

## 論文の内容の要旨

氏名：稲 成信

博士の専攻分野の名称：博士（生物資源科学）

論文題名：米アルブミンの食後血糖値上昇抑制効果と機能性食品素材としての物理化学的性質の評価に関する研究

### 緒論

現在、糖尿病の患者数は4億2000万人にのぼり、2045年までに約7億人に増加すると予測されている。糖尿病は、症状や発症原因の違いにより「1型糖尿病」と「2型糖尿病」の2種類に分類され、その大半は2型糖尿病である。2型糖尿病とは、肥満・体質といった遺伝的因子と、食生活、喫煙、運動不足などの環境因子が複雑に関係して発症する疾患であり、膵臓のランゲルハンス島β細胞からのインスリン分泌低下と末梢組織でのインスリン感受性低下に伴う慢性的な高血糖が主な発症原因である。この2型糖尿病の予防には、食後の血糖値上昇を抑制することが有効であると考えられており、そのような作用を有する食品成分の探索が広く行われてきている。

食事由来のデンプンが、口腔内および小腸内のα-アミラーゼおよびα-グルコシダーゼによってグルコースまで分解されると、小腸でグルコーストランスポーターが発現し、小腸から血中へグルコースが輸送され、血糖値が上昇する。血糖値が上昇すると、膵臓のランゲルハンス島β細胞からインスリンが分泌され、血中から抹消細胞へとグルコースが輸送されることにより、血糖値が低下する。従って、血糖値の上昇を抑制するには、消化酵素の阻害、グルコースの吸着による排出促進、インスリンの分泌促進、グルコーストランスポーターを介したグルコースの輸送阻害などの方法が考えられる。これまでの研究において、カルボキシメチルセルロースなどの水溶性食物繊維が、グルコースを吸着し消化管内での拡散を防ぐことで、その吸収を阻害することが知られている。また、小麦、大麦、ライ麦、インゲン豆などの穀類・豆類の種子タンパク質に含まれているα-アミラーゼインヒビター(α-AI)は、消化管内において、デンプン分解酵素であるα-アミラーゼの活性を抑制することで、食後の血糖値の上昇を穏やかにすることが知られている。特に、小麦種子のアルブミン(Wheat albumin: WA)に含まれるα-AIは、血糖値上昇抑制効果を有する特定保健用食品(消費者庁省許可)に使用されている。しかし、小麦タンパク質は、アレルゲンとなった場合、アナフィラキシーを伴う重篤な症状を示す危険性がある。一方、小麦と同じイネ科植物の稲(*Oryza sativa*)の種子である米のアルブミン(Rice albumin: RA)にもα-AIが豊富に含まれることが知られているが、これまでに詳細な検討は行われていない。また、米アレルギーでは、アナフィラキシー症状を示すことはないと言われていたことから、RAに哺乳類のα-アミラーゼに対する阻害活性があれば、血糖値上昇抑制作用を有する新たな機能性食品素材になると考え、本研究を開始した。

また、タンパク質を機能性食品素材として利用するには、その加工特性も重要である。タンパク質の中には、起泡性や乳化性などの食品加工上有用な特性を有するものもあるが、タンパク質は一般的に加熱やpH変化に弱く、変性により機能が消失したり、溶解性・起泡性・乳化性が低下するといった現象が起こることが多い。

そこで本研究では、まず、RAの食後血糖値上昇抑制効果について検討し、その作用メカニズムの解明を行った。次に、RAの機能性食品素材としての利用可能性を調べるため、熱耐性・溶解性・起泡性・乳化性といった物理化学的性質の評価を行なった。

## 1. 米アルブミンの食後血糖値上昇抑制作用の検討

まず、米を粉砕し、得られた米粉から、水溶性タンパク質として RA を抽出した。この抽出タンパク質を SDS-ポリアクリルアミド電気泳動にて分離したところ、RA の分子質量は 14 kDa および 16 kDa であった。RA が  $\alpha$ -アミラーゼに対する阻害活性を有するか検討するため、哺乳類としてヒト唾液とブタ膵臓由来、昆虫としてミールワーム由来の  $\alpha$ -アミラーゼを用いて、これらに対する RA の阻害活性を評価した。その結果、RA は、ミールワーム由来の  $\alpha$ -アミラーゼに対しては強力な阻害活性を示したものの、哺乳類由来の  $\alpha$ -アミラーゼに対しては阻害活性を示さなかった。しかし、RA にタンパク質消化酵素を作用させたところ、ペプシンで2時間、パンクレアチンで6時間処理しても、14 kDa のバンドが残存し、消化耐性が高いペプチドが存在することが明らかとなった。このことから、RA は、WA のような  $\alpha$ -アミラーゼ阻害による血糖値上昇抑制作用は示さないものの、食物繊維のようなグルコースの吸着・排出促進による血糖値上昇抑制作用を示す可能性があると考えられた。

そこで、RA を用いて、経口デンプン負荷試験 (Oral Starch Tolerance Test: OSTT) および経口グルコース負荷試験 (Oral Glucose Tolerance Test: OGTT) を行った。まず、Wistar 系ラットに、デンプンと共に RA を投与した場合には、デンプンのみを投与したコントロール群と比べて、食後血糖値と血漿インスリン値の上昇が有意に抑制された。また、デンプン投与後 90 分間での血中総取込みグルコース量を示す曲線下面積 (グルコース AUC) および 90 分間での血漿中総分泌インスリン量を示す曲線下面積 (インスリン AUC) においては、RA 投与群はコントロール群と比べ減少傾向を示した。さらに、グルコースと共に RA を投与した場合においても、グルコースのみを投与したコントロール群と比べて、食後の血糖値と血漿インスリン値の上昇が有意に抑制された。また、グルコース AUC およびインスリン AUC においても、RA 投与群はコントロール群と比べ減少傾向を示した。

以上の結果から、RA は、デンプンばかりでなくグルコースを投与した場合においても、食後の血糖値・インスリン値の上昇を抑制し、その効果は、WA のような糖質分解酵素の阻害とは異なるメカニズムであることが明らかになった。

## 2. 米アルブミンの食物繊維様作用の評価

前章において、RA が食後血糖値・インスリン値上昇抑制効果を有し、糖尿病の予防に有効な食品素材であることが明らかとなった。しかしながら、RA は WA と異なり、哺乳類の  $\alpha$ -アミラーゼの阻害活性を示さず、デンプン投与時だけでなくグルコース投与時にも、血糖値・インスリン値上昇抑制効果を示すなど、その作用メカニズムは、これまでに報告がある穀類アルブミンとは異なっていると考えられた。そこで本章では、RA の食後血糖値・インスリン値上昇抑制効果が、その食物繊維様作用によるものかについて検討した。

まず、RA が消化管内で作用するのか否かを検討するため、腹腔内グルコース負荷試験 (Intraperitoneal Glucose Tolerance Test: IPGTT) を行った。Wistar 系ラットに RA を経口胃内投与し、その 15 分後に、腹腔内にグルコースを投与し、血糖値の変化を測定した。もし、RA が消化管内で作用しているのであれば、血糖値の変化は、RA を投与しないコントロール群と同じになる。一方、もし RA が消化吸收後に血中で作用しているのであれば、血糖値の上昇は抑制されるはずである。その結果、RA を経口投与しても、血糖値の変化はコントロール群とほぼ同じであった。また前章において、RA は、グルコースを経口投与後の血糖値・インスリン値の上昇を抑制した。インスリンの分泌量低下は、グルコース吸収量の減少を示すことから、IPGTT の結果とあわせて、RA の血糖値上昇抑制効果は、小腸管腔内におけるグルコースの吸収抑制によるものと考えられた。

小腸においてグルコースの吸収を抑制する物質としては、水溶性食物繊維が知られている。食物繊維は、一般的に難消化性の多糖を指すが、タンパク質にも難消化性のものがある。例えば、大豆中の疎水性タンパク質は、生体内の消化酵素で分解されにくく、高分子のまま消化管内に到達し、脂質を吸着することでその吸収を抑制することが報告されている。しかし、水溶性タンパク質による糖質の吸収阻害に関する報告はほとんどない。そこで、RA が既知の水溶性食物繊維と同様に、グルコース吸着能を示すのか、半透膜を用いたグルコース拡散試験にて検討した。その結果、RA は血糖値上昇抑制効果が知られている食物繊維と同様にグルコース吸着能を示した。しかし、元々RA 中に含まれる 14 kDa のタンパク質がグルコース吸着能を示すか、あるいは、16 kDa のタンパク質の一部分解により生成した 14 kDa のペプチドが作用を示すのかは定かではない。

そこで、RA に消化酵素を作用させた後、残存している 14 kDa のタンパク質/ペプチドの同定を質量分析計を用いて行った。その結果、この 14 kDa のバンドは、16 kDa のタンパク質の分解物であり、16 kDa のタンパク質は、NCBI データベース上の  $\alpha$ -amylase inhibitors and seed storage protein subfamily に属する Os07g0214300 であることが明らかになった。従って、16 kDa の RA タンパク質は、消化酵素により、2 kDa 以下の低分子ペプチド (LMP) と 14 kDa の高分子ペプチド (HMP) に分解され、14 kDa の HMP は高い消化耐性を持つことが示された。得られたアミノ酸配列情報から、立体構造既知の WA を鋳型とし、タンパク質モデリングサーバー (SWISS-MODEL) を用いて構造特性を推定した結果、16 kDa の RA は、分子内に 5 つものジスルフィド結合を有する強固に折りたたまれた構造をもつことが示唆され、この構造特性が高い消化耐性の一因であると推察された。

RA の酵素消化物からこの 14 kDa の HMP を分画し、上記と同様の方法で半透膜を用いたグルコース拡散試験を行った結果、HMP も RA と同様にグルコース吸着能を有することが示された。

これらのことから、RA の摂取により消化管内で生成した難消化性ペプチドの HMP が、グルコースを吸着し、その排出を促進することで、食後血糖値の上昇が抑制されたと考えられる。

### 3. 米アルブミン分解ペプチドの食後血糖値上昇抑制作用

前章において、RA の血糖値・インスリン値上昇抑制効果は、難消化性高分子ペプチドの糖吸着・排出促進作用によることが示唆された。しかしながら、RA からは消化酵素によって 2 kDa 以下の LMP も生成し、RA の効果には、これらの低分子ペプチドも寄与している可能性が考えられる。そこで本章では、RA 分解ペプチドの食後血糖値・インスリン値上昇抑制効果について検討した。

まず、RA をアルカリ処理することで変性させ、消化耐性を喪失させた。その後トリプシン処理を行うことで、RA 全てを低分子化した RA 加水分解物 (RAH) を作製した。この RAH をグルコースと共に Wistar 系ラットに投与し、OGTT を行った。その結果、RAH 投与群も RA 投与群と同様に、食後血糖値とインスリン値上昇を有意に抑制した。従って、RA の食後血糖値上昇抑制効果には、難消化性の高分子ペプチドによる食物繊維様の作用だけではなく、低分子ペプチドも寄与していることが示唆された。

そこで次に、RA をトリプシンで消化した後、ゲルろ過クロマトグラフィーによって HMP と LMP に分離し、それらを用いて OGTT を行った。RA からは、2 : 1 の重量比で HMP と LMP が生成したことから、Wistar 系ラットに、グルコースと共に RA の 2/3 量の HMP あるいは 1/3 量の LMP を投与し、血糖値・インスリン値の変化を測定した。その結果、HMP 群と LMP 群のいずれにおいても、食後血糖値・インスリン値の上昇が有意に抑制された。前章の IPGTT 結果から、RA は消化管内で作用することが明らかになっている。従って、低分子ペプチドの小腸内におけるグルコース吸収抑制作用メカニズムとしては、小腸上皮細胞におけるグルコース輸送の機能阻害が考えられる。

小腸からのグルコースの取り込みは、 $\text{Na}^+$ /グルコース共輸送体である SGLT1 を入口として行われる。SGLT1 は空腹時にほとんど発現せず、グルコース投与後に瞬時に発現し、発現量は投与したグルコースの濃度に比例することが知られている。そこで、LMP が SGLT1 の発現に及ぼす影響を、マウス小腸上皮モデル細胞である STC-1 細胞を用いて評価した。その結果、LMP を培地中に添加することで、高グルコース添加時においても SGLT1 の発現量が著しく抑制された。

以上の結果から、RA の血糖値・インスリン値上昇抑制効果は、難消化性の HMP によるグルコースの吸着・排出促進といった食物繊維様の効果と、LMP の小腸上皮細胞における SGLT1 の発現阻害という、二つの働きに起因していることが明らかとなった。

#### 4. 機能性食品素材としての米アルブミンの物理化学的性質の評価

タンパク質を食品素材として工業的に製造・加工する場合、溶解性・熱安定性・乳化性・起泡性などの物理化学的性質が高いことも重要である。しかし、タンパク質の中には、ネイティブな状態においては高い機能性や加工特性を有していても、加熱や酸・アルカリ処理により変性し、その特性を失うものも多い。従って本章では、RA の健康機能性食品素材としての利用可能性を評価するため、その物理化学的性質を、食品産業で一般的に使用されるカゼイン、大豆タンパク質分離物 (SPI)、および乾燥卵白 (DEW) と比較した。

まず、RA の熱安定性を示差走査熱量測定 (DSC) を用いて測定した。その結果、RA の変性ピーク温度は  $100.8^{\circ}\text{C}$  と非常に高温であったが、還元剤の添加により変性ピークが  $52.0^{\circ}\text{C}$  へとシフトした。このことから、第2章で推定された分子内の5つのジスルフィド結合が、熱安定性に寄与していることが示唆された。

続いて、食品の一般的な pH 値である pH3-8 の範囲における RA の溶解性、乳化性、起泡性を評価した。その結果、RA は pH3-8 の範囲において、いずれも 80%以上の優れた溶解性を示し、 $80^{\circ}\text{C}$ 、20 分の加熱後もほとんど変化しなかった。また、RA はいずれの pH においても、安定した乳化性と起泡性を示し、pH 3-5 の範囲における乳化性は、4 つのタンパク質の中で最も優れ、pH 4-5 の範囲における起泡性は、DEW と同程度まで高かった。

以上の結果から、RA は、優れた熱安定性と溶解性をもち、食品の一般的な pH において安定した乳化性と起泡性を示す加工性に優れた機能性食品素材であることが明らかになった。

#### 総括

本研究では、RA が食後血糖値上昇抑制作用を有し、糖尿病の予防に有効な機能性食品素材であることを明らかにした。また、その効果が、生体内のタンパク質消化酵素の分解により生成する HMP のグルコースの吸着排出促進といった食物繊維様の効果と、LMP の小腸上皮細胞における SGLT1 の発現阻害によるグルコースの吸収阻害という、二つの働きに起因することを明らかにした。さらに、RA が優れた物理化学的性質を有する、食品工業的な取り扱いに適した機能性食品素材であることを明らかにした。RA は、食用として長年摂取されている米を原料とするものであるため、安全性は高いと思われる。また、RA は精白米の胚乳の表面近傍に多く含まれ、日本酒製造において米を削った際に出る削り粉、米加工品を製造する際の洗米廃液から抽出することが可能であり、廃棄物有効利用の観点からも好ましい食品素材である。本研究の成果は、糖尿病予防効果が期待される新たな機能性食品素材の開発および未利用資源の活用において大きく寄与するものである。