

## 論文審査の結果の要旨

氏名： 二宮 和美

博士の専攻分野の名称：博士（生物資源科学）

論文の題目：穀物アルブミンの食後血糖値上昇抑制効果と物理化学的特性の評価に関する研究

審査委員：(主査) 教授 熊谷 日登美

(副査) 教授 細野 朗

教授 長田 和実

我が国の糖尿病患者数は約 1,000 万人にのぼり、糖尿病は、深刻な生活習慣病として位置づけられている。糖尿病は自覚症状がないことが多く、治療せずに放置すると糖尿病性網膜症、腎症、神経障害、血管症などの糖尿病性合併症を引き起こし、末期には失明したり、人工透析が必要になることがある。これらの合併症の進行に、高血糖そのものが大きく関わっていることが明らかになるにつれ、食後を含めたより厳格な血糖管理の重要性が認識されるようになった。血糖値の上昇を抑制する方法として、グルコース吸着能を有する成分や多糖類の加水分解を阻害する成分の摂取が効果的といわれている。 $\alpha$ -アミラーゼインヒビター ( $\alpha$ -Amylase Inhibitor:  $\alpha$ -AI) は、デンプン分解酵素である  $\alpha$ -アミラーゼの活性を阻害するため、デンプンから還元糖への分解を抑制する。このことから、 $\alpha$ -AI は食後血糖値上昇抑制効果を有すると考えられ、糖尿病予防・治療の観点から注目されている。

穀物は、昆虫等に対する生体防御の役割で、しばしば種子に高濃度の  $\alpha$ -AI を含んでいる。特に、小麦のアルブミン（水溶性タンパク質）画分に含まれている  $\alpha$ -AI は哺乳類の  $\alpha$ -アミラーゼを強力に阻害し、デンプンから還元糖への加水分解を遅らせると報告されている。そのため、小麦  $\alpha$ -AI は、既に特定保健用食品の血糖値上昇を抑制する機能性成分として用いられている。一方、米のアルブミン画分に含まれている  $\alpha$ -AI は昆虫の  $\alpha$ -アミラーゼは阻害するが、哺乳類の  $\alpha$ -アミラーゼは阻害しない。しかし、共同研究者の稲は、米  $\alpha$ -AI がグルコース負荷後に血糖値の上昇を抑制することを明らかにした。その血糖値上昇抑制メカニズムは、小腸におけるグルコーストランスポーターの発現抑制および難消化性画分によるグルコースの吸着と排出促進であると推察しているが、米  $\alpha$ -AI のグルコース吸着能の定量的評価は行っていない。

蕎麦 (*Fagopyrum esculentum* Moench) は、世界中でシリアル、パン、クッキーおよび麺などの様々な製品に使用されており、日本においても馴染み深い穀物である。蕎麦にもアルブミン画分に  $\alpha$ -

AI が含まれていると報告されているが、蕎麦  $\alpha$ -AI の血糖値上昇抑制効果およびそのメカニズムについてははまだ明らかでない。

また、食品の加工過程では、通常、加熱処理工程を含むため、タンパク質を機能性食品素材として利用するには、熱安定性についての情報も重要である。さらに、食品素材として、溶解性、乳化性、起泡性などの機能性についての情報も必要になる。

本研究では、蕎麦アルブミンの食後血糖値上昇抑制効果を小麦アルブミンと比較し、その作用メカニズムについて検討すると共に、米アルブミンのグルコース吸着能について、拡散モデルを構築し、定量的評価を行った。さらに、蕎麦アルブミンが消化酵素で加水分解後も高い  $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性を有していたため、蕎麦アルブミン加水分解物の食後血糖値上昇抑制効果について検討し、この機能に関与するペプチドを推定した。また、蕎麦アルブミンの食品素材としての応用のため、熱安定性・溶解性・起泡性・乳化性等の物理化学的特性を評価した。

第 2 章では、まず、蕎麦粉、小麦粉、米粉から、アルブミン画分の抽出を行った。蕎麦アルブミンについては、Wistar 系ラットにおける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) を行い、食後血糖値上昇抑制効果を小麦および米アルブミンと比較した。OSTT では、蕎麦、小麦および米アルブミンのいずれも、デンプンのみを投与したコントロール群と比較し、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。一方、OGTT に関しては、蕎麦および小麦アルブミンを投与した場合には食後血糖値および血漿インスリン値の上昇抑制効果は認められなかったが、米アルブミンを投与した場合には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。次いで、蕎麦、小麦および米アルブミンの哺乳類および昆虫の  $\alpha$ -アミラーゼに対する阻害活性を比較した。その結果、蕎麦および小麦アルブミンは哺乳類および昆虫に対するアミラーゼ阻害活性を有していたが、既に報告したように、米アルブミンは、昆虫由来の  $\alpha$ -アミラーゼに対してのみ阻害活性を示し、哺乳類由来の  $\alpha$ -アミラーゼに対しては阻害活性をほとんど示さなかった。そこで、哺乳類の  $\alpha$ -アミラーゼに対する阻害活性を示した蕎麦および小麦アルブミンについて、 $\alpha$ -アミラーゼ阻害様式を評価するため、酵素動力学における Lineweaver-Burk プロットを作成した。その結果、 $\alpha$ -アミラーゼに対する阻害様式は、蕎麦アルブミンが競合阻害、小麦アルブミンが非競合阻害であることが明らかになった。このことから、蕎麦アルブミンの  $\alpha$ -アミラーゼ阻害には、修飾されている糖鎖も関与していると推察される。次に、蕎麦、小麦および米アルブミンに消化酵素であるペプシンおよびトリプシンを作用させたところ、蕎麦アルブミンには消化耐性は認められなかったが、小麦および米アルブミンは消化耐性を有していた。さらに、二次元電気泳動にて蕎麦、小麦および米アルブミンを比較した結果、蕎麦アルブミンは pI4.1-4.8、小麦アルブミンは pI4.5-5.7、米アルブミンは pI5.5-7.2 であった。これらのことから、蕎麦、小麦、米アルブミンの血糖値上昇抑制作用を有するタンパク質のアミノ酸配列は異なると推察される。蕎麦および小麦アルブミンは、哺乳類の  $\alpha$ -アミラーゼに対する阻害様式は異なるものの、デンプンから還元糖への分解を阻害することにより、食後血糖値の上昇を抑制すると考えられる。一方、米アルブミンの食後血糖値上昇抑制作用は  $\alpha$ -アミラーゼ阻害によるものではなく、共同研究者の稲が推察しているように、小腸におけるグルコーストランスポーターの発現抑制および難消化性画分によるグルコースの吸着と排出促進であると考えられる。

そこで、米アルブミンのグルコース吸着能を評価するため、拡散モデルを構築し、グルコース吸着能があることが知られている食物繊維との比較を行った。まず、グルコース溶液のみで、透析膜を用いた

グルコース拡散実験を行い、拡散モデルを用いてグルコースの拡散係数を算出したところ、 $1.66 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$  となった。次に、米アルブミンあるいは食物繊維をグルコース溶液に添加し、同様の実験を行い、構築したグルコース拡散モデルを用いて、水溶性食物繊維および米アルブミンの吸着量を算出した。その結果、米アルブミンは、食物繊維よりは若干低いものの、 $200 \text{ mM}$  のグルコース溶液と混合した場合には、約  $1.8 \text{ g/g-albumin}$  ものグルコースを吸着していることが示された。

以上の結果から、蕎麦および小麦アルブミンは $\alpha$ -アミラーゼ阻害により、米アルブミンはグルコーストランスポーターの発現抑制に加えてグルコースの吸着により、食後血糖値上昇抑制作用を示すことが明らかとなった。

第 2 章において、蕎麦アルブミンにはペプシンおよびトリプシンに対する消化耐性は認められなかったが、酵素消化により低分子化した蕎麦アルブミンが $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性を保持し、食後血糖値上昇抑制効果を有している可能性が考えられる。そこで、第 3 章では、まず蕎麦アルブミンを酵素により加水分解し、 $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性および食後血糖値上昇抑制効果を検討した。次に、 $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性を有するペプチドを推定した。

まず、酵素消化後の蕎麦および小麦アルブミン加水分解物の $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性を測定した。その結果、小麦アルブミンは酵素消化により $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性が低下したが、蕎麦アルブミンは酵素消化後も、高いアミラーゼ阻害活性を保持していた。次いで、蕎麦アルブミン加水分解物の食後血糖値上昇抑制効果の有無の検討のため、前章と同様に OSTT を行った。加水分解物の OSTT では、デンプンのみを投与したコントロール群と比較し、蕎麦アルブミン加水分解物を投与した場合、食後 15 分の血糖値上昇が有意に抑制された。一方、小麦アルブミン加水分解物を投与した場合には、有意な血糖値上昇抑制作用は認められなかった。次に、 $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性を有するペプチドを推定するため、クロマトグラフィーにより活性ペプチドを精製し、プロテインシーケンサーにより N-末端アミノ酸配列を測定し、BLAST による解析を行った。3 回の精製で、ほぼ同じクロマトグラムが得られ、1~10 番目までの配列は一致した。BLAST での解析により、 $\alpha$ -アミラーゼ活性を有する蕎麦アルブミンの一次構造が明らかとなり、配列中にシステイン残基を 14 個有し、そのうちいくつかは分子内で架橋していると推察された。

以上の結果から、食後血糖値上昇抑制のメカニズムは、蕎麦アルブミンはペプチドなどの低分子による $\alpha$ -アミラーゼ阻害、小麦アルブミンは主にタンパク質による $\alpha$ -アミラーゼ阻害、米アルブミンは難消化性タンパク質によるグルコース吸着とグルコーストランスポーターの発現抑制であることが示唆された。

前章までに、蕎麦アルブミンがパンや米飯などのデンプン摂取時に食後血糖値の上昇を抑制し、糖尿病の予防や治療に有効な食品素材であることを示してきたが、食品の加工過程では、通常、加熱処理工程を含むため、熱安定性についての情報も重要である。また、食品素材として、加工特性についての情報も必要である。そこで第 4 章では、蕎麦アルブミンの食品への応用のため、熱安定性、溶解性、乳化性および起泡性などの物理化学的特性について検討した。

まず、蕎麦および小麦アルブミンを  $100^\circ\text{C}$  で 10 分~120 分加熱し、残存する $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性から熱安定性を評価した。次に、蕎麦アルブミンの変性温度を示差走査熱量測定 (Differential Scanning Calorimetry: DSC) にて測定した。蕎麦および小麦アルブミンは加熱後も高いアミラーゼ阻害活性を維持していた。また、蕎麦アルブミンの変性ピーク温度は約  $150^\circ\text{C}$  であり、ジスルフィド結合を切断しても、約  $135^\circ\text{C}$  と高い変性温度を保持していた。蕎麦アルブミンの pH 3-6 における溶解性は

いずれの pH でも高く、加熱後も高い溶解性を保持していた。乳化性は、蕎麦アルブミン、蕎麦アルブミン加水分解物にコーン油を加えホモジナイズし、500 nm の吸光度を測定することにより評価した。起泡性は、蕎麦アルブミン、蕎麦アルブミン加水分解物をクリーマーで泡立て、体積を測定することにより評価した。なお、乳化性および起泡性は、ポジティブコントロールの卵アルブミンおよびネガティブコントロールのカゼインと比較した。乳化性測定の結果、カゼインにはほとんど乳化性が認められなかったが、蕎麦および卵アルブミンには高い乳化性が確認され、pH による乳化性の低下はほとんど認められなかった。一方、蕎麦アルブミンは加水分解により乳化性が低下した。起泡性については、蕎麦アルブミンおよびその加水分解物は卵アルブミン、カゼインよりも高い起泡性および起泡安定性を示し、pH による起泡体積の変化はほとんど認められなかった。

以上により、蕎麦アルブミンは優れた熱安定性と溶解性をもち、食品の一般的な pH において高い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、蕎麦アルブミン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、その抑制メカニズムは、蕎麦はペプチドなどの低分子による哺乳類の  $\alpha$ -アミラーゼ阻害であり、主にタンパク質による哺乳類の  $\alpha$ -アミラーゼ阻害である小麦アルブミンや、グルコースの吸着およびグルコーストランスポーターの発現抑制である米アルブミンとは異なっていた。米アルブミンのグルコース吸着能に関しては、拡散モデルを構築し、その定量的評価を行った。蕎麦アルブミンは消化酵素による加水分解後も高い  $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性を保持し、その加水分解物にも食後血糖値上昇抑制効果が認められた。蕎麦アルブミン加水分解物を分画し、 $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性を有するペプチドを推定した。さらに、蕎麦アルブミンが熱安定性、溶解性、乳化性および起泡性に優れた食品素材であることを明らかにした。これらのことから、蕎麦アルブミンは、食後の急激な血糖値の上昇を抑制し、糖尿病の予防や治療に有効だけでなく、無味・無臭であるため嗜好性を損なうことなく、パンやケーキなど、気泡や油滴を保持した状態で加熱を行う食品への応用が可能な機能性食品素材であることが明らかになった。

よって本論文は、博士（生物資源科学）の学位を授与されるに値するものと認められる。

以上

令和 4 年 10 月 6 日