大豆油に富む食餌を用いエネルギー的に等価な試験を行い、肝臓および脂肪組織のトランスクリプトーム解析を行った。

II. 材料および方法

1) 動物実験

実験は、高崎健康福祉大学動物実験委員会から承認を得て実施した。3週齢のWistar系雄性ラット（Charles River Laboratories Japan）を、温度と湿度がコントロールされた部屋で12時間の昼夜サイクル（昼06:30-18:30、夜18:30-06:30）で飼育した。ラットを環境に慣らすため、1週間固形飼料（MF, オリエンタル酵母）で飼育した。平均体重が均等になるように3群（低脂肪食投与群（L群）、中脂肪食投与群（M群）および高脂肪食投与群（H群））に分け（各n=5）、低脂肪食（エネルギー換算でC:F=65:15）、中脂肪食（60:20）あるいは高脂肪食（35:45）の3種類の食餌を与えた。食餌組成をTable 3-1に示す。低脂肪食は、AIN-93Gを基に脂質割合がエネルギー比15%となるように調製した（Lien *et al.*, 2001）。この時の脂質は、ラード11%、大豆油4%（エネルギー比）とした。中脂肪食および高脂肪食は、ラード含量を固定して大豆油の割合を増加させ、ラードと大豆油を合わせた脂質含量が、それぞれ20%、45%（エネルギー比）となるようにした。タンパク質の割合は3種類の食餌ともにエネルギー比20%で固定し、脂質割合の増加に伴って炭水化物の割合を減らした。食餌はResearch Dietsより購入した。最初の1週間は自由摂食とし、その後、低脂肪食群は自由摂食、その他の群は低脂肪食群と等エネルギーになるように食餌を与えて、9週間飼育した。

解剖の17時間前に食餌を取り除いた。所定時刻に解剖し、血液・肝臓・白色脂肪組織・褐色脂肪組織を摘出した。M群とH群に属する1匹ずつ（個体番号M_7とH_11）の食事摂取量が少なかったため、この2匹はすべての解析から除外した（各n=4~5）。血清と血漿は標準的な方法で全血から採取した。肝臓は、小片をRNAlater（Qiagen）に浸漬した。肝臓の残り・白色脂肪組織（white

adipose tissue, WAT)・褐色脂肪組織 (brown adipose tissue, BAT) は、液体窒素で急速凍結した。全てのサンプルは、 -80°C あるいは -150°C に保存した。

2) 血液生化学パラメータの測定

血液生化学パラメータは、全て長浜ライフサイエンスで測定した。血漿を用いてグルコース・ピルビン酸・総脂質・リン脂質・総ケトン体を測定した。その他のパラメータは、血清を用いて測定した。血清インスリン濃度は、ラットインスリン ELISA キット (森永生化学研究所、神奈川) を用いて測定した。

3) 肝臓脂質の測定

肝臓脂質は、既法にしたがって抽出した。即ち、100 mg の凍結肝臓組織片を、クロロホルム：メタノール (2:1) 溶液 2mL 中で、マルチビーズショッカー (安井機械) を用いてホモジナイズした。ホモジナイズしたサンプルをろ過し、クロロホルム：メタノール溶液 4 mL に調製した後、水 0.8 mL で洗浄した。クロロホルム：メタノール：水 (2:1:0.75) 溶液 3.75mL でさらに洗浄し、クロロホルム層をエバポレーターで乾固した。乾固させた脂質を、イソプロパノール 1mL に溶解した。

肝臓中トリアシルグリセロール、総コレステロールおよび総胆汁酸濃度は、それぞれ Cholestest TG、Cholestest CHO (積水メディカル)、total bile acids assay kit (Diazyme Laboratories) を用いて測定した。

4) DNA マイクロアレイ実験

保存しておいた肝臓、WAT および BAT から TRIzol reagent (Invitrogen) を用いて全 RNA を抽出し、RNeasy mini kits (Qiagen) で精製した。精製した全 RNA (100 または 200ng) からアンチセンス RNA を合成し、GeneChip 3' IVT

Express Kit (Affymetrix) を用いてビオチン化 cRNA を調製した。次に、cRNA を断片化し、GeneChip Rat Genome 230 2.0 Array (Affymetrix) に 45°C で 16 時間ハイブリダイズした。アレイは、GeneChip Fluidics Station 450 (Affymetrix) を用いて、洗浄およびフィコエリスリン染色した。Affymetrix GeneChip Scanner 3000 7G で蛍光シグナルをスキャンし、Affymetrix GeneChip Command Console Software で CEL ファイルを作成した。

5) DNA マイクロアレイ解析

肝臓、WAT および BAT から得た CEL ファイルを、統計ソフト R (2.7.1) (<http://www.r-project>) と Bioconductor (2.2) (<http://www.bioconductor.org/>) (Gentleman *et al.*, 2004) を用いて、それぞれ quantified using robust multi-array average (RMA)、factor analysis for robust microarray summarization (quantile normalization, qFARMS)、GCRMA で正規化した (Hochreiter *et al.*, 2006; Irizarry *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2004)。階層的クラスタリングを R の pvclust 機能で実行し (Suzuki and Shimodaira, 2006)、rank products (RP) 法を用いて有意に発現した遺伝子プローブセットを同定した (Breitling *et al.*, 2004)。それぞれの群間 (L-M, M-H, L-H) で false discovery rate (FDR) < 0.05 のプローブセットを、有意に発現変動したとみなした。

FDR<0.05 で抽出された発現上昇/低下遺伝子を、the Functional Annotation Tool of the Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery (DAVID) (Dennis *et al.*, 2003; Huang da *et al.*, 2009) と Quick GO (<http://www.ebi.ac.uk/QuickGO/>) (Hosack *et al.*, 2003) を用いて、遺伝子オントロジー (gene ontology, GO) によって機能的に分類した。肝臓では、フィッシャーの正確検定による p 値が 0.01 未満の場合に、有意に濃縮され

た GO タームとして抽出した。WAT と BAT の場合は、Benjamini-Hochberg の p 値が 0.05 未満の場合、有意に濃縮された GO タームとして抽出した。

肝臓と脂肪組織のトランスクリプトームにおける推定上流因子を、Ingenuity Pathway Analysis (IPA, Qiagen, www.qiagen.com/ingenuity) を用いて同定した。Activation z-scores の絶対値 2.5 以上を、有意に活性化または抑制された因子とみなして抽出した。

6) 統計解析

結果は平均±標準偏差 (SD) で示した。One-way ANOVA Tukey-Kramer 検定を多重比較に用い、 $p < 0.05$ の場合に有意差があると判定した。1 元配置分散分析 (One-way ANOVA) を、3 群間の比較に用い、その後に Tukey-Kramer 検定で群間のペアワイズ比較を行った。

Ⅲ. 結果

1) 食餌中の炭水化物と脂質のバランス変化によって影響を受ける肝臓遺伝子の特徴づけ

ラットに、炭水化物と脂質の割合が異なる 3 種の食餌 L, M, H (Table 3-1) を、総エネルギー量が一定となるように与えた。9 週の飼育期間中、体重に群間差はなかった (Figure 3-1)。さらに、肝臓と白色脂肪組織の重量にも群間差はなかった (Figure 3-1, inset)。血液生化学的解析を行ったところ、いくつかのマーカーで群間差が見られた (Table 3-2)。H 群はアラニンアミノトランスフェラーゼ濃度が高く、トリアシルグリセロール・リン脂質・HDL コレステロール濃度が低かった。M 群はリン脂質・総コレステロール・HDL コレステロール濃度が低かった。加えて、肝臓の生化学的解析を行ったところ、H 群でトリアシルグリセロール・総コレステロール・総胆汁酸濃度が上昇した。

H 群肝臓のトランスクリプトームは、クラスタシステム樹において L 群と M 群からは独立した (Figure 3-2)。この全体的な違いを個々の遺伝子レベルで解明するため、各群の比較で有意に発現変動した遺伝子 (differentially expressed genes, DEGs) の重なりを解析した (Figure 3-3a)。これらの DEGs を、群名と構成遺伝子数で呼ぶこととする。例えば、LM43 + 83 は、MH131 + 106 や LH206 + 230 と比べて最も小さなグループを形成し、その約半数 (15 + 5 および 40 + 1) を、LH206 + 230 と共有している。また、MH131 + 106 の約 2/3 が LH206 + 230 と共有している。このことは、L から H へのトランスクリプトームの変化は、L から M より、M から H への変化に近いことを示している。

次に、GO 濃縮解析 (Dennis *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2009) を用いて L-H で特異的に変動した DEGs (LH186 + 189, Fig. 3-3a, 網掛け) の機能を

解析した。その結果、54 遺伝子が 9 個の最下層 GO タームに帰属した (Table 3-3)。これらの GO タームのうち、4 つは脂質代謝に関連していた (GO0019216, 0006633, 0008203, 0033189)。濃縮された遺伝子には 8 個の代謝酵素遺伝子が含まれていた。 *Fads1* (fatty acid desaturase 1), *Msmo1* (methylsterol monooxygenase 1), *Cyp7b1* (cytochrome P450), *Idi1* (isopentenyl-diphosphate delta isomerase 1), *Sqle* (squalene epoxidase) は H 群で発現が上昇し、 *Cyp4a1* (cytochrome P450), *Elovl5* (ELOVL fatty acid elongase 5), *Scd1* (stearoyl-Coenzyme A desaturase 1) は低下した (Table3-4 網掛け)。このことは、多価不飽和脂肪酸合成が亢進され、またコレステロール・胆汁酸合成も亢進されたことを示唆する。加えて、腸管および肝臓のトリアシルグリセロール輸送の主要因子である *Apoa4* (apolipoprotein A-IV) が、H 群で発現低下した。Regulation of lipid metabolic process (GO:0019216) に含まれる遺伝子は、 *Prkaa2, b1* (protein kinase, AMP-activated, alpha 2, beta 1) , *Srebf1* (sterol regulatory element binding transcription factor 1), *Il1a* (interleukin 1 alpha), glucocorticoid receptor といった代謝制御にかかわる遺伝子であった (Table 3-4)。これらのうち、 *Srebf1* (sterol regulatory element binding transcription factor 1) だけが H 群で発現上昇し、他は発現低下した。さらにサーカディアンリズム (GO0007623) に属する遺伝子が 6 つあった。昼遺伝子である *Arntl/Clock* (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like), *Npas2/Clock* (neuronal PAS domain protein 2) paralog, *Egfr* (epidermal growth factor receptor) が H 群で発現低下し、夜遺伝子である *Prf1* (perforin 1), *Per2, 3* (period circadian clock) が発現上昇した。H 群ではこれらの遺伝子発現の位相がずれていたことを意味しており、食餌脂質の量の違いがサーカディアンリズムに関する遺伝子発現に影響を及ぼすことが明らかとなった。加えて、17 遺伝子が RNA ポリメラーゼ II 依存的な転写に関与す

ると同定されたが(GO0045944)、これらのうち、*Ppargc1b* (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 beta) だけが H 群で発現上昇し、他は発現低下した。

LH186 + 189 遺伝子が脂質代謝に関連した GO タームに有意に濃縮されたのに対して、LM43 + 83 遺伝子は数が少なく、このような解析が難しかった。そこでこれらの遺伝子を M-H または L-H の DEGs の制御に基づいて分類した (Figure 3-3b)。14 + 26 個のプローブセット (Figure 3-3b 網掛け) が、L-M M-H とで正反対の制御を受けていた (Table 3-5)。これらのプローブセットは、11 個の代謝酵素遺伝子を含んでいた (Table 3-5, 網掛け)。即ち糖原性アミノ酸の利用に関与する *Sds* (serine dehydratase)、 β 酸化を負に制御する *Acot1* (acyl-CoA thioesterase 1)、脂肪酸合成を正に制御する *Acsm2* (acyl-CoA synthetase medium-chain family member 2)、トリアシルグリセロール合成に関与する *Agpat9* (1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 9)、グリセロールからの糖新生に関与する *Gpd2* (glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2, mitochondrial)、解毒に関与する *Cyp2b1* (cytochrome P450, family 2, subfamily b, polypeptide 1), *Akr7a3* (aldo-keto reductase family 7, member A3 (aflatoxin aldehyde reductase)), *Cyp26b1* (cytochrome P450, family 26, subfamily b, polypeptide 1), *Cyp4a8* (cytochrome P450, family 4, subfamily a, polypeptide 8), *Gstt3* (glutathione S-transferase, theta 3), *Sqrdl* (sulfide quinone reductase-like(yeast)) である。この結果は、M 群がこれらの代謝遺伝子の制御スイッチングをコントロールする栄養的な状況下に置かれていることを示す。

2) 炭水化物と脂質のバランス変化に対する脂肪組織のトランスクリプトーム応答

上記の肝臓トランスクリプトーム応答が、脂肪組織等の他の組織とのエネルギー的な相互作用の変動について示唆していたので、それぞれの実験条件での WAT と BAT のトランスクリプトームを解析した (Table 3-6)。これらの L-H DEGs を肝臓と同様に GO ターム濃縮解析に供したところ、WAT LH235 + 336 DEGs が脂質代謝に関連するタームに顕著に濃縮された (GO:0008610, 0006635, 0045444 に 43 遺伝子) (Table 3-7)。そしてその代謝酵素遺伝子のほとんどが H 群で発現低下した (Table 3-8 灰色網掛け)。この条件では脂質合成と β 酸化の両方が抑制されたのかもしれない。WAT LH235 + 336 DEGs の他の特徴として、グルコース代謝やインスリンシグナリングに関連する GO ターム (それぞれ GO:006006, GO:0032868) 内に制御因子となる遺伝子が高頻度で含まれていた (GO:006006: *Pik3r1* (phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1), *Lep* (leptin), *Il6st* (interleukin 6 signal transducer), *Igf2* (insulin-like growth factor 2), *Atf3* (activating transcription factor 3), *Crem* (cAMP responsive element modulator), *Pdk1* (pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 1), *Ppp1r1a* (protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 1A), 16 遺伝子中 8 遺伝子 (Table 3-8 緑色網掛け)、GO:0032868: *Lyn* (LYN proto-oncogene, Src family tyrosine kinase), *Foxo1* (Forkhead box O1A), *Acvr1c* (activin A receptor, type IC), *Pde3b* (phosphodiesterase 3B, cGMP-inhibited) and *Shc1* (Src homology 2 domain containing transforming protein 1), 15 遺伝子中 5 遺伝子 (Table 3-8 黄色網掛け))。これらの遺伝子のほとんどは、満腹ホルモンであるレプチンをコードする *Lep* (leptin)、IL-6 免疫シグナルトランスデューサーをコードする *Il6st* (interleukin 6 signal transducer)、チロシンキナーゼをコードする *Lyn* (LYN proto-oncogene, Src family tyrosine kinase) を除いて、H 群で発現低下した。骨形成に関連する GO

タームに、15 個の遺伝子が帰属した (GO:0060348 and GO:0001503) (Table 3-8 青網掛け)。

BAT LH212 + 405 DEGs は、WAT と似た制御パターンを示した (Table 3-9)。即ち、脂質代謝に関連する酵素遺伝子の全てが、H 群で発現低下した

(GO:0006631 と 0006695 の 24 遺伝子、Table 3-10, 黄色網掛け)。他の 23 個の酵素遺伝子は、酸化還元のカテゴリーに含まれた (GO:0055114) (Table 3-10, 緑色網掛け)。うち 15 遺伝子は H 群で発現低下した。BAT の DEGs は response to organic substance に分類される遺伝子が 64 も含まれていた (GO:0010033)。これらの遺伝子は、制御因子や転写因子 (SREBF2, glucagon receptor)、トランスポーターをコードする。その他の 12 遺伝子は、アクチン・ミオシン・トロポニン等、筋肉収縮に関与するものであった (GO:0006936)。

3) 肝臓と脂肪組織に共通する上流制御因子の探索

高脂肪食によって肝臓で脂肪酸の不飽和化とコレステロール合成が亢進され (Table 3-3)、脂肪組織で脂肪酸合成が低下した (Table 3-7 および Table 3-9) という GO 解析の結果から、これらの遺伝子制御が、肝臓と脂肪組織に共通する生化学的シグナルによって引き起こされるのかを、Ingenuity Pathway Analysis (IPA) を用いて解析した。Table 3-11 に L-H DEGs のデータを基に活性化または抑制されたと推定された IPA 上流制御因子を挙げた (Z スコアの絶対値 > 2.5)。比較的高い Z スコアが、WAT (3.07) と BAT (2.73) の両方において LY294002 (PI3 キナーゼ阻害剤) で抽出された (Vlahos *et al.*, 1994)。このことは、H 群でインスリンシグナリングが阻害されたことを示唆する。インスリン下流シグナリング (脂肪酸合成に関与する SREBF1 と、コレステロール合成に関与する SREBF2) (佐藤・今川, 2007) が WAT (-3.68 / -3.52) と

BAT (−4.18 / −4.17) の両方で抑制された (Z スコアが負であった) という結果とも合致する。同じく注目すべき点として、インスリンで誘導され SREBF のリプレッサーとして機能する INSIG1, 2 (Yabe *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2002) が、BAT で活性化されると推定された (3.61 / 2.93)。加えて、PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor) alpha の特異的アゴニストであるピリニクス酸が、WAT と BAT に共通の上流制御因子として検出された。Z スコアが負であることから (WAT; −3.07, BAT; −2.99)、ピリニクス酸によって制御されるプロセスが抑制されたことが示唆された。

IV. 考察

体内の炭水化物や脂質がエネルギー産生に利用されるとき、動物の置かれた環境によって利用度が異なる。例えば、脂質は主に休息状態で利用される時の利用率が総エネルギーの約 90%にもなる (Coyle, 1995; Romijn *et al.*, 1993) が、急激な運動時には約 10%にまで低下し、炭水化物の好氣的または嫌氣的な代謝によって代替される。また、飢餓状態では炭水化物が 1 日以内に枯渇してしまうので、その後の数日間は基礎代謝の約 4/5 が脂質によって、約 1/5 がアミノ酸によって維持される (Cahill, 1976)。

炭水化物と脂質の間では代謝変動のカギとなる有機化合物が存在する。即ち、トリアシルグリセロール分解産物かつ糖新生の基質であるグリセロール-3-リン酸、ペントースリン酸回路の水素受容体かつ脂肪酸合成の水素供与体である NADP(H)、TCA サイクルの基質かつ脂肪酸合成の基質であるアセチル CoA 等が存在することから、代謝変動は可変である。従って、食餌に含まれる炭水化物と脂質の割合は、動物のエネルギー恒常性に大きな影響を与えると考えられる。

本章では、等エネルギー条件下で炭水化物と脂質のエネルギー比 (CF 比) を変化させた時の肝臓および脂肪組織におけるトランスクリプトーム応答を解析した。3 種の餌の CF 比を調整する目的でヒトの食事において主要な油脂である大豆油を用いたため、肝臓のトランスクリプトームには大豆油の特性が影響した可能性もある (Hashimoto *et al.*, 2013) が、主要なエネルギー源が炭水化物 (L 群) から脂質 (H 群) に切り替わっていることが重要である。飼育実験において、ラットの体重と相対組織重量に群間差は認められなかったが (Figure 3-1)、H 群の血清アラニンアミノトランスフェラーゼ濃度が L 群および M 群と比べて高かった (Table 3-2)。他の障害マーカーに有意な変動が見られなかった

ことから、H 群の肝障害は重篤ではなかったと考えられた。このことは、炎症や線維化等の肝障害 (Kamei *et al.*, 2015) に関連する GO タームが有意に濃縮されなかったことから支持された。

肝臓において明らかとなった LM43 + 83 DEGs (Figure 3-3) は、脂質恒常性に関与するものである (Table 3-5)。即ち、H 群における *Acsm2* (acyl-CoA synthase medium-chain family member2) および *Agpat9* (1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 9) の上昇から、肝臓でのトリアシルグリセロールの合成が亢進したと考えられた。加えて、本研究が等エネルギー条件下で行われたことから、H 群での *Sds* (serine dehydratase) の低下はアミノ酸が糖新生へ利用されるのを抑制し、*Gpd2* (glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2, mitochondrial) の上昇はトリアシルグリセロール分解によって生成されるグリセロールからの糖新生を促進すると考えられた。これらの遺伝子の発現パターンが二相性であることから、M 条件 (中脂肪食) 付近に代謝制御の分岐点があると推察された。

H 群のラットでは L 群と比較して、血清トリアシルグリセロールおよび HDL コレステロール濃度が低下した。また、肝臓トリアシルグリセロール、コレステロールおよび総胆汁酸濃度が上昇し (Table 3-2)、肝臓におけるコレステロールおよび胆汁酸合成が促進された (Table 3-4)。この肝臓トランスクリプトーム応答から、コレステロール合成および胆汁酸分泌を介してアセチル CoA 消費が促進したことが考えられた (Vidon *et al.*, 2001)。一方、WAT における脂質合成および β 酸化 (Table 3-8) と BAT におけるコレステロール合成が抑制されたこと (Table 3-10) がトランスクリプトーム解析から示唆された。WAT における脂質合成の抑制は、空腹時血清への脂肪酸放出抑制につながる。このように、肝臓では脂質合成促進、一方脂肪組織では脂質合成抑制という対照的な遺伝子発現が明らかとなった (Figure 3-4)。

これら肝臓および脂肪組織のトランスクリプトームの制御に関わる細胞性シグナルを明らかにするために行った IPA 上流制御因子解析から、インスリン-PI3K-SREBF シグナリングと PPAR α シグナリングの両方の低下が脂肪組織で検出されたが、肝臓では検出されなかった (Table 3-11)。このことから、インスリンの同化シグナル (脂肪酸合成) と PPAR α の異化シグナル (脂肪酸酸化) の両方が脂肪組織で抑制されたことが示唆された。H 群のラットは、L 群や M 群のラットとほぼ同程度の成長率 (Figure 3-1) および血清インスリン濃度 (Table 3-2) であったことから、インスリンシグナリングの抑制は外的要因ではなく、脂肪組織内の内的・質的变化によるものと推察される (Poletto *et al.*, 2010; Shankar *et al.*, 2010; Xue *et al.*, 2015)。また、H 群の血清トリアシルグリセロール濃度の低下は、脂肪組織での脂肪酸濃度に影響し、PPAR α シグナリングの抑制につながった可能性が考えられた。

以上をまとめると、本章において、糖新生と脂質代謝に関与する肝臓遺伝子が、L-M と M-H で正反対に制御されることを見いだした。このことは、中脂肪食 (C:F = 60:20) が、エネルギー源として炭水化物から脂質へ遺伝子発現がスイッチするターニングポイントと考えられることを意味する。さらに、L-H の解析から、高脂肪食は肝臓でのコレステロール・胆汁酸合成を亢進し、脂肪組織でのコレステロール・脂肪酸合成を抑制することが見出された。また、上流制御因子解析から、WAT と BAT において、インスリンおよび PPAR α シグナリングが H 群において抑制されたことが示唆された。従って、肝臓および脂肪組織は、内分泌シグナルに応答するだけでなく、遺伝子発現を変動させることによって、炭水化物と脂質のバランス変化にそれぞれ異なった適応を示すことが明らかとなった (Figure 3-4)。

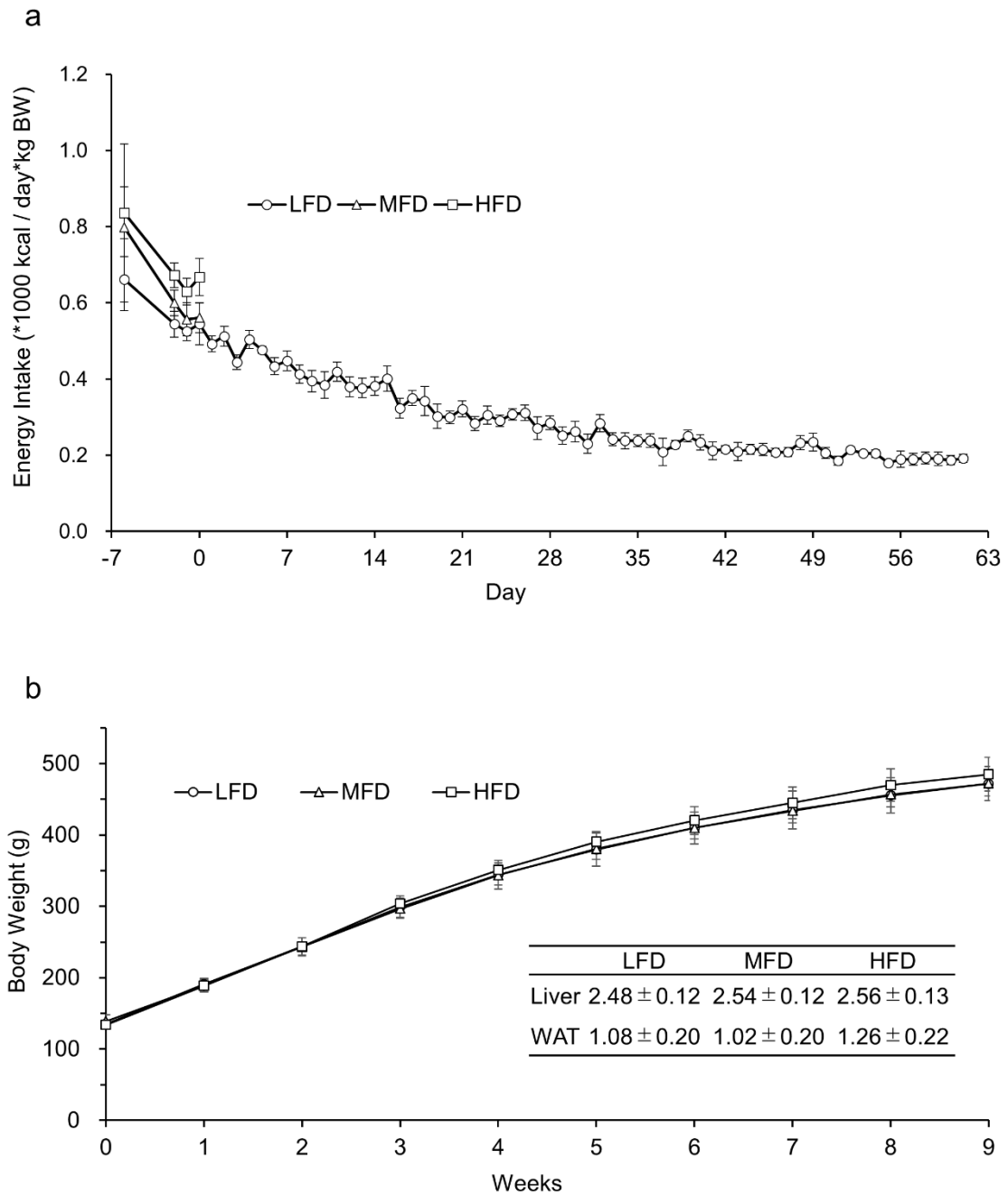


Figure 3-1. Physical parameters of the animals. a, Energy intake during the experimental period. The intakes of the rats in the M- and H-groups were restricted to the average intake of the rats in the L-group. Data for the M- and H-groups after day 0 were omitted. b, Body and tissue weights. The inset represents the relative tissue weights (% to body weight) at the time of sacrifice (week 9). Values are represented as mean \pm SD ($n=4-5$). LFD, low-fat diet; MFD, middle-fat diet; HFD, high-fat diet.

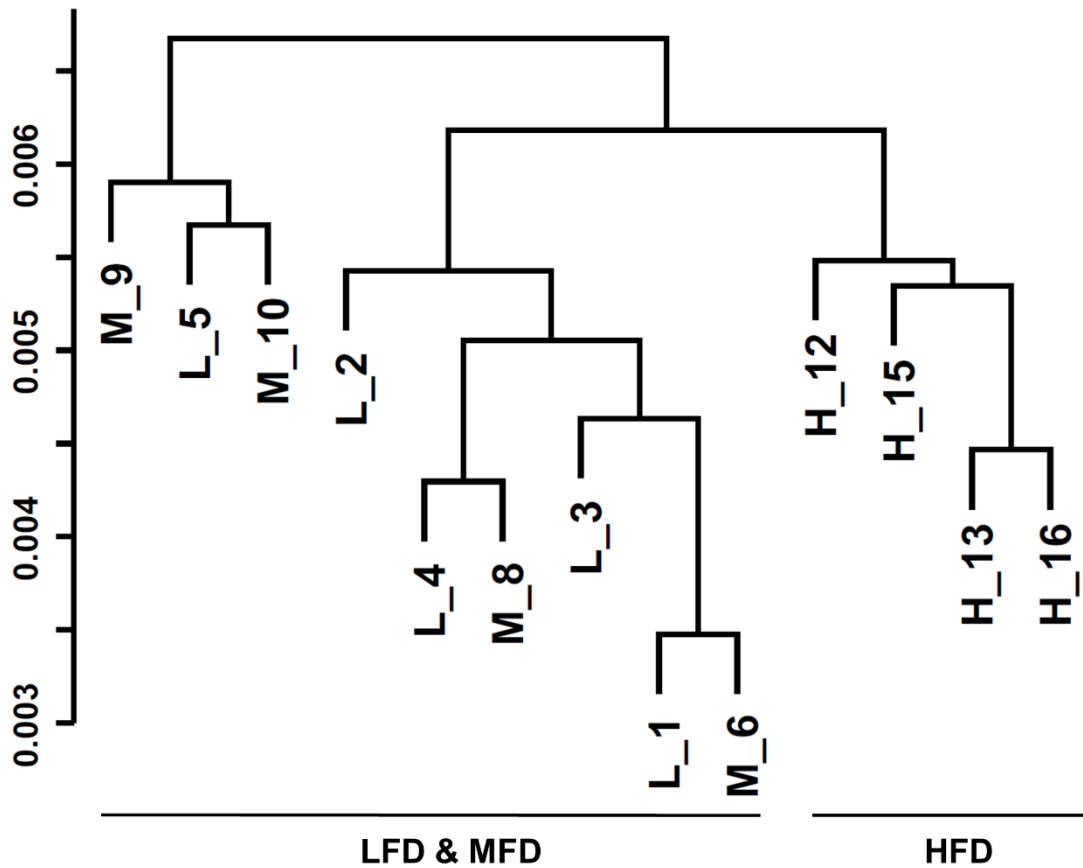


Figure 3-2. Cluster analysis of each liver transcriptome in experimental groups. RMA-normalized expression data were subjected to hierarchical clustering analysis and represented in a dendrogram. Each sample name consists of a letter corresponding to the feeding condition (L, LFD; M, MFD; H, HFD) and a number corresponding to the individual rat. The vertical scale represents the distance between each transcriptome.

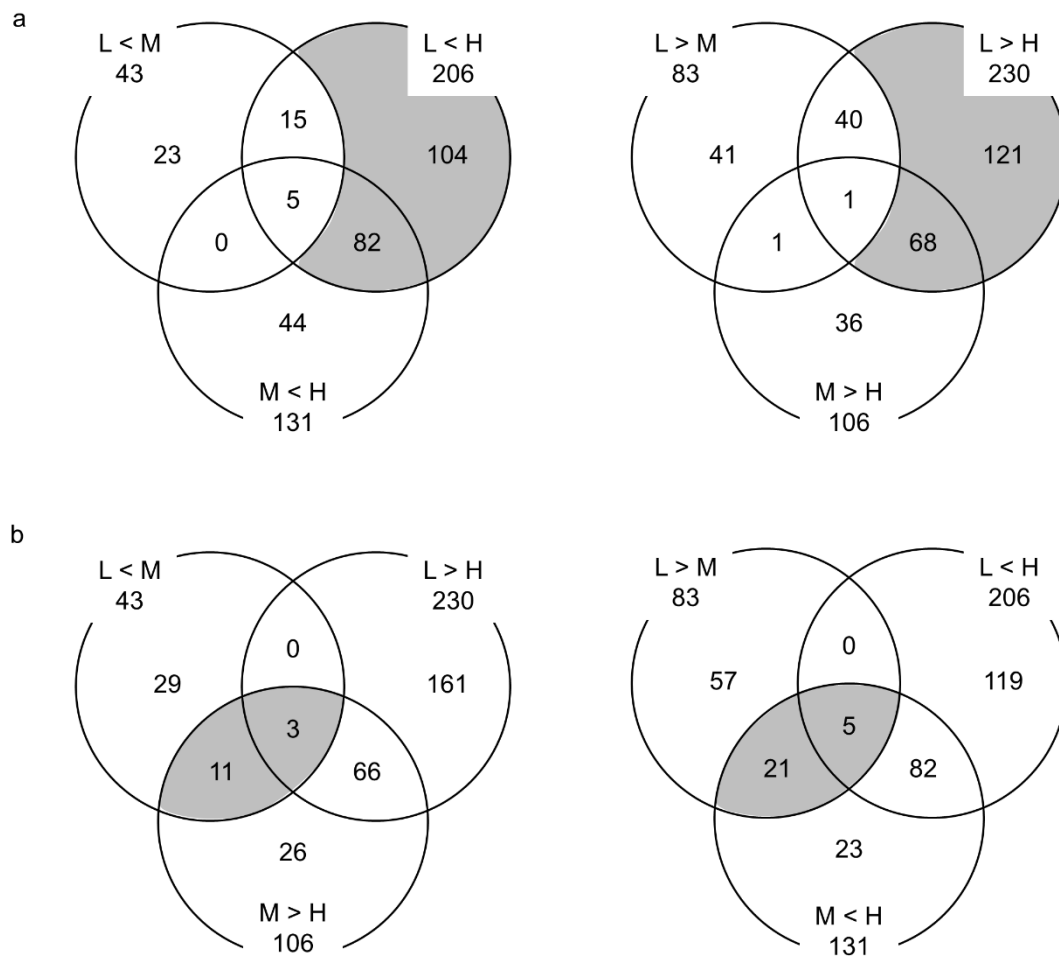


Figure 3-3. Number of liver probe sets that were differentially expressed between experimental groups. a, Coincidence of DEGs among experimental groups. The subsets of DEGs specific to the L vs H change are indicated by shaded areas. b, Oppositely regulated DEGs (shaded areas).

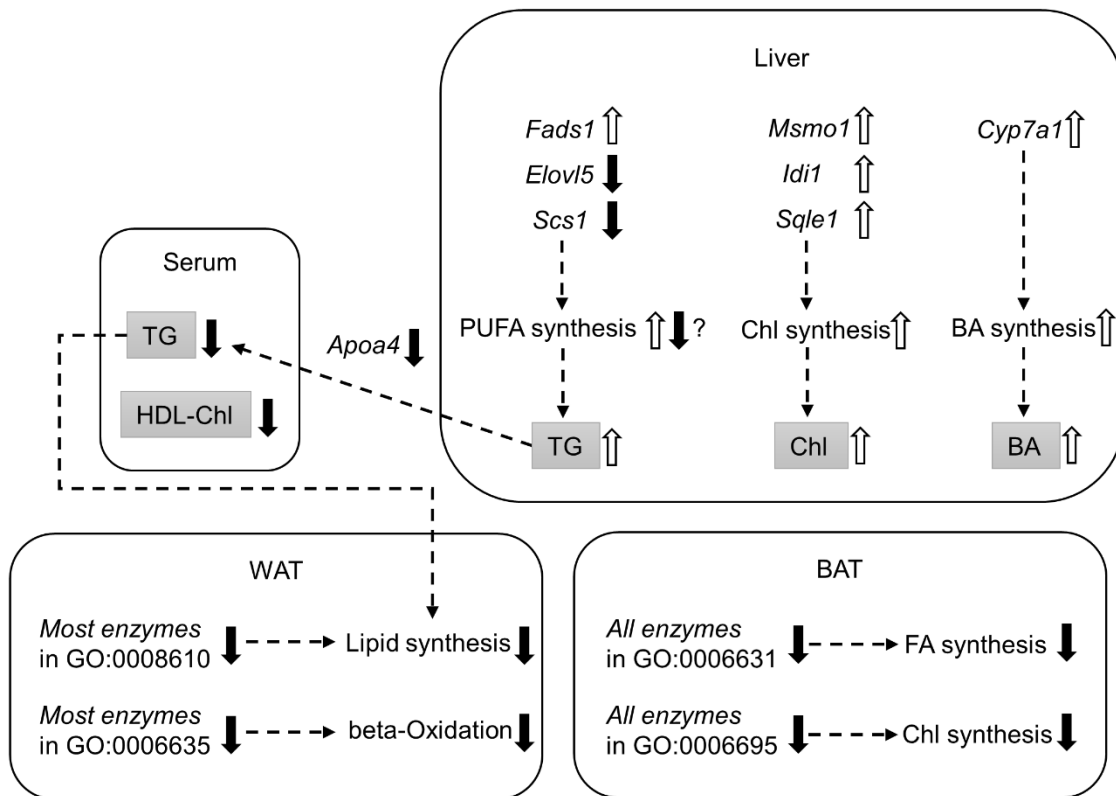


Figure 3-4 Transcriptomic and metabolic changes in H-condition compared to L-condition. Shaded molecules indicate metabolites, and others indicate transcripts specific to L vs H change (Liver LH186+189, WAT LH235+336 and BAT LH212+405). Upward arrows indicate H-up genes (*italic*) or predicted pathways compared to L-condition, and *vice versa*. TG, triacylglycerol; Chl, cholesterol; BA, bile acid; FA, fatty acid; PUFA, polyunsaturated fatty acid.

Table 3-1. Composition of diets.

Macronutrient	Ingredients	Low-fat diet (L)			Middle-fat diet (M)			High-fat diet (H)		
		Weight (g)	Energy (kcal)	Energy (%)	Weight (g)	Energy (kcal)	Energy (%)	Weight (g)	Energy (kcal)	Energy (%)
Protein Amino acid	casein	200	800	20	200	800	20	200	800	20
	L-cystine	3	12		3	12		3	12	
	corn starch	448.2	1793		396	1584		144	576	
Carbohydrate	maltodextrin 10	100	400	64	100	400	59	100	400	34
	sucrose	100	400		100	400		100	400	
	cellulose BW200	50	0	-	50	0	-	50	0	-
Fat	soybean oil	17.8	160	15	41	369	20	153	1377	45
	lard	50	450		50	450		50	450	
	mineral mix S10026	10	0	-	10	0	-	10	0	-
	dicalcium phosphate	13	0	-	13	0	-	13	0	-
	calcium carbonate	5.5	0	-	5.5	0	-	5.5	0	-
	potassium citrate- 1H ₂ O	16.5	0	-	16.5	0	-	16.5	0	-
	vitamin mix V10001	10	40	1	10	40	1	10	40	1
	choline bitartrate	2	0	-	2	0	-	2	0	-
	Total	1026	4055	100	997	4055	100	857	4055	100

Table 3-2. Blood and liver biochemical analysis.

		L-group	M-group	H-group
	Aspartate Aminotransferase (IU / L)	128 ± 16	126 ± 5	154 ± 22
	Alanine Aminotransferase (IU / L)	25 ± 2 a	23 ± 4 a	52 ± 13 b
	Alkaline Phosphatase (IU / L)	232 ± 43	194 ± 52	247 ± 39
	Lactate Dehydrogenase (IU / L)	2136 ± 375	2183 ± 310	1866 ± 228
	Leucine Aminopeptidase (IU / L)	71 ± 4	71 ± 5	79 ± 5
	Choline Esterase (IU / L)	13 ± 2	13 ± 2	14 ± 3
	Total Bilirubin (mg / dL)	0.07 ± 0.02	0.07 ± 0.01	0.07 ± 0.02
	Glucose (mg / dL)	154 ± 17	160 ± 20	160 ± 14
	Pyruvic Acid (mg / dL)	2.37 ± 1.07	1.68 ± 1.50	2.45 ± 1.61
Blood	Total Lipid (mg / dL)	259 ± 45 a	193 ± 31 ab	172 ± 35 b
	Triacylglycerol (mg / dL)	76 ± 19 a	58 ± 21 ab	28 ± 14 b
	Phospholipid (mg / dL)	120 ± 11 a	101 ± 7 b	93 ± 8 b
	Non-esterified Fatty Acid (µEq / L)	435 ± 104	364 ± 121	275 ± 40
	Total Cholesterol (mg / dL)	76 ± 10 a	58 ± 4 b	65 ± 9 ab
	LDL-Cholesterol (mg / dL)	7 ± 1	6 ± 1	5 ± 1
	HDL-Cholesterol (mg / dL)	22 ± 1 a	18 ± 2 b	19 ± 1 b
	Total Ketone Body (µmol / L)	1131 ± 249	923 ± 398	1068 ± 374
	Total Bile Acid (µmol / L)	8 ± 4	5 ± 3	7 ± 5
	Insulin (ng / mL)	0.946 ± 0.547	1.278 ± 0.277	0.843 ± 0.458
	Triacylglycerol (mg / g-tissue)	11.0 ± 2.7 a	14.5 ± 1.3 ab	18.6 ± 3.1 b
Liver	Total Cholesterol (mg / g-tissue)	1.97 ± 0.18 a	2.53 ± 0.22 ab	2.81 ± 0.56 b
	Total Bile Acid (nmol / g-tissue)	13.8 ± 1.7 a	17.4 ± 3.4 a	25.6 ± 2.3 b

Values are represented as mean ± SD.

Shaded column: significant difference detected by Tukey-Kramer comparison ($p < 0.05$).

Table 3-3. Significantly enriched GO terms found in liver LH186+189 genes

GO-ID	Term	p-value	gene count
	biological process		
0007623	circadian rhythm	1.82E-03	7
0007568	aging	5.77E-03	10
0009991	response to extracellular stimulus	5.66E-04	17
0031667	response to nutrient levels	2.20E-03	15
0033189	response to vitamin A	4.30E-02	9
0016525	negative regulation of angiogenesis	9.58E-03	4
0006882	cellular zinc ion homeostasis	9.78E-03	3
0019216	regulation of lipid metabolic process	4.72E-03	9
0016053	organic acid biosynthetic process	3.59E-04	12
0046394	carboxylic acid biosynthetic process	3.59E-04	12
0006633	fatty acid biosynthetic process	4.39E-03	7
0006631	fatty acid metabolic process	1.49E-04	14
0008610	lipid biosynthetic process	9.86E-03	13
0008203	cholesterol metabolic process	7.85E-04	8
0008202	steroid metabolic process	7.11E-04	12
0016125	sterol metabolic process	2.15E-04	9
0051254	positive regulation of RNA metabolic process	7.84E-03	18
0045893	positive regulation of transcription, DNA-dependent	7.11E-03	18
0045944	positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	7.29E-03	16

Shaded column: GO terms at the lowest hierarchy.

Table 3-4. The list of Liver LH186+189 genes that belong to the GO terms located at the lowest level of hierarchy

Gene Symbol	Description	L < H	L > H	A	B	C	D	E	F	G	H	I
Abhd5	abhydrolase domain containing 5		L > H	+								
Cidea	cell death-inducing DFFA-like effector a	L < H		+								
Il1a	interleukin 1 alpha		L > H	+								
Nr3c1	nuclear receptor subfamily 3, Glucocorticoid receptor		L > H	+								
Yy1	YY1 transcription factor		L > H	+								
Prkab1	Protein Kinase, AMP-Activated, Beta 1 Non-Catalytic Subunit		L > H	+	+							
Prkaa2	Protein Kinase, AMP-Activated, Alpha 2 Catalytic Subunit		L > H	+	+	+						
Apoa4	apolipoprotein A-IV		L > H	+		+						
Srebf1	sterol regulatory element binding transcription factor 1	L < H		+		+	+		+	+		
Fads1	fatty acid desaturase 1	L < H			+		+			+		
Msmo1	methylsterol monooxygenase 1	L < H			+							
Cyp4a1	cytochrome P450		L > H		+							
Elovl5	ELOVL fatty acid elongase 5		L > H		+							
Scd1	stearoyl-Coenzyme A desaturase 1		L > H		+							
Cyp7b1	cytochrome P450	L < H				+						
Idi1	isopentenyl-diphosphate delta isomerase 1	L < H				+						
Sqle	squalene epoxidase	L < H				+						
Lepr	leptin receptor		L > H			+						
Pcsk9	proprotein convertase subtilisin/kexin type 9	L < H				+						
Igfbp2	insulin-like growth factor binding protein 2	L < H					+			+		
Serpina7	serpin peptidase inhibitor	L < H					+			+		
Dusp1	dual specificity phosphatase 1		L > H				+					
Arntl/Clock	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like		L > H					+	+			
Npas2/Clock	neuronal PAS domain protein 2		L > H					+	+			
Egfr	epidermal growth factor receptor		L > H					+				
Prf1	perforin 1 (pore forming protein)	L < H						+				
Per2	period circadian clock 2	L < H						+				

Gene Symbol	Description	L < H	L > H	A	B	C	D	E	F	G	H	I
Per3	period circadian clock 3	L < H						+				
Hhex	hematopoietically expressed homeobox		L > H						+		+	
Atxn7	ataxin 7		L > H						+			
Foxa1	forkhead box A1		L > H						+			
Foxa2	forkhead box A2		L > H						+			
Hdac1	histone deacetylase 1		L > H						+			
Inhba	inhibin beta-A		L > H						+			
Myc	myelocytomatosis oncogene		L > H						+			
Onecut1	one cut homeobox 1		L > H						+			
Ppargc1b	peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 beta	L < H							+			
Thrap1	Thyroid Hormone Receptor Associated Protein 1		L > H						+			
Traf6	TNF receptor-associated factor 6		L > H						+			
Tbl1x	transducin (beta)-like 1 X-linked		L > H						+			
Mafb	v-maf avian musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B		L > H						+			
Socs2	suppressor of cytokine signaling 2		L > H						+			
Thbs1	Thrombospondin 1	L < H								+	+	
Ccl5	chemokine (C-C motif) ligand 5	L < H								+		
Dcn	decorin		L > H							+		
Pik3r1	phosphoinositide-3-kinase		L > H							+		
Slc1a2	solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter)	L < H								+		
Zfp354a	zinc finger protein 354A	L < H								+		
Cxcl10	chemokine (C-X-C motif) ligand 10	L < H									+	
Pf4	platelet factor 4	L < H									+	
LOC100362769, Mt1a, Ttr	hypothetical protein LOC100362769 , metallothionein 1a, transthyretin	L < H										+
Mt2A	metallothionein 2A	L < H										+
Slc39a4	solute carrier family 39 (zinc transporter)		L > H									+

Shaded cell entries: metabolic enzyme genes related to lipid.

A: GO:0019216 regulation of lipid metabolic process

- B: GO:0006633 fatty acid biosynthetic process
- C: GO:0008203 cholesterol metabolic process
- D: GO:0033189 response to vitamin A
- E: GO:0007623 circadian rhythm
- F: GO:0045944 positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter
- G: GO:0007568 aging
- H: GO:0016525 negative regulation of angiogenesis
- I: GO:0006882 cellular zinc ion homeostasis

Table 3-5. The list of the reversely regulated liver LM43 + 83 genes

Expression pattern	Probe ID	Gene symbol	Description	
14 probe sets L < M and M > H		1369268_at	Atf3	activating transcription factor 3
	L > H	1370988_at	Cyp2b1	cytochrome P450, family 2, subfamily b, polypeptide 1
		1393510_at	Golsyn	Golgi-localized protein
		1382451_at	Hebp2	heme binding protein 2
		1382284_at	LOC685440, Nek3	similar to NIMA (never in mitosis gene a)-related expressed kinase 5, NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 3
		1397745_at	Mib1	mindbomb homolog 1
		1369202_at	Mx2	myxovirus (influenza virus) resistance 2
	L > H	1389990_at	RGD15637	similar to Gene model 609
		1383956_at	RGD1565709	similar to ovostatin-2
		1397859_x_at	RT1-A3	RT1 class I, locus A3
	L > H	1369864_a_at	Sds	serine dehydratase
		1373740_at	---	---
		1382517_at	---	---
		1392860_at	---	---

Expression pattern	Probe ID	Gene symbol	Description	
26 probe sets L > M and M < H	L < H	1398250_at	Acot1	acyl-CoA thioesterase 1
		1370436_at	Acsm2	acyl-CoA synthetase medium-chain family member 2
	L < H	1374610_at	Agpat9	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 9.
		1368121_at	Akr7a3	aldo-keto reductase family 7, member A3 (aflatoxin aldehyde reductase)
		1383242_a_at	Cebpa	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha
		1389625_at	Chchd4	coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 4
		1384392_at	Cyp26b1	cytochrome P450, family 26, subfamily b, polypeptide 1
		1368607_at	Cyp4a8	cytochrome P450, family 4, subfamily a, polypeptide 8
		1388342_at	Etv3	Ets variant 3
		1387670_at	Gpd2	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2, mitochondrial
	L < H	1371942_at	Gstt3	glutathione S-transferase, theta 3
		1370912_at 1368247_at	Hspa1a, Hspa1b	heat shock 70kD protein 1A, heat shock 70kD protein 1B (mapped)
		1389251_at	Nudt7	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 7
		1397164_at	Pola2	polymerase (DNA directed), alpha 2
		1392854_at	RGD1564560	Similar to RCK
		1373777_at	Rgs16	regulator of G-protein signaling 16
	L < H	1371143_at	Serpina7	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 7
	L < H	1389142_at	Sqrdl	sulfide quinone reductase-like (yeast)
		1393160_at	Tbx3	T-box 3
		1374924_at	Upf3b	UPF3 regulator of nonsense transcripts homolog B (yeast) (predicted)
		1380306_at 1381553_at 1392613_at	Zbtb16	zinc finger and BTB domain containing 16
		1393192_at	---	---
		1397225_at	---	---

Shaded column: metabolic enzyme genes related to lipid.

Table 3-6. Differentially expressed genes in the liver and the adipose tissues

Tissue \ Compared groups	L < H	L > H
Liver	206	230
WAT	235	336
BAT	212	405

Table 3-7. Significantly enriched GO terms found in WAT LH235+336 genes

GO-ID	Term	P-Value	Count
	biological process		
0008610	lipid biosynthetic process	6.17E-06	25
0045444	fat cell differentiation	1.96E-04	10
0001503	ossification	2.57E-04	13
0060348	bone development	4.80E-05	15
0005996	monosaccharide metabolic process	4.41E-06	21
0019318	hexose metabolic process	8.08E-06	19
0006006	glucose metabolic process	1.18E-05	17
0009991	response to extracellular stimulus	1.43E-06	28
0031667	response to nutrient levels	1.20E-05	25
0007584	response to nutrient	2.84E-04	18
0009719	response to endogenous stimulus	1.89E-08	47
0009725	response to hormone	1.25E-07	42
0043434	response to peptide hormone	1.59E-04	20
0032868	response to insulin	4.31E-04	14
0010033	response to organic substance	4.50E-09	65
0016042	lipid catabolic process	3.15E-04	14
0044242	cellular lipid catabolic process	1.33E-04	11
0009062	fatty acid catabolic process	2.42E-05	9
0006635	fatty acid beta-oxidation	2.70E-05	8
0046395	carboxylic acid catabolic process	1.17E-05	14
0016054	organic acid catabolic process	1.17E-05	14
0006631	fatty acid metabolic process	3.43E-08	24
0019395	fatty acid oxidation	3.85E-04	8
0034440	lipid oxidation	3.85E-04	8
0055114	oxidation-reduction process	1.62E-04	34

Shaded column: GO terms at the lowest hierarchy.

Table 3-8. The list of WAT LH235+336 genes that belong to the GO terms located at the lowest level of hierarchy

Gene Symbol	Description	L < H	L > H	A	B	C	D	E	F	G	H
Fabp3	fatty acid binding protein 3, muscle and heart	L < H		+	+			+			
Scd1	stearoyl-Coenzyme A desaturase 1		L > H	+		+					
Pc	pyruvate carboxylase		L > H	+			+				
Star	steroidogenic acute regulatory protein		L > H	+				+	+		
Insig1	insulin induced gene 1		L > H	+				+		+	
Ptgs2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2		L > H	+					+	+	+
Aldh1a2	aldehyde dehydrogenase 1 family, member A2		L > H	+					+		
ELOVL6	ELOVL family member 6		L > H	+							
Pnpla3	patatin-like phospholipase domain containing 3		L > H	+							
Abhd5	abhydrolase domain containing 5		L > H	+							
Acaca	acetyl-CoA carboxylase alpha		L > H	+							
Acly	ATP citrate lyase		L > H	+							
Acss2	acyl-CoA synthetase short-chain family member 2		L > H	+							
Agmo	alkylglycerol monooxygenase		L > H	+							
Chka	choline kinase alpha		L > H	+							
Dbi	diazepam binding inhibitor (GABA receptor modulator, acyl-CoA binding protein)		L > H	+							
Dgat1	diacylglycerol O-acyltransferase 1		L > H	+							
Etnk1	ethanolamine kinase 1		L > H	+							
Fasn	fatty acid synthase		L > H	+							
Ggt5	gamma-glutamyltransferase 5	L < H		+							
Hmgcs1	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 1 (soluble)		L > H	+							
Hsd17b12	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 12		L > H	+							
Lpcat3	lysophosphatidylcholine acyltransferase 3		L > H	+							
Lrrn4	leucine rich repeat neuronal 4		L > H	+							
Pnpla3	patatin-like phospholipase domain containing 3		L > H	+							
Scarb1	scavenger receptor class B, member 1	L < H		+							
Adipoq	adiponectin, C1Q and collagen domain containing		L > H		+	+	+		+		

Gene Symbol	Description	L < H	L > H	A	B	C	D	E	F	G	H
Echs1, LOC100911186	enoyl CoA hydratase, short chain, 1, mitochondrial, enoyl-CoA hydratase, mitochondrial-like		L > H		+						
Eci1	enoyl-CoA delta isomerase 1		L > H		+						
Eci2	enoyl-CoA delta isomerase 2		L > H		+						
Ehhadh	enoyl-CoA, hydratase/3-hydroxyacyl CoA dehydrogenase		L > H		+						
Etfdh	electron-transferring-flavoprotein dehydrogenase		L > H		+						
LOC100912409	short/branched chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial-like	L < H			+						
RETN	resistin		L > H			+		+			
Aacs	acetoacetyl-CoA synthetase		L > H			+			+		
Tcf7l2	Transcription factor 7-like 2, T-cell specific, HMG-box		L > H			+					
ADRB1	adrenergic, beta-1-, receptor		L > H			+					
Adrb3	adrenoceptor beta 3		L > H			+					
Lrg1	leucine-rich alpha-2-glycoprotein 1	L < H				+					
Rgs2	regulator of G-protein signaling 2		L > H			+					
Wfdc21	WAP four-disulfide core domain 21		L > H			+					
PIK3R1	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1 (alpha)		L > H				+	+			
Lep	leptin	L < H					+	+			
Il6st	interleukin 6 signal transducer	L < H					+		+		
Igf2	insulin-like growth factor 2		L > H				+			+	+
GPD1	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 (soluble)		L > H				+				
Atf3	activating transcription factor 3		L > H				+				
Creb	cAMP responsive element modulator		L > H				+				
Cryab	crystallin, alpha B	L < H					+				
Pdha1	pyruvate dehydrogenase (lipoamide) alpha 1		L > H				+				
Pdk1	pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 1		L > H				+				
Ppp1r1a	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 1A		L > H				+				
Serp1	stress-associated endoplasmic reticulum protein 1		L > H				+				
Serpina12	serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antitrypsin), member 12		L > H				+				

Gene Symbol	Description	L < H	L > H	A	B	C	D	E	F	G	H
Taldo1	transaldolase 1		L > H				+				
LYN	LYN proto-oncogene, Src family tyrosine kinase	L < H						+			
FOXO1	Forkhead box O1A		L > H					+			
---	---		L > H					+			
Acvr1c	activin A receptor, type IC		L > H					+			
Apobec1	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide 1	L < H						+			
Cyp2b1, Cyp2b2, LOC100909962	cytochrome P450, family 2, subfamily b, polypeptide 1, cytochrome P450, family 2, subfamily b, polypeptide 2, cytochrome P450 2B1-like	L < H						+			
Enpp1	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1		L > H					+			
Pde3b	phosphodiesterase 3B, cGMP-inhibited		L > H					+			
Shc1	SHC (Src homology 2 domain containing) transforming protein 1		L > H					+			
Acs11	acyl-CoA synthetase long-chain family member 1		L > H						+		
Bckdhb	branched chain keto acid dehydrogenase E1, beta polypeptide		L > H						+		
Cubn	cubilin (intrinsic factor-cobalamin receptor)	L < H							+		
Dusp1	dual specificity phosphatase 1		L > H						+		
Gatm	glycine amidinotransferase (L-arginine:glycine amidinotransferase)	L < H							+		
Igf2r	insulin-like growth factor 2 receptor		L > H						+		
Igfbp2	insulin-like growth factor binding protein 2		L > H						+		
Serpinf1	serpin peptidase inhibitor, clade F (alpha-2 antiplasmin, pigment epithelium derived factor), member 1	L < H							+		
Timp3	TIMP metalloproteinase inhibitor 3	L < H							+		
Bmp4	bone morphogenetic protein 4	L < H							+	+	+
Sparc	secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)	L < H							+	+	+
Spp1	secreted phosphoprotein 1	L < H							+	+	+
Bmp3	bone morphogenetic protein 3		L > H							+	+
Chrd11	chordin-like 1	L < H								+	+
Fhl2	four and a half LIM domains 2	L < H								+	+
Gabbr1	gamma-aminobutyric acid (GABA) B receptor 1		L > H							+	+

Gene Symbol	Description	L < H	L > H	A	B	C	D	E	F	G	H
Gpnmb	glycoprotein (transmembrane) nmb	L < H								+	+
Mef2c	myocyte enhancer factor 2C	L < H								+	+
Ptn	pleiotrophin	L < H								+	+
Tgfb3	transforming growth factor, beta 3	L < H								+	+
Papss2	3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase 2	L < H								+	

Shaded cell entries: metabolic enzyme genes related to lipid.

Green column shows the molecule contained in GO0060006 related to glucose metabolism (Igf2: related both to bone development and glucose metabolism).

Yellow column shows the molecule contained in GO0032868 related to insulin signaling.

Blue column shows the molecule related to bone development (Ptgs2, Papss2: related both to lipid and bone development).

A: GO:0008610 lipid biosynthetic process

B: GO:0006635 fatty acid beta-oxidation

C: GO:0045444 fat cell differentiation

D: GO:0006006 glucose metabolic process

E: GO:0032868 response to insulin stimulus

F: GO:0007584 response to nutrient

G: GO:0060348 bone development

H: GO:0001503 ossification

Table 3-9. Significantly enriched GO terms found in BAT LH212+405 genes

GO-ID	Term	P-Value	Count
	biological process		
0055114	oxidation-reduction process	4.18E-06	41
0010033	response to organic substance	6.50E-06	61
0006631	fatty acid metabolic process	4.40E-05	20
0003012	muscle system process	1.43E-05	15
0006936	muscle contraction	8.02E-05	13
0008610	lipid biosynthetic process	2.59E-11	36
0006694	steroid biosynthetic process	6.54E-05	12
0016126	sterol biosynthetic process	4.38E-08	11
0006695	cholesterol biosynthetic process	7.52E-09	11
0008203	cholesterol metabolic process	3.75E-08	16
0016125	sterol metabolic process	1.01E-07	16
0008202	steroid metabolic process	7.84E-06	20

Shaded column: GO terms at the lowest hierarchy.

Table 3-10. The list of BAT LH212+405 genes that belong to the GO terms located at the lowest level of hierarchy

Gene Symbol	Description	L < H	L > H	A	B	C	D	E
Fads1	fatty acid desaturase 1		L > H	+		+	+	
Agmo	alkylglycerol monooxygenase		L > H	+		+		
Ehhadh	enoyl-CoA, hydratase/3-hydroxyacyl CoA dehydrogenase		L > H	+		+		
Fasn	fatty acid synthase		L > H	+		+		
Faxdc2	fatty acid hydroxylase domain containing 2		L > H	+		+		
LOC100912469, Scd	acyl-CoA desaturase 2-like, stearoyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase)		L > H	+		+		
Sc5d	sterol-C5-desaturase		L > H	+		+		
Scd1	stearoyl-Coenzyme A desaturase 1		L > H	+		+		
---	---		L > H	+			+	
Acaca	acetyl-CoA carboxylase alpha		L > H	+			+	
ACC2	acetyl-CoA carboxylase beta		L > H	+			+	
Acs14	acyl-CoA synthetase long-chain family member 4		L > H	+			+	
Acs15	acyl-CoA synthetase long-chain family member 5		L > H	+			+	
FABP3	Fatty acid binding protein 3	L < H		+			+	
Lep	leptin		L > H	+			+	
Ppara	peroxisome proliferator activated receptor alpha	L < H		+			+	
Slc27a1	solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 1		L > H	+			+	
Acsf2	acyl-CoA synthetase family member 2		L > H	+				
Acsm5	acyl-CoA synthetase medium-chain family member 5		L > H	+				
Elovl6	ELOVL fatty acid elongase 6		L > H	+				
Slc27a2	solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 2	L < H		+				
Insig1	insulin induced gene 1		L > H		+		+	
Ebp	emopamil binding protein (sterol isomerase)		L > H		+			
Fdps	farnesyl diphosphate synthase		L > H		+			
Lss	lanosterol synthase (2,3-oxidosqualene-lanosterol cyclase)		L > H		+			
Pmvk	phosphomevalonate kinase		L > H		+			
G6pd	glucose-6-phosphate dehydrogenase		L > H		+	+	+	
Cyb5r3	cytochrome b5 reductase 3		L > H		+	+		
Cyp51	cytochrome P450, family 51		L > H		+	+		
Dhcr7	7-dehydrocholesterol reductase		L > H		+	+		

Gene Symbol	Description	L < H	L > H	A	B	C	D	E
Fdft1	farnesyl diphosphate farnesyl transferase 1		L > H		+	+		
Nsdhl	NAD(P) dependent steroid dehydrogenase-like		L > H		+	+		
Cyp1b1	cytochrome P450, family 1, subfamily b, polypeptide 1		L > H			+	+	
Hmox1	heme oxygenase (decycling) 1		L > H			+	+	
Idh1	isocitrate dehydrogenase 1 (NADP+), soluble		L > H			+	+	
Me1	malic enzyme 1, NADP(+)-dependent, cytosolic		L > H			+	+	
Adhfe1	alcohol dehydrogenase, iron containing, 1	L < H				+		
Akr1b8	aldo-keto reductase family 1, member B8	L < H				+		
Akr1c14	aldo-keto reductase family 1, member C14		L > H			+		
Cbr3	carbonyl reductase 3		L > H			+		
Chdh	choline dehydrogenase		L > H			+		
Cox8b	cytochrome c oxidase, subunit VIIIb	L < H				+		
Cyb5b	cytochrome b5 type B (outer mitochondrial membrane)		L > H			+		
Cyp2e1	cytochrome P450, family 2, subfamily e, polypeptide 1	L < H				+		
Cyp2u1	cytochrome P450, family 2, subfamily u, polypeptide 1		L > H			+		
Cyp4b1	cytochrome P450, family 4, subfamily b, polypeptide 1		L > H			+		
Dcxr	dicarbonyl L-xylulose reductase	L < H				+		
Dhrs9	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 9		L > H			+		
Dhtkd1	dehydrogenase E1 and transketolase domain containing 1	L < H				+		
Fmo2	flavin containing monooxygenase 2	L < H				+		
Impdh2	IMP (inosine 5'-monophosphate) dehydrogenase 2		L > H			+		
Maob	monoamine oxidase B		L > H			+		
Mdh1	malate dehydrogenase 1, NAD (soluble)		L > H			+		
Me3	malic enzyme 3, NADP(+)-dependent, mitochondrial	L < H				+		
Pdha1	pyruvate dehydrogenase (lipoamide) alpha 1		L > H			+		
PPARGC1A	PPARγ coactivator 1α	L < H				+		
Pxdn	peroxidasin homolog (Drosophila)		L > H			+		
Rcn3	reticulocalbin 3, EF-hand calcium binding domain		L > H			+		
RGD1560015, Tecr	similar to glycoprotein, synaptic 2, trans-2,3-enoyl-CoA reductase		L > H			+		
ERN1	endoplasmic reticulum to nucleus signaling 1		L > H				+	
SREBP2	Sterol-regulatory element-binding protein-2		L > H				+	
Abcb11	ATP-binding cassette, subfamily B (MDR/TAP), member 11		L > H				+	

Gene Symbol	Description	L < H	L > H	A	B	C	D	E
Apoc3	apolipoprotein C-III	L < H					+	
Atp5g1, LOC689961	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial Fo complex, subunit C1 (subunit 9), similar to ATP synthase lipid-binding protein, mitochondrial precursor		L > H				+	
Car2	carbonic anhydrase 2	L < H					+	
Ccl5	chemokine (C-C motif) ligand 5	L < H					+	
Ccnd2	cyclin D2		L > H				+	
Cd14	CD14 molecule		L > H				+	
Col1a1	collagen, type I, alpha 1		L > H				+	
Cyr61	cysteine-rich, angiogenic inducer, 61	L < H					+	
Egr1	early growth response 1		L > H				+	
FOS	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	L < H					+	
Gcgr	glucagon receptor		L > H				+	
Gnas	GNAS complex locus	L < H					+	
Gng13	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 13		L > H				+	
Gstm7	glutathione S-transferase, mu 7	L < H					+	
Hspa1a, Hspa1b	heat shock 70kD protein 1A, heat shock 70kD protein 1B (mapped)		L > H				+	
Hspa4l	heat shock protein 4-like		L > H				+	
Id1	inhibitor of DNA binding 1	L < H					+	
Id2	inhibitor of DNA binding 2		L > H				+	
Igf1	insulin-like growth factor 1		L > H				+	
Igfbp2	insulin-like growth factor binding protein 2	L < H					+	
LDLR	low density lipoprotein receptor		L > H				+	
LRP6	low density lipoprotein receptor-related protein 6	L < H					+	
Mgst3	microsomal glutathione S-transferase 3	L < H					+	
Mmp2	matrix metalloproteinase 2		L > H				+	
Myc	myelocytomatosis oncogene		L > H				+	
Nr0b2	nuclear receptor subfamily 0, group B, member 2, small heterodimer partner (SHP)	L < H					+	
Nr4a3	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3, orphan		L > H				+	
P2rx1	purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 1		L > H				+	
PIK3R1	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1 (alpha)		L > H				+	
Pik3r1	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1 (alpha)		L > H				+	
Plin2	perilipin 2		L > H				+	

Gene Symbol	Description	L < H	L > H	A	B	C	D	E
Ppargc1b	peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 beta	L < H					+	
PPP2R2A	Protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit B (PR 52), alpha isoform	L < H					+	
Sdc2	syndecan 2		L > H				+	
Serpinf1	serpin peptidase inhibitor, clade F (alpha-2 antiplasmin, pigment epithelium derived factor), member 1		L > H				+	
Sgk1	serum/glucocorticoid regulated kinase 1	L < H					+	
Slc6a9	Solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, glycine), member 9		L > H				+	
Socs2	Suppressor of cytokine signaling 2		L > H				+	
Tfrc	transferrin receptor	L < H					+	
Timp4	tissue inhibitor of metalloproteinase 4	L < H					+	
Trib1	tribbles pseudokinase 1	L < H					+	
Txnip	thioredoxin interacting protein		L > H				+	
Xbp1	X-box binding protein 1		L > H				+	
Acta1	actin, alpha 1, skeletal muscle	L < H					+	
Mb	myoglobin	L < H					+	+
Actn3	actinin alpha 3	L < H						+
Agt	angiotensinogen (serpin peptidase inhibitor, clade A, member 8)	L < H						+
Mybpc2	myosin binding protein C, fast-type	L < H						+
Myh1	myosin, heavy chain 1, skeletal muscle, adult, myosin, heavy chain 2, skeletal muscle, adult, myosin, heavy chain 8, skeletal muscle, perinatal	L < H						+
Myh11	myosin, heavy chain 11, smooth muscle		L > H					+
Myl1	myosin, light chain 1	L < H						+
Mylpf	myosin light chain, phosphorylatable, fast skeletal muscle	L < H						+
Tnnc2	troponin C type 2 (fast)	L < H						+
Tnni2	troponin I type 2 (skeletal, fast)	L < H						+
Tnnt3	troponin T type 3 (skeletal, fast)	L < H						+
Tpm1	tropomyosin 1, alpha	L < H						+

Shaded cell entries: metabolic enzyme genes related to lipid.

A: GO:0006631 fatty acid metabolic process

B: GO:0006695 cholesterol biosynthetic process

C: GO:0055114 oxidation reduction

D: GO:0010033 response to organic substance

E: GO:0006936 muscle contraction

Table 3-11. Comparison of IPA-upstream regulators among the liver and the adipose tissue transcriptomes

Upstream Regulator		Activation z-score		
Abbreviation	Description	Liver	WAT	BAT
LY294002	PI3 kinase inhibitor	-0.756	3.07	2.73
SREBF1	Sterol regulatory element-binding transcription factor 1	1.27	-3.68	-4.18
SREBF2	Sterol regulatory element-binding transcription factor 2	1.12	-3.52	-4.17
INSIG1	Insulin induced gene 1	-2.15	1.61	3.61
INSIG2	insulin induced gene 2	-	2.39	2.93
PPARG	peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma	-1.01	-2.73	-2.15
gemfibrozil	PPAR alpha activator	-1.57	-2.21	-2.80
pirinixic acid	PPAR alpha activator	-1.79	-3.07	-2.99
CREB1	cAMP responsive element binding protein 1	0.751	-3.17	-2.14
IL4	interleukin 4	0.789	-2.64	-2.41
MLXIPL	MLX interacting protein-like, Carbohydrate-responsive element-binding protein	-	-2.41	-2.61
CD38	CD38 molecule	-0.269	-2.28	-3.41
paclitaxel	taxol	1.19	-2.19	-2.66
PPIF	peptidylprolyl isomerase F, cyclophilin D	2.83	0.200	2.00

The absolute Z-scores of larger than 2.5 are represented by the shaded columns. -; no significant Z-score. Upstream Regulators are classified according to their relevance to each other.

第4章

即席麺に含まれる味物質・メイラード反応生成物
による視床下部一下垂体系を介する脂質代謝制御

I. 序

第3章では食餌中の炭水化物、脂質の組成を変化させることによって、エネルギー代謝が肝臓において変化することを明らかにした。その変動は糖質燃焼から脂質燃焼へと切り替わるターニングポイントが存在することであった。炭水化物と脂質の代謝経路の変化は食品の一次機能のうちで最も中心的な反応と考えられるが、実際の食品では、3大栄養素に加え、微量であっても生体調節機能を有する成分が存在する。本章では、実際の食品として即席麺を取り上げ微量成分の混合物の効果を検証する。

日常我々が摂取する食物には多種多様な調味料や香辛料が含まれている。これらに含まれる物質の中には、口腔内感覚系だけでなく消化管上皮を刺激するものもある。例えば、近藤らは、1%のグルタミン酸ナトリウム (MSG) 溶液をマウスに自由飲水させたところ、高糖質高脂肪を摂取して生じる脂肪の蓄積を抑制したと報告している (Kondoh and Torii, 2008)。また Shinozaki ら (2016) は、19種類のアミノ酸混合物 (Gly を 19 mol% とその他のアミノ酸を 0.5–18 mol% 含む) を総エネルギーの 0.38% になるように加えるとアドレナリンによるシグナル伝達が肝臓と脂肪組織で亢進すると報告している。辛味成分であるカプサイシンやショウガオールは TRP (transient receptor potential) チャネルによって受容され、エネルギー産生を亢進することが報告されている (Riera *et al.*, 2009)。このような代謝制御メカニズムとしては、自律神経系または中枢神経系の活動を内臓求心性神経が最終的に制御している可能性が示唆されている。例えば、MSG (60mM) を胃内投与したラットでは視床下部が活性化されるが、迷走神経を外科手術によって切断すると活性化は起こらなかったという fMRI を用いた報告がある (Uematsu *et al.*, 2010)。また、ヒトを対象とした研究では、TRP のアゴニストを摂取後、10 分以内に総エネルギー消費と体表面温

度が上昇したことが報告されている (Michlig *et al.*, 2016)。

実際に日常摂取する食品に含まれる調味料・香辛料やメイラード反応生成物が、協調して生体の代謝調節に影響を与えていると考えられるが、様々な成分を含む食品そのものを研究対象として解析した例はほとんどない。そこで、我々は日常的に摂取する食品の中で、調味料・香辛料やメイラード反応生成物が含まれている即席麺を用いて、消化管刺激を基点とする中枢神経系 (central nerve system, CNS) への作用と、その結果生じる代謝変化および代謝産物の変動を解析し、複雑系である実際の食品が示す機能を俯瞰する研究を行なった。

II. 材料および方法

1) 動物実験

実験は、東京大学動物実験委員会から承認を得て実施した。8 週齢の Wistar 系雄性ラットを日本クレアから購入した。飼育室は 22°C に保ち、12 時間ずつ明期・暗期とした。餌は自由摂取、水は自由飲水とし、1 週間 AIN-93 で馴化した。その後、体重の平均値がほぼ同じになるようにラットを 2 群に分け（各 n=7）、それぞれ粉末飼料である N-diet あるいは C-diet を摂取させた。

N-diet には市販の即席麺「チキンラーメン」（日清食品）を混合した。製品を湯戻しせずに粉碎し、エネルギー比 34%（重量比 30%）となるよう、AIN-93G に混合した。さらに、平成 25 年度国民健康・栄養調査結果に基づき、日本人の平均エネルギー摂取比率と等しくなるよう、コーンスターチ、ミルクカゼイン、精製大豆油を減じて調整した（P:F:C=14.9:25.6:59.5）。

C-diet は以下の通り調製した。N-diet 100g に含まれるチキンラーメン由来のパーム油、グルテン、食塩はそれぞれ 17.00g, 5.81g, 6.59g であったことから、AIN-93G に対して同量のパーム油・グルテン・食塩を加え、等カロリーとなるように精製大豆油、ミルクカゼイン、コーンスターチを減じたものを調製した。なお、これらの飼料は日本クレアにおいて作成された。

N-diet 摂取群は自由摂取とし、摂取エネルギー量が等しくなるように、ペアフィーディングを行い、60g/kg 体重/日となる量の餌を 30 日間摂取させた。飼育終了の翌日、イソフルラン麻酔下で解剖し、臓器の摘出、サンプル採取を行った。

2) 血清・肝臓・糞中の生化学パラメータの解析

肝臓および糞中の総脂質はクロロホルム/メタノール法によって抽出した。

-80°Cに保存しておいた 50mg のサンプルをビーズショッカー（安井機器）で破碎し、クロロホルム：メタノール(2：1)の溶液を加え、Vortex で激しく攪拌して脂質を抽出した。抽出液中のコレステロールとトリグリセリド (TG) は、Cholestest N CHO Kit および Cholestest N TG kit (Kyokuto Seiyaku)を用いて定量した。

3) DNA マイクロアレイ解析

全 RNA の抽出および cRNA の標識等は第 3 章 (PFC バランス試験) と同様の方法で行った。また、解析も同様に行ったが、データの正規化は qFARMS 法を用いた。

4) 尿中カテコールアミンの測定

6N HCl を 150 μ L 加えた 50mL チューブに 24 時間尿を集め、酸性尿とした。カテコールアミン標準液 (Thermo Fischer) は、カテコールアミン希釈緩衝液を用いて 10 ng あるいは 500 ng/mL 濃度になる様に希釈し、20 μ L の 3,4-dihydroxybenzylamine (DHBA) と 50 μ L の 1 M KH_2PO_4 (pH 8.0) を加え、DHBA の最終濃度が 200 ng/mL になる様に調整した。1 mL の尿を 10,000 $\times g$ で 1 分間遠心分離をし、180 μ L の上清に 20 μ L の DHBA (2 μ g/mL) と 50 μ L の 1 M KH_2PO_4 (pH 8.0) を加えた。MonoSpin PBA カラムを 1% の酢酸を含む 100 mM KH_2PO_4 (pH 8.0) で平衡化した。このカラムに 250 μ L の尿サンプルあるいはカテコールアミン標準液 250 μ L をロードし、100 mM KH_2PO_4 (pH 8.0) で洗浄した後、200 μ L の 1 % 酢酸で溶出した。サンプルを HPLC カラム (Acclaim 120C18 3 μ m, Thermo Fischer) にチャージし、75 mM NaH_2PO_4 , 25 mM トリクロロ酢酸、アセトニトリル、メタノール (85 : 10 : 5) の溶液を用いて溶離した。サンプルの検出は、ECD-3000 システムを用い、ch1=-50 mV ,

ch2= 300 mV にて行った。

尿中のグルコース量は、長浜ライフサイエンス研究所に依頼し、ヘキソース/グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ法にて解析した。

5) 血清中のアミノ酸量

100 μ L の血清を HITACHI CF15RXII 微量遠心機を用いて 9,000 rpm, 15 分間遠心分離し、90 μ L の上清に 6% トリクロロ酢酸を 90 μ L 加えた後、再度 9,000 rpm, 15 分間遠心分離した。得られた上清は、0.22 μ m のフィルターを通し、このサンプルを HITACHI L-8900 全自動アミノ酸分析計を用いて定量した。

Ⅲ. 結果

1) 即席麺を含む食餌を摂取したラットの生理学的応答の解析

まず、即席麺入りの試験餌および対照となる餌を準備した (Table 4-1)。いずれもエネルギー換算比でタンパク質 14.9%、脂質 25.6%、炭水化物 59.5%に設定した。脂質含量はラットの標準食として American Institute of Nutrition で推奨している AIN-93G の脂質 18.7%に比べてやや高めの設定である。この値は、標準食の 3分の1を即席麺で置き換えた場合の PFC 比率とほぼ同程度としているが、高脂肪食として研究に頻繁に用いられる 40%に比べると低い値となっている。

試験餌 (N-diet) は、即席麺を 30%含む。対照餌 (C-diet) は 30%即席麺置換食の PFC 比率に合わせるために、小麦グルテン、パーム油、コーンスターチを加えて調整した。N-diet は、チキンラーメン由来の遊離アミノ酸や香辛料・調味成分 (ガーリック、オニオン、ジンジャー等) およびメイラード反応生成物を含むことを特徴とする。これらの添加物の分析値を Table 4-2 に示す。特に遊離のアミノ酸が N-diet には多く含まれており (0.404%)、中でもグルタミン酸は 0.326wt%と多く、総エネルギー量の 0.29%に相当する。今回用いたチキンラーメン中の香辛料には cycloalliin (ガーリック由来)、ケルセチン (オニオン由来)、6-ショウガオール (ショウガ由来) 等の化合物が含まれる。その他は製造過程で産生する副産物であると推定される (1.64g/100g N-diet) が、化学成分は未同定である。

30日間の飼育では、エネルギー摂取量、体重、臓器重量に N-diet 群と C-diet 群で差はなかった (Figure 4-1)。また血液生化学的データにおいても N-diet 群と C-diet 群では統計的有意と判定される項目はなかった (Table 4-3)。しかし、

肝臓中 TG が N-diet 群で有意に低下し、糞中の総コレステロール量は、N-diet 群で有意に増加していた (Table 4-4)。

2) 視床下部-下垂体のトランスクリプトーム解析

N-diet 摂取群の肝臓中 TG の減少および糞中コレステロールの増加といった現象を引き起こすメカニズムを解析するために、視床下部および下垂体 (hypothalamus - pituitary, HP)、肝臓、白色脂肪組織 (WAT) における発現遺伝子の網羅的解析を行った。各々の臓器から抽出した RNA を用いて N-diet 群および C-diet 群で 2 群間比較を行った。CEL ファイルを取得した後、qFARMS で正規化をし、Rank products 法を用いた 2 群間比較により FDR < 0.05 の遺伝子を抽出した。HP では、N-diet 群の方が C-diet 群より発現上昇したものは 82 遺伝子、減少したものが 101 遺伝子であった。一方肝臓では N-diet 群で上昇したものが 417、減少が 358、WAT では上昇 314、減少 377 遺伝子であった (Table 4-5)。そこで、HP の遺伝子発現解析から、N-diet によって惹起された感覚シグナルが HP の内分泌系の応答をどのように引き起こしたか調べた。

HP のトランスクリプトーム解析で抽出された DEGs は、82 (N-diet 群で上昇) と 101 (N-diet 群で減少) と比較的少なかったため、通常行う GO enrichment analysis や IPA を用いた DEGs の機能を抽出する方法をとらず、個々の分子に関する既知の情報を調べることで、HP で変動する遺伝子について機能分類を行った。その結果、内分泌系の応答に関与する分子が 63 抽出された。これらの分子を機能別に分類するとニューロペプチド関連 9 遺伝子、酵素 16 遺伝子、細胞間シグナリング 15 遺伝子、免疫遺伝子関連 23 遺伝子が含まれていた (Table 4-6)。注目すべき点は甲状腺刺激ホルモン Tshb (thyroid stimulating hormone, beta) と Cga (glycoprotein hormone alpha polypeptide) が N-diet で上昇して

いたことである。これらのペプチドホルモンは下垂体で合成され、ヘテロダイマーを形成し、甲状腺ホルモン(thyroid hormone, TH)の分泌促進に関与する(Bargi-Souza *et al.*, 2015)。さらに血圧に関与する二つのホルモン Avp (arginine vasopressin) が N-diet 群で上昇し、Vip (vasoactive intestinal peptide) が N-diet 群で減少していた。神経伝達物質の代謝に関わる Hdc (histidine decarboxylase) と Maob (monoamine oxidase B) は N-diet 群で発現上昇していた。加えて、脂質代謝に関わる遺伝子として、Acsm5 (acyl-CoA synthase medium-chain family member5) が N-diet 群で上昇し、Ch25h (cholesterol 25-hydroxylase) と Gpd1 (Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1) がどちらも N-diet 群で発現減少した。

3) 肝臓および WAT トランスクリプトーム解析による上流因子の推定

HP のトランスクリプトーム解析の結果から、ホルモンによる末梢組織の代謝制御が起こっている可能性が示唆された。この結果を踏まえ、IPA ソフトウェアに搭載されている上流因子を予測するツールを用いて、肝臓と WAT の遺伝子発現を制御すると思われる上流分子の抽出を行った。Z-score が 2.5 以上の上流因子を Table 4-7 に示す。その結果、肝臓では SREBF1,2 (Sterol regulator element binding transcription factor 1, 2) の発現が N-diet 群で上昇する可能性が示された。SREBF1,2 は、脂質およびコレステロール代謝を調節することが知られている。さらに生体異物によって活性化される受容体 PXR (Pregnane X Receptor)、および転写制御因子(SMARCH1 (SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily b, member 1) と XBP1 (X-box binding protein 1)) が、発現上昇する上流因子として抽出された。

WAT のトランスクリプトーム解析の結果では、肝臓よりも多くの上流因子が抽出された。膜を介したシグナル伝達に関わる因子が多く、ANGPT2 (Angiopoietin 2) と ERBB4 (Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 4) は N-diet 群で活性化し、TGFRB1 (Transforming Growth Factor Beta Receptor 1)、WNT3A (Wingless-Type MMTV Integration Site Family Member 3A)、NEDD9 (Neural Precursor Cell Expressed, Developmentally Down-Regulated 9)、F2R (Coagulation Factor II Thrombin Receptor) は、Z-スコアがマイナスであり、これらの分子に起因するシグナルは低下すると予測された。ANGPT2 (angiopoietin-2) は、血管新生を介して WAT の代謝を改善する作用があることが最近報告された (Mullur *et al.*, 2014)。上流因子として活性が上昇すると予測された制御分子には、スタチン類の一種でコレステロール合成を阻害する cerivastatin が含まれていた (Gbelcova *et al.*, 2017)。その他、5 つの転写制御分子が抽出された (SPDEF (SAM Pointed Domain Containing ETS Transcription Factor) および SPI1 (Spi-1 Proto-oncogene) は N-diet 群で上昇、CREB (CAMP Responsive Element Binding Protein)、NFκB (Nuclear Factor Kappa B complex) および STAT4 (Signal Transducer and Activator of Transcription 4, transcription regulator) は減少)。これらの結果から、N-diet 群と C-diet 群では、明らかに代謝制御に違いがあることが示された。

4) 尿中のカテコールアミン量および血清中のアミノ酸量

視床下部-下垂体(HP)、肝臓、WAT のトランスクリプトーム解析の結果から、N-diet 群では神経系および代謝系関連分子の発現パターンが、対照群と比べて異なることが示唆された。そこで、内分泌系の変化を検証するために尿中の副腎髄質ホルモン (カテコールアミン) を測定した (Figure 4-2)。その結果、ノ

ルアドレナリン量が C-diet 群に対して N-diet 群で有意に上昇していた。即ち、N-diet の摂取により、ノルアドレナリンの分泌量が上昇したことが示された。さらに、血清中の遊離アミノ酸類の濃度を測定したところ、Ala, Val, His, Tyr, Met が N-diet 群においてやや上昇傾向にあり、1-methyl-His と 3-methyl-His は N-diet 群において低下していた (Table 4-8)。

IV. 考察

本研究では、炭水化物を中程度含み、香辛料や調味料などの風味が添加され、またメイラード反応生成物を含有する食品を摂取した場合の生体へ与える影響を解析するための実験を進めた。モデルとして、即席麺を1日のうち1食摂取した場合を想定し、PFCバランスが等しくなるように、ラットの標準的飼料であるAIN-93Gに（即席麺の組成に合わせるため）パーム油、小麦グルテン、塩を加えて改変した対照餌（C-diet）を摂取した場合と、AIN-93Gの3分の1を即席麺で置き換えた（N-diet）を調製した。一か月間の飼育の後、視床下部－下垂体（HP）、肝臓、WATのトランスクリプトーム解析と、末梢における生化学的データを取得した。

実験に用いた即席麺に含まれる調味料の主たる成分は、アミノ酸と6-ショウガオールである。遊離のアミノ酸は栄養素源と言えるほどの量は含まれておらず、最も多く含まれるグルタミン酸は総エネルギー量に対して0.29%である。さらにN-diet群とC-diet群の体重と各組織重量に差がないことから遊離アミノ酸が増えても（エネルギー源としての）栄養的な違いはないと言える。さらに血清中のGlu量はN-diet群とC-diet群で差がなかったが、1-methyl Hisと3-methyl-Hisは、N-diet群で低下していた。この2つのアミノ酸誘導体は、筋肉損傷時に分泌されるアミノ酸である（Aranibar *et al.*, 2011）。これらの知見を総合して考えると、遊離アミノ酸が神経回路に作用し、さらに6-ショウガオールはおそらく自律神経系を介して複数の代謝調節、例えば熱産生やコレステロール低下に作用すると予想される（Iwasaki *et al.*, 2006; Lei *et al.*, 2014; Uyama *et al.*, 2004; Watanabe and Terada, 2015）。

これらの一連のシグナルの流れは、副腎髄質からのアドレナリン／ノルアドレナリンの分泌によって制御されているものと思われる。副腎髄質は交感神経

に支配されることから、6-ショーガオールとアミノ酸混合物の双方が神経系に影響を与えたのではないかと考えられる。今後、メイラード反応生成物も含め、活性に寄与する成分の単離・同定や、複数成分による相乗作用の検討が必要である。

HP のトランスクリプトーム解析では、甲状腺ホルモン (TH) の分泌を刺激する下垂体のホルモンである Tshb と Cga が N-diet 群で上昇しており、TH の活性上昇が示唆された。視床下部神経に発現し Tshb と Cga の上流に位置する甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン Trh (thyrotropin releasing hormone) は N-diet 群で発現が減少していた。Trh の発現は TH によって負のフィードバック刺激を受けることから、TH の活性上昇により Trh は低下したのではないかと考えられた。さらに、本研究において N-diet 群でノルアドレナリンが上昇することを見出した。このことはノルアドレナリンを分泌、生産する主たる臓器である交感神経系と副腎髄質でのノルアドレナリン生産がホルモンによって制御されていることを示すものである。尿中の総ノルアドレナリン生産量は N-diet 群で上昇したが、カテコールアミンの前駆体であるチロシンも N-diet 群の血清中で上昇したことから、ホルモンによる代謝制御が起こっていることが推定された。

本研究において、甲状腺ホルモン (TH) とノルアドレナリンが協調的に代謝を制御していることを支持するいくつかのデータを得た。第一番目に、N-diet 群で SREBF1 と SREBF2 の活性上昇が肝臓において起きていることが推定された。SREBF1, 2 は転写制御因子であるが、同様に転写制御因子である TH 受容体と相互作用し、脂肪酸合成とコレステロール合成をそれぞれ上昇させることが報告されている (SREBF1 が脂肪酸合成、SREBF2 がコレステロール合成にそれぞれ関与) (Desvergne *et al.*, 2006; Mullur *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2003)。第二に WAT において脂肪の分解が起こることで、ノルアドレナリンが

ホルモン感受性脂質代謝を引き起こし、肝臓で β 酸化が起こることが予測された (Damiano *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2014; Uyama *et al.*, 2004)。本章における実験では、ノルアドレナリン依存的な β 酸化と SREBF1 依存的脂肪酸合成は、おそらく前者の方が優れていると思われる。その理由として、肝臓中の TG が N-diet 群で有意に減少していたことがある。

このような代謝の変化は、アセチル CoA から合成されるコレステロールの糞中への排泄が N-diet で多いことも説明できる。即ち、 β 酸化で生成したアセチル CoA はコレステロール合成に利用され、胆汁酸となって排出された可能性がある。WAT では ANGPT2 シグナルの上昇が示唆された。ANGPT2 は WAT において血管新生を通して脂質代謝を改善する作用がある (An *et al.*, 2017)。TH シグナルによる血管新生の誘導に関する報告もある (Cao, 2010; Vasilopoulou *et al.*, 2014)。

以上の代謝変化を Figure 4-3 にまとめた。即席麺による視床下部一下垂体を介したホルモンによる代謝制御は、即席麺に含まれるシーズニング（アミノ酸やポリフェノール類）等による効果と考えられる。しかしながら、これらの他に N-diet には未同定の物質による作用もあると思われる。例えば、麺の加熱加工中に生成するメイラード反応生成物のうちの一部は、芳香をもちスパイシーな香りを与えると同時に、機能性成分として何らかの作用（例えば乳化活性; Lee *et al.*, 2017）を示す可能性がある。本研究では、N-diet に含まれるシーズニングが共同して視床下部一下垂体神経系と交感神経を刺激し、それによって甲状腺ホルモンとノルアドレナリンの分泌を亢進し、脂質代謝を改善することを明らかにした。

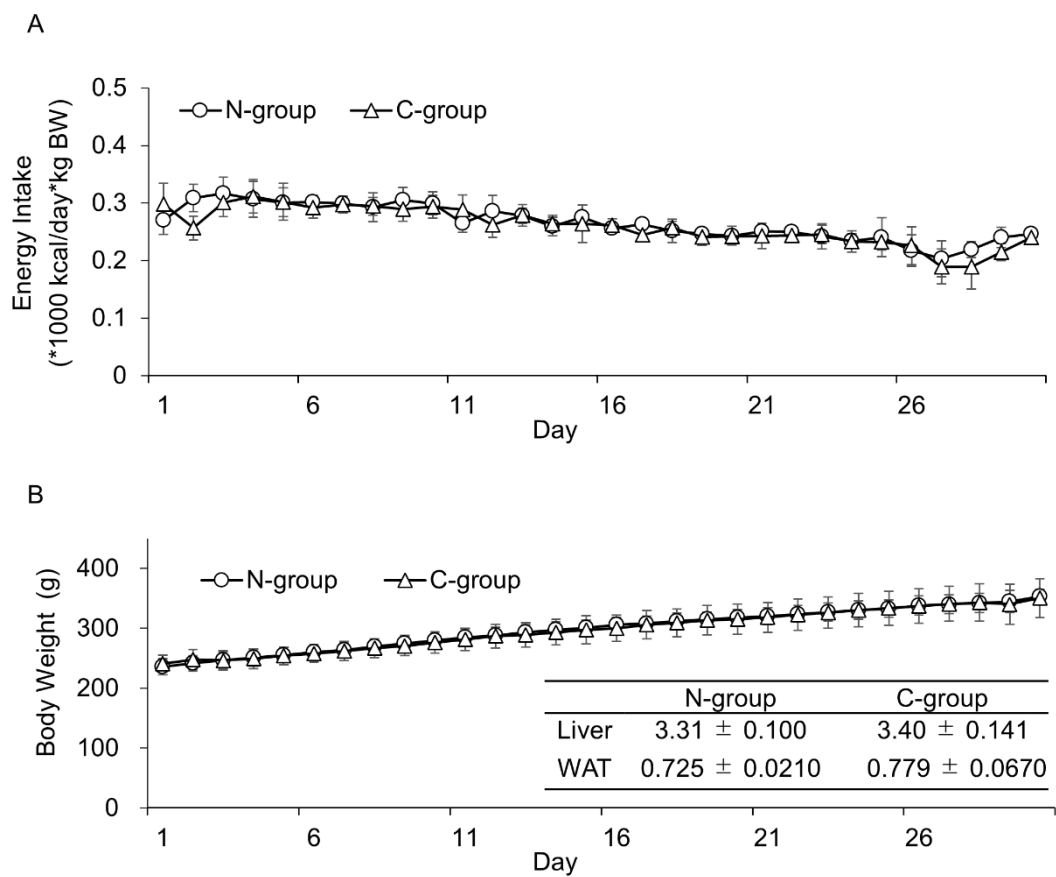


Figure 4-1. Time course of physical parameters. A, Energy intake during the experimental period. The drop at the day 27 reflect the urine sampling in the closed cage. B, Body and tissue weight. The inset represents the relative tissue weights (% to BW) at the time of sacrifice (9th week). Values are represented as mean \pm SD (n=6).

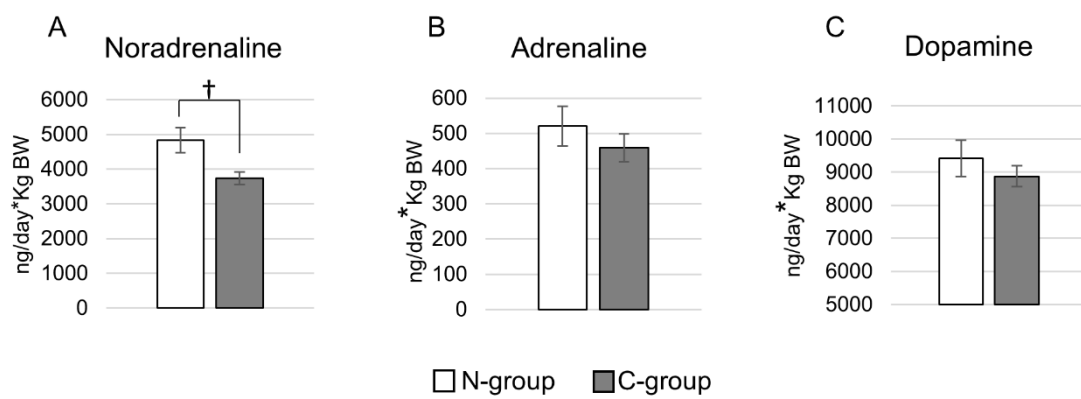


Figure 4-2. Catecholamine amount in the urine. The urine of each rat was collected for 24 hours and analyzed by HPLC (Materials and Methods).

†: significant difference detected by t-test (n=6, $p < 0.05$).

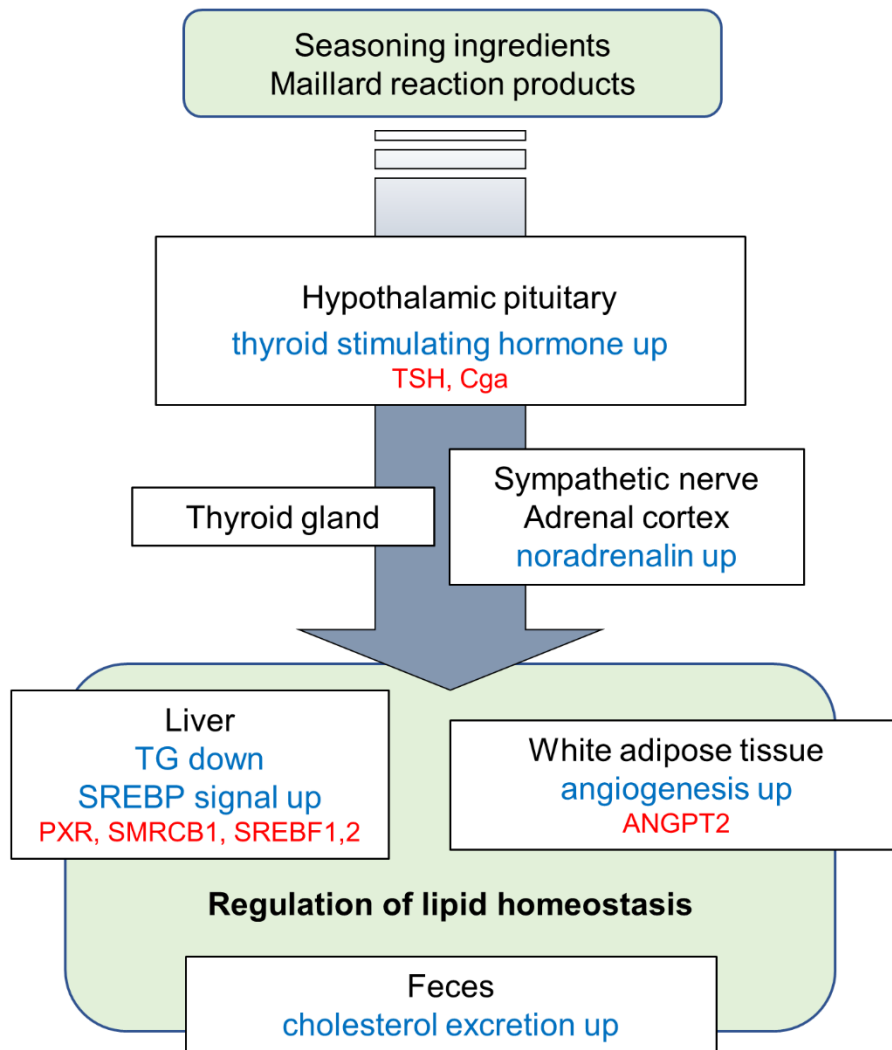


Figure 4-3. Summary of physiological pathway accelerated by seasoning ingredients in instant noodle.

Table 4-1. Composition of the diets

	N-diet		C-diet		AIN-93G		
	Weight (g)	Energy (%)	Weight (g)	Energy (%)	Weight (g)	Energy (%)	
milk casein	13.0	14.9	13.9	14.8	20.0	19.1	
wheat gluten			2.05				
protein derived from the instant noodle	2.89						
L-cystine	0.300		0.300		0.300		
free amino acids	0.404						
soybean oil	5.50	25.6	5.25	25.9	7.00	18.7	
palm oil			5.10				
palm oil derived from the instant noodle	5.12						
alpha-corn starch	13.2	59.5	13.2	59.3	13.2	62.2	
beta-corn starch	18.2		38.5				39.7
sucrose	10.0		10.0				10.0
wheat carbohydrate derived from the instant noodle	18.9						
cellulose	5.00		5.00				5.00
choline bitartrate	0.250		0.250		0.250		
vitamin mx (AIN-93VX)	1.00		1.00		1.00		
mineral mix (AIN-93G)	3.50		3.50		3.50		
NaCl	1.98		1.98		(0.259)*		
tertiary butylhydroquinon	0.00140		0.00140		0.00140		
other materials derived from the instant noodle	2.04						
total weight (g)	100		100		88.9		
total energy (kcal/100g)		388		380		369	

Shaded columns; compounds derived from the instant noodle. * content of NaCl in the mineral mix.

Table 4-2. Composition of seasoning materials in Noodle diet

Chemicals		N-diet	C-diet
Amino acids derived from chicken extract (mg / 100g)	glycine	5.67	n.d.
	alanine	6.15	1.00
	valine	6.09	n.d.
	leucine	7.53	n.d.
	isoleucine	5.07	n.d.
	serine	5.91	n.d.
	threonine	3.69	n.d.
	cysteine	n.d.	n.d.
	cystine	n.d.	n.d.
	methionine	1.2	n.d.
	aspartate	11.7	n.d.
	glutamine	n.d.	n.d.
	glutamate	326	n.d.
	arginine	5.91	n.d.
	lysine	4.95	n.d.
	histidine	1.38	n.d.
	phenylalanine	4.17	n.d.
	tyrosine	2.01	n.d.
	tryptophan	n.d.	n.d.
proline	6.57	n.d.	
anserine	n.d.	n.d.	
carnosine	n.d.	n.d.	
Phytochemicals derived from spices (mg / 100g)	cycloaliin	n.d.	n.d.
	quercetin	n.d.	n.d.
	6-shogaol	0.236	n.d.
total (mg / 100g)		404	

Values are mean \pm SEM (n=5).

n.d: not detectable

Table 4-3. Biochemical analysis of the sera

Biochemical parameters	N-group	C-group
Aspartate Aminotransferase (IU / L)	79.0±6.5	84.2±8.7
Alanine Aminotransferase (IU / L)	20.2±1.1	19.4±0.8
Alkaline Phosphatase (IU / L)	629.2±53.9	633.0±28.6
Lactate Dehydrogenase (IU / L)	1396.6±248.3	1483.0±316.3
Leucine Aminopeptidase (IU / L)	28.8±0.7	29.0±0.3
Choline Esterase (IU / L)	50.8±2.7	54.2±3.0
Total Bilirubin (mg / dL)	0.090±0.007	0.080±0.006
Glucose (mg / dL)	179.2±5.4	184.4±15.0
Pyruvic Acid (mg / dL)	1.00±0.08	0.87±0.07
Total Lipid (mg / dL)	405.3±55.7	473.3±69.7
Triacylglycerol (mg / dL)	170.4±44.2	214.8±57.7
Phospholipid (mg / dL)	130.8±9.2	146.6±9.8
Non-esterified Fatty Acid (μEq / L)	268.0±23.8	395.6±91.6
Total Cholesterol (mg / dL)	69.4±4.0	74.6±3.9
LDL-Cholesterol (mg / dL)	7.8±0.5	8.2±0.6
HDL-Cholesterol (mg / dL)	25.6±1.4	25.2±1.4
Total Ketone Body (μmol / L)	192.4±23.3	217.2±15.2
Total Bile Acid (μmol / L)	9.2±2.5	8.0±1.3
Hemoglobin A1C (%)	4.76±0.03	4.83±0.04
Insulin (ng / mL)	1.40±0.14	1.52±0.17

Values are mean ± SEM (n=5).

Table 4-4. Biochemical analysis of the liver and the feces

Tissue	Metabolite	N-group	C-group
Liver	Triacylglycerol (mg / g-tissue)	15.74±2.06	22.76±1.65
	Total Cholesterol (mg / g-tissue)	2.41±0.07	2.96±0.36
Feces	Triacylglycerol (mg / g-feces)	4.41±1.39	4.72±0.80
	Total Cholesterol (mg / g-feces)	4.42±0.37	3.27±0.13
	Total Bile Acid (nmol / g-feces)	2.18±0.34	2.43±0.78
Urine	Glucose (mg / day*kg BW)	10.26±0.67	11.61±1.35

Values are mean ± SEM. Shaded column: significant difference detected by Tukey-Kramer test (n=5, $p < 0.05$).

Table 4-5. Differentially expressed genes in the hypothalamic-pituitary, the liver and the white adipose tissue

Tissue \ Compared groups	N < C	N > C
Hypothalamic-pituitary	101 (124)	82 (101)
Liver	358 (501)	417 (519)
White adipose tissue	377 (477)	314 (351)

Numbers in parenthesis indicate non-annotated genes.

Table 4-6. The hypothalamic-pituitary DEGs classified into neuropeptide or other functional categories

Function	Probe ID	Gene Symbol	Gene Title	N > C	N < C
Neuropeptide 9 genes	1387317_at	Avp	arginine vasopressin	+	
	1369659_at	Cga	glycoprotein hormones, alpha polypeptide	+	
	1369717_at	Nmu	neuromedin U	+	
	1369750_at	Tshb	thyroid stimulating hormone, beta	+	
	1380967_at	Nts	neurotensin		+
	1368312_at	Oxt	oxytocin/neurophysin 1 prepropeptide		+
	1367762_at	Sst	somatostatin		+
	1368912_at	Trh	thyrotropin releasing hormone		+
	1377146_at	Vip	vasoactive intestinal peptide		+
Enzyme 16 genes	1377407_at	Acsm5	acyl-CoA synthetase medium-chain family member 5	+	
	1388689_at	Acyp2	acylphosphatase 2, muscle type	+	
	1375412_at	Arsb	arylsulfatase B	+	
	1370363_at	Ces1d	carboxylesterase 1D	+	
	1384392_at	Cyp26b1	cytochrome P450, family 26, subfamily b, polypeptide 1	+	
	1370491_a_at	Hdc	histidine decarboxylase	+	
	1368514_at	Maob	monoamine oxidase B	+	
	1369502_a_at	Amy1a /// Amy2a3	amylase, alpha 1A (salivary) /// amylase 2a3		+
	1380063_at	Ch25h	cholesterol 25-hydroxylase		+
	1372846_at	Cyb561a3	cytochrome b561 family, member A3		+
	1371363_at	Gpd1	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 (soluble)		+
	1369473_at	Pgm1	phosphoglucomutase 1		+
	1367851_at	Ptgds	prostaglandin D2 synthase (brain)		+
	1382949_at	Rdh12	retinol dehydrogenase 12 (all-trans/9-cis/11-cis)		+
	1370019_at	Sult1a1	sulfotransferase family, cytosolic, 1A, phenol-preferring, member 1		+
	1391864_at	Enpp6	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 6		+

Function	Probe ID	Gene Symbol	Gene Title	N > C	N < C
Cell signaling 15 genes	1398340_at	Ccndbp1	cyclin D-type binding-protein 1	+	
	1390722_at	Nucks	nuclear casein kinase & cyclin-dependent kinase substrate 1	+	
	1384587_at	Pak3	p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 3	+	
	1372101_at	Ppap2b	phosphatidic acid phosphatase type 2B	+	
	1386950_at	Ppp1cb	protein phosphatase 1, catalytic subunit, beta isozyme	+	
	1368589_at	Ptprj	protein tyrosine phosphatase, receptor type, J	+	
	1372299_at	Cdkn1c	cyclin-dependent kinase inhibitor 1C		+
	1394689_at	Csnk1a1	Casein kinase 1, alpha 1		+
	1397130_at	Mapk10	mitogen activated protein kinase 10, similar to binding protein		+
	1379433_at	Pik3c2a	phosphatidylinositol-4-phosphate 3-kinase, catalytic subunit type 2 alpha		+
	1372316_at	Pkdcc	protein kinase domain containing, cytoplasmic		+
	1383191_at, 1386968_at	Ppp1r1a	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 1A		+
	1395436_at	PPP3CA	PROTEIN PHOSPHATASE 3, CATALYTIC SUBUNIT, ALPHA ISOFORM		+
	1396148_at	Prkcbp1	Protein kinase C binding protein 1		+
	1367802_at	Sgk1	serum/glucocorticoid regulated kinase 1		+
Immune function 23 genes	1374061_at	Cd302	CD302 molecule	+	
	1388583_at	Cxcl12	chemokine (C-X-C motif) ligand 12	+	
	1388694_at	LOC1009097 97 /// RT1-T24-3	RT1 class I histocompatibility antigen, AA alpha chain-like /// RT1 class I, locus T24, gene 3	+	
	1370428_x_at	RT1-A2, A3, EC2	RT1 class Ia, locus A2 /// RT1 class I, locus A3 /// RT1 class Ib, locus EC2	+	
	1377334_at	RT1-Ba	RT1 class II, locus Ba	+	
	1388164_at	RT1-S3	RT1 class Ib, locus S3	+	
	1389734_x_at	RT1-T24-4	RT1 class I, locus T24, gene 4	+	
	1368000_at	C3	complement component 3		+

Function	Probe ID	Gene Symbol	Gene Title	N > C	N < C
Immune function 23 genes	1376652_at	C1qa	complement component 1, q subcomponent, A chain		+
	1370215_at	C1qb	complement component 1, q subcomponent, B chain		+
	1373025_at	C1qc	complement component 1, q subcomponent, C chain		+
	1367679_at	Cd74	Cd74 molecule, major histocompatibility complex, class II invariant chain		+
	1390529_at	Cd83	CD83 molecule		+
	1371079_at	Fcgr2b	Fc fragment of IgG, low affinity IIb, receptor (CD32)		+
	1395126_at	Fcrl2	Fc receptor-like 2		+
	1390916_at	H13	histocompatibility 13		+
	1389210_at	Lcp1	lymphocyte cytosolic protein 1		+
	1371033_at	LOC688090 /// RT1-Bb	similar to RT1 class II histocompatibility antigen, B-1 beta chain precursor (RT1.B-beta(1)) /// RT1 class II, locus Bb		+
	1393108_at	Mhc	histocompatibility antigen Class I		+
	1367847_at	Nupr1	nuclear protein, transcriptional regulator, 1		+
	1370463_x_at	RT1-CE16	RT1 class I, locus CE16		+
	1388071_x_at	RT1-EC2	RT1 class Ib, locus EC2		+
	1387839_at	RT1-N1 /// RT1-N2	RT1 class Ib, locus N1 /// RT1 class Ib, locus N2		+

Table 4-7. IPA upstream regulator analysis of the liver and the white adipose tissue DEGs

Tissue	Upstream Regulator	Molecule Type	Predicted Activation State	Target molecules in the dataset
Liver	SREBF1	Sterol Regulatory Element Binding Transcription Factor 1, transcription regulator	Activated	<p>N > C</p> <p>Tp53,Tmem97,Tm7sf2,Sqle*,Rdh11,Pmvk*,Pcsk9,Nsdhl*,Nfil3,Msmo1*,Miox*,Lss*,Insig1,Idi1,Hmgcs1*,Gpam,Gck,Fdps*,Fdft1,Fasn,Dhcr7*,Cyp51a1*,Csad,Cidea,Cdkn1a,Acss2*,Acly,Adh1c,Fas,Pls3</p> <p>N < C</p> <p>Pck1,Irs2,Dpy19l3,Cyp7a1,Vegfa,Thrsp,Scd,Nr0b2,Hmgcr*,Fads2,Fabp5,Elovl6,Cebpa,Bhlhe40,Acacb,Cebpb,Ethe1,Tf</p>
	SREBF2	Sterol Regulatory Element Binding Transcription Factor 2, transcription regulator	Activated	<p>N > C</p> <p>Tmem97,Tm7sf2,Sqle*,Rdh11,Pmvk*,Pcsk9,Nsdhl*,Msmo1*,Lss*,Insig1,Idi1,Hmgcs1*,Fdps*,Fdft1,Fasn,Dhcr7*,Cyp51a1*,Cdkn1a,Acss2*,Acly,Acaa2,Ebp,Plin2</p> <p>N < C</p> <p>Thrsp,Scd,Hmgcr*,Hes6,Fads2,Fabp5,Elovl6,Irs2</p>
	NR1H2, PXR	Pregnane X Receptor, xeno-sensing nuclear receptor	Activated	<p>N > C</p> <p>Tgm2,Pgrmc2,Insig2,Insig1,Hmgcs1,Gstm5,Gstm1,Fasn,Cyp2b6,Cth,Ces1c,Ces1,Cdkn1a,Fmo5,Aldh1a1,Cyp1a2</p> <p>N < C</p> <p>Tf,Ppara,Nr0b2,Nat8,Jun,Cyp7a1,Cpt1a,Scd,Elovl6,Cebpa,Alas1,Abcc2,Por</p>
	SMARCB1	Regulator of Chromatin, Subfamily B, Member 1, transcription regulator	Activated	<p>N > C</p> <p>Tp53,Ppp1r3c,Oas1,Mx1,Igfbp2,Gjb2,Fas,Cyp4a14,Cdkn1a,Atp1b1,A2m,Btg1,Dapk1</p> <p>N < C</p> <p>Dhfr,Ccnd1,Slc37a4,Pck1,Ill1a,Cyp4f8,Bnip3,Fos,Gadd45a</p>

Tissue	Upstream Regulator	Molecule Type	Predicted Activation State	Target molecules in the dataset
Liver	XBP1	X-Box Binding Protein 1, transcription regulator	Activated	N > C Stard5,Sdf2l1,Mcf2,Lman2,Hsp90b1,Ggcx,Fasn,Fas,Esr1,Dnajc10,Cyp1a2,Apoa1,Erp29,Cxcl2,S1pr1 N < C Xbp1,Vamp7,Herpud1
WAT	ANGPT2	Angiopoietin 2, growth factor	Activated	N > C Vcam1,Sod2,Serp1,Ptges,Hspa5,Hspa1a/Hspa1b,Hsp90aa1,Hmox1,Cyba,Cd68 N < C Txnip,Thbs2,Agtr1,Cryab,Col1a1
	ERBB4	Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 4, kinase	Activated	N > C Igfbp5,Gap43,Adam19,Hmox1 N < C Wisp2,Vegfd,Tln1,Timp3,Sfrp1,Rasa3,Ptgis,Hba1/Hba2,Fbln2,Egr1,Dusp1,Myc,Gja1
	SPDEF	SAM Pointed Domain Containing ETS Transcription Factor, transcription regulator	Activated	N > C Ucp3 N < C Vegfb,Fzd8,Dkk3,Ctgf,Col1a1,Cdh11,Ptprf
	SPI1	Spi-1 Proto-oncogene, transcription regulator	Activated	N > C Spp1,Psmb8,Mrc1,Lyz,Fos,Cybb,Ctss,Adgre1,Actb,Bcl6,C1qc,Cd68,Ddx21,Hspa8,Klf4 N < C Myc,Foxp1
	cerivastatin	hydroxymethyl-glutaryl coenzyme A inhibitor	Activated	N > C Vcam1,Hmox1,Fdps,Cd36,S100a9 N < C F3,Ctgf,Col1a1,Myc,Net1

Tissue	Upstream Regulator	Molecule Type	Predicted Activation State	Target molecules in the dataset
WAT	TGFBR1	Transforming Growth Factor Beta Receptor 1, kinase	Inhibited	N > C Hmox1 N < C Rgs3,Id4,Fmod,Fgf9,Ctgf,Col1a1,Bmp4,Bhlhe40,Bgn,Cldn5,Zfp36
	WNT3A	Wingless-Type MMTV Integration Site Family Member 3A, cytokine	Inhibited	N > C Vcam1,Serpinb1,Pnpla3,Pmp22,Igfbp5,Cd68,App,Pxylp1,Klf4,Gap43,Adamts4 N < C Wisp2,Timp3,Tcf4,Sparc,Sfrp2,Sdc4,Nek6,Myc,Mmd,Mitf,Gadd45g,Fmod,Fhl2,Cyr61,Ctgf,Col1a1,Bmp4,Xbp1,Txnip,Rhoa,Eng,Ddit4,Bgn
	CREB	CAMP Responsive Element Binding Protein	Inhibited	N > C Fos,Adk,Cntf,Nedd9,Pde3b,Rgs2,Sp1,Ucp1 N < C Synpo,Prkaa2,Mitf,Gja1,Foxp1,Egr1,Dusp1,Cxcl10,Adm,Gabbr1,Ier3,Lmo4,Per1,Per2,Star
	NFkB (complex)	Nuclear Factor Kappa B complex	Inhibited	N > C Spp1,Rt1-Ec2,Hmox1,Hla-a,Fos,Cyp3a5,Vcam1,Tfrc,Sod2,Slc2a4,Ptges,Plk2,Hspa9,G0s2,Fst,Cybb,Cgref1,Adgre1,App,Cd36,Clu,Itgav N < C Zfp36,Zc3h12a,Sdc4,Rsad2,Pim3,Nr1d1,Nfkbia,Myc,Krt19,Igfbp2,Ier3,Fam46a,F3,Egr1,Dmrt1,Dbp,Cxcl10,Ctgf,Cdh22,Cdc25b,Cbr3,Abcg1,Cyr61,Fgf1

Tissue	Upstream Regulator	Molecule Type	Predicted Activation State	Target molecules in the dataset
WAT	E2F1	transcription regulator	Inhibited	N > C Vcam1,Ucp1,Sp1,Sod2,Cyb5a,Cdkn2c,Adipo r2,Adk,Cav1,Fos,Hspa8,Maf,Plk2 N < C Ybx3,Vegfb,Rrm2,Prkaa2,Pola2,Nrp1,Myc,Krt 14,Egr1,Dusp1,Cryab,Ca2,Bnip3,Nfkbia,Bmp 4,Cdc25b,Cited2,Hist2h2aa3/Hist2h2aa4,Inmt ,Zfp36
	F2R	Coagulation Factor II Thrombin Receptor, g-protein coupled receptor	Inhibited	N > C Fos,Vcam1,Hmox1 N < C Rhoa,Gja1,F3,F2r,Egr1,Dusp1,Cyr61,Ctgf
	NEDD9	Neural Precursor Cell Expressed, Developmentally Down-Regulated 9, other	Inhibited	N > C Fos,App N < C Txnip,Plac8,Errfi1,Ddit4,Bnip3,Bhlhe40,Adm
	STAT4	Signal Transducer and Activator of Transcription 4, transcription regulator	Inhibited	N > C Serpinb1,Hla-dqb1,Stat1,Ccr5 N < C Sh3glb1,Rgcc,Ramp2,Plac8,Per1,Ndr1,Myc, Lpin1,Krt18,Klf9,Itga7,Irf3,Hist2h2aa3/Hist2h 2aa4,Gja1,Gcnt2,Gadd45g,Errfi1,Cxcl10

Only those with the absolute z-scores larger than 2.5 were shown.

Shaded column: predicted to be inhibited in N-group (negative z-score).

*; enzyme genes involved in cholesterol synthesis

Table 4-8. Amino acid and peptide concentration in the sera

Amino acid, peptide	N-group	C-group
glycine	2.63±0.091	3.10±0.213
alanine	8.34±0.313	6.38±0.396
Isoleucine	1.133±0.041	1.111±0.048
leucine	1.907±0.063	1.778±0.058
valine	2.43±0.055	2.11±0.046
serine	3.15±0.117	3.27±0.144
threonine	4.08±0.139	3.75±0.156
aspartate	0.440±0.062	0.457±0.098
glutamate	2.22±0.205	2.64±0.275
arginine	2.13±0.121	2.30±0.133
lysine	5.70±0.246	5.31±0.174
histidine	0.727±0.017	0.611±0.020
1-methylhistidine	0.076±0.001	0.087±0.003
3-methylhistidine	0.016±0.001	0.026±0.003
tyrosine	1.076±0.039	0.866±0.062
phenylalanine	0.699±0.017	0.719±0.024
cysteine	0.191±0.025	0.221±0.020
methionine	0.772±0.021	0.688±0.017
anserine	0.062±0.008	0.039±0.016
carnosine	0.248±0.010	0.264±0.015
g-aminobutyric acid	0.005±0.001	0.005±0.001
ethanolamine	0.217±0.019	0.231±0.023
ornithine	0.611±0.020	0.615±0.053

Shaded column: significant difference detected by t-test (n=6, $p < 0.05$).
Concentration in nmol / 20 μ L

第5章

総合討論 (総括と今後の展望)

5-1. 総括

約 60 年前に安藤百福氏によって開発された即席麺は、今日では国際的にも市民権を得た“食形態”に位置づけられている。簡便で、美味しく、安価な主食として日本食の一角を築いてきた。我が国古来の「うどん・そば」などと同様な小麦粉製品であるが、中華麺（ラーメン）をインスタント（即席）食にした点で全く異なる麺の文化を構築してきた。

本研究では主食としての即席麺の課題として、（１）食品工学面からのフライ麺の油脂低減技術の開発、（２）即席麺の栄養研究：PFC バランスとエネルギー代謝の解析、（３）機能性面からのチキンラーメンの生理効果の解析を実施した。以下に個別に総合討論を述べる。

（１）食品工学面からのフライ麺の油脂低減技術の開発

小麦は世界で最も普及している穀物の一つであり、様々な加工品が作られている。麺もその一つで、中でも即席麺製品は、湯を加えるだけですぐに食することができることから、単身や共働き世帯の増加を背景に国内外で利用が増えている。フライ麺の場合、フライ処理によって得られる特有の風味は消費者に好ましく受け入れられるが、一方、フライ中に麺は油を多く含むため高カロリーとなる。エネルギーの過剰摂取によると考えられる肥満や糖尿病が問題となっていることから、美味しさを維持した低カロリーのフライ麺の開発研究を実施し、本研究の着想起点とした。

フライ麺の油脂含量とグルテンの関係について検討した結果、製麺方法を変えることでグルテンの形態（ネットワーク構造）が大きく変化し、粗く疎なグルテンネットワークを持つ麺の方が油脂含量が低いことを明確にした。さらに、グルテンネットワーク形成を抑制する具体的な方法の 1 つとして、押し出し麺

帯成形および少ない回数の圧延の組み合わせを示した（低油脂麺）。フライ前の麺では、グルテンネットワーク中に糊化した澱粉粒が分散している。糊化澱粉粒に含まれる水分は、フライ時の高温加熱によって蒸発し、それによって生じた空隙の一部が油と置換される。低油脂麺では、麺線断面積および空隙率が小さいことから置換される油の量が少なくなり、麺の油脂含量が低くなったと考えられた。麺はグルテンタンパク質と澱粉が複雑に絡み合うことで独特の食感を創出するが、低油脂麺は澱粉の α 化度は変わらない新規フライ麺と位置づけられる。

要するに低油脂麺の開発のポイントは、グルテンネットワークを密ではなく、粗く疎な構造にすることにある。この場合、麺線断面積および空隙率が小さいことから置換される油量が少なくなる。さらに、麺の膨化程度（空隙率）が小さく、締まった食感になる傾向にある。一般的に、麺の品質を左右する「コシ」はグルテンネットワークの十分な形成と相関する。一方低油脂麺は、グルテンネットワークが疎ではあるが、即席麺として適切なバランスで湯戻り感と食感を表現することができる。

本研究では、フライ麺の油脂低減技術として麺帯成形の押し出し機、ロール機、圧延装置、切出し機などの各工程条件を解析し、新たな低油脂麺の製法（特許）を提唱した。本製法による低油脂麺の普及が期待されている。

（2）即席麺の栄養研究：PFC バランスとエネルギー代謝の解析

即席フライ麺は一般的に脂質の占める割合が高いと考えられている。食事中的脂質の量・質はエネルギー代謝に影響を及ぼす。脂質量に加えてさらに、PFC バランスがエネルギー代謝に総合的に関与することが知られている。しかし、分子レベルでの網羅的解析例は少ない。

そこで第3章では、即席麺の栄養効果を検討するために、PFC バランスの違

い (P=20 に固定, L 群; C:F=65:15, M 群; C:F=60:20, H 群; C:F=35:45) が生体のエネルギー代謝に与える影響を分子レベルで解析した。具体的には、肝臓および脂肪組織 (WAT・BAT) におけるトランスクリプトーム解析を行い、脂質割合とエネルギー代謝に関わる生体調節作用の一端を解析した。興味深いことに、L 群と M 群間の肝臓における遺伝子発現に大きな差は見られなかった (Figure 3-2)。脂質量が 20% までは、肝臓における栄養素代謝制御に変化がないと判断できる。一方、H 群 (F=45) では L (M) 群に比べ遺伝子発現が大きく異なっていた (Figure 3-2)。統計学的に抽出された変動遺伝子群には、糖代謝や脂肪酸代謝に関連する DEGs が多数含まれていた。H 群は L 群と比較して、肝臓中のトリアシルグリセロール、総コレステロールおよび総胆汁酸が上昇した。肝臓 DNA マイクロアレイ解析の結果、糖新生に関与する *serine dehydratase* や β 酸化を負に制御する *acyl-CoA thioesterase 1* 等が「スイッチ遺伝子」として見出され、M 群の食餌の付近が、エネルギー源として炭水化物から脂質を利用するために遺伝子発現がスイッチするターニングポイントであると考えられた。また、白色・褐色脂肪組織に共通のレギュレーターとして、脂質生合成の調節因子である *SREBF-1, -2* や *insulin induced gene-1, -2*、および転写因子 (*NFkB* および *PPAR α*) 等が見出され、肝臓と脂肪組織において、エネルギー蓄積・移動の遺伝子発現に異なる影響を与えたことが明らかになった。

上述したように、摂取脂質量 20% 程度において、糖質から脂質へのエネルギー代謝関連遺伝子の発現が切り替わるターニングポイントの可能性を推定した。今後、20~45% の間の脂質量での研究も興味深い。これまでの多くの研究では、ラードのみを用いた飼料例がほとんどであり、脂質 20% でも血液生化学データが変化することが報告されている。今回は大豆油を加えており、不飽和脂肪酸の効果が影響した可能性がある。即席麺製造には主にパーム油が用いられてお

り、PFC バランスのみならず、即席麺と同等の脂質成分を用いた詳細な解析が必要である。

(3) 機能性面からのチキンラーメンの生理効果の解析

チキンラーメンをラットに投与した時に生じる代謝変化および代謝産物の変動を解析した(第4章)。30%のチキンラーメンを含み、脂質エネルギー比が26%である食餌を30日間摂取したN群(noodle群)では、同質の栄養素を含む食餌(C群・対照群)と比較し、肝臓トリアシルグリセロールが低く、糞中コレステロールが高かった。また、N群では肝臓でのSREBFシグナルの活性化と白色脂肪組織での血管新生シグナルの亢進が予想された。N群で尿中ノルアドレナリンが高かったデータも考え合わせると、これら臓器中の代謝系が甲状腺ホルモンとノルアドレナリンとによって制御されていることが考えられた。N群の食餌にはグルタミン酸を含む遊離アミノ酸、香辛料(ショウガオール等)および他の物質(メーラード反応生成物等)が含まれており、これらの味物質が視床下部-下垂体系を介して脂質ホメオスタシスに影響を与えたと示唆された。

肥満はエネルギー摂取と消費の量的アンバランスによって生じる。食事バランス(PFCバランス)の乱れが主要な原因であると考えられている。そのため、肥満症の改善には摂取カロリー、とくに脂質の摂取制限が提唱されている。同時に、肥満症に対して有効な食品成分を有する食品を積極的に摂取することにより、予防・改善する可能性が明らかになっている。このような食品素材の効果として、エネルギー基質となる糖・脂質などの吸収抑制、熱産生亢進、摂食抑制、肥満状態の質的改善などの機能性が示唆されている。本研究のN群に含まれるアミノ酸や香辛料には上記の肥満症改善効果のエビデンスが明らかになっている。とくに香辛料に関しては、エネルギー代謝促進、抗炎症などの機能

があることから、分子レベルでのメカニズム解析は興味深い。また、視床下部-下垂体は脂質代謝を含むエネルギー代謝制御に関わる脳組織であることから、チキンラーメンに含まれる味物質が腸管を介して中枢に刺激を伝達する可能性も考えられる。

今後、脂質代謝改善を担う活性成分の単離・同定、複数の関与成分による相乗作用の解明、さらには当該成分を多く含む加工条件の検討が必要である。即席麺の3次機能（生体調節機能）は、これまで殆ど検討されてこなかったが、本研究が契機となりさらなる追究がなされることが期待される。

わが国で誕生した即席麺は世界中に普及し、年間消費数は約1,000億食にのぼっている。1958年に第一号商品が発売されてから現在に至るまで、製品工程に種々の改良が加えられ、消費者の感覚（味覚・嗅覚等）に働きかける機能、いわゆる2次機能を中心に進化し続けている。今後も、画期的なイノベーションを伴う高付加価値商品の登場が期待される。本研究は、PFCバランス変化に伴う代謝変化を解明するとともに、即席麺の製法および栄養的価値に関する学際的追究まで踏み込んで実施したものである。第2章で提示した油脂含量の低いフライ麺は、消費者の健康維持に具体的に貢献する。また、第4章の内容は、チキンラーメンおよびそれに含まれる味物質の機能性を科学的に証明した製品研究であり、食品科学研究ならびに食品産業の発展に寄与するものと考えられる。

5-2. 今後の展望

即席麺を始めとする加工食品は、手作り調理品と比較して栄養的に偏りがあると考える消費者が少なくない。一般的な即席麺において栄養バランス的に問題となるのは、ビタミン A・ビタミン C、マグネシウム・鉄・亜鉛等のミネラルや食物繊維が少ないこと、食塩（後述）およびフライ麺の場合は油脂（特に飽和脂肪酸）が多いこと、またアミノ酸バランスの点である。1食の食事「ミール」として完結しうるものにするためには、不足栄養素の補充が求められる。即席麺製品の場合、不足栄養素の麺への練り込みやスープへの添加、また具材（例えば卵）による栄養バランスの改善（卵の場合にはアミノ酸スコア向上）が対策として考えられる。この際、添加する物質の呈味性への影響や加熱安定性について十分考慮する必要がある。食物繊維のように加熱が問題とならない成分もあるが、一方、加熱により失活するものについては、安定化された化合物を使う必要がある。例えば、ビタミン C にグルコースを結合させた糖転移ビタミン C（L-アスコルビン酸 2-グルコシド）は、熱・光・酸素やアミノ酸・鉄等による酸化・分解を受けにくい。これは、小腸において α -グルコシダーゼにより加水分解され、ビタミン C として血中に吸収され体内で機能を発揮することが明らかにされている（Taniguchi *et al.*, 2012）。微量栄養素を強化した即席麺は、飢餓とそれに伴う栄養不足に苦しむ人々への国際支援の面からも期待される。World Food Program（WFP）によると、鉄（知能発達の遅れ）、ビタミン A（失明や、はしか・麻疹・マラリアによる死亡リスク増加）、ヨウ素（妊娠中の摂取不足による子供の知的障害）、亜鉛（幼少期の成長阻害と免疫不全）の不足が特に深刻となっており（Nutrition Service of the World Food Program, 2006）、これらを強化した即席麺は飢餓問題解決の一助となり得る。

即席麺の価値を「完全栄養食」として高めるためには、上述のような不足栄養

養素の補充による 1 次機能向上に加え、生体調節機能を有する成分を添加し新たな 3 次機能を付加することも選択肢の一つとなる。これまでの研究から、ポリフェノール類（カテキン・アントシアニン・セサミン・ケルセチン等）、カロテノイド類（カロテン・リコペン・ルテイン）、香辛料成分（ショウガオール（第 4 章）・イソチオシアネート・カプサイシン等）、機能性ペプチド（アンセリン・カルノシン・カゼインホスホペプチド等）・機能性アミノ酸（ γ -アミノ酪酸（ γ -amino butyric acid, GABA）・テアニン等）、プロバイオティクス・プレバイオティクス等の生理機能が明らかにされ、有望視されている（食品機能性の科学編集委員会、2008）。これらをサプリメントとして利用するのみならず、麺を有用物質のキャリアとして位置づけて麺に含有させたり、具材に含まれる有用物質を利用する等により、日常的で効果的な摂取が可能な機能性即席麺製品となる。

現在、食塩の過剰摂取が社会問題化している。日本における成人の 1 日あたりの食塩平均摂取量は、男性 10.8 g、女性 9.2 g であり（2016 年国民健康・栄養調査）、これは食事摂取基準（2015 年）の目標値である男性 8.0 g 未満、女性 7.0 g 未満を上回っており、減塩を行うことが必要とされている。日本人の塩分摂取量の 60～70% が、醤油・味噌等の調味料を中心とした加工食品から取られていることから、即席麺製造においても、呈味性を損なうことなく減塩を行うことが求められている。この際、消費者に受け入れられるために、急激に塩分を減らすのではなく、時間をかけて段階的に（例えば 5 年間で 15%）減らしていくことが有効であろう。減塩を目的として、塩味代替物質や塩味増強物質が望まれている。NaCl 以外に異味をほぼ伴わず塩味を呈する物質は LiCl である（Murphy *et al.*, 1981）が、毒性があるため食品として使用することはできない。そこで、塩味代替品として KCl が広く普及しているが、異味があり完全な

NaCl 代替品とは言い難い。陰イオンの異なる Na_2SO_4 、 CH_3COONa 等の Na 塩も、NaCl とは全く異なる味を呈する。

塩味増強物質の候補として、塩味受容体を活性化させるものが考えられる。塩味受容体の実体は長らく不明であったが、近年 epithelial sodium channel (ENaC) がマウスの塩味受容体として報告された (Chandrashekar *et al.*, 2010)。ENaC は上皮性ナトリウムチャネルの一種で、尿細管腔の原尿中のナトリウムを細胞内に流入させる働きをもつ。舌上皮にも存在し、ENaC を欠失したマウスでは低濃度の塩に対する感受性が低下したことから、少なくともマウスの塩味受容に関与していることは明らかである。しかし、塩への感受性を全て失うことはなく、ENaC 以外にも塩を受容する分子の存在が示唆されている。さらに、ヒトにおいては ENaC の貢献度は低いことが指摘されており、ヒトにおける塩味受容の全貌の解明が強く求められている。ヒトにおける塩味受容体が解明され、この受容体を活性化し塩味を増強させる物質が発見されれば、少ない食塩でも塩味を強く感じる事が出来るはずである。このような分子レベルでの減塩対策も視野に入れ、健康的でかつ嗜好性を満たす加工食品の創出によって世界 76 億人の豊かな食を支えるための研究が必要である。

即席麺に限らず、食品の安全性確保は必須の条件であり極めて重要である。原料に有害物質が含まれていないことを高精度で分析し確認するのみならず、加熱（蒸煮・フライ・乾燥）等の加工過程において新たな有害性物質が生じないように注意を払う必要がある。食品の加熱には有害微生物の殺菌、澱粉の糊化あるいは加熱フレーバーの生成等の目的があり、麺類の加工において加熱は不可欠である。一方、加熱によって、例えばアクリルアミドや最終糖化産物 (advanced glycation end-products, AGEs) といった有害物質 (heat-generated food toxicants, HEATOX) が生成することが明らかとなっており (Table

5-1)、HEATOX が生成されないような加工工程の確立が急務である。

AGEs は、タンパク質と糖との間の非酵素的糖化反応（メイラード反応）の後期段階で生成する構造体の総称で、老化や長期の糖尿病等で生じるタンパク質の構造的・機能的変性との関連が指摘される等、近年多くの報告がなされ注目されている（Ajith and Vinodkumar, 2016; Sharma *et al.*, 2015）。複数の化学構造が報告されており、中でも N ϵ -(carboxymethyl) lysine (CML) や N ϵ -(carboxyethyl) lysine (CEL) が主要な構造体であり、糖尿病への関与が指摘されている（Beisswenger, 2014）。また、AGEs 受容体 (receptor for AGEs, RAGE) は多様なクラスのリガンドと相互作用するパターン認識受容体であり、動脈硬化、関節炎、ガン、アルツハイマー症等の疾患に関わると考えられている（Ajith and Vinodkumar, 2016）。一方、可溶性 RAGE (soluble AGEs, sRAGE) は血清中で検出でき、RAGE の機能を中和する可能性があり、血清中の sRAGE 濃度が高いと冠動脈疾患、高血圧、メタボリックシンドローム、関節炎、アルツハイマー病のリスクが低くなると従来から言われている（Geroldi *et al.*, 2006）。食品中のメイラード反応生成物中の高毒性化合物が体内に蓄積し、上述のような疾病の進行に実際に関与するか否かについて現段階では全く不明であり、今後詳細に検討される必要がある。

我々が日常摂取する食物の中には、HEATOX のように既に明らかにされつつある危害物質以外に、構造、毒性、生成機構の未知な物質が存在する可能性がある。加工度の高い食品の製造販売者には、これらに対して先回りして予防策を講じる必要が求められる。例えば、肝臓組織や細胞に製品抽出物を添加し、遺伝子発現変化を網羅的に解析するトキシコゲノミクス (toxicogenomics) のような取り組みで、未知の毒性物質の有無を予測し回避する等の検討が必要であると考えられる。さらに、全ての人に対して安全な即席麺製品を提供するためには、小麦アレルギー患者のための低アレルギー化や、セリアック病患者用

のグルテンフリー製品の開発も望まれる。

小麦粉に含まれるグルテンおよび澱粉に関する研究も、今後益々重要となってくる。小麦のもつ加工特性は、タンパク質の 80%を占めるグリアジンとグルテニンから形成されるグルテンによるところが大きい。グルテンは小麦粉の中に存在せず、小麦粉に水を加えて捏ねることによって初めて形成される高分子量複合体である。グルテン複合体の分子量は 1,000,000 にも及ぶ高分子で、グリアジン、グルテニンの 3~5 のサブユニットから成る。長い小麦タンパク質の研究史の中で、グリアジンとグルテニンのサブユニット同士が構成する複合体は、常に解析対象になってきた。ジスルフィド結合は、グルテニン分子では分子間結合を生成し、高分子量の複合体を形成して、強靱かつ大きなサブユニットを形成する (Anjum *et al.*, 2007)。しかしながら、ジスルフィド結合だけで、グルテンの粘性、弾性を説明することは無理があり、ジスルフィド結合以外の結合（疎水結合、水素結合）等の存在も指摘されてきた。2001 年には、チロシンが関与する架橋構造が存在することも報告された (Tilley *et al.*, 2001) が、グルテン構造の分子レベルでの解明は、その複雑さから、全貌解明には至っていない。

小麦粉製品の食感を示す要素には力学的特性と組織構造とが挙げられている。力学的特性である粘弾性や伸展性は、麺の製造工程においても製品管理の面からも重要であり、アミログラフ、ファリノグラフ、エキソテンソグラフによってドウの力学的特性が測定される。力学的特性に加え、組織構造（グルテン構造）を解析する試みも同じく重要度が高い。本研究（第 2 章）において用いた走査型電子顕微鏡によって明らかにされる麺組織は、食感との対応関係があると考えられ、FT-IR による油脂の解析方法では、各成分の含有量だけでなく分布を可視化し評価することが出来る。組織学的観察評価に関しては、序論（第 1

章)において述べたように、抗グリアジン・グルテニン抗体による蛍光染色と、蛍光色素による澱粉粒・脂肪等の染色を組み合わせ、麺やパンの2次元構造を解析することによって3次元構造を予測する方法(福留ら、2014)や、麺を透明化試薬によって処理した後、2光子励起蛍光顕微鏡によってそれまでのz軸方向の深度を大きくとることで、より広範囲の3次元構造を可視化する方法(小川・松村、2016)等が確立されつつある。今後、グルテンに関する分子レベルでの解析、力学的・組織学的解析のそれぞれが新しい技術を取り入れ、製品の向上と製造過程における効率化に寄与することが望まれる。

諸外国へ即席麺を普及させることを考えると、その国の食文化や食経験、食事形態を考慮しなくてはならない。それぞれの国は独自の歴史の中に食文化が存在する。海外展開に当たっては、味や香りのみならず、食感を始めとする物理的な性質や形態も検討すべきである。将来的には、例えば人工知能(AI)によって、ヒトの感覚を精密かつ再現性良く予測することが可能となるかもしれない。

即席麺製品(カップ製品)は麺・スープ・具材から構成され、それぞれが乾燥状態で容器に入っている。それらは熱湯を注ぐと3~5分後に復元され食事として出来上がる。いわば乾燥・復元を中心とする技術の結晶である。麺・スープ・具材、そして三者を収める包材、これら全てに対して革新的技術が利用されている。

例えば、従来の即席麺は、ウェーブ(麺線切出し時の工夫により、麺線に波状のウェーブを付与した状態)や縮れがないと、麺線 α 化のための蒸煮工程において麺が強く結着しやすく、蒸煮・着味・フライ時に「ムラ」が生じて安定生産できなかったが、一方、麺線にウェーブや縮れがある状態では本格的なうどん・そば等を表現できないという問題点があった。そこで、麺線切出し時に

隣同士の麺線が並ぶ（揃う）ことのないよう、切出し位置をずらすよう切刃の構造に工夫を加えることにより、蒸し麺の強固な麺線結着が起こらず、ストレートな状態でも着味やフライにムラの生じない状態を得ることが可能となっている。スープ製造の場合は、抽出・調合・造粒等の多くの技術に支えられて、調理感の再現が試みられている。味・香りの評価は今でも官能評価が多くのウェートを占めるものの、味覚センサー・香りセンサーが開発され、客観的評価による味・香りの「数値化・見える化」「マッピング」が試みられようとしている（都甲・中本、2017）。上述した味覚・嗅覚受容機構の解明は、これらに対して具体的に寄与するとともに、官能評価による製品開発にも活かされると考えられる。具材開発にも食品科学（化学・工学）の知見が活かされ、乾燥素材が元の状態に限りなく近い状態に再現され「本物感」が演出される。さらに、大豆タンパク質を原料とする疑似肉（ソイ・ミート）のような、新しい加工素材も創出されている。畜肉により近い食感とするためのタンパク質研究（結着・組織化技術）や、畜肉の風味を生み出すフレーバリング技術等により、単なるイミテーションをはるかに超え新価値と言える利点を兼ね備えた素材を具材として用いることで、即席麺製品はさらに進化することができる。製品の生産工場もまた高度化すべき対象である。ロボット技術やAIを応用し省人化が図られつつある。このことにより、人件費削減のみならず、異物混入リスクを下げ食の安全性確保に大きく貢献することができる。

以上、即席麺に関する研究・開発における今後の展望を述べた。即席麺製品の製造には技術の粋が尽くされ、フルコース料理の如くあらゆる分野の技術が動員されることによって完成する。徹底的に技術にこだわり、栄養面、ナチュラル感、美味しさ、安全性等あらゆる面で可能性を追求し、即席麺の「食」としての価値をより向上させることが求められる。

Table 5-1. 加熱により生成する毒性を有する化合物

化合物	生成反応
アクリルアミド	アミノ酸と還元糖を 120°C以上で加熱
クロロプロパノール	タンパク質の酸分解と食塩や脂質とともに加熱
ヘテロサイクリックアミン	タンパク質やアミノ酸を 150°C以上で加熱
フラン	メイラード反応の副産物
4-メチルイミダゾール	メイラード反応の副産物
最終糖化産物	炭水化物や脂質を高温で長時間加熱
多環芳香族炭化水素	こげや燻製等の加熱で生成

引用文献

- Aguila M, Pinheiro AD, Parente LB, Mandarim-de-Lacerda CA, 2003. Dietary effect of different high-fat diet on rat liver stereology. *Liver International* 23: 363-370.
- Ajith TA, Vinodkumar P, 2016. Advanced glycation end products: Association with the pathogenesis of diseases and the current therapeutic advances. *Current Clinical Pharmacology* 11: 118-127.
- An YA, Sun K, Joffin N, Zhang F, Deng YF, Donze O, Kusminski CM, Scherer PE, 2017. Angiopoietin-2 in white adipose tissue improves metabolic homeostasis through enhanced angiogenesis. *Elife* 6: 22.
- Anjum FM, Khan MR, Din A, Saeed M, Pasha I, Arshad MU, 2007. Wheat gluten: high molecular weight glutenin subunits – Structure, genetics, and relation to dough elasticity. *Journal of Food Science* 72: R56-63.
- Aranibar N, Vassallo JD, Rathmacher J, Stryker S, Zhang YR, Dai J, Janovitz EB, Robertson D, Reily M, Lowe-Krentz L, Lehman-McKeeman L, 2011. Identification of 1-and 3-methylhistidine as biomarkers of skeletal muscle toxicity by nuclear magnetic resonance-based metabolic profiling. *Analytical Biochemistry* 410: 84-91.
- Bae IY, Kim HJ, Inglett GE, Lee S, 2016. Effect of whole grain wheat flour on the mixing properties, oil uptake, and in vitro starch digestibility of instant fried noodles. *Cereal Chemistry* 93: 100-103.
- Bargi-Souza P, Romano RM, Goulart-Silva F, Brunetto EL, Nunes MT, 2015. T-3 rapidly regulates several steps of alpha subunit glycoprotein

- (CGA) synthesis and secretion in the pituitary of male rats: Potential repercussions on TSH, FSH and LH secretion. *Molecular and Cellular Endocrinology* 409: 73-81.
- Beisswenger PJ, 2014. Methylglyoxal in diabetes: link to treatment, glycaemic control and biomarkers of complications. *Biochemical Society Transactions* 42: 450-456.
- Bickerton AST, Roberts R, Fielding BA, Hodson L, Blaak EE, Wagenmakers AJM, Gilbert M, Karpe F, Frayn KN, 2007. Preferential uptake of dietary fatty acids in adipose tissue and muscle in the postprandial period. *Diabetes* 56: 168-176.
- Breitling R, Armengaud P, Amtmann A, Herzyk P, 2004. Rank products: A simple, yet powerful, new method to detect differentially regulated genes in replicated microarray experiments. *FEBS Letters* 573: 83-92.
- Cahill GF, 1976. Starvation in man. *Clinics in Endocrinology and Metabolism* 5: 397-415.
- Cao YH, 2010. Adipose tissue angiogenesis as a therapeutic target for obesity and metabolic diseases. *Nature Reviews Drug Discovery* 9: 107-115.
- Chandrashekar J, Kuhn C, Oka Y, Yarmolinsky DA, Hummler E, Ryba NJP, Zuker CS, 2010. The cells and peripheral representation of sodium taste in mice. *Nature* 464: 297-U182.
- Cohen JC, Noakes TD, Benade AJS, 1988. Serum triglyceride response to fatty meals – Effects of meal fat content. *American Journal of Clinical Nutrition* 47: 825-827.
- Coyle EF, 1995. Substrate utilization during exercise in active people. *American Journal of Clinical Nutrition* 61: 968S-979S.

- Crescenzo R, Bianco F, Mazzoli A, Giacco A, Cancelliere R, di Fabio G, Zarrelli A, Liverini G, Iossa S, 2015. Fat quality influences the obesogenic effect of high fat diets. *Nutrients* 7: 9475-9491.
- Damiano F, Rochira A, Gnoni A, Siculella L, 2017. Action of thyroid hormones, T3 and T2, on hepatic fatty acids: Differences in metabolic effects and molecular mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences* 18: 19.
- Dennis G, Sherman BT, Hosack DA, Yang J, Gao W, Lane HC, Lempicki RA, 2003. DAVID: Database for annotation, visualization, and integrated discovery. *Genome Biology* 4.
- Deol P, Evans JR, Dhahbi J, Chellappa K, Han DS, Spindler S, Sladek FM, 2015. Soybean oil is more obesogenic and diabetogenic than coconut oil and fructose in mouse: Potential role for the liver. *Plos One* 10.
- Desvergne B, Michalik L, Wahli W, 2006. Transcriptional regulation of metabolism. *Physiological Reviews* 86: 465-514.
- Enns JE, Hanke D, Park A, Zahradka P, Taylor CG, 2014. Diets high in monounsaturated and polyunsaturated fatty acids decrease fatty acid synthase protein levels in adipose tissue but do not alter other markers of adipose function and inflammation in diet-induced obese rats. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 90: 77-84.
- Ernst ND, Cleeman J, Mullis R, Sooterbochenek J, Vanhorn L, 1988. The national cholesterol education-program – Implications for dietetic practitioners from the adult treatment panel recommendations. *Journal of the American Dietetic Association* 88: 1401-1408.

- Even PC, Bertin E, Gangnerau MN, Roseau S, Tome D, Portha B, 2003. Energy restriction with protein restriction increases basal metabolism and meal-induced thermogenesis in rats. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 284: R751-R759.
- Food and Nutrition Board, 2005. Dietary reference intakes, for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein, and amino acids. National Academies Press (Washington, DC).
- Gbelcova H, Rimpelova S, Ruml T, Fenclova M, Kosek V, Hajslova J, Strnad H, Kolar M, Vitek L, 2017. Variability in statin-induced changes in gene expression profiles of pancreatic cancer. *Scientific Reports* 7: 11.
- Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, Ellis B, Gautier L, Ge YC, Gentry J, Hornik K, Hothorn T, Huber W, Iacus S, Irizarry R, Leisch F, Li C, Maechler M, Rossini AJ, Sawitzki G, Smith C, Smyth G, Tierney L, Yang JYH, Zhang JH, 2004. Bioconductor: Open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biology* 5.
- Geroldi D, Falcone C, Emanuele E, 2006. Soluble receptor for advanced glycation end products: From disease marker to potential therapeutic target. *Current Medicinal Chemistry* 13: 1971-1978.
- Gulia N, Khatkar BS, 2013. Effect of processing variables on the oil uptake, textural properties and cooking quality of instant fried noodles. *Journal of Food Quality* 36: 181-189.
- Gulia N, Khatkar BS, 2014. Relationship of dough thermomechanical properties with oil uptake, cooking and textural properties of instant

- fried noodles. *Food Science and Technology International* 20: 171-182.
- Gulia N, Khatkar BS, 2015. Quantitative and qualitative assessment of wheat gluten proteins and their contribution to instant noodle quality. *International Journal of Food Properties* 18: 1648-1663.
- Hanke D, Zahradka P, Mohankumar SK, Clark JL, Taylor CG, 2013. A diet high in alpha-linolenic acid and monounsaturated fatty acids attenuates hepatic steatosis and alters hepatic phospholipid fatty acid profile in diet-induced obese rats. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 89: 391-401.
- Hashimoto Y, Yamada K, Tsushima H, Miyazawa D, Mori M, Nishio K, Ohkubo T, Hibino H, Ohara N, Okuyama H, 2013. Three dissimilar high fat diets differentially regulate lipid and glucose metabolism in obesity-resistant Slc:Wistar/ST rats. *Lipids* 48: 803-815.
- Hochreiter S, Clevert DA, Obermayer K, 2006. A new summarization method for affymetrix probe level data. *Bioinformatics* 22: 943-949.
- Hosack DA, Dennis G, Sherman BT, Lane HC, Lempicki RA, 2003. Identifying biological themes within lists of genes with EASE. *Genome Biology* 4.
- Huang DW, Sherman BT, Zheng X, Yang J, Imamichi T, Stephens R, Lempicki RA, 2009. Extracting biological meaning from large gene lists with DAVID. *Current Protocols in Bioinformatics*: 13.11. 1-13.11. 13.
- Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U, Speed TP, 2003. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* 4: 249-264.

- Itoh H, Kaneko M, Ohshima S, Shumiya S, Sakaguchi E, 2002. Effect of low protein and low energy diet on physiological status and digestibility of F344 rats. *Experimental Animals* 51: 485-491.
- Iwasaki Y, Morita A, Iwasawa T, Kobata K, Sekiwa Y, Morimitsu Y, Kubota K, Watanabe T, 2006. A nonpungent component of steamed ginger -10-shogaol- increases adrenaline secretion via the activation of TRPV1. *Nutritional Neuroscience* 9: 169-178.
- Jayarajan P, Reddy V, Mohanram M, 1980. Effect of dietary fat on absorption of beta-carotene from green leafy vegetables in children. *Indian Journal of Medical Research* 71: 53-56.
- Kamei A, Watanabe Y, Shinozaki F, Yasuoka A, Kondo T, Ishijima T, Toyoda T, Arai S, Abe K, 2015. Administration of a maple syrup extract to mitigate their hepatic inflammation induced by a high-fat diet: a transcriptome analysis. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 79: 1893-1897.
- Kondoh T, Torii K, 2008. MSG intake suppresses weight gain, fat deposition, and plasma leptin levels in male Sprague-Dawley rats. *Physiology & Behavior* 95: 135-144.
- Lee YH, Mottillo EP, Granneman JG, 2014. Adipose tissue plasticity from WAT to BAT and in between. *Biochimica Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* 1842: 358-369.
- Lee YY, Tang TK, Phuah ET, Alitheen NBM, Tan CP, Lai OM, 2017. New functionalities of Maillard reaction products as emulsifiers and encapsulating agents, and the processing parameters: A brief review. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 97: 1379-1385.

- Lei L, Liu YW, Wang XB, Jiao R, Ma KY, Li YM, Wang LJ, Man SW, Sang SM, Huang Y, Chen ZY, 2014. Plasma cholesterol-lowering activity of gingerol- and shogaol-enriched extract is mediated by increasing sterol excretion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62: 10515-10521.
- Lien EL, Boyle FG, Wrenn JM, Perry RW, Thompson CA, Borzelleca JF, 2001. Comparison of AIN-76A and AIN-93G diets: A 13-week study in rats. *Food and Chemical Toxicology* 39: 385-392.
- Mensink RP, Zock PL, Kester ADM, Katan MB, 2003. Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: A meta-analysis of 60 controlled trials. *American Journal of Clinical Nutrition* 77: 1146-1155.
- Michlig S, Merlini JM, Beaumont M, Ledda M, Tavenard A, Mukherjee R, Camacho S, le Coutre J, 2016. Effects of TRP channel agonist ingestion on metabolism and autonomic nervous system in a randomized clinical trial of healthy subjects. *Scientific Reports* 6: 12.
- Minana-Solis MeC, Escobar C, 2008. Post-weaning protein malnutrition in the rat produces short and long term metabolic impairment, in contrast to earlier and later periods. *International Journal of Biological Sciences* 4: 422-32.
- Mullur R, Liu YY, Brent GA, 2014. Thyroid hormone regulation of metabolism. *Physiological Reviews* 94: 355-382.
- Murphy C, Cardello AV, Brand J, 1981. Tastes of fifteen halide salts following water and NaCl: Anion and cation effects. *Physiology & Behavior* 26:

1083-1095.

Nutrition Service of the World Food Program, 2006. Micronutrient fortification: WFP experiences and ways forward. *Food and Nutrition Bulletin* 27: 67-75.

Pedersen AN, Kondrup J, Borsheim E, 2013. Health effects of protein intake in healthy adults: A systematic literature review. *Food & Nutrition Research* 57: 1-29.

Pimentel GD, Dornellas APS, Rosa JC, Lira FS, Cunha CA, Boldarine VT, de Souza GIH, Hirata AE, Nascimento CMO, Oyama LM, Watanabe RLH, Ribeiro EB, 2012. High-fat diets rich in soy or fish oil distinctly alter hypothalamic insulin signaling in rats. *Journal of Nutritional Biochemistry* 23: 822-828.

Poletto AC, Anhe GF, Eichler P, Takahashi HK, Furuya DT, Okamoto MM, Curi R, Machado UF, 2010. Soybean and sunflower oil-induced insulin resistance correlates with impaired GLUT4 protein expression and translocation specifically in white adipose tissue. *Cell Biochemistry and Function* 28: 114-121.

Portillo MP, Chavarri M, Duran D, Rodriguez VM, Macarulla MT, 2001. Differential effects of diets that provide different lipid sources on hepatic lipogenic activities in rats under ad libitum or restricted feeding. *Nutrition* 17: 467-473.

Riera CE, Menozzi-Smarrito C, Affolter M, Michlig S, Munari C, Robert F, Vogel H, Simon SA, le Coutre J, 2009. Compounds from Sichuan and Melegueta peppers activate, covalently and non-covalently, TRPA1 and TRPV1 channels. *British Journal of Pharmacology* 157:

1398-1409.

- Romijn JA, Coyle EF, Sidossis LS, Gastaldelli A, Horowitz JF, Endert E, Wolfe RR, 1993. Regulation of endogenous fat and carbohydrate-metabolism in relation to exercise intensity and duration. *American Journal of Physiology* 265: E380-E391.
- Shahkhalili Y, Mace K, Moulin J, Zbinden I, Acheson KJ, 2011. The fat:carbohydrate energy ratio of the weaning diet programs later susceptibility to obesity in male Sprague Dawley rats. *Journal of Nutrition* 141: 81-86.
- Shankar K, Harrell A, Kang P, Singhal R, Ronis MJJ, Badger TM, 2010. Carbohydrate-responsive gene expression in the adipose tissue of rats. *Endocrinology* 151: 153-164.
- Sharma C, Kaur A, Thind SS, Singh B, Raina S, 2015. Advanced glycation end-products (AGEs): An emerging concern for processed food industries. *Journal of Food Science and Technology - Mysore* 52: 7561-7576.
- Shinozaki F, Abe T, Kamei A, Watanabe Y, Yasuoka A, Shimada K, Kondo K, Arai S, Kumagai K, Kondo T, Abe K, 2016. Coordinated regulation of hepatic and adipose tissue transcriptomes by the oral administration of an amino acid mixture simulating the larval saliva of *Vespa* species. *Genes and Nutrition* 11: 10.
- Suzuki R, Shimodaira H, 2006. Pvcust: An R package for assessing the uncertainty in hierarchical clustering. *Bioinformatics* 22: 1540-2.
- Taniguchi M, Arai N, Kohno K, Ushio S, Fukuda S, 2012. Anti-oxidative and anti-aging activities of 2-O-alpha-glucopyranosyl-L-ascorbic acid on

- human dermal fibroblasts. *European Journal of Pharmacology* 674: 126-131.
- Tilley KA, Benjamin RE, Bagorogoza KE, Okot-Kotber BM, Prakash O, Kwen H, 2001. Tyrosine cross-links: Molecular basis of gluten structure and function. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 2627-2632.
- Uematsu A, Tsurugizawa T, Uneyama H, Torii K, 2010. Brain-gut communication via vagus nerve modulates conditioned flavor preference. *European Journal of Neuroscience* 31: 1136-1143.
- Uyama N, Geerts A, Reynaert H, 2004. Neural connections between the hypothalamus and the liver. *Anatomical Record Part a-Discoveries in Molecular Cellular and Evolutionary Biology* 280A: 808-820.
- Vasilopoulou E, Loubiere LS, Lash GE, Ohizua O, McCabe CJ, Franklyn JA, Kilby MD, Chan SY, 2014. Triiodothyronine regulates angiogenic growth factor and cytokine secretion by isolated human decidual cells in a cell-type specific and gestational age-dependent manner. *Human Reproduction* 29: 1161-1172.
- Vidon C, Boucher P, Cachefo A, Peroni O, Diraison F, Beylot M, 2001. Effects of isoenergetic high-carbohydrate compared with high-fat diets on human cholesterol synthesis and expression of key regulatory genes of cholesterol metabolism. *American Journal of Clinical Nutrition* 73: 878-884.
- Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, Brown RF, 1994. A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002).

- Journal of Biological Chemistry 269: 5241-5248.
- Wang XK, Cheng MJ, Zhao M, Ge AG, Guo FF, Zhang M, Yang YH, Liu LG, Yang NH, 2013. Differential effects of high-fat-diet rich in lard oil or soybean oil on osteopontin expression and inflammation of adipose tissue in diet-induced obese rats. *European Journal of Nutrition* 52: 1181-1189.
- Watanabe T, Terada Y, 2015. Food compounds activating thermosensitive TRP channels in Asian herbal and medicinal foods. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 61: S86-S88.
- World Health Organization. Global report on diabetes. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. (2016)
http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/204871/1/9789241565257_eng.pdf
- Wu ZJ, Irizarry RA, Gentleman R, Martinez-Murillo F, Spencer F, 2004. A model-based background adjustment for oligonucleotide expression arrays. *Journal of the American Statistical Association* 99: 909-917.
- Xue B, Nie J, Wang X, DuBois DC, Jusko WJ, Almon RR, 2015. Effects of high fat feeding on adipose tissue gene expression in diabetic Goto-Kakizaki rats. *Gene Regulation and Systems Biology* 9: 15-26.
- Yabe D, Brown MS, Goldstein JL, 2002. Insig-2, a second endoplasmic reticulum protein that binds SCAP and blocks export of sterol regulatory element-binding proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 12753-12758.
- Yang T, Espenshade PJ, Wright ME, Yabe D, Gong Y, Aebersold R, Goldstein JL, Brown MS, 2002. Crucial step in cholesterol homeostasis: Sterols promote binding of SCAP to INSIG-1, a membrane protein that

facilitates retention of SREBPs in ER. Cell 110: 489-500.

Zhang YQ, Yin LY, Hillgartner FB, 2003. SREBP-1 integrates the actions of thyroid hormone, insulin, cAMP, and medium-chain fatty acids on ACC alpha transcription in hepatocytes. Journal of Lipid Research 44: 356-368.

Zhao M, Zang BC, Cheng MJ, Ma Y, Yang YH, Yang NH, 2013. Differential responses of hepatic endoplasmic reticulum stress and inflammation in diet-induced obese rats with high-fat diet rich in lard oil or soybean oil. Plos One 8.

小川剛伸、松村康生, 2016. 麵内部のグルテンタンパク質の三次元ネットワーク構造の新規計測、日本農芸化学会 2016 年度大会講演要旨集.

小田聞多, 2003. (新訂) めんの本、食品産業新聞社.

貝沼圭二、松永暁子、板川正秀、小林昭一, 1981. β - アミラーゼ - プルラナーゼ (BAP) 系を用いた澱粉の糊化度、老化度の新測定法、澱粉科学、28, 235-240.

厚生労働省, 2014. 日本人の食事摂取基準 (2015 年版) 策定検討会報告書.

佐藤隆一郎、今川正良, 2007. 生活習慣病の分子生物学、三共出版.

食品機能性の科学 編集委員会, 2008. 食品機能性の科学、産業技術サービスセンター.

都甲潔、中本高道, 2017. においと味を可視化する：化学感覚を扱う科学技術の最前線、フレグランスジャーナル社.

長尾精一, 2014. 小麦の機能と科学、朝倉書店.

日本即席食品工業 (監修) , 1998. 新・即席めん入門、日本食糧新聞社.

福留真一、西辻泰之、隈丸潤、松宮健太郎、松村康生, 2014. ミキシングによる

パン生地タンパク質と油脂の相互作用とタンパク質の変化、化学と生物、52, 460-465.

松尾伸二、田中充, 2008. 世界初“宇宙食ラーメン”の開発、日本食品科学工学会誌、55, 517-519.

守屋岩夫、遠藤周、奥富保雄, 1992. 製パン材料の科学 (田中康夫、松本博 編著)、光琳.

謝辞

本研究は、日清食品ホールディングス株式会社グローバルイノベーション研究センターおよび東京大学寄附講座「味覚サイエンス」において行われたものであります。本学位論文の作成にあたり、多くの有益なるご助言とご指導を賜りました東京大学大学院農学生命研究科教授・佐藤隆一郎先生に厚く御礼申し上げます。

本研究の着想段階から、実験の実施、投稿論文の執筆に至るまで、終始温かいご指導・ご鞭撻を賜りました東京大学大学院農学生命研究科名誉教授・阿部啓子先生、特任教授・朝倉富子先生、特任准教授・石丸喜朗先生（現 明治大学農学部）および「味覚サイエンス」関係各位に深く感謝申し上げます。

動物実験実施に際し、高崎健康福祉大学准教授永井俊匡先生（第3章）および神奈川県立産業技術総合研究所安岡顕人先生（第4章）には、多くのご支援をいただきました。先生方のご尽力なくしては、本研究は為し得ませんでした。

日清食品ホールディングス株式会社代表取締役社長・安藤宏基 CEO には、学位取得にご理解いただき、多くの支援と叱咤激励をいただきました。また、同グローバルイノベーション研究センター各位には、多くのご協力をいただきました。ここに記し、感謝申し上げます。

論文の内容の要旨

論文題目 即席麺に関する食品科学および栄養学的研究

氏 名 田中 充

現在わが国では、単身や共働き世帯の増加を背景に、インスタント食品や冷凍食品、「中食」等の加工食品の利用が増えており、手軽で栄養バランスの良い食品の必要性が高まっている。一方、先進諸国では、エネルギーの過剰摂取によると考えられる肥満や糖尿病等の生活習慣病が問題となっている。これらのことから、食品に含まれるタンパク質 (P)・脂質 (F)・炭水化物 (C) のバランス (PFC バランス) の変化に伴う代謝変化や、簡便・保存性に優れ世界中に普及している即席麺に含まれる調味料・香辛料の複合的な生体調節機能を解明するとともに、嗜好性と栄養価を同時に満たせるような即席麺の加工方法の開発に取り組んだ。

序論に続く第 2 章では、これまでフライ麺の製造工程におけるグルテン形成と油脂含量との関係について明確にされていなかったことから、この点に着目して油脂含量の低いフライ麺の開発を行った。通常製法において、麺帯のロール複合およびロール圧延工程は、グルテンネットワークの形成を促進する。ロール複合と圧延回数を増やして圧延した、細密なグルテンネットワーク構造を持つ麺は、フライにより麺線が膨化し、麺線断面積及び空隙率が大きくなり、それに伴って、油脂含量が高くなった。一方、押し出し麺帯成形と少ない回数の圧延に変えることで、グルテンの形態 (ネットワークの構造) が大きく変化することを明らかにした。本研究で開発した作製方法による低油脂麺のグルテンネットワークは、粗く疎であった。低油脂麺では麺線の膨化が抑制され、麺線断面積及び空隙率が小さくなり、油脂含量が低くなった (通常製法麺 17.2%に対して、低油脂麺では 11.4%に低下)。

フライ前の麺では、グルテンネットワーク中に糊化した澱粉粒が分散している。糊化澱粉粒に含まれる水分は、フライ時の高温加熱によって蒸発し、それによって生じた空隙の一部が油と置換される。低油脂麺では、麺線断面積及び空隙率が小さいことから置換される油の量が少なくなり、麺の油脂含量が低くなったと考えられた。麺はグルテンと澱粉が複雑に絡み合うことで独特の食感が生じるが、押し出し成形と少ない回数の圧延を組み合わせることで、フライした際の残留油脂分が少なく、かつ澱粉の糊化度は変化しない新規フライ麺を創出することができた。

第 3 章では、食餌の CF 比 (カロリー比) を変化させた時の臓器での遺伝子発現変化を網羅的に解析した。マウスを 3 群に分け、CF 比の異なる飼料 (C:F=65:15(L 群), 60:20(M 群), 35:45(H 群)) で 9 週間飼育した。生化学的な事象として、H 群は L 群と比較して、血清トリアシルグリセロールが減少し、肝臓中のトリアシルグリセロール、総コレステロールおよび総胆汁酸が上昇した。肝臓の DNA マイクロアレイ解析を行ったところ、L 群・H 群間で 436 遺伝子が

発現変動した（発現上昇 206、発現低下 230）。このうち、L 群・M 群間では発現が変わらず、M 群・H 群間で変化した 375 遺伝子は、遺伝子オントロジー解析の結果、主として脂肪酸合成やサーカディアンリズムに関するものであり、H 群でコレステロール・胆汁酸合成が促進したことが示唆された。また、L→M→H 群での発現変化が直線的ではなく、谷型（M 群で最低）あるいは山型（M 群で最高）となった遺伝子（スイッチ遺伝子）として、糖新生に関与する *serine dehydratase* や β 酸化を負に制御する *acyl-CoA thioesterase 1* 等が見出された。このことから、M 群の食餌の付近が、エネルギー源として炭水化物から脂質を利用するために遺伝子発現がスイッチするターニングポイントであると考えられた。

さらに、肝臓トランスクリプトーム応答が、脂肪組織等の他のエネルギー代謝関連組織とどのように相互作用するのかを解析する目的で、白色脂肪組織および褐色脂肪組織においても同様に解析し、脂質代謝酵素遺伝子が H 群で特異的に発現低下したことを明らかにした。遺伝子変動の上流レギュレーター解析（Ingenuity Pathways Analysis, IPA）を行ったところ、白色・褐色脂肪組織に共通のレギュレーターとして、脂質生合成の調節因子である *sterol regulatory element-binding transcription factor 1* および *2*（SREBF-1, -2）や *insulin induced gene 1* および *2*、転写因子（PPAR α ）等が見出された。

以上のように、本章では、食餌の CF 比が、肝臓と脂肪組織において、エネルギー蓄積・移動の遺伝子発現に異なる影響を与えたことを明らかにした。

ところで、我々は食品を各種栄養成分ごとに独立して摂取するのではなく、味物質や加熱生成物とともに「食事」として摂取している。にもかかわらず、食事に含まれる多くの味物質やメイラード反応生成物が、動物の代謝にどのような影響を与えるのか殆ど解明されていない。そこで、第 4 章では、日常摂取する食品の例として即席麺（チキンラーメン）をラットに投与した時に生じる代謝変化および代謝産物の変動を解析した。30%のチキンラーメンを含み、脂質エネルギー比が 26%である食餌を 30 日間摂取した N 群（noodle 群）では、同質の栄養素を含む食事（C 群・対照群）と比較し、肝臓トリアシルグリセロールが低く、糞中コレステロールが高かった。視床下部一下垂体系、肝臓および白色脂肪組織におけるトランスクリプトーム解析を行ったところ、視床下部一下垂体系において *thyroid stimulating hormone*（甲状腺刺激ホルモン）- β を含む 9 種類の神経ペプチドの発現パターンが異なっていた。

ホルモンによる末梢組織の代謝制御が起こっている可能性が示唆されたことから、IPA ソフトウェアに搭載されている予測ツールを用いて、肝臓および白色脂肪組織の遺伝子発現を制御すると思われる上流分子の抽出を行った。その結果、脂質およびコレステロール代謝を調節する SREBF-1 および SREBF-2 が N 群で上昇する可能性が示された。また、白色脂肪組織における血管新生シグナルが N 群で亢進していることが予想された。

神経系および代謝系関連分子の発現パターンが、群間で異なることが示唆されたので、内分泌系の変化を検証するために尿中の副腎髄質ホルモン（カテコールアミン）を測定した。尿中ノルアドレナリンが N 群で高かったことから、肝臓および脂肪組織の代謝系が甲状腺ホルモンとノ

ルアドレナリンとによって制御されていることが考えられた。N 群の食餌にはグルタミン酸を含む遊離アミノ酸、香辛料（ショウガオール等）および他の物質（メーラード反応生成物等）が含まれている。これらの味物質が視床下部一下垂体系を介して脂質ホメオスタシスに影響を与えたことが示唆された。

以上のように、本研究は、PFC バランス変化に伴う代謝変化の解明のみならず、即席麺の製法および栄養的価値に関する学際的追究まで踏み込んで実施したものである。第 2 章で提示した油脂含量の低いフライ麺は、消費者の健康維持に具体的に貢献する。また、第 4 章の内容は、即席麺およびそれに含まれる味物質の機能性を科学的に証明した製品研究であり、食品科学研究ならびに食品産業の発展の一助となることが期待される。