

研究ノート

DNA マイクロアレイ解析を活用した大豆の機能性評価

高橋 陽子*[§], 小西 智一**

* 独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所

** 秋田県立大学 生物資源科学部

Evaluation of functional properties of soybean using DNA microarray

Yoko TAKAHASHI*[§] and Tomokazu KONISHI**

* National Food Research Institute, National Agriculture and Food Research Organization,
2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642, Japan

** Department of Bioresource Sciences, Akita Prefectural University, Shimosinjo Nakano, Akita 010-0195, Japan

Abstract

The effect of dietary whole soybeans on rats was analyzed in the level of gene expression using DNA microarray. As soybean content increased in diet, lipid levels in serum and liver were generally lowered. To remove unwanted variation in mRNA expression signals to enable a compatible comparison across different experiments, the DNA microarray data was normalized in accordance with three-parameter log-normal distribution. DNA microarray analyses elucidated that hepatic transcriptome was globally altered depending on the amount of soybean in diets. Among various biological functions, soybean was found to specifically affect transcriptomes involved in lipid/fatty acid biosynthesis in liver. mRNA expressions of these lipogenic genes were lowered with increased amount of soybean in diet. By comparing DNA microarray data across multiple experiments, it was revealed the comprehensive functionality of soybean was correlated with that of freeze-dried tofu. Thus, DNA microarray provides powerful information for understanding the food functionality when those gene expression data is handled properly.

Keywords: soybean (大豆), DNA microarray (DNA マイクロアレイ), liver (肝臓), gene expression (遺伝子発現)

[§] 連絡先 (corresponding author), youkot@affrc.go.jp

緒言

大豆は他の豆類と比べ、タンパク質のほか、オリゴ糖、食物繊維、イソフラボン、ミネラル等の栄養素が豊富である¹⁾。大豆タンパク質は、1999年に米国FDAで心血管病のリスクを低下させるヘルスクレームが承認されたように¹⁾、複数のヒト介入試験で、血中LDLコレステロールを低減させる作用が報告されてきた²⁾。大豆食品にはタンパク質だけではなく、不飽和脂肪酸や食物繊維、ビタミン・ミネラル類が多く含まれる一方、飽和脂肪酸が少ないことも、心血管病やがん、更年期障害、骨粗鬆症等に対して有益であると考えられている³⁾。また、多種類の機能性成分が含まれる食品には、成分同士の相乗作用のように、一つの機能性成分だけでは期待できない効果が生じる可能性が少なからず存在する⁴⁾。それにもかかわらず、大豆を含めた食品の機能性研究では、機能性成分の特定とそのメカニズム解明に関心が向けられることがほとんどであり、大豆そのものの健康作用を示すデータは少ないのが現状である。

このように、未知のファクターが多く、どのような効果が示されるかが不明な食品成分の影響を解析するには、全ゲノムトランスクリプトーム解析が適している⁵⁾。DNAマイクロアレイ解析は、栄養素によって生じた機能性の作用メカニズムを網羅的にプロファイリングし、遺伝子発現レベルで同定することが可能である。また、個人間や食群間での食品成分に対する小さな応答の違いも検出できるため、一次的なスクリーニングにも用いられる。近年、この技術は食品の機能性解析の分野で広く利用されるようになってきたが、全ゲノムの情報は膨大であるため、データの解析法や解釈に戸惑うケースが多いようである。特に、バイオインフォマティクスや統計解析の知識が十分でない、研究者の都合が良いようにデータを解釈しがちになり、ひいてはデータの改竄になりかねない。この問題に対処するため、様々なマイクロアレイデータの標準化法や解析法が提案されているが、決定的な方法はまだ示されていない⁶⁾。

筆者らは、これまでに構築してきた数々の知見を基にして確立したマイクロアレイデータの標準化法を用い⁷⁾、研究対象とするトランスクリプトームの状態を網羅的に定量できるこの測定方法の特長を生かした、食品の機能性を解析する方法を開発した。先行研究では、この方法により凍り豆腐の機能性を解析したとこ

ろ、凍り豆腐の血清脂質濃度抑制作用は、豆腐中のタンパク質成分が、肝臓での脂質・コレステロール合成系を遺伝子発現レベルで抑制するために生じることが明らかとなった⁸⁾。本研究では、大豆そのものの機能性をDNAマイクロアレイ解析により評価した。遺伝子発現レベルでの変化の全体像から、大豆の影響を受ける生物学的機能性の特定、さらに他の大豆食品の機能性と比較することで、大豆そのものが有する機能性の特徴を解明した。

実験方法

1. 飼料用大豆

酵素失活大豆粉（愛知県産フクユタカ）は西尾製粉（株）より購入した。青臭みの元になるリポキシゲナーゼと、消化阻害物質であるトリプシンインヒビターを、生大豆の状態特殊加工により失活させたものである。大豆粉100g中の栄養成分は以下の通りであった；エネルギー1792 kJ、水分10.0 g、タンパク質40.0 g、脂質20.0 g、炭水化物24.5 g、食物繊維11.8 g、灰分5.5 g（製造者による分析値）。

2. 動物実験

4週齢のSprague-Dawley雄性ラット（日本チャールス・リバー（株））を明暗サイクル（点灯7:00、消灯19:00）、室温（22℃±1℃）、湿度（55–65%）が一定の飼育室にて市販の標準飼料で5日間予備飼育した。その後、ラットをランダムに4群に分け、大豆粉含量の異なる食餌で21日間飼育した（ $n=7-8$ ）。試験飼料中の大豆粉は、100gあたり0g（Soy0）、12.5g（Soy12.5）、25g（Soy25）または50g（Soy50）とした（表1）。食餌タンパク質、脂質および食物繊維量は、各群とも20、15、および5g/100gとなるように、カゼイン、パーム油およびセルロースで調整した。試験期間中は自由に飲水・摂食させた。飼育終了後にエーテル麻酔下で腹部大動脈より採血し、肝臓および脂肪組織を採取して重量を測定した。本実験は食品総合研究所動物実験委員会の承認を得て、同所規定の動物実験ガイドラインに従い実施した。

3. 血清および肝臓脂質濃度の測定

血清中の中性脂肪、総コレステロール、高比重リポタンパク質（HDL）コレステロール、リン脂質、遊離脂肪酸は、市販の測定キットを用いて測定した（和光純薬工業（株））。肝臓脂質は、Folch法により総脂質

表 1. 食餌組成

Ingredients (g/kg diet)	Soy0	Soy12.5	Soy25	Soy50
Casein ¹	200	150	100	0
Soy powder ²	0	125	250	500
Cornstarch	150	150	150	150
Sucrose	449.5	402.5	355.4	261.3
Palm oil	100	75	50	0
Cellulose	50	47	44	38
Mineral mix ³	35	35	35	35
Vitamin mix ⁴	10	10	10	10
L-Cystine	3	3	3	3
Chorine bitartrate	2.5	2.5	2.5	2.5

Soy0, 大豆0%食; Soy12.5, 大豆12.5%食; Soy25, 大豆25%食; Soy50, 大豆50%食.

¹ カゼイン, 乳由来 (和光純薬 (株))

² 酵素失活大豆粉 (西尾製粉 (株))

³ AIN-93 ビタミン混合 (オリエンタル酵母工業 (株))

⁴ AIN-93G ミネラル混合 (オリエンタル酵母工業 (株))

を抽出した後, 中性脂肪濃度は比色定量法により, コレステロール濃度はコレステロールオキシダーゼを用いた方法により測定した⁹⁾.

4. DNA マイクロアレイによる遺伝子発現量の測定

各群から摂食量が平均的であった5個体ずつを選抜し, 肝臓サンプルから得た総RNAを鋳型として, 3' IVT Express Kit (Affymetrix (株))によりビオチン標識サンプルを作製した. 1サンプルに1枚のAffymetrix社製Rat Genome 230_2.0アレイと反応させ, 組織で発現している遺伝子の量を測定した. 発現量の生データはスカイライト・バイオテック (株)のSuperNORMサービスを利用して, 3パラメータ対数正規分布モデルを使ったパラメトリック法により標準化し, 発現量をzスコアに変換した⁸⁾. Affymetrix社のDNAマイクロアレイの場合, 1遺伝子の発現量測定につき複数のperfect match (PM)と呼ばれる異なるプローブ配列を持つスポットを有しており, 同一遺伝子であっても配列により感度に差が生じる. そこで, 食餌群間の遺伝子発現量の差は, PMの感度と食餌群の違いによる二元配置分散分析で算出した¹⁰⁾. 大豆を含まないSoy0群と大豆を含む他の食餌群間のzスコアの差 (Δz) が0.2以上で, 危険率0.5%以下 ($p < 0.005$)の遺伝子を, 大豆摂取により発現量が有意に変化したと判断した. この条件により選抜された遺伝子は, DNAマイクロアレイ上に存在する31,042個のうち9,084個であった.

5. DNA マイクロアレイデータの処理

(1) 主成分分析

DNAマイクロアレイ解析では, 各食餌群で測定した遺伝子数分の多次元なデータが得られる. その膨大なデータの扱いや解釈は容易ではない. まず, 遺伝子発現レベルで全体の変化を俯瞰するために, 主成分分析を実施した. 主成分分析により, 多次元データが持つ情報をできるだけ損なわず, 少ない次元に縮約して視覚化することで, 解釈を容易にすることができる¹¹⁾. 本研究では, 前項で選抜基準をクリアした遺伝子全てのデータについて, 各群の平均値の行列から主成分の軸を算出し, 各サンプルをその軸上に展開することで, サンプルと遺伝子の主成分を求めた.

(2) 大豆摂取の影響を受けた生物学的機能の探索

大豆摂取の影響を受ける生物学的機能の特徴を捉えるため, 選抜された全遺伝子について, Affymetrix社のデータベース (<http://www.affymetrix.com/support/technical/byproduct.affx?product=rat230-20>)で遺伝子名を特定し, 各遺伝子が有すると断定または予測されている生物学的機能をGene Ontology Biological Processデータベース (<http://rgd.mcw.edu/>)で検索した. これらの情報から, 選抜された遺伝子群の中に多く出現した機能性キーワードを二項分布により検定した¹⁰⁾. このうち, 出現遺伝子数が5個以上かつp値が1%以下の有意なキーワードを選抜した.

(3) 他の実験系との比較

農産物である大豆と、これを加工した大豆食品（凍り豆腐）の機能性を比較するため、本研究のDNAマイクロアレイデータと、凍り豆腐の機能性を解析した先行研究⁸⁾のデータを調べた。両研究とも、同じパラメトリック法でデータを標準化したため、双方のデータは比較と統合が可能である⁷⁾。両食品の機能性の相関は、大豆（食品）を含む食餌群と、含まない食餌群で得られた遺伝子発現データの差から評価した。大豆についてはSoy0群（カゼインベースの無大豆食）とSoy20（食餌中のタンパク質源の全てが大豆由来）群との差、凍り豆腐についてはC（カゼイン食）群とT20（食餌中のタンパク質源の全てが凍り豆腐由来）群⁸⁾との差をとり、両研究間の相関を調べた。

6. 統計処理

DNAマイクロアレイ解析以外の統計処理は、ソフトウェアSPSS 13.0J for Windows（日本IBM（株））を用い、実験結果は平均値±標準偏差（SD）で表した。一元配置分散分析の後、Tukey-Kramerの多重比較検定（ $p < 0.05$ ）で群間差を調べた。

実験結果および考察

飼育期間終了後の体重・体重増加量および飼育期間中の摂食量は、各群間で有意差はなかった（表2）。

肝臓重量は、大豆を含まない食餌群と比べると、大豆を12.5%以上含む食餌群で、脂肪組織重量はSoy50群で有意に減少した。同様に、血清中の脂質濃度も大豆食で低い値を示し、Soy0群との差は、総コレステロール濃度では大豆を25%以上含む食餌群で、リン脂質はSoy50群で、遊離脂肪酸濃度はSoy12.5とSoy50群で有意であった。また、肝臓の中性脂肪濃度は大豆を12.5%以上含む食餌群で有意に低くなった。このことから、大豆タンパク質等の精製成分で示されているように^{1,2)}、大豆は脂質代謝を改善する食品であることが確認された。

以上を裏付けるように、肝臓におけるトランスクリプトームは、食餌中の大豆量と相関を保ちつつ変化した。主成分分析の結果、この変化は第1主成分に現れ、最も少ない食餌大豆量でも変化は確認された（図1）。大豆が多い食餌群の個体ほど、負の方向にプロットされた。第1主成分の寄与率は77%であることから、食餌中の大豆の量は、遺伝子発現量の変化を説明する大きな要素であることがわかる。同様に投与量に依存すると考えられる若干の副次的効果が第2主成分に確認される。これらの効果は明白であり、サンプルの位置のばらつきで表される個体間差よりはるかに大きいものだった（図1）。

また、第1主成分の値が大きかった遺伝子は、いずれも大豆摂取によって発現量が抑制された遺伝子であった。これらの遺伝子からは、脂肪酸および脂質合

表2. 食餌中の大豆含有量がラットの体重・臓器重量および血清・肝臓脂質濃度に及ぼす影響

	Soy0	Soy12.5	Soy25	Soy50
Final body weight (g)	325 ± 9	336 ± 19	328 ± 24	331 ± 19
Body weight gain (g/day)	8.56 ± 0.59	9.11 ± 0.98	8.72 ± 1.15	8.86 ± 0.79
Food consumption (g/day)	21.2 ± 0.7	21.3 ± 1.3	21.0 ± 1.5	20.8 ± 1.1
Liver (g/100 g BW)	4.97 ± 0.46 ^b	4.39 ± 0.42 ^a	4.41 ± 0.24 ^a	4.18 ± 0.26 ^a
Adipose tissue weight (g/100 g body weight)				
Epididymal	1.16 ± 0.18 ^b	1.13 ± 0.22 ^b	1.01 ± 0.19 ^{ab}	0.837 ± 0.091 ^a
Perirenal	1.73 ± 0.22 ^b	1.79 ± 0.27 ^b	1.73 ± 0.39 ^b	1.14 ± 0.29 ^a
Serum lipids (mmol/L)				
Triacylglycerol	2.14 ± 0.32	1.72 ± 0.51	1.99 ± 0.29	1.68 ± 0.50
Total cholesterol	1.94 ± 0.16 ^c	1.85 ± 0.31 ^{bc}	1.56 ± 0.24 ^{ab}	1.39 ± 0.38 ^a
HDL-Cholesterol	1.26 ± 0.41 ^{ab}	1.37 ± 0.29 ^b	1.16 ± 0.30 ^{ab}	0.859 ± 0.334 ^a
Phospholipid	2.41 ± 0.14 ^b	2.09 ± 0.19 ^{ab}	2.00 ± 0.23 ^{ab}	1.57 ± 0.20 ^a
Free fatty acid	0.974 ± 0.264 ^b	0.614 ± 0.163 ^a	0.722 ± 0.166 ^{ab}	0.615 ± 0.176 ^a
Liver lipids (μmol/g)				
Triacylglycerol	25.7 ± 11.5 ^b	12.5 ± 6.2 ^a	13.4 ± 3.3 ^a	14.4 ± 7.2 ^a

値は平均値±SDで示す（各群7-8匹）。表中のa-cの表示は、異なる文字を付した群間で有意差があることを示す（ $p < 0.05$ ）。

成に関わるキーワードが高頻度で確認された(表3)。一方、脂質代謝以外の機能性については、特徴的な生物学的機能を示すキーワードはほとんど見られなかった。主成分分析で第1主成分の値が大きかった脂質合成関連遺伝子で、各食餌群における発現量を個別に見ると、いずれも大豆の量に反して低下する傾向が認められた(図2)。したがって、大豆の摂取は脂質代謝に影響を与えること、特に脂肪酸や脂質の合成が抑制されることが明らかになった。

さらに、大豆と凍り豆腐を対象とした2つの実験間で、遺伝子発現の変化は正の相関を示した(図3)。これは、大豆と凍り豆腐が有する作用機作が共通していることを示唆している。また、相関を示す回帰直線の傾きは0.414であった。大豆と凍り豆腐の機能性が同等であれば傾きは1に近くなるため、大豆は凍り豆腐よりも全般的にやや弱い機能性を有すると考えられる。本研究では、遺伝子発現データは対数正規分布するとの数理モデルに基づいて、パラメトリック法により遺伝子発現データを標準化しているため⁷⁾、異なる

実験群で得られたデータであっても、遺伝子発現量の比較が可能である。他の研究グループでも、異なる実験間のデータ比較に適した標準化法が検討されているが¹²⁾、DNAマイクロアレイの原理に則った方法はほとんど存在しないようである。

このように、研究目的に沿った実験計画を用意することで、ノイズを管理しながらデータの本質を明らかにすることができる。また適切な計算手法を用いれば、DNAマイクロアレイのような包括的なデータでも、実験を超えた比較ができる。こうした一般性のある解析方法は、それぞれの実験から得た知見を統合するために重要である。

謝 辞

本研究は、農林水産省委託プロジェクト研究「農林水産物・食品の機能性等を解析・評価するための基盤技術の開発」の一部として行われたものである。

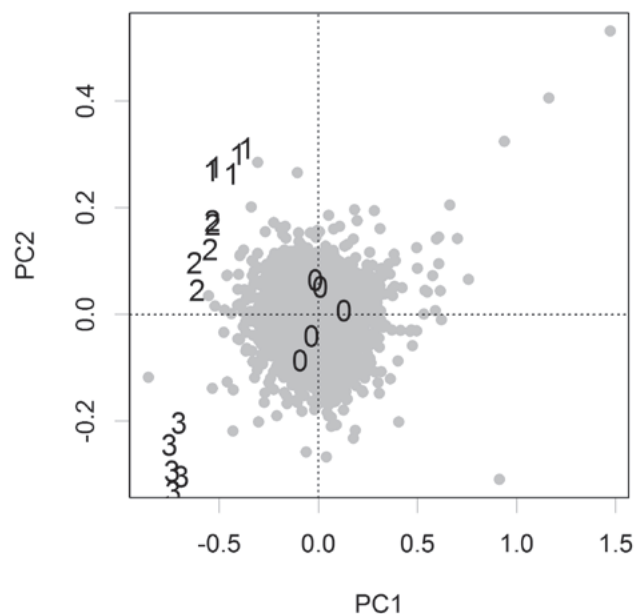


図1. 食餌中の大豆含有量がラット肝臓の遺伝子発現全般に及ぼす影響(サンプルと遺伝子の主成分分析)

Soy0群と比べてSoy12.5, Soy25, またはSoy50群での発現量が有意に異なる遺伝子を選抜し、これら遺伝子全ての発現量変化の情報をbiplotで表した(各群5匹)。図中の数字は各サンプルの群名を表す: 0, Soy0; 1, Soy12.5; 2, Soy25; 3, Soy50。灰色の円は1つの遺伝子を表す。X軸(第1主成分)で正の値をとる遺伝子は大豆によって発現抑制されたものである。Y軸は第2主成分である。

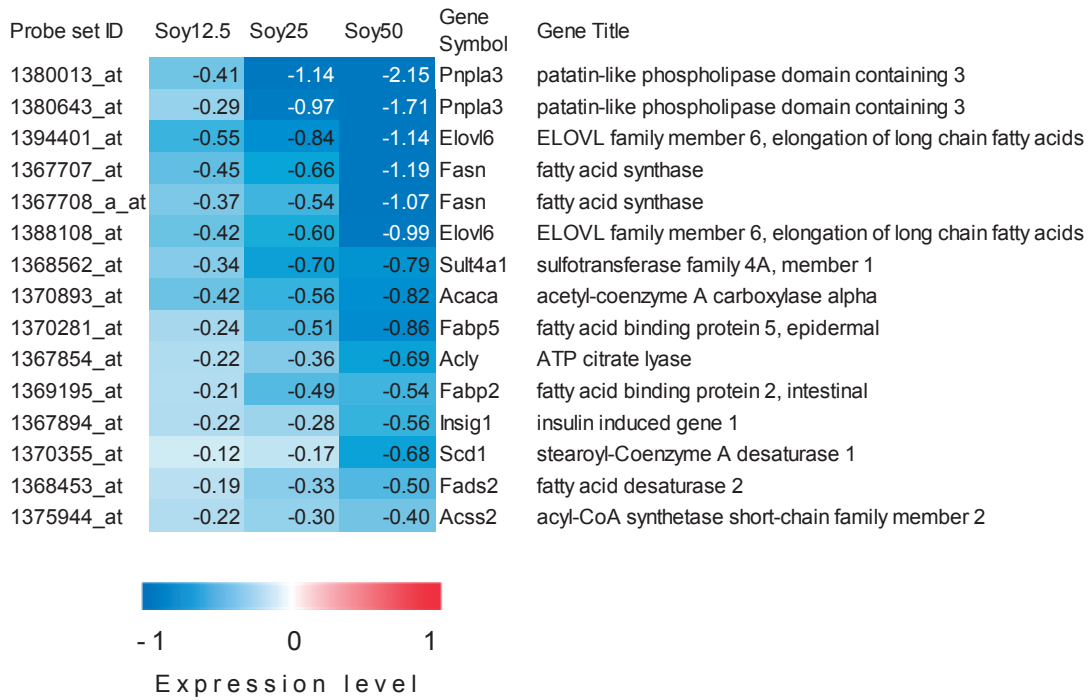


図2. 大豆がラット肝臓の脂質合成関連遺伝子の発現に及ぼす影響

脂質合成のキーワードを有する、第1主成分の上位15遺伝子の発現量を示す。発現量は、 Δz [(Soy0) - (Soy12.5, Soy25 または Soy50)] で表した (各群5匹)。

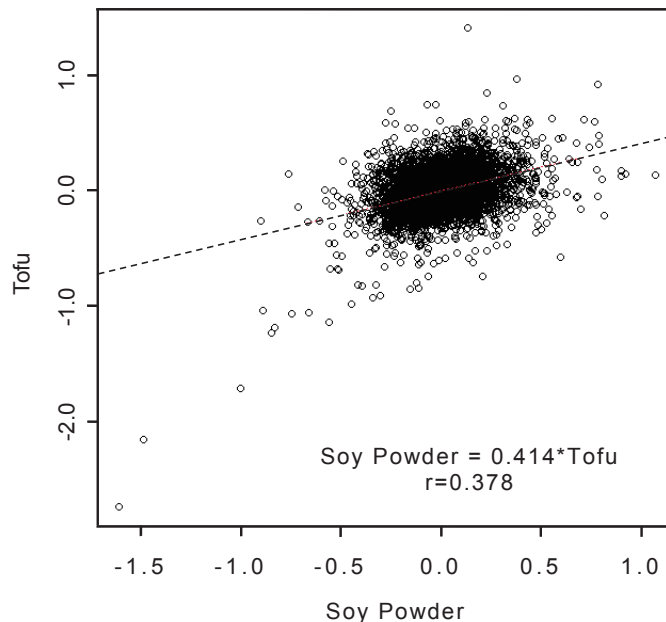


図3. 大豆と凍り豆腐がラット肝臓の遺伝子発現全般に及ぼす影響の比較 (相関)

X軸は、本研究での大豆摂取の影響を比較したデータ (Soy0 - Soy50)、Y軸は、先行研究⁹⁾での凍り豆腐摂取の影響を比較したデータ [C (カゼイン食) - T20 (凍り豆腐由来タンパク質20%食)] とし、両研究で2群の差が有意であると判定された遺伝子をプロットした。

表 3. 第 1 主成分で有意に出現確率が高かった生物学的機能キーワード

PC1-Positive			
Category of Gene Ontology Biological Process	Total contents	Frequency selected	<i>p</i> -value
metabolic process	2384	40	5.62×10^{-9}
biosynthetic process	1364	30	1.67×10^{-9}
lipid metabolic process	309	18	1.41×10^{-12}
lipid biosynthetic process	160	17	4.77×10^{-15}
fatty acid biosynthetic process	87	12	5.20×10^{-13}
response to organic cyclic substance	321	12	9.38×10^{-7}
response to drug	588	11	1.16×10^{-3}
oxidation reduction	610	10	4.86×10^{-3}
cellular response to insulin stimulus	103	9	2.18×10^{-8}
response to insulin stimulus	180	9	2.21×10^{-6}
response to glucose stimulus	139	8	2.96×10^{-6}
response to nutrient	250	8	1.82×10^{-4}
response to cAMP	108	7	5.81×10^{-6}
fatty acid metabolic process	125	7	1.48×10^{-5}
carbohydrate metabolic process	216	7	4.27×10^{-4}
acetyl-CoA metabolic process	10	6	6.62×10^{-11}
triglyceride biosynthetic process	23	6	9.16×10^{-9}
steroid metabolic process	89	5	2.52×10^{-4}
response to retinoic acid	109	5	6.25×10^{-4}

PC1-Negative			
Category of Gene Ontology Biological Process	Total contents	Frequency selected	<i>p</i> -value
metabolic process	2384	34	3.79×10^{-6}
oxidation reduction	610	18	5.88×10^{-8}
transmembrane transport	687	12	1.25×10^{-3}
response to nutrient	250	8	1.82×10^{-4}
response to glucocorticoid stimulus	195	6	1.43×10^{-3}
anion transport	41	5	6.58×10^{-6}

各群 5 匹の DNA マイクロアレイデータから、遺伝子数が 5 個以上のカテゴリー（キーワード）を選抜した。

要 約

DNA マイクロアレイを用い、遺伝子発現レベルでラットにおける大豆の機能性を解析した。食餌中の大豆の量が増えるとともに、血清および肝臓の脂質濃度は全般的に低下した。DNA マイクロアレイで得られた、遺伝子発現シグナルに含まれる不要なノイズを除き、異なる実験間で遺伝子発現変化の比較ができるように、3 パラメータ対数正規分布に従ってデータを標準化した。DNA マイクロアレイ解析によって、肝臓のトランスクリプトームは、食餌中の大豆の量に応じて全体的に変化することが観察された。数々の生物学的機能のうち、大豆は肝臓での脂質・脂肪酸合成に関わるトランスクリプトームに特異的に影響した。これらの脂質合成系遺伝子の mRNA 発現量は、食餌大豆

量の増加に伴い低下した。複数の実験間で DNA マイクロアレイデータを比較することにより、大豆の総合的な機能性は、凍り豆腐の機能性と相関があることが明らかになった。このように、DNA マイクロアレイ解析は、遺伝子発現データが適切に取り扱われるとき、食品の機能性を理解するための説得力のある情報をもたらすことができる。

引用文献

- 1) Mateos-Aparicio, I., Redondo Cuenca, A., Villanueva-Suárez, M.J. and Zapata-Revilla, M.A., Soybean, a promising health source. *Nutr. Hosp.*, **23**, 305-312 (2008).
- 2) Anderson, J.W. and Bush, H.M., Soy protein effects

- on serum lipoproteins: a quality assessment and meta-analysis of randomized, controlled studies. *J. Am. Coll. Nutr.*, **30**, 79-91 (2011).
- 3) Sacks, F.M., Lichtenstein, A., Van Horn, L., Harris, W., Kris-Etherton, P. and Winston, M., Soy protein, isoflavones, and cardiovascular health. an American Heart Association Science Advisory for Professionals from the Nutrition Committee. *Circulation*, **113**, 1034-1044 (2006).
 - 4) Jacobs, Jr., D.R., Gross, M.D. and Tapsell, L.C., Food synergy: an operational concept for understanding nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.*, **89S**, 1543S-1548S (2009).
 - 5) Keijer, J., van Helden, Y.G., Bunschoten, A. and van Schothorst, E.M., Transcriptome analysis in benefit-risk assessment of micronutrients and bioactive food components. *Mol. Nutr. Food Res.*, **54**, 240-248 (2010).
 - 6) Ramasamy, A., Mondry, A., Holmes, C.C. and Altman, D.G., Key issues in conducting a meta-analysis of gene expression microarray datasets. *PLoS Med.*, **5**, e184 (2008).
 - 7) Konishi, T., Three-parameter lognormal distribution ubiquitously found in cDNA microarray data and its application to parametric data treatment. *BMC Bioinformatics.*, **5**, 5 (2004).
 - 8) Takahashi, Y. and Konishi, T., Tofu (soybean curd) lowers serum lipid levels and modulates hepatic gene expression involved in lipogenesis primarily through its protein, not isoflavone, component in rats. *J. Agric. Food Chem.*, **59**, 8976-8984 (2011).
 - 9) Takahashi, Y. and Ide, T., Effects of soy protein and isoflavone on hepatic fatty acid synthesis and oxidation and mRNA expression of uncoupling proteins and peroxisome proliferator-activated receptor gamma in adipose tissues of rats. *J. Nutr. Biochem.*, **19**, 682-693 (2008).
 - 10) Konishi, T., Konishi, F., Takasaki, S., Inoue, K., Nakayama, K. and Konagaya, A., Coincidence between transcriptome analyses on different microarray platforms using a parametric framework. *PLoS One*, **3**, e3555 (2008).
 - 11) Jackson, J.E., PCA with more than two variables. In "A user's guide to principal components," 1st ed. (Wiley), pp26-62 (1991).
 - 12) Autio, R., Kilpinen, S., Saarela, M., Kallioniemi, O., Hautaniemi, S. and Astola, J., Comparison of Affymetrix data normalization methods using 6,926 experiments across five array generations. *BMC Bioinformatics.*, **10**, S24 (2009).

引用 URL

- i) <http://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?c=ecfr;sid=502078d8634923edc695b394a357d189;rgn=div8;view=text;node=21%3A2.0.1.1.2.5.1.13;idno=21;cc=ecfr> (2012.11.21)