

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

日本大学大学院 生物資源科学研究科

稲 成信

2019

【目次】

第1章 序論	1
第2章 米アルブミンの食後血糖値および血漿インスリン値上昇抑制効果 の検討	10
2-1 緒言	10
2-2 実験材料と方法	13
2-3 結果	20
2-4 考察	33
第3章 米アルブミンの食物繊維様作用の評価	36
3-1 緒言	36
3-2 実験材料と方法	38
3-3 結果	45
3-4 考察	56
第4章 米アルブミン分解ペプチドの食後血糖値および血漿インスリン値 上昇抑制効果の検討	60
4-1 緒言	60
4-2 実験材料と方法	62
4-3 結果	68
4-4 考察	75

第 5 章 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	79
5-1 緒言	79
5-2 実験材料と方法	81
5-3 結果	87
5-4 考察	99
第 6 章 総括	104
引用文献	112

第 1 章 序論

現在，世界における糖尿病とその合併症を発症する患者数は，4 億 2,000 万人にのぼり（WHO, 2016; Table 1-1），わが国においても，食生活の欧米化や人口の高齢化に伴い，その増加が懸念されている。厚生労働省の調査によると，国内における糖尿病患者とその予備軍は 2,000 万人にのぼり，これは成人の 6 人に 1 人が糖尿病とその予備軍であることを示している（厚生労働省, 2017）。

糖尿病の発症には，遺伝的な要因のみでなく食生活や生活環境などの環境因子が複雑に関係しており，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 種類に分類される（Figure 1-1）。1 型糖尿病とは，膵臓のランゲルハンス島 β 細胞が死滅することによるインスリンの慢性的不足により発症する疾患である。その主な原因は，自己免疫細胞が自らのランゲルハンス島 β 細胞を攻撃する自己免疫性であるといわれている（Bach, 1994; Castano and Eisenbarth, 1990; Eisenbarth, 1986）。一方，2 型糖尿病とは，肥満・体質といった遺伝的因子（Mokdad *et al.*, 2003）と，食生活（Hu *et al.*, 2001a）・喫煙（Willi *et al.*, 2007）・運動不足（Hu *et al.*, 1999）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量低下と，末梢組織のインスリン感受性低下の二つを主な発症原因とする。どちらの疾患においても，インスリンの分泌異常とそれに依存する慢性的な高血糖が発症の原因であり，日常の食事におけるインスリン分泌を強く刺激する糖質の過剰な摂取もそれらを誘発する要因の一つとして考えられている（Hu *et al.*, 2001b）。このような背景から，現在では，糖尿病の発症と進行には，食後の血糖値上昇とインスリンの分泌が密接に関係していると認識されるように

なった。

Jenkins や Wolever は、食後の血糖値変化が食後のインスリン分泌パターンと類似していることを見出し、糖質食品を摂取した際の血糖応答を glycemic index (GI) として表すことで、糖尿病予防の指標に用いることを提案した (Jenkins *et al.*, 1981; Wolever and Jenkins, 1986; Wolever *et al.*, 1991; Wolever *et al.*, 1994)。GI とは、食餌由来の炭水化物が体内でグルコースへと分解される割合を相対的に表す数値であり、グルコースを摂取した際の血糖値上昇を 100 とし、食餌由来の炭水化物を摂取した際の血糖値上昇の度合いを相対値で表したものである (Figure 1-2)。これは、食餌摂取時の血糖値上昇曲線下面積を、グルコース摂取時の血糖値上昇曲線下面積で割ることにより算出される値である。糖尿病予防の指標として GI の活用が推奨される理由は、糖質食品を摂取した際の血糖応答やインスリン分泌の推定が可能となることにある。

GI は、個々の食品に固有の値であり、食品の成分・形態・調理方法によって変化する。そのため、同じ食材由来だからと言って GI が同じとは限らず、うどんと白パンのように同じ小麦粉由来の食品によっても GI は異なる。代表的な糖質食品の GI を挙げると、米飯 (GI: 48)、白パン (GI: 95)、うどん (GI: 62)、パスタ (GI: 34)、蕎麦 (GI: 46)、マッシュポテト (GI: 101)、コーンチップ (GI: 72) となっている (Powell *et al.*, 2002)。GI が高い食餌を総称して高 GI 食 (GI > 60) と呼び、高 GI 食の長期的・継続的な摂取は、肥満体質になりやすく糖尿病発症のリスクを高めると言われている (Ludwig *et al.*, 1999; Willett *et al.*, 2002)。一方、GI が低い食餌を総称して低 GI 食 (GI < 60) と呼び、低 GI 食の継続的な摂取はインスリン感受性を亢進し、糖尿病予防への効果が期待されている (Järvi *et al.*, 1999; Jenkins *et al.*, 2002; Miller

et al., 2003; Ritz *et al.*, 1991; Wolever and Mehling, 2002)。したがって、日々の食事において GI 値を考慮に入れて上手に活用することは、糖尿病の予防と症状の改善に効果的であると考えられている。

GI に影響を与える因子としては、食品中の食物繊維含量、デンプンの形態、茹でや焼きなどの加工方法がこれまでに報告されている (Brand *et al.*, 1985; Jenkins *et al.*, 2002; Schulze *et al.*, 2004)。食物繊維は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 (Jenkins *et al.*, 1978; Ou *et al.*, 2001) (Figure 1-3)。また、デンプンの形態やその形態を変化させる加工方法は、デンプンの消化速度に影響を与える (Araya *et al.*, 2003; Björck *et al.*, 1994; Brand *et al.*, 1985)。つまり、デンプンの消化速度が遅ければ、デンプンを完全に消化できないうちに小腸を通過し、小腸より吸収されるグルコース量が減少するため、結果的に低 GI 食となる。デンプンの消化速度の遅れは、食品中のデンプンの構造やデンプンの消化に影響を与える他の成分の存在により、 α -アミラーゼをはじめとした糖質消化酵素が作用しにくくなるために起こる。これまでに、レジスタントスターチ (Goñi *et al.*, 1996)、アミロース含量 (Hu *et al.*, 2004) や α -アミラーゼインヒビター (α -AI) (Buonocore *et al.*, 1977; Granum, 1978; Marshall and Lauda, 1975; Silano *et al.*, 1973; Weselake *et al.*, 1983) など、デンプンの消化速度に影響を与える様々な要因が報告されてきた。

その中でも、 α -AI は、小麦 (*Triticum aestivum*) (Buonocore *et al.*, 1977; Shaikin and Birk, 1970; Silano *et al.*, 1973)、大麦 (*Hordeum vulgare*) (Weselake *et al.*, 1983)、ライ麦 (*Secale cereale*) (Granum, 1978)、インゲン豆 (*Phaseolus vulgaris*) (Bowman, 1945; Marshall and Lauda, 1975; Berre-Anton *et al.*, 1997) などの穀物の種子中の水溶性タンパク質画分であるアルブミンに豊富に含まれており、哺乳類の α -アミラ

ーゼの活性を強力に阻害することが知られている。これまでに、デンプン性の食品と同時に α -AI を摂取することで、 α -アミラーゼ活性が抑制され、食後の血糖値の上昇が穏やかになることが明らかとなっている (Preuss *et al.*, 2007; Tormo *et al.*, 2004)。すなわち、 α -AI を日々の食事に加えるのみで、食餌の GI を下げる効果が期待できる (Figure 1-4)。我が国でも、小麦 α -AI を含む食品が血糖値上昇抑制効果を有する特定保健用食品に認定されている (Kodama *et al.*, 2005)。しかしながら、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 (James *et al.*, 1997)。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 (RA) にも、 α -AI が豊富に含まれることが知られているが (Feng *et al.*, 1991a)、これまでに詳細な検討は行われていない。また、米アレルギーにおいては、アナフィラキシー症状を示すことはないとされていることから、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となる可能性がある。

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、変性により機能性が消失したり、溶解性・起泡性・乳化性が低下したりといった現象が起こることが多い。

そこで本研究では、糖尿病の発症を予防する新たな機能性食品成分の探索と食品産業での利用を目的とし、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、熱安定性・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。

Table 1-1. Estimated prevalence and number of people with diabetes
(adults 18⁺ years)

WHO Region	Prevalence (%)		Number (millions)	
	1980	2014	1980	2014
African Region	3.1%	7.1%	4	25
Region of the Americas	5.0%	8.3%	18	62
Eastern Mediterranean Region	5.9%	13.7%	6	43
European Region	5.3%	7.3%	33	64
South-East Asia Region	4.1%	8.6%	17	96
Western Pacific Region	4.4%	8.4%	29	131
Total *	4.7%	8.5%	108	422

*Totals include non-Member States

World Health Organization, *Global Report on Diabetes* (2016).

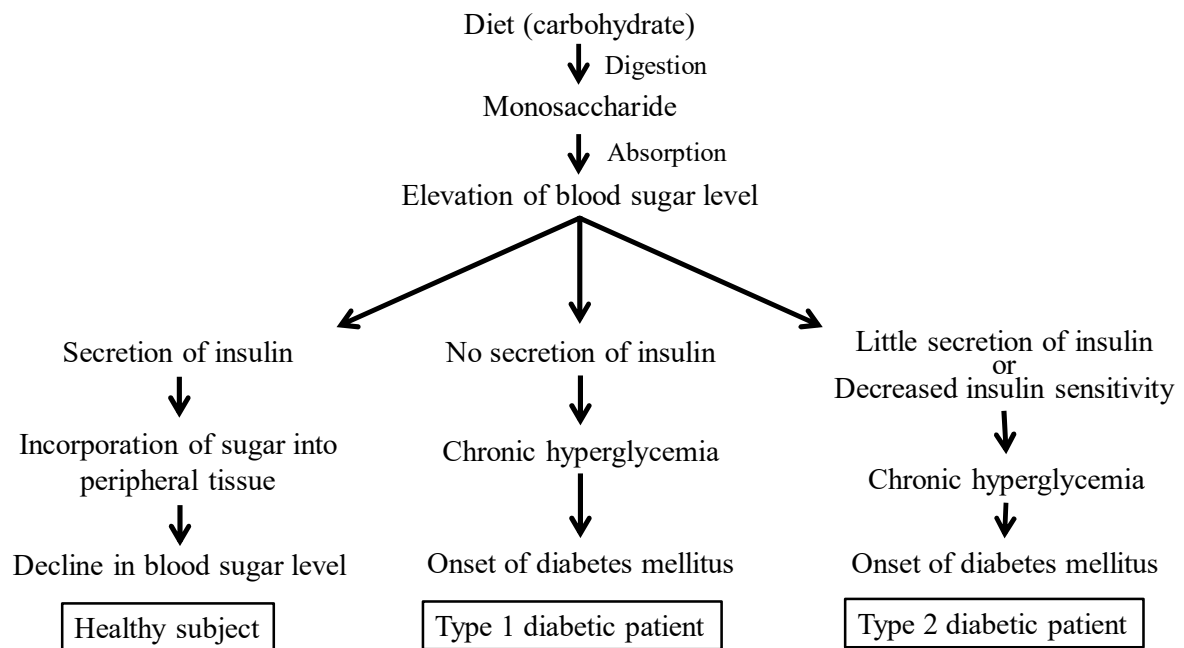
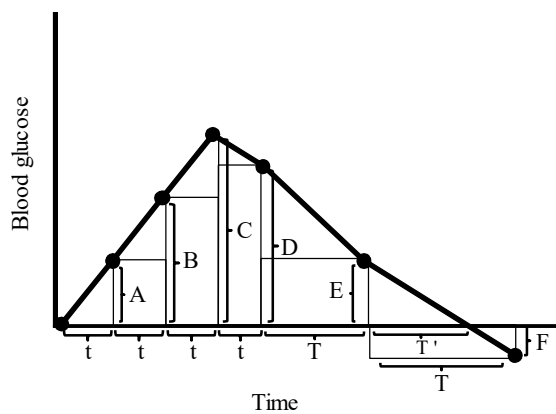


Figure 1-1. Summary of regulation of blood sugar level and pathogenesis of diabetes mellitus.



$$\text{Area} = \frac{At}{2} + \frac{(B+A)t}{2} + \frac{(B+C)t}{2} + \frac{(C+D)t}{2} + \frac{(D+E)t}{2} + \frac{ET'}{2}$$

$$= (A+B+C+D)t + \frac{Et}{2} + \frac{ET'}{2}$$

$$\text{Since } \frac{E}{(E+F)} = \frac{T'}{T}$$

$$\text{Therefore } \frac{ET'}{2} = \frac{E^2T}{2(E+F)}$$

The overall equation simplifies to:

$$\text{Area} = \left(A+B+C+\frac{D}{2} \right) t + \frac{(D+E)T}{2} + \frac{E^2T}{2(E+F)}$$

$$\text{GI} = \frac{\text{Area under the curve for ingestion of X g of test food}}{\text{Area under the curve for ingestion of X g of glucose}} \times 100$$

Figure 1-2. General blood glucose response curve and method of calculation of area under the curve and glycemic index (GI).

Wolever *et al.*, *American Journal of Clinical Nutrition* (1986).

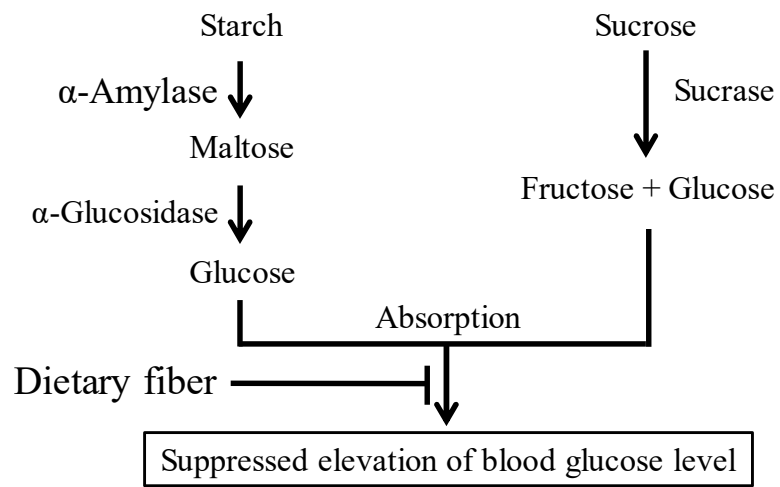


Figure 1-3. Suppression of elevation in blood glucose level by dietary fiber.

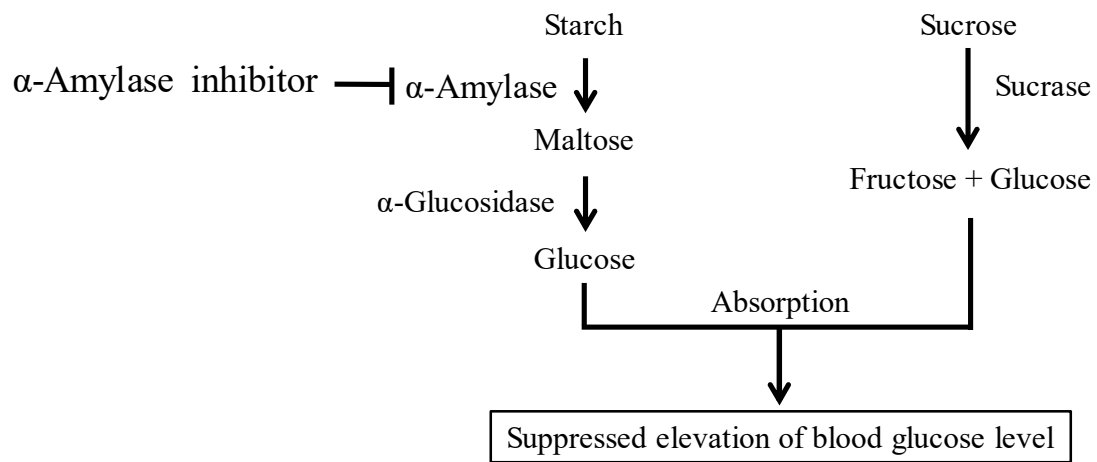


Figure 1-4. Suppression of elevation in blood glucose level by α -amylase inhibitor.

第2章 米アルブミンの食後血糖値および血漿インスリン値上昇抑制効果の検討

2-1 緒言

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、インクレチン（gastric inhibitory polypeptide (GIP), glucagon-like peptide-1 (GLP-1)）が膵臓のランゲルハンス島β細胞からのインスリンが分泌を促し、血中から末梢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（Figure 2-1）。その後、dipeptidyl peptidase-IV (DPP-4)によりインクレチンが分解され、インスリンの分泌が停止する。したがって、血糖値の上昇を抑制するには、糖質消化酵素の阻害、グルコースの吸着による排出促進、DPP-4の阻害等による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。

小麦、大麦、ライ麦およびインゲン豆などの穀類・豆類の種子中の水溶性タンパク質画分（アルブミン）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、小麦アルブミン（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。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（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。

そこで本章では、糖尿病の発症を予防する新たな機能性食品成分としての RA の利用可能性を明らかにすることを目的とし、まず、RA の糖質分解酵素に対する阻害活性の評価を行った。さらに、デンプンとグルコースの二種類の糖質を用いて糖質負荷試験を行い、食後血糖値および血漿インスリン値の変化に RA が与える影響について検討した。

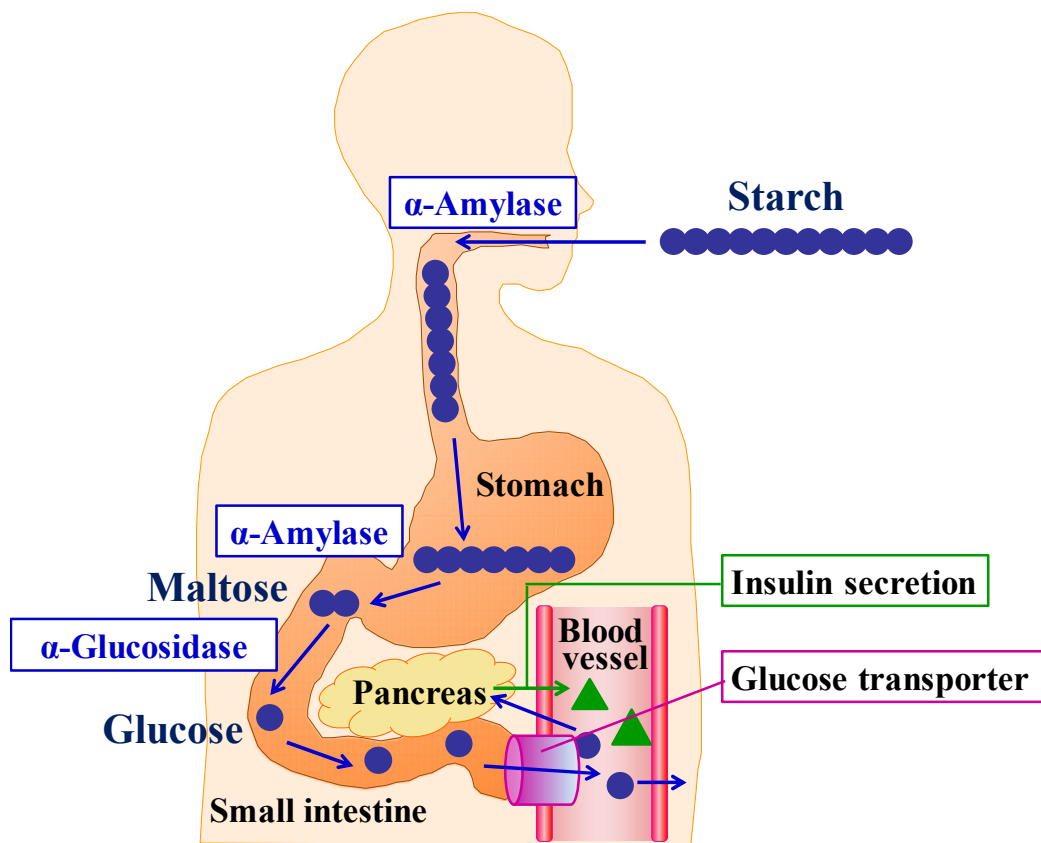


Figure 2-1. Scheme of postprandial blood glucose elevation and reduction after ingestion of starchy food.

2-2 実験材料と方法

2-2-1 米アルブミンおよび小麦アルブミンの調製

RA および WA の調製は，Feng らの方法（Feng *et al.*, 1991a; Feng *et al.*, 1991b）を参考に，一部修正を加えて行った。米粉（*Oryza sativa japonica* cv. Nipponbare, 滋賀県産）または小麦粉（*Triticum aestivum*, 日清製粉株式会社，東京）1 kg を 5 倍量（w/v）の 100 mM クエン酸緩衝液（pH 6.0）に浸漬し，4°C で一晩攪拌した。その後，遠心分離（15,000g, 15 min, 4°C）を行ない，上清を 80°C で 20 分間加熱処理することで， α -AI 以外の熱変性しやすい夾雑タンパク質を沈殿させた。抽出液を氷中で室温まで冷却した後，遠心分離（15,000g, 15 min, 4°C）を行い，上清に 40%飽和となるように硫酸アンモニウムを加え，4°C で一晩攪拌した。遠心分離（15,000g, 60 min, 4°C）にて沈殿を回収し，少量の純水に溶解した後，純水に対して透析（MWCO 3,500, 21-152-9, Thermo Fisher Scientific, USA）を行った。透析内液を遠心分離（15,000g, 15 min, 4°C）し，上清を凍結乾燥して，粗アルブミン粉末を得た。

RA および WA の精製のために，1 g の粗アルブミン粉末を 40 mL の純水に溶解し，濾過フィルターで滅菌した後，Sephadex G-50（17004101, GE Healthcare, USA）ゲルろ過カラム（ $\phi 2.5 \times 100$ cm, 737-2591, Bio-Rad, USA）を接続した FPLC システム（AKTA prime plus, GE Healthcare）にアプライし，純水を移動相として，流速 0.5 mL/min, 5 mL/フラクション，4°C の条件で分離し，各フラクションの 280 nm の波長における吸光度をモニタリングした。各ピークのフラクションを回収して凍結乾燥し，凍結乾燥粉末 10 μ g を 1 \times SDS sample buffer 20 μ L に溶解し，2-2-3 と同じ操作 SDS-PAGE を行った。

RA の場合， SDS-PAGE の結果から， 2 番目のピークのフラクションを収集した。 WA の場合は， 同様の条件でゲルろ過クロマトグラフィーを行った後， 各フラクションにおけるブタ膵臓由来 α -アミラーゼに対する阻害活性を 2-2-2 の方法を用いて測定し， 90% 以上の阻害活性を示すフラクションを収集した。 収集されたフラクションを凍結乾燥し， RA および WA 粉末を得た。 これらは， 使用するまで -20°C 以下で保存した。

アルブミン粉末中のタンパク質純度は， BCA Protein Assay Kit (23250, Thermo Fisher Scientific) を使用して， ウシ血清アルブミン (BSA) の標準曲線に基づいて決定した。

2-2-2 α -アミラーゼおよび α -グルコシダーゼ阻害活性の測定

α -アミラーゼ阻害活性の測定

RA および WA の α -アミラーゼに対する阻害活性は， Foo と Bais の方法 (Foo and Bais, 1998) を参考に， 一部修正を加えて行った。 ブタ膵臓由来 α -アミラーゼ (A6255-10MG) とヒト唾液 α -アミラーゼ

(A0521-500UN) は， Sigma-Aldrich (USA) から購入した。 ミールワーム由来 α -アミラーゼは， Buonocore らの方法で抽出した (Buonocore *et al.*, 1975)。 哺乳類の α -アミラーゼ阻害活性測定には， 50 mM NaCl 3 mM CaCl_2 含有 20 mM HEPES 緩衝液 (pH 6.9) を， ミールワームの α -アミラーゼ阻害活性測定には， 100 mM NaCl 含有 20 mM 酢酸 Na 緩衝液 (pH 5.4) を活性測定用緩衝液として用いた。 α -アミラーゼの基質として， 2-クロロ-4-ニトロフェニル- α -D-マルトトリオシド

(G3-CNP; 45607000, オリエンタル酵母工業株式会社, 東京) を 2 mM となるよう活性測定用緩衝液に溶解して使用した。

96 ウェルマイクロプレート (Nunc イムノモジュール+フレーム,

Thermo Fisher Scientific) の各ウェルで、哺乳類 α -アミラーゼ溶液 (1.6 U/ μ L) 25 μ L またはミールワーム α -アミラーゼ溶液 25 μ L (抽出した α -アミラーゼ溶液を活性測定用緩衝液で 100 倍希釈したもの) と RA または WA 溶液 (1 μ g/ μ L) 25 μ L を混合し、37°C で 30 分間インキュベートした。哺乳類 α -アミラーゼにおける 1 アミラーゼ単位(U) は、デンプンとの反応 (pH 6.9, 3 min, 20°C) で、1 mg のマルトースを遊離する酵素量として定義した。次に、基質溶液 50 μ L を加えて、37°C で 10 分間酵素反応を行った。続いて、10% (w/v) Tris 溶液 (pH 10.5) 100 μ L を添加することにより酵素反応を停止し、酵素反応により生成した 2-クロロ-4-ニトロフェノールの 405 nm における吸光度を測定した。ミールワーム由来 α -アミラーゼを酵素溶液として用いる場合は、インキュベート温度を 25°C に変更して行った。

α -アミラーゼ阻害活性は、試料を含まない時の α -アミラーゼ活性に対する、試料を加えた時の α -アミラーゼ活性の比率として、以下の式を用いて算出した。

$$\alpha\text{-アミラーゼ阻害活性 (\%)} = (A-B) / A \times 100$$

A : 酵素溶液 + 緩衝液 (試料無添加) (OD 405 nm)

B : 酵素溶液 + 試料溶液 (OD 405 nm)

α -グルコシダーゼ阻害活性の測定

Dahlqvist と Seri らの方法 (Dahlqvist, 1964; Seri *et al.*, 1996) を参考に、一部修正を加えて行った。 α -グルコシダーゼの活性測定には、150 mM NaCl 含有 100 mM マレイン酸緩衝液 (pH 6.9) を活性測定用緩衝液として用いた。 α -グルコシダーゼの基質として、マルトース・二水和物 (136-00612, 富士フイルム和光純薬株式会社, 大阪) を 200

mM となるよう活性測定用緩衝液に溶解して使用した。ラット小腸由来 α -グルコシダーゼは、Dahlqvist の方法 (Dahlqvist, 1964) を参考に抽出した。ラット小腸アセトン粉末 1 g (I1630, Sigma-Aldrich) を、9 倍量 (w/v) の 2% (v/v) プロテアーゼ阻害剤カクテル (225955, ナカライテスク株式会社, 京都) 含有活性測定用酸緩衝液に懸濁して、ポリトロンホモジナイザー (PT1200E, KINEMATICA, CHE) を用いて均一化した。懸濁液を遠心分離 (20,000g, 10 min, 4°C) し、上清を回収して粗 α -グルコシダーゼ溶液とした。酵素阻害活性測定には、活性測定用緩衝液で 5 倍希釈して使用した。

96 ウェルマイクロプレート (469922, F16 POLYSORP UNFRA NUNC-IMMUNO MODULE, Thermo Fisher Scientific) の各ウェルに、 α -グルコシダーゼ基質溶液 25 μ L との活性測定用緩衝液 150 μ L を加えた。次に、RA またはアカルボース (019-22671, 富士フイルム和光純薬株式会社) 溶液 50 μ L (1 μ g/ μ L) と α -グルコシダーゼ溶液 25 μ L を加え、37°C で 10 分間酵素反応を行った。続いて、マイクロプレートを 90°C で 10 分間インキュベートし、酵素反応を停止した。20 μ L の反応溶液を各ウェルからガラス試験管に分取し、酵素反応により生成したグルコースの濃度を、グルコース CII-テストワコー (439-90901, 富士フイルム和光純薬株式会社) を用いて測定した。

α -グルコシダーゼ阻害活性は、試料を含まない時の α -グルコシダーゼ活性に対する、試料を加えた時の α -グルコシダーゼ活性の比率として、 α -アミラーゼ阻害活性と同様に算出した。

2-2-3 *In vitro* における米アルブミンの消化性の評価

Iwami らと Akesson と Stahmann の方法 (Iwami *et al.*, 1986; Akesson and Stahmann, 1964) を参考に、一部修正を加えて行った。RA, WA また

はウシ血清アルブミン (BSA; A7030-50G, Sigma-Aldrich) 100 mg を純水 10 mL に懸濁し, 希塩酸で pH 2 に調整した後, ブタ胃由来ペプシン (165-18711, 富士フイルム和光純薬株式会社) 1 mg を加えて, 37°C で 2 時間インキュベートした。その後, 重炭酸ナトリウム 100 mg を加えて酵素反応を停止し, さらに, ブタ膵臓由来パンクレアチン (A3292, Sigma-Aldrich) 10 mg を加えて, 37°C で 2, 4, 6 時間インキュベートした。各時間に試料溶液 50 μ L を分取し, 2 \times SDS sample buffer [65 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% (w/v) SDS, 10% (v/v) グリセロール, 0.0025% (w/v) ブロモフェノールブルー, 5% 2-メルカプトエタノール, 20 mM ジチオスレイトール (DTT), 全て富士フイルム和光純薬株式会社] 500 μ L と混合した。そこに, 純水 450 μ L を加えて 5 分間煮沸し, この試料を用いて SDS-PAGE を行った。

SDS-PAGE は, Laemmli の方法 (Laemmli, 1970) を参考に行った。アクリルアミド濃度 14% (w/v) の分離ゲルの使用し, 各ウェルに SDS sample buffer と混合した試料を 20 μ L と分子質量マーカー (03-064, テフコ株式会社, 東京) 5 μ L をそれぞれアプライした。電気泳動は, AE-6530P/M 型ラピダス・ミニスラブ電気泳動槽 (アトー株式会社, 東京) に泳動用緩衝液 [25 mM Tris, 192 mM グリシン, 0.1% (w/v) SDS] を満たし, 100 mA, 50 V の定電圧で 30 分間行った後, 100 mA, 150 V の定電圧で約 70 分間行った。泳動後, ゲルを取り外し, 固定液 [50% (v/v) メタノール, 10% (v/v) 酢酸] に 40 分間浸漬してタンパク質を固定した後, CBB 染色液 [0.025% (w/v) クマシーブリリアントブルー R250, 5% (v/v) メタノール, 10% (v/v) 酢酸] で一晩染色し, 脱色液 [12% (v/v) メタノール, 7% (v/v) 酢酸] で周辺が透明になるまで脱色した。

2-2-4 実験動物

7 週齢の雄性 Wistar ラット（日本エスエルシー株式会社，静岡）を，環境馴化のために試験前 1 週間予備飼育した。飼料には CE2（日本クレア株式会社，東京）を与え，滅菌水を自由摂取させた。飼育は，12 時間の明暗サイクル（8:00～20:00）で，室温 $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ ，湿度 50% の環境下で行った。本章における全ての動物実験は，日本大学生物資源科学部の動物実験ガイドラインに従って実施した。

2-2-5 米アルブミンの食後血糖値および血漿インスリン値上昇抑制効果の検討（OSTT, OGTT）

RA の食後血糖値および血漿インスリン値上昇抑制効果は，経口デンプン負荷試験（OSTT: Oral Starch Tolerance Test）および経口グルコース負荷試験（OGTT: Oral Glucose Tolerance Test）にて検討した。

試験前，ラットをランダムに以下の 8 群に分けた（ $n=7$ /群）：可溶性デンプン（9005-25-8，富士フイルム和光純薬株式会社）投与群，可溶性デンプン+RA 200 mg/kg 体重投与群，可溶性デンプン+WA 200 mg/kg 体重投与群，グルコース（50-99-7，富士フイルム和光純薬株式会社）投与群，グルコース+RA 200 mg/kg 体重投与群，グルコース+RA100 mg/kg 体重投与群，グルコース+RA 50 mg/kg 体重投与群，グルコース+WA 200 mg/kg 体重投与群。試験前に 15 時間絶食させ，試験直前に尾静脈採血を行い，デキスター ZII（バイエル薬品株式会社，DEU）にて空腹時初期血糖値を測定した。採血後，15 分間の間隔をあけ，5 mL/kg 体重の PBS（05913，日水製薬株式会社，東京）に溶解した，1 g/kg 体重の可溶性デンプンまたはグルコースと各量（50, 100, 200 mg/kg 体重）の RA または WA を，無麻酔下でゾンデ（CL-4596，日本クレア株式会社）にて経口胃内投与（1 g の可溶性デンプンまた

はグルコースおよび 50~200 mg の RA または WA を 5 mL の PBS に溶解し、5 mL/kg 体重となるように投与) した。なお、OSTT においては可溶性デンプン投与のみ投与した群を、OGTT においてはグルコースのみ投与した群をそれぞれコントロールとした。試料を投与した時間を 0 分とし、投与後、15 分、30 分、45 分、90 分の時間に尾静脈採血を行い、血糖値を測定した。尾静脈血は、ヘパリン処理されたヘマトクリットチューブ (22-362-566, Thermo Fisher Scientific) を用いて約 60 μ L 採血し、これを 0.6 mL チューブへ移して、遠心分離 (1,300g, 10 min, 4°C) し、血漿を得た。血漿は、インスリン濃度測定直前まで -80°C で保存した。血漿中インスリン濃度は、レビスインスリン-ラット (AKRIN-010, 株式会社シバヤギ, 群馬) を用いて測定した。

糖質投与後 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: area under the curve) 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) は、Wolever と Jenkins の方法を用いて算出した (Figure 1-2; Wolever and Jenkins, 1986)。

2-2-6 統計解析

データは、エクセル統計 (株式会社社会情報サービス, 東京) を使用した一元配置分散分析 (ANOVA) によって分析した。各グループ間の比較は、Tukey-Kramer の検定を使用して行い、 p 値が 0.05 以下の確率値を統計的有意なものとした。

2-3 結果

2-3-1 米アルブミンと的小麦アルブミンの調製

RA 中のほとんどのタンパク質は、分子質量 14-16 kDa のタンパク質である (Feng *et al.*, 1991a)。Sephadex G-50 カラムを用いたゲル濾過クロマトグラフィーの結果、14-16 kDa アルブミンは、2 番目のピークに含まれていた (Figure 2-2, Figure 2-3)。1 番目のピークは、高分子質量夾雑タンパク質、3 番目のピークは SDS-PAGE および CBB 染色によってバンドが確認されなかったことから、核酸などの 280 nm の波長に吸光をもつタンパク質以外の物質であると推察された。2 番目のピークを凍結乾燥して得られた粉末のタンパク質純度を、BCA 法にて測定した結果、凍結乾燥粉末のタンパク質純度は、約 80-95% であった。また、粉末は白色であり、溶液は透明～淡黄色を示した。凍結乾燥粉末の回収率は、生米重量に対して約 0.1% であった。

Feng らの方法 (Feng *et al.*, 1991b) を参考に、WA の調製を行った。Sephadex G-50 カラムを用いたゲル濾過クロマトグラフィーの結果、全てのピークにおいて、高いブタ臍臓 α -アミラーゼに対する阻害活性が観察された (Figure 2-4)。90%以上の阻害活性を示したフラクション回収し SDS-PAGE を行った結果、米アルブミンと同様に 12-16 kDa に濃いバンドが確認された (Figure 2-5)。哺乳類由来 α -アミラーゼの強力な阻害剤である小麦 0.19 α -AI の分子質量が、約 13.3 kDa であることから (Maeda *et al.*, 1985)、回収したフラクション中には小麦 0.19 α -AI が高濃度に含まれていると推察された。二つ目のピークを凍結乾燥して得られた粉末のタンパク質純度を、BCA 法にて測定した結果、凍結乾燥粉末のタンパク質純度は、約 72% であった。また、粉末は白色であり、溶液は透明～淡黄色を示した。凍結乾燥粉末の回

収率は、小麦粉重量に対して約 0.12%であった。

2-3-2 α -アミラーゼおよび α -グルコシダーゼ阻害活性の測定

種々の α -アミラーゼに対する RA および WA の阻害活性を Table 2-1 に示す。WA は、ブタ膵臓 (98.5%)、ヒト唾液 (90.5%) およびミールワーム由来 (98.5%) の α -アミラーゼの活性を強力に阻害した。一方で、RA は、ミールワーム由来 α -アミラーゼに対してのみ阻害活性を示し (97.6%)、哺乳類由来 α -アミラーゼの活性を阻害しなかった。

ラットの α -グルコシダーゼに対する RA およびアカルボースの阻害活性を Table 2-2 に示す。アカルボースは、 α -グルコシダーゼ活性を強力に阻害 (94.5%) したのに対し、RA は阻害活性を示さなかった。

2-3-3 *In vitro* における米アルブミンの消化性の評価

In vitro における RA, WA およびカゼインの、ペプシンおよびパンクレアチンによる消化性を比較した結果を Figure 2-6 に示す。RA においては、15-16 kDa のバンドはペプシン処理によって消失したが、14 kDa のバンドはパンクレアチンで 6 時間処理後も残存した。WA においては、14 kDa より小さいバンドがペプシンで処理することによって部分的に分解され、パンクレアチンで 2 時間処理することにより完全に消失した。14 kDa のバンドは、パンクレアチンで 6 時間処理後も残存した。ネガティブコントロールであるカゼインは、ペプシンで 2 時間およびパンクレアチンで 2 時間処理することで、バンドが完全に消失した。

2-3-4 経口デンプン負荷試験 (OSTT)

Wistar ラットへの OSTT における，RA および WA 投与後の血糖値および血漿インスリン値の変化を測定した結果を Figure 2-7 に示す。コントロール群において，血糖値および血漿インスリン値は，デンプン投与後 15 分でピークに達し，時間経過とともに空腹時のレベルに戻った。デンプンと 200 mg/kg 体重の RA または WA の同時投与は，デンプン摂取後のピーク時の血糖値および血漿インスリン値を有意に減少させた (Figure 2-7 A および C)。投与後 15 分での血糖値はそれぞれ，コントロール群で 144 ± 6 mg/dL，RA 200 mg/kg 体重投与群で 127 ± 4 mg/dL，WA 200 mg/kg 体重投与群で 130 ± 2 mg/dL であった。投与後 15 分での血漿インスリン値はそれぞれ，コントロール群で 2.56 ± 0.49 ng/mL，RA 200 mg/kg 体重投与群で 1.33 ± 0.29 ng/mL，WA 200 mg/kg 体重投与群で 1.60 ± 0.12 ng/mL であった。RA および WA 投与群におけるグルコース AUC は，コントロール群と比較して，それぞれ 66% および 75% にまで減少した (Figure 2-7 B)。さらに，RA および WA 投与群におけるインスリン AUC は，コントロール群と比較して，それぞれ 66% および 55% にまで減少した (Figure 2-7 D)。

2-3-5 経口グルコース負荷試験 (OGTT)

Wistar ラットへの OGTT における，RA および WA 投与後の血糖値および血漿インスリン値の変化を測定した結果を Figure 2-8 に示す。コントロール群において，血糖値および血漿インスリン値は，グルコース投与後 15 分でピークに達し，時間経過とともに空腹時のレベルに戻った。グルコースと RA 50-200 mg/kg 体重または WA 200 mg/kg 体重との同時投与は，ピーク時における血糖値および血漿インスリン値を有意に減少させた (Figure 2-8 A および C)。投与後 15 分での血糖値はそれぞれ，コントロール群が 157 ± 7 mg/dL，RA 200 mg/kg 体重

投与群が 137 ± 4 mg/dL, WA 200 mg/kg 体重投与群が 136 ± 4 mg/dL であった。RA 50, 100, 200 mg/kg 体重投与群におけるグルコース AUC は, コントロール群と比較して, 投与量依存的にそれぞれ 92%, 66%, 51% にまで減少した (Figure 2-8 B)。WA 投与群におけるグルコース AUC がコントロール群の 89% であったことから, RA の血糖値上昇抑制効果は, WA よりも高いことが明らかとなった。さらに, 全ての RA 群において, グルコース投与後 15-90 分の血漿インスリン値は, コントロール群と比較して低下した。一方で, WA 投与群の血漿インスリン値は, グルコース負荷後 45 分および 90 分でわずかに減少するのみであった。投与後 15 分での血漿インスリン値は, コントロール群で 2.73 ± 0.59 ng/mL, RA 200 mg/kg 体重投与群で 2.07 ± 0.39 ng/mL, WA 200 mg/kg 体重投与群で 2.35 ± 0.16 ng/mL であった。RA 50, 100, 200 mg/kg 体重投与群におけるインスリン AUC は, それぞれコントロール群の 66%, 56%, 49% にまで減少した。RA 200 mg/kg 体重投与群においては, 同じ投与量の WA 投与群の 64% より低かった (Figure 2-8 D)。

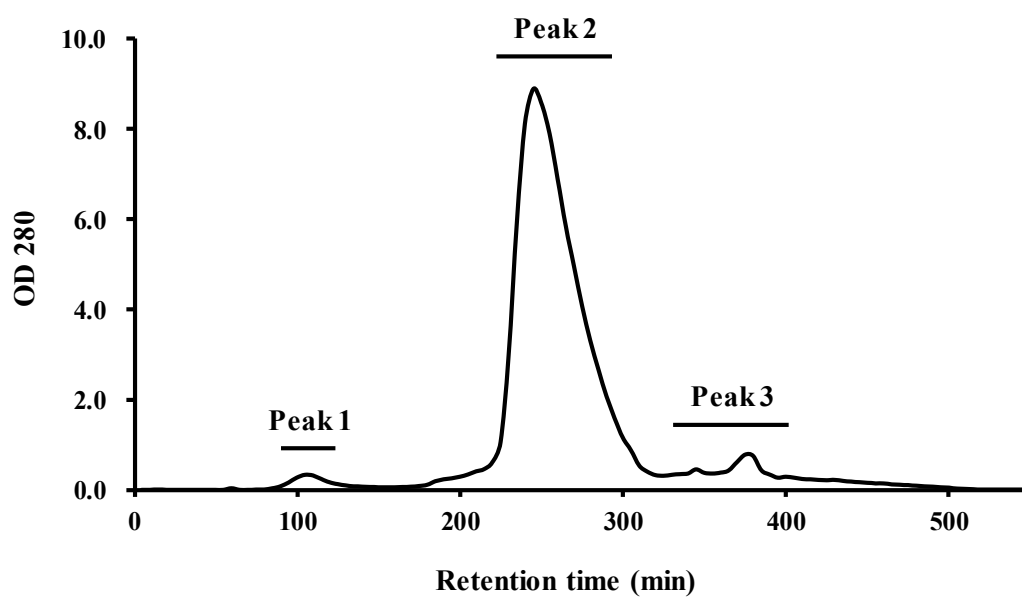


Figure 2-2. Sephadex G-50 gel-filtration chromatogram of 0-40% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fraction in RA.

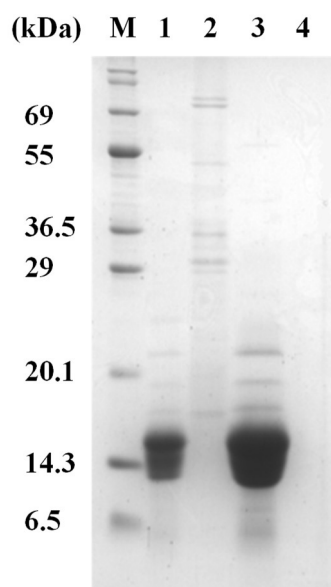


Figure 2-3. SDS-PAGE of RA separated by Sephadex G-50 gel-filtration chromatography. M, molecular-mass marker; lane 1, crude RA; lane 2, peak 1; lane 3, peak 2; lane 4, peak 3.

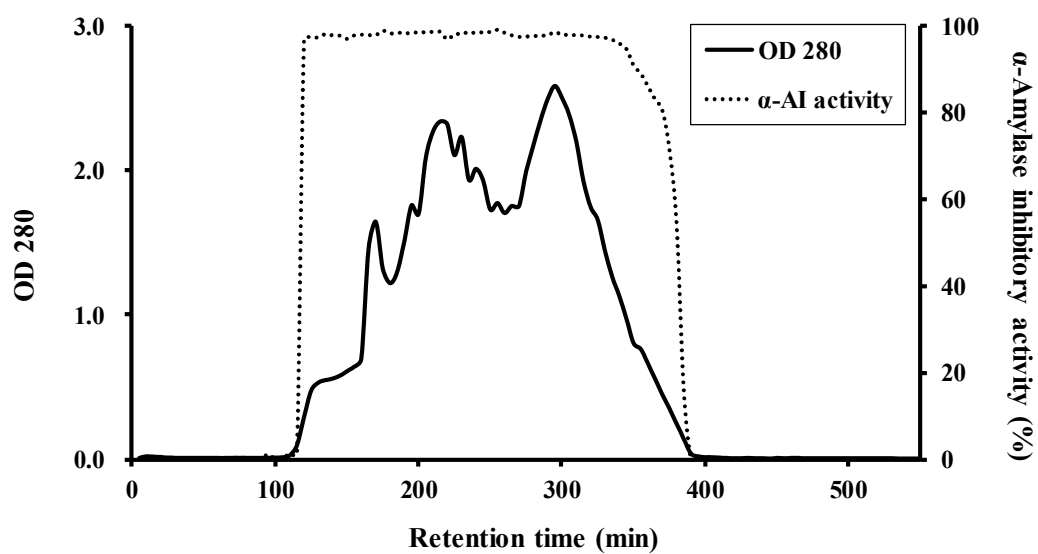


Figure 2-4. Sephadex G-50 gel-filtration chromatogram and porcine pancreas α -amylase inhibitory activity of 0-40% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fraction in WA.

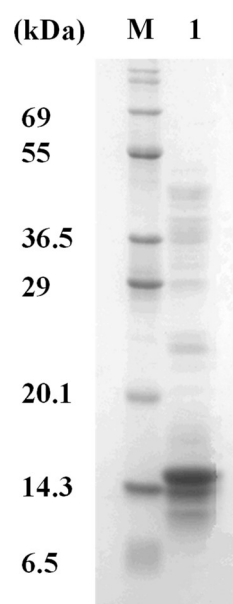


Figure 2-5. SDS-PAGE of WA separated by Sephadex G-50 gel-filtration chromatography. M, molecular-mass marker; lane 1, WA.

Table 2-1. Inhibitory activity of RA and WA against α -amylase of various origins.

	α -Amylase inhibitory activity (%)		
	Porcine pancreas	Human saliva	Mealworm (<i>Tenebrio molitor</i>)
RA	n.d.	n.d.	97.6 \pm 0.1
WA	98.5 \pm 0.1	90.5 \pm 1.3	98.5 \pm 0.0

Each value is the mean of 3 experiments with SE, n.d., not detected.

Table 2-2. Inhibitory activity of RA and Acarbose against rat intestinal α -glucosidase.

α -Glucosidase inhibitory activity (%)	
RA	n.d.
Acarbose	94.5 ± 0.3

Each value is the mean of 3 experiments with SE, n.d., not detected.

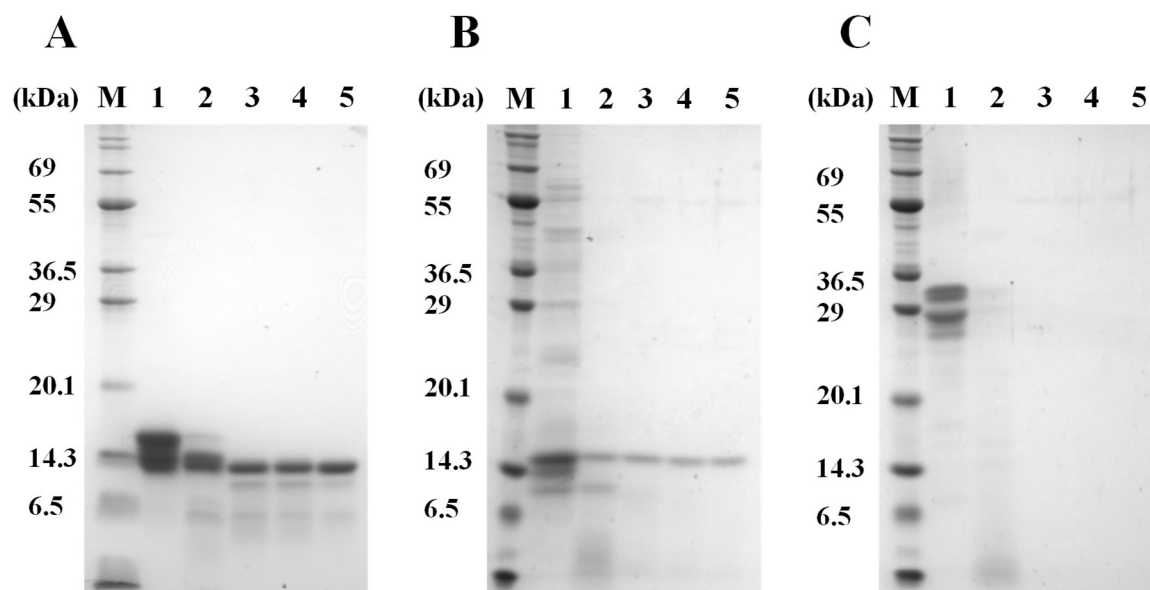


Figure 2-6. *In vitro* digestibility of RA (A), WA (B), and casein (C; negative control) shown by SDS-PAGE. M, molecular-mass marker; lane 1, non-treatment; lane 2, pepsin treatment for 2 h; lane 3, pepsin treatment for 2 h and pancreatin treatment for 2 h; lane 4, pepsin treatment for 2 h and pancreatin treatment for 4 h; lane 5, pepsin treatment for 2 h and pancreatin treatment for 6 h.

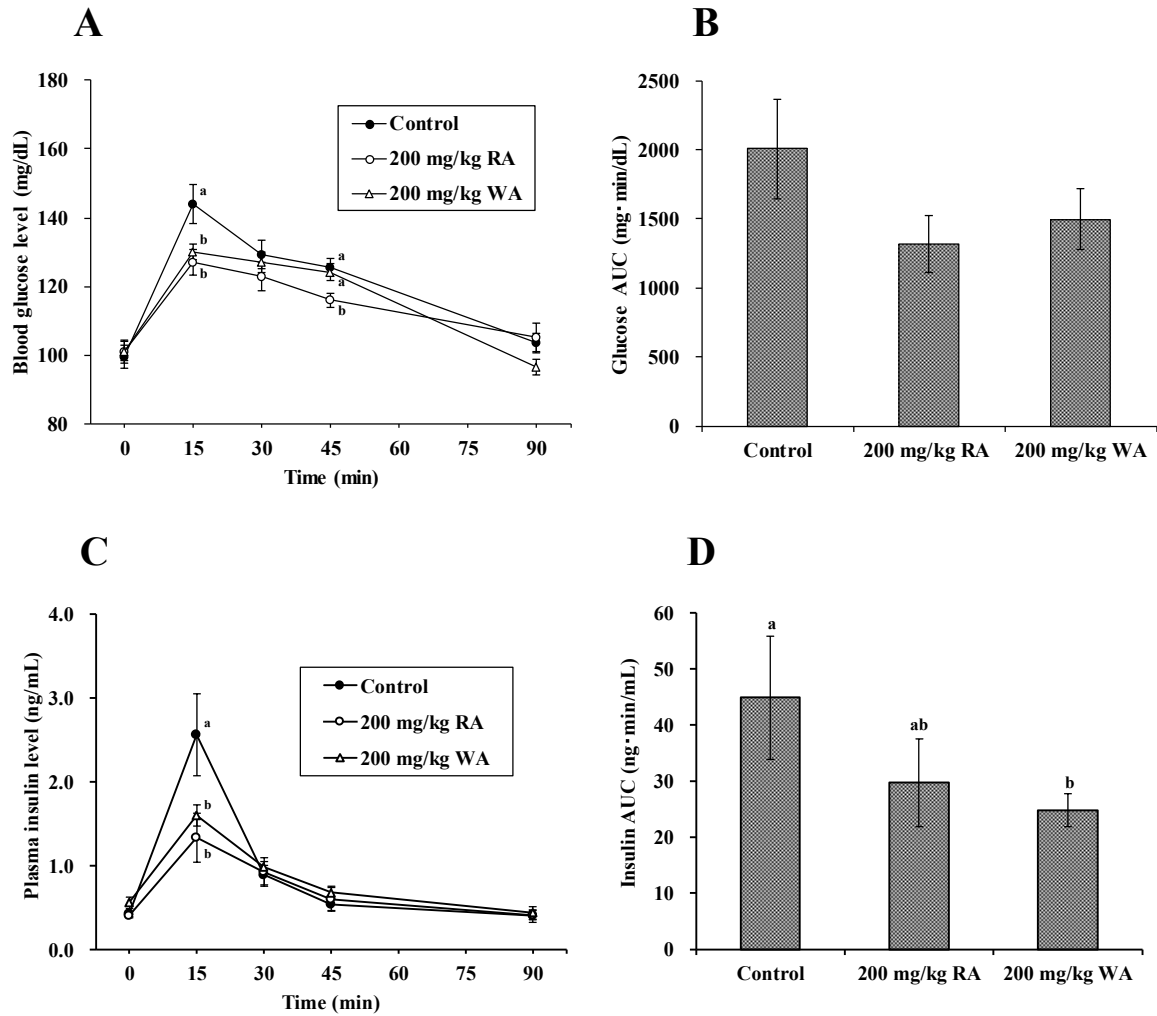


Figure 2-6. Effects of RA and WA on blood glucose level (A), glucose AUC (B) plasma insulin level (C), and insulin AUC (D) after the oral starch tolerance test (OSTT) on Wistar rats. Values with different letters are significantly different at $p < 0.05$ vs. control group by Tukey-Kramer's test. Each value is the mean of 7 animals with SE shown as a vertical bar.

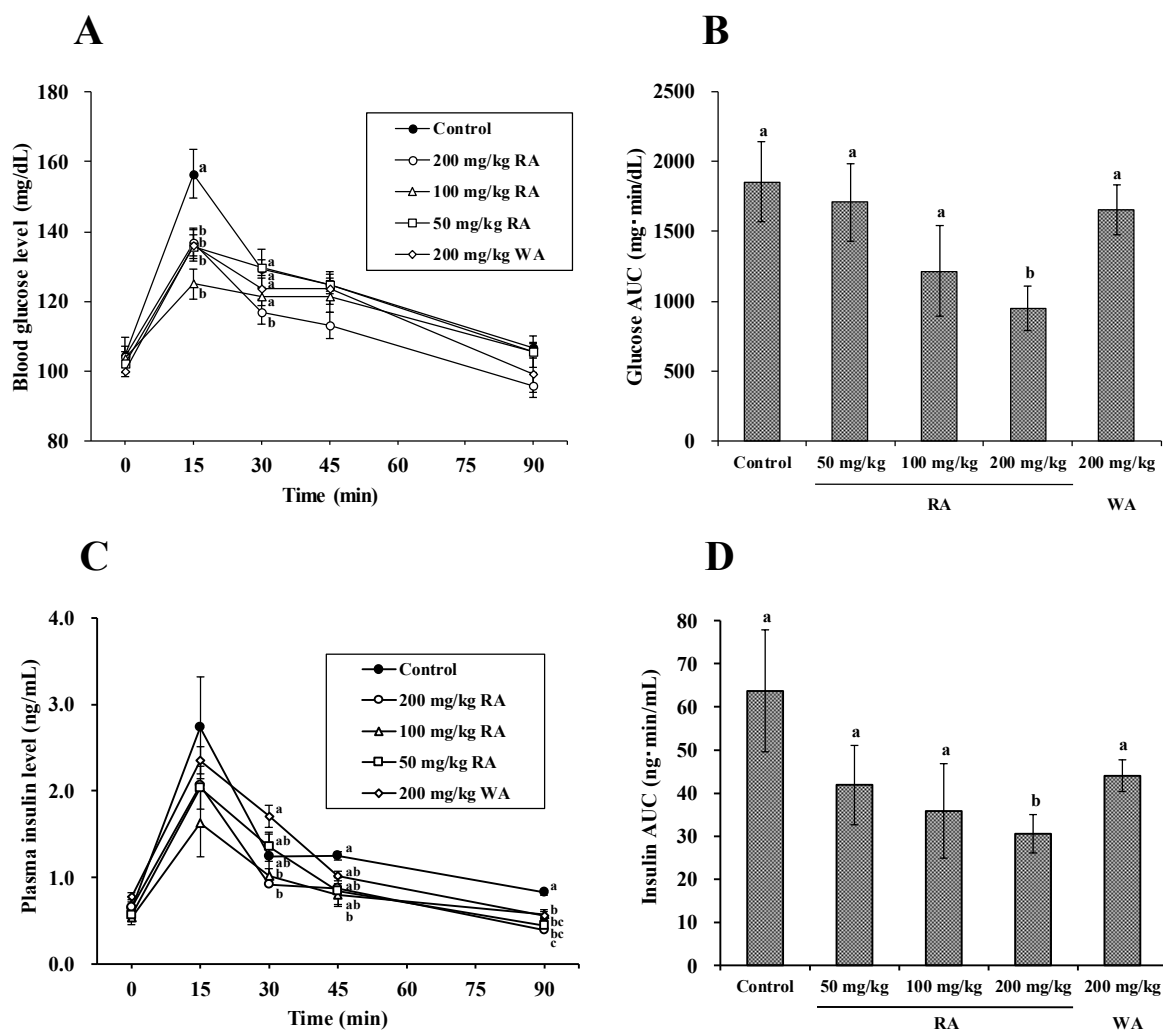


Figure 2-7. Effects of RA and WA on blood glucose level (A), glucose AUC (B) plasma insulin level (C), and insulin AUC (D) after the oral glucose tolerance test (OGTT) on Wistar rats. Values with different letters are significantly different at $p < 0.05$ vs. control group by Tukey-Kramer's test. Each value is the mean of 7 animals with SE shown as a vertical bar.

2-4 考察

糖質摂取時の血糖値および血漿インスリン値の上昇を予防する有効な方法の一つは、消化管における α -アミラーゼや α -グルコシダーゼの活性を阻害し吸収可能なグルコースへの分解を抑制することである。そのため、 α -AI である WA のデンプン負荷における食後の血糖値および血漿インスリン値の上昇抑制効果は、これまでも研究されている (Kodama *et al.*, 2005; Lankisch *et al.*, 1998; Plus and Keup, 1973)。そこで、RA においても WA 同様に α -アミラーゼに対する阻害活性を有するのか否か、哺乳類としてヒト唾液とブタ膵臓由来、昆虫として、RA により活性が阻害されることが既に報告されているミールワーム由来の α -アミラーゼを用いて、RA の阻害活性を評価した。また、 α -アミラーゼ阻害活性を示さなくとも、 α -グルコシダーゼ阻害活性を有することも考えられることから、ラット小腸由来 α -グルコシダーゼを用いて、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 α -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 α -アミラーゼに対しては阻害活性を示さなかった (Table 2-1)。さらに、RA は α -グルコシダーゼに対しても同様に阻害活性を示さなかった (Table 2-2)。これらの結果から、RA においては、WA のような糖質分解酵素の阻害による血糖値および血漿インスリン値上昇抑制効果が望めないことが示唆された。

糖質摂取時の血糖値および血漿インスリン値の上昇を予防するその他の方法としては、小腸からのグルコースの吸収を抑制または遅延させることが挙げられ、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 (Jenkins *et al.*, 1978)。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。それらはレジスタントプロテインとも呼ばれ、大豆、ソバおよび米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 (Sugano *et al.*, 1988; Kayashita *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 2007)。しかしながら、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 が哺乳類のタンパク質消化酵素に対して耐性を有するのか検討した。哺乳類におけるタンパク質の消化は、まず、強酸性下で胃液に含まれるペプシンにより行われ、続いて、中性～弱アルカリ性下で膵液に含まれるトリプシンやキモトリプシンによって連続的に行われる。そこで、生体内の条件により近づけるため、RA にペプシンや膵液の乾固物であるパンクレアチンを連続的に作用させた。その結果、RA は、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、消化耐性の高いタンパク質（またはペプチド）が存在することが明らかとなった (Figure 2-6)。このことから、RA は、WA のような α -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、消化耐性をもつことにより高分子のまま小腸に達することで、食物繊維のようなグルコースの吸着・排出促進による効果で、血糖値の上昇を抑制する可能性があると考えられた。

また、 α -AI においては、その特性から、マルトースやグルコースといった二糖以下の糖を摂取した場合には、血糖値および血漿インスリン値の上昇を抑制することはできないが、糖の吸着・排出促進といったメカニズムであれば、摂取する糖質の種類に関係なく、いかなる糖を摂取した場合においても血糖値の上昇を抑制できる可能性がある。そこで、RA を用いて、Wistar ラットに OSTT および OGTT を行った。OSTT の結果、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

(Figure 2-7)。またグルコース AUC およびインスリン 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、OGTT の結果、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 (Figure 2-8)。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、本研究の結果は、RA が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、食後の血糖値および血漿インスリン値の上昇を抑制し、糖尿病の予防に有効な機能食品素材となりうることをはじめて見出した。また、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を明らかにした (Ina *et al.*, 2016)。

第3章 米アルブミンの食物繊維様作用の評価

3-1 緒言

糖尿病の予防と治療には、食後の血糖値およびインスリン値の管理が重要である。食物繊維の摂取は、食後の血糖値上昇を抑制し、過剰なインスリンの分泌を抑制する (Anderson *et al.*, 1995; Liljeberg *et al.*, 1996; Yokoyama *et al.*, 1997)。そのため、食物繊維の継続的な摂取は、インスリン感受性を亢進し、糖尿病予防への効果が期待されている (Schulze *et al.*, 2004; Lafrance *et al.*, 1998; Rodríguez-Morán *et al.*, 1998)。食物繊維による血糖値上昇抑制メカニズムは、大きく分けて二つあり、一つは、糖の消化管内での滞留時間を延長すること (Jenkins *et al.*, 1978)、もう一つは、糖の消化管内での拡散を抑制することであると考えられている (Ou *et al.*, 2001)。いずれのメカニズムも食物繊維による糖の吸着に起因するものであると考えられている。

一方で、いくつかの食品由来のタンパク質は、食物繊維様の効果を有することが知られている (Nagaoka *et al.*, 2001; Sugano *et al.*, 1988; Kayashita *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 2007)。しかしながら、これら食品タンパク質の食物繊維様の効果についての報告は、血清コレステロール低下効果や血清中性脂肪上昇抑制効果といった脂質代謝に関わるものがほとんどであり、食後の血糖値上昇抑制効果といった糖代謝への影響については検討されていない。

前章において、RA が食後血糖値および血漿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機能性食品素材であること示唆してきた (Ina *et al.*, 2016)。しかしながら、RA は WA と異なり、哺乳

類の α -アミラーゼの活性を阻害せず、デンプン投与時だけでなく、グルコース投与時においても、血糖値および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。また、哺乳類のタンパク質消化酵素に対して強力な消化耐性を示したことから、そのメカニズムとして、高分子のまま腸管に到達することで、食物繊維様の効果を有する可能性が見出された。

そこで本章では、RA の食後血糖値およびインスリン値上昇抑制効果が、その食物繊維様の作用によるものか検討した。まず、RA が消化管内で作用するのか否かを検討するため、腹腔にグルコースを注入し、消化管を経由せずに直接血糖値の上昇を誘発することが可能な、腹腔内グルコース負荷試験を行った。次に、RA のグルコース吸着および拡散抑制効果について *in vitro* の系にて評価した。また、RA 中の難消化性タンパク質（またはペプチド）の消化耐性を分子レベルで明らかにするため、質量分析計を用いて難消化性タンパク質（またはペプチド）の同定を試み、タンパク質構造モデリングサーバーを用いて構造解析を行った。

3-2 実験材料と方法

3-2-1 実験動物

実験動物である Wistar ラットの飼育は、2-2-4 と同じ条件で行った。本章における全ての動物実験は、日本大学生物資源科学部の動物実験ガイドラインに従って実施した（承認番号：AP14B004）。

3-2-2 米アルブミンの腹腔内グルコース投与後の血糖値および血漿インスリン値上昇抑制効果の検討（IPGTT）

RA の腹腔内グルコース投与後の血糖値および血漿インスリン値上昇抑制効果は、腹腔内グルコース負荷試験（IPGTT: Intraperitoneal Glucose Tolerance Test）にて評価した。試験前、ラットをランダムに以下の 2 群に分けた（ $n=9$ /群）：グルコース + PBS 投与群，グルコース + RA 200 mg/kg 体重投与群。なお，グルコース + PBS 投与群をコントロール群とした。試験前に 15 時間絶食させ，試験直前に尾静脈採血を行い，アセンシアブリーズ 2（バイエル薬品株式会社）にて空腹時初期血糖値を測定した。採血後，5 mL の PBS に溶解した 200 mg RA を 5 mL/kg 体重となるように，無麻酔下でゾンデにて経口胃内投与した。RA を含まない PBS のみを経口胃内投与した群をコントロールとした。経口胃内投与した時間を -15 分とし，15 分後（0 分）に尾静脈採血を行い，血糖値を測定した後，5 mL の PBS にグルコース 1 g を溶解した溶液を 5 mL/kg 体重となるように腹腔内注射にて投与した。投与後，15 分，30 分，45 分，90 分の時間に尾静脈採血を行い，血糖値を測定した。以降，2-2-5 と同じ方法で，血漿中インスリン濃度の測定と曲線下面積の算出を行った。

3-2-3 *In vitro* における米アルブミンのグルコース吸着能の評価

Ou らの方法 (Ou *et al.*, 2001) を参考に、一部修正を加えて行った。透析ユニットの上部チャンバー (Slide-A-Lyzer MINI Dialysis Unit 3.5K MWCO, 69550, Thermo Fisher Scientific) の中に、8 mg/mL の濃度となるよう純水に溶解した RA、カルボキシメチルセルロース (CMC ; C4888, Sigma-Aldrich) または、グァーガム (G4129, Sigma-Aldrich) 溶液 125 μ L と、200 mM グルコース溶液 125 μ L を加えてよく混合した。この混合液を含んだ上部チャンバーを 2 mL の純水で満たした下部チャンバーに浸し、37°C, 100 回/min の振とう下で透析を行った。透析開始から 30, 60, 90, 120, 150 分後に 20 μ L の透析外液を分取し、透析外液中のグルコース量をグルコース CII-テストワコーを用いて測定した。

3-2-4 質量分析計 (LC/MS/MS) を用いた難消化性米アルブミンの同定

二次元電気泳動

2-2-3 の方法を用いて、RA をペプシンで 2 時間、パンクレアチンで 6 時間酵素反応させた後、80°C で 10 分間インキュベートして酵素反応を停止した。この溶液を純水に対して透析を行い低分子ペプチドと塩を除去した後、凍結乾燥を行い、難消化性 RA 粉末を得た。

難消化性 RA 粉末 10 μ g を、0.5% (v/v) ZOOM Carrier Ampholytes pH 3-10 (Thermo Fisher Scientific), 0.02% (w/v) ブロムフェノールブルー含有 60 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.8) 155 μ L に溶解し、ZOOM IPG Runner Cassette (Thermo Fisher Scientific) に満たした。ZOOM strip pH 3-10NL (Thermo Fisher Scientific) を取り付けてゲルを 1 時間膨潤した後、ZOOM IPG Runner Mini-Cell (Thermo Fisher Scientific) を用い

て、175 V で 20 分間、175 V-2000 V で 45 分間、2000 V で 60 分間の条件で等電点電気泳動を行った。

泳動後、ストリップゲルを、SDS 化溶液 [3 M 尿素, 10% (w/v) グリセロール, 1% (w/v) SDS, 50 mM DTT, 0.02% (w/v) ブロムフェノールブルー含有 18.66 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.8)] 5 mL に 15 分浸漬して SDS 化した後、アルキル化溶液 [3 M 尿素, 10% (w/v) グリセロール, 1% (w/v) SDS, 50 mM アクリルアミド, 0.02% (w/v) ブロムフェノールブルー含有 18.66 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.8)] 5 mL に 15 分浸漬してアルキル化した。ストリップゲルを NuPAGE 4-12% Bis-Tris ZOOM Gels, 1.0 mm, IPG well (Thermo Fisher Scientific) の上にセットして、2%アガロースゲルで二つのゲルを固定した。このゲルを、XCell SureLock Mini-Cell (Thermo Fisher Scientific) にセットし、NuPAGE MES SDS Running Buffer (Thermo Fisher Scientific) を満たして、200 V で 45 分間の条件で SDS-PAGE を行った。泳動終了後、2-2-3 と同様の操作で CBB 染色を行った。

ゲル内トリプシン消化

CBB 染色したゲルを OHP フィルム (VF-5, コクヨ株式会社, 大阪) の上に乗せ、メスにより各スポットを 1 mm 角の立方体に切り出した。ゲル片をスポットごとに各チューブに移し、脱色液 [30% (v/v) アセトニトリル含有 25 mM 重炭酸アンモニウム溶液] 100 μ L を加えて、室温で 10 分間振とうした。チューブから脱色液を取り除き、ゲル片から CBB 染色液の色が完全に抜けるまでこの操作を繰り返した。

チューブから脱色液を取り除き、ゲル片を真空乾燥 (CVE-200D, 東京理化器械株式会社, 東京) した。続いて、チューブに還元液 (10 mM DTT 含有 25 mM 重炭酸アンモニウム溶液) 100 μ L を加え、56°C で

60 分間振とうした。還元液を取り除き，洗浄液（25 mM 重炭酸アンモニウム）100 μ L を加え，室温で 10 分間振とうした。さらに，アルキル化液（55 mM ヨードアセトアミド含有 25 mM 重炭酸アンモニウム溶液）100 μ L を加えて，室温で 45 分間振とうして還元アルキル化した。洗浄液とアルキル化液の混合液を取り除き，100 μ L の洗浄液を加えて，室温で 10 分間振とうした。脱水液 200 μ L を加え，室温で 10 分間振とうした後，脱水液を取り除き，ゲル片を真空乾燥した。

そして，トリプシン溶液 [10 μ g/mL Sequencing Grade Modified Trypsin (V5111, Promega, USA) 含有 50 mM 重炭酸アンモニウム溶液] 30 μ L を加え，氷上に 30 分間静置した後，余分なトリプシン溶液を取り除き，37°C で一晩トリプシン消化を行った。続いて，抽出液 [50% (v/v) アセトニトリル含有 5% (v/v) トリフルオロ酢酸] 50 μ L を加え，室温で 30 分間振とうした後，抽出液を別のチューブに回収した。ゲル片の入ったチューブに，さらに抽出液 25 μ L を加え，室温で 30 分間振とうした後，先ほど抽出液を回収したチューブに，抽出液をさらに回収し，90 分間真空乾燥した。このチューブへ 0.1% (v/v) ギ酸溶液 13 μ L を加え，ボルテックスミキサーにて良く攪拌した後，溶液 12 μ L を新しいチューブへ回収した。この溶液を LC/MS/MS 用の試料とした。

LC/MS/MS 分析

LC/MS/MS 分析は，nano-LC エレクトロスプレーイオン化源（エーエムアール株式会社，東京）を備えたキャピラリー HPLC システム（Paradigm MS4, Michrom Bioresources, USA）と接続した LC-Deca XP イオントラップ質量分析計（Thermo Finnigan, USA）を使用して行った。

ペプチドは、試料 10 μ L をペプチド分離カラム (L-column Micro C18, ϕ 0.2 \times 50 mm, 化学物質評価研究機構, 東京) に注入し, 流速 1.5 μ L/min, アセトニトリル濃度 5-80% の直線勾配で, 移動相 A [2% (v/v) アセトニトリル, 0.1% (v/v) ギ酸] および移動相 B [90% (v/v) アセトニトリル, 0.1% (v/v) ギ酸] によって, 30 分以上の間隔をあけて分離・溶出された。溶出されたペプチドは, エレクトロスプレーイオン化源に直接注入され, イオントラップ質量分析計で検出された。得られた MS/MS データは, 実験データと既知のタンパク質配列から得られた理論スペクトルとの相関を可能にする SEQUEST (Bioworks v3.2, Thermo Fisher Scientific) によって分析された。全てのスペクトルは, 米国立生物工学情報センター (NCBI) の “*Oryza sativa*” に該当する FASTA 形式のデータベースに対して検索された。

3-2-5 難消化性米アルブミンのホモロジーモデリングと構造解析

難消化性 RA の立体構造の推定は, 自動タンパク質構造モデリングサーバー (SWISS-MODEL, <http://swissmodel.expasy.org/>, Swiss; Arnold, *et al.*, 2006; Schwede *et al.*, 2003; Guex and Peitsch, 1997) を用いて行った。NCBI データベース上の Os07g0214300 [*Oryza sativa Japonica* Group] (Accession, 113610721) を目的タンパク質とし, Chain A, 0.19 Alpha-Amylase Inhibitor From Wheat (Accession, 3318681; PDB, 1HSS; Oda, *et al.*, 1997; Maeda *et al.*, 1985) を鋳型タンパク質として用いた。得られた立体構造情報 (PDB file) は, タンパク質立体構造シミュレーションソフトウェア (ICM Browser, MolSoft L.L.C., USA) を用いて画像化した。

3-2-6 米アルブミンからの HMP と LMP の分画

RA 250 mg を，50 mL 容スクリーキャップ付遠沈管（VIO-50BN，アズワン株式会社，大阪）に量り取り，50 mM 重炭酸アンモニウム溶液 25 mL を加え，ミクロスパーテルで溶解した。この溶液に，ウシ膵臓由来トリプシン（208-13954，富士フィルム和光純薬株式会社）2.5 mg を添加し，37°C，100 回/分で振とうしながら 6 時間インキュベートした。80°C，10 分間インキュベートしてトリプシンを失活させ，水中で室温まで冷却した後，凍結乾燥したものをトリプシン処理 RA 粉末とした。

トリプシン処理 RA 粉末 160 mg に，50 mM 重炭酸アンモニウム溶液 5.3 mL を加え，ミクロスパーテルで溶解した。この溶液を遠心分離（10,000g，4°C，15 分間）し，上清と沈殿をそれぞれ回収した。沈殿は 4°C で保存し，上清は孔径 0.45 μm フィルター（25CS045AS，アドバンテック東洋株式会社，東京）で滅菌および清澄化した後，Sephadex G-25（17003101，GE Healthcare）ゲルろ過カラム（ $\phi 2.5 \times 100$ cm）を接続した FPLC システム（AKTA prime plus）にアプライし，50 mM 重炭酸アンモニウム溶液を移動相として，流速 0.5 mL/min，5 mL/フラクション，4°C の条件で分離した。214 nm の波長における吸光度をモニタリングし，トリプシン未処理 RA のクロマトグラムと比較して，トリプシン処理後に新たに出現したピークフラクションを LMP とし，未処理 RA と同じリテンションタイムに出現したピークフラクションとゲルろ過前の遠心沈殿を混合したものを難消化性画分である HMP とした。得られた HMP および LMP は凍結乾燥し，使用するまで -20°C 以下で保存した。

SDS-PAGE は，2-2-3 と同じ方法で行った。アクリルアミド濃度 14%（w/v）の分離ゲルの使用し，RA，HMP および LMP 粉末 10 μg を 1×SDS sample buffer 20 μL に混合し，各ウェルにアプライした。電気

泳動後のゲルは CBB 染色した。

3-2-7 *In vitro* における HMP のグルコース吸着能の評価

透析ユニットの上部チャンバーの中に、8 mg/mL の濃度となるよう純水に溶解した RA、HMP または CMC 溶液 125 μ L と、200 mM グルコース溶液 125 μ L を加えてよく混合した。以降、3-2-3 と同様の方法で透析および経過時間ごとの透析外液中のグルコース量を測定した。

3-2-8 統計解析

データは、エクセル統計（株式会社社会情報サービス、東京）を使用した一元配置分散分析（ANOVA）によって分析した。各グループ間の比較は、Tukey-Kramer の検定または Dunnett の検定を使用して行い、 p 値が 0.05 以下の確率値を統計的に有意なものとした。

3-3 結果

3-3-1 腹腔内グルコース負荷試験 (IPGTT)

Wistar ラットへの IPGTT における, RA 投与後の血糖値および血漿インスリン値の変化を測定した結果を Figure 3-1 に示す。グルコースを腹腔内注射した後の血糖値, 血漿インスリン値の変化およびそれらの曲線下面積 (AUC) において, コントロール群と RA 200 mg/kg 体重投与群との間に有意な差は認められなかった。

3-3-2 *In vitro* における米アルブミンのグルコース吸着能の評価

透析ユニットにおける, RA または食物繊維の有無による下部チャンバー内のグルコース濃度の経時変化を Table 3-1 に示す。RA, CMC およびグァーガム群の下部チャンバー透析液中のグルコース濃度は, CMC の 30 分の結果を除き, 測定したすべての時間において, コントロール群と比較して有意に減少し, それぞれコントロール群の 74.9-78.3%, 80.9-93.1%, 49.7-67.6%であった。グルコース拡散に対する RA の抑制効果は, グァーガムよりも低かったが, CMC よりもわずかに高かった。

3-3-3 難消化性米アルブミンの同定と構造解析

難消化性米アルブミンの 2 次元電気泳動の結果を Figure 3-2 に示す。その結果, 4 つのスポットが確認され, pI はそれぞれ 6.1, 6.6, 7.2, 7.6 であった。各スポットのタンパク質を LC/MS/MS により同定した結果, 4 つのタンパク質全てが, α -amylase inhibitors and seed storage protein subfamily に属する, Os07g0214300 (Accession, 113610721) であることが示唆された (Table 3-2)。Os07g0214300 と小麦 0.19 α -AI

(Accession, 3318681) のアミノ酸配列の相同性は 34.1%であり、システイン残基の数と位置は高く保存されていた (Figure 3-3)。結晶構造が既知の小麦 0.19 α -AI (Oda *et al.*, 1997; PDB, 1HSS) を鋳型とし、Os07g0214300 の立体構造を、SWISS-MODEL を用いて推定した。その結果、166 個のアミノ酸配列のうち、40-160 番目のアミノ酸配列に対して構造が推定された。Os07g0214300 は、小麦 0.19 α -AI と同様に、4 つの α -ヘリックス、2 つの短い逆平行 β -ストランドを有し、Cys41 と Cys93, Cys55 と Cys81, Cys63 と Cys82, Cys95 と Cys153, Cys125 と Cys141 において 5 つの分子内ジスルフィド結合を形成するタンパク質であると推察された (Figure 3-4)。

3-3-4 米アルブミンからの HMP と LMP の分画

トリプシン処理および未処理 RA のゲルろ過クロマトグラフィーのクロマトグラムを Figure 3-5 A に示す。未処理 RA は、リテンションタイム 290-395 分に単一の大きなピークとして溶出されたが、トリプシン処理 RA は、リテンションタイム 290-395 分に同様の大きなピークが観察された後、395 分より後に複数の小さなピークが観察された。トリプシン処理 RA のクロマトグラムにおける、未処理 RA と重なる、リテンションタイム 290-395 分のピークフラクションと、SDS-PAGE の結果 14 kDa の高分子ペプチドであった(データ示さず)ゲルろ過クロマトグラフィー前の遠心沈殿物を混合したものを HMP とし、395 分より後のピークフラクションを回収したものを LMP とした。HMP および LMP の SDS-PAGE の結果を Figure 3-5 B に示す。14-16 kDa の RA バンド (レーン 1) は、トリプシン処理によって部分的に分解され、14 kDa のペプチドが残存した (レーン 2)。HMP の分子質量は、レーン 2 の 14 kDa ペプチドの分子質量と一致した (レ

ーン 3)。一方で，LMP の分子質量は<2 kDa と小さいことから，CBB 染色では検出されなかった（レーン 4）。RA 160mg から，おおよそ HMP 100mg と LMP 50mg が得られ，HMP と LMP は約 2：1 の重量比で精製された。

3-3-5 *In vitro* における HMP のグルコース吸着能の評価

透析ユニットにおける，RA，HMP または CMC の有無による下部チャンバー内のグルコース濃度の経時変化を Table 3-3 に示す。透析開始 30-150 分における，RA，HMP およびポジティブコントロールである CMC 群の下部チャンバー透析液中のグルコース濃度は，それぞれコントロール群の 57-76%，79-87% および 76-83% であった。HMP のグルコース拡散抑制効果は，RA より若干低かったが，CMC と同程度であった。

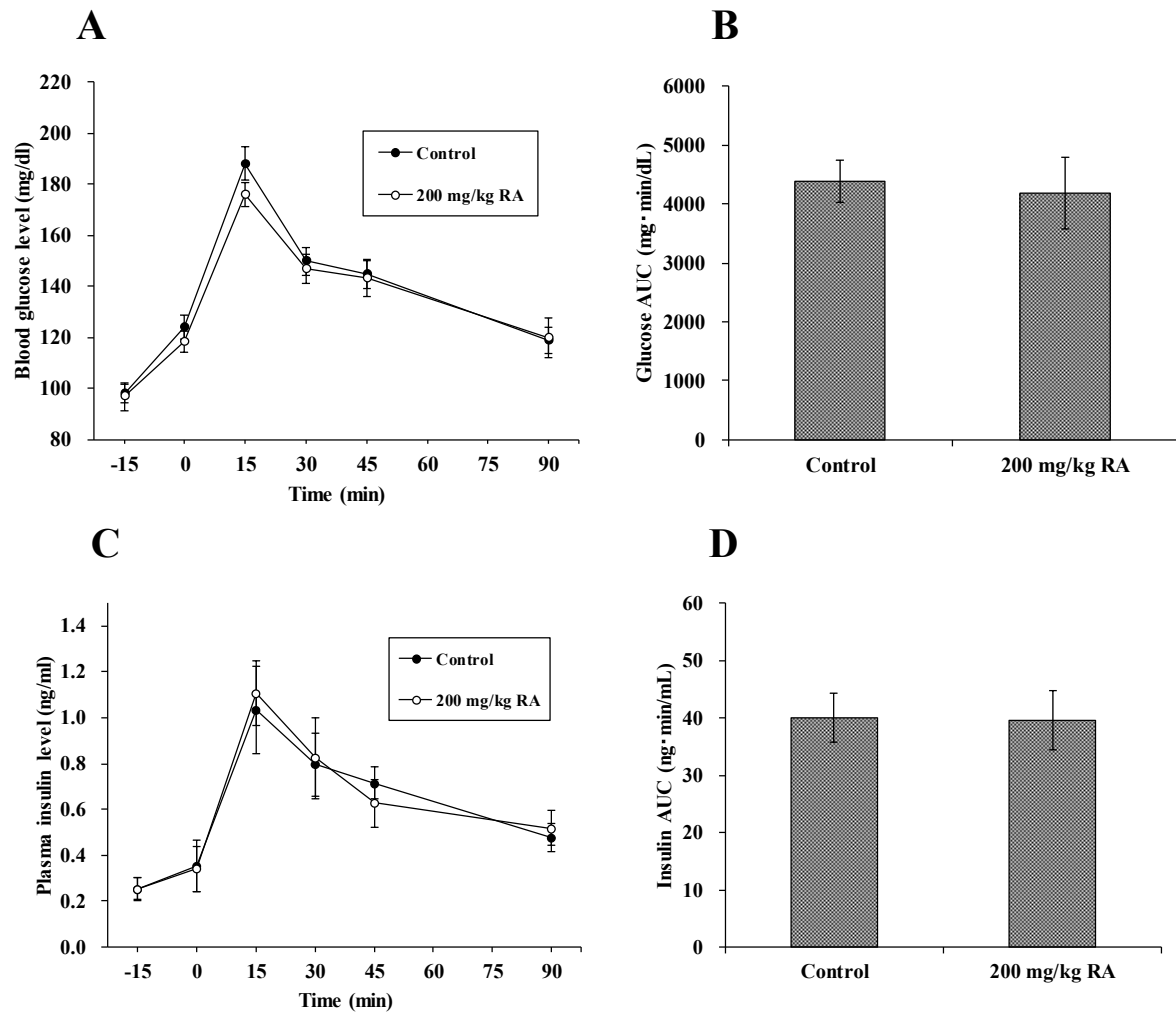


Figure 3-1. Effects of RA on blood glucose level (A), glucose AUC (B) plasma insulin level (C), and insulin AUC (D) after intraperitoneal glucose tolerance test (IPGTT) on Wistar rats. Values with different letters are significantly different at $p < 0.05$ vs. control group by Tukey-Kramer's test. Each value is the mean of 9 animals with SE shown as a vertical bar.

Table 3-1. Effects of RA and various dietary fibers on glucose diffusion

	Glucose in dialysate (mmol/L)				
	30 min	60 min	90 min	120 min	150 min
Control	1.419 ± 0.091	2.794 ± 0.145	4.036 ± 0.153	5.111 ± 0.072	6.186 ± 0.219
RA	1.063 ± 0.068*	2.158 ± 0.056*	3.089 ± 0.087*	4.004 ± 0.070*	4.843 ± 0.098*
Guar gum	0.959 ± 0.081*	1.721 ± 0.096*	2.283 ± 0.034*	2.805 ± 0.208*	3.073 ± 0.116*
CMC	1.321 ± 0.030	2.439 ± 0.074*	3.395 ± 0.110*	4.028 ± 0.167*	5.002 ± 0.138*

Values with * are significantly different at $p < 0.05$ vs. control group by Dunnett's test. Each value is the mean of 5 experiments ± SE.

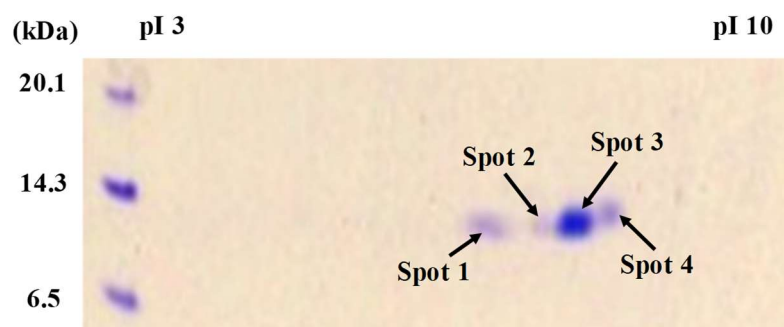


Figure 3-2. 2-Dimensional electrophoresis of indigestible RA.

Table 3-2. Proteins identified from indigestible RA by LC/MS/MS analysis

SpotNo.	Accession	Protein name	Sf	Peptides	Coverage (%)	MW
1	BAF21099	Os07g0214300 (<i>Oryza sativa Japonica</i>)	7.26	9	44.58	17864.5
2	BAF21099	Os07g0214300 (<i>Oryza sativa Japonica</i>)	5.65	7	47.60	17864.5
3	BAF21099	Os07g0214300 (<i>Oryza sativa Japonica</i>)	7.89	10	44.60	17864.5
4	BAF21099	Os07g0214300 (<i>Oryza sativa Japonica</i>)	5.61	7	44.58	17864.5

Sf, Sf score calculated by SEQUEST; Coverage, the percent coverage based upon the amino acids of the protein; Peptides, total number of peptide matches; MW, molecular weight calculated from amino-acid sequence of the protein.

WA (0.19 α -AI)	5	MCYPGQAFQVPALPACRPLLRLQCNGSQVP-----EAVLRDCCQQ	44
RA (Os07g0214300)	40	RCQPGMGYPMYSLPRCRAVVKRQCVGHGAPGGAVDEQLRQDCCRQ	84
WA (0.19 α -AI)	45	LAHISE-WCRCGALYSMLDSMYKEHGAGE-GQAGTGAFPRCRREV	87
RA (Os07g0214300)	85	LAAVDDSWCRCSALNHMVGGIYRELGATDVGHHPMAEVFPGCRRGD	129
WA (0.19 α -AI)	88	VKLTAASITAVCRLPIVVDASGDGAYVCKDVAAYP	122
RA (Os07g0214300)	130	LERAAASLP AFCNVDIPN---GTG-GVC-YWLGYP	160

Figure 3-3. Homology of amino-acid sequences between WA (0.19 α -AI) and RA (Os07g0214300).

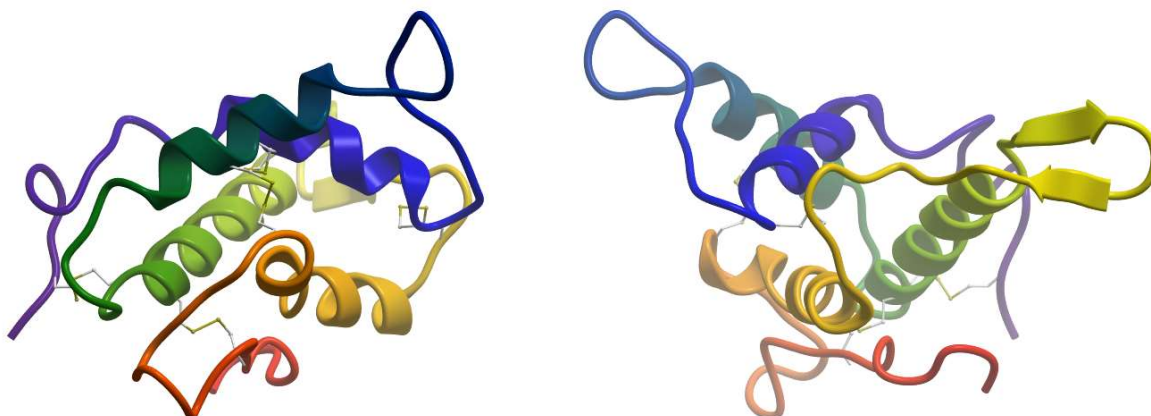


Figure 3-4. Predicted structure of RA (Os07g0214300) by SWISS-MODEL using the structure of WA (0.19 α -AI) as a template. The left and right 3D-structures show RA (Os07g0214300) viewed from different angles. The positions of disulfide bond in RA were predicted to be Cys41-Cys93, Cys55-Cys81, Cys63-Cys82, Cys95-Cys153 and Cys125-Cys141.

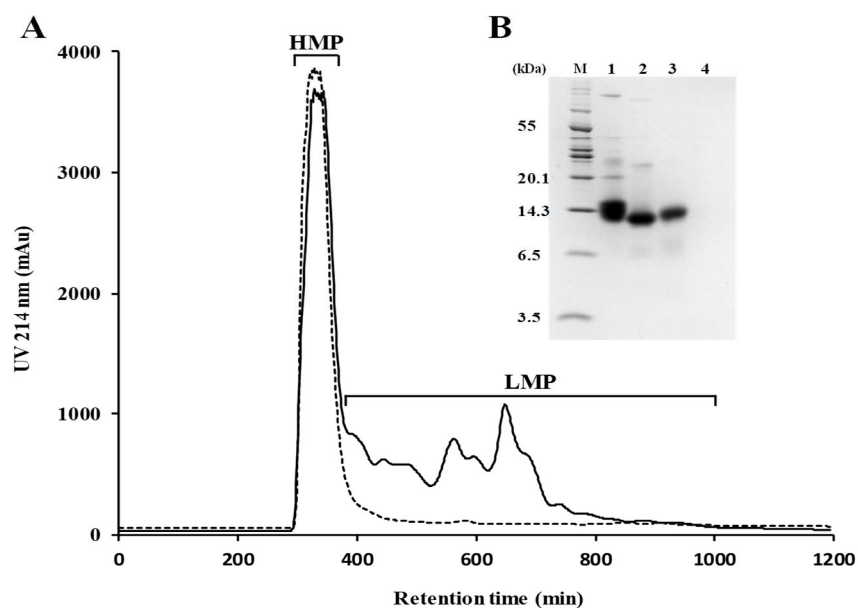


Figure 3-5. Fractionation of HMP and LMP by Sephadex G-25 gel-filtration chromatography (A). Chromatograms indicate trypsin-treated RA (solid line) and untreated RA (broken line). The two fractions indicated by brackets on the chromatogram of trypsin-treated RA were subjected to SDS-PAGE analysis (B). M, molecular-mass marker; lane 1, untreated RA; lane 2, trypsin-treated RA; lane 3, HMP; lane 4, LMP.

Table 3-3. Effects of RA and HMP on glucose diffusion

	Glucose in dialysate (mmol/L)				
	30 min	60 min	90 min	120 min	150 min
Control	1.718 ± 0.089	3.018 ± 0.153	4.220 ± 0.182	5.279 ± 0.238	6.148 ± 0.299
RA	0.986 ± 0.044*	2.051 ± 0.096*	2.959 ± 0.153*	3.848 ± 0.241*	4.664 ± 0.213*
HMP	1.352 ± 0.048*	2.527 ± 0.093*	3.556 ± 0.141*	4.501 ± 0.141*	5.323 ± 0.151*
CMC	1.299 ± 0.031*	2.408 ± 0.062*	3.398 ± 0.075*	4.263 ± 0.049*	5.111 ± 0.068*

Values with * are significantly different at $p < 0.05$ vs. control group by Dunnett's test. Each value is the mean of 3-6 experiments ± SE.

3-4 考察

RA は、WA と異なり、哺乳類の α -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、IPGTT を行った。Wistar 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、血糖値および血漿インスリン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、血糖値とインスリン値の変化は、RA を投与しないコントロール群と同じ傾向になる。一方、もし、RA が消化吸収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、インスリン値の変化はコントロール群と異なる傾向を示すはずである。IPGTT の結果、RA を経口投与しても、血糖値およびインスリン値の変化はコントロール群とほぼ同じであった (Figure 3-1)。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であると考えられた。

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、高分子のまま小腸に達することで、グルースを吸着し排出を促進することで食後の血糖値およびインスリン値の上昇を抑制する (Jenkins *et al.*, 1978)。RA は、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の消化耐性の高いペプチドが残存することから、RAは、高分子のまま消化管に到達し、食物繊維様の効果で血糖値およびインスリン値の上昇を抑制する可能性があると考えられた。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、Ouらの考案した半透膜を用いたグルコース拡散試験にて、RAまたは食物繊維存在下での半透膜を通過するグルコースの拡散速度 (mmol/min) から評価した (Ou *et al.*, 2001)。RAまたは食物繊維の存在下での下部チャンバー内の透析液のグルコース濃度 (C_L : mmol/L) は、それらが存在しない場合よりも低かった (Table 3-1)。特定の時間 t (min) における $C_L V_L$ (V_L : 下部チャンバーの溶液体積) は、透析開始からの時間 t (min) までに膜を通過して拡散したグルコース量 (mmol) であるため、Table 3-1の結果から、上部チャンバーにRAまたは食物繊維が存在することで、膜を通過するグルコースの拡散速度が抑制されたことになる。膜を通過するグルコースの拡散速度は、上部チャンバーと下部チャンバー間のグルコース濃度の差に比例することから、この拡散速度の低下は、RAまたは食物繊維へのグルコースの吸着によって引き起されたことになる。以上の結果から、RAは、血糖値上昇抑制効果が知られているCMC (Brenelli *et al.*, 1997) やグァーガム (Jenkins *et al.*, 1978) といった食物繊維と同様に、グルコース吸着能を示すことが明らかとなった。

一方で、RA中に元々含まれる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のタンパク質の分解により生成した14 kDaペプチドが作用を示すのかは定かではない。そこで、質量分析計を用いて、RAに消化酵素を作用させた後に残存する14 kDaのタンパク質 (またはペプチド) の同定を行った。その結果、この

14 kDa のタンパク質（またはペプチド）は、NCBI データベース上の α -amylase inhibitors and seed storage protein subfamily に属する、分子質量が約 18 kDa の Os07g0214300 (Accession, 113610721) であることが明らかとなった (Table 3-2)。Adachi らは、Os07g0214300 と同じアミノ酸配列をもつ RAG2 (Accession, 119395238) の cDNA のクローニングを行い、RAG2 の 1-26 番目のアミノ酸はシグナルペプチドとして切断されることを示唆している (Adachi *et al.*, 1993)。このことから、14 kDa のバンドは、分子質量が約 16 kDa のタンパク質の分解ペプチドであることが明らかとなった。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、Os07g0214300 (16 kDa RA) の構造特性を、SWISS-MODEL を用いて推定した。 α -Amylase inhibitors and seed storage protein subfamily に属するタンパク質は、小麦、大麦、稲といった、イネ科の植物に広く存在している (Franco *et al.*, 2002)。それらのアミノ酸配列は互いに相同性を持ち、特にシステイン残基の数と位置は高く保存されている (Strobl *et al.*, 1998)。その中でも、WA に含まれる小麦 0.19 α -AI は、16 kDa RA と 34.1% の相同性を持ち、システイン残基の数と位置は高く保存されていた (Figure 3-3)、さらに、小麦 0.19 α -AI は、Oda らにより結晶構造が明らかにされていることから (Oda *et al.*, 1997)、これを鋳型とし、16 kDa RA の立体構造を推定した。その結果、16 kDa 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た (Figure 3-4)。ジスルフィド結合を含むタンパク質は、消化酵素に対して耐性をもつことが知られていることから (Reddy *et al.*, 1988),

この構造特性が消化耐性を示す理由の一つであることが示唆された。

また、RA は小麦 0.19 α -AI とアミノ酸配列に一定の相同性を有するにもかかわらず、哺乳類由来 α -アミラーゼの活性を阻害しなかった。小麦 0.19 α -AI において、哺乳類由来 α -アミラーゼを活性阻害するのに重要となるアミノ酸は、47 番目ヒスチジンであると報告されているが (Franco *et al.*, 2000), 16 kDa RA の場合、それに対応するアミノ酸がアラニンに置き換わっていた (Figure 3-3)。すなわち、この構造的な違いが、RA が哺乳類由来 α -アミラーゼの活性を阻害しない理由の一つであると思われる。

一方で、RA がグルコース吸着能を有することは明らかとなったが、消化酵素により部分分解された HMP においてもグルコース吸着能を示すのかは不明である。そこで、RA の酵素消化物から 14 kDa の HMP を分画し、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。その結果、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 (Table 3-3)。

以上、本研究の結果から、RA の血糖値上昇抑制メカニズムの一つとして、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、食後血糖値の上昇を抑制することが示唆された (Ina *et al.*, 2016; Ina *et al.*, 2020)。

第 4 章 米アルブミン分解ペプチドの食後血糖値および血漿インスリン値上昇抑制効果の検討

4-1 緒言

食品タンパク質の消化や分解によって生じるペプチドの中には、生体内において生理活性を示すものが知られている。例えば、トウモロコシのゼイン由来のペプチドや米のグルテリン由来のペプチドが、インスリンの分泌を促すホルモンであるインクレチンの分泌を刺激し、さらには、インクレチン分解酵素である DPP-IV の活性を阻害することによって、食後の血糖値上昇を穏やかにすることが報告されている (Hira *et al.*, 2009; Mochida *et al.*, 2010; Ishikawa *et al.*, 2015; Ina *et al.*, 2019a)。

前章において、RA の食後血糖値および血漿インスリン値上昇抑制効果は、難消化性 HMP の糖吸着・排出促進作用によることが示唆された (Ina *et al.*, 2016; Ina *et al.*, 2020)。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 の血糖値および血漿インスリン値上昇抑制メカニズムを明らかにすることを目的とし、RA 分解ペプチド HMP および LMP のそれぞれの効果について検討した。まず、RA の効果が HMP の食物繊維様の作用のみに起因するのかを明らかにするため、RA をアルカリ-トリプシン処理することより消化耐性を消失させた RA 加水分解ペプチドを用いて糖負荷試験を行った。次に、LMP が小腸から血中へのグルコース輸送に及ぼす影響について、その入口となる $\text{Na}^+/\text{D-グルコース}$ 共輸送体 (sodium dependent glucose transporter-1:

SGLT1) をターゲットとして，マウス小腸上皮由来細胞である STC-1 細胞を用いた *in vitro* の系にて検討した。

4-2 実験材料と方法

4-2-1 アルカリトリプシン処理による米アルブミン加水分解物の調製

RA 1 g に 1 N NaOH 10 mL を加え，室温で 2 時間攪拌後，1 N HCl を加えて pH 7 に調整した。純水に対して透析した後，凍結乾燥してアルカリ処理 RA 粉末を得た。

アルカリ処理 RA 粉末 1 g を 50 mM 重炭酸アンモニウム溶液 100 mL に溶解し，ウシ膵臓由来トリプシン 10 mg (208-13954, 富士フィルム和光純薬株式会社) を加え，37°C，100 回/分で振とうしながら 6 時間インキュベートした。80°C，10 分間インキュベートしてトリプシンを失活させ，水中で室温まで冷却した後，凍結乾燥したものをアルカリトリプシン処理 RA (RAH) 粉末とした。試料は，使用するまで -20°C 以下で保存した。また，14% アクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE (2-2-3) により，分解の程度を評価した。

4-2-2 実験動物

実験動物である Wistar ラットの飼育は，2-2-4 と同じ条件で行った。本章における全ての動物実験は，日本大学生物資源科学部の動物実験ガイドラインに従って実施された（承認番号：AP13B056 および AP13B083）。

4-2-3 アルカリトリプシン処理米アルブミン加水分解物の食後血糖値・インスリン値上昇抑制効果の検討 (OGTT)

試験前，ラットをランダムに以下の 3 群に分けた (n=6-9/群)：グルコース + PBS 投与群，グルコース + RA 200 mg/kg 体重投与群，グ

ルコース + RAH 200 mg/kg 体重投与群。なお，グルコース + PBS 投与群をコントロール群とした。以降，2-2-5 と同じ方法で OGTT を行い，血糖値，血漿中インスリン濃度測定および，曲線下面積の算出を行った。

4-2-4 米アルブミン消化ペプチド（HMP，LMP）の食後血糖値・インスリン値上昇抑制効果の検討（OGTT）

試験前，ラットをランダムに以下の 4 群に分けた（n=9-15/群）：グルコース + PBS 投与群，グルコース + RA 200 mg/kg 体重投与群，グルコース + HMP 133 mg/kg 体重投与群，グルコース + RA 67 mg/kg 体重投与群，グルコース + HMP 133 mg/kg 体重投与群。なお，グルコース + PBS 投与群をコントロール群とした。以降，2-2-5 と同じ方法で OGTT を行い，血糖値，血漿中インスリン濃度測定および，曲線下面積の算出を行った。

4-2-5 マウス小腸上皮由来細胞（STC-1 細胞）の培養

実験細胞として，マウス小腸上皮由来細胞である STC-1 細胞（CRL-3254，ATCC，passage 40-90，Rindi *et al.*, 1990）を用いた。細胞培養は Vayro らの方法（Vayro *et al.*, 2001）を参考に，一部修正して行った。

STC-1 細胞懸濁液（ 1.2×10^6 total cells/ampule）を Complete growth medium [10% (v/v) fetal bovine serum, (S1780, フナコシ株式会社，東京)，100 U/mL ペニシリン (P7794, Sigma-Aldrich)，and 100 μ g/mL ストレプトマイシン (S9137, Sigma-Aldrich) 含有 Dulbecco's Modified Eagle's medium (11965-084, Gibco: Thermo Fisher Scientific)] 9 mL に添加した。これを遠心分離（500 rpm, 3 min, 室温；H-500FR，株式

会社コクサン，埼玉）し，沈澱として得た細胞を Complete growth medium 15 mL に懸濁した。この懸濁液を 75 cm² の細胞培養フラスコ（2-8589-02，アズワン株式会社，大阪）に移し，5% CO₂ 存在下，37°C でインキュベートした（MCO-170AIC，パナソニックヘルスケア株式会社，群馬）。細胞の接着を確認した後，培地を除去し，Complete growth medium 15 mL を加えて，5% CO₂ 存在下 37°C で，70% コンフルエントになるまで培養した。培養中の培地交換は 2-3 日に 1 回行った。

4-2-6 マウス小腸上皮由来細胞（STC-1 細胞）の SGLT1 発現量に及ぼす LMP の効果の検討

STC-1 細胞からの SGLT1 を含むタンパク質の抽出

実験は，4-2-5 の方法で培養した STC-1 細胞を用いて，Vayro らの方法（Vayro *et al.*, 2001）を参考に，一部修正して行った。

細胞を 70%コンフルエントになるまで培養後，トリプシン-EDTA 溶液（25300-062，Gibco: Thermo Fisher Scientific）2 mL を加え，5% CO₂ 存在下，37°C で 1 分 30 秒間インキュベートして細胞を剥離した。細胞懸濁液 50 μL を分取して，トリパンブルー溶液（207-17081，富士フィルム和光純薬株式会社）50 μL を混合し，血球計算盤（2-5390-03，アズワン株式会社）で生細胞数を測定した。細胞懸濁液を遠心分離（500 rpm，3 min，室温）して上清を除去した後，生細胞が 5×10⁵ cells/mL となるよう Complete growth medium に懸濁した。この細胞懸濁液を，Complete growth medium 14.3 mL の入った 75 cm² の細胞培養シャーレ（353003，Corning，USA）に添加した後，5% CO₂ 存在下，37°C でインキュベートした。細胞の接着を確認した後，培地を除去し，Complete growth medium 15 mL を加え，5% CO₂ 存在下 37°C で，2-3 日に 1 回培地交換を行いながら，90%コンフルエントに

達するまで培養した。

続いて、培地を除去し、PBS（ダルベッコ PBS(-)粉末「ニッスイ」，05913，日水製薬株式会社，東京）溶液 5 mL を加えて細胞表面を洗浄後，この溶液を除去し，100 μ g/mL LMP 含有 25 mM グルコース培地（100 μ g/mL LMP 含有 Complete growth medium）15 mL を添加し，5% CO₂ 存在下 37°C で，48 時間培養した。なお，ポジティブコントロールとして 25 mM グルコース培地（Complete growth medium），ネガティブコントロールとして 3 mM グルコース培地 [3 mM グルコース，10% (v/v) fetal bovine serum, (S1780, フナコシ株式会社，東京)，100 U/mL ペニシリン（P7794, Sigma-Aldrich），100 μ g/mL ストレプトマイシン（S9137, Sigma-Aldrich）含有 Dulbecco's Modified Eagle's medium (No-glucose) (11966-025, Gibco: Thermo Fisher Scientific)] を LMP 無添加で使用した。

培養後，培地を除去し，氷冷した PBS 溶液 5 mL を加えて細胞表面を洗浄した後，溶液を除去して再び氷冷した PBS 溶液 5 mL を添加した。スクレーパー（1-2248-01，アズワン株式会社）で細胞を剥離して遠沈管に移し，培養フラスコに氷冷した PBS 溶液 5 mL を加えて残りの細胞を剥離し，同じ遠沈管に加えた。遠心分離（1,000 rpm, 5 min, 室温）して上清を除去し，沈殿として得た細胞を，Lysis buffer [150 mM NaCl, 1% (w/v) SDS, 10 mM EDTA, 1% (v/v) protease inhibitor cocktail (25955-24, ナカライテスク株式会社，京都)，0.2 mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride; 06297-31, ナカライテスク株式会社)，10 mM HEPES-Tris (pH 7.4)] 1 mL に懸濁し，超音波破碎機（NR-21, 株式会社マイクロテックニチオン，千葉）を用いて最大出力で破碎を行った。破碎と氷冷は 30 秒ごとに交互に行い，この操作を 15 回行った。続いて，遠心分離（1,000g, 10 min, 4°C）して上清を回収し，

21, 25, 27 ゲージの注射針で各 10 回ずつホモジナイズして, タンパク質抽出液を得た。BCA Protein Assay Kit (23227, Thermo Fisher Scientific) を用いてタンパク質濃度を測定し, 等量の 2×SDS sample buffer を加え, 室温で一晩放置した後, タンパク質濃度が 15 $\mu\text{g}/20\ \mu\text{L}$ となるよう調製したものを電気泳動用サンプルとした。

ウェスタンブロット法

電気泳動用サンプル各 20 μL と分子質量マーカー (DM637, 株式会社株式会社バイオダイナミクス研究所, 東京) 5 μL を用いて, アクリルアミド濃度 8% (w/v) の分離ゲルの使用し, 2-2-3 と同じ操作で SDS-PAGE を行った。

セミドライブロッティング装置 (AE-6677, アトー株式会社) の陽極側から, ブロッティング A 液 (300 mM Tris, 5%メタノール) を染み込ませたろ紙 (3030-909, GE Healthcare) 2 枚, B 液 (25mM Tris, 5%メタノール) を染み込ませたろ紙 1 枚, メタノールに 30 秒間浸した後, B 液に 30 分以上浸した PVDF 膜 (WSE-4052, アトー株式会社), 泳動ゲル, C 液 (25 mM Tris, 40 mM 6-アミノカプロン酸, 5%メタノール) を染み込ませたろ紙 3 枚の順に重ね, 50 V, 2×PVDF 膜の面積 (cm^2)mA の定電流で 60 分間転写を行った。転写後の PVDF 膜を TPBS [150 mM NaCl, 0.05% Tween 20, 10 mM Tris-HCl (pH 7.4)] で洗浄し, 0.5% (w/v) スキムミルク (190-12865, 富士フイルム和光純薬株式会社) 含有 TPBS で, 室温で 1 時間ブロッキングを行った。膜を洗浄後, 1 次抗体 [(Anti-SGLT1 抗体; ab14686, Abcam, GBR; 1:500) または (Anti- β -actin(C4), sc-47778, Santa Cruz Biotechnology, USA; 1:10,000)] を加え, 4°C で一晩反応させた。膜を洗浄後, 2 次抗体 [(Goat Anti-Rabbit IgG Peroxidase Conjugate, DC03L, Merck, DEU; 1:1,000)

または (Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody, 7076S, Cell Signaling Technology, USA ; 1:10,000)] を加え, 37°C で 2 時間反応させた。

続いて, ECL Select Western Blotting Detection Reagent (RPN2235, GE Healthcare) を用いて, Chemi Doc MP (Bio-Rad, USA) にてバンドを検出した後, Image Lab ソフトウェア (Bio-Rad, USA) を用いてバンド強度の解析を行った。ローディングコントロールである β -アクチンの Adj. Vol. (Int) の値で SGLT1 の Adj. Vol. (Int) の値を割ることにより, サンプル間の誤差を補正した。ポジティブコントロールの値を平均し, これを 100%としたときのネガティブコントロールおよび LMP 添加群の値を求め, これを SGLT1 relative abundance (%) とした。

4-2-7 統計解析

データは, エクセル統計 (株式会社社会情報サービス, 東京) を使用した一元配置分散分析 (ANOVA) によって分析した。各グループ間の比較は, Tukey-Kramer の検定または Dunnett の検定を使用して行い, p 値が 0.05 以下の確率値を統計的に有意なものとした。

4-3 結果

4-3-1 アルカリトリプシン処理による米アルブミン加水分解物の調製

トリプシン処理およびアルカリ処理または両方の処理による，RAの消化性の変化を比較した結果を Figure 4-1 に示す。アルカリ処理を行わずにトリプシン処理のみを行った場合，RAの15-16 kDaのバンド部は部分的に加水分解されたが，14kDaのバンドは残存していた。一方で，アルカリ処理のみを行った場合，RAの14-16kDaのバンドは加水分解しなかったが，その後が続いてトリプシン処理を行ったRAHの場合は，14-16kDaのバンドはほとんど消失し，8 kDa以下の低分子ペプチドに加水分解された。

4-3-2 アルカリトリプシン処理米アルブミンの食後血糖値上昇抑制効果の検討（OGTT）

Wistar ラットへの OGTT における，RA および RAH 投与後の血糖値および血漿インスリン値の変化を測定した結果を Figure 4-2 に示す。コントロール群において，血糖値および血漿インスリン値は，グルコース投与後 15 分でピークに達し，時間経過とともに空腹時のレベルに戻った。グルコースと RA または RAH 200 mg/kg 体重との同時投与は，ピーク時における血糖値および血漿インスリン値を有意に減少させた (Figure 4-2 A および C)。投与後 15 分での血糖値はそれぞれ，コントロール群が 179 ± 10 mg/dL，RA 投与群で 159 ± 11 mg/dL，RAH 投与群で 157 ± 7 mg/dL であった。投与後 15 分での血漿インスリン値はそれぞれ，コントロール群で 1.81 ± 0.30 ng/mL，RA 投与群で 0.74 ± 0.17 ng/mL，RAH 投与群で 1.06 ± 0.19 ng/mL であった。RA およ

び RAH 投与群におけるグルコース AUC は、コントロール群と比較して、それぞれ 73% および 64% にまで減少した (Figure 4-2 B)。さらに、RA および RAH 投与群におけるインスリン AUC は、コントロール群と比較して、それぞれ 69% および 76% にまで減少した (Figure 4-2 D)。

4-3-3 米アルブミン消化ペプチド (HMP, LMP) の食後血糖値・インスリン値上昇抑制効果の検討 (OGTT)

Wistar ラットへの OGTT における、RA, HMP および LMP 投与後の血糖値および血漿インスリン値の変化を測定した結果を Figure 4-3 に示す。コントロール群において、血糖値および血漿インスリン値は、グルコース投与後 15 分でピークに達し、時間経過とともに空腹時のレベルに戻った。グルコースと RA 200 mg/kg 体重および RA 中に含まれるそれぞれのペプチドの相当量である HMP 133 mg/kg 体重または LMP 67 mg/kg 体重との同時投与は、ピーク時における血糖値および血漿インスリン値を有意に減少させた (Figure 4-3 A および C)。投与後 15 分での血糖値はそれぞれ、コントロール群が 157 ± 4 mg/dL, RA 投与群で 143 ± 4 mg/dL, HMP 投与群で 140 ± 5 mg/dL, LMP 投与群で 146 ± 3 mg/dL であった。投与後 15 分での血漿インスリン値はそれぞれ、コントロール群で 1.10 ± 0.16 ng/mL, RA 投与群で 0.80 ± 0.16 ng/mL, HMP 投与群で 0.79 ± 0.15 ng/mL, LMP 投与群 0.66 ± 0.14 ng/mL であった。RA, HMP および LMP 投与群におけるグルコース AUC は、コントロール群と比較して、それぞれ 77%, 77% および 72% にまで減少した (Figure 4-3 B)。さらに、RA および RAH 投与群におけるインスリン AUC は、コントロール群と比較して、それぞれ 70%, 77% および 71% にまで減少した (Figure 4-3 D)。また、RA, HMP および

LMP 投与群間において、血糖値およびインスリン AUC に有意差は認められなかった。

4-3-4 マウス小腸上皮由来細胞（STC-1 細胞）の SGLT1 発現量に及ぼす LMP の効果の検討

STC-1 細胞における培地中の LMP の有無による SGLT1 の発現量 [relative abundance (%)] の変化を測定した結果を Figure 4-4 に示す。SGLT1 の発現量は、培地中のグルコース濃度が 3 mM から 25 mM へ増加するにつれて急激に増加した。25 mM グルコース培地に 100 μ g/mL の LMP を添加した群において、SGLT1 の発現は 25 mM グルコース培地群（ポジティブコントロール）の $40 \pm 18\%$ にまで減少した。すべてのグループ間において、内部標準である β -アクチンの発現量に有意差は認められなかった。また、MTT アッセイにより LMP の細胞毒性を調べた結果、3 mM グルコース培地群と LMP 群間に有意な差は認められなかった（データ示さず）。

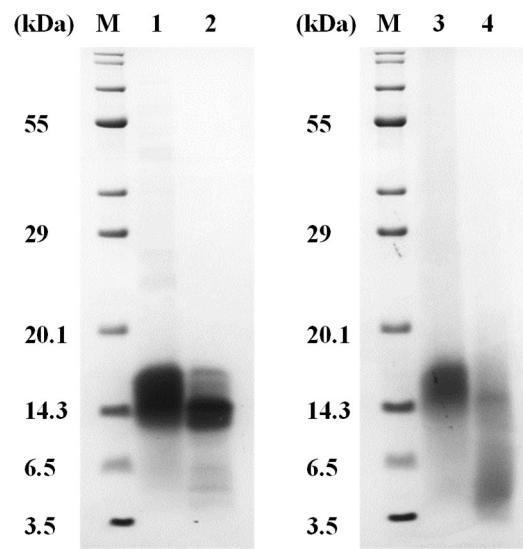


Figure 4-1. *In vitro* digestibility of RA shown by SDS-PAGE. M, molecular-mass marker; lane 1, RA; lane 2, trypsin-treated RA; lane 3, alkali-treated RA; lane 4, RA hydrolyzed by alkaline and tryptic treatments (RAH).

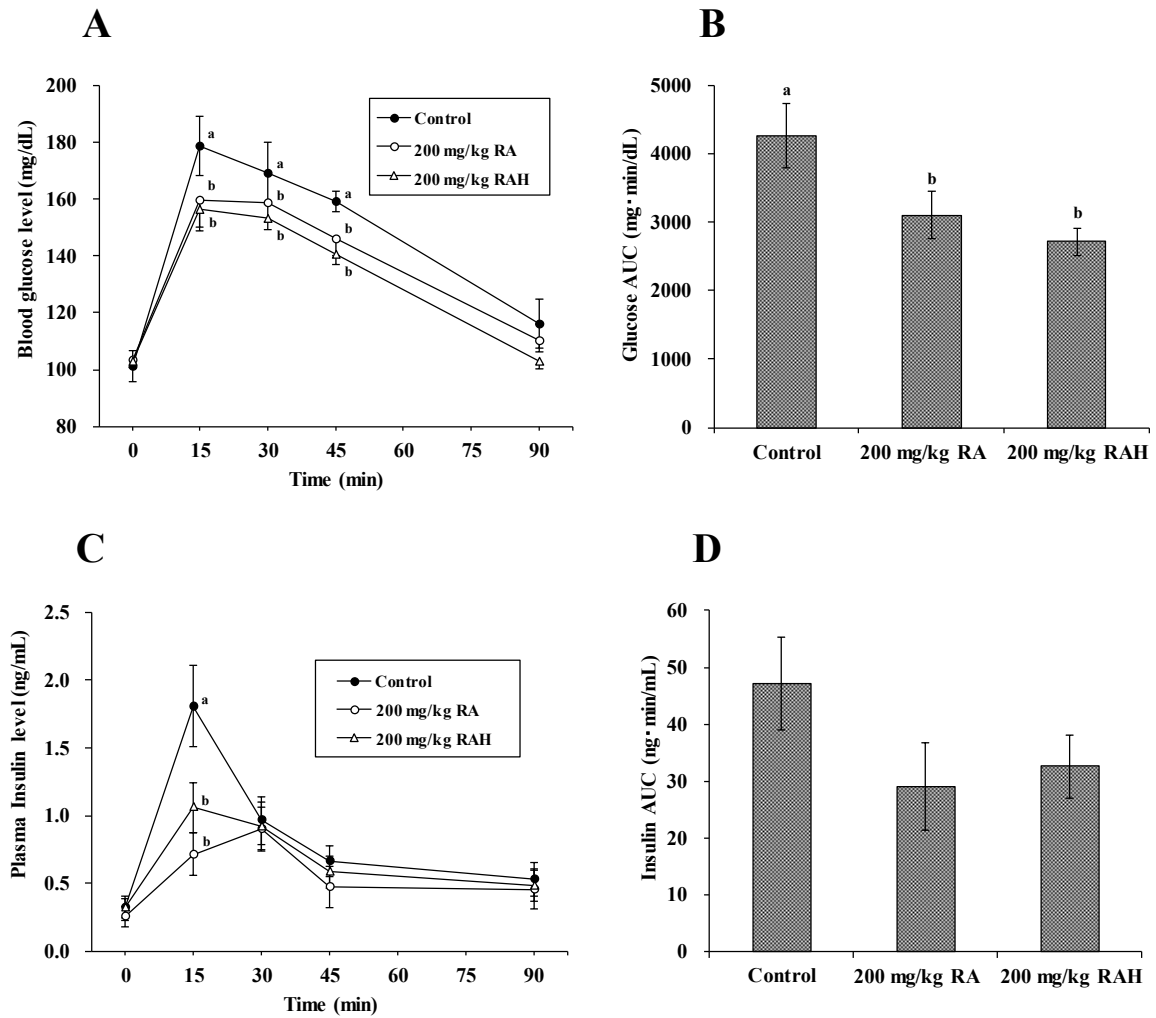


Figure 4-2. Effects of RA and RAH on blood glucose level (A), glucose AUC (B), plasma insulin level (C), and insulin AUC (D) after the oral glucose tolerance tests (OGTT) on Wistar rats. Values with different letters are significantly different at $p < 0.05$ vs. control group by Tukey-Kramer's test. Each value is the mean of 6–9 animals with the SE shown as a vertical bar.

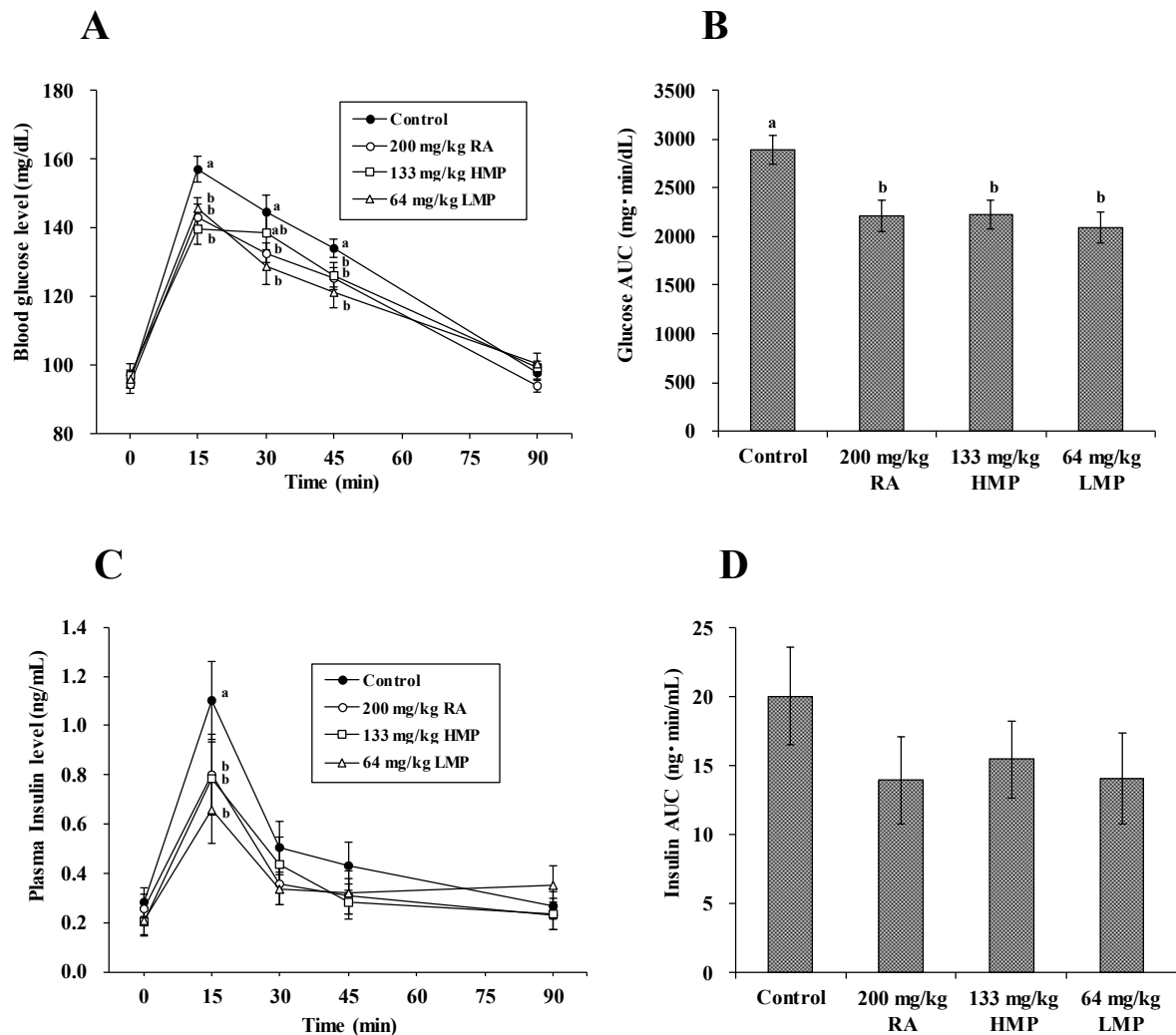


Figure 4-3. Effects of RA, HMP and LMP on blood glucose level (A), glucose AUC (B), plasma insulin level (C) and insulin AUC (D) after the oral glucose tolerance test (OGTT) on Wistar rats. Values with different letters are significantly different at $p < 0.05$ vs. control group by Tukey-Kramer's test. Each value is the mean of 9–15 animals with the SE shown as a vertical bar.

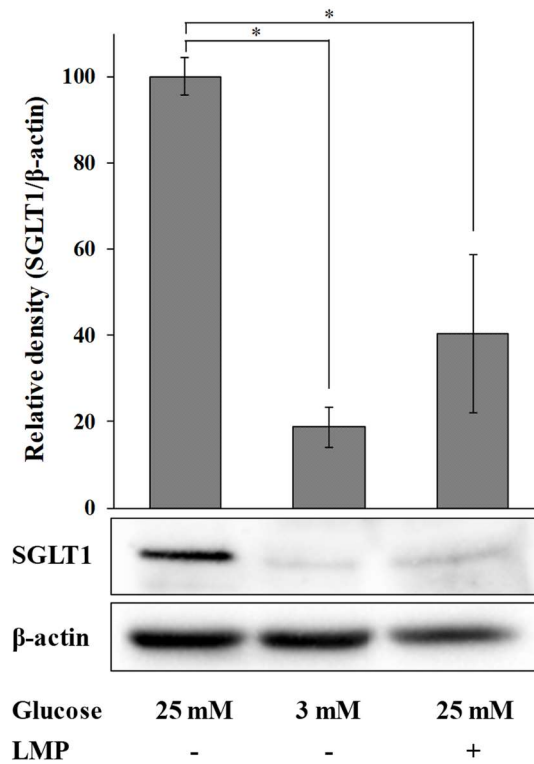


Figure 4-4. Effect of LMP in a solution of medium glucose concentration on SGLT1 abundance in STC-1 cells (Western blotting). Cells were cultured in medium containing different concentrations of glucose (3 or 25 mM) for 48 h at 37°C and 5% CO₂. Values with * are significantly different at $p < 0.05$ vs. those of the control group by Dunnett's test. Each value is the mean of 3 experiments with SE as a vertical bar.

4-4 考察

食物タンパク質は、ペプシン、トリプシン、キモトリプシンなどの胃や小腸に存在する消化酵素によって、ペプチドやアミノ酸にまで消化される。前章において、RA の食後血糖値およびインスリン値上昇抑制効果は、難消化性高分子ペプチドである HMP 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および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 (Figure 4-1)。この RAH をグルコースと共に Wistar 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、食後血糖値および血漿インスリン値の上昇を有意に抑制した (Figure 4-2)。従って、RA の食後血糖値上昇抑制効果には、難消化性の HMP による食物繊維様の作用だけではなく、LMP 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 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、血糖値および血漿インスリン値の変化を測定した。その結果、RA 投与群だけでなく HMP 投与群および LMP 投与群においても、食後血糖値および血漿インスリン値上昇がコントロール群と比較して有意に抑制された (Figure 4-3)。Ishikawa らは、

米のアルカリ可溶性タンパク質であるグルテリンの加水分解ペプチドが、インクレチンである GLP-1 の血中への分泌を刺激すること、および、血中においてインクレチン分解酵素である DPP-IVの活性を阻害することで、膵臓からのインスリン分泌を促進し、食後の血糖値上昇を穏やかにすることを報告している (Ishikawa *et al.*, 2015)。しかしながら、OGTT の結果、RA、HMP および LMP の経口投与によって血漿インスリン値の上昇は抑制された (Figure 4-3 C)。インスリン分泌量の減少は、小腸からのグルコース吸収量の減少を示すこと、さらには、前章の IPGTT 結果から、RA は血中ではなく消化管内で作用することが明らかになっていることから、RA 分解ペプチドは、米グルテリンペプチドと異なり、小腸から血中へのグルコース取り込みプロセスを阻害することにより、食後の高血糖を抑制したことが示唆された。HMP においては、前章のグルコース拡散試験の結果より、消化管におけ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が示唆されている。一方、LMP においては、RA や HMP と同様に、グルコース吸着能についての詳細な検討は必要ではあるものの、分子質量が 2 kDa 以下と低分子のため、HMP のようにグルコースを吸着する可能性が低いことから、小腸上皮細胞におけるグルコース輸送機能の阻害により、食後の高血糖を抑制することが示唆された。

小腸からのグルコースの取り込みは、 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 は空腹時にはほとんど発現しておらず、小腸上皮細胞の表面に存在する甘味受容体である T1R2/T1R3 ヘテロ二量体にグルコースが結合することによるシグナル伝達によって、瞬時に発現する (Nelson *et al.*, 2001; Shirazi-Beechey *et al.*, 2011; Gorboulev *et al.*, 2012)。また、その発現量は、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 (Vayro *et al.*, 2001;

Dyer *et al.*, 2003)。そこで、LMP が SGLT1 の発現に及ぼす影響を、実際の小腸上皮細胞と比較して SGLT1 の発現速度に差はあるものの、その発現経路の類似性から、現在最も適した実験細胞である STC-1 細胞を用いて評価した (Vayro *et al.*, 2001)。その結果、高グルコース (25 mM) 存在下においても、LMP を培地中に添加することで SGLT1 の発現は有意に抑制された (Figure 4-4)。この結果は、LMP が小腸上皮細胞での SGLT1 の発現を阻害することにより、小腸から血液へのグルコース取り込みを抑制することを強く支持している。SGLT1 の発現は、いくつかのペプチドによって阻害されることが報告されている。35 残基のアミノ酸からなる味覚修飾ペプチドであるグルマリンは、T1R3 の細胞外ドメインと T1R2 の細胞外および膜貫通ドメインに結合することで、SGLT1 発現におけるガストデューシン依存性経路を遮断するアンタゴニストとして作用して、SGLT1 の発現を阻害する (Margolskee *et al.*, 2007; Yasumatsu *et al.*, 2009)。RA は、14-16 kDa の複数のタンパク質の集合体であることから、その分解物である LMP も様々なペプチドで構成されていると予想される。詳細なメカニズム解明の為に、SGLT1 発現阻害の核となるペプチドを特定する必要があるが、LMP に含まれるペプチドも T1R2/T1R3 からのシグナル伝達経路のどこかを阻害することで、SGLT1 の発現を抑制したと考えられる。

一方で、RA、HMP および LMP 投与群のグルコース AUC は同程度であり、HMP および LMP の相乗効果は RA 投与群でほとんど観察されなかった (Figure 4-3 B)。この理由として、RA は不十分に消化されて少量の HMP と LMP を生成したか、RA はペプシンやキモトリプシンなどの他のプロテアーゼによってより広範囲に消化され、LMP 中の生理活性ペプチドの一部が失われた可能性が考えられる。この疑

問を解消するためには、ラットへの OGTT において、*in vitro* で生成した HMP と LMP の混合物を投与するといった方法で検証を行う必要があるだろう。

以上本研究の結果から、RA の血糖値・インスリン値上昇抑制効果は、*in vivo* において RA から産生される、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示唆された (Ina *et al.*, 2020)。一方で、本研究において SGLT1 の発現抑制効果を検証したのは LMP のみであり、RA および HMP においても同様の機能性を有している可能性があること、*in vivo* における実際の小腸上皮細胞の SGLT1 発現抑制効果については未知なことから、今後更なる検証が必要だろう。

さらに本研究の結果から、LMP という従来の血糖値・インスリン値上昇抑制メカニズムとは異なる作用機序で効果を発揮する機能性成分の発見に至った。現在、SGLT1 の発現を阻害する食品成分に関する報告は僅かであり、米といった世界中の国々で主食とされるほどの食品からの発見は本研究がはじめてである。LMP を濃縮して摂取する場合、毒性や安全性についての更なる検証は必須ではあるが、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。よって本研究の知見は、新たな機能性食品成分として LMP を単独利用する観点からも貴重なものである。

第 5 章 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

5-1 緒言

米は、多くの国々で主食として食され、アジアにおいては、主要な炭水化物およびタンパク質の供給源として、最も広く消費されている植物性食品の一つである (Kennedy and Burlingame, 2003)。米の胚乳には、約 8% のタンパク質が含まれており、溶媒への可溶性の違いから、グルテリン (酸アルカリ可溶性画分：含有率 80%)、グロブリン (塩水可溶性画分：含有率 12%)、アルブミン (水溶性画分：含有率 5%)、プロラミン (アルコール可溶性画分：含有率 3%) に分けられる (Ju *et al.*, 2001)。米タンパク質の中には、栄養源としてだけではなく病気の予防や治療に有効な生理機能を持つものが知られており、プロラミンとグロブリンは血中や肝臓のコレステロールを低下させる効果をもつことや (Yang *et al.*, 2007; Tong *et al.*, 2012) や、グルテリンは糖尿病性腎症の進行に対する改善効果をもつことなどが報告されている (Kubota *et al.* 2013)。筆者も前章まで研究において、RA が食後の血糖値および血漿インスリン値の上昇を抑制し、糖尿病の予防に有効な機能食品素材であることを明らかにしてきた (Ina *et al.*, 2016; Ina *et al.*, 2019a; Ina *et al.*, 2020)。

一方で、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 (Wang *et al.* 1999)。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、殺菌処理における加熱や酸・アルカリ処理による pH 変化により変性し、

その特性を失うものも多い。RA は、水溶性・無味・無臭であり、飲料をはじめとする種々の食品に利用できる可能性があるため、もし RA が高い熱安定性をもち、広い pH 範囲において優れた物理化学的性質を備えているのであれば、様々な形態の食品に適用することが可能となる。

そこで本章では、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ことを目的とし、RA の熱安定性と、それに及ぼす分子内ジスルフィド結合の影響について評価した。続いて、食品の加工において一般的な pH 3-8 の範囲における、RA の溶解性、起泡性、乳化性および表明疎水性度といった物理化学的性質について、食品産業で一般的に使用されるカゼイン (Kinsella, 1984)、大豆タンパク質分離物 (SPI: Yasumatsu *et al.*, 1972) および乾燥卵白 (DEW: Campbell *et al.*, 2003) と比較して評価した。

5-2 実験材料と方法

5-2-1 実験材料

RA (タンパク質純度 85-95%) は、2-2-1 の方法で調製した。SPI (Soy protein isolate; タンパク質純度 90%), DEW (Dried egg white タンパク質純度 94%), カゼイン (牛乳由来, タンパク質純度 83%) は、それぞれ不二製油株式会社 (大阪), キューピー株式会社 (東京), 富士フイルム和光純薬株式会社 (大阪) から購入した。

5-2-2 米アルブミンの熱安定性の評価

米アルブミンの熱安定性の評価

RA の熱安定性は、加熱処理後の RA のミールワーム由来 α -アミラーゼに対する阻害活性を測定することによって評価した。RA を純水 1 mL に 0.1% (w/w) となるようにネジ口試験管の中で溶解し、室温で 60 分間攪拌した。RA 溶液を 100°C で 10-120 分間加熱させた後、室温まで冷却し、ミールワーム由来 α -アミラーゼに対する阻害活性を 2-2-2 の方法で測定した。熱安定性は、加熱処理後の RA の残存する α -アミラーゼ阻害活性の比として表し、以下のように計算した

$$\text{熱安定性 (\%)} = (\text{加熱 RA の } \alpha\text{-アミラーゼ阻害活性} / \text{未加熱 RA の } \alpha\text{-アミラーゼ阻害活性}) \times 100$$

米アルブミンの濃度が熱安定性に及ぼす影響の評価

RA の濃度が熱安定性に及ぼす影響は、種々の濃度における RA のミールワーム由来 α -アミラーゼに対する阻害活性を測定することによって評価した。RA を純水 1 mL に 0.1-10% (w/w) となるようにネ

ジロ試験管の中で溶解し，室温で 60 分間攪拌した。各溶液を 2 つの試験管に分け，一方の試験管を 100°C で 60 分間加熱した。両試験管を氷冷し，最終濃度が 0.05% (w/w) となるように純水で希釈した。これらの懸濁液を遠心分離 (10,000g, 15 min, 4°C) し，上清を純水で 25 倍希釈し，ミールワーム由来 α -アミラーゼに対する阻害活性を 2-2-2 の方法で測定した。熱安定性は，上記と同じ方法で計算した。

DSC を用いた米アルブミンの熱安定性におけるジスルフィド結合の寄与の評価

RA の熱安定性に対するジスルフィド結合の寄与は，示差走査熱量計 (DSC) を用いて，還元剤の有無における変性温度を測定することにより評価した。RA を水または 200 mM DTT 溶液へ 20% (w/w) となるように溶解し，室温で 16 時間攪拌した。続いて，各 RA 溶液 30 mg を銀パン (GCA-0021, 株式会社日立ハイテクサイエンス, 東京) に秤量した。パンを密閉し，DSC (DSC-100:セイコーインスツル株式会社, 千葉) へセットし，1°C/min の昇温速度で 25-130°C まで加熱した。リファレンスとして，等量の蒸留水または 200 mM DTT 溶液を含む密閉パンを用いた。変性開始温度 (T_i)，変性ピーク温度 (T_p)，変性収束温度 (T_f) および変性のエンタルピー (ΔH) は，Standard Analysis (セイコーインスツル株式会社) を用いて DSC サーマグラムから計算した。

5-2-3 可溶性窒素量の評価

Bera と Mukherjee の方法 (Bera and Mukherjee, 1989) を参考に，一部修正して行った。タンパク質試料 200 mg をクエン酸リン酸緩衝液 (50 mM クエン酸, 100 mM リン酸水素二ナトリウムを混合し pH 3-8

に調整) 20 mL に懸濁し、室温で 60 分間攪拌した後、2 つの試験管に分けた。一方は 80°C で 20 min 加熱し、もう一方は室温で保った。2 つの試験管を遠心分離 (10,000g, 15 min, 室温) し、上清の窒素含有量をケルダール法により求めた。また、タンパク質 100 mg 中の全窒素含有量を緩衝液に溶解させることなく測定した。

ケルダール法は以下の操作で行った。試料を精秤し、ケルダールフラスコに移した。分解促進剤 (硫酸カリウム:硫酸銅・5 水和物 = 9:1) 2 g と濃硫酸 20 mL を加え、ケルダール分解台で青緑色になるまで加熱した。青緑色を呈してから更に 1 時間加熱し、放冷後、蒸留水で 50 mL に fill up した。ケルダール蒸留装置を洗浄後、少量のフェノールフタレインを加えた 1/20 N H₂SO₄ 10 mL とグローク氏液 [0.1% (v/v) メチルレッド, 0.1% (v/v) メチレンブルー含有エタノール溶液] 2 滴を受けフラスコに入れ、冷却管の先に設置した。試料分解液 5 mL に 30% (w/v) NaOH 10 mL を加えて蒸留した。受けフラスコの溜出液が 80 mL 以上で蒸留を終了した。受けフラスコに残っている 1/20 N H₂SO₄ を 1/20 N NaOH で滴定した。盲検として、1/20 N H₂SO₄ 10 mL を 1/20 N NaOH で滴定した。試料中の窒素含有量および、各 pH の緩衝液における可溶性窒素量は以下の式で算出した。

$$\text{窒素含有量} = 1/20 \times 14 \times (V_0 - V_1) \times F_{\text{NaOH}} / F_{\text{H}_2\text{SO}_4} \times 50/5$$

V_0 : 盲検の滴定値 (mL)

V_1 : 分解液の滴定値 (mL)

F_{NaOH} : 1/20N NaOH の力価

$F_{\text{H}_2\text{SO}_4}$: 1/20N H₂SO₄ の力価

$$\text{可溶性窒素量 (\%)} = (\text{上清の窒素含有量} / \text{全窒素含有量}) \times 100$$

5-2-4 米アルブミンの Hydropathy index の評価

Kyte と Doolittle の方法 (Kyte and Doolittle, 1997) に従い, ExPASy データベース上の自動タンパク質構造計算サーバー (ExPASy Proteomics Server, <http://www.expasy.ch/cgi-bin/protscale.pl>, Swiss) を用いて行った。目的タンパク質には, 3-3-3 で同定された Os07g0214300 [Oryza sativa Japonica Group] (Accession, 113610721) を用いた。

5-2-5 乳化性の評価

Pearce と Kinsella の方法 (Pearce and Kinsella, 1978) を参考に, 一部修正して行った。タンパク質試料 30 mg を 1 % (w/v) となるよう, クエン酸リン酸緩衝液 (pH 3-8) 3 mL に溶解し, 60 分間室温で撹拌した。遠心分離 (10,000g, 10 min, 室温) を行い, ガラス製試験管に上清 2.4 mL, コーン油 (富士フイルム和光純薬株式会社) 0.8 mL を加え, ポリトロンホモジナイザー (PT-1200E, KINEMATICK, CHE) でホモジナイズ (25,000 rpm, 1 min, 室温) し, 0 分, 10 分経過時に試験管底部より試料混合液を 50 μ L 分取し, 0.1% (w/v) SDS 溶液 5 mL に混合した後, 500 nm の波長における吸光度を, 分光光度計 (UVmin-1240, 島津製作所, 東京) を用いて測定した。乳化測定後, 試験管を静置し, 10 分後に同様に乳化を測定した。これを乳化安定性とした。

5-2-6 起泡性の評価

Wang らの方法 (Wang *et al.*, 1999) を参考に, 一部修正して行った。タンパク質試料 24 mg を 0.2% (w/v) となるよう, クエン酸リン酸緩

衝液 (pH 3-8) 12 mL に溶解し, 60 分間室温で攪拌した。遠心分離 (10,000g, 10 min, 室温) を行い, 上清 10 mL を 250 mL 容ガラス製メスシリンダー ($\phi 35$ mm) 中に入れた。窒素ガスボンベと連結したシリコンチューブの先にピペット用ディスポーサブルチップ (00-BMT2-SG, 株式会社ニチリョー, 埼玉) を装着し, チップの先端がメスシリンダーの底部に到達するまでチューブを垂らした。続いて, 窒素ガスを $90 \text{ cm}^3/\text{min}$ の風速で 5 分間, 15 秒ごとに注入し, 最も高い泡の体積を起泡性とした。泡立ち測定後, 空気の注入を止め, そこから 10 分後の泡の体積を測定し, これを泡立ち安定性とした。

5-2-7 表面疎水性度の評価

Iwami らの方法 (Iwami *et al.*, 1986) を参考に。タンパク質試料 30 mg を 1% (w/v) となるよう, クエン酸リン酸緩衝液 (pH 3-8) 1 mL に溶解し, 60 分間室温で攪拌した。遠心分離 (10,000g, 10 min, 室温) を行い, 上清をクエン酸リン酸緩衝液 (pH 3-8) で 0.1-0.0125% (w/v) となるように希釈した。各溶液 200 μL を 96 ウェルマイクロプレートに分注し, 100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解した 8 mM 1-アニリノ-8-ナフタレンスルホン酸 (ANS; 富士フイルム和光純薬株式会社) 1 μL を添加した。ANS の蛍光強度は, それぞれ 390 nm と 470 nm の励起および蛍光波長を用いて, フルオロメータ (Synergy 2, BioTek, USA) を用いて測定した。蛍光強度とタンパク質濃度の線形回帰分析の係数をタンパク質表面疎水性の指標として用いた。

5-2-8 統計解析

データは, エクセル統計 (株式会社社会情報サービス, 東京) を使用した一元配置分散分析 (ANOVA) によって分析した。各グループ

間の比較は、Tukey-Kramer の検定または Dunnett の検定を使用して行い、 p 値が 0.05 以下の確率値を統計的に有意なものとした。

5-3 結果

5-3-1 米アルブミンの熱安定性の評価

RA の熱安定性は，ミールワーム由来 α -アミラーゼに対する阻害活性を指標として評価した。 α -アミラーゼ阻害活性は，加熱時間が長くなるにつれて徐々に低下したが，濃度が 0.1% の場合，100°C で 120 分間加熱後も残存阻害活性は 50% にとどまった (Figure 5-1)。また，表面疎水性度は， α -アミラーゼ阻害活性と反比例して，加熱時間が長くなるにつれて徐々に増加した (Figure 5-1)。種々の濃度における RA の熱安定性を測定した結果， α -アミラーゼ阻害活性は濃度依存的に低下したが，100°C で 60 分間加熱した後も α -アミラーゼ阻害活性が残存していた (Figure 5-2)。また，結果には示していないが，加熱による変性凝集は濃度依存的に増加した。

DSC による測定の結果，DTT (還元剤) を添加していない RA の変性吸熱ピークは 73.3°C (T_i) で開始し，114.8°C (T_f) で終了した。変性ピーク温度 (T_p) と変性エンタルピー (ΔH) は，それぞれ 100.8°C と 3.15 J/g であった (Figure 5-3 A, Table 5-1)。対照的に，DTT を添加した RA の変性吸熱ピークの T_i および T_f は，それぞれ 37.3°C と 59.3°C であり， T_p と ΔH はそれぞれ 52.0°C と 0.78 J/g であった。さらに，DTT 添加後では，溶液の白濁が確認された (Figure 5-3 B)。

5-3-2 可溶性窒素量の評価

80°C, 20 分間の加熱前後における種々の pH の溶液へのタンパク質の溶解性を，可溶性窒素量として評価した (Figure 5-4)。RA は加熱後もいずれの pH においても高い溶解性を示した。DEW の溶解性は加熱前では高かったが，加熱後に大幅に減少した。カゼインは pH 5 以

下の溶液に溶解しなかったが，未加熱および加熱後のいずれにおいても pH 7 以上の溶液に溶解した。SPI の溶解度は，他のタンパク質サンプルほど高くはなかったが，未加熱および加熱後のいずれにおいても pH の増加に伴って徐々に増加した。

5-2-4 米アルブミンの Hydropathy index の評価

タンパク質構造自動計算サーバー ExPASy を用いて，RA に含まれるタンパク質である Os07g0214300 の hydropathy index を算出した結果を，Figure 5-5 示す。5-24 番目のアミノ酸を除き，殆どのアミノ酸残基が 0 以下の値を示した。Os07g0214300 の 1-26 番目のアミノ酸は，シグナルペプチドとして切断されていると予想されていることから (Adachi *et al.*, 1993)，Os07g0214300 は，構造内に小さな疎水性コアを持ち，表面には多くの親水基が露出した親水性の高いタンパク質であることが示唆された。

5-3-3 乳化性の評価

いずれのタンパク質も中性領域 (pH 6-8) 付近において高い乳化性を示したが，カゼインおよび SPI は pH 5 以下で低い乳化性を示した (Figure 5-6)。一方で，RA の乳化性は安定しており，すべての pH において高い値を維持した。また，カゼイン，SPI，および DEW とは異なり，RA の乳化安定性は酸性領域 (pH 3-5) では比較的高かったが，pH 6 では低かった。SPI と DEW の乳化安定性は，測定されたいずれの pH においても低かったのに対し，カゼインの乳化安定性は pH 大きくなるにつれて徐々に増加し，pH 7-8 においては RA とほぼ同程度であった。

5-3-4 起泡性の評価

RA および DEW は、すべての pH において安定した起泡性を示したが、カゼインおよび SPI は pH 5 以下で低い値を示した (Figure 5-7)。酸性領域 (pH 3-5) においては、RA と DEW の起泡性はカゼインおよび SPI よりも高かった。中性領域 (pH 6-8) では、RA の起泡性は SPI および DEW とほぼ同程度であったが、カゼインよりも低かった。また、すべてのタンパク質の泡立ち量は 10 分後には減少した。RA の起泡安定性は pH 4-5 でわずかに高かったが、pH 6 以上では低かった。

5-3-5 表面疎水性度の評価

RA と DEW の表面疎水性度は、いずれの pH においても比較的安定的で高かったのに対し、SPI と DEW の表面疎水性度は pH 4-5 において低かった (Figure 5-8)。

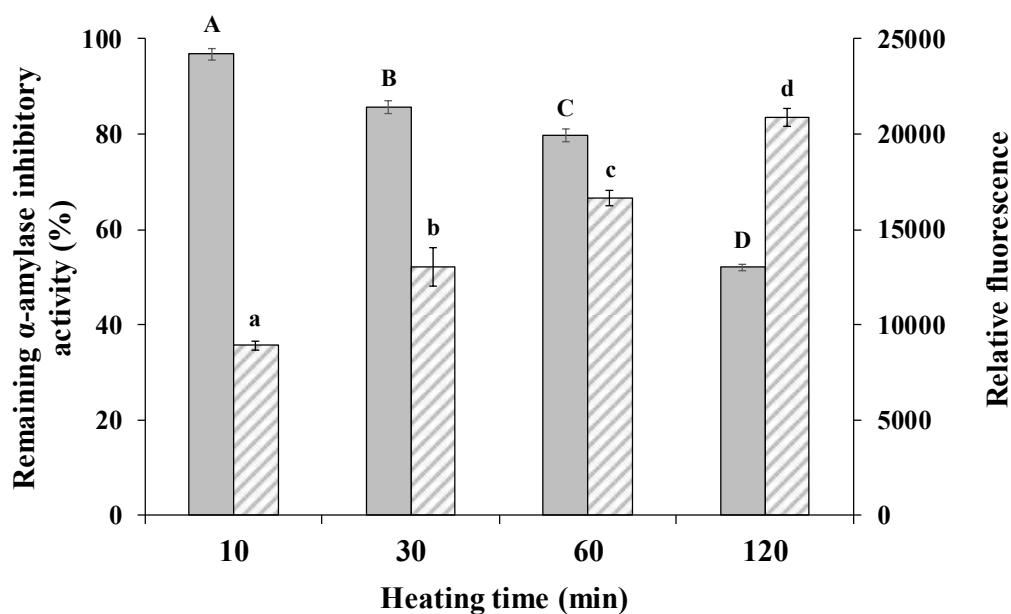


Figure 5-1. Remaining α -amylase inhibitory activity and surface hydrophobicity of RA with different heating times. Solid bar, α -amylase inhibitory activity; hatched bar, surface hydrophobicity. Heating temperature was 100°C. Values with different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Tukey-Kramer's test. Each value is the mean of 3 experiments with SD shown as a vertical bar.

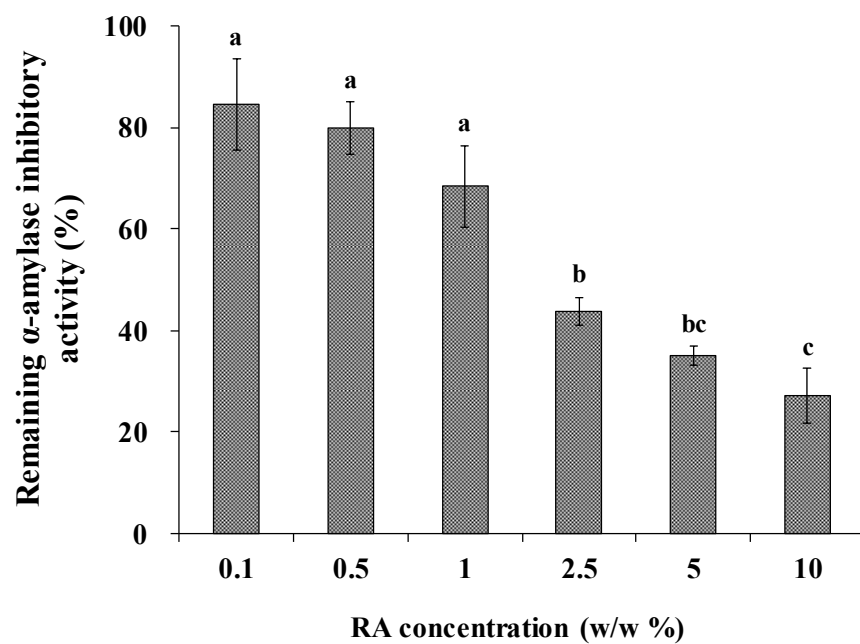


Figure 5-2. Remaining α -amylase inhibitory activity of RA at different concentrations after heating at 100°C for 60 min. Values with different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Tukey-Kramer's test. Each value is the mean of 3 experiments with SD shown as a vertical bar.

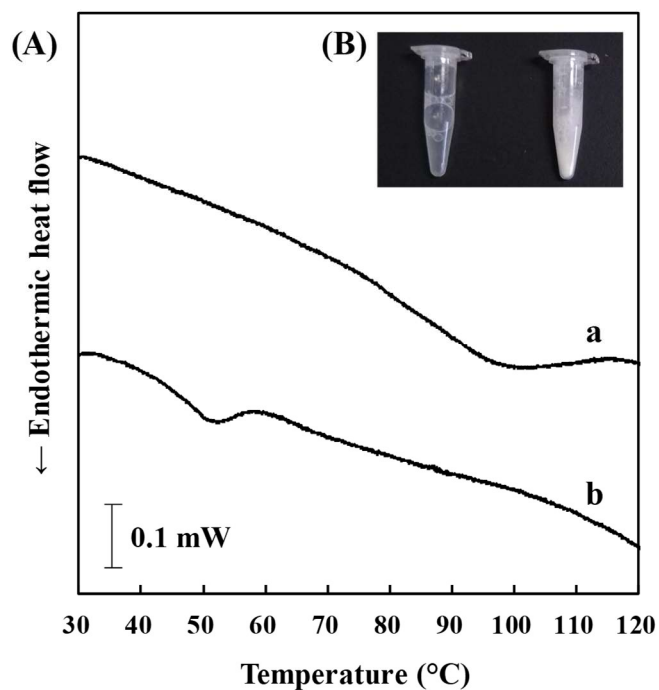


Figure 5-3. Changes in thermal sensitivity of rice RA after the addition of a reducing agent (DTT). A, DSC thermograms of RA untreated (a) or treated (b) with DTT for 16 hr at room temperature; B, Changes in the turbidity of RA after the addition of a reducing agent, left: untreated, right: treated with DTT.

Table 5-1. Changes in the denaturation temperature and enthalpy of RA by the addition of reducing agent (DTT)

	T_i (°C)	T_d (°C)	T_f (°C)	ΔH (J/g)
Non-treated RA	73.3	100.8	114.8	3.15
DTT-treated RA	37.3	52.0	59.3	0.78

T_i , denaturation-initiated temperature; T_d , denaturation peak temperature; T_f , denaturation-terminated temperature; ΔH , denaturation enthalpy. Each value is calculated from the DSC thermograms.

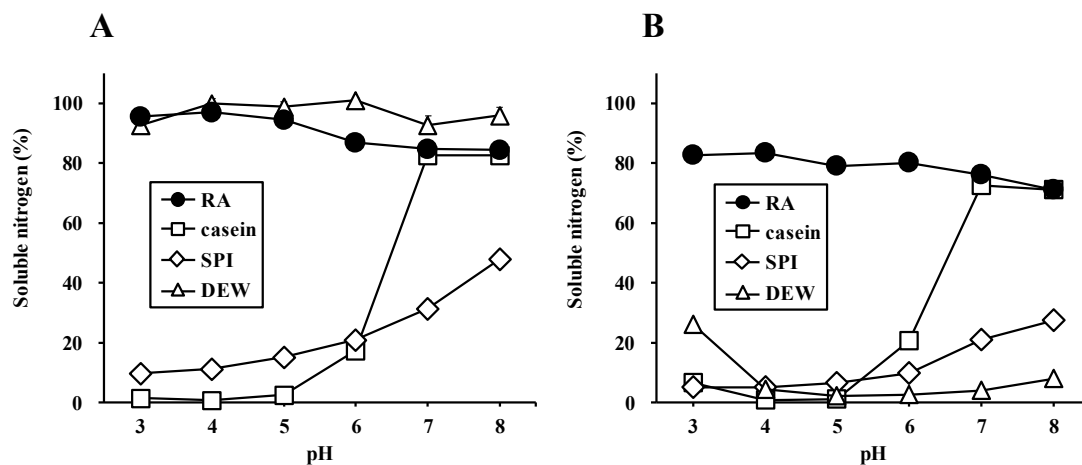


Figure 5-4. Nitrogen solubility profiles of RA, casein, SPI, and DEW at different pH values. A, non-heat-treated; B, heat-treated (80°C, 20 min). Each value is the mean of 3 experiments with SD shown as a vertical bar.

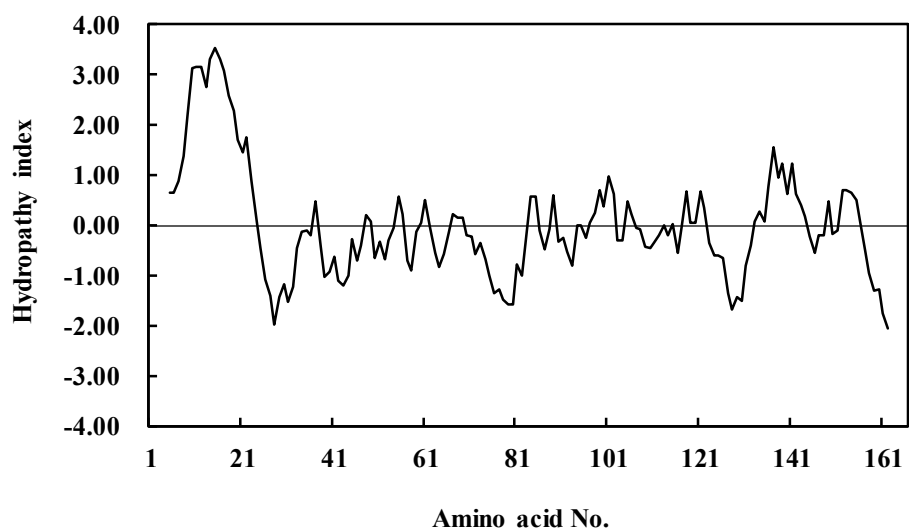


Figure 5-5. Hydropathy index of RA (Os07g0214300) calculated by ExPASy Proteomics Server.

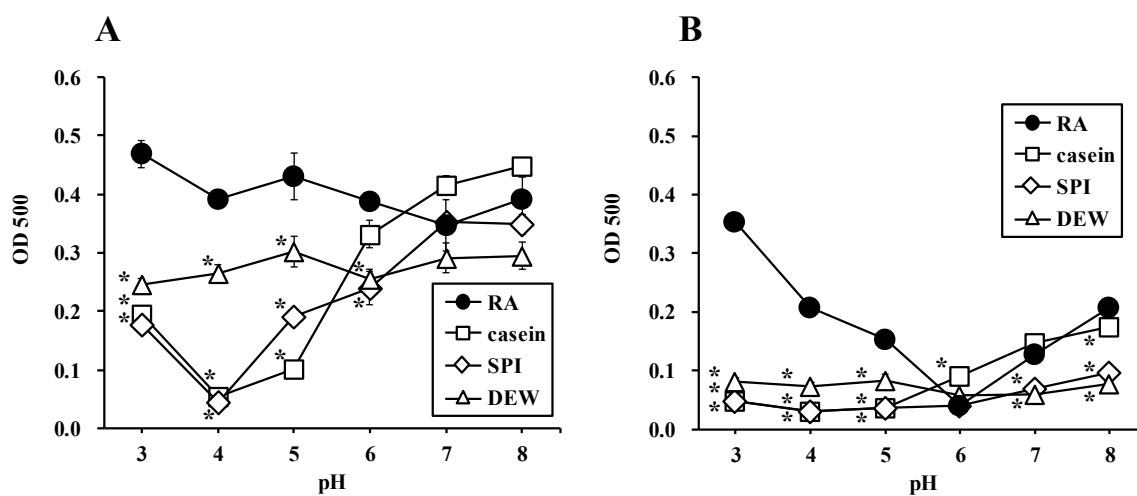


Figure 5-6. Emulsion activity and stability of RA, casein, SPI, and DEW at different pH values. A, emulsion activity; B, emulsion stability after 10 min. Values with * are significantly different from the corresponding RA value at $p < 0.05$ by Dunnett's test. Each value is the mean of 4 experiments with SD shown as a vertical bar.

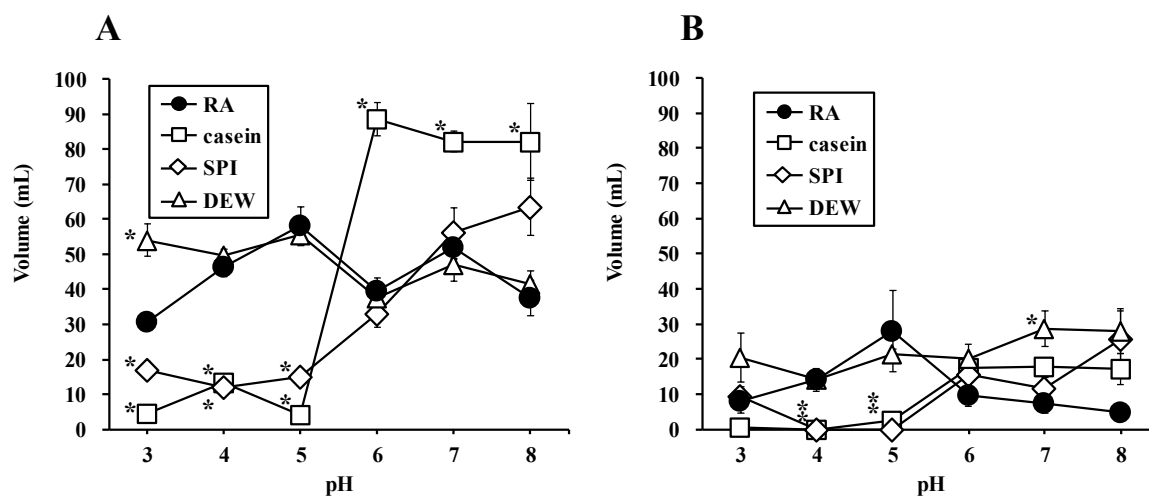


Figure 5-7. Foaming capacity and stability of RA, casein, SPI, and DEW at different pH values. A, foaming capacity; B, foaming stability after 10 min. Values with * are significantly different from the corresponding RA value at $p < 0.05$ by Dunnett's test. Each value is the mean of 4 experiments with SD shown as a vertical bar.

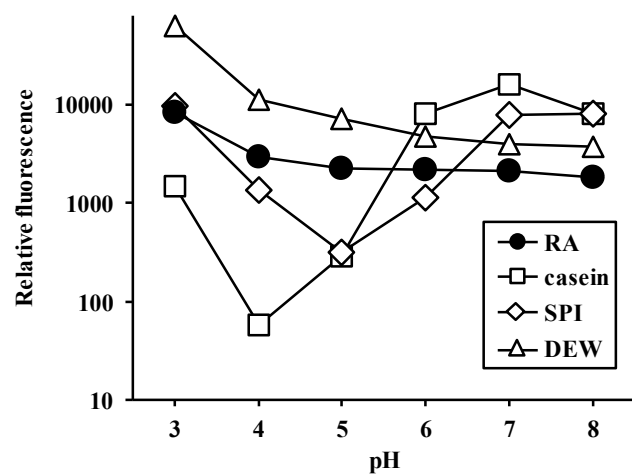


Figure 5-8. Surface hydrophobicity profiles of RA, casein, SPI, and DEW at different pH values.

5-4 考察

タンパク質を食品素材として工業的に製造・加工するためには、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。一方でタンパク質は、食品産業において欠かせない工程である加熱殺菌や、加工工程における pH 変化により変性しやすく、その機能を失うことも多い。

RA は、消化酵素によって 14 kDa の HMP と 2 kDa 以下の HMP に加水分解される 16 kDa のタンパク質である。HMP は、ペプシンで 6 時間、パンクレアチン 6 時間処理しても分解されない難消化性ペプチドであるが、この高い消化耐性は、LC/MS/MS による構造解析によって示唆された 5 つの分子内ジスルフィド結合による強固に折りたたまれた構造に起因している可能性がある。そこで、この分子内ジスルフィド結合がタンパク質の構造を安定させ、加熱処理や pH 変化に対して影響を及ぼすのか検討した。

タンパク質の熱安定性に対するジスルフィド結合の寄与は、DSC を用いて還元剤の有無による RA の変性温度の変化から評価した。その結果、DTT 未処理 RA の変性ピーク温度 (T_p) は 100.8°C と DTT 処理によりジスルフィド結合を切断した RA の 52.0°C よりも大幅に高かった (Figure 5-3 A)。また、DTT 添加により RA の変性エンタルピー (ΔH) は、3.15 J/g から 0.78 J/g へと減少し、溶液の白濁が観察された (Figure 5-3 B)。この ΔH の減少は、DSC 分析の前に、RA が DTT 処理により変性凝集したことにより内部エネルギーが減少したためだと考えられる。以上の結果から、RA の変性温度はタンパク質としては非常に高温であり、その構造安定性には分子内ジスルフィド結合が寄与していることが明らかとなった。

変性に対する加熱時間及び RA 濃度の影響を，ミールワーム由来 α -アミラーゼに対する阻害活性及び表面疎水性度を測定することによって評価した。RA の濃度が 0.1% の場合，100°C で 60 分間加熱した後では α -アミラーゼ阻害活性は約 80% 残存しており，100°C で 120 分間加熱した後においても約 50% 残存していた (Figure 5-1)。RA の表面疎水性度は，100°C での加熱時間に依存して増加し，加熱後に RA の立体構造が不可逆的に変性したことを示している。DSC 分析により観測された RA の T_p が 100.8°C とほぼ同じであるため，これらの結果は，DSC の結果と一致した。また，RA の α -アミラーゼ阻害活性は，RA 濃度が増加するにつれて減少した (Figure 5-2)。これは，RA の濃度の増加が加熱により誘発されるタンパク質間の相互作用を増加させ，RA の凝集を促進したためと思われる。

よく知られている耐熱タンパク質としては，カゼイン，オボムコイドおよび T4 リゾチームが挙げられる。カゼインは，プロリンを豊富に含み，分子内ジスルフィド結合は非常に少ない。この構造的特徴は，三次構造を制限し熱安定性に寄与する。一方，オボムコイドおよび T4 リゾチームは，その構造を安定化する上で重要な役割を果たす複数のジスルフィド結合を有する (Matsuda *et al.*, 1982; Wetzel *et al.*, 1988)。さらに，RA と高い相同性を有する小麦アルブミンにおいても，分子内ジスルフィド結合が耐熱性に寄与している (Silano and Zahnley, 1978; Oneda *et al.*, 2004)。これらの知見は，RA の熱安定性にジスルフィド結合が寄与したという結果を支持している。

続いて，RA の構造を安定化するジスルフィド結合は酸性条件下で切断されにくいことや，一般的な食品の pH は酸性から中性付近であることから，RA の物理化学的性質における酸安定性について検討した。

可溶性窒素量は、種々の pH の溶媒に溶解した後の上清に残存する窒素量と全窒素量の割合によって測定した (Figure 5-4)。本研究において観察された、カゼイン、SPI および DEW の可溶性窒素量の傾向は、既報とよく一致していた (Ahmedna *et al.*, 1999)。カゼインの可溶性窒素量は等電点付近の pH 3-5 ではほぼ 0%であったが、pH 7-8 では高い可溶性窒素量を示した。SPI は難溶性タンパク質であることから窒素溶解度は、いずれの pH においてもそれほど高くはなかった。DEW の可溶性窒素量は、加熱前の状態では pH 3-8 のいずれにおいても高かったが、80°C、20 分間加熱した後ではほとんど溶解しなかった。一方、RA の可溶性窒素量は、加熱前のカゼインおよび SPI のよりも高く、測定したすべての pH において 80%以上であった。また、加熱処理後も大きく減少することなく 80%程度を維持した。RA に含まれるタンパク質である Os07g0214300 の hydropathy index を算出した結果、Os07g0214300 は分子内に小さな疎水性コアを持ち、表面には多くの親水基が露出した親水性の高い構造をもつと推定された (Figure 5-5)。RA 中の大部分を占める 14-16 kDa のタンパク質群は、そのほとんどが α -amylase inhibitors and seed storage protein subfamily に属し、互いにアミノ酸配列に高い相同性を持っている (Adachi *et al.*, 1993; Alvarez *et al.*, 1995)。このことから、RA 中の他の 14-16 kDa のタンパク質においても同様の性質を有していることが予想される。また、RA はジスルフィド結合により強固に折りたたまれた構造を有していることや、100°C での加熱後も α -アミラーゼ阻害活性を維持した結果などから (Figure 5-1)、加熱後や pH が変化しても、その親水性の高い三次構造は維持され、高い窒素溶解度を示したものであると思われる。このような RA の性質は、溶解度の高いタンパク質食品素材として、液体食品および飲料への利用可能性を広げる

ものである。さらに，RA は，食品産業における煮沸程度の加熱処理や酸性から中性における pH 変化によっても不溶化しないことから，沈殿や不溶化による外観上の品質低下を抑えることが可能である。このような RA の特徴は，沈殿物の分離工程を回避することにも繋がり，廃棄物の削減にも貢献するものである。

乳化性および起泡性は，食品添加物としての水溶性タンパク質の利用性を評価するために重要である。RA の乳化性および起泡性は，これらの物理化学的性質が水への溶解性の影響を強く受けることから（Kinsella and Melachouris, 1976; Ahmedna *et al.*, 1999），種々の pH において可溶で加熱後もその溶解性を失わない RA は，一般的なタンパク質よりも優れていると予想される。本研究で観察されたカゼイン，SPI および DEW の乳化性は，既報と一致していた（Chobert *et al.*, 1988; Tomotake *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2012）。酸性 pH における RA の乳化性および安定性は，他のタンパク質と比較して有意に高かった（Figure 5-6）。酸性 pH におけるカゼインおよび SPI の低い乳化性と安定性は，その pH における溶解度が低いためと考えられる。DEW の乳化性は RA の約 3 分の 2 程度であり，カゼインや SPI ほど低くなかった。RA の乳化安定性は，酸性 pH において他のタンパク質よりも高かったが，pH 6 においては低かった。これは RA の等電点が pH 6-7 であることから（Matsuda *et al.*, 1991），付近の pH における低い正味電荷がエマルジョンを不安定にしたためだと考えられる。起泡性は，すべてのタンパク質において可溶性窒素量と同様の傾向を示した。RA の起泡性は，すべての pH において DEW とほぼ同程度であり，pH 4-5 においては，カゼインおよび SPI よりも高かった（Figure 5-7）。タンパク質の溶解性には，空気と水の界面におけるタンパク質の吸着に影響する高い正味電荷が必要なため（Cherry and

McWatters, 1981), タンパク質の溶解度が高いと起泡性が向上すると考えられている (Townsend and Nakai, 1983)。本研究におけるタンパク質の起泡安定性は、非常に低いように思われたが、他の研究においても同様の結果が得られていた。Ahmedna らは、SPI, DEW およびカゼインナトリウム溶液を泡立たせ、30 分後に残っている液体量を測定することにより安定性を評価した。その結果、これらのタンパク質に関して、泡の約 10%が残ると報告している (Ahmedna *et al.*, 1999)。さらに、Wang らは、pH 7.4 における米糠タンパク質の泡の安定性を評価し、泡立ててから 30 分後に残る泡の体積が初期体積の約30%に減少することを報告している (Wang *et al.*, 1999)。一方で、卵白のメレンゲのように、変性を受けやすいタンパク質は、表層に疎水性アミノ酸残基が露呈しやすく、泡の表面に容易に整列し泡沫を安定化させる。RA は、測定したすべての pH において、安定した表面疎水性度を示したことから、RA の起泡安定性が低いのは、変性に対する耐性が高いことに起因するためだと推察された (Figure 5-8)。

以上、本研究の結果は、RA が一般的な食品タンパク質と比較して優れた熱安定性をもち、食品の一般的な pH (特に酸性 pH) においても安定した溶解性、乳化性および起泡性を示すことをはじめて明らかにした。よって RA は、飲料やその他の様々な形態の食品に添加可能な、加工性に優れた機能性食品素材であることが明らかとなった (Ina *et al.*, 2019b)。

第 6 章 総括

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、マルタ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、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（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 japonica*）の種子である米のアルブミン（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されている。このことから、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となりえる。

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、変性により機能性が消失したり、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 の食後血糖値および血漿インスリン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。

まず、第 2 章では、米から水溶性タンパク質として RA を抽出し、その分子量や α -アミラーゼ阻害活性を調べた。この RA を SDS-PAGE にて分離したところ、14-16 kDa の分子質量を有していた。RA が、 α -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 α -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 α -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 α -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 α -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 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、第 2 章の結果から、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、食後の血糖値および血漿インスリン値の上昇を抑制し、糖尿病の予防に有効な機能食品素材となりうることをはじめて見出した。また、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を明らかにした。

続いて第3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が消化吸収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2章において、RAは、グルコースを経口投与後の血糖値・インスリン上昇値上昇を抑制した。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 のタンパク質の分解により生成した 14 kDa 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 *α-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。これらの結果から、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。

一方で、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。そこで第 4 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 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。

そこで続いて、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 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・インスリン値上昇が有意に抑制された。第 3 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。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、 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示唆された。また，LMP という従来の血糖値・インスリン値上昇抑制メカニズムとは異なる作用機序で効果を発揮する新しい機能性成分をはじめて発見した。

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。従って第 5 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℃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℃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 pH 3-8 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 pH 3-8 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℃，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，pH3-5 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，pH4-5 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。

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，生体内の消化酵素で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 およびその分解ペプチドは，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。

引用文献

Adachi, T., Izumi, H., Yamada, T., Tanaka, K., Takeuchi, S., Nakamura, R., and Matsuda, T., Gene structure and expression of rice seed allergenic proteins belonging to the α -amylase/trypsin inhibitor family. *Plant Molecular Biology*, **21**, 239-248 (1993)

Ahmedna, M., Prinyawiwatukul, W., and Rao, R. M., Solubilized wheat protein isolate: functional properties and potential food applications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**, 1340-1345 (1999)

Akeson, W. R. and Stahmann, M. A., A pepsin pancreatin digest index of protein quality evaluation. *The Journal of Nutrition*, **83**, 257-261 (1964)

Alvarez, A. M., Adachi, T., Nakase, M., Aoki, N., Nakamura, R., and Matsuda, T., Classification of rice allergenic protein cDNAs belonging to the α -amylase/trypsin inhibitor gene family. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1251**, 201-204 (1995)

Anderson, J. W., O'Neal, D. S., Riddell-Mason, S., Floore, T. L., Dillon, D. W., and Oeltgen, P. R., Postprandial serum glucose, insulin, and lipoprotein responses to high- and low-fiber diets. *Metabolism*, **44**, 848-854 (1995)

Araya, H., Pak, N., Vera, G., and Alviña, N., Digestion rate of legume carbohydrates and glycemic index of legume-based meals. *International*

Journal of Food Sciences and Nutrition, **54**, 119-126 (2003)

Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J., and Schwede, T., The SWISS-MODEL Workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*, **22**, 195-201 (2006)

Bach, J. F., Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease. *Endocrine Reviews*, **15**, 516-542 (1994)

Bera, M. B., and Mukherjee, R. K., Solubility, emulsifying, and foaming properties of rice bran protein concentrates. *Journal of Food Science*, **54**, 142-145 (1989)

Berre-Antona, V. L., Bompard-Gillesb, C., Payanb, F., and Rougé P., Characterization and functional properties of the α -amylase inhibitor (α -AI) from kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1343**, 31-40 (1997)

Björck, I., Granfeldt, Y., Liljeberg, H., Tovar, J., and Asp, N. G., Food properties affecting the digestion and absorption of carbohydrates. *American Journal of Clinical Nutrition*, **59**, 699-705 (1994)

Bowman, D. E., Amylase inhibitor of navy beans. *Science*, **102**, 358-359 (1945)

Brand, J. C., Nicholson, P. L., Thorburn A. W., and Truswell A. S., Food

processing and the glycemic index. *American Journal of Clinical Nutrition*, **42**, 1192-1196 (1985)

Brenelli, S. L., Campos, S. D. S., and Saad, M. J. A., Viscosity of gums *in vitro* and their ability to reduce postprandial hyperglycemia in normal subjects. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **30**, 1437-1440 (1997)

Buonocorea, V., Poerio, E., Gramenzi, F., and Silano, V., Affinity column purification of amylases on protein inhibitors from wheat kernel. *Journal of Clinical Chromatography A*, **114**, 109-114 (1975)

Buonocorea, V., Petruccib, T., and Silano, V., Wheat protein inhibitors of α -amylase. *Phytochemistry*, **16**, 811-820 (1977)

Campbell, L., Raikos, V., and Euston, S. R., Modification of functional properties of egg-white proteins. *Food /Nahrung*, **47**, 369-376 (2003)

Castano, L. and Eisenbarth, G. S., Type-I diabetes: a chronic autoimmune disease of human, mouse, and rat. *Annual Review of Immunology*, **8**, 647-679 (1990)

Chen, C., Chi, and Y-J., Xu, W., Comparisons on the functional properties and antioxidant activity of spray-dried and freeze-dried egg white protein hydrolysate. *Food and Bioprocess Technology*, **5**, 2342-2352 (2012)

Cherry, J. P., and McWatters, K. H., Whippability and aeration. In “Protein Functionality in Foods. (ACS Symposium Series, Vol. 147)” ed. by Cherry, J. P., ACS Publications, Washington DC, pp. 149-176 (1981)

Chobert, J. M., Bertrand-Harb, C., and Nicolas, M. G., Solubility and emulsifying properties of caseins and whey proteins modified enzymically by trypsin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **36**, 883-892 (1988)

Dahlqvist, A., Method of assay of intestinal disaccharidases. *Analytical Biochemistry*, **7**, 18-25 (1964)

Dyer, J., Vayro, S., King, T. P., and Shirazi-Beechey, S. P., Glucose sensing in the intestinal epithelium. *European Journal of Biochemistry*, **270**, 3377-3388 (2003)

Eisenbarth, G. S., Type I diabetes mellitus. A chronic autoimmune disease. *The New England Journal of Medicine*, **314**, 1360-1368 (1986)

Feng, G. H., Chen, M., Kramer, K. J., and Reeck, G. R., Amylase inhibitors from rice: fractionation and selectivity toward insect, mammalian, and bacterial α -amylases. *Cereal Chemistry*, **68**, 516-526 (1991a)

Feng, G. H., Chen, M., Kramer, K. J., and Reeck, G. R., Reversed phase high-performance liquid chromatographic separation of wheat

proteinaceous inhibitors of insect and mammalian α -amylase. *Cereal Chemistry*, **68**, 95-99 (1991b)

Foo, A. Y. and Bais, R., Amylase measurement with 2-chloro-4-nitrophenyl maltotrioside as substrate. *Clinica Chimica Acta*, **272**, 137-147 (1998)

Franco, O. L., Rigden, D. J., Melo, F. R., and Grossi-de-Sá, M. F., Plant α -amylase inhibitors and their interaction with insect α -amylases. *European Journal of Biochemistry*, **269**, 397-412 (2002)

Goñi, I., García-Diz, L., Mañas, E., and Saura-Calixto, F., Analysis of resistant starch: a method for foods and food products. *Food Chemistry*, **56**, 445-449 (1996)

Gorboulev, V., Schürmann, A., Vallon, V., Kipp, H., Jaschke, A., Klessen, D., Friedrich, A., Scherneck, S., Rieg, T., Cunard, R., Veyhl-Wichmann, M., Srinivasan, A., Balen, D., Breljak, D., Rexhepaj, R., Parker, H. E., Gribble, F. M., Reimann, F., Lang, F., Wiese, S., Sabolic, I., Sendtner, M., and Koepsell, H., Na(+)-D-glucose cotransporter SGLT1 is pivotal for intestinal glucose absorption and glucose-dependent incretin secretion. *Diabetes*, **61**, 187-196 (2012)

Granum, P. E., Purification and characterization of an α -amylase inhibitor from rye (*Secale cereale*) flour. *Journal of Food Biochemistry*, **2**, 103-120 (1978)

Guex, N. and Peitsch, M. C., SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modelling. *Electrophoresis*, **18**, 2714-2723 (1997)

Hira, T., Mochida, T., Miyashita, K., and Hara, H., GLP-1 secretion is enhanced directly in the ileum but indirectly in the duodenum by a newly identified potent stimulator, zein hydrolysate, in rats. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, **297**, 663-671 (2009)

Hu, F. B., van Dam, R. N., and Liu, S., Diet and risk of type II diabetes: the role of types of fat and carbohydrate. *Diabetologia*, **44**, 805-817 (2001a)

Hu, F. B., Manson, J. E., Stampfer, M. J., Colditz, G., Liu, S., Solomon, C. G., and Willett, W. C., Diet, lifestyle, and the risk of type 2 diabetes mellitus in women. *The New England Journal of Medicine*, **345**, 790-797 (2001b)

Hu, F. B., Sigal, R. J., Rich-Edwards, W. J., Colditz, G. A., Solomon, C. G., Willett, W. C., Speizer, F. E., and Manson, J. E., Walking compared with vigorous physical activity and risk of type 2 diabetes in women. *The Journal of the American Medical Association*, **282**, 1433-1439 (1999)

Hu, P., Zhao, H., Duan, Z., Linlin, Z., and Wu, D., Starch digestibility

and the estimated glycemic score of different types of rice differing in amylose contents. *Journal of Cereal Science*, **40**, 231-237 (2004)

Ina, S., Ninomiya, K., Mogi, T., Hase, A., Ando, T., Matsukaze, N., Ogihara, J., Akao, M., Kumagai, H., and Kumagai, H., Rice (*Oryza sativa japonica*) albumin suppresses the elevation of blood glucose and plasma insulin levels after oral glucose loading. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **64**, 4882-4890 (2016)

Ina, S., Hamada, A., Kumagai, H. and Yamaguchi, Y., Bioactive ingredients in rice (*Oryza sativa* L.) function in the prevention of type 2 diabetes. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, **65**, S113-S116 (2019a)

Ina, S., Hamada, A., Kaneko, T., Nakajima, N., Yamaguchi, Y., Akao, M., Kumagai, H., and Kumagai, H., Physicochemical and surface properties of rice albumin for its application as a functional food material. *Food Science and Technology Research*, **25**, 555-562 (2019b)

Ina, S., Hamada, A., Nakamura, H., Yamaguchi, Y., Kumagai, H. and Kumagai, H., Rice (*Oryza sativa japonica*) albumin hydrolysates suppress postprandial blood glucose elevation by adsorbing glucose and inhibiting Na⁺-D-glucose cotransporter SGLT1 expression. *Journal of Functional Foods*, **64**, 103603, 1-8 (2020)

Ishikawa, Y., Hira, T., Inoue, D., Harada, Y., Hashimoto, H., Fujii, M.,

Kadowaki, M., and Hara, H., Rice protein hydrolysates stimulate GLP-1 secretion, reduce GLP-1 degradation, and lower the glycemic response in rats. *Food & Function*, **6**, 2525-2534 (2015)

Iwami, K., Sakakibara, K., and Ibuki, F., Involvement of post-digestion 'hydrophobia' peptides in plasma cholesterol-lowering effect of dietary plant proteins. *Agricultural and Biological Chemistry*, **50**, 1217-1222 (1986)

James, J. M., Sixbey, J. P., Helm, R. M., Bannon, G. A., and Burks, A. W., Wheat α -amylase inhibitor: a second route of allergic sensitization. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **99**, 239-244 (1997)

Järvi, A. E., Karlström, B. E., Granfeldt, Y. E., Björck, I. E., Asp, N. G., and Vessby, B. O., Improved glycemic control and lipid profile and normalized fibrinolytic activity on a low-glycemic index diet in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*, **22**, 10-18 (1999)

Jenkins, D. J., Wolever, T. M., Haisman, P., Dilawari, J., Goff, D. V., Metz, G. L., and Alberti, K. G., Dietary fibres, fibre analogues, and glucose tolerance: importance of viscosity. *British Medical Journal*, **1**, 1392-1394 (1978)

Jenkins, D. J., Wolever, T. M., Taylor, R. H., Barker, H., Fielden, H., Baldwin, J. M., Bowling, A. C., Newman, H. C., Jenkins, A. L., and Goff, D. V., Glycemic index of foods: a physiological basis for carbohydrate

exchange. *American Journal of Clinical Nutrition*, **34**, 362-366 (1981)

Jenkins, D. J., Kendall, C. W. C., Augustin, L. S. A., Franceschi, S., Hamidi, M., Marchie, A., Jenkins, A. L., and Axelsen, M., Glycemic index: overview of implications in health and disease. *American Journal of Clinical Nutrition*, **76**, 266-273 (2002)

Jenkins, A. L., Jenkins, D. J., Zdravkovic, U., Würsch, P., and Vuksan, V., Depression of the glycemic index by high levels of beta-glucan fiber in two functional foods tested in type 2 diabetes. *European Journal of Clinical Nutrition*, **56**, 622-628 (2002)

Ju, Z. Y., Hettiarachchy, N. S., and Rath, N., Extraction, denaturation and hydrophobic properties of rice flour proteins. *Journal of Food Science*, **66**, 229-232 (2001)

Kayashita, J., Shimaoka, I., Nakajoh, M., Yamazaki, M., and Kato, N., Consumption of buckwheat protein lowers plasma cholesterol and raises fecal neutral sterols in cholesterol-fed rats because of its low digestibility. *The Journal of Nutrition*, **127**, 1395-1400 (1997)

Kennedy, G., and Burlingame, B., Analysis of food composition data on rice from a plant genetic resources perspective. *Food Chemistry*, **80**, 589-596 (2003)

Kinsella, J. E., Milk proteins: physicochemical and functional properties.

Critical Reviews in Food Science and Nutrition, **21**, 197-262 (1984)

Kinsella, J. E., and Melachouris, N., Functional properties of proteins in foods: a survey. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **7**, 219-280 (1976)

Kodama, T., Miyazaki, T., Kitamura, I., Suzuki, Y., Namba, Y., Sakurai, J., Torikai, Y., and Inoue, S., Effects of single and long-term administration of wheat albumin on blood glucose control: randomized controlled clinical trials. *European Journal of Clinical Nutrition*, **59**, 384-392 (2005)

厚生労働省, 平成 28 年 国民健康・栄養調査結果の概要, pp. 7-9, (2017)

Kubota, M., Watanabe, R., Kabasawa, H., Iino, N., Saito, A., Kumagai, T., Fujimura, S., and Kadowaki, M., Rice protein ameliorates the progression of diabetic nephropathy in Goto-Kakizaki rats with high-sucrose feeding. *British Journal of Nutrition*, **110**, 1211-1219 (2013)

Kyte, J. and Doolittle, R. F., A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology*, **157**, 105-132 (1982)

Laemmli, U. K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685 (1970)

Lafrance, L., Rabasa-Lhoret, R., Poisson, D., Ducros, F., and Chiasson, J. L., Effects of different glycaemic index foods and dietary fibre intake on glycaemic control in Type 1 diabetic patients on intensive insulin therapy. *Diabetic Medicine*, **15**, 972–978 (1998)

Lankisch, M., Layer, P., Rizza, R. A., and DiMagno, E. P., Acute postprandial gastrointestinal and metabolic effects of wheat amylase inhibitor (WAI) in normal, obese, and diabetic humans. *Pancreas*, **17**, 176-181 (1998)

Liljeberg, H. G. M., Granfeldt, Y. E., and Björck, I. M. E., Products based on a high fiber barley genotype, but not on common barley or oats, lower postprandial glucose and insulin responses in healthy humans. *The Journal of Nutrition*, **126**, 458-466 (1996)

Ludwig, D. S., Majzoub, J. A., Al-Zahrani, A., Dallal, G. E., Blanco, I., and Roberts, S. B., High glycemic index foods, overeating, and obesity. *Pediatrics*, **103**, 2-6 (1999)

Maeda, K., Kakabayashi, S., and Matsubara, H., Complete amino acid sequence of an α -amylase inhibitor in wheat kernel (0.19-inhibitor). *Biochimica et Biophysica Acta*, **828**, 213-221 (1985)

Margolskee, R. F., Dyer, J., Kokrashvili, Z., Salmon, K. S., Ilegems, E., Daly, K., Maillet, E. L., Ninomiya, Y., Mosinger, B., and Shirazi-Beechey,

S. P., T1R3 and gustducin in gut sense sugars to regulate expression of Na⁺-glucose cotransporter 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**, 15075-15080 (2007)

Marshall, J. J. and Lauda, C. M., Purification and properties of phaseolamin, an inhibitor α -amylase, from the kidney bean, *Phaseols vulgaris*. *The Journal of Biological Chemistry*, **250**, 8030-8037 (1975)

Matsuda, T., Nomura, R., Sugiyama, M., and Nakamura, R., Immunochemical studies on rice allergenic proteins. *Agricultural and Biological Chemistry*, **55**, 509-513 (1991)

Matsuda, T., Watanabe, K., and Nakamura, R., Immunochemical studies on thermal denaturation of ovomucoid. *Biochimica et Biophysica Acta*, **707**, 121-128 (1982)

Miller, J. B., Hayne, S., Petocz, P., and Colagiuri, S., Low-glycemic index diets in the management of diabetes a meta-analysis of randomized controlled trials. *Diabetes Care*, **26**, 2261-2267 (2003)

Mokdad, A. H., Ford, E. S., Bowman, B. A., Dietz, W. H., Vinicor, F., Bales, V. S., and Marks, J. S., Prevalence of obesity, diabetes, and obesity-related health risk factors. *The Journal of the American Medical Association*, **289**, 76-79 (2003)

Mochida, T., Hira, T., and Hara, H., The corn protein, zein hydrolysate,

administered into the ileum attenuates hyperglycemia via its dual action on glucagon-like peptide-1 secretion and dipeptidyl peptidase-IV activity in rats. *Endocrinology*, **151**, 3095-3104 (2010)

Nagaoka, S., Futamura, Y., Miwa, K., Awano, T., Yamauchi, K., Kanamaru, Y., Kojima, T., and Kuwata, T., Identification of novel hypocholesterolemic peptides derived from bovine milk β -lactoglobulin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **281**, 11-17 (2001)

Nelson, G., Hoon, M. A., Chandrashekar, J., Zhang, Y., Ryba, N. J., and Zuker, C. S., Mammalian sweet taste receptors. *Cell*, **106**, 381-390. (2001)

Oda, Y., Matsunaga, T., Fukuyama, K., Miyazaki, T., and Morimoto, T., Tertiary and quaternary structures of 0.19 α -amylase inhibitor from wheat kernel determined by X-ray analysis at 2.06 Å resolution. *Biochemistry*, **36**, 13503-13511 (1997)

Oneda, H., Lee, S., and Inouye, K., Inhibitory Effect of 0.19 α -Amylase Inhibitor from wheat kernel on the activity of porcine pancreas α -Amylase and its thermal stability. *The Journal of Biochemistry*, **135**, 421-427 (2004)

Ou, S., Kwok, K., Li, W., and Fu, L., *In vitro* study of possible role of dietary fiber in lowering postprandial serum glucose. *Journal of*

Agricultural and Food Chemistry, **49**, 1026-1029 (2001)

Pearce, K. N., and Kinsella, J. E., Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **26**, 716-723 (1978)

Plus, W., and Keup, U., Influence of an α -amylase inhibitor (BAY d 7791) on blood glucose, serum insulin, and NEFA in starch loading tests in rats, dogs and man. *Diabetologia*, **9**, 97-101 (1973)

Preuss, H. G., Echard, B., Bagchi, D., and Stohs, S., Inhibition by natural dietary substances of gastrointestinal absorption of starch and sucrose in rats 2. Subchronic studies. *International Journal of Medical Sciences*, **4**, 209-215 (2007)

Reddy, I. M., Kella, N. K. D., and Kinsella, J. E. Structural and conformational basis of the resistance of β -lactoglobulin to peptic and chymotryptic digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **36**, 737-741 (1988)

Ritz, P., Krempf, M., Cloarec, D., Champ, M., and Charbonnel, B., Comparative continuous-indirect-calorimetry study of two carbohydrates with different glycemic indices. *American Journal of Clinical Nutrition*, **54**, 865-859 (1991)

Rodríguez-Morán, M., Guerrero-Romero, F., and Lazcano-Burciaga, G.,

Lipid-and glucose-lowering efficacy of *Plantago Psyllium* in type II diabetes. *Journal of Diabetes and its Complications*, **12**, 273-278 (1998)

Schulze, M. B., Liu, S., Rimm, E. B., Manson, J. E., Willett, W. C., and Hu, F. B., Glycemic index, glycemic load, and dietary fiber intake and incidence of type 2 diabetes in younger and middle-aged women. *American Journal of Clinical Nutrition*, **80**, 348-356 (2004)

Schwede, T., Kopp, J., Guex, N., and Peitsch, M. C., SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Research*, **31**, 3381-3385 (2003)

Seri, K., Sanai, K., Matsuo, N., Kawakubo, K., Xue, C., and Inoue, S., L-Arabinose selectively inhibits intestinal sucrase in an uncompetitive manner and suppresses glycemic response after sucrose ingestion in animals. *Metabolism*, **45**, 1368-1374 (1996)

Strobl, S., Maskos, K., Wiegand, G., Huber, R., Gomis-Rüth, F. X., and Glockshuber, R., A novel strategy for inhibition of α -amylases: yellow meal worm α -amylase in complex with the Ragi bifunctional inhibitor at 2.5 Å resolution. *Structure*, **6**, 911-921 (1998)

Shainkin, R. and Birk, Y., α -Amylase inhibitors from wheat. Isolation and characterization. *Biochimica et Biophysica Acta*, **221**, 502-513 (1970)

Shirazi-Beechey, S. P., Moran, A. W., Batchelor, D. J., Daly, K., and

Al-Rammahi, M., Glucose sensing and signalling; regulation of intestinal glucose transport. *Proceedings of the Nutrition Society*, **70**, 185-193 (2011)

Silano, V., Pocchiari, F., and Kasarda, D. D., Physical characterization of alpha-amylase inhibitors from wheat. *Biochimica et Biophysica Acta*, **317**, 139-148 (1973)

Silano, V., and Zahnley, J. C., Association of *Tenebrio molitor* L. α -amylase with two protein inhibitors-one monomeric, one dimeric-from wheat flour: differential scanning calorimetric comparison of heat stabilities. *Biochimica et Biophysica Acta*, **533**, 181-185 (1978)

Sugano, M., Yamada, Y., Yoshida, K., Hashimoto, Y., Matsuo, T., and Kimoto, M., The hypocholesterolemic action of the undigested fraction of soybean protein in rats. *Atherosclerosis*, **72**, 115-122 (1988)

Tomotake, H., Shimaoka, I., Kayashita, J., Nakajoh, M., and Kato, N., Physicochemical and functional properties of buckwheat protein product. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 2125-2129 (2002)

Tong, L.T., Fujimoto, Y., Shimizu, N., Tsukino, M., Akasaka, T., Kato, Y., Iwamoto, W., Shiratake, S., Imaizumi, K., and Sato, M., Rice α -globulin decreases serum cholesterol concentrations in rats fed a hypercholesterolemic diet and ameliorates atherosclerotic lesions in apolipoprotein E-deficient mice. *Food Chemistry*, **132**, 194-200 (2012)

Tormo, M. A., Exojo, I. G., Tejada A. R., and Campillo, J. E., Hypoglycaemic and anorexigenic activities of an α -amylase inhibitor from white kidney beans (*Phaseolus vulgaris*) in Wistar rats. *British Journal of Nutrition*, **92**, 785-790 (2004)

Townsend, A. A., and Nakai, S., Relationships between hydrophobicity and foaming characteristics of food proteins. *Journal of Food Science*, **48**, 588-594 (1983)

Vayro, S., Wood, I. S., Dyer, J., and Shirazi-Beechey, S. P., Transcriptional regulation of the ovine intestinal Na⁺/glucose cotransporter SGLT1 gene. Role of HNF-1 in glucose activation of promoter function. *European Journal of Biochemistry*, **268**, 5460-5470 (2001)

Wang, M., Hettiarachchy, N.S., Qi, M., Burks, W., and Siebenmorgen, T., Preparation and functional properties of rice bran protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**, 411-416 (1999)

Weselake, R. J., MacGregor, A. W., Hill, R. D., and Duckworth, H. W., Purification and characteristics of an endogenous α -amylase inhibitor from barley kernels. *Plant Physiology*, **73**, 1008-1012 (1983)

Wetzel, R., Perry, L. J., Baase, W. A., and Becktel, W. J., Disulfide bonds and thermal stability in T4 lysozyme. *Proceedings of the National*

Academy of Sciences of the United States of America, **85**, 401-405 (1988)

Willett, W., Manson, J., and Liu, S., Glycemic index, glycemic load, and risk of type 2 diabetes. *American Journal of Clinical Nutrition*, **76**, 274-280 (2002)

Willi, C., Bodenmann, P., Ghali, W. A., Faris, P. D., and Cornuz, J., Active smoking and the risk of type 2 diabetes. *The Journal of the American Medical Association*, **298**, 2654-2664 (2007)

Wolever, T. M. and Jenkins, D. J., The use of the glycemic index in predicting the blood glucose response to mixed meals. *American Journal of Clinical Nutrition*, **43**, 167-172 (1986)

Wolever T. M. S. and Mehling, C., High-carbohydrate–low-glycaemic index dietary advice improves glucose disposition index in subjects with impaired glucose tolerance. *British Journal of Nutrition*, **87**, 477-487 (2002)

Wolever, T. M., Jenkins, D. J., Jenkins, A. L., and Josse, R. G., The glycemic index: methodology and clinical implications. *American Journal of Clinical Nutrition*, **54**, 846-854 (1991)

Wolever, T. M. S., Katzman R. L., Jenkins, A. L., Vuksan, V., Josse, R. G., and Jenkins, D. J. A., Glycaemic index of 102 complex carbohydrate foods on patients with diabetes. *Nutrition Research*, **14**, 651-669 (1994)

World Health Organization, Global Report on Diabetes. pp. 13, 25 (2016)

Yang, L., Kumagai, T., Kawamura, H., Watanabe, T., Kumota, M., Fujimura, S., Watanabe, R., and Kadowaki, M., Effects of rice proteins from two cultivars, koshihikari and shunyo, on cholesterol and triglyceride metabolism in growing and adult rats. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **71**, 694-703 (2007)

Yasumatsu, K., Ohkuri, T., Sanematsu, K., Shigemura, N., Katsukawa, H., Sako, N., and Ninomiya, Y., Genetically-increased taste cell population with G-gustducin-coupled sweet receptors is associated with increase of gurmarin-sensitive taste nerve fibers in mice. *BMC Neuroscience*, **10**, 152-160 (2009)

Yasumatsu, K., Sawada, K., Moritaka, S., Misaki, M., Toda, J., Wada, T., and Ishii, K., Whipping and emulsifying properties of soybean products. *Agricultural and Biological Chemistry*, **36**, 719-727 (1972)

Yokoyama, W. H., Hudson, C. A., Knuckles, B. E., Chiu, M. C. M., Sayre, R. N., Turnlund, J. R., and Schneeman, B. O., Effect of barley β -glucan in durum wheat pasta on human glycemic response. *Cereal Chemistry*, **74**, 293-296 (1997)