

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

日本大学大学院 生物資源科学研究科

二宮 和美

2022

## 【目次】

|         |  |    |
|---------|--|----|
| 第 1 章   | 序論   | 1  |
| 第 2 章   | 穀物アルブミンの食後血糖値上昇抑制効果および<br>その特性の比較            | 8  |
| 2-1     | 緒言   | 8  |
| 2-2     | 実験材料と方法                                      | 10 |
| 2-2-1   | 穀物アルブミンの食後血糖値上昇抑制効果の評価                       | 10 |
| 2-2-1-1 | 実験試料の調製                                      | 10 |
| (1)     | 実験試料   | 10 |
| (2)     | 蕎麦タンパク質の分画                                   | 10 |
| (3)     | 蕎麦、小麦および米アルブミンの調製                            | 11 |
| 2-2-1-2 | 動物実験   | 15 |
| (1)     | 実験動物   | 15 |
| (2)     | デンプン負荷試験 (OSTT) およびグルコース負荷試験<br>(OGTT)       | 15 |
| 2-2-1-3 | 穀物アルブミンの $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性                 | 20 |
| (1)     | $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性測定                        | 20 |
| (2)     | 蕎麦および小麦アルブミンによる $\alpha$ -アミラーゼ阻害の<br>動力学的解析 | 22 |
| 2-2-2   | 穀物アルブミンの特性の評価                                | 22 |
| (1)     | <i>In vitro</i> における蕎麦、小麦および米アルブミンの<br>消化性評価 | 22 |
| (2)     | 蕎麦アルブミン中の糖タンパク質の染色                           | 25 |
| (3)     | 二次元電気泳動 (2D-PAGE)                            | 29 |
| 2-2-3   | 水溶性高分子へのグルコースの吸着挙動に関する検討                     | 29 |

|         |   |    |
|---------|---|----|
| 2-2-3-1 | グルコース拡散実験                                 | 29 |
| (1)     | 実験試料                                      | 29 |
| (2)     | グルコース拡散実験                                 | 30 |
| 2-2-3-2 | グルコース吸着量の解析法                              | 30 |
| (1)     | グルコース拡散モデル                                | 30 |
| (2)     | 水溶性高分子無添加時の拡散係数 $D$ の評価                   | 34 |
| (3)     | 水溶性高分子の存在下での吸着量 $m$ の算出                   | 34 |
| (4)     | 水溶性高分子溶液の粘度                               | 34 |
| 2-2-4   | 統計解析                                      | 34 |
| 2-3     | 結果  | 37 |
| 2-3-1   | 蕎麦タンパク質の分画                                | 37 |
| 2-3-2   | 穀物アルブミンの食後血糖値上昇抑制効果                       | 37 |
| (1)     | デンプン負荷試験 (OSTT) およびグルコース負荷試験 (OGTT)       | 37 |
| (2)     | $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性測定                     | 40 |
| (3)     | 蕎麦および小麦アルブミンによる $\alpha$ -アミラーゼ阻害の動力学的解析  | 40 |
| 2-3-3   | 穀物アルブミンの特性の評価                             | 45 |
| (1)     | <i>In vitro</i> での蕎麦アルブミンの消化性および糖タンパク質の染色 | 45 |
| (2)     | 蕎麦、小麦および米アルブミン $\alpha$ -AI の比較           | 45 |
| 2-3-4   | 水溶性高分子へのグルコースの吸着挙動の解析                     | 45 |
| (1)     | 透析膜中でのグルコースの拡散係数 $D$ の算出                  | 45 |
| (2)     | 水溶性高分子へのグルコース吸着量 $m$ の算出                  | 49 |
| (3)     | 水溶性高分子溶液の粘度                               | 51 |
| (4)     | グルコースの拡散シミュレーション                          | 55 |

|  |  |    |
|--|--|----|
| 2-4  | 考察   | 58 |
| 2-4-1  | 穀物アルブミンの食後血糖値上昇抑制効果                        | 58 |
| 2-4-2  | 水溶性高分子へのグルコースの吸着挙動の解析                      | 60 |
| 2-5  | 小括   | 67 |
| 第3章 蕎麦アルブミン加水分解物の食後血糖値上昇抑制効果<br>および関与ペプチドの推定 |  |    |
|  | および関与ペプチドの推定                               | 68 |
| 3-1  | 緒言   | 68 |
| 3-2  | 実験材料と方法                                    | 69 |
| 3-2-1  | 実験試料                                       | 69 |
| 3-2-2  | 蕎麦および小麦アルブミン加水分解物の $\alpha$ -アミラーゼ<br>阻害活性 | 69 |
| 3-2-3  | 動物実験試料としての蕎麦および小麦アルブミン<br>加水分解物の調製         | 69 |
| 3-2-4  | 実験動物                                       | 71 |
| 3-2-5  | 蕎麦および小麦アルブミン加水分解物のデンプン負荷<br>試験 (OSTT)      | 71 |
| 3-2-6  | ペプチド推定のための蕎麦アルブミンの精製                       | 71 |
| 3-2-7  | 蕎麦アルブミン中の $\alpha$ -AIの推定                  | 75 |
| 3-2-8  | 統計解析                                       | 77 |
| 3-3  | 結果   | 77 |
| 3-3-1  | 蕎麦および小麦アルブミン加水分解物の $\alpha$ -アミラーゼ<br>阻害活性 | 77 |
| 3-3-2  | 動物実験試料としての蕎麦および小麦アルブミンの<br>酵素的加水分解         | 77 |
| 3-3-3  | 蕎麦および小麦アルブミン加水分解物のデンプン負荷                   |    |

|  |     |
|--|-----|
| 試験 (OSTT) .....                                  | 77  |
| 3-3-4 蕎麦アルブミン $\alpha$ -AI ペプチドの精製 .....         | 81  |
| 3-3-5 蕎麦アルブミン $\alpha$ -AI ペプチドの分析 .....         | 81  |
| 3-4 考察 .....                                     | 88  |
| 3-5 小括 .....                                     | 92  |
| <br>   |     |
| 第4章 機能性食品素材としての蕎麦アルブミンの物理化学的<br>性質の評価 .....      | 93  |
| 4-1 緒言 .....                                     | 93  |
| 4-2 実験材料と方法 .....                                | 95  |
| 4-2-1 実験試料 .....                                 | 95  |
| 4-2-2 蕎麦アルブミンの調製 .....                           | 95  |
| 4-2-3 蕎麦アルブミンの熱安定性の評価 .....                      | 95  |
| 4-2-4 示差走査熱量測定 (DSC) による蕎麦アルブミンの<br>変性温度測定 ..... | 97  |
| 4-2-5 蕎麦アルブミンの溶解度測定 .....                        | 97  |
| 4-2-6 酵素製剤による蕎麦アルブミンの加水分解 .....                  | 100 |
| 4-2-7 蕎麦アルブミンの加水分解度測定 .....                      | 100 |
| 4-2-8 $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性 .....                  | 100 |
| 4-2-9 乳化性測定 .....                                | 100 |
| 4-2-10 起泡性測定 .....                               | 102 |
| 4-2-11 統計解析 .....                                | 105 |
| 4-3 結果 .....                                     | 106 |
| 4-3-1 蕎麦アルブミンの熱安定性の評価 .....                      | 106 |
| 4-3-2 蕎麦アルブミンの変性温度 .....                         | 106 |
| 4-3-3 蕎麦アルブミンの溶解性 .....                          | 106 |

|              |  |     |
|--------------|--|-----|
| 4-3-4        | 蕎麦アルブミンの加水分解度 .....                        | 110 |
| 4-3-5        | 酵素製剤による加水分解後の蕎麦アルブミンの<br>α-アミラーゼ阻害活性 ..... | 110 |
| 4-3-6        | 蕎麦アルブミンおよびその加水分解物の乳化性 .....                | 110 |
| 4-3-7        | 蕎麦アルブミンおよびその加水分解物の起泡性 .....                | 115 |
| 4-4          | 考察 .....                                   | 117 |
| 4-5          | 小括 .....                                   | 122 |
| 第5章 総括 ..... |  | 123 |
| 引用文献 .....   |  | 129 |
| 謝辞 .....     |  | 147 |

## 第 1 章 序論

糖尿病 (Diabetes mellitus: DM) は世界中で深刻な疾病の一つだといわれており、世界保健機関 (World Health Organization: WHO) が実施した最新の調査によると、2014 年の患者数は世界で 4 億 2200 万人と推定されている (World Health Organization, 2016)。DM は、網膜症、腎症、神経障害、血管障害などの病変を突然発症するまで、患者が症状を認識しないことが多いため、“サイレントキラー”と呼ばれている (World Health Organization, 2016)。これらの合併症は、失明、腎不全、および足潰瘍などを引き起こすことがあり、患者の健康に関する生活の質 (Quality of Life: QOL) に深刻な影響を及ぼす。DM は原因が異なる I 型と II 型に大別される (Alberti and Zimmet, 1998)。DM 患者の約 90% 以上を占める II 型 DM は、いくつかの遺伝的要因に食生活や肥満、運動不足等の生活環境が複雑に関係して発症する疾患であり、主に末梢組織のインスリン感受性低下と膵臓のランゲルハンス島  $\beta$  細胞からのインスリン分泌量の低下の二つが原因であるとされている。DM とその合併症の進行に、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。DM とその合併症を予防する方法の 1 つは、適切な食事を摂取することによって食後の血糖値の上昇を抑制することである。食後の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 (Van de Laar *et al.*, 2004)。

食物繊維 (Braaten *et al.*, 1991; Nishimune *et al.*, 1991; Liljeberg *et al.*, 1996; Cavallero *et al.*, 2002)、ポリフェノール (Hara and Honda,

1990; Matsui *et al.*, 2007)、タンパク質 (Shainkin and Birk, 1970; Silano *et al.*, 1973; Buonocore *et al.*, 1977; Blanco-Labra, 1981; Weselake *et al.*, 1983b) およびペプチド (Yu *et al.*, 2012; Yan *et al.*, 2019) など、多くの食品素材に関して、食後の血糖値上昇を抑制する効果が報告されている。食物繊維は、グルコースを吸着し、排出を促進するが、ポリフェノール、タンパク質およびペプチドは、 $\alpha$ -アミラーゼや  $\alpha$ -グルコシダーゼなどの酵素を阻害し、グリコシド結合の加水分解とグルコース産生を遅らせることが知られている。

穀物中のタンパク質には食後の血糖値上昇を抑制する効果を有するものがいくつか報告されている。穀物は、昆虫に対する生体防御の役割でしばしば種子に高濃度の  $\alpha$ -アミラーゼインヒビター ( $\alpha$ -Amylase Inhibitor:  $\alpha$ -AI) を含んでいる (Svensson *et al.*, 2004)。 $\alpha$ -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。そのため、 $\alpha$ -AI は食後血糖値上昇抑制作用を有することが報告されている (Figure 1-1)。タンパク質性の  $\alpha$ -AI としてよく研究されている例として小麦 (*Triticum aestivum*) (Silano *et al.*, 1973; O'Donnell and McGeeney, 1976; Petrucci *et al.*, 1976)、米 (*Oryza sativa*) (Feng *et al.*, 1991)、大麦 (*Hordeum vulgare*) (Weselake *et al.*, 1983a)、ライ麦 (*Secale cereale*) (Granum, 1978; Iulek *et al.*, 2000)、トウモロコシ (*Zea mays*) (Blanco-Labra, 1981)、およびインゲン豆 (*Phaseolus vulgaris*) (Marshall *et al.*, 1975) などの穀物由来のものがあるが、特に、小麦とインゲン豆の  $\alpha$ -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 (Tormo *et al.*, 2004; Kodama *et al.*, 2005; Tormo *et al.*, 2006)。

タンパク質は、溶解する溶媒の種類によって、水溶性のアルブミ

ン、塩溶性のグロブリン、希酸・希アルカリ可溶性のグルテリン、アルコール可溶性のプロラミンに大別され、各タンパク質の含量は、穀物種によって大きく異なる (Radovic *et al.*, 1999; Janssen *et al.*, 2016; Hoogenkamp *et al.*, 2016; Table 1-1)。小麦の  $\alpha$ -AI は小麦タンパク質のアルブミン画分に存在する (Puls and Keup, 1973; Koike *et al.*, 1995; Lankisch *et al.*, 1998)。また、小麦アルブミンはペプシンやトリプシンによる消化に耐性を示し、熱安定性も有するため、食品加工工程などにおける加熱後も  $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性を維持することが期待できる (Oneda *et al.*, 2004)。小麦アルブミンは、既に日本の特定保健用食品 (Food for Specified Health Uses: FoSHU) の血糖値の上昇を抑制する機能性成分として使用されている (Arai *et al.*, 2008)。

一方、米のアルブミン画分にも  $\alpha$ -AI が含まれていることが知られているが、哺乳類の  $\alpha$ -アミラーゼは阻害せず、昆虫由来のアミラーゼを阻害すると報告されている (Feng *et al.*, 1996; Ina *et al.*, 2016)。米アルブミンは、消化酵素による加水分解に強い耐性があり、哺乳類の  $\alpha$ -アミラーゼは阻害にも関わらず、ラットでのグルコース負荷時に血糖値の上昇を抑制した (Ina *et al.*, 2016)。Ina らはこのメカニズムをグルコーストランスポーターの発現抑制とグルコースの吸着および排出促進だと推察しているが、グルコース吸着能に関する定量的評価はできていない (Ina *et al.*, 2016; Ina *et al.*, 2020)。

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広義の穀物である。蕎麦種子のタンパク質含有量は 12-15% であり、総タンパク質の約 44% をアルブミンが占めて

いる (Gul and Yao, 2006)。蕎麦タンパク質は抗コレステロール活性等を有する健康的な食品素材として注目されている (Kayashita *et al.*, 1997; Tomotake *et al.*, 2000; Wijngaard and Arend, 2006; Ma and Xiong, 2009; Yilmaz *et al.*, 2020)。蕎麦にもタンパク質性の  $\alpha$ -AI (水溶性のアルブミン画分) が含まれていると報告されているが (Ikeda *et al.*, 1993; Ikeda *et al.*, 1994)、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未だ明らかでない。

また、タンパク質を機能性食品素材として利用するには、熱安定性に加えて、溶解性、乳化性、起泡性など、加工時に有用な特性を有することが望ましい。

本研究では、蕎麦のアルブミン画分中に含まれる  $\alpha$ -AI の食後血糖値上昇抑制効果を小麦および米のアルブミンと比較し、その作用メカニズムについて検討した。また、蕎麦アルブミンの物理化学的特性、機能性についても検討した。

本論文の構成は以下の通りである。

第 2 章では、動物実験により、蕎麦アルブミンの食後血糖値上昇抑制効果について検討し、小麦および米のアルブミンと比較した。また *in vitro* で、蕎麦、米、小麦のアルブミンの  $\alpha$ -アミラーゼの阻害活性を測定し、酵素動力学的な解析を行った。また、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。

第 3 章では、蕎麦アルブミンを消化酵素で加水分解し、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、この機能に参与するペプチドの推定を行った。

第 4 章では、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・水への溶解性・乳化性・起泡性といった物理化学的特性を評価した。

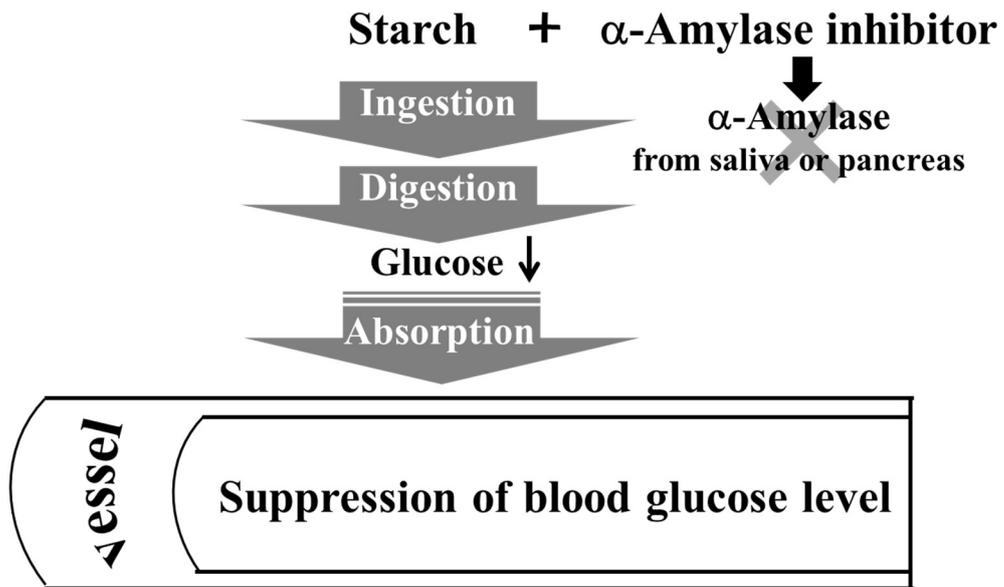


Figure 1-1 Suppression of the postprandial blood glucose elevation by  $\alpha$ -amylase inhibitor ( $\alpha$ -AI).

Table 1-1 Content of albumin, globulin, glutelin, and prolamin  
in cereals

|  | <b>Buckwheat</b>            | <b>Wheat</b>             | <b>Rice</b>                 |
|--|-----------------------------|--------------------------|-----------------------------|
| <b>Albumin<br/>(Water-soluble)</b>                 | <b>18-32% <sup>1)</sup></b> | <b>15% <sup>2)</sup></b> | <b>4-22% <sup>3)</sup></b>  |
| <b>Globulin<br/>(Salt-soluble)</b>                 | <b>70% <sup>1)</sup></b>    | <b>7% <sup>2)</sup></b>  | <b>5-13% <sup>3)</sup></b>  |
| <b>Glutelin<br/>(Dilute acid/alkaline-soluble)</b> | <b>4-23% <sup>2)</sup></b>  | <b>33% <sup>2)</sup></b> | <b>70-80% <sup>3)</sup></b> |
| <b>Prolamin<br/>(Aqueous alcohol-soluble)</b>      | <b>1-5% <sup>2)</sup></b>   | <b>46% <sup>2)</sup></b> | <b>1-5% <sup>3)</sup></b>   |

1) Radovic *et al.*, *J. Agric. Food Chem.* (1999)

2) Janssen *et al.*, *Compr. Rev. Food Sci.* (2016)

3) Hoogenkamp, Kumagai *et al.*, *Sustainable Protein Sources*, Elsevier (2016)

## 第2章 穀物アルブミンの食後血糖値上昇抑制効果およびその特性の比較 (Ninomiya *et al.*, 2018; Ninomiya *et al.*, 2022a; Ninomiya *et al.*, 2022b)

### 2-1 緒言

第1章で述べたように、糖尿病 (DM) を予防する方法の1つは、適切な食事を摂取することによって食後の血糖値の上昇を抑制することであり、食後の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である (Van de Laar *et al.*, 2004)。

小麦のアルブミン画分に含まれる  $\alpha$ -AI は昆虫と哺乳類の両方の  $\alpha$ -アミラーゼを阻害し、ラット、犬、ヒトの血糖値の上昇を抑制することが報告されている (Puls and Keup, 1973; Koike *et al.*, 1995; Lankisch *et al.*, 1998)。

一部の食物繊維は、デンプンまたはグルコースと一緒に摂取すると食後の血糖値上昇を抑制することが知られている (Braaten *et al.*, 1991; Nishimune *et al.*, 1991; Liljeberg *et al.*, 1996; Chandalia *et al.*, 2003)。食物繊維が血糖値の上昇を抑制する主なメカニズムとしては4つが提唱されている。(1) 粘度を上げることによってグルコースの拡散を妨げる、(2) 胃内容排出を遅らせる、(3) グルコースを吸着し、その排泄を促進することにより、グルコース濃度を下げる、(4) デンプンと酵素をカプセル化することによって  $\alpha$ -アミラーゼ作用を遅らせる (Blackburn *et al.*, 1984; Moron *et al.*, 1989; Flourie, 1992; Gourgue *et al.*, 1992; Ou *et al.*, 2001)。血糖値の上昇に対する食物繊維の抑制効果は、部分的なグルコースの吸着によるものであるため、食物繊維へのグルコース吸着特性を解明することは重要で

ある。

米アルブミンは消化酵素による加水分解に強い耐性があり、哺乳類の  $\alpha$ -アミラーゼは阻害しないにも関わらず、ラットでのグルコース負荷後も血糖値の上昇を抑制した (Ina *et al.*, 2016)。Ina ら

(2016) はこのメカニズムをグルコーストランスポーターの発現抑制とグルコースの吸着および排出促進だと推察しているが、グルコース吸着能の量的評価はできていない (Ina *et al.*, 2016)。

蕎麦 (*Fagopyrum esculentum* Moench) にもアルブミン画分中に  $\alpha$ -AI が含まれていると報告されているが、蕎麦の  $\alpha$ -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 (Ikeda *et al.*, 1993; Ikeda *et al.*, 1994)。そこで本章では、動物実験により、蕎麦アルブミンの食後血糖値上昇抑制効果について検討し、小麦および米のアルブミンと比較した。また *in vitro* で、蕎麦、米、小麦のアルブミンの  $\alpha$ -アミラーゼの阻害活性を測定し、酵素動力学的な解析を行った。また、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。

## 2-2 実験材料と方法

### 2-2-1 穀物アルブミンの食後血糖値上昇抑制効果の評価

#### 2-2-1-1 実験試料の調製

##### (1) 実験試料

蕎麦粉（北海道産そば粉（石臼一本挽）, 富澤商店株式会社, 東京、日本）、小麦粉（日清フラワー（薄力小麦粉）, 日清製粉株式会社、東京、日本）、精白米（日本晴, 2012年度産, 滋賀）およびミールワーム（*Tenebrio molitor*）は市販品を購入した。ヒト唾液、膵臓、ブタ膵臓  $\alpha$ -アミラーゼは、Sigma-Aldrich（St. Louis, State of Missouri, USA）から、 $\alpha$ -アミラーゼの基質である 2-chloro-4-nitrophenyl- $\alpha$ -D-maltotrioside（G3-CNP）は、オリエンタル酵母（東京、日本）から入手した。ミールワーム由来の  $\alpha$ -アミラーゼの調製は、Buonocore and Poerio（1975）の方法に修正を加えて行った（Buonocore and Poerio, 1975）。ペプシン（ブタ胃由来）およびトリプシン（ウシ膵臓由来）は和光純薬工業（大阪、日本）から入手した。他の化学薬品はすべて特級試薬を使用した。

##### (2) 蕎麦タンパク質の分画

蕎麦粉に 5 倍量の 25 mM HEPES buffer（pH 6.9）を加え、4°C で 3 時間以上攪拌した。その後、高速冷却遠心機（himac CR-21G II, 株式会社日立ハイテクノロジーズ, 東京）にて遠心分離（15,000×g、15 min、4°C）し、上清を回収した。得られた上清に 100%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。その後、高速冷却遠心機にて遠心分離（15,000×g、60 min、4°C）し、沈殿を回収した。沈殿は、少量の純水に溶解し、純水に対して透析を行った。透析後、透析チューブ内の溶液を微量高速冷却遠心機（MX-

300、株式会社トミー精工、東京)にて遠心分離 (15,000×g, 15 min, 4°C) し、得られた上清 (アルブミン) と沈殿 (グロブリン) をそれぞれ凍結乾燥 (FDU-2000、東京理化工機株式会社、東京) し、使用するまで-20°Cで保存した。

SDS-PAGE に使用するサンプルは、タンパク質当量で 1 mg/mL となるよう純水に溶解し、等量の 2×SDS sample buffer と混合し 5 分間煮沸し調製した。α-アミラーゼ阻害活性測定に使用するサンプルは、各試料粉末を 5 mg/mL となるよう α-アミラーゼ阻害活性測定用 buffer に溶解し、2-2-1-3 (1) の方法で α-アミラーゼ阻害活性を測定した。

### (3) 蕎麦、小麦および米アルブミンの調製

2-2-1-1 (2) から蕎麦のアルブミン画分を抽出し、既に報告されている小麦および米アルブミンの抽出・精製を行った。

蕎麦及び小麦アルブミンの調製は、Feng ら (1991) の方法 (Feng *et al.*, 1991) に一部修正を加えて行った (Figure 2-1)。蕎麦粉 (*Fagopyrum esculentum* Moench, 株式会社富澤商店, 東京) あるいは小麦粉 (*Triticum aestivum*, 日清製粉株式会社, 東京) に 5 倍量 (w/v) の 25 mM 4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid (HEPES) buffer (pH 6.9) を加え、4°C で 3 時間攪拌した後、遠心分離 (15,000×g, 15 min, 4°C) した。得られた上清を 80°C で 20 分間加熱処理し、夾雑タンパク質を熱変性させ、遠心分離 (15,000×g, 15 min, 4°C) することで除去した。得られた上清に 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、遠心分離 (15,000×g, 60 min, 4°C) して沈殿を回収した。沈殿は、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 (15,000×g, 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。

粗アルブミン粉末を 15 mg/mL となるように 20 mL の純水に溶解し、ろ過フィルター (25CS045AS, アドバンテック東洋株式会社, 東京) で滅菌後、Sephadex G-50 column ( $\phi$  2.5 × 100 cm) (GE Healthcare UK Ltd., Buckinghamshire, UK) にアプライし、流速 0.2 mL/min、5 mL フラクション、4°C の条件で分離した。各フラクションは、280 nm における吸光度を分光光度計 (UV mini 1240, 島津株式会社, 京都) を用いて測定した。さらに、各フラクションのブタ膵臓由来  $\alpha$ -アミラーゼに対する阻害活性の測定を 2-2-1-3 (1) の方法を用いて測定した。 $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性 90%以上のフラクションを凍結乾燥し、蕎麦  $\alpha$ -AI を得た。試料は、使用するまで-20°C で保存した。

米アルブミンの調製は、Ina ら (2016) の方法 (Ina *et al.*, 2016) に一部修正を加えて行った (Figure 2-2)。精白米を小型製粉機 (ミクロパウダー・MPW-G008, 榎野産業株式会社, 東京) で破碎し、粉状にした。この米粉末 600 g に 5 倍量 (w/v) の 100 mM クエン酸 buffer (pH 6.0) を加え、4°C で一晩攪拌した。その後は、蕎麦および小麦アルブミンの調製と同様の操作を行い、米アルブミンを得た。

タンパク純度は、BCA Protein Assay Kit (23250, Thermo Fisher Scientific) を使用して、BCA 法 (Smith *et al.*, 1985) により測定されたウシ血清アルブミン (BSA) の標準曲線を元に算出した。

SDS-PAGE に使用するサンプルは、タンパク質当量で 1 mg/mL となるよう純水に溶解し、等量の 2×SDS sample buffer と混合し 5 分間

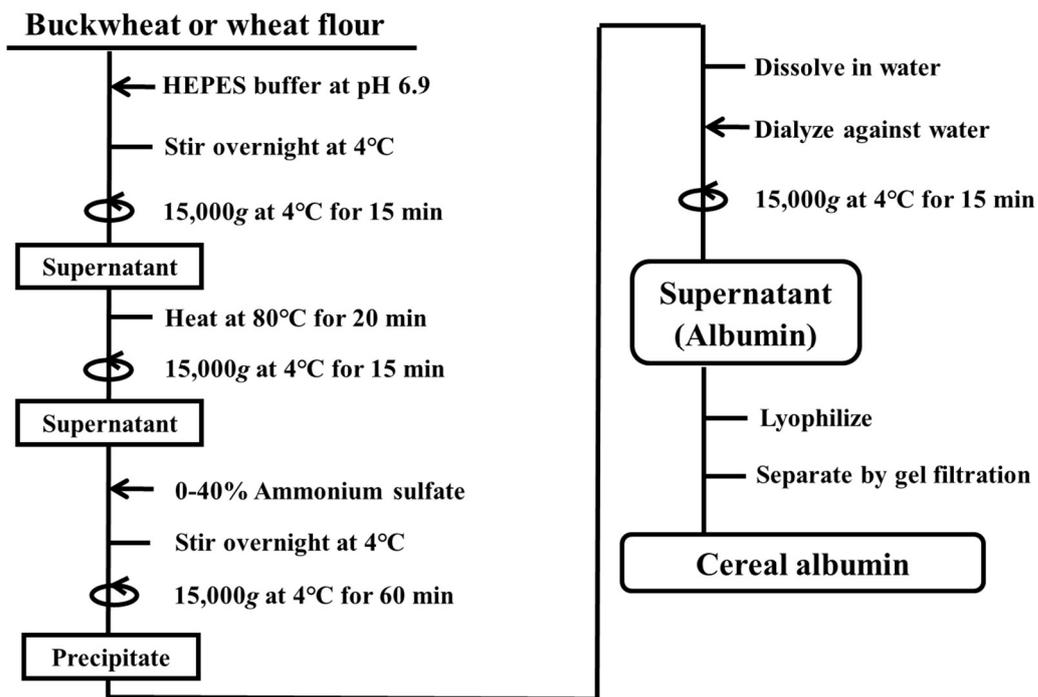


Figure 2-1 Extraction of buckwheat and wheat albumin.

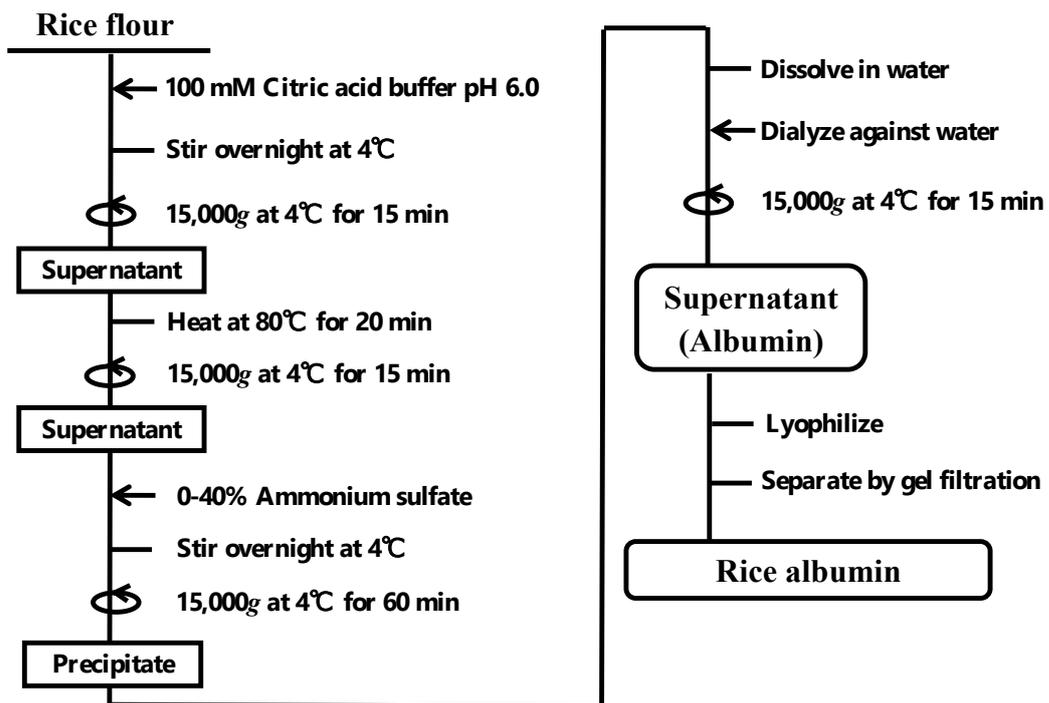


Figure 2-2 Extraction of rice albumin.

煮沸し調製した。

## 2-2-1-2 動物実験

### (1) 実験動物

Wistar 系ラット（SPF，7 週齢，オス）は日本 SLC 株式会社（静岡）から購入し、環境への馴化のため、1 週間予備飼育を行った。飼育は、5 連ゲージにラットを 1 頭ずつ入れ、予備飼育およびその後の研究期間を通して、23℃および 55%の湿度に制御された環境で、8:00 から 20:00 までの 12 時間の明/暗サイクル下の飼育室で行った。飲料水としては滅菌水を与え、飼料の CE-2（マウス・ラット・ハムスター用飼育繁殖固形飼料（CE-2），日本クレア株式会社，東京）は自由摂取させた。すべての動物実験は、日本大学動物実験運営内規に則り行った（承認番号：AP11B012）。

### (2) デンプン負荷試験（OSTT）およびグルコース負荷試験

（OGTT）における蕎麦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

デンプン負荷試験（Oral Starch Tolerance Test：OSTT）およびグルコース負荷試験（Oral Glucose Tolerance Test：OGTT）は Ina ら（2016）の方法（Ina *et al.*, 2016）に一部改変して行った（Figures 2-3, 2-4）。予備飼育後のラットは、ランダムに以下の 6 群に分けた（n=7/群）：可溶性デンプン（9005-25-8，富士フィルム和光純薬株式会社）投与群、可溶性デンプン+蕎麦アルブミン 300 mg/kg 体重投与群、可溶性デンプン+小麦アルブミン 300 mg/kg 体重投与群、グルコース（50-99-7，富士フィルム和光純薬株式会社）投与群、グルコース+蕎麦アルブミン 300 mg/kg 体重投与群、グルコース+小麦

アルブミン 300 mg/kg 体重投与群。試験前に 14 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，ドイツ）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蕎麦アルブミンまたは小麦アルブミンを無麻酔下でゾンデ（CL-4596，日本クレア株式会社）によって経口胃内投与した。なお、可溶性デンプンあるいはグルコースのみを 1 g/kg となるように PBS で調製したものを投与した群をコントロール群とした。試料を投与した時間を 0 分とし、投与後 0、15、30、45、90 分に尾静脈よりヘパリン処理されたヘマトクリット採血管（22-362-566，Thermo Fisher Scientific）を用いて約 70  $\mu$ L 採血するとともに Dexter-ZII（バイエル薬品株式会社，ドイツ）を用いて血糖値を測定した。採取した血液は 0.6 mL チューブに移し、遠心分離（3,000 $\times$ g，10 min，4 $^{\circ}$ C）し、血漿を得た。得られた血漿は測定するまで-80 $^{\circ}$ Cで保存した。血漿インスリン値はインスリンキット（AKRIN-010，Rat Insulin ELISA Kit (U-E type)，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）を Wolever and Jenkins（1986）の方法を用いて算出した（Wolever and Jenkins，1986）（Figure 2-5）。

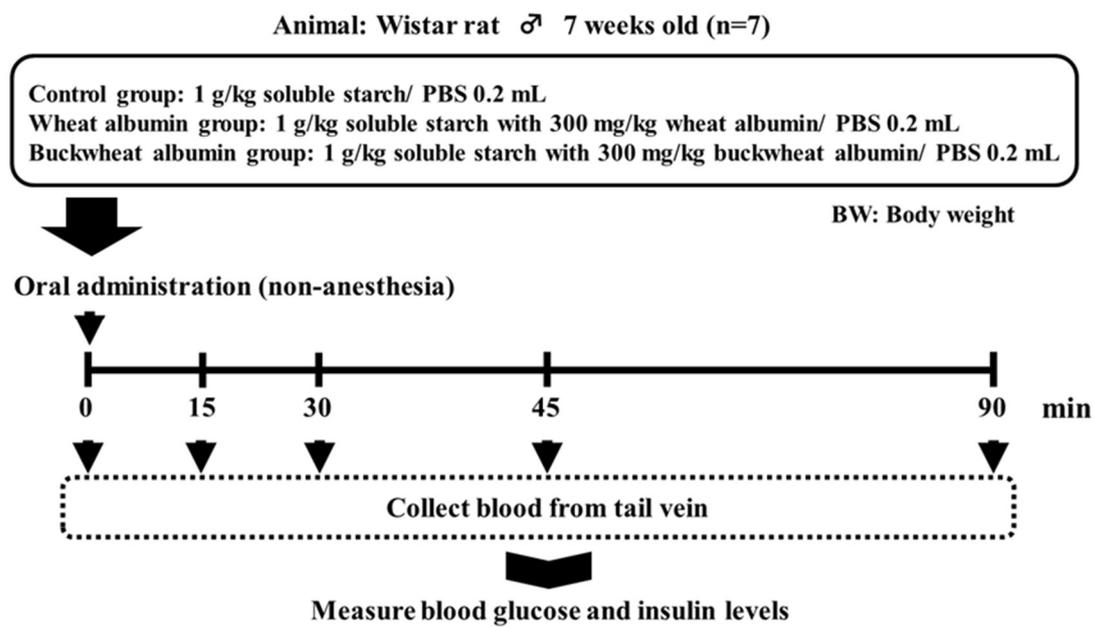


Figure 2-3 Experimental design for oral soluble starch tolerance test (OSTT) in normal rats.

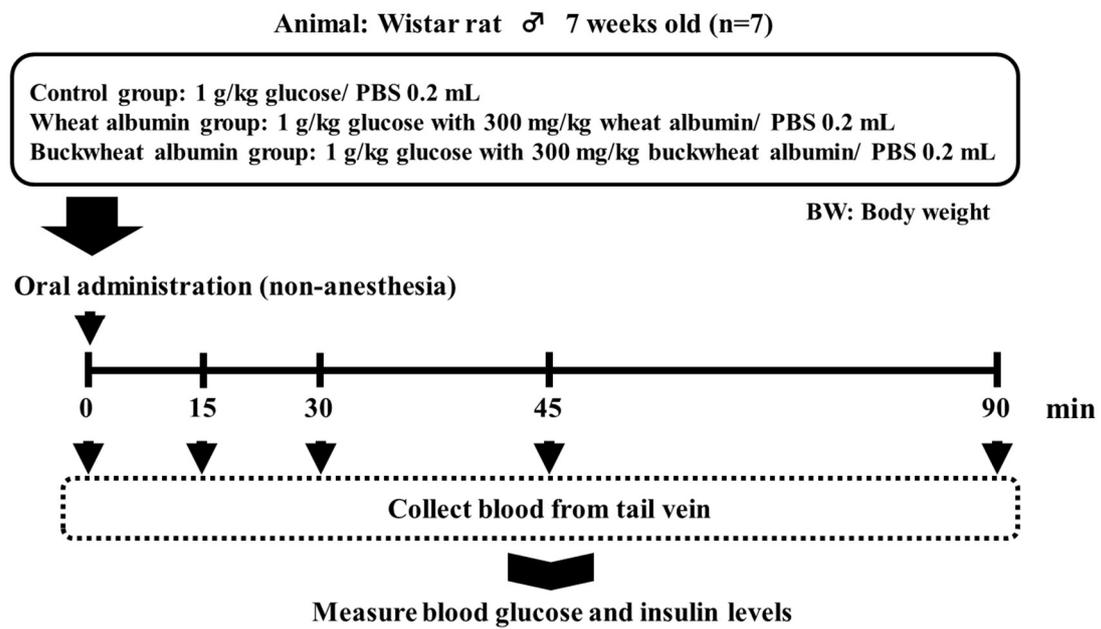
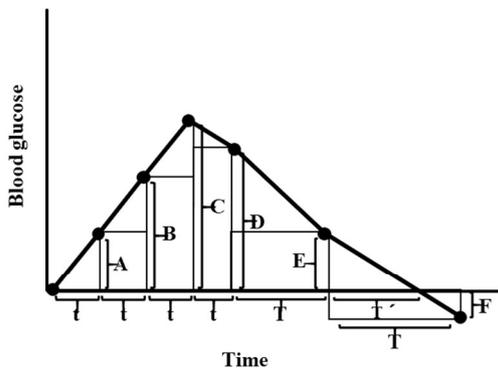


Figure 2-4 Experimental design for oral glucose tolerance test (OGTT) in normal rats.



$$\begin{aligned} \text{Area} &= \frac{At}{2} + \frac{(B+A)t}{2} + \frac{(B+C)t}{2} + \frac{(C+D)t}{2} + \frac{(D+E)t}{2} + \frac{ET}{2} \\ &= (A+B+C+D)t + \frac{Et}{2} + \frac{ET}{2} \\ \text{Since } \frac{E}{(E+F)} &= \frac{T}{T} \\ \text{Therefore } \frac{ET}{2} &= \frac{E^2T}{2(E+F)} \end{aligned}$$

The overall equation simplifies to:

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

Wolever et al., *American Journal of Clinical Nutrition*, 43(1), 167-172 (1986)

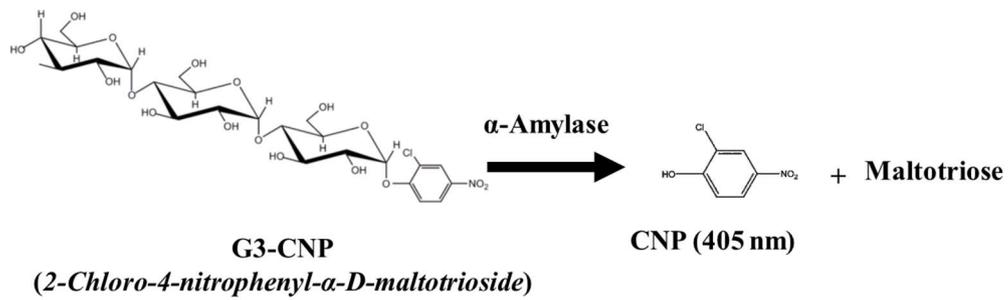
Figure 2-5 Method of calculation of area under the curve.

### 2-2-1-3 穀物アルブミンの $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性

#### (1) $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性測定

$\alpha$ -アミラーゼ阻害活性は Foo and Bais (1998) の方法 (Foo and Bais, 1998) に一部修正を加えて行った。ブタ膵臓由来  $\alpha$ -アミラーゼ ( $\alpha$ -Amylase from Porcine Pancreas (1325 U/mg protein), A6255-10MG)、ヒト唾液  $\alpha$ -アミラーゼ ( $\alpha$ -Amylase from Human Saliva (210 U/mg solid), A0521-500UN) およびヒト膵液由来-アミラーゼ ( $\alpha$ -Amylase from Human Pancreas, A9972) は、Sigma-Aldrich (USA) から購入した。ミールワーム由来  $\alpha$ -アミラーゼは、Buonocore and Poerio の方法で抽出した (Buonocore and Poerio, 1975)。哺乳類の  $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性測定には、50 M NaCl 3 mM CaCl<sub>2</sub> 含有 20 mM HEPES buffer (pH 6.9) を、ミールワームの  $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性測定には、100 mM NaCl 含有 20 mM 酢酸 Na buffer (pH 5.4) を活性測定用 buffer として用いた。 $\alpha$ -アミラーゼの基質として、2-chloro-4-nitrophenyl- $\alpha$ -D-maltotriose (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 buffer に溶解して使用した。哺乳類由来の  $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性は、 $\alpha$ -AI 添加時あるいは無添加時に G3-CNP が  $\alpha$ -アミラーゼによって分解される生じる 2-chloro-nitrophenol (CNP) の吸収波長である 405 nm における吸光度を測定することにより求めた (Figure 2-6)。

$\alpha$ -アミラーゼ阻害活性は、マイクロプレート (Nunc イムノモジュール+フレーム, サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社, 東京) に、25  $\mu$ L の酵素溶液と 25  $\mu$ L のサンプル溶液を混合し、37°C で 30 分間インキュベートした。哺乳類  $\alpha$ -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



Foo et al. *Clinica Chimica Acta*, 272(2),137-147(1998)

Figure 2-6 Hydrolysis of G3-CNP by  $\alpha$ -amylase.

た。次に、50  $\mu\text{L}$  の基質溶液を加えて、37°C で 10 分間酵素反応を行った。さらに、0% (w/v) Tris 溶液 (pH 10.5) を 100  $\mu\text{L}$  加え、酵素反応を停止した。酵素反応により生成した CNP の 405 nm における吸光度を、イムノミニ (NJ-2300, バイオテック株式会社, 東京) を用いて測定した。

$\alpha$ -アミラーゼ阻害率は、以下の式を用いて算出した。

$$\text{阻害率(\%)} = (\text{Ac} - \text{Ai}) / \text{Ac} \times 100 \quad (1)$$

Ac : 試料無添加時 (OD 405 nm)

Ai : 試料添加時 (OD 405 nm)

(2) 蕎麦および小麦アルブミンによる  $\alpha$ -アミラーゼ阻害の動力学的解析

蕎麦および小麦アルブミンのブタ膵臓由来  $\alpha$ -アミラーゼに対する  $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性測定は Seri ら (1996) の方法 (Seri *et al.*, 1996) を一部改変して行った。蕎麦および小麦アルブミン濃度を 0.05、0.15、0.25、0.35 mg/mL、基質濃度を 0.5、1.0、1.5、2.0 mM、0.2 U/well のブタ膵臓由来  $\alpha$ -アミラーゼを酵素とし、2-2-1-3 (1) と同様の操作を行った。測定データは、Lineweaver and Burk (1934) の方法 (Lineweaver and Burk, 1934) でプロットした。

## 2-2-2 穀物アルブミンの特性の評価

(1) *In vitro* における蕎麦アルブミンの消化性の評価

Iwami ら (1986) と Ma and Xiong (2009) の方法 (Iwami *et al.*, 1986; Ma and Xiong, 2009) を参考に、一部修正を加えて行った

(Figure 2-7)。蕎麦または小麦アルブミン 10 mg に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) を 0.1 mg/mL とするよう HCl に溶解したペプシン溶液 (pH 2.0) を 1 mL 加えて 37°C で 2 時間インキュベートした。その後、4% (w/v) NaHCO<sub>3</sub> を 1 mL 加えて酵素反応を停止した。さらに、1 mg/mL とするよう 50 mM Tricine buffer (pH 8.0) に溶解したウシ膵臓由来トリプシン (208-13954, 富士フイルム和光純薬株式会社) を 1 mL 加え、37°C で 2, 4, 6 時間インキュベートした。酵素反応は 100°C で 5 分間煮沸することにより停止した。加水分解の程度は sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) にて評価した。SDS-PAGE には、各加水分解物 20 μL を等量の 2×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] と混合し 5 分間煮沸したものを供した。SDS-PAGE は Laemmli (1970) 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 10 μL と分子質量マーカー (03-064, テフコ株式会社, 東京) 5 μL 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 buffer [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。電気泳動後、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) Coomassie Brilliant Blue R-250, 5%

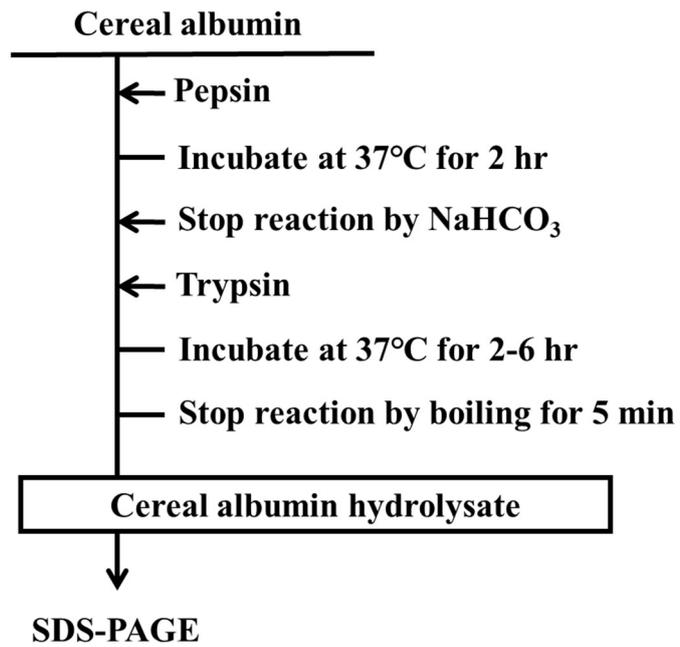


Figure 2-7 Hydrolysis of cereal albumin.

(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) 蕎麦アルブミン中の糖タンパク質の染色

電気泳動後、分画したタンパク質を polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (ProBlott, Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) に転写した。泳動後のゲルをブロッキング B 液 (25 mM Tris, 5%メタノール) に 5 分間浸漬させ、セミドライブロッキング装置 (モデル AE-6677, アトー株式会社, 東京) の陽極側からブロッキング A 液 (300 mM Tris, 5% メタノール) を染み込ませたろ紙 (3030-909, GE Health care) 2 枚、B 液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、1 cm<sup>2</sup> 当たり 2 mA の定電流で 40 分間転写を行った。転写後の膜は、TPBS (phosphate-buffered saline containing 0.05% Tween 20) で 10 分毎に 3 回洗浄し、0.05% (v/v) 過ヨウ素酸となるように TPBS に溶解した過ヨウ素酸溶液に浸漬させ、10 分間緩く攪拌した (Figure 2-8)。その後、PVDF 膜を TPBS で 10 分毎に 3 回洗浄し、25 µg/mL となるように、ビオチンヒドラジド ((+)-Biotin hydrazide, B7639, SIGMA-ALDRICH, USA) を dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解し、NaOH で 40 倍希釈したビオチンヒドラジド溶液に浸漬し、30 分間緩く攪拌した。攪拌後、PVDF 膜を TPBS で 10 分毎に 3 回洗浄し、HRP-ストレプトアビジン (HRP-conjugated streptavidin, フナコシ株式会社, 東京) を TPBS で 500

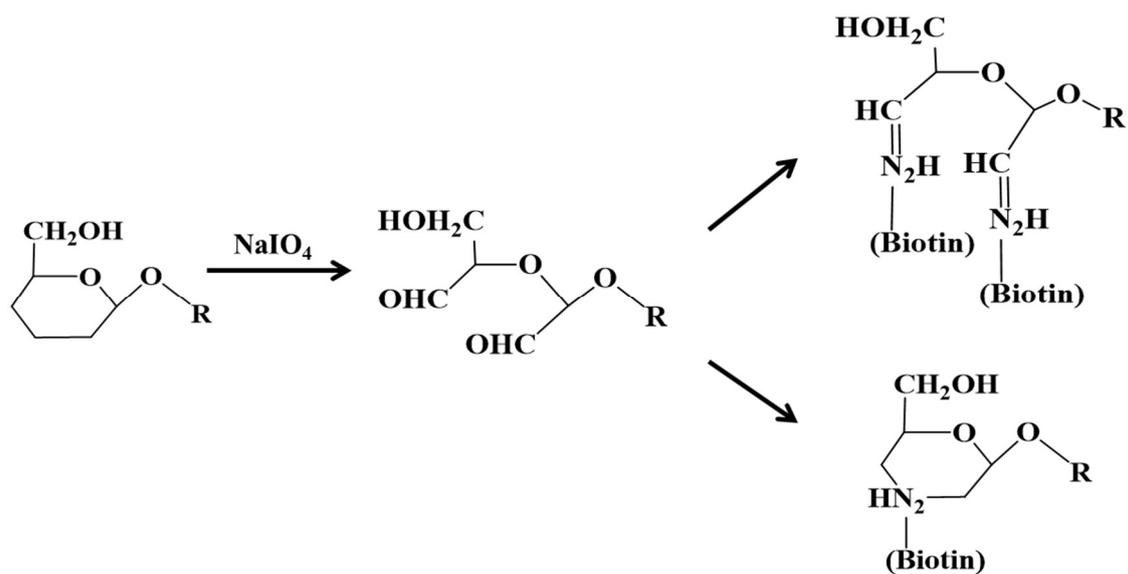


Figure 2-8 Principle of non-reducing sugar hexose oxidation by  $\text{NaIO}_4$ .

倍希釈した HRP 標識アビジン溶液に浸漬させ、15 分間緩く攪拌した。さらに、PVDF 膜を TPBS で 10 分毎 3 回洗浄し、ECL キット (Amersham™ ECL™ Western Blotting Analysis System, RPN2109, GE Healthcare, UK) を用いて化学発光させ gel imaging system (ChemiDoc MP, BioRad, Hercules, CA, USA) で検出した (Figure 2-9)。なお、HRP-ストレプトアビジンおよび ECL キットは使用直前に調製した。

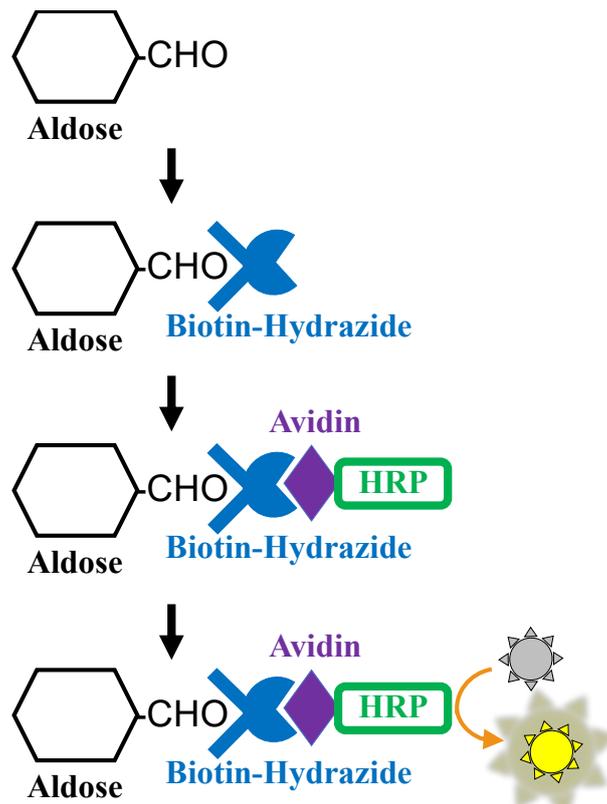


Figure 2-9 Method of saccharide chain detection.

### (3) 二次元電気泳動 (2D-PAGE)

二次元電気泳動は Westermeier ら (2011) の方法を一部修正して行った (Westermeier *et al.*, 2011)。蕎麦アルブミンまたは小麦アルブミンを immobilized pH gradient (IPG) strips (pH 3-10 non-linear) に流した。等電点電気泳動 (IEF) は、以下の条件で行った：一次元目では、175 V で 20 分間維持し、次にアルブミンを 175 V で 45 分間、2000V で 1 時間流した。IEF 後、ストリップゲルを SDS 平衡化 buffer (3 M Urea, 10%グリセロール, 1%SDS および 0.02%プロモフェノールブルーを含む 18.66 mM Tris pH 8.8) に溶解した 50 mM ジチオスレイトール (DTT) および SDS 平衡化 buffer に溶解した 50mM アクリルアミドに 15 分間浸漬した。次に、ストリップゲルを NuPAGE 4-12% Bis-Tris ZOOM ゲル、1.0 mm、IPG ウェル (NP0330BOX, Life Technologies Japan Ltd., 東京) に乗せ、XCell SureLockMini-Cell および SDS-PAGE を 200 V で 45 分間行った。電気泳動後、ゲルを 0.025% Coomassie Brilliant Blue R-250 溶液 (和光純薬工業, 大阪, 日本) で染色した。

## 2-2-3 水溶性高分子へのグルコース吸着挙動に関する検討

### 2-2-3-1 グルコース拡散実験

#### (1) 実験試料

CMC (C 4888)、グアーガム (G 4129)、およびキサントガム (G 1253) は Sigma-Aldrich (St. Louis, State of Missouri, USA) から入手し、水溶性高分子として使用した。米アルブミンは 2-2-1-1 (3) の方法で調製した。

## (2) グルコース拡散実験

グルコースの水溶性高分子（食物繊維や米アルブミンなど）への吸着を評価するための、グルコース拡散実験は、Inaら（2016）が米アルブミンの検討に用いた方法で行った（Ina *et al.*, 2016）。

Figure 2-10 は、本実験で使用された透析システムを示している。分子量 3,500 以下の分子のみ透過する Slide-A-Lyzer MINI 透析ユニット（Thermo Fisher Scientific）を使用した。50、100、あるいは 200 mmol/L のグルコースと 2 mg/mL の水溶性高分子を含む溶液（250  $\mu$ L）を透析ユニットの上部コンテナに添加し、2 mL の脱イオン水を下部チャンバーに充填した。37°C の振とう恒温槽（BT-300，ヤマトサイエンティフィック株式会社，東京，日本）で 100 cycle/min で振とうさせた。拡散モデルのパラメータの値は次のとおりである。

$$\text{透析膜面積 } A = 3.266 \times 10^{-5} \text{ m}^2$$

$$\text{透析膜厚み } L = 2.8 \times 10^{-5} \text{ m}$$

$$\text{上部チャンバーの溶液体積 } V_1 = 2.50 \times 10^{-7} \text{ m}^3$$

$$\text{下部チャンバーの溶液体積 } V_2 = 2.00 \times 10^{-6} \text{ m}^3$$

振とう後 30、60、90、120、および 150 分後に下部チャンバーから 20  $\mu$ L の透析液を採取し、グルコース CII テスト（和光純薬工業，大阪，日本）を使用してグルコース含有量を測定した。

### 2-2-3-2 グルコース吸着量の解析法

#### (1) グルコース拡散モデル

透析膜を介したグルコース拡散を説明するために本実験で構築したモデルを Figure 2-11 に示す。

モデルの前提条件は次のとおりである。

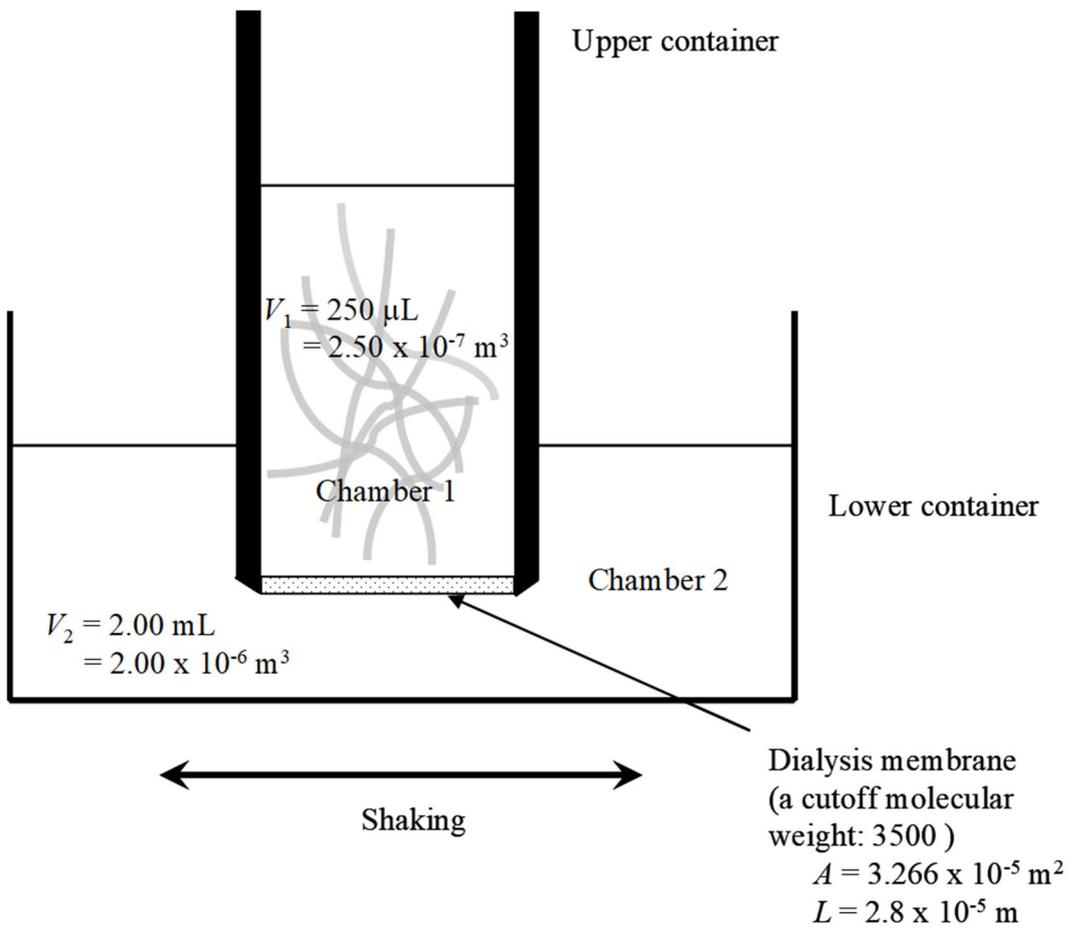
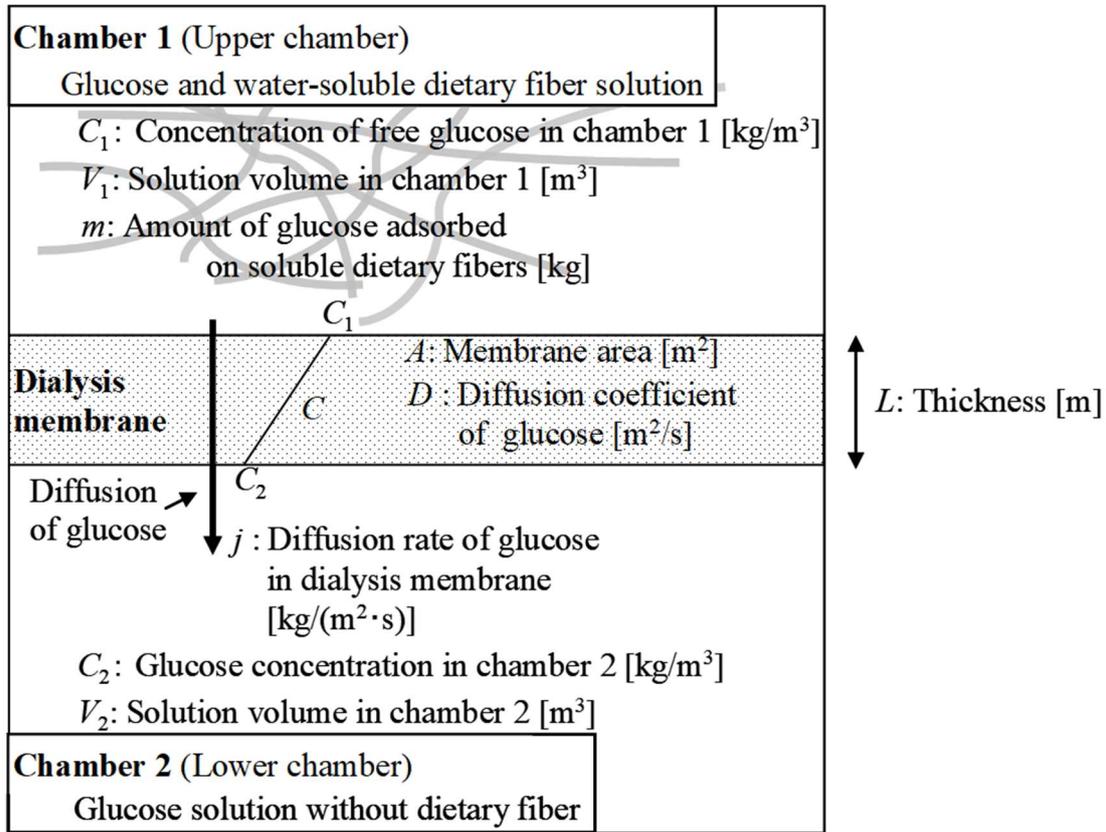


Figure 2-10 Schematic diagram of dialysis system.



$C$ : Glucose concentration in dialysis membrane

Figure 2-11 Model of glucose diffusion through a membrane.

$C$ : Glucose concentration in dialysis membrane [kg/m<sup>3</sup>]

$C_1$ : Concentration of free glucose in chamber 1 [kg/m<sup>3</sup>]

$C_2$ : Glucose concentration in chamber 2 [kg/m<sup>3</sup>]

$D$ : Diffusion coefficient of glucose in dialysis membrane [m<sup>2</sup>/s]

$j$ : Diffusion rate of glucose in dialysis membrane [kg/(m<sup>2</sup>·s)]

- i) チャンバー1（上部チャンバー）とチャンバー2（下部チャンバー）の溶液は、透析実験中に完全に混合される。つまり、グルコース濃度はチャンバー1 および 2 で均一である。
- ii) 透析膜中のグルコースの拡散係数  $D$  [ $\text{m}^2/\text{s}$ ]は、グルコース濃度や透析膜内の位置に関わらず一定である。
- iii) 透析膜は準定常状態で、濃度は膜内の拡散方向に沿って直線的に変化する。
- iv) 静水圧と浸透圧の差による透析膜中の水の透過流束は無視できる。
- v) 水溶性高分子に吸着されるグルコースの量  $m$  [ $\text{kg}$ ]は、透析実験中一定である。
- vi) パラメータ  $A$ 、 $L$ 、 $V_1$ 、および  $V_2$  の値は、透析実験中一定である。

グルコース吸着挙動の解析式は次のとおりである。

透析膜を通過するグルコースの拡散速度  $j$  [ $\text{kg}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ]は、準定常状態でのフィックの法則によって次のように記述される。

$$j = D \frac{C_1 - C_2}{L} \quad (1)$$

ここで、 $C_1$  [ $\text{kg}/\text{m}^3$ ]は上部チャンバーの遊離（水溶性高分子に結合していない）グルコース濃度、 $C_2$  [ $\text{kg}/\text{m}^3$ ]は下部チャンバーのグルコース濃度、 $D$  [ $\text{m}^2/\text{s}$ ]は上部チャンバーのグルコースの拡散係数、 $L$  [ $\text{m}$ ]は透析膜の厚さである。また、 $C_1$  と  $C_2$  は時間  $t$  の関数である。つまり、 $C_1 = C_1(t)$  および  $C_2 = C_2(t)$  である。下部チャンバーのグルコースの物質収支から、

$$j = \frac{V_2}{A} \frac{dC_2}{dt} \quad (2)$$

となる。ここで、 $A[\text{m}^2]$ は膜の面積である。システム内のグルコースの総量  $M_0[\text{kg}]$ は、

$$M_0 = C_1 V_1 + C_2 V_2 + m \quad (3)$$

となる。ここで、 $V_1$ は上部チャンバー $[\text{m}^3]$ の溶液量、 $V_2$ は下部チャンバー $[\text{m}^3]$ の溶液量である。

(1)、(2)、(3)式から、次の微分方程式が得られる。

$$\frac{dC_2}{dt} = -\frac{1}{T} \left( C_2 - \frac{M_0 - m}{V_1 + V_2} \right) \quad (4)$$

ここで、パラメータ  $T$ は、透析膜内の拡散プロセスの時定数であり、次の式で定義される。

$$T = \frac{V_1}{V_1 + V_2} \frac{LV_2}{DA} \quad (5)$$

微分方程式(4)は、次のように、 $t=0$ で初期条件  $C_2=0$ を用いて解くと、以下のようなになる。

$$C_2 = \frac{M_0 - m}{V_1 + V_2} (1 - e^{-t/T}) \quad (6)$$

となる。

## (2) 水溶性高分子無添加時の拡散係数 $D$ の評価

水溶性高分子無添加時の実験では、(6)式で  $m$ をゼロと見なせるので、以下の式が得られる。

$$x = x_0 e^{-t/T} \quad (7)$$

ここで、変数  $x$ と  $x_0$ は次のように定義される。

$$x = C_2 - \frac{M_0}{V_1 + V_2} \quad (8)$$

$$x_0 = -\frac{M_0}{V_1 + V_2} \quad (9)$$

(7) 式から、次の式が導かれる。

$$\log_e (x/x_0) = -t/T \quad (10)$$

水溶性高分子無添加時の透析実験から得られる  $\log_e (x/x_0)$  対  $t$  プロットの傾きは、 $-1/T$  である。上述のように求められた  $T$  の値を用いて  $D$  の値は、(5) 式から算出される。

### (3) 水溶性高分子存在下での吸着量 $m$ の算出

グルコース吸着量  $m$  は、拡散係数  $D$  の値を用い、水溶性高分子存在下での実験から得られた  $C_2$  対  $t$  プロットを (6) 式に回帰することによって算出した。

### (4) 水溶性高分子溶液の粘度

食物繊維の血糖値上昇抑制作用は、溶液粘度上昇によるという説がある (Dikeman and Fahey, 2006) ので、溶液粘度を cone-and-plate 型粘度計により測定した。粘度計としては、cone-and-plate 型粘度計 TVE-22 (東機産業株式会社, 東京, 日本) を、直径 48 mm、コーン角度  $1^\circ 34'$  のコーンを用いて使用した。コーンとプレートの間に各サンプル溶液を充填し、ローター速度は 0.5 から 50 rpm まで変化させた。粘度測定は  $37^\circ\text{C}$  で実施した。

## 2-2-4 統計解析

データは Mac 統計解析 ver.3.0 (エスミ株式会社, 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 未満を統計的に有意なものとした。

## 2-3 結果

### 2-3-1 蕎麦タンパク質の分画

Ikeda ら (1994) は、蕎麦粉から 0.9% (w/v) NaCl 溶液で抽出したタンパク質が哺乳類の  $\alpha$ -アミラーゼに対する阻害活性を有していることを報告している (Ikeda *et al.*, 1994)。そこで、蕎麦  $\alpha$ -AI を含むタンパク質を特定するため、蕎麦粉から水溶性のアルブミンおよび塩溶性のグロブリン画分を抽出し、 $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性を比較した。希酸・希アルカリ可溶性のグルテリンおよびアルコール可溶性のプロラミンは  $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性を測定する溶媒へ溶解しないため、 $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性を測定できないので抽出を行わなかった。蕎麦粉から pH 6.9 の緩衝液にて抽出したタンパク質を水に対して透析することで、抽出を行った。透析内液を遠心分離した際の上清を水溶性のアルブミン画分、沈殿物を塩溶性のグロブリン画分として回収した結果、アルブミン画分にはグロブリン画分よりも 16 倍多く  $\alpha$ -AI が含まれていた (Figure 2-12 および Table 2-1)。このことから、蕎麦タンパク質中の主な  $\alpha$ -AI はアルブミン中に含まれていることが明らかとなった。

### 2-3-2 穀物アルブミンの食後血糖値上昇抑制効果

#### (1) デンプン負荷試験 (OSTT) およびグルコース負荷試験 (OGTT)

蕎麦、小麦および米アルブミンのタンパク質純度を BCA 法により算出した結果、どのサンプルもタンパク質純度が 85% 以上だった。このサンプルを動物実験に用いた。デンプン負荷後の血糖値およびインスリン値に対する蕎麦および小麦アルブミンの影響を、健康ラットで検討した。蕎麦および小麦アルブミンを投与したラット

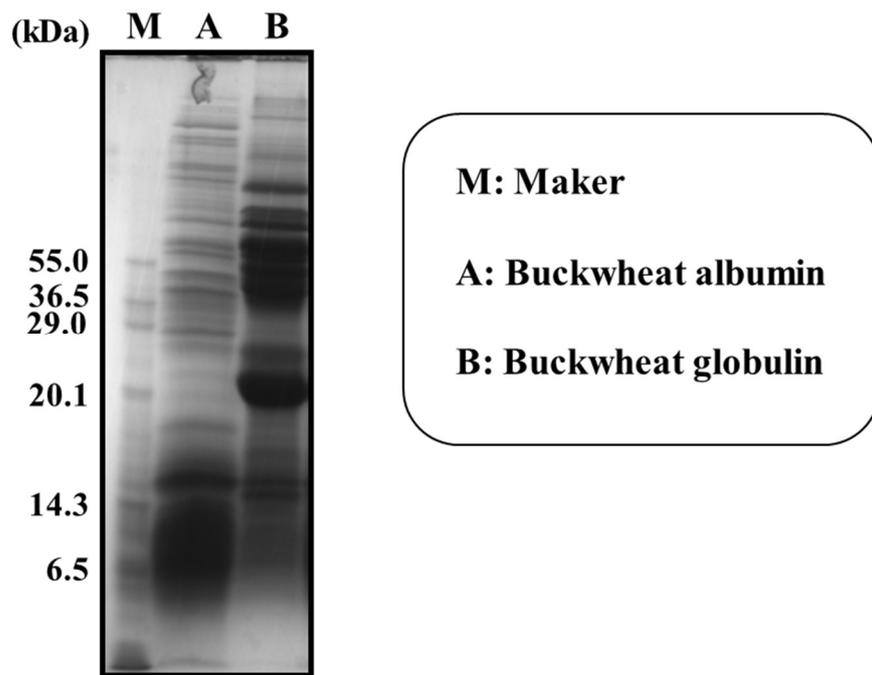


Figure 2-12 SDS-PAGE of buckwheat albumin and globulin.

Table 2-1  $\alpha$ -Amylase inhibitory activity of buckwheat albumin and globulin

| <b>Fraction</b> | <b>Inhibitory unit (IU)</b> |
|-----------------|-----------------------------|
| <b>Albumin</b>  | <b>42.74</b>                |
| <b>Globulin</b> | <b>2.62</b>                 |

**IU : One inhibitory unit was defined as the amount of inhibitor (mg) required for 50% inhibition of 1 unit of amylase.**

のデンプン負荷後 15 分での食後血糖値は、デンプンのみ投与した群と比較して、各々12%と 15%低かった (Figure 2-13AB)。曲線下面積は、有意差はなかったものの、蕎麦アルブミン投与群は、コントロール群よりも低くなった。デンプン負荷後の同時間で、蕎麦および小麦アルブミンを投与されたラットの食後血漿インスリン値は、デンプンのみ投与したラットよりも各々85%、70%と低かった (Figure 2-13CD)。曲線下面積も、蕎麦アルブミン投与群は、コントロール群よりも有意に低い値であった。グルコース負荷試験では、蕎麦および小麦アルブミンは食後血糖値の上昇 (Figure 2-14AB) あるいは血漿インスリン値の上昇 (Figure 2-14CD) を抑制しなかった。

## (2) $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性測定

様々な由来の  $\alpha$ -アミラーゼに対する蕎麦および小麦アルブミンの阻害活性を Figure 2-15 に示す。小麦アルブミンは、ヒト唾液 (99.5%)、ヒト膵臓 (99.3%)、ブタ膵臓 (99.4%) およびミールワーム (97.6%) 由来の  $\alpha$ -アミラーゼを強力に阻害した。一方、蕎麦アルブミンもブタ膵臓 (97.9%) およびミールワーム (93.2%) 由来の  $\alpha$ -アミラーゼを強く阻害したが、ヒト膵臓 (68.7%) からの  $\alpha$ -アミラーゼの阻害はやや弱く、ヒト唾液 (10.2%) 由来の  $\alpha$ -アミラーゼの阻害は非常に弱かった。

## (3) 蕎麦および小麦アルブミンによる $\alpha$ -アミラーゼ阻害の動力学的解析

小麦 (Figure 2-16A) および蕎麦 (Figure 2-16B) アルブミンの酵素反応速度を評価するために Lineweaver-Burk プロットを生成し

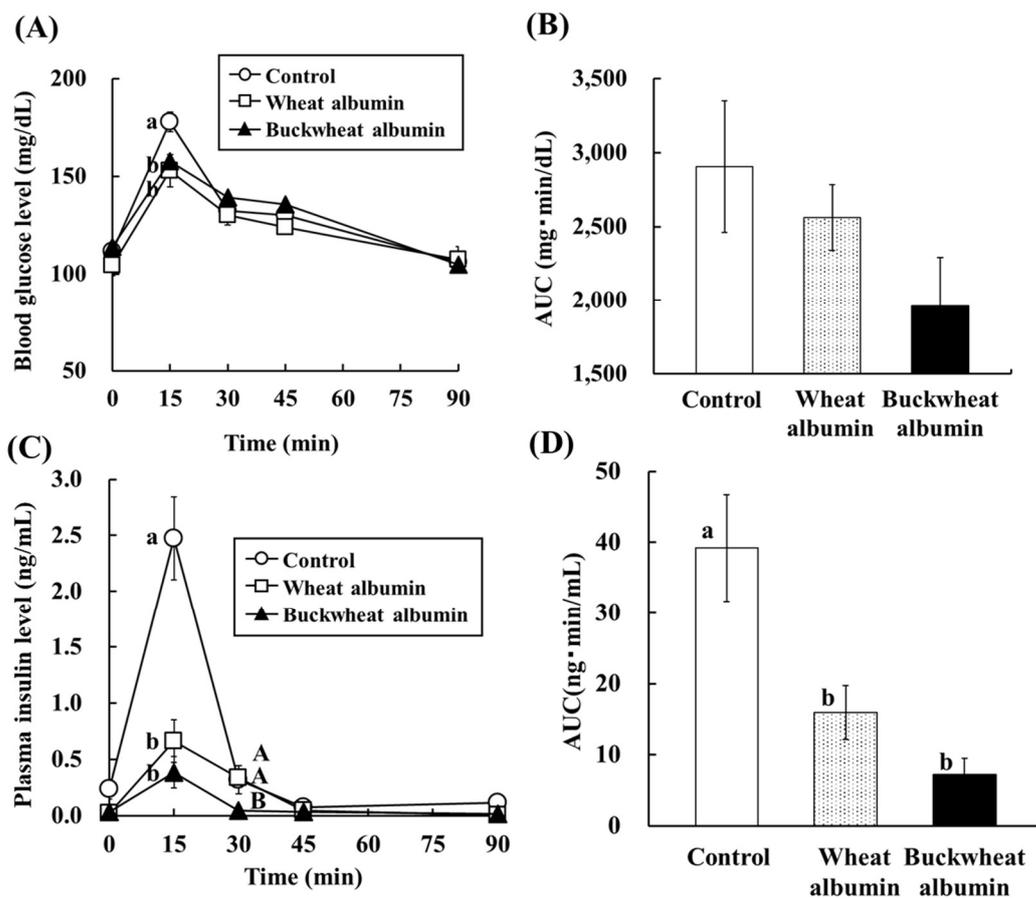


Figure 2-13 Effect of buckwheat albumin on blood glucose level (A), glucose AUC (B), plasma insulin level (C), and insulin AUC (D) after oral loading of starch in normal Wistar rats. Values with different letters are significantly different at  $p < 0.05$  vs. control group by Tukey-Kramer's test. Each value is the mean of 6-7 experiments with S.E. shown as a vertical bar.

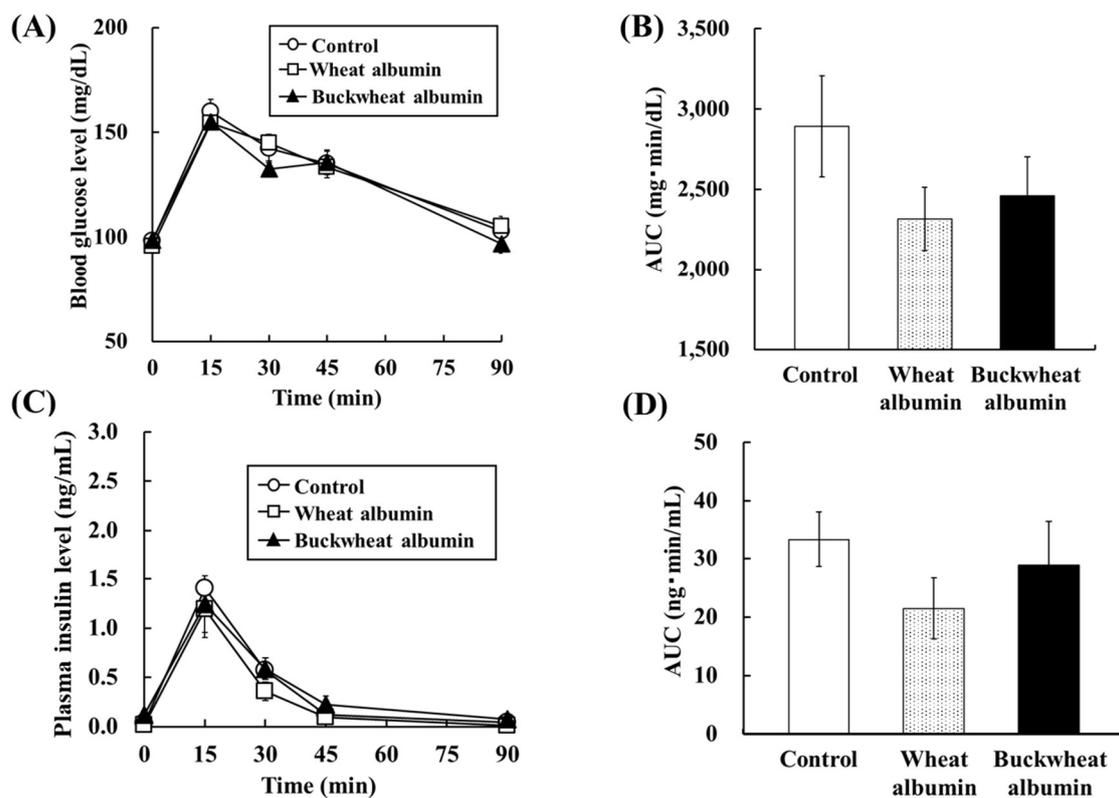


Figure 2-14 Effect of buckwheat albumin on blood glucose level (A), glucose AUC (B), plasma insulin level (C), and insulin AUC (D) after oral loading of glucose in normal Wistar rats. Values with different letters are significantly different at  $p < 0.05$  vs. control group by Tukey-Kramer's test. Each value is the mean of seven experiments with S.E. shown as a vertical bar.

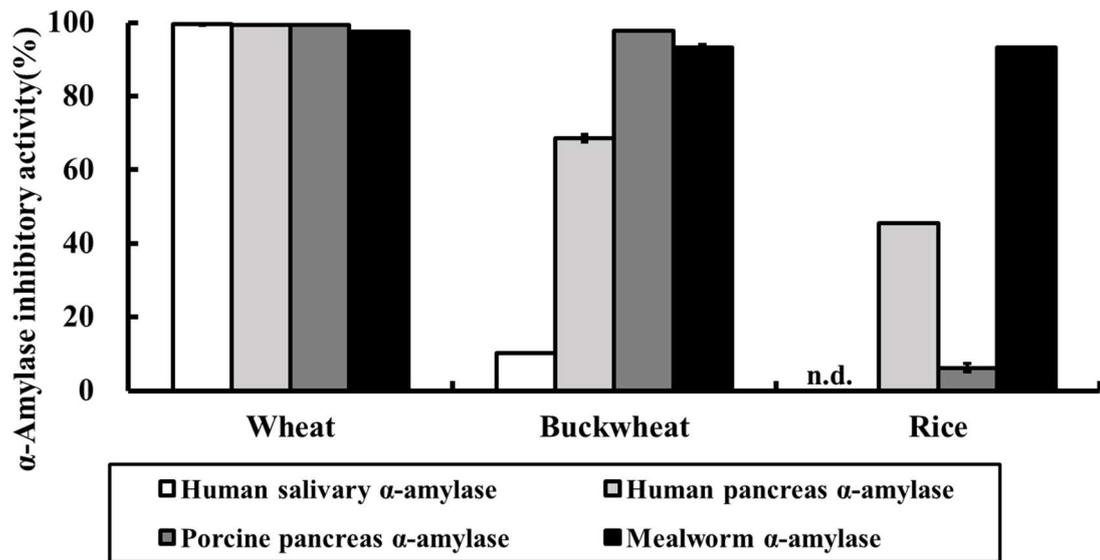


Figure 2-15  $\alpha$ -Amylase inhibitory activity of wheat, buckwheat, and rice albumins. Each value is the mean of three experiments with standard error (S.E.) shown as a vertical bar. n.d. : Not detected.

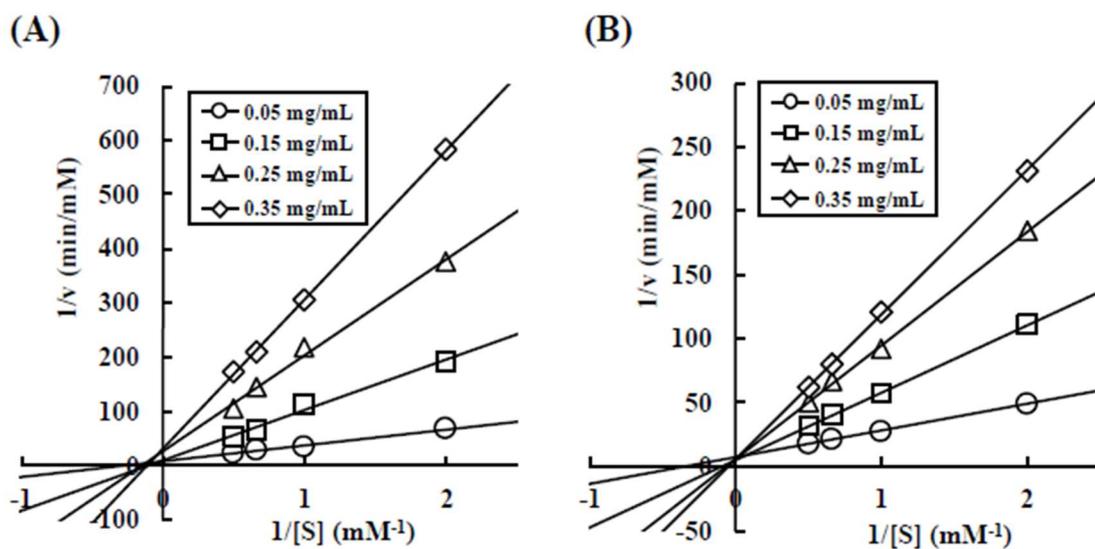


Figure 2-16 Kinetic analysis of the inhibitory activity against  $\alpha$ -amylase from porcine pancreas. (A) Wheat  $\alpha$ -AI; and (B) Buckwheat  $\alpha$ -AI.

た。小麦アルブミンのプロットは、横軸上で交差した。一方、蕎麦アルブミンのプロットは、縦軸上で交差した。

### 2-3-3 穀物アルブミンの特性の評価

(1) *In vitro* での蕎麦アルブミンの消化性および糖タンパク質の染色

蕎麦アルブミンの *in vitro* での消化性は、ペプシンおよびトリプシンによる連続消化にて評価した。14 kDa の小麦タンパク質は高い消化耐性を示したが (Figure 2-17)、蕎麦タンパク質はほとんど 6.5 kDa 未満のペプチドに加水分解され、蕎麦アルブミンには消化酵素による耐性が認められなかった。

高分子 (> 29 kDa) の蕎麦アルブミンの糖タンパク質は染色試薬により検出された。一方、ネガティブコントロールとして使用したウシ血清アルブミン (BSA) では糖タンパク質はほとんど検出されなかった (Figure 2-17)。

(2) 蕎麦、小麦および米アルブミン  $\alpha$ -AI の比較

蕎麦アルブミンの二次元電気泳動は、*pI* 4.1–4.8 の範囲に、10–17 kDa の 4 つのスポットが認められた (Figure 2-18)。一方、小麦および米アルブミンのスポットは、それぞれ *pI* 4.5–5.7、*pI* 5.5–7.2 であった。

### 2-3-4 水溶性高分子へのグルコースの吸着挙動の解析

(1) 透析膜中でのグルコースの拡散係数  $D$  の算出

Figure 2-19(A)に、水溶性高分子無添加時の下部チャンバー ( $C_2$ ) のグルコース濃度の時間経過を示す。 $C_2$  の値は時間  $t$  と共に増加し

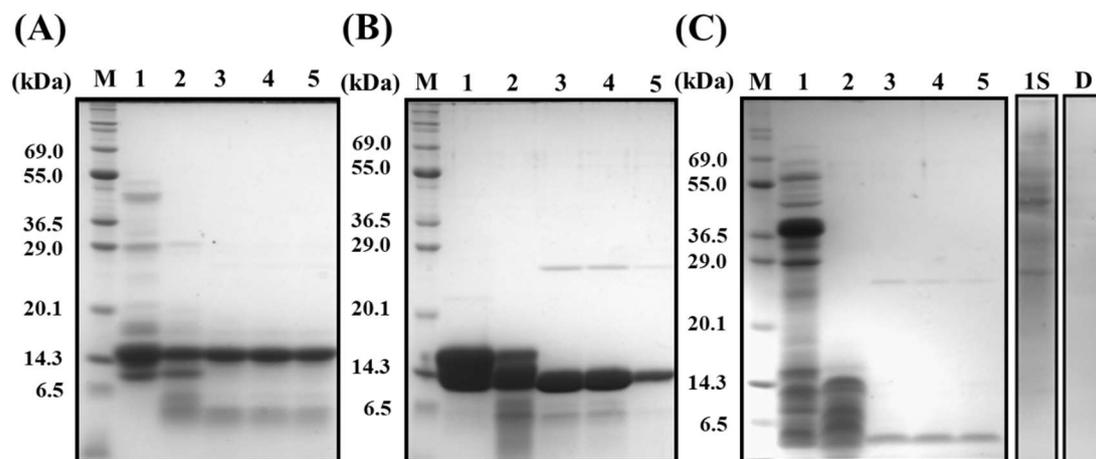


Figure 2-17 SDS-PAGE of wheat and buckwheat albumins before and after treatment with digestive enzymes and glycoprotein staining. (A) Wheat albumin; (B) rice albumin; (C) Buckwheat albumin. (M) Marker; (1) Undigested; (2) Digested by pepsin for 2 h; (3) Digested by pepsin for 2 h followed by digestion with trypsin for 2 h; (4) Digested by pepsin for 2 h followed by digestion with trypsin for 4 h; and, (5) Digested by pepsin for 2 h followed by digestion with trypsin for 6 h; (1S) Undigested and stained with glycoprotein-staining reagent; (D) Bovine serum albumin stained with glycoprotein-staining reagent.

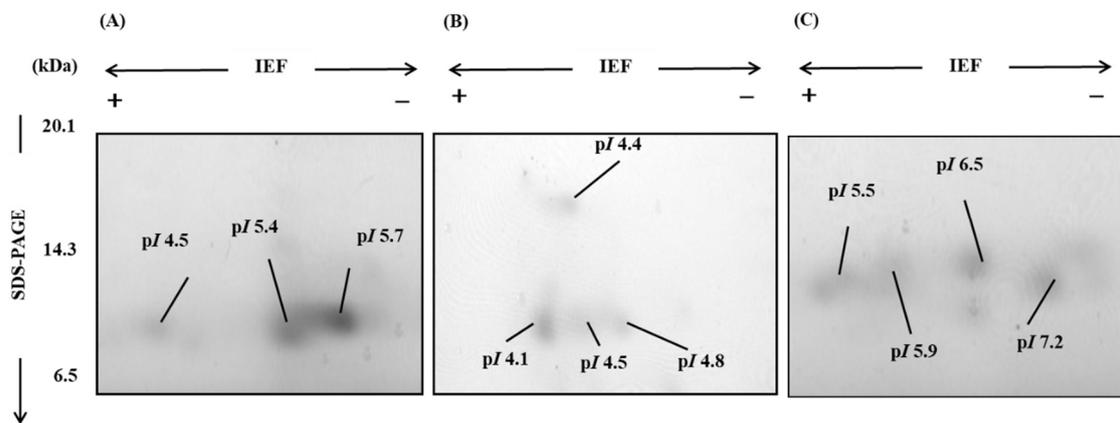


Figure 2-18 Two-dimensional-electrophoresis of (A) wheat-albumin  $\alpha$ -AI, (B) buckwheat-albumin  $\alpha$ -AI, and (C) rice-albumin  $\alpha$ -AI.

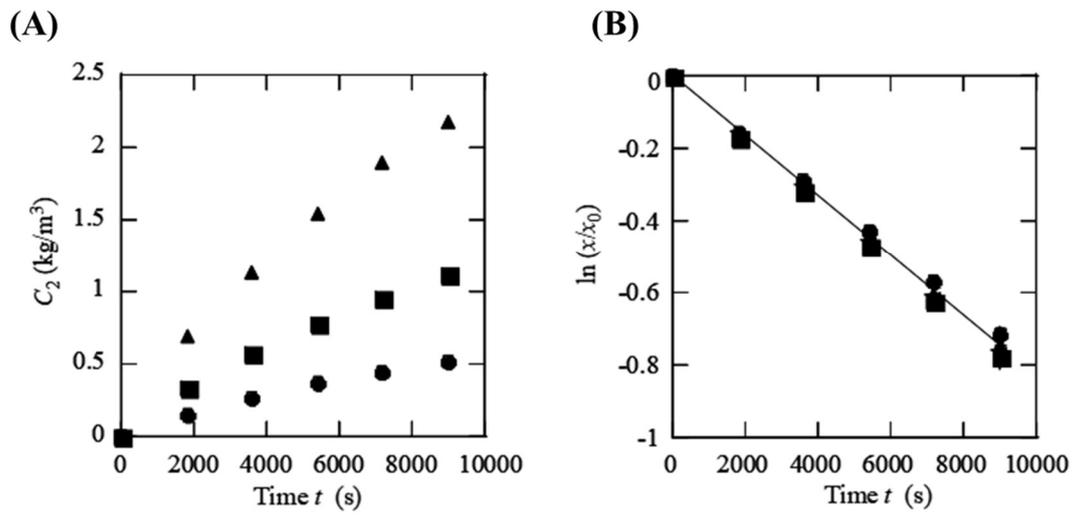


Figure 2-19 Evaluation of coefficient of glucose diffusion through dialysis membrane ( $D$ ) using experimental data. (A) The time course of the glucose concentration in the lower chamber  $C_2$  (B) Plots for evaluating  $D$  Initial glucose concentration in the upper chamber: ●, 50 mM; ■, 100 mM; ▲, 200 mM

た。  $x$  と  $x_0$  の値は、 Figure 2-19 (A) のデータを使用し、 (8) および (9) 式から算出した。 Figure 2-19 (A) に示した 3 つの実験の  $\log_e (x/x_0)$  対  $t$  のプロットを Figure 2-19 (B) に示す。すべてのプロットは、原点を通る一本の直線となった。傾きの逆数から、(10) 式の  $T$  の値は、  $1.15 \times 10^4$  秒となった。この  $T$  の値を用いて、(5) 式から、透析膜中のグルコースの拡散係数  $D$  の値は、  $1.66 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$  と算出された。

Figure 2-19 に示す実験では、容器上部の液面の変化は観察されなかった。しかし、  $300 \text{ mM}$  ( $54 \text{ kg/m}^3$ ) 以上のグルコース濃度の場合、おそらく浸透圧のため液面上昇が観察された。(データは示していない)。したがって、このモデルは、初期のグルコース濃度が  $300 \text{ mM}$  の以上の場合には適用できないことが確認された。

## (2) 水溶性高分子へのグルコース吸着量 $m$ の算出

Figure 2-20 に、食物繊維存在下における透析実験中の時間経過による  $C_2$  の変化を示す。コントロールとして、水溶性高分子無添加時の  $C_2$  対  $t$  プロット (Figure 2-19 (A)) も示している。水溶性高分子存在下での  $C_2$  の値は、水溶性高分子無添加時の値よりも低かった。したがって、水溶性食物繊維は、Ina ら (2016) が報告しているように、透析膜を介したグルコース拡散を遅延させることが示された (Ina *et al.*, 2016)。同一時刻  $t$  における  $C_2$  の値は、キサントガム > グアーガム > CMC > 米アルブミンの順に減少した。

Figure 2-20 中の実線の曲線は、データを (6) 式に回帰することにより算出された (Figure 2-19 (B) から得られた  $D=1.6 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$  を使用)。すべての実験データは (6) 式で良好に回帰された (相関係数の値は 0.999 以上)。このことから、本研究で構築されたモデルは、

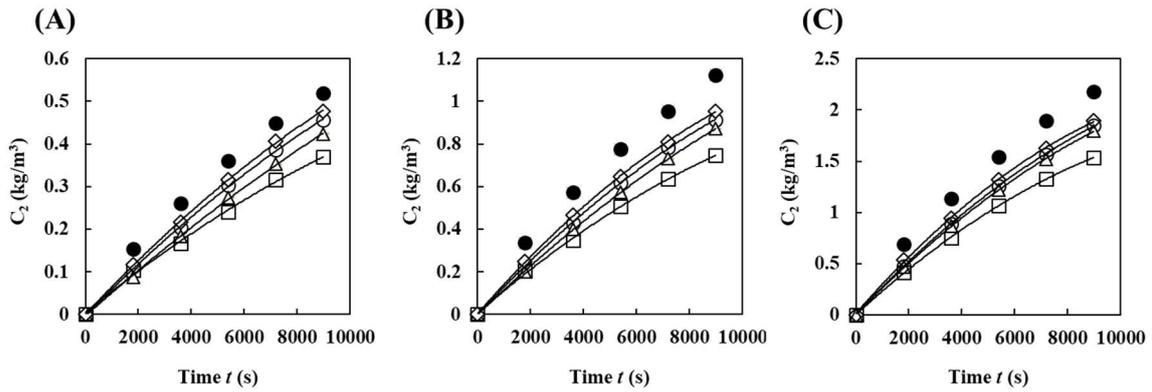


Figure 2-20 Effects of various sources of dietary fibres on glucose diffusion rate. Initial glucose concentration in the upper chamber: (A) 50 mM, (B) 100 mM, (C) 200 mM. ●, Control; ○, CMC; □, Xanthan gum; △, Guar gum; ◇, Rice albumin. Concentration of dietary fibre in the upper chamber: 2 mg/mL. The solid curves: The best-fit computations from Eq. (6) using  $D$  obtained from Figure 2-16.

Figure 2-20 に示す透析膜を介したグルコース拡散速度を良好に記述することが確認された。

水溶性食物繊維に吸着したグルコース量  $m$  [kg] は、Figure 2-20 のデータを (6) 式に当てはめることにより算出した。 $m$  の値から、単位質量あたりの食物繊維に吸着されたグルコースの量 [kg/kg-solid] (GAC) が算出された。Figure 2-21 は、37°C での CMC、グアーガム、キサントランガムおよび米アルブミンのグルコース吸着等温線を示している。グルコース濃度の増加に伴い、グルコースの吸着量はほぼ直線的に増加した。吸着したグルコース量は、同じグルコース濃度でキサントランガム > グアーガム > CMC > 米アルブミンの順に大きい傾向がみられた。

### (3) 水溶性高分子溶液の粘度

Figure 2-22 は、キサントランガムおよびグアーガムの 2 mg/mL の濃度での流動特性 (粘度 vs. せん断速度のプロット) を示す。キサントランガムとグアーガムでは、ずり流動化 (せん断速度の増加に伴う粘度の低下) が観察された。水溶性食物繊維溶液の粘度は、添加するグルコース濃度の影響を受けなかった。2 mg/mL の濃度での CMC の粘度は、使用した cone-and-plate 粘度計で測定するには小さすぎたが、文献 (Kumagai *et al.*, 2009) によると、 $\sim 10^0$  mPa $\cdot$ s であった。Kumagai ら (2009) は、CMC 溶液が 2% (w/w) の濃度以下でニュートン流体に近い挙動を示すことを報告している (Kumagai *et al.*, 2009)。

Figure 2-23 にグルコースの吸着量と水溶性食物繊維の粘度の関係を示す。Figure 2-23 では、CMC 溶液の粘度を 1 mPa $\cdot$ s とした。吸着されたグルコース量と溶液粘度との間に相関関係は認められなか

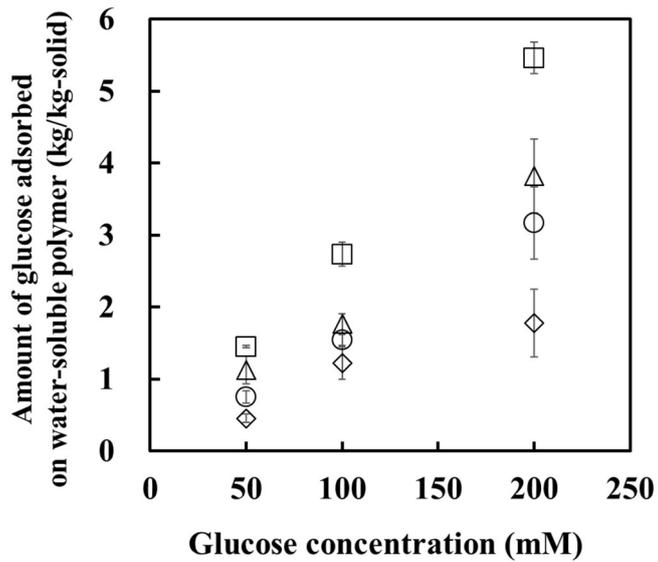


Figure 2-21 Glucose adsorption isotherms of water-soluble dietary fibres. Temperature: 37°C. Concentration of dietary fibre: 2 mg/mL. ○, CMC; □, Xanthan gum; △, Guar gum; ◇, Rice albumin. Each value is the mean of three experiments with S.D. shown as a vertical bar.

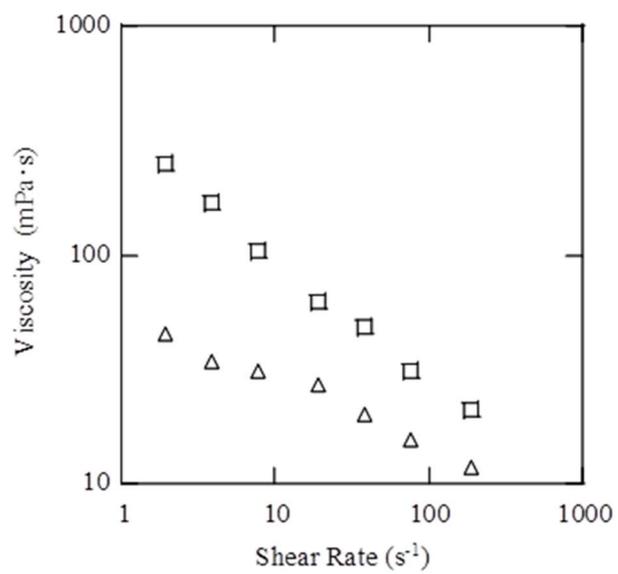


Figure 2-22 Shear-rate dependence of viscosity of dietary-fibre solutions at 37°C.  $\square$ , Xanthan gum;  $\triangle$ , Guar gum. Concentration of dietary fibre: 2 mg/mL.

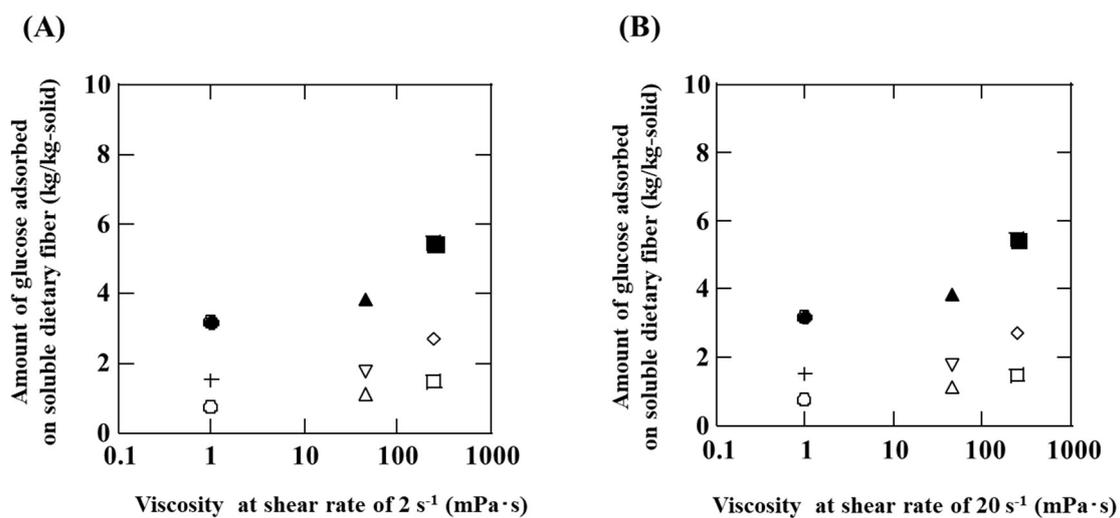


Figure 2-23 Relationship between amount of glucose adsorbed onto water-soluble dietary fibre and viscosity at shear rates of (A) 2 s<sup>-1</sup> and (B) 20 s<sup>-1</sup>. CMC: ○, 50 mM glucose; +, 100 mM glucose; ●, 200 mM glucose. Xanthan gum: □, 50 mM glucose; ◇, 100 mM glucose; ■, 200 mM glucose. Guar gum: △, 50 mM glucose; ▽, 100 mM glucose; ▲, 200 mM glucose.

った。

#### (4) グルコースの拡散シミュレーション

透析膜を用いた拡散実験における緩和過程（平衡状態に達する過程）の状況を明瞭にするために、構築した拡散モデルを用いて、初期グルコース濃度 100 mM ( $18 \text{ kg/m}^3$ ) での拡散実験のシミュレーションを行った。結果を Figure 2-24 および Figure 2-25 に示す。上部チャンバーと下部チャンバーの間の拡散は、約  $5 \sim 6 \times 10^4$  秒（約 14 ~ 17 時間）で平衡に達した。Figure 2-24 では、食物繊維存在下での  $C_1$  と  $C_2$  は、同時に  $t$  でコントロール溶液よりも低くなっている。平衡状態の  $C_1$  の値は、初期値の約 10 分の 1 に減少した。

膜を通過する拡散の推進力 ( $C_1 - C_2$ ) と膜を通過するグルコース流束を Figure 2-25 に示す。平衡状態では、 $C_1 - C_2$  がゼロになり、 $j$  がゼロになる。食物繊維存在下での  $C_1 - C_2$  の値は、 $t$  のコントロール溶液の値よりも低くなった。

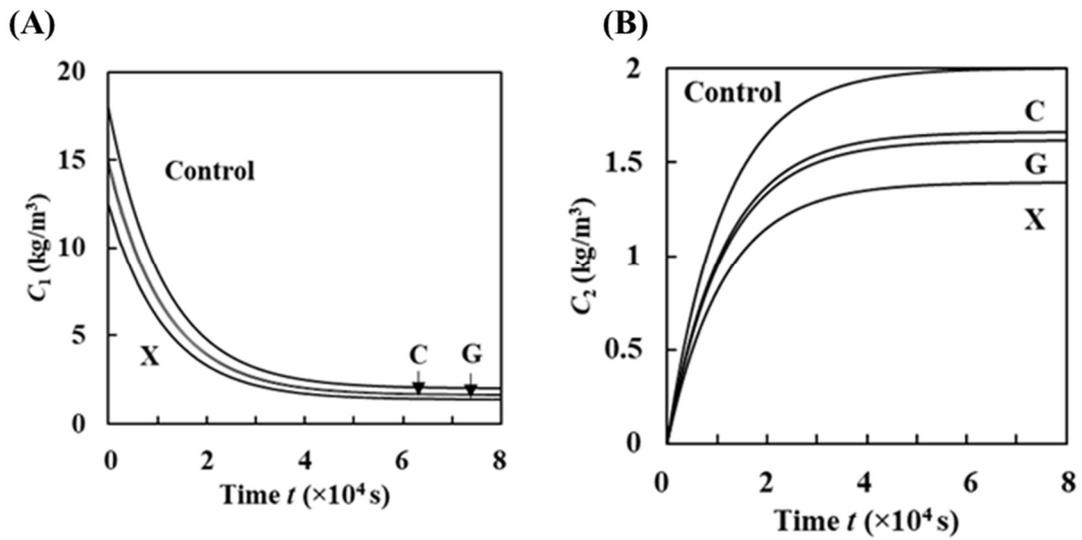


Figure 2-24 Simulation of time course of (A)  $C_1$  and (B)  $C_2$  during diffusion experiment. C, CMC; G, Guar gum; X, Xanthan gum; Control, without dietary fibre. Temperature:  $37^\circ\text{C}$ . Concentration of dietary fibre:  $2 \text{ mg/mL}$ . Initial glucose concentration in the upper chamber:  $100 \text{ mM}$  ( $18 \text{ kg/m}^3$ ). Eqs. (3) and (6) were used for Figure 2-23 (A), and Eq. (6) for Figure 2-23 (B).

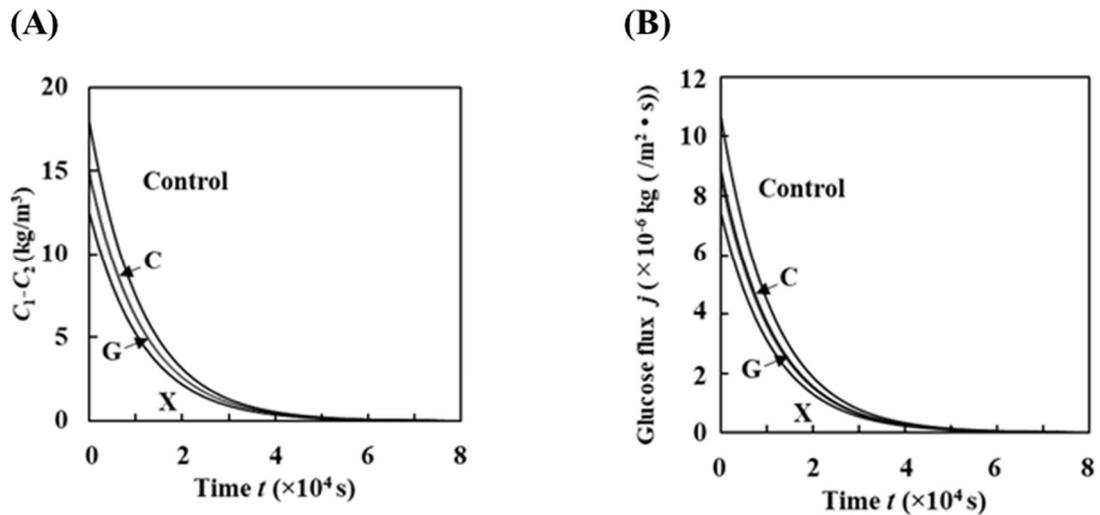


Figure 2-25 Simulation of time course of  $C_1 - C_2$  and  $j$  during diffusion experiment. C, CMC; G, Guar gum; X, Xanthan gum; Control, without dietary fibre. Concentration of dietary fibre: 2 mg/mL. Temperature: 37°C. Initial glucose concentration in the upper chamber: 100 mM ( $18 \text{ kg/m}^3$ ). Eqs. (3) and (6) were used for Figure 2-24 (A), and Eqs. (2) and (6) for Figure 2-24 (B).

## 2-4 考察

### 2-4-1 穀物アルブミンの食後血糖値上昇抑制効果

本章では、蕎麦アルブミンが健常ラットの食後血糖上昇を抑制することを示した。小麦アルブミンは、昆虫および哺乳類両方の  $\alpha$ -アミラーゼを阻害すること (Silano *et al.*, 1973; O'Donnell *et al.*, 1976; Petrucci *et al.*, 1976; Oneda *et al.*, 2004) および血糖値上昇抑制効果を有すること (Puls and Keup, 1973; Koike *et al.*, 1995; Lankisch *et al.*, 1998) が既に報告されている。本章では、蕎麦アルブミンの  $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性と食後の血糖値上昇に対する抑制効果を小麦および米アルブミンと比較した。

OSTT では、蕎麦アルブミンは、小麦および米アルブミンと同様に食後の血糖値および血漿インスリン値の上昇を抑制したが (Figure 2-13)、OGTT では、蕎麦および小麦アルブミンのどちら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なかった (Figure 2-14)。小麦アルブミンの結果は、Puls and Keup (1973) の結果と同様であった (Puls and Keup, 1973)。米アルブミンは OSTT と OGTT の両方で食後の血糖値上昇を抑制することが報告されている (Ina *et al.*, 2016)。

この血糖値上昇メカニズムを検討するために蕎麦、小麦および米アルブミン  $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性を比較した。様々な穀物には  $\alpha$ -AI が含まれており、哺乳類由来のアミラーゼを阻害するものもあれば、ミールワーム由来のアミラーゼのみを阻害するものもある。Figure 2-15 に示すように、小麦アルブミンは、ヒト唾液、ヒト膵臓、ブタ膵臓、およびミールワーム由来の  $\alpha$ -アミラーゼを阻害した。米アルブミンは、ミールワーム由来の  $\alpha$ -アミラーゼを阻害するが、ヒト唾液、ヒト膵臓、およびブタ膵臓由来の  $\alpha$ -アミラーゼは阻

害しないことが報告されている (Ina *et al.*, 2016)。大麦 (Weselake *et al.*, 1983a)、ライ麦 (Granum, 1978; Iulek *et al.*, 2000)、トウモロコシ (Blanco-Labra, 1981) およびインゲンマメ (Marshall *et al.*, 1975) の  $\alpha$ -AI も、ミールワームの  $\alpha$ -アミラーゼを阻害すると報告されている。一方、蕎麦アルブミンは、ヒト膵臓、ブタ膵臓およびミールワーム由来の  $\alpha$ -アミラーゼを阻害したが、ヒト唾液の  $\alpha$ -アミラーゼは阻害しなかった (Figure 2-15)。これは、Buonocore and Poerio (1975)、Feng ら (1991)、および Ikeda and Kishida (1993) の結果と同様であった (Buonocore and Poerio, 1975; Feng *et al.*, 1991; Ikeda and Kishida, 1993)。この結果は、ヒト唾液および膵臓からの  $\alpha$ -アミラーゼの基質認識のメカニズムが異なり、蕎麦および小麦  $\alpha$ -AI の構造が同一ではないことを意味している。

小麦および蕎麦  $\alpha$ -AI の酵素阻害メカニズムを調査するため、Lineweaver-Burk プロットを作成した。Figure 2-16 において、小麦  $\alpha$ -AI の Lineweaver-Burk プロットは、横軸上で交差しており、以前に報告されているように、小麦  $\alpha$ -AI がブタ膵臓からの  $\alpha$ -アミラーゼを非競合的に阻害することを示している (O'Connor *et al.*, 1981)。一方、蕎麦  $\alpha$ -AI のプロットは、縦軸上で交差しており、蕎麦  $\alpha$ -AI が  $\alpha$ -アミラーゼを競合的に阻害することを示している。一般的に、糖は  $\alpha$ -アミラーゼの活性部位に適合し、ペプチドは基質として認識される可能性が低いため、蕎麦  $\alpha$ -AI から生成された糖ペプチドが競合阻害剤になっている可能性が考えられる。一部の研究者は、植物から得られた糖タンパク質が  $\alpha$ -アミラーゼを競合的に阻害することを報告した (Maskos *et al.*, 1996; Gibbs and Alli, 1998; Gadge *et al.*, 2015)。さらに、29 kDa 以上の糖タンパク質が未消化の蕎麦アルブミンで検出された (Figure 2-17)。蕎麦アルブミン調製中

に遊離の糖が除去され、蕎麦アルブミンのほとんどが 6.5 kDa 未満のペプチドに加水分解されたことを考慮すると、蕎麦アルブミン中に存在する糖タンパク質から消化酵素による加水分解によって生成された糖ペプチドが  $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性を示した可能性が考えられる。また、蕎麦アルブミンの  $\alpha$ -AI の二次元電気泳動パターンは小麦アルブミンの  $\alpha$ -AI とは異なり (Figure 3-11)、蕎麦  $\alpha$ -AI の  $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性を有するアミノ酸配列が小麦アルブミンの  $\alpha$ -AI と異なることを示している (Baker, 1988; Feng *et al.*, 1996)。したがって、蕎麦および小麦  $\alpha$ -AI のアミラーゼ阻害活性のメカニズムは互いに異なるため、これらは構造と分子量の異なるタンパク質だと推察される。

蕎麦アルブミンは Figure 2-15 に示すように、デンプン負荷後の食後血糖値上昇抑制効果は、*in vitro* で哺乳類由来の  $\alpha$ -アミラーゼを阻害したため、小麦アルブミンのメカニズムと同様に、デンプンから還元糖への加水分解を阻害したことに起因することが示唆された。米アルブミンのグルコース負荷後の食後血糖値上昇抑制効果については、米アルブミンは哺乳類由来の  $\alpha$ -アミラーゼを阻害せず、消化酵素によって加水分解もされないため、小腸でグルコース分子を吸着する食物繊維様の作用によるものだと考えられる (Ina *et al.*, 2016)。そこで、米アルブミンの食後血糖値上昇抑制メカニズムを検討するため、透析膜を用いたグルコース拡散実験を行った。

#### 2-4-2 水溶性高分子へのグルコース吸着挙動の解析

Ina ら (2016) は、Ou ら (2001) の方法を修正した透析膜を用いた拡散実験により、米アルブミンとグルコースの相互作用を評価した (Ina *et al.*, 2016)。Ou ら (2001) は、分子量 12000 で分画する透

析バッグを使用し、200 mL の脱イオン水に対して 25 mL のグルコースと水溶性高分子の混合物を透析した。最大拡散速度は、コントロール > CMC > グアーガム > キサンタンガムの順で減少した (Ou *et al.*, 2001)。本研究では Ina ら (2016) と同様に、分画分子量が 3500 の透析ユニットを使用して透析実験を行い、上部チャンバー内にグルコースと水溶性高分子の混合物 250  $\mu$ L を入れ、下部チャンバーに 2 mL の脱イオン水を加え、水に対して振とうしながら透析した。本実験の拡散システムでは、溶液量が少なく、振とうの影響により、2 つのチャンバーでグルコース濃度が均一になると予想される (Ina *et al.*, 2016)。このような実験条件下でも、Figure 2-19 に示すように、コントロールと水溶性高分子を含む溶液の間に  $C_2$  の違いが観察された。 $C_2$  の値は、Ou ら (2001) によって報告された傾向と同様にキサンタンガム > グアーガム > CMC の順に減少した (Ou *et al.*, 2001)。以前の研究では、米アルブミン、CMC、またはグアーガムを含む溶液はコントロールと比較しグルコース濃度  $C_2$  に有意差 ( $p < 0.05$ ) が観察され、 $C_2$  は Ou ら (2001) によって報告された傾向と同様にコントロール > CMC > 米アルブミン > グアーガムの順に減少した (Ou *et al.*, 2001)。本実験では、透析膜を通過する拡散速度を、輸送現象に基づく拡散モデルを使用してさらに定量的に解析した。

Figure 2-19 では、透析膜におけるグルコースの拡散係数  $D$  の値は  $1.66 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$  と算出された。水中のグルコースの拡散係数は約  $7 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$  (Suhaimi and Das, 2016) で、Suhaimi ら (2015) は、27–30°C で膜を通過するグルコースの拡散係数の値が  $10^{-11} \sim 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$  であることを報告した (Suhaimi *et al.*, 2015)。透析膜におけるグルコースの拡散係数の値は、膜の細孔サイズに依存する。本実験

では、分画分子量が 3500 の透析膜を使用し、 $D = 1.66 \times 10^{-11} \text{ m}^2$  の評価値は妥当であると考えられる。

本実験で構築されたモデルでは、静水圧と浸透圧の差による透析膜を通る水の浸透流束は無視されている。Figure 2-10 および Figure 2-11 に示す実験では、Figure 2-19 および Figure 2-20 に示すように、上部チャンバー内の液面の変化は観察されなかった。したがって、静水圧および浸透圧の差による透析膜を通る水の透過流束は無視できることが確認された。

一般に透析膜を用いた実験では、溶液中の高分子による膜の目詰まり、透析膜表面でのゲル分極が起こりうる。しかし、本研究の実験系において、拡散実験中に目詰まりやゲル分極が進行すれば、拡散係数  $D$  は見かけ上低下し、その結果グルコース吸着量も変化するはずである。Figure 2-19、Figure 2-21 に示すように一定の拡散係数  $D$  の値を用いて求められたグルコース吸着量  $m$  は拡散実験中一定である（回帰の良好さがそれを示している）。本研究で用いた膜の分画分子量は 3,500 であるので、おそらく食物繊維は透析膜中の細孔にほとんど入らなかったと推察される。また、用いた食物繊維は水溶性であり、使用濃度が 2 mg/mL と低濃度なので、膜表面でのゲル分極も起こらなかったと考えられる。

(5) 式の時定数  $T$  は、拡散が平衡状態に達するまでの緩和時間と見なすことができる。(6) 式によると、 $t = 0$  から平衡状態 ( $t \rightarrow \infty$ ) への  $C_2$  の変化は、 $T$  の経過後に 63%、 $3T$  後に 95%、 $5T$  後に 99%であった。 $T \approx 1.15 \times 10^4$  秒（約 3.2 時間）であるため、拡散プロセスは  $5 \times 10^5$  秒（約 14 時間）後に平衡に達すると見なされた。この結果は、Figure 2-24 および Figure 2-25 に示すシミュレーション結果と矛盾しない。Oura (2001) は拡散が平衡に達したと仮定し

て、37°Cで6時間攪拌した後、水溶性高分子に結合したグルコース量を測定した。しかし、我々の計算によれば、Ouraの実験では6時間で平衡状態に達していない可能性が考えられる。

我々が構築したモデルでは、各実験中に透析膜でも準定常状態になると想定されるため、この仮定を検証した。厚さ  $L$  [m]の平板内の拡散過程は、無次元時間  $Dt/(L/2)^2$  が2以上、つまり  $t > L^2/(2D)$  になると、平衡状態または定常状態になる (Gurney and Lurie, 1923)。本実験では、 $L^2/(2D)$ の値は  $(2.8 \times 10^{-5})^2 / \{2 \times (1.66 \times 10^{-11})\} = 24$  秒であった。したがって、膜の両側の溶液のグルコース濃度が一定の場合、膜の濃度分布は約1分で定常状態に達すると推察される。拡散実験は Figure 2-19 および Figure 2-20 に示すように数時間程度のため、各実験の間に透析膜中では準定常状態となり、濃度は膜内の拡散の方向に沿って直線的に変化すると考えられる。

Figure 2-19 (B)では、Figure 2-19 (A)の3つの実験の  $\log_e (x/x_0)$  対  $t$  のプロットは、原点を通る一本の直線である。これは、膜内の拡散が定常状態でフィックの法則に従うこと、および  $D$  の値が本実験で選択されたグルコース濃度の範囲で一定であることを示している (Bird *et al.*, 1960)。

Figure 2-20 では、 $C_2$  の値は 9000 秒まで増加した。Figure 2-24 に示すように、上部チャンバーの  $C_1$  の値は、9000 秒で初期の  $C_1$  値の約3分の1になった。Figure 2-21 から、グルコース濃度の増加に伴い、グルコースの吸着量はほぼ直線的に増加した。本実験で使用した水溶性高分子へのグルコースの吸着が可逆的であるなら、Figure 2-20 に示す実験中に、グルコースの吸着量は徐々に減少するであろう。本実験では  $V_2/V_1 = 8$  であるため、 $C_1$  の値は平衡状態の初期  $C_1$  の約9分の1になり、水溶性高分子に結合するグルコースの量は脱

着によって初期値の 9 分の 1 に減少する。もしそうであるなら、 $C_2$  対  $t$  のプロットは (6) 式では記述されなかったであろう (モデルにおいて、 $m$  は拡散実験の間一定であると仮定されている)。おそらく、水溶性高分子からのグルコースの脱着速度が遅いため、吸着されたグルコースの量が実験の間 (数時間) ほぼ一定に保たれていたと考えられる。

Figure 2-20 に示すように、CMC、キサントガム、およびグアーガムの溶液は、透析膜を通過するグルコースの拡散を遅らせた。膜を通るグルコース拡散速度は、溶液の粘度の増加とともに減少した可能性が考えられる。粘性多糖類の粘度は、グルコース吸収の阻害に重要な役割を果たすと考えられているが (Qi *et al.*, 2016)、米糠繊維のグルコース拡散および透析遅延指数 (Glucose Diffusion and Dialysis Retardation Index : GDRI) はそれらの粘度と相関していない (López *et al.*, 1996)。López ら (1996) はアーティチョーク繊維によって引き起こされたグルコース拡散の遅延は溶液粘度が要因でなかったと述べている (López *et al.*, 1996)。また、Fabek ら (2014) は、キサントガムやグアーガムなどの食物繊維の粘度だけが、食後の血糖値の調節における唯一の要因ではない可能性を述べている (Fabek *et al.*, 2014)。他の研究でも、粘度と食後血糖値の上昇に対する抑制効果との間に関連は認められないが、一部の粘性食物繊維は溶液粘度による血糖値上昇抑制に効果的であるといわれている (Dikeman and Fahey, 2006)。CMC 溶液の粘度は水の粘度に近かったが、グルコース拡散速度をグアーガムと同じレベルで低下させた。グアーガムの粘度は、せん断速度  $10 \text{ s}^{-1}$  で水の粘度の数十倍であった。さらに、Figure 2-20 に示すように、吸着されたグルコース量と溶液粘度の間に相関関係は認められなかった。水溶性高分子の

粘度の増加は、透析膜を通過する拡散速度の減少の程度を適切に説明していないといえる。一方、透析膜を通過するグルコースの拡散速度は、(1) 式の  $(C_1 - C_2)$  に比例する。Figure 2-25 に示すシミュレーションによると、水溶性高分子を含む溶液の  $C_1 - C_2$  はコントロールよりも小さく (Figure 2-25 (A))、グルコース流束  $j$  が減少する (Figure 2-25 (A)(B))。このように、水溶性高分子 (CMC、キサントタンガム、グアーガム) は、水溶性高分子溶液の粘度が高いためではなく、グルコースの吸着によって、透析膜を介したグルコース拡散を遅らせることが確認された。

Figure 2-21 に示すように、CMC、グアーガム、キサントタンガムに吸着するグルコース量は、グルコース濃度の増加に伴ってほぼ直線的に増加した。米糠繊維 (Rice Bran water-Insoluble Fibre: RBIF) および硫酸修飾米糠繊維 (Sulfuric acid-Modified Rice Bran Insoluble Fibre: SMRBIF) の場合、グルコース吸着量 (Glucose-Adsorption Capacity: GAC) はグルコース濃度とともに増加した。RBIF および 2.0% SMRBIF の GAC の値は、それぞれ約 0.05 mmol/g (= 0.009 kg/kg) および 1.5 mmol/g (= 0.27 kg/kg) であった (Qi *et al.*, 2016)。一方、Figure 2-21 に示すように、CMC、グアーガム、キサントタンガムに吸着したグルコース量は、100 mM グルコース濃度でそれぞれ約 1.5、1.8 および 2.7 kg/kg であった。水溶性高分子は、WISDF よりも多くのグルコースを吸着する可能性が考えられる。In vivo での実験は小麦ふすま等の不溶性食物繊維が食後のグルコース応答にほとんど影響を及ぼさないことを示しているが、オート麦、大麦、およびライ麦などの可溶性食物繊維は、食後の血糖値の上昇を抑制する。

本研究で構築されたモデルは、グルコース拡散系での拡散速度を

よく表している (Dikeman and Fahey, 2006)。さらに、水溶性高分子に吸着されたグルコース量を測定することができる。グルコース吸着による小腸でのグルコース濃度の低下は、食後の血糖値上昇に対する食物繊維の抑制効果の重要なメカニズムの1つであるため、ここで提案する拡散モデルは、DMの予防に効果的な食物繊維のスクリーニングに使用可能であると考えられる。さらに、この拡散モデルは、食物繊維や難消化性タンパク質などの高分子量化合物へのグルコース以外の物質の吸着の分析への利用も期待できる。

## 2-5 小括

本章では、動物実験により、蕎麦アルブミンの食後血糖値上昇抑制効果について検討し、小麦および米のアルブミンと比較した。また *in vitro* で、蕎麦、米、小麦のアルブミンの  $\alpha$ -アミラーゼの阻害活性を測定し、酵素動力学的な解析を行った。さらに、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。

蕎麦および小麦アルブミンは、哺乳類の  $\alpha$ -アミラーゼ活性を競合的および非競合的に阻害することにより、デンプン負荷後の食後の血糖値上昇を抑制したが、米アルブミンは哺乳類の  $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性は認められなかったにも関わらず、デンプンおよびグルコース負荷の両方の食後の血糖値上昇を抑制した。蕎麦アルブミンは、酵素によって低分子に加水分解されたが、小麦および米アルブミンは難消化性を示した。

米アルブミンの食後血糖値上昇抑制メカニズムを検討するため、透析膜を通過するグルコース拡散速度を記述するためのモデルを構築し、水溶性高分子に吸着するグルコースの拡散実験を行った。透析膜におけるグルコースの拡散係数  $D$  は、グルコース濃度に関係なく一定を示した。グルコース濃度の増加に伴い、水溶性高分子へのグルコース吸着量は直線的に増加し、米アルブミンも水溶性高分子と同等にグルコースを吸着していることが示された。さらに、グルコース拡散速度の低下は、粘度との相関が認められなかった。

したがって、各穀物アルブミンの血糖値上昇抑制メカニズムについては、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競合的および非競合的な阻害、米アルブミンは食物繊維様に働き、グルコースを吸着することに起因することが示唆された。

### 第3章 蕎麦アルブミン加水分解物の食後血糖値上昇抑制効果 および関与ペプチドの推定 (Ninomiya *et al.*, 2018, Ninomiya *et al.*, 2022b)

#### 3-1 緒言

前章にて、蕎麦アルブミンはペプシンおよびトリプシンによ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維持し、食後血糖値上昇抑制効果を有する可能性が考えられる。

本章では、蕎麦アルブミンを酵素により加水分解し、残存する  $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性および *in vivo* における蕎麦アルブミン加水分解物の食後の血糖値上昇に対する抑制効果を検討した。さらに、ゲル濾過クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、および High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) を使用して加水分解物中の活性ペプチドを精製した後、 $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性に関与するペプチドのアミノ酸配列の分析を行った。

## 3-2 実験材料と方法

### 3-2-1 実験試料

蕎麦粉（富澤商店株式会社、東京、日本）と小麦粉（日清製粉株式会社、東京、日本）は市販品購入した。ブタ膵臓由来の  $\alpha$ -アミラーゼは、Sigma-Aldrich (St. Louis, State of Missouri, USA)、および  $\alpha$ -アミラーゼの基質である 2-chloro-4-nitrophenyl- $\alpha$ -D-maltotrioside (G3-CNP) はオリエンタル酵母（東京、日本）から入手した。ペプシン（ブタ胃由来）およびトリプシン（ウシ膵臓由来）は和光純薬工業（大阪、日本）から入手した。他の化学薬品はすべて特級試薬を使用した。

### 3-2-2 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

2-2-2 (1) の方法で加水分解した蕎麦アルブミン加水分解物の残存した  $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性を 2-2-1-3 (1) の方法で測定した。

### 3-2-3 動物実験試料としての蕎麦および小麦アルブミン加水分解物の調製 (Figure 3-1)

動物実験試料としての蕎麦および小麦アルブミン加水分解物は、2-2-2 (1) の方法を一部修正して行った。初めに、蕎麦および小麦アルブミン 100 mg を 10 mL のトリプシン溶液に懸濁し、37°C で 6 時間インキュベートした。インキュベート後、10 mL のペプシン溶液を加え、37°C で 2 時間インキュベートした。酵素反応は 100°C で 5 分ボイルすることにより停止した。加熱後、3 kDa 以上の高分子画分はフィルター (Amicon® Ultra-15 3,000 NMML, Merck Millipore Co., Ltd., US) を用いて遠心分離 (10,000×g、10 min、4°C) によっ

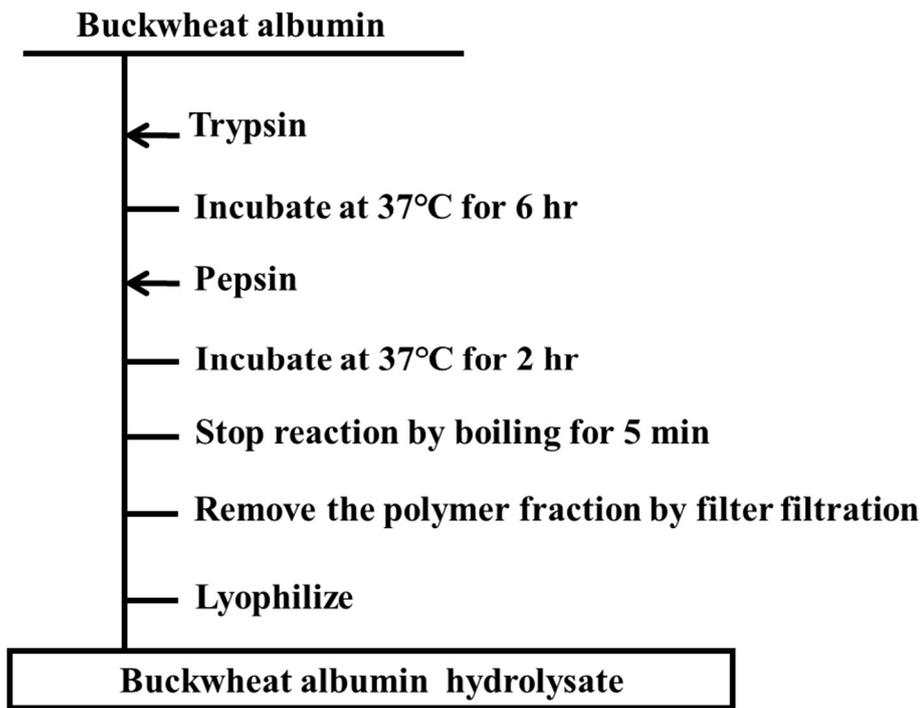


Figure 3-1 Digestibility of cereal albumins.

て除去した。得られた 3 kDa 未満の画分は、蕎麦および小麦アルブミン加水分解物として凍結乾燥した。加水分解の程度は、2-2-2 (1) の方法と同様に SDS-PAGE にて評価した。

#### 3-2-4 実験動物

実験動物である Wistar ラットの飼育は 2-2-1-2 (1) と同じ条件で行った。本章における全ての動物実験は、日本大学動物実験運営内規に則り行った（承認番号：AP12B059）。

#### 3-2-5 蕎麦および小麦アルブミン加水分解物のデンプン負荷試験 (OSTT) (Figure 3-2)

試験前、ラットをランダムに以下の 3 群に分けた (n=7/群)：可溶性デンプン投与群、可溶性デンプン+蕎麦アルブミン加水分解物 300 mg/kg 体重投与群、可溶性デンプン+小麦アルブミン加水分解物 300 mg/kg 体重投与群。なお、可溶性デンプンのみを 1 g/kg となるように PBS で調製したものを投与した群をコントロール群とした。以降、2-2-1-2 (2) と同様の方法で OSTT を行い、血糖値、血漿インスリン値および曲線化面積を算出した (Wolever and Jenkins, 1986)。

#### 3-2-6 ペプチド推定のための蕎麦アルブミンの精製 (Figure 3-3)

2-2-1 (4) で得られたゲルろ過後にブタ膵臓由来  $\alpha$ -アミラーゼに対する阻害活性 90%以上示した画分をアフィニティークロマトグラフィーおよび HPLC を用いて精製した。まず、10 mg の蕎麦アルブミンを 1 mg/mL となるように 50 mM Tricin buffer (pH 8.0) に溶解したトリプシン 1 mL と混合し、37°C で 4 時間インキュベートし

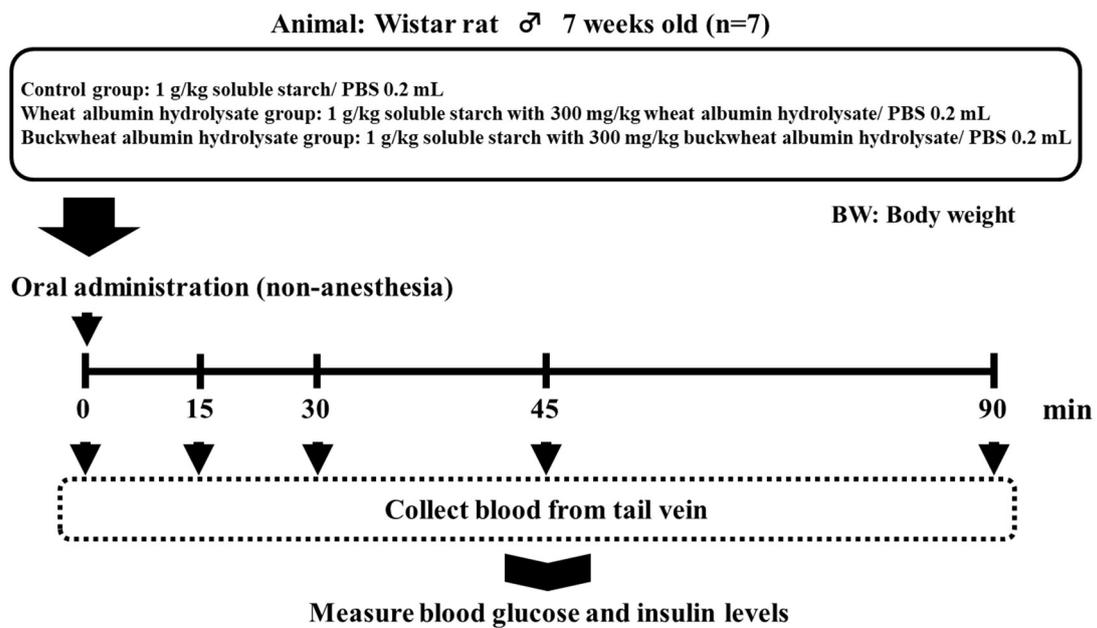


Figure 3-2 Experimental design for oral soluble starch tolerance test (OSTT) in normal rats.

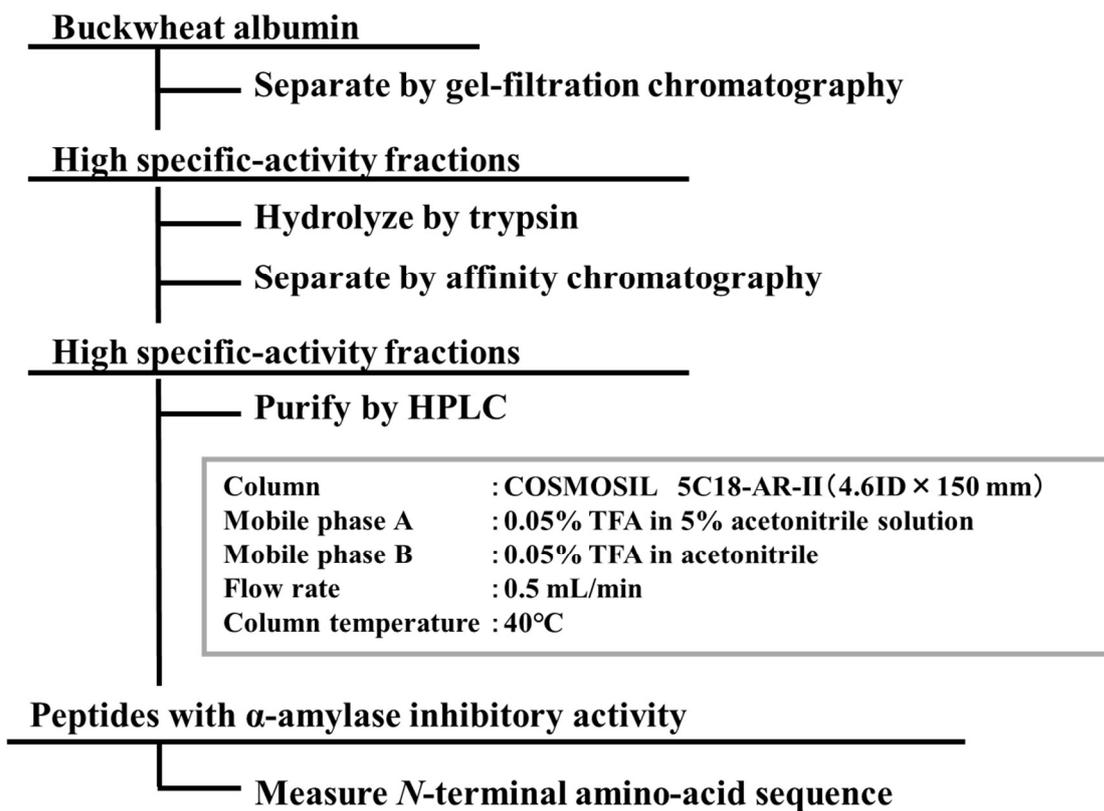


Figure 3-3 Analysis of primary structure of peptides with  $\alpha$ -amylase inhibitory activity.

た。インキュベート後、酵素反応は 100°C で 5 分のボイルにより停止させ、溶液を凍結乾燥した。アフィニティーカラムは  $\alpha$ -アミラーゼとカップリングした HiTrap NHS-activated HP column ( $\phi$  0.7 cm $\times$ 2.5 cm, 17-0716-01, GE Healthcare Japan, Tokyo, Japan) を作製した。カラムを 1 mM HCl で洗浄後、10 mg のブタ膵臓由来  $\alpha$ -amylase (1663 U/mg protein) を加えた 1 mL のカップリング buffer (0.2 M 炭酸水素ナトリウムおよび 0.5 M NaCl 含有、pH 8.3) をカラムにアプライし、4°C で 4 h 静置した。次に、3 mL のカップリング buffer をアプライした。未反応の官能基をブロックするため、6 mL のブロッキング buffer (0.5 M monoethanolamine (MEA) および 0.5 M NaCl 含有、pH 8.3) をアプライし室温で 1 h 静置した。その後、洗浄 buffer (0.1 M 酢酸ナトリウムおよび 0.5 M NaCl 含有、pH 4.0)、ブロッキング buffer および洗浄 buffer を各 6 mL アプライし、11 mL の平衡化 buffer (20 mM HEPES, 50 mM NaCl, および 3 mM CaCl<sub>2</sub> 含有、pH 6.9) をアプライした。次に、3 mL の平衡化 buffer に溶解した 20 mg の蕎麦アルブミンペプチドをカラムにアプライし、平衡化 buffer は 280 nm での溶出吸光度がおおよそ 0 になるまでアプライし続けた。 $\alpha$ -アミラーゼとカラム内で結合した蕎麦アルブミンペプチドは溶出 buffer (0.1 M グリシンおよび 0.02 M HCl 含有) で溶出した。各フラクション (1 mL) は 280 nm での吸光度および  $\alpha$ -amylase 阻害活性を測定し、90%以上のブタ膵臓由来  $\alpha$ -アミラーゼに対する阻害活性を示したフラクションを回収し凍結乾燥した。蕎麦アルブミンペプチドの HPLC は COSMOSIL 5C18-AR-II column (4.6 mm I.D. $\times$ 150 mm, 38144-31, ナカライテスク株式会社, 京都) を接続した liquid chromatographic system (株式会社島津製作所, 京都) を用いた。測定条件は以下の通り: カラム温度, 40°C: 移動相, 100%

溶媒 A (0.05% TFA in 5% acetonitrile solution) を 50 min、80% 溶媒 A/20% 溶媒 B (アセトニトリルに溶解した 0.05%トリフルオロ酢酸 (TFA)) を 80 min、および 100% 溶媒 B を 60 min: 流速, 0.5 mL/min; 注入量, 20  $\mu$ L; および検出, 215 nm。蕎麦アルブミンペプチドは溶媒 A に溶解し、0.45  $\mu$ m membrane-filter (Millex-LH, Merck Co., Ltd., Tokyo, Japan)でフィルターろ過した。各フラクション (0.5 mL) は回収し、 $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性を測定した。ブタ膵臓由来  $\alpha$ -アミラーゼに対する高い  $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性を示したフラクションは凍結乾燥した。

### 3-2-7 蕎麦アルブミン中の $\alpha$ -AI の推定

HPLC によって精製した蕎麦アルブミン  $\alpha$ -AI ペプチドは 0.05% TFA および 5%アセトニトリル水溶液に溶解し、N-末端タンパク質配列はプロテインシーケンサー(Applied Biosystems model492, Thermo Fisher Scientific K.K., Tokyo, Japan)で分析した。得られたアミノ酸配列から、蕎麦ゲノムデータベース (Kazusa DNA Res. Inst. (<http://www.kazusa.or.jp/e/resources/database.html>)) よりタンパク質の一次配列を推定した (Yasui *et al.*, 2016; Kazusa DNA Research Institute, 2015)。分子量および親タンパク質の理論上の pI は ExPASy ProtParamtool (<https://web.expasy.org/protparam/>)を用いて推定した。

### 3-2-8 統計解析

データは平均 $\pm$ 標準誤差 (S.E.) として表し、Mac 統計解析 ver.3.0 (株式会社エスミ、東京) を使用した一元配置分散分析 (ANOVA) によって評価した。各グループ間の比較は、Tukey-Kramer の検定を

使用して行い  $p < 0.05$  を統計的に有意なものとした。

### 3-3 結果

#### 3-3-1 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

消化酵素による消化後の蕎麦および小麦アルブミンの残存するアミラーゼ阻害活性を測定した (Figure 3-4)。蕎麦アルブミンは消化酵素によって加水分解されたが、高い  $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性を保持していた (91.4%)。一方、小麦アルブミンの  $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性は、ペプシンおよびトリプシンによる消化耐性を有するにも関わらず、55.9%に低下した。

#### 3-3-2 動物実験試料としての蕎麦および小麦アルブミンの酵素的加水分解

トリプシンおよびペプシンによる加水分解前後の蕎麦および小麦アルブミンの SDS-PAGE は、消化前に観察された 10 kDa を超える全てのバンドが消失した (Figure 3-5)。蕎麦および小麦アルブミンのどちらも、消化酵素によって加水分解された 10 kDa 未満のペプチドを回収することができた。

#### 3-3-3 蕎麦および小麦アルブミン加水分解物のデンプン負荷試験 (OSTT)

蕎麦アルブミン加水分解物の経口投与では、デンプン負荷後 15 分で食後の血糖上昇を有意に抑制し、食後血糖値はコントロールと比較して 87%であった (Figure 3-6 (A))。デンプンと共に小麦アルブミン加水分解物を経口投与した際の食後 15 分後の血糖値は、コントロールの血糖値の約 93%であった ( $p = 0.25$ )。曲線下面積は、有意差はなかったものの、蕎麦アルブミン投与群は、コントロール

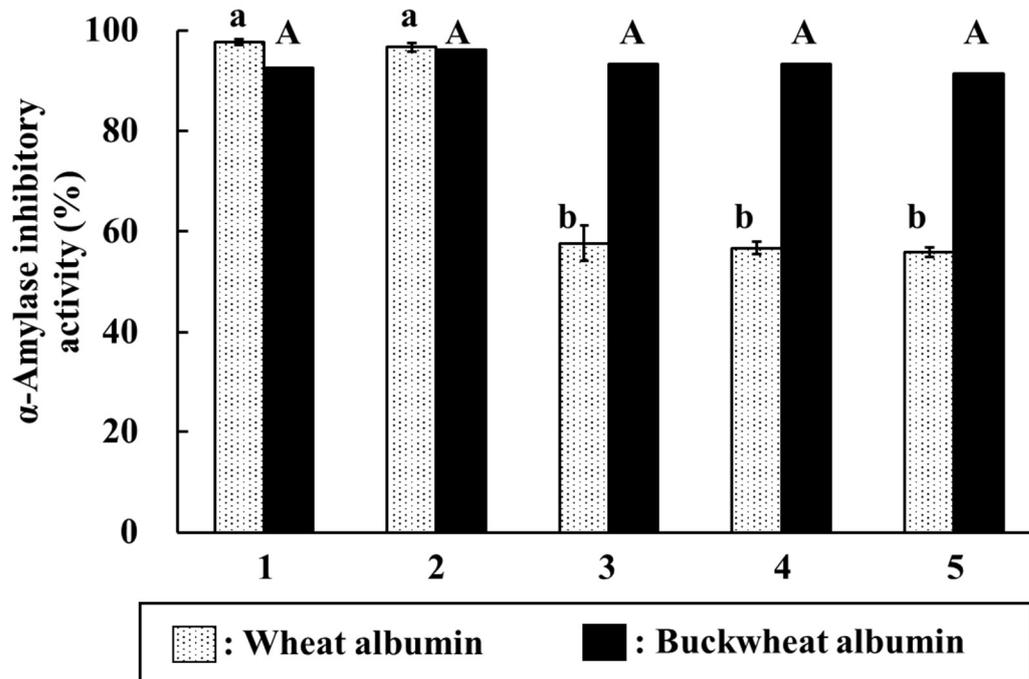


Figure 3-4  $\alpha$ -Amylase inhibitory activity of wheat and buckwheat albumins after digestion. (1) Undigested; (2) Digested by pepsin for 2 h; (3) Digested by pepsin for 2 h followed by digestion with trypsin for 2 h; (4) Digested by pepsin for 2 h followed by digestion with trypsin for 4 h; (5) Digested by pepsin for 2 h followed by digestion with trypsin for 6 h. Values with different letters are significantly different at  $p < 0.05$ .

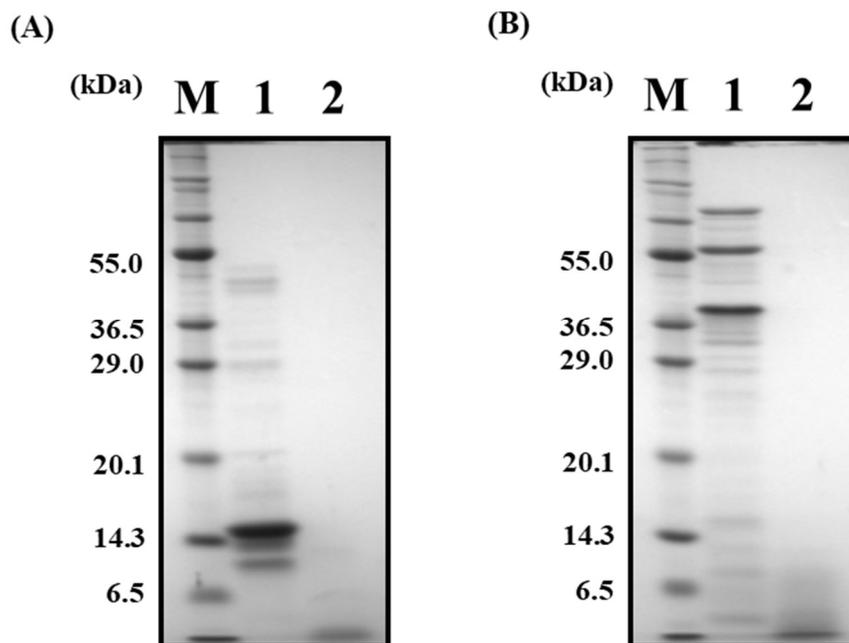


Figure 3-5 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis patterns of (A) wheat albumin and (B) buckwheat albumin digested by pepsin and trypsin. (M) Marker; (1) undigested; (2) digested by pepsin for 2 h and trypsin for 6 h.

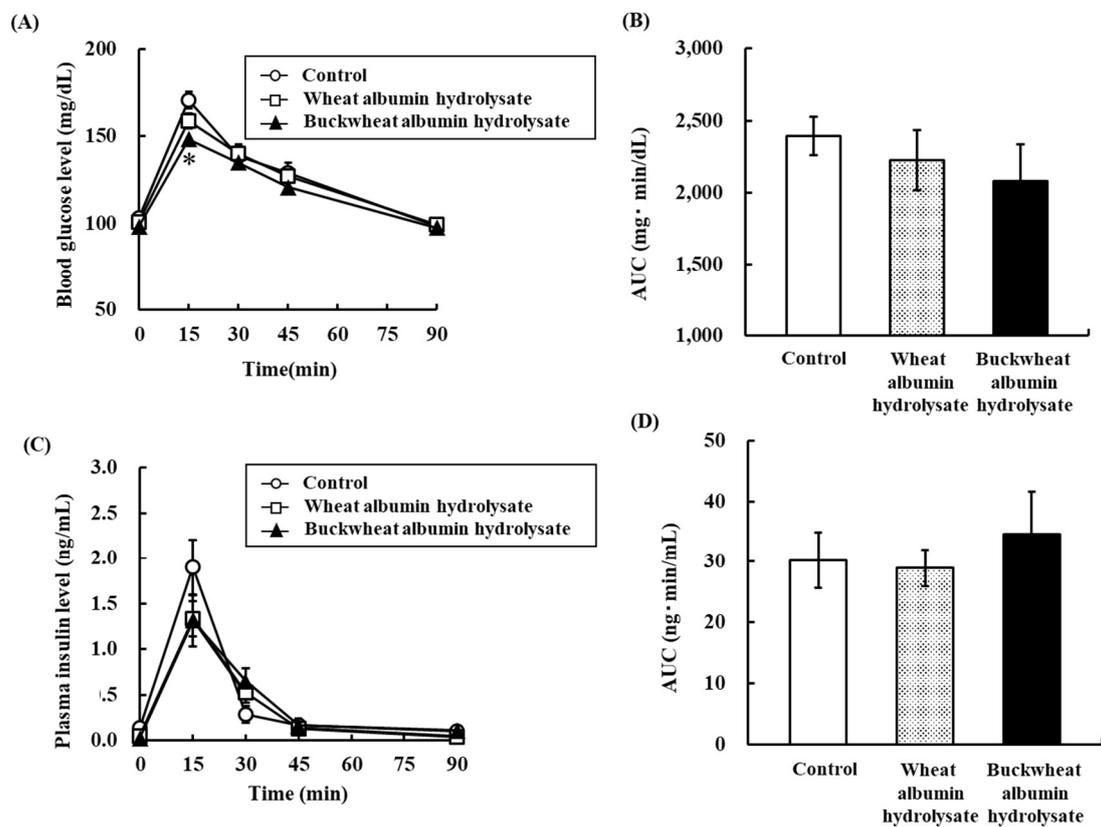


Figure 3-6 Effect of buckwheat and wheat albumins hydrolysates blood glucose level (A), glucose AUC (B), plasma insulin level (C), and insulin AUC (D) after oral loading of starch in normal Wistar rats. Each value is the mean of 7 experiments with S.E. shown as a vertical bar. Values with different letters are significantly different at  $p < 0.05$ .

群よりも低くなった。蕎麦アルブミン加水分解物および小麦アルブミン加水分解物群の血漿インスリン値は、有意差は認められなかったが、食後 15 分でコントロール群よりも低い傾向がみられた（それぞれ  $p = 0.33$  および  $0.35$ ）（Figure 3-6 (C)）。各群の各時間の間には有意差が認められた。

#### 3-3-4 蕎麦アルブミン $\alpha$ -AI ペプチドの精製

蕎麦アルブミンはゲルろ過クロマトグラフィーで分離した（Figure 3-7）。フラクション No.27-51 は高い  $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性を示したため、それらを回収し、トリプシンによって加水分解した。蕎麦アルブミンペプチドを  $\alpha$ -アミラーゼをリガントとしたアフニティークロマトグラフィーに供した。アフニティークロマトグラフィー後、0.1M グリシンと 0.02M HCl を含む溶出バッファーで溶出されたフラクション No.8 および 9 は、高い  $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性を示した（Figure 3-8）。これらの画分を HPLC でさらに精製し、74 分にペプチド濃度が高く、 $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性を持つ単一画分が得られた（Figure 3-9）。 $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性の高い画分が他にもいくつか認められたが、アミノ酸配列の分析に供するためのペプチド濃度が十分ではなかった。この精製を 3 回行い、ほぼ同一のクロマトグラムが得られた。

#### 3-3-5 蕎麦アルブミン $\alpha$ -AI ペプチドの分析

HPLC による 74 分でのフラクションの N 末端アミノ酸配列を、タンパク質シーケンサーを使用して分析した。精製は 3 回行い、3 回の別々の精製から 3 つのペプチドが得られた（Table 3-1）。

蕎麦のゲノムデータベースによると、このペプチドは分子量 17.8

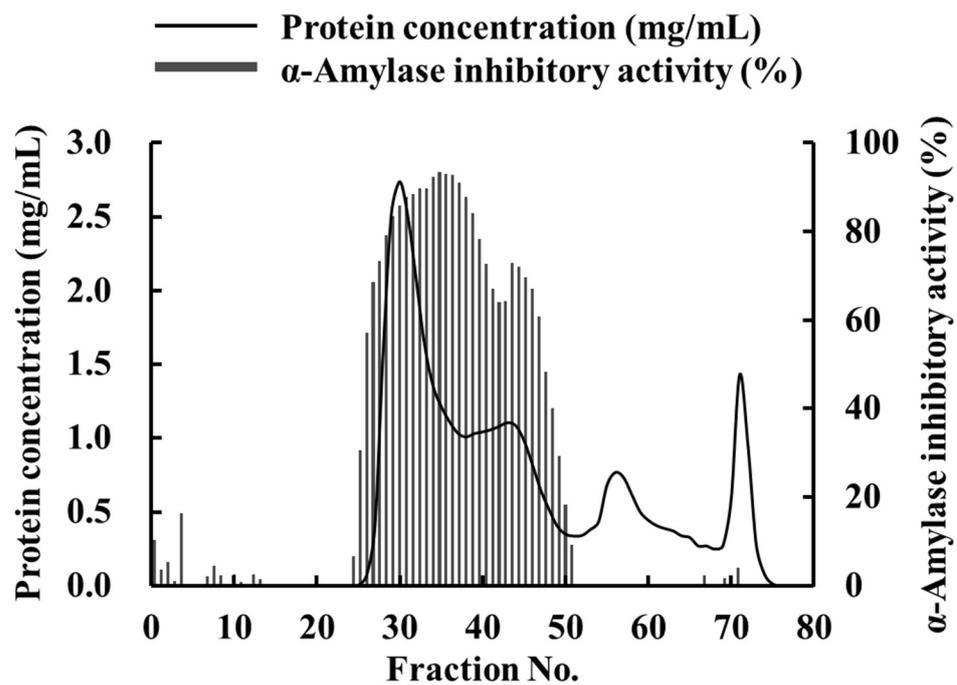


Figure 3-7 Sephadex G-50 gel filtration chromatogram of buckwheat albumin and  $\alpha$ -amylase inhibitory activity of each fraction.

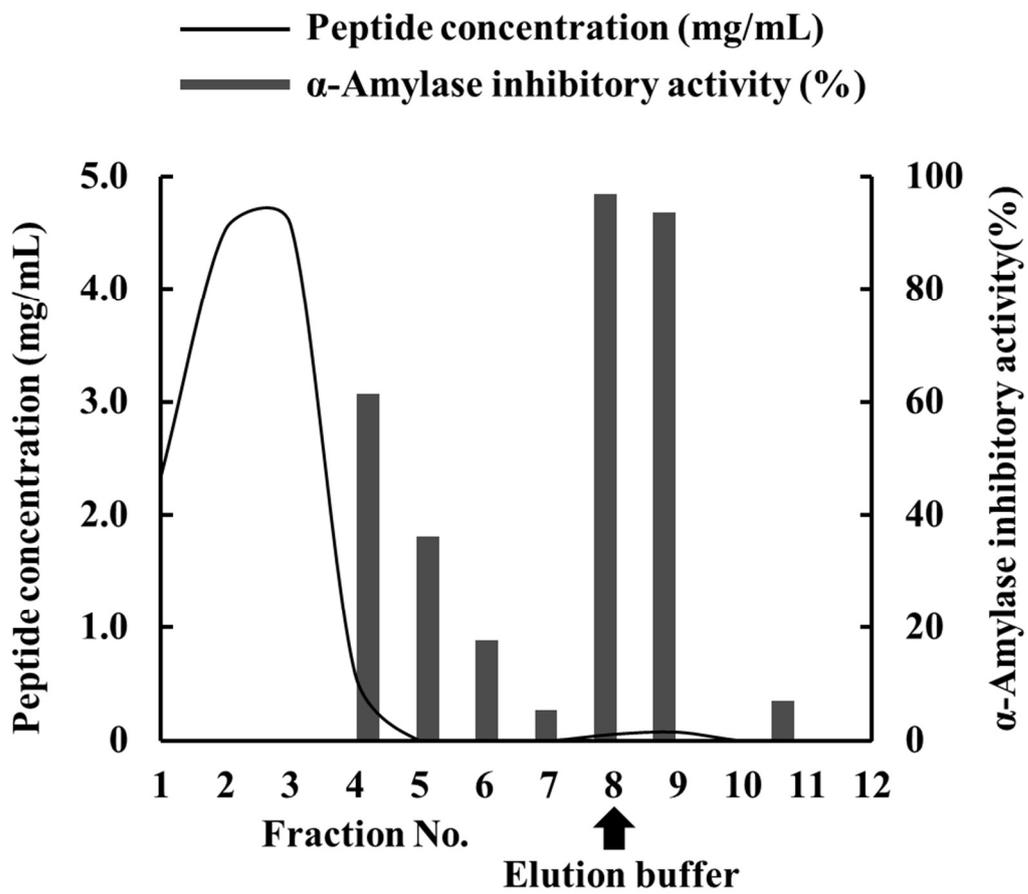


Figure 3-8  $\alpha$ -Amylase affinity chromatogram of buckwheat peptides and  $\alpha$ -amylase inhibitory activity of each fraction.

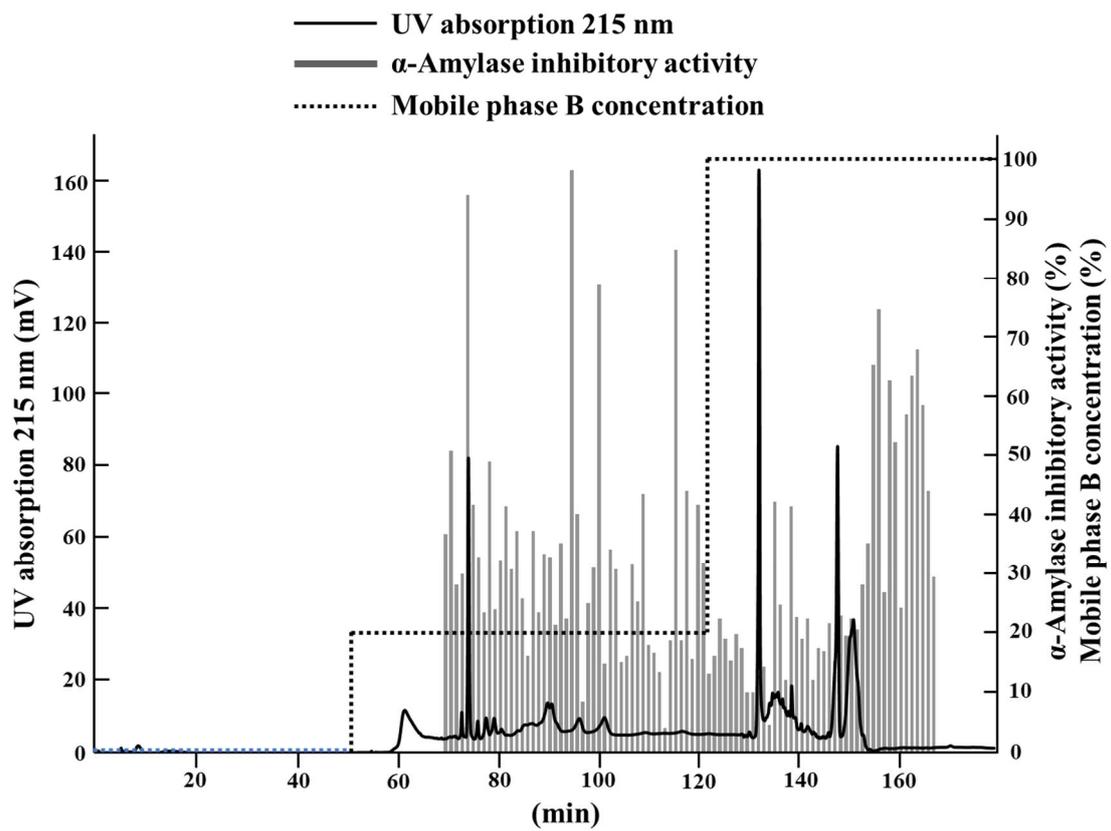


Figure 3-9 Peptide concentration (solid line) and  $\alpha$ -amylase inhibitory activity (bars) of buckwheat albumin hydrolysates separated by HPLC chromatography.

kDa の親タンパク質であり、理論上の pI 4.77 であり、未確認のアミノ酸はシステイン残基であることが明らかとなった (Figure 3-10)。

Table 3-1 Amino-acid sequences of buckwheat  $\alpha$ -AI peptide measured by protein sequencer

|           | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 |
|-----------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|
| peptide 1 | Y | V | E | P | D | X | G | N | L | G  | X  | X  | Y  | H  | X  |
| peptide 2 | Y | V | E | P | D | X | G | N | L | G  | X  | X  | X  | X  | X  |
| peptide 3 | Y | V | E | P | D | X | G | N | L | G  | X  | X  | Y  | H  | X  |

|   |   |
|---|---|
| <i>Fagopyrum esculentum</i> Moench (Fes_sc0000001.1.g000011.aua.1 (/n)) |   |
| 1-40  | MK LTIQCLVVFAALLLASSLPFSSGYVEPDCGNLGCYHY    |
| 41-80   | IGK CAK CCEPGEVGFGRPGGFGGGQGGDPGYGGGGQGGF   |
| 81-120  | GR GSGSFGGEQGS DPSYGGGQGDYGGRSSGGEGGR GGGSS |
| 121-160   | LQGGCYGGEQGHCGSDQGGDAGVIGGGQPQTGDFAE LTK    |
| 161-182   | SGCCYPTK FFCGR CCESGEAPP                    |

Kazusa DNA Res. Inst. Databases: <http://www.kazusa.or.jp/e/resources/database.html>

|                                |     |  |     |
|--------------------------------|-----|--|-----|
| Buckwheat-albumin $\alpha$ -AI | 1   | MK LTIQCLVVFAALLLASSLPFSSGYVEPDCGNLGCYHYIGKCAKCEPGEVGFGRGPG    | 60  |
| Wheat-albumin $\alpha$ -AI     | 1   | ---SGPWMCYPGQAFQVPALPACRPLLRLLQCNGSQVPEAVLRDCCQQLAHISEWCRCG--- | 55  |
|                                |     | LP C C G   |     |
| Buckwheat-albumin $\alpha$ -AI | 61  | GFGGGQGGDPGYGGGGQGGFGRGSGSFGGEQGS DPSYGGGQGDYGGRSSGGEGGRGGSS   | 120 |
| Wheat-albumin $\alpha$ -AI     | 56  | --ALYSMLDSMYKEHGAQEGQAGTGAFPCRR-----E VVKLTAAS                 | 94  |
|                                |     | D Y G G G F E S  |     |
| Buckwheat-albumin $\alpha$ -AI | 121 | LQGGCYGGEQGHCGSDQGGDAGVIGGGQPQTGDFAE LTKSGCCYPTK FFCGRCCESGEA  | 180 |
| Wheat-albumin $\alpha$ -AI     | 95  | ITAVCR----LPIVVDASGDG-----AYVCKDVAAYPDA-----                   | 124 |
|                                |     | C D GD CK YP   |     |
| Buckwheat-albumin $\alpha$ -AI | 181 | PP   | 182 |
| Wheat-albumin $\alpha$ -AI     | 124 | --   | 124 |

Figure 3-10 Homology of amino-acid sequences between buckwheat-albumin  $\alpha$ -AI and wheat-albumin  $\alpha$ -AI.

### 3-4 考察

小麦アルブミンは  $\alpha$ -アミラーゼの活性を阻害することが知られており、食後の血糖値の上昇を抑制するため、既に特定保健用食品 (FoSHU) の機能性成分として用いられている。前章で、蕎麦アルブミンは  $\alpha$ -アミラーゼの活性を競合的に阻害することにより、デンプン負荷後の食後の急激な血糖値の上昇を抑制することを示した (Ninomiya *et al.*, 2018)。また、蕎麦アルブミンの *in vitro* での  $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性は小麦アルブミンよりも低かったが (Figure 2-15)、蕎麦アルブミンの *in vivo* での食後血糖値上昇抑制効果は小麦アルブミンよりも高かった (Figure 2-13)。この相反する現象を解明するために、*in vitro* 消化後の  $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性を評価した。小麦アルブミンの  $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性は、ペプシンおよびトリプシン消化後に 60%に減少した (Figure 3-4) が、消化耐性が認められた (Figure 2-17)。一方、蕎麦アルブミンは消化酵素によって低分子量ペプチドに加水分解されたが (Figure 2-17)、消化後もほぼ 100%のアミラーゼ阻害活性を保持していた (Figure 3-4)。

Figure 3-6 に示すように、タンパク質が消化酵素によって小さなペプチドに加水分解されたにも関わらず、OSTTにおいて蕎麦アルブミン加水分解物がデンプン投与 15 分後に血糖値の上昇を有意に抑制した。この結果は、蕎麦アルブミン加水分解物中のいくつかの小さなペプチドによって、デンプンからグルコースへの加水分解が抑制され、小腸から吸収されるグルコースの量が減少したことを示している。

蕎麦アルブミン加水分解物投与群の血漿インスリン値は増加しなかったが、食後 15 分でインスリン分泌の上昇を抑制する傾向が認められた (Figure 3-6)。これは、蕎麦アルブミンの血糖値上昇抑制

効果がインスリンによる細胞へのグルコース取り込みの促進ではなく、腸内の  $\alpha$ -アミラーゼ阻害に起因することを意味している。食後の血糖値上昇に対する蕎麦アルブミン加水分解物の抑制効果が小麦アルブミン加水分解物よりも高かったのは、小麦アルブミンの  $\alpha$ -アミラーゼに対する阻害効果が加水分解により低下したことも一因と考えられる (Ninomiya *et al.*, 2018)。

これらの結果は、蕎麦アルブミン加水分解物が高い  $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性を有していた一方で、小麦アルブミンが *in vivo* で部分的に消化され、食後の血糖値上昇に対する抑制効果を低下させたことを示唆している。これは、蕎麦アルブミンが、小麦アルブミンと比較して、*in vitro* での  $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性が弱いにもかかわらず、食後の血糖値上昇に対してより強力な抑制効果を示した理由であると考えられる。

蕎麦アルブミン加水分解物が  $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性を有する理由として、3つの仮説が考えられる：(1) 特定のペプチド配列が  $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性を示す、(2) ペプチドに共有結合した糖鎖が  $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性を示す、(3) 糖鎖およびペプチド配列が  $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性を示す。

食後の血糖値上昇抑制に関与するペプチドを推定するために、蕎麦アルブミンペプチドを  $\alpha$ -アミラーゼをリガントとしたアフィニティークロマトグラフィーおよび HPLC によって精製した。この手順を3回繰り返し行い、毎回ほぼ同じクロマトグラムが得られた。タンパク質シーケンサーによる N 末端アミノ酸配列の測定には、 $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性が高く、ペプチド濃度が十分な画分を使用した。一部の残基は特定できなかったが、3つの別々の精製から得られた3つのペプチドのアミノ酸配列はほぼ同一であった (Table 3-1)。次

に、この配列を蕎麦ゲノムデータベースの配列と比較したところ、読み取り不可能なアミノ酸残基がシステイン残基であることが明らかとなった (Figure 3-10)。推定されたアミノ酸配列 YVEPDCGNLGCCYHC は、分子量 17.8 kDa および理論上の pI 4.77 の親タンパク質に含まれていた。蕎麦アルブミンの  $\alpha$ -AI と小麦アルブミンの  $\alpha$ -AI のアミノ酸配列の相同性は非常に低かった。前章の Lineweaver-Burk プロットの結果から、蕎麦アルブミンの  $\alpha$ -AI は  $\alpha$ -アミラーゼを競合的に阻害するが、小麦アルブミンの  $\alpha$ -AI は非競合的に阻害する (Figure 2-16)。蕎麦アルブミンの  $\alpha$ -AI と小麦アルブミンの  $\alpha$ -AI の異なる阻害様式も、アミノ酸配列が異なることを支持している。一部の研究者は、植物から得られた糖タンパク質が  $\alpha$ -アミラーゼを競合的に阻害すると報告している (Maskos *et al.*, 1996; Gibbs and Alli, 1998; Gadge *et al.*, 2015)。蕎麦アルブミン  $\alpha$ -AI の阻害様式から、ペプチド自体が  $\alpha$ -アミラーゼの活性部位に適合する可能性は低いため、本章で推定された蕎麦  $\alpha$ -AI ペプチドはグリコシル化されていると推測される。

糖鎖はアスパラギン (Asn) の側鎖中のアミド窒素原子、セリン (Ser) およびスレオニン (Thr) の酸素原子に結合することが知られている。今回得られた配列から 33 番目のアスパラギン、18-19、23-24、84、86、93、96、108-109、119-120、135、161、177 番目のセリン、4、151、158、167 番目のスレオニンに糖鎖が付加している可能性が考えられる。また、トリプシンによってアルギニンおよびリジンのカルボキシル基側でペプチド結合が切断されることから、Figure 3-10 に示す線の位置でペプチドの切断が起こると推測される。したがって、トリプシンによる加水分解によって生じたペプチドあるいは上述したアスパラギン、セリン、スレオニンへ付加し

た糖鎖が  $\alpha$ -アミラーゼの活性中心に入り込み  $\alpha$ -アミラーゼを競合阻害したことが推察される。

我々はこれまでに、米アルブミンが、デンプン負荷時だけでなく、グルコース負荷時でも食後の血糖値上昇を抑制することを示した (Ina *et al.*, 2016)。米アルブミンは、昆虫由来の  $\alpha$ -アミラーゼの活性は阻害するが、哺乳類由来の  $\alpha$ -アミラーゼの活性を阻害しない (Figure 2-13)。したがって、食後の血糖値を抑制するメカニズムは、蕎麦アルブミンとは異なる。米アルブミンは、おそらくジスルフィド結合によって形成された強固な構造のため、ペプシンおよびトリプシンに対して消化耐性を有すると考えられる。しかし、蕎麦アルブミン  $\alpha$ -AI のシステイン残基数は 14 であり、米アルブミンよりも多いが、蕎麦アルブミンは消化酵素によって容易に加水分解された。これは、蕎麦のアルブミン  $\alpha$ -AI のシステイン残基がジスルフィド結合による強固な構造の形成に寄与しないことを示している。

本章では、蕎麦アルブミン加水分解物が腸内の  $\alpha$ -アミラーゼ活性を阻害することにより、*in vivo* での食後血糖値の上昇に対して抑制効果を有することを示し、この機能に関与するペプチドを推定した。しかし、ペプチド濃度が低く、 $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性が高い画分がいくつかあったため、蕎麦アルブミン加水分解物には他の  $\alpha$ -AI ペプチドが含まれている可能性が考えられる。これらのペプチドのアミノ酸配列を解明し、*in vivo* での実験でその機能を証明するにはさらなる研究が必要である。

### 3-5 小括

本章では、蕎麦アルブミンを酵素により加水分解し、残存する  $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性および *in vivo* における蕎麦アルブミン加水分解物の食後の血糖値上昇に対する抑制効果を検討し、ゲル濾過クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、および High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) を使用して精製した後、 $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性に関与するペプチドのアミノ酸配列の分析を行った。

蕎麦アルブミンは、消化酵素によって加水分解された後も  $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性を維持し、デンプン負荷試験において血糖値上昇を抑制した。この蕎麦アルブミンの血糖値上昇抑制効果は、 $\alpha$ -アミラーゼの活性を阻害し、食後の血糖値上昇を抑制することが知られている小麦アルブミンの加水分解物よりもいくらか高かった。蕎麦アルブミンのアミノ酸配列と分子量は小麦アルブミンのものとは異なっていた。これらのことから、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、米アルブミンはグルコースの吸着に起因することが明らかとなった。したがって、蕎麦アルブミンは、食後の血糖値上昇を抑制するため特定保健用食品の機能性成分としての利用が可能と考えられるが、メカニズムの解明にはさらなる検討が必要である。

## 第4章 機能性食品素材としての蕎麦アルブミンの物理化学的性質の評価 (Ninomiya *et al.*, 2018, Ninomiya *et al.*, 2022c)

### 4-1 緒言

前章までに、蕎麦アルブミンが  $\alpha$ -アミラーゼインヒビター ( $\alpha$ -amylase inhibitor:  $\alpha$ -AI)として働き (Ikeda and Kishida, 1993; Ikeda *et al.*, 1994; Ninomiya *et al.*, 2018)、食後の急激な血糖値上昇を抑制することを明らかにした (Ninomiya *et al.*, 2018)。また前章において、蕎麦アルブミンは、既に血糖値上昇抑制する特定保健用食品 (FoSHU) (Kodama *et al.*, 2005; Arai *et al.*, 2008) の機能性成分として知られている小麦アルブミンと比較すると、加水分解後も高い  $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性と食後の血糖値上昇抑制効果があることを明らかにした (Ninomiya *et al.*, 2018)。

蕎麦アルブミンは、水溶性のうえに無臭・無味であるため、食品の嗜好性に影響を与えることなく、血糖値の上昇を防ぐ機能性食品素材としての利用が期待できる。それゆえ、蕎麦アルブミンは糖尿病予防の FoSHU の機能性成分として有効であると考えられる。

タンパク質は食品加工中の加熱時に変性し、不溶性になることが多いため、タンパク質を食品産業の原料として利用するには、高い熱安定性が必要である。加えて、高い乳化および起泡性を有することにより、食品での幅広い用途が可能になる。卵タンパク質は優れた表面特性を持つことが知られており、マヨネーズ、アイスクリーム、メレンゲおよびスポンジケーキに使用されている。蕎麦アルブミンが高い乳化および起泡性を有するのなら、卵タンパク質の代替品として効果的に使用できる。

蕎麦については、既に、蕎麦粉およびグロブリン画分の乳化およ

び起泡性が報告されているが (Tomotake *et al.*, 2000; Tang, 2007; Raikos *et al.*, 2014; Kumari *et al.*, 2015)、蕎麦アルブミンの物理化学的特性は十分に研究されていない。そこで本章では、蕎麦アルブミンの耐熱性、水への溶解性、乳化性および起泡性を検討し、機能性食品への応用の可能性を検討した。また、部分的なタンパク質の分解はタンパク質の表面特性を変化させることがあるため (Kumagai *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 1990; Kumagai *et al.*, 2002; Zeng *et al.*, 2013)、本章では、蕎麦のアルブミン加水分解物の乳化および起泡性についても検討した。

## 4-2 実験材料と方法

### 4-2-1 実験試料

蕎麦粉（富澤商店株式会社、東京、日本）は市販品を購入した。卵アルブミンおよびカゼインは和光純薬工業（大阪、日本）から入手した。プロテアーゼ A「アマノ」SD は天野エンザイム株式会社（名古屋、日本）から入手した。ブタ膵臓由来  $\alpha$ -アミラーゼは Sigma-Aldrich（St. Louis, State of Missouri, USA）から入手し、 $\alpha$ -アミラーゼの基質である 2-chloro-4-nitrophenyl- $\alpha$ -D-maltotrioxide（G3-CNP）はオリエオリエントアル酵母工業株式会社（東京、日本）から入手した。他のすべての試薬は特級を使用した。

### 4-2-2 蕎麦アルブミンの調製

蕎麦アルブミンの調製は 2-2-1-1 (3) と同様の方法で行った。

### 4-2-3 蕎麦アルブミンの熱安定性の評価

蕎麦および小麦アルブミンの熱安定性は、加熱後のブタ膵臓由来  $\alpha$ -アミラーゼに対する  $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性の残存活性によって評価した（Figure 4-1）。蕎麦および小麦アルブミンは、0.1% (w/w) となるように純水 1 mL に溶解し、100°C で 10、30、60 および 120 分間加熱した。室温まで放冷後、 $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性を 2-2-1-3 (1) と同様の操作で行った。加熱処理後に残存している  $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性の割合 (%) を熱安定性として定義し、以下の式により算出した。

$$\text{熱安定性 (\%)} = \text{IAh} / \text{IAN} \times 100 \quad (4-1)$$

IAh： 加熱後の  $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性

IAN： 未加熱 の  $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性

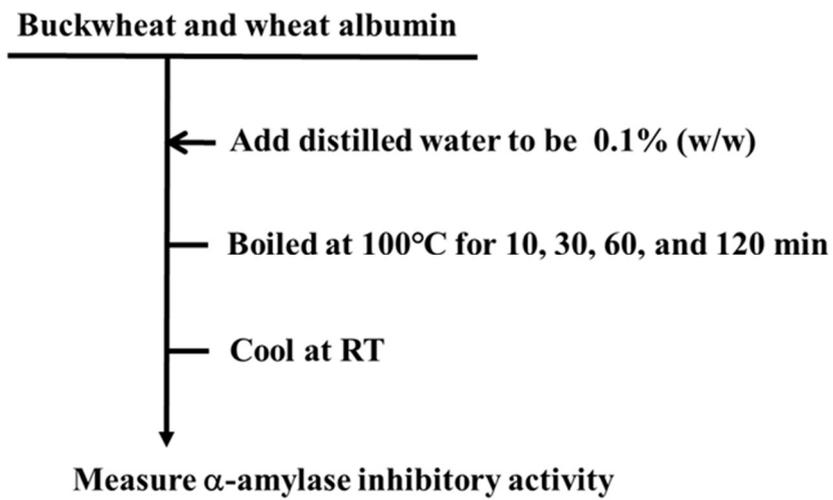


Figure 4-1 Method of thermal stability measurement.

#### 4-2-4 示差走査熱量測定 (DSC) による蕎麦アルブミンの変性温度測定

変性温度測定は、Ina ら (2019) の方法で行った (Ina *et al.*, 2019; Figure 4-2)。ジスルフィド結合の熱安定性への影響は、還元剤添加あるいは無添加時の蕎麦アルブミンの変性温度を示差走査熱量計 (DSC-100; Seiko Instruments Inc., Chiba, Japan) で測定し、評価した。蕎麦アルブミンは、水あるいは 200 mM dithiothreitol (DTT) 溶液を加え 20% (w/w) となるよう溶解し、室温で 16 時間静置した。次に、DTT 添加あるいは無添加の各蕎麦アルブミン溶液は銀製の pan に 30 mg となるよう秤量した。密封した pan は 1°C/min で 170°C まで加熱した。同量の水あるいは 200 mM DTT 溶液を入れた密封した pan をリファレンスとした。ピーク温度 ( $T_p$ ) とエンタルピー変化 ( $\Delta H$ ) は Standard Analysis (Seiko Instruments Inc.) で算出した。

#### 4-2-5 蕎麦アルブミンの溶解度測定

溶解性は Ina ら (2019) の方法を一部修正して行った (Ina *et al.*, 2019; Figure 4-3)。タンパク質サンプル (100 mg) は 50 mM citrate-phosphate buffer (pH 3.0–6.0) 10 mL に懸濁し、室温で 60 分攪拌した。溶液は 2 つの試験管に分割した ; 1 つは室温に、もう 1 つは 80°C で 20 分間加熱した。遠心分離 (10,000×g、15 min) 後、上清のタンパク質含有量を BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific, Kanagawa, Japan) にて測定した。溶解度は以下の式で算出した : 溶解度 (%) = (上清のタンパク質濃度/全タンパク質濃度) × 100

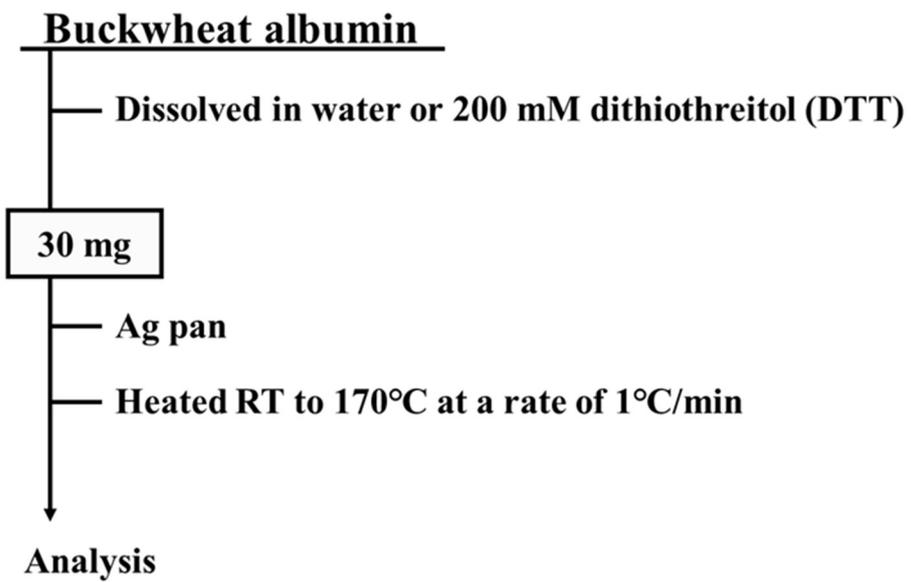


Figure 4-2 Method of DSC measurement.

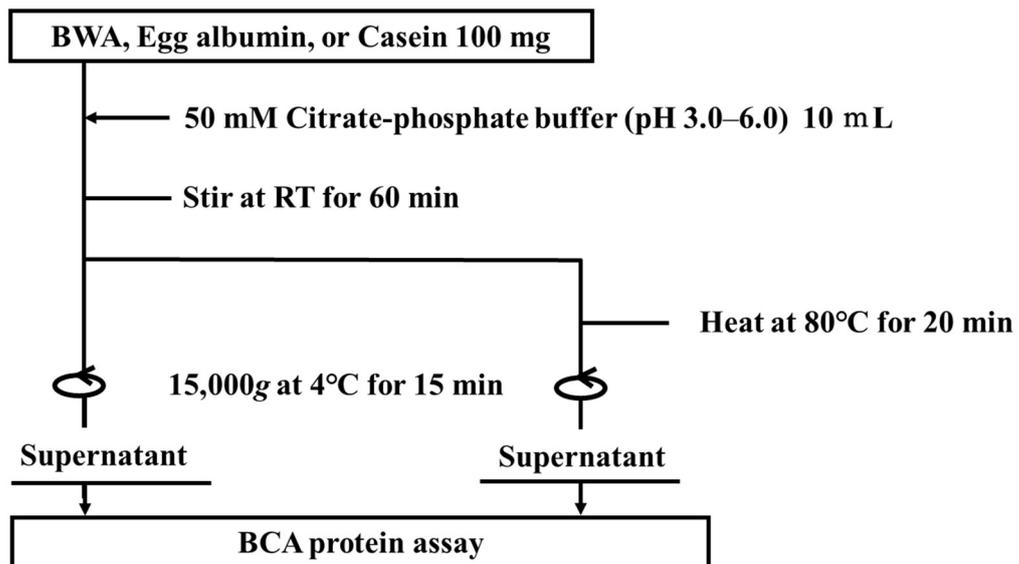


Figure 4-3 Method of solubility measurement.

#### 4-2-6 酵素製剤による蕎麦アルブミンの加水分解

酵素による加水分解は Kumagai ら (1994) の方法を参考に一部修正して行った (Kumagai *et al.*, 1994; Figure 4-4)。蕎麦アルブミン 10 mg を 0.5 mL の水に溶解し、0.5 mL の 0.002% プロテアーゼ A「アマノ」SD 溶液を加え、50°C で 15–60 分間インキュベートした。酵素反応は、沸騰湯浴中で 10 分間ボイルし停止させた。各加水分解物は凍結乾燥し、使用するまで -20°C で保管した。

#### 4-2-7 蕎麦アルブミンの加水分解度測定

加水分解度は Kumagai ら (1994) の方法を参考に一部修正して行った (Kumagai *et al.*, 1994)。蕎麦アルブミン加水分解物 (1 mg/mL) は 10 mL の 1.2 M トリクロロ酢酸と混合し、室温で 30 分間攪拌した。遠心分離 (13,000×g、20 min、20°C) 後、上清から 350 µL を分取し 0.42 M NaOH を 500 µL 加え中和した。タンパク質/ペプチド濃度は BCA 法により測定した。加水分解度は上清中のペプチド濃度と総タンパク質濃度から算出した。

Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) は Laemmli (1970) の方法 (Laemmli, 1970) で行い、ゲルは 0.025% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 solution (Wako Pure Chemical Industries) で染色した。

#### 4-2-8 $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性

$\alpha$ -アミラーゼ阻害活性は 2-2-1-3 (1) と同様の方法で行った。

#### 4-2-9 乳化性測定

蕎麦アルブミンとその加水分解物の乳化性は Ina ら (2019) の方

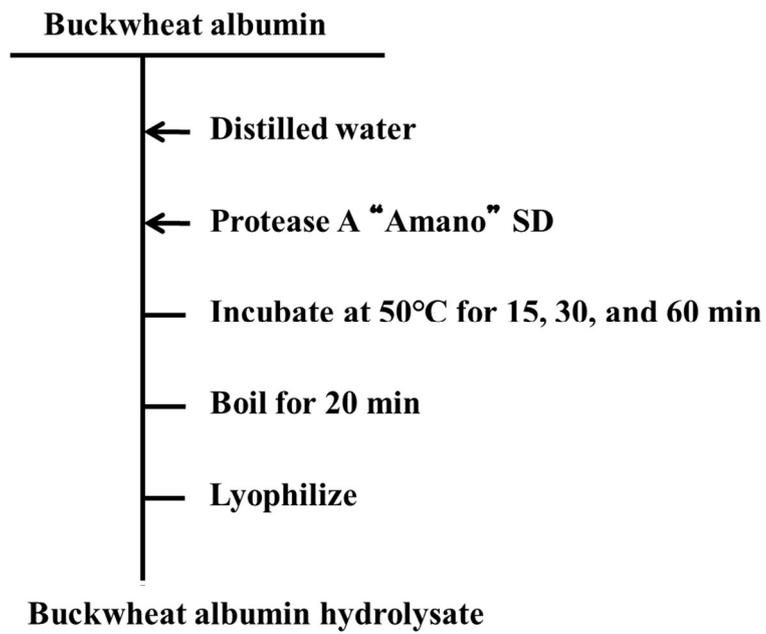


Figure 4-4 Hydrolysis of buckwheat by protease A "amano" SD.

法を一部修正し、pH 3.0–6.0 の溶液中で卵アルブミンおよびカゼインと比較し評価した (Ina *et al.*, 2019; Figure 4-5)。蕎麦アルブミン (未処理あるいは加水分解物)、卵アルブミン、あるいはカゼイン (24 mg) は 50 mM クエン酸リン酸 buffer (pH 3.0–6.0) 2.4 mL に懸濁し、室温で 10 分間攪拌した。次に、コーン油 0.8 mL を各懸濁液に加え、homogeniser (Phycostron, NS-52K; Microtec Co., Ltd., Chiba, Japan) で乳化 (25,000 rpm、1 min) した。乳化後 0、10、および 30 分に、50  $\mu$ L のエマルジョンを試験管底部から採取し、5 mL of 0.1% SDS 溶液で希釈した。希釈したエマルジョンの吸光度は 500 nm で測定した。乳化能 (Emulsifying Activity: EA) はホモジナイズ直後に測定した 500 nm での吸光度から、乳化安定性 (Emulsion Stability: ES) はホモジナイズ後 10 分および 30 分後の吸光度から算出した。

#### 4-2-10 起泡性測定

蕎麦アルブミンとその加水分解物の起泡性は Ina ら (2019) の方法を一部修正し、pH 3.0–6.0 の溶液中で卵アルブミンおよびカゼインと比較し評価した (Ina *et al.*, 2019; Figure 4-6)。蕎麦アルブミン (未処理あるいは加水分解物)、卵アルブミン、あるいはカゼイン (25 mg) は 50 mM クエン酸リン酸 buffer (pH 3.0–6.0) 5 mL に懸濁し、室温で 10 分間攪拌した。各懸濁液は、泡立て器 (Creamer Qto CQT-45, Hario, Tokyo, Japan) にて 1 分間泡立てた。起泡体積は泡立て後 0–120 分後に測定した。起泡能 (Foaming Capacity: FC) は泡立て直後の起泡体積から、起泡安定性 (Foaming Stability: FS) は泡立て後 30 および 120 分後の起泡体積を測定し算出した。

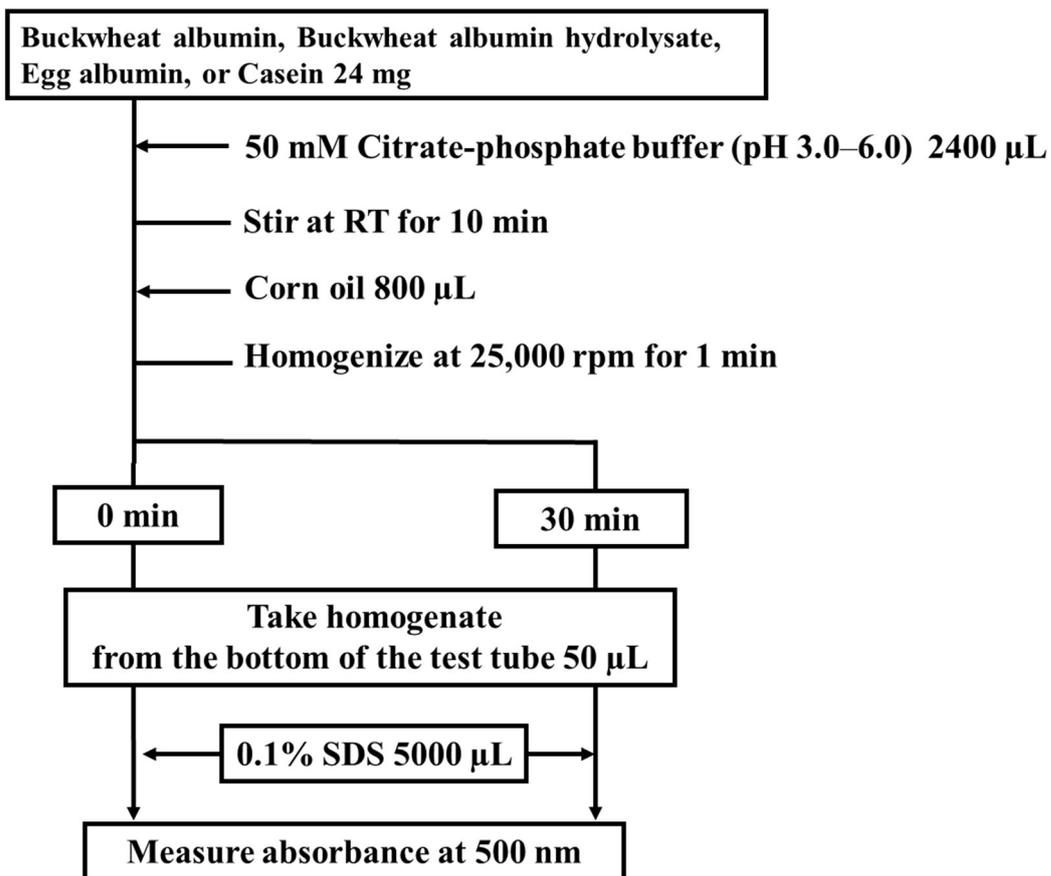


Figure 4-5 Measurement of emulsifying properties.

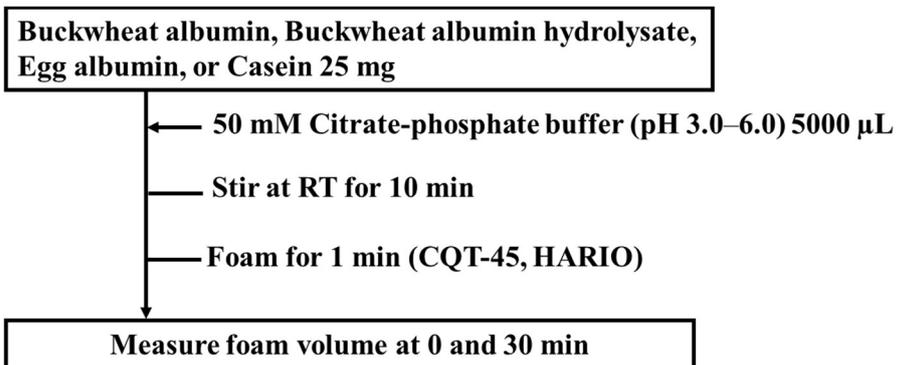
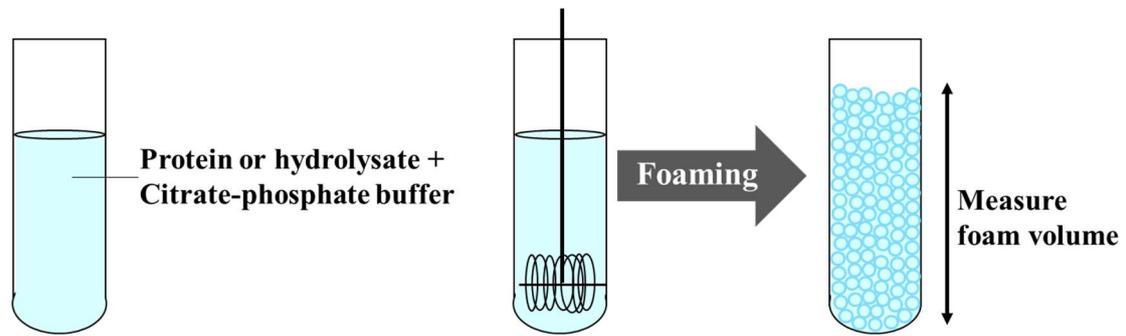


Figure 4-6 Measurement of foaming properties.

#### 4-2-11 統計解析

各グループ間の比較は、エクセル統計 Version 7.0（株式会社エスミ、東京）の Tukey-Kramer の検定を使用して行い  $p$  値が 0.05 未満を統計的に有意なものとした。

### 4-3 結果

#### 4-3-1 蕎麦アルブミンの熱安定性の評価

蕎麦および小麦アルブミンの熱安定性は、100°Cで10–120分間加熱した後に $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性を測定し評価した (Figure 4-7)。小麦および蕎麦アルブミンのどちらも、100°Cで120分間加熱後も高い $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性を維持した (各々98.2%および75.4%)。

#### 4-3-2 蕎麦アルブミンの変性温度

DTTを添加時と無添加時の蕎麦アルブミンの示差走査熱量測定 (DSC) サーモグラムを Figure 4-8(A)に示す。DTT無添加時は、蕎麦アルブミンの変性吸熱ピークは、変性開始温度 ( $T_i$ ) が110°Cで、変性終了温度 ( $T_f$ ) が160°Cの幅広い範囲観察された。そのピーク温度 ( $T_p$ ) とエンタルピー変化 ( $\Delta H$ ) はそれぞれ148.4°Cと3.45 J/gであった (Figure 4-8(A))。対照的に、DTT添加時の蕎麦アルブミンの変性-吸熱ピークはより鋭く、 $T_i$ 、 $T_f$ 、 $T_p$ 、および $\Delta H$ はそれぞれ110°C、160°C、136.3°C、および4.05 J/gであった (Figure 4-8(A))。さらに、DTT添加時にはゲル化が観察された (Figure 4-8(B))。

#### 4-3-3 蕎麦アルブミンの溶解性

Figure 4-9は、加熱の前後の、pH 3.0–6.0での蕎麦アルブミン、卵アルブミン、およびカゼインの溶解性を示している。蕎麦アルブミンは、測定した全てのpHで高い溶解性を示し、加熱後もその高い溶解性を保持していた。卵アルブミンと比較すると、卵アルブミンの溶解性は蕎麦アルブミンの溶解性の50–60%であり、加熱後、pH 4.0を超えると約10%に低下した。カゼインの溶解性はpH 3.5–5.0

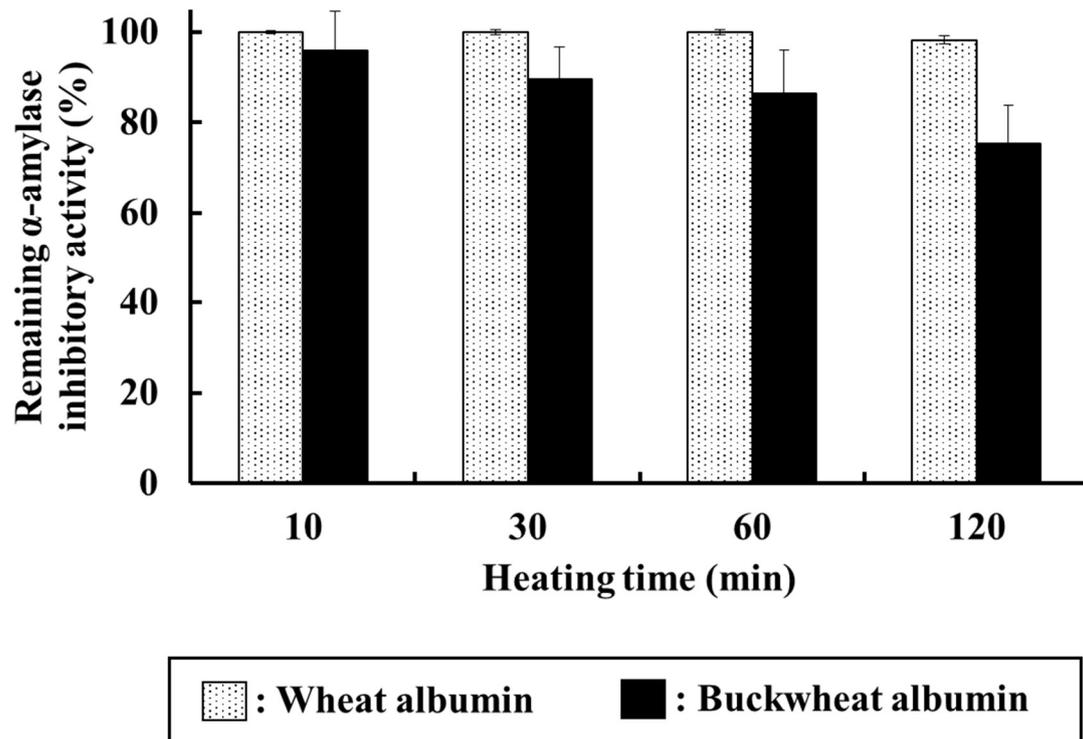


Figure 4-7 Thermal stability of wheat and buckwheat  $\alpha$ -AIs. Each value is the mean of 2-3 experiments with S.E. shown as a vertical bar.

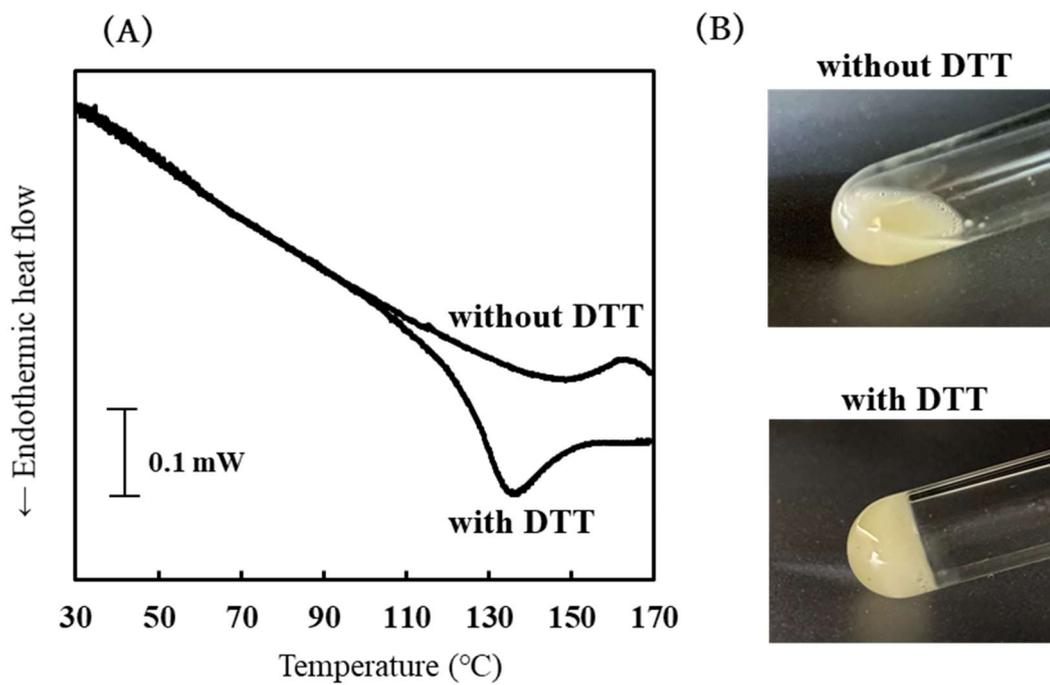


Figure 4-8 (A) DSC thermogram of buckwheat albumin with and without the addition of DTT. (B) Gelation of buckwheat albumin with the addition of DTT.

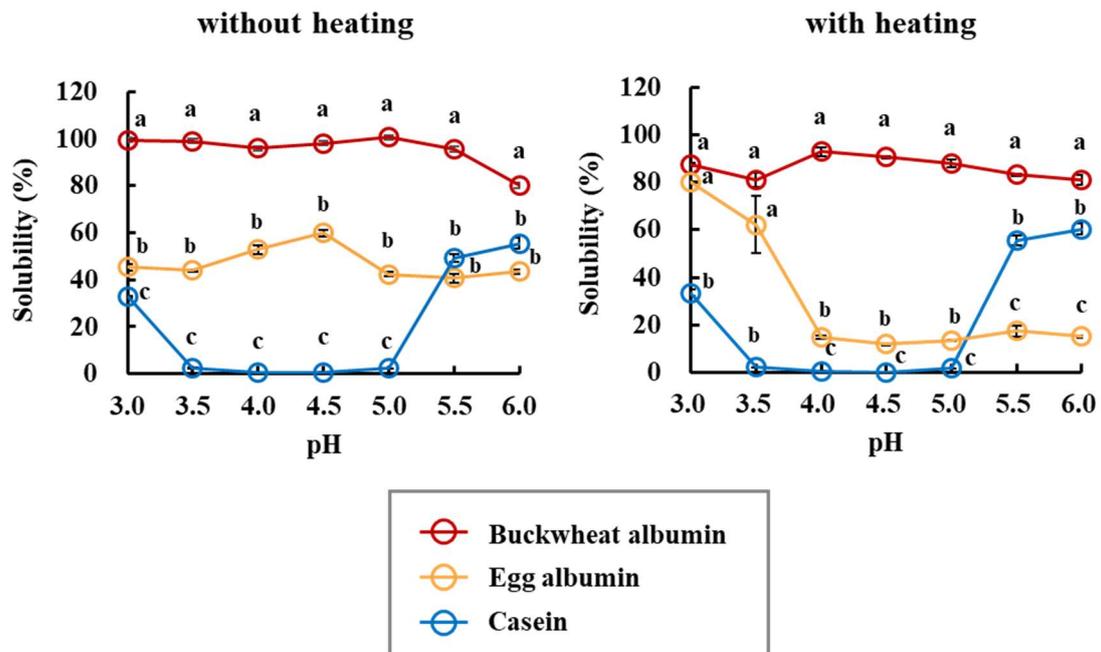


Figure 4-9 Solubility profiles buckwheat albumin, casein, and egg albumin in solutions at different pH values with and without heating at 80°C for 20 min. Results are expressed as the mean of three experiments  $\pm$  SD.

の間で非常に低く、pH 5.5 を超えると蕎麦アルブミンの溶解度の50-60%程度まで増加したが、加熱後も変化しなかった。

#### 4-3-4 蕎麦アルブミンの加水分解度

プロテアーゼによる蕎麦アルブミンの加水分解の程度は時間の経過と共に増加し、60 分間の加水分解後には < 15 kDa のペプチドに分解された (Figure 4-10)。加水分解度は、15 分、30 分、60 分処理後、それぞれ 31.7%、47.1%、63.3%であった (Figure 4-11)。

#### 4-3-5 酵素製剤による加水分解後の蕎麦アルブミンの $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性

プロテアーゼ処理後の蕎麦アルブミンの残存する  $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性を Figure 4-12 に示す。残存する  $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性は、15 分、30 分、および 60 分のプロテアーゼ処理後、それぞれ  $96.1\% \pm 0.008$ 、 $94.8\% \pm 0.008$ 、および  $95.2\% \pm 0.014$  であった。プロテアーゼによって加水分解されたにも関わらず (Figure 4-10 および Figure 4-11)、蕎麦アルブミンは 60 分のプロテアーゼ処理後でも依然として  $\alpha$ -アミラーゼに対する元の阻害活性の 95.2%を保持していた。

#### 4-3-6 蕎麦アルブミンおよびその加水分解物の乳化性

蕎麦アルブミン、蕎麦アルブミン加水分解物、卵アルブミン、およびカゼインの乳化性を Figure 4-13 に示す。蕎麦アルブミンと卵アルブミンの両方が、測定した全ての pH の 0 分で高い乳化性

(Emulsifying Activity: EA) を示した。乳化後 30 分での蕎麦アルブミンの乳化安定性 (Emulsifying Stability: ES) はその EA の約 50%

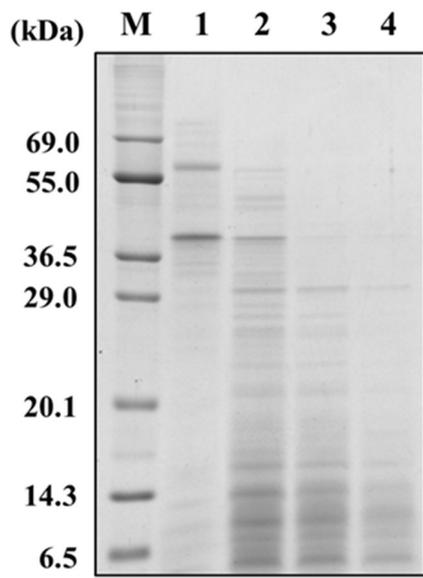


Figure 4-10 SDS-PAGE of buckwheat albumin before and after protease treatment. (M) Marker; (1) unhydrolysed; (2) hydrolysed by protease for 15 min; (3) hydrolysed by protease for 30 min; (4) hydro-lysed by protease for 60 min.

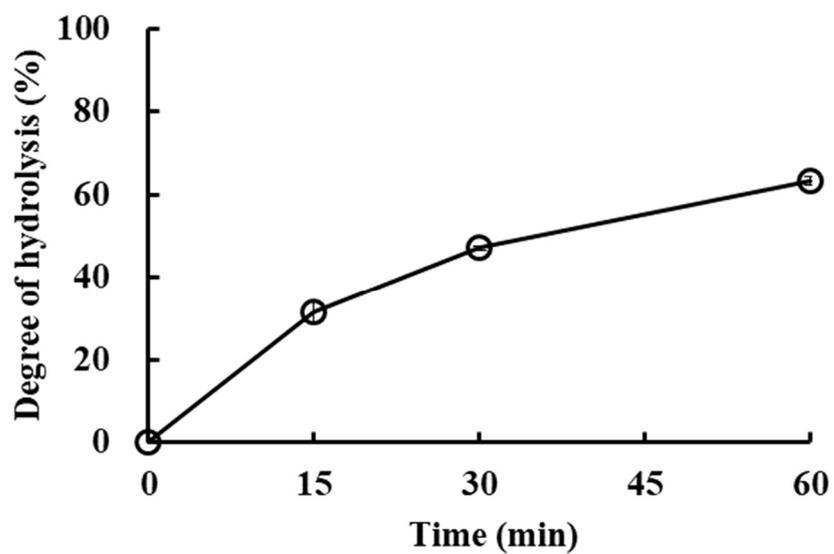


Figure 4-11 Change in degree of hydrolysis of buckwheat albumin treated by protease. Results are expressed as the mean of three experiments  $\pm$  SD.

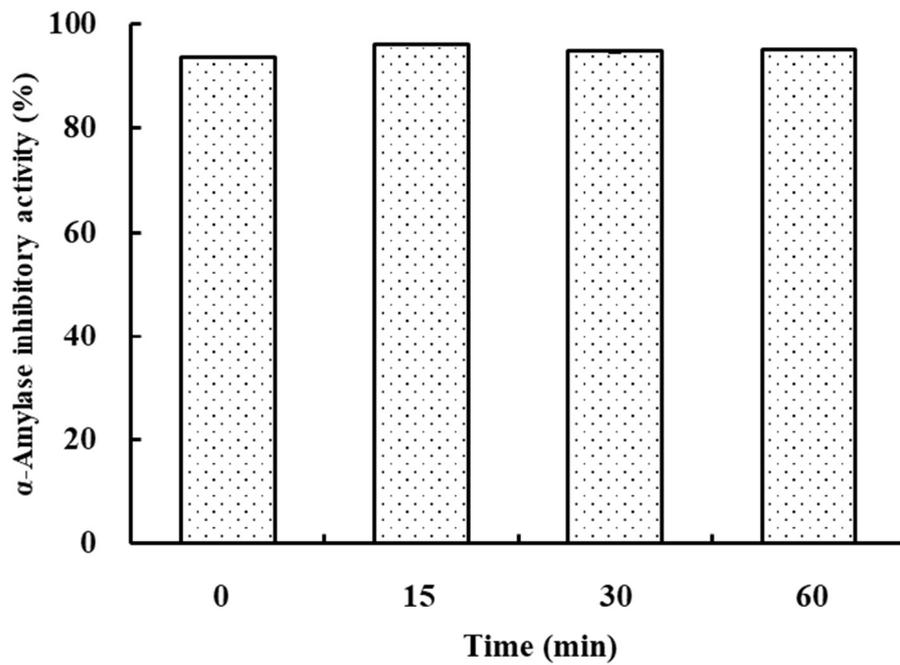


Figure 4-12  $\alpha$ -Amylase inhibitory activity of buckwheat albumin before and after hydrolysis by protease up to 60 min. Results are expressed as the mean of three experiments  $\pm$  SD.

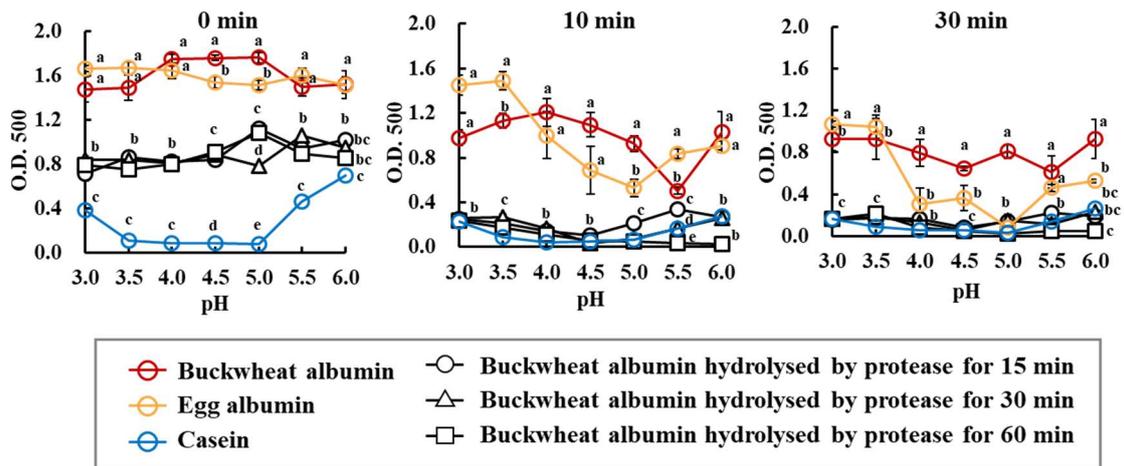


Figure 4-13 Emulsifying properties of buckwheat albumin and its hydrolysate in solutions of various pH immediately, 10 min and 30 min after emulsification compared with those of egg albumin and casein. Results are expressed as the mean of three experiments  $\pm$  SD.

であった。ただし、pH 4.0–6.0 では蕎麦アルブミンは卵アルブミンよりも高い乳化性を示し、pH 3.0–3.5 ではほぼ同程度であった。カゼインは、特に pH 3.5–5.0 の間の 0 分で低い EA を示し、10 分と 30 分での ES は、測定した全ての pH での EA よりも低かった。蕎麦アルブミン加水分解物は、加水分解されていない蕎麦アルブミンの 50% の EA を示し、ES は EA よりもかなり低かった。

#### 4-3-7 蕎麦アルブミンおよびその加水分解物の起泡性

蕎麦アルブミン、その加水分解物、卵アルブミン、およびカゼインの起泡性を Figure 4-14 に示す。蕎麦アルブミンは、測定した全ての pH で高い起泡性 (Foaming Capacity: FC) を示し、10 分および 30 分での起泡安定性 (Foaming Stability: FS) は FC の約 80% であった。卵アルブミンとカゼインと比較すると、カゼインは蕎麦アルブミンの 20–60% の FC を示し、卵アルブミンは蕎麦アルブミンの 30–70% の FS を示した。蕎麦アルブミン加水分解物の FC および FS も高く、未分解の蕎麦アルブミンのものに近かった。

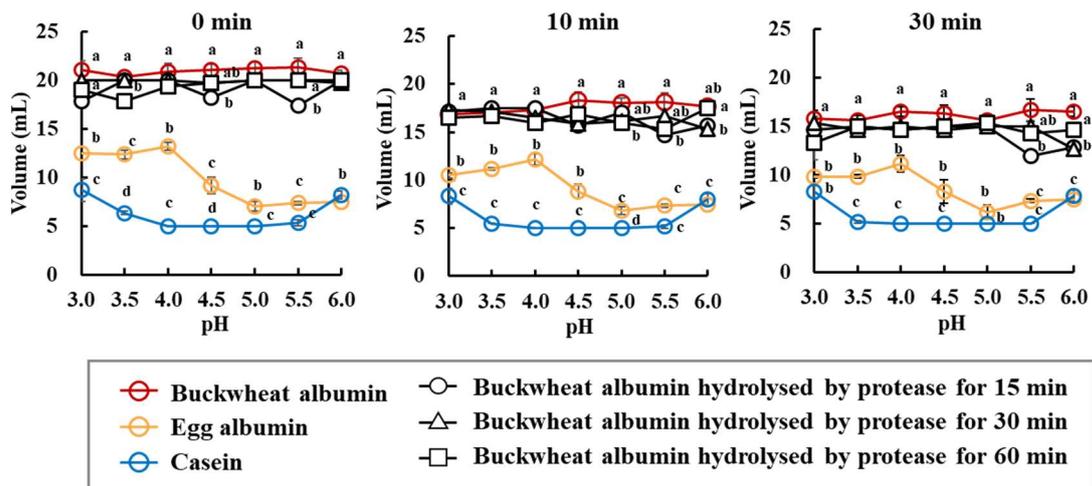


Figure 4-14 Foaming properties of buckwheat albumin and its hydrolysate in solutions of various pH immediately, 10 min and 30 min after whipping compared with those of egg albumin and casein. Results are expressed as the mean of three experiments  $\pm$  SD.

#### 4-4 考察

食品工業において加熱による殺菌・滅菌は不可欠なプロセスである。食品の pH は通常 3-6 の範囲にあるため、タンパク質を食品産業の原料として利用するには、生理学的機能に加えて、耐熱性、水への溶解性、弱酸性下での表面特性などの物理化学的機能を考慮する必要がある。さらに、前章までに、蕎麦アルブミンとその加水分解物の両方が、デンプン負荷時の血糖値の上昇を抑制することを示した (Ninomiya *et al.*, 2018, Ninomiya *et al.*, 2022b)。したがって、本章では、蕎麦アルブミンの機能性食品成分としての潜在的な用途を見出すために、蕎麦アルブミンとその加水分解物の物理化学的機能を評価した。

蕎麦アルブミンの熱耐性は、加熱後の  $\alpha$ -アミラーゼに対する残存活性と DTT 添加時と無添加時の DSC による変性温度を用いて評価した。Figure 4-1 に示すように、小麦および蕎麦アルブミンは、加熱後も高い  $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性を維持していた。小麦アルブミンは分子内ジスルフィド結合により高い熱安定性を示すと報告されており (Oneda *et al.*, 2004)、100°C で 120 分間加熱後でも  $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性を 98%以上保持した結果と一致する。蕎麦アルブミンの  $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性は、加熱時間に伴い徐々に低下したが、120 分後も 75%を示した。この結果は、蕎麦アルブミンの糖鎖が  $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性を有し、加熱による変性後もその活性を保持しているという仮定と一致する。また、蕎麦アルブミンの熱安定性は高く、加熱を伴う食品の加工にも利用可能だと考えられる。

DSC サーマグラムによると、蕎麦アルブミンの変性ピーク温度 ( $T_p$ ) とエンタルピー変化 ( $\Delta H$ ) はそれぞれ 148.4°C と 3.45 J/g であった (Figure 4-8)。本章で得られた DSC による高い変性温度は、

蕎麦アルブミンの加熱後に残存する  $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性で認められた耐熱性と一致している (Figure 4-1)。また、蕎麦アルブミンは、pH 3-6 の溶液で 80-100% の溶解性を示した。これは、加熱後も高い溶解性を維持するという点で卵アルブミンとは異なる (Figure 4-3)。蕎麦アルブミンの耐熱性と高い水への溶解性は、製造工程で加熱による殺菌・滅菌する必要のある食品へ応用するために望ましい特性である。

DTT 添加時は、 $T_p$  が 136.3°C に低下し、 $\Delta H$  が 4.05 J/g に上昇した。これは、タンパク質構造の安定性にジスルフィド結合が関与していることを示している。ジスルフィド結合はタンパク質の熱安定性に寄与することが知られており (Matsuda *et al.*, 1982, Wetzel *et al.*, 1988)、小麦および米アルブミンは、分子間ジスルフィド結合のために耐熱性があると報告されている (Silano and Zahnley, 1978; Oneda *et al.*, 2004; Ina *et al.*, 2019)。蕎麦アルブミンは小麦アルブミンよりもシステインの含有量が高いため (Javornik and Kreft, 1984; Zhu *et al.*, 2006)、形成されるジスルフィド結合の数が多いため、構造の安定性が向上する可能性が考えられる。さらに、DTT 添加時の蕎麦アルブミンでゲル化が観察された (Figure 4-2)。これは、DTT によって切断された分子内ジスルフィド結合が他のタンパク質分子のチオール (SH) 基と再結合し、分子内ネットワークを形成した結果である可能性が考えられる (Hashizume and Sato, 1988; Matsudomi *et al.*, 1992; Otte *et al.*, 2000)。

DTT によるジスルフィド結合の切断は蕎麦アルブミンの  $T_p$  を低下させたが、その値は依然として 100°C 超を示した。対照的に、DTT の添加により、米アルブミンの  $T_p$  は 100.8°C から 52.0°C に低下した (Ina *et al.*, 2019)。米アルブミンとは異なり、蕎麦アルブミ

ンは糖タンパク質であり (Ninomiya *et al.*, 2018)、タンパク質のグリコシル化は  $T_p$  の増強に効果的であると報告されている (Takano *et al.*, 2007)。したがって、蕎麦アルブミンの高い耐熱性は、部分的にそのグリコシル化構造に起因している可能性が考えられる。

乳化および起泡性は、食品添加物としてタンパク質を使用する際に考慮すべき重要な特性である。両親媒性のタンパク質は、疎水性領域を油相または気泡に、親水性領域を水相に向けることにより、優れた界面活性剤として機能する。ただし、ほとんどのタンパク質には、より大きな疎水性領域が含まれている。タンパク質のグリコシル化は、親水性領域を増やすことによって物理化学的特性を改善することが知られている (Nakamura and Kato, 2000; Takano *et al.*, 2007; Matemu *et al.*, 2009)。グリコシル化されている蕎麦アルブミンは、優れた親水性と疎水性のバランスを持ち、その結果、より優れた機能特性を示すことが期待される。そこで、蕎麦アルブミンの乳化および起泡性の検討を行った。

卵タンパク質は表面特性が高いことが知られているが、カゼインは酸性 pH への溶解度が低く、乳化性と起泡性が低いと考えられている。したがって、卵アルブミンとカゼインはそれぞれポジティブコントロールとネガティブコントロールとして使用した。卵タンパク質、カゼインナトリウム、およびカゼインは、中性 pH で一定レベルの乳化性 (EA) および乳化安定性 (ES) を示すことが報告されている (Ven der Ven, 2001; Kuan *et al.*, 2011)。蕎麦アルブミンは、pH 3-6 の卵アルブミンとほぼ同じ高い EA を示した。さらに、乳化後 30 分での卵アルブミンの ES は、pH 4-6 の EA の 10-25% に減少した。一方、蕎麦アルブミンの ES は、測定した全ての pH で EA の 50% に維持された (Figure 4-7)。これらの結果は、蕎麦アル

ブミンが卵アルブミンよりも親水性と疎水性のバランスが良く、エマルションを形成していることを示唆している。カゼインは、pH 5 まで低い EA を示したが、pH が 6 に近づくにつれて徐々に EA が増加した (Figure 4-7)。カゼインの EA と ES が低いのは、pH 5 未満での溶解性が低いためである可能性が考えられる (Figure 4-3)。

卵タンパク質は中性 pH で優れた起泡性を持つことが知られており (Kumagai *et al.*, 2002; Raikos *et al.*, 2007; Gharbi and Labbafi, 2019)、メレンゲ、スポンジケーキ、ホイップクリームによく使用されている。蕎麦アルブミンの起泡性 (FC) と起泡安定性 (FS) はどちらも、pH 3-6 の卵アルブミンおよびカゼインの FC と FS よりもはるかに高かった (Figure 4-8)。卵アルブミンとカゼインの FC は、蕎麦アルブミンの FC の各々 30-60% と 25-45% であった。また、卵アルブミンとカゼインの FS は、蕎麦アルブミンの FS の各々 30-70% と 30-55% であった。このように、蕎麦アルブミンは卵アルブミンやカゼインよりも起泡性が高く、さまざまな食品の製造に応用可能だということが示唆された。

乳化性や起泡性などの物理化学的特性は、溶解度の影響を強く受ける (Kinsella and Melachouris, 1976; Ahmedna *et al.*, 1999)。蕎麦アルブミンは、加熱後も pH 3-6 の溶液に高い溶解性を示した。酸性 pH での蕎麦アルブミンの乳化および起泡性はカゼインのものより高かった (Figure 4-8)。カゼインの乳化性と起泡性が低いのは、pH 3-6 での溶解性が低いためだと考えられる。タンパク質の溶解性は、空気-水界面でのタンパク質の吸着に影響を与える高い正電荷を必要とするため、タンパク質の溶解性は起泡性を向上するために考慮すべき事項である (Ahmedna *et al.*, 1999)。

乳化および起泡性は、加水分解後に変化することがよく見受けら

れる (Kumagai *et al.*, 1994; Zeng *et al.*, 2013)。蕎麦アルブミンは、プロテアーゼ処理によって最大 60%加水分解された (Figure 4-5)。しかし、 $\alpha$ -アミラーゼに対する阻害活性は、加水分解後も変化が認められなかった (Figure 4-6)。したがって、蕎麦アルブミン加水分解物が優れた表面特性を有する場合、糖尿病を予防するための機能性食品の素材として有用である。

ペプチドは、界面張力を低下させ、液滴の崩壊を促進し、再合体を防ぐことにより、乳化および起泡性に影響を与えることがある (Walstra and Smulders, 1997)。本章では、蕎麦アルブミンの EA と ES は加水分解によって減少したが、FC と FS は未分解の蕎麦アルブミンと同等に保持された。したがって、蕎麦アルブミン加水分解物の表面特性を発揮するメカニズムは、未分解の蕎麦アルブミンとは異なる可能性が考えられる。この結果と同様に、ミールワームのタンパク質は加水分解時に EA の減少を示したが、FC の増加を示したと報告されている (Leni *et al.*, 2020)。加水分解はしばしばタンパク質の疎水性領域を表面に露出させ、親水性と疎水性のバランスを変化させる。また、乳化および起泡性には適した親水性-疎水性バランス (Hydrophilic-Lipophilic Balance: HLB) があることが知られている。通常の HLB 範囲は 1-20 で、数値が大きいほど水溶性が高い (親水性が高い) ことを示し、その逆も同様である。乳化に適した HLB は 8-18 といわれているが、起泡性の場合にはより高い値のほうが好ましいとされている (Zhang *et al.*, 2012)。疎水性粒子は、気泡の液面近辺に並び、液膜間の圧力差を減少させることによって泡沫を安定化させることが報告されている (Kumagai *et al.*, 1991)。したがって、加水分解し疎水性が向上することにより、蕎麦アルブミン加水分解物が高い FC および FS を示した可能性が考えられる。

#### 4-5 小括

本章では、蕎麦アルブミンの食品素材としての利用のため、蕎麦アルブミンの耐熱性、水への溶解性、乳化性および起泡性を検討し、機能性食品への応用の可能性を検討した。また、部分的なタンパク質の分解はタンパク質の表面特性を変化させることがあるため、蕎麦のアルブミン加水分解物の乳化および起泡性についても検討した。

蕎麦アルブミンは、150°C 近くの変性ピーク温度 ( $T_p$ ) で高い耐熱性を示し、加熱後も pH 3-6 の溶液に高い溶解性を示した。DTT 添加時では、ゲル化とともにわずかに  $T_p$  の減少が観察された。これは、蕎麦アルブミンがグリコシル化しているだけでなく、ジスルフィド結合の存在が部分的に起因している可能性が考えられる。さらに、蕎麦アルブミンは、弱酸性 pH で優れた乳化および起泡性を有することが示された。また、蕎麦アルブミンは加水分解により乳化性は低下したが、起泡性は未分解のものと同様であった。蕎麦アルブミン加水分解物の乳化性と起泡性にこれほどの差が表れたのは、乳化および起泡に最適な親水性-疎水性バランス (HLB) が異なるためだと考えられる。したがって、蕎麦アルブミンは、食後の血糖値の上昇を防ぐだけでなく、パンやケーキなど加熱による殺菌が必要な加工食品などの様々な機能性食品に利用可能と考えられる。

## 第 5 章 総括

糖尿病 (Diabetes mellitus: DM) は世界中で深刻な疾病の一つだといわれており、2014 年の患者数は世界で 4 億 2200 万人と推定されている。DM は、網膜症、腎症、神経障害、血管障害などの病変を突然発症するまで、患者が症状を認識しないことが多いため、“サイレントキラー”と呼ばれている。DM 患者の約 90%以上を占める II 型 DM とその合併症を予防する方法の 1 つは、適切な食事を摂取することによって食後の血糖値の上昇を抑制することである。食後の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

穀物中のタンパク質には食後の血糖値上昇を抑制する効果を有するものがいくつか報告されている。穀物は、しばしば種子に高濃度の  $\alpha$ -アミラーゼインヒビター ( $\alpha$ -Amylase Inhibitor:  $\alpha$ -AI) を含んでいる。 $\alpha$ -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。そのため、 $\alpha$ -AI は食後血糖値上昇抑制作用を有することが報告されている。

本研究では、世界中で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広義の穀物である蕎麦のアルブミン画分中に含まれる  $\alpha$ -AI の食後血糖値上昇抑制効果を小麦および米のアルブミンと比較し、その作用メカニズムについて検討した。また、蕎麦アルブミンの物理化学的特性、機能性についても検討した。

本研究は、第 1 章 序論および第 2~4 章から成り、内容は以下の通りである。

第2章では、動物実験により、蕎麦アルブミンの食後血糖値上昇抑制効果について検討し、小麦および米のアルブミンと比較した。また *in vitro* で、蕎麦、米、小麦のアルブミンの  $\alpha$ -アミラーゼの阻害活性を測定し、酵素動力学的な解析を行った。また、食物繊維へのグルコース吸着特性を解明するため、グルコース吸着能について拡散モデルを構築し、アルブミンの定量的評価を行った。得られた知見は以下の通りである。

特定保健用食品として既に報告されている小麦アルブミンと同様に蕎麦アルブミンもデンプン負荷後の食後の血糖値上昇抑制効果を示した。このメカニズムは、蕎麦および小麦アルブミンは哺乳類の  $\alpha$ -アミラーゼ活性を競合的および非競合的に阻害することによることが明らかとなった。米アルブミンは哺乳類の  $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性は認められなかったにも関わらず、デンプンおよびグルコース負荷の両方の食後の血糖値上昇を抑制した。蕎麦アルブミンは、酵素によって低分子に加水分解されたが、小麦および米アルブミンは難消化性を示した。二次元電気泳動の結果、蕎麦の  $\alpha$ -AI は *pI* 4.1-4.8 の酸性タンパク質であり、小麦および米アルブミンと異なるタンパク質であることが示唆された。

米アルブミンの食後血糖値上昇抑制メカニズムを検討するため、透析膜を通過するグルコース拡散速度を記述するためのモデルを構築し、水溶性高分子に吸着するグルコースの拡散実験を行った。透析膜を通過するグルコースの拡散速度を表すモデルが開発され、水溶性高分子の存在下および非存在下でのグルコースの拡散速度に関するデータはモデルによって良好に記述された。水溶性高分子に対する透析膜におけるグルコースの拡散係数  $D$  は、グルコース濃度に

関係なく一定を示した。グルコース濃度の増加に伴い、水溶性高分子へのグルコース吸着量は直線的に増加し、米アルブミンも水溶性高分子と同等にグルコースを吸着していることが示さ、様々な水溶性高分子に吸着されたグルコース量を評価しうることが明らかとなった。さらに、グルコース拡散速度の低下は、粘度との相関が認められなかった。

したがって、各穀物アルブミンの血糖値上昇抑制メカニズムについては、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競合的および非競合的な阻害、米アルブミンは食物繊維様に働き、グルコースを吸着することに起因することが示唆された。

第3章では、蕎麦アルブミンを酵素により加水分解し、残存する  $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性および *in vivo* における蕎麦および小麦アルブミン加水分解物の食後の血糖値上昇に対する抑制効果を検討し、ゲル濾過クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、および High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) を使用して精製した後、 $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性に関与するペプチドのアミノ酸配列の分析を行った。得られた知見は以下の通りである。

蕎麦アルブミンは、消化酵素によって加水分解された後も  $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性を維持し、デンプン負荷試験において血糖値上昇を抑制した。一方、小麦アルブミンは加水分解することにより  $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性が低下し、デンプン負荷試験において血糖値上昇抑制効果を示さなかった。蕎麦アルブミンのアミノ酸配列と分子量は小麦アルブミンのものとは異なっていた。これらのことから、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  $\alpha$ -アミラーゼ阻害であることが明らかとなった。したがって、蕎麦アルブミンは、食後の血糖値上昇を抑制するため特定保健用食品の機能性成分としての利用が可能だと考えられるが、メカニズムの解明にはさらなる検討が必要である。

第4章では、蕎麦アルブミンの食品素材としての利用のため、蕎麦アルブミンの耐熱性、水への溶解性、乳化性および起泡性を検討し、機能性食品への応用の可能性を検討した。また、部分的なタンパク質の分解はタンパク質の表面特性を変化させることがあるため、蕎麦のアルブミン加水分解物の乳化および起泡性についても検討した。得られた知見は以下の通りである。

蕎麦アルブミンは、 $150^{\circ}\text{C}$  近くの変性ピーク温度 ( $T_p$ ) で高い耐熱性を示し、加熱後も pH 3–6 の溶液に高い溶解性を示した。DTT 添加時では、ゲル化とともにわずかに  $T_p$  の減少が観察された。これは、蕎麦アルブミンがグリコシル化しているだけでなく、ジスルフィド結合の存在が部分的に起因している可能性が考えられる。さらに、蕎麦アルブミンは、弱酸性 pH で優れた乳化および起泡性を有することが示された。また、蕎麦アルブミンは加水分解により乳化性は低下したが、起泡性は未分解のものとほぼ同等であった。蕎麦アルブミン加水分解物の乳化性と起泡性にこれほどの差が表れたのは、乳化および起泡に最適な親水性–疎水性バランス (HLB) が異なるためだと考えられる。したがって、蕎麦アルブミンは、食後の血糖値の上昇を防ぐだけでなく、パンやケーキなど加熱による殺菌が必要な加工食品などの様々な機能性食品に利用可能と考えられる。

以上、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初めて明らかにした。また、その血糖値上昇抑制メカニズムについては、蕎麦アルブミンはペプチドなどが  $\alpha$ -アミラーゼを競合的に阻害することによることを明らかとし、主にタンパク質が  $\alpha$ -アミラーゼを非競合的に阻害する小麦アルブミンとグルコースを吸着する米アルブミンと異なることを示した。さらに、蕎麦アルブミンは、高い熱安定性、水への溶解性、乳化性、起泡性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 (Table 5-1)。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において大きく寄与することが期待される。

Table 5-1 Summary of this study

|   | Buckwheat   | Wheat                                   | Rice                          |
|---|---|---|-------------------------------|
| Mammalian pancreatic $\alpha$ -amylase inhibition   | ○   | ○                                       | ×                             |
| Indigestibility                                     | ×   | ○                                       | ○                             |
| $\alpha$ -Amylase inhibition by albumin hydrolysate | ○   | △                                       | —                             |
| Inhibition manner                                   | Competitive   | Non-competitive                         | —                             |
| Thermal stability                                   | ○   | ○                                       | ○                             |
| Isoelectric point                                   | pI 4.1-4.8  | pI 4.5-5.7                              | pI 5.5-7.2                    |
| Oral starch tolerance test                          | ○   | ○                                       | ○                             |
| Oral glucose tolerance test                         | ×   | ×                                       | ○                             |
| Mechanism for suppressing blood glucose elevation   | $\alpha$ -Amylase inhibition by peptides or sugar chain | $\alpha$ -Amylase inhibition by protein | Glucose adsorption by protein |

|                   | Buckwheat | Wheat | Rice | Egg |
|-------------------|-----------|-------|------|-----|
| Thermal stability | ○         | ○     | ○    | ×   |

|                      | Buckwheat | Hydrolysate | Egg | Casein |
|----------------------|-----------|-------------|-----|--------|
| Solubility           | ◎         | —           | △   | ×      |
| Emulsifying property | ◎         | △           | ○   | ×      |
| Foaming property     | ◎         | ◎           | ○   | ×      |

## 引用文献

Ahmedna, M., Prinyawiwatkul, W., Rao, R. M. (1999) Solubilized wheat protein isolate: functional properties and potential food applications. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 1340–1345.

Alberti, K. G. M. M., Zimmet, P. Z. (1998) Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus, Provisional report of a WHO Consultation. *Diabet. Med.* **15**, 539-553.

Arai, S., Yasuoka, A., Abe, K. (2008) Functional food science and food for specified health use policy in Japan: State of the art. *J. Lipid Res.* **19**, 69–73.

Baker, J. E. (1988) Purification of an  $\alpha$ -amylase inhibitor from wheat, *Triticum aestivum*, and its interaction with amylase from the rice, weevil, *Sitophilus orizae* (Coleoptera: Curculionidae). *Insect Biochem.* **18**, 107-116.

Bird, R.B., Stewart, W.E, Lightfoot, E. N. (1960) Transport Phenomena (pp. 519–553). New York: John Willey & Sons, Inc.

Blackburn, N. A., Redfern, J. S., Jaris, H., Holgate, A. M., Hanning, I., Schrpello, J. H. B., Johnson, I. T., Read, N. W. (1984) The mechanism of action of guar gum improving glucose tolerance in man. *Clin. Sci.* **66**,

326–336.

Blanco-Labra, A., Iturbe-chiñas, F. A. (1981) Purification and characterization of an  $\alpha$ -amylase inhibitor from maize (*Zea maize*). *J. Food Biochem.* **5**, 1-17.

Braaten, J. T., Wood, P. J., Scott, F. W., Riedel, K. D., Poste, L. M., Collins, M. W. (1991) Oat gum lowers glucose and insulin after an oral glucose load. *Am. J. Clin. Nutr.* **53**, 1425-1430.

Buonocore, V., Poerio, R. (1975) Affinity column purification of amylases on protein inhibitors from wheat kernel. *J. Chromatogr.* **114**, 109–114.

Buonocore, V., Petrucci, T., Silano, V. (1977) Wheat protein inhibitors of  $\alpha$ -amylase. *Phytochem.* **16**, 811-820.

Cavallero, A., Empilli, S., Brighenti, F., Stanca, A. M. (2002) High (1 $\rightarrow$ 3, 1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -glucan barley fractions in bread making and their effects on human glycemic response. *J. Cereal. Sci.* **33**, 56-66.

Chandalia, M., Garg, A., Lutjohann, D., Bergmann, K., Grundy, S. M., Brinkley, L. J. (2003) Beneficial effects of high dietary fiber intake in patients with type 2 diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* **342** (19), 1392–1398.

Dikeman, C. L. Fahey, Jr., G. C. (2006) Viscosity as related to dietary fiber: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* **46**, 649–663.

Fabek, H., Messerschmidt, S., Brulport, V., Goff, H. D. (2014) The effect of *in vitro* digestive processes on the viscosity of dietary fibres and their influence on glucose diffusion., *Food Hydrocoll.* **35**, 718–726.

Feng, G.H., Chen, M., Kreamer, K.J., Reeck, G.R. (1991) Alpha-amylase inhibitors from rice: Fractionation and selectivity toward insect, mammalian, and bacterial alpha-amylases. *Cereal Chem.* **68**, 516–526.

Feng, G. H., Richardson, M., Chen., M. S., Kramer, K. J., Morgan, T. D., Reeck, G. R. (1996)  $\alpha$ -Amylase from wheat: amino acid sequences and patterns of inhibition of insect and human  $\alpha$ -amylase. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **26**, 419-426.

Flourie, B. (1992) The influence of dietary fiber on carbohydrate digestion and of food nutritional function in health and disease (pp.181–196). London: Springer-Verlag.

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

Gadge, P. P., Wagh, S. K., Shaikh, F. K., Tak, R. D., Padul, M. V., Kachole, M. S. (2015) A bifunctional  $\alpha$ -amylase/trypsin inhibitor from pigeonpea seeds: Purification, biochemical characterization and its bio-

efficacy against *Helicoverpa armigera*. *Pest Biochem. Physiol.* **125**, 17–25.

Gharbi, N., Labbafi, M. (2019) Influence of treatment-induced modification of egg white proteins on foaming properties. *Food Hydrocoll.* **90**, 72–81.

Gibbs, B. F., Alli, I. (1998) Characterization of a purified  $\alpha$ -amylase inhibitor from white kidney beans (*Phaseolus vulgaris*). *Food Res. Int.* **31**, 217–225.

Gourgue, C. M. P., Champ, M. M. J., Lozano, Y., Delort-Laval, J. (1992) Dietary fiber from mango by products: characterization and hypoglycemic effects determined by *in vitro* methods. *J. Agric. Food Chem.* **40**, 1864–1868.

Granum, P. E. (1978) Purification and characterization of an  $\alpha$ -amylase inhibitor from rye (secale cereal) flour. *J. Food Biochem.* **2**, 103–120.

Gul, X., Yao, H. (2006) Fractionation and characterization of tartary buckwheat flour proteins. *Food Chem.* **98** (1), 90–94.

Gurney, H. P., Lurie, J. (1923) Charts for Estimating Temperature Distributions in Heating or Cooling Solid Shapes. *Ind. Eng. Chem. Res.* **15**, 1170–1172.

Hara, Y., Honda, M. (1990) The inhibition of  $\alpha$ -amylase by tea polyphenols. *Agric. Biol. Chem.* **54**, 1939-1945.

Hashizume, K., Sato, T. (1988) Gel-forming characteristics of milk proteins. 2. Role of sulfhydryl groups and disulfide bonds. *J. Dairy Sci.* **71**, 1447–1454.

Hoogenkamp, H., Kumagai, H., Wanasundara, J. (2016) Rice Protein and Rice Protein Products in "Sustainable Protein Sources", Academic Press, Elsevier, Editors: Nadathur, S. R., Wanasundara, J. P. D., Scanlin L., pp. 47-65 (Chapter 3)

Ikeda, K., Kishida, M. (1993) Digestibility of proteins in buckwheat seed. *Fagopyrum* **13**, 21–24.

Ikeda, K., Shida, K., Kishida, M. (1994)  $\alpha$ -Amylase inhibitor in buckwheat seed. *Fagopyrum* **14**, 3–6.

Ina, S., Ninomiya, K., Mogi, T., Hase, A., Ando, T., Matsukaze, N., Ogiwara, J., Akao, M., Kumagai, H., Kumagai, H. (2016) Rice (*Oryza sativa japonica*) Albumin Suppresses the elevation of blood glucose and plasma insulin levels after oral glucose loading. *J. Agric. Food Chem.* **64**, 4882–4890.

Ina, S., Hamada, A., Kaneko, T., Nakajima, N., Yamaguchi, Y., Akao, M., Kumagai, H., Kumagai, H. (2019) Physicochemical and surface

properties of rice albumin for its application as a functional food material. *Food Sci. Technol. Res.* **25** (4), 555–562.

Ina, S., Hamada, A., Nakamura, H., Yamaguchi, Y., Kumagai, H., Kumagai, H., (2020) Rice (*Oryza sativa japonica*) albumin hydrolysates suppress postprandial blood glucose elevation by adsorbing glucose and inhibiting Na<sup>+</sup>-D-glucose cotransporter SGLT1 expression. *J. Funct. Foods* **64**, 103603. (8 pages).

Iulek, J., Franco, O. L., Silva, M., Slivinski, C. T., Bloch, C., Jr., Rigden, D.J., Grossi de Sá, M.F. (2000) Purification, biochemical characterization and partial primary structure of a new  $\alpha$ -amylase inhibitor from *Secale cereal* (rye). *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **32**, 1195–1204.

Iwami, K., Sakakibara, K., Ibuki, F. (1986) Involvement of post-digestion 'hydrophobia' peptides in plasma cholesterol-lowering effect of dietary plant proteins. *Agric. Biol. Chem.* **50**, 1217–1222.

Janssen, F., Pauly, A., Rombouts, I. Jansens, K. J. A., Deleu, L. J., Delcour, J. A. (2016) Proteins of Amaranth (*Amaranthus* spp.), Buckwheat (*Fagopyrum* spp.), and Quinoa (*Chenopodium* spp.): A Food Science and Technology Perspective. *Compr. Rev. Food Sci.*, **16**, 39–58.

Javornik, B., Kreft, I. (1984) Characterization of buckwheat proteins. *Fagopyrum.*, **4**, 30–38.

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

Kazusa DNA Research Institute, Buckwheat Genome Data Base (BGDB), (2015) <http://buckwheat.kazusa.or.jp>

Kim, S. Y., Park, P. S.-W., Rhee, K. C. (1990) Functional of proteolytic enzyme modified soy protein isolate. *J. Agric. Food Chem.* **38**, 651–656.

Kinsella, J.E., Melachouris, N. (1976) Functional properties of proteins in foods: A survey. *Crit Rev Food Sci Nutr.*, **7** (3), 219–280.

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

Koike, D., Yamadera, K., Dimagno, E. P. (1995) Effect of a wheat amylase inhibitor on canine carbohydrate digestion, gastrointestinal function, and pancreatic growth. *Gastroenterology.* **108**, 1221–1229.

Kuan, Y.-H.; Bhat, R., Karim, A. A. (2011) Emulsifying and foaming properties of ultraviolet-irradiated egg white protein and sodium

caseinate. *J. Agric. Food Chem.* **59**, 4111–4118.

Kumagai, H., Torikata, Y., Yoshimura, H., Kato, M., Yano, T. (1991) Estimation of the stability of foam containing hydrophobic particles by parameters in the capillary model. *Agric. Biol. Chem.* **55** (7), 1823–1829.

Kumagai, H., Seto, H., Kumagai, H., Sakurai, H., Ishii, K., Arai, S. (1994) Changes in Water Activity and Functional Properties of Protein Hydrolysates. *Developments in Food Engineering*, Yano. T., Matsuno, R., Nakamura, K., Springer: Boston, MA, US, pp. 176–178.

Kumagai, H., Seto, H., Norimatsu, Y., Ishii, K., Kumagai, H. (2002) Changes in activity coefficient  $\gamma_w$  of water and the foaming capacity of protein during hydrolysis. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66** (7), 1455–1461.

Kumagai, H., Tashiro, A., Hasegawa, A., Kohyama K., Kumagai, H. (2009) Relationship between Flow Properties of Thickener Solutions and their Velocity through the Pharynx Measured by the Ultrasonic Pulse Doppler Method, *Food Sci. Technol. Res.* **15**, 203–210. H

Kumari, N., Raghuvanshi, R. S. (2015) Physicochemical and functional properties of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). *J. Eco-friendly Agric.* **10** (1), 77–81.

Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the

assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227** (5259), 680–685.

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

Leni, G., Soetemans, L., Caligiani, A., Sforza, S., Bastiaens, L. (2020) Degree of hydrolysis affects the techno-functional properties of lesser mealworm protein hydrolysates. *Foods* **9**, 381.

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

Lineweaver, H., Burk, D. (1934) The determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc.* **56**, 658–666.

López, G., Ros, G., Rincón, F., Periago, M. J., Martínez, M. C., Ortuño, J. (1996) Relationship between physical and hydration properties of soluble and insoluble fiber of artichoke. *J. Agric. Food Chem.* **44**, 2773–2778.

Ma, Y., Xiong, Y. L. (2009) Antioxidant and bile acid binding activity of buckwheat protein *in vitro* digests. *J. Agric. Food Chem.* **57**, 4372–4380.

Marshall, J. J., Lauda, C. M. (1975) Purification and properties of phaseolamin, an inhibitor of  $\alpha$ -amylase, from the kidney bean, *Phaseolus vulgaris*. *J. Biol. Chem.* **250**, 8030–8037.

Maskos, K., Huber-Wunderlich, M., Glockshuber, R. (1996) RBI, a one-domain  $\alpha$ -amylase/trypsin inhibitor with completely independent binding sites. *FEBS Lett.* **397**, 11–16.

Matemu, A. S., Kayahara, H., Murasawa, H., Nakamura, S. (2009) Importance of size and charge of carbohydrate chains in the preparation of functional glycoproteins with excellent emulsifying properties from tofu whey. *Food Chem.* **114**, 1328–1334.

Matsuda, T., Watanabe, K., Nakamura, R. (1982) Immunochemical studies on thermal denaturation of ovomucoid. *Biochem. Biophys. Acta.* **707**, 121–128.

Matsudomi, N., Oshita, T., Sasaki, E., Kobayashi, K. (1992) Enhanced heat-induced gelation of  $\beta$ -lactoglobulin by  $\alpha$ -lactalbumin. *Biosci. Biotech. Biochem.* **56** (11), 1697–1700.

Matsui, T., Tanaka, T., Tamura, S., Toshima, A., Tamaya, K., Miyata, Y., Tanaka, K., Matsumoto, K. (2007)  $\alpha$ -Glucosidase inhibitory profile of catechins and theaflavins. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 99–105.

Moron, D., Melito, C., Tovar, J. (1989) Effect of indigestible residue from food stuffs on trypsin and pancreatic amylase activity *in vitro*. *J. Sci. Food Agric.* **47**, 171–179.

Nakamura, S., Kato, A. (2000) Multi-functional biopolymer prepared by covalent attachment of galactomannan to egg-white proteins through naturally occurring Maillard reaction. *Nahrung* **44** (3), 201–206.

Ninomiya, K., Ina, S., Hamada, A., Yamaguchi, Y., Akao, M., Shinmachi, F., Kumagai, H., Kumagai, H. (2018) Suppressive effect of the  $\alpha$ -amylase inhibitor albumin from buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) on postprandial hyperglycaemia. *Nutrients* **10** (10), 1503 (12 pages).

Ninomiya, K., Ina, S., Nakamura, H., Yamaguchi, Y., Kumagai, H. Kumagai, H. (2022a) Evaluation of the amount of glucose adsorbed on water-soluble dietary fibres by the analysis of its diffusion rate through a dialysis membrane. *Food Hydrocoll.* **129**, 107626 (9 pages).

Ninomiya, K., Yamaguchi, Y., Shinmachi, F., Kumagai, H., Kumagai, H. (2022b) Suppression of postprandial blood glucose elevation by buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) albumin hydrolysate and identification of the peptide responsible to the function. *Food Sci. Hum. Well.* **11** (4) 992-998.

Ninomiya, K., Yamaguchi, Y., Kumagai, H., Kumagai, H. (2022c) Physicochemical and functional properties of buckwheat (*Fagopyrum*

*esculentum* Moench) albumin. *Future Foods*. **6**, 100178 (7 pages).

Nishimune, T., Yakushiji, T., Sumimoto, T., Taguchi, S., Konishi, Y., Nakahara, S., Ichikawa, T., Kunita, N. (1991) Glycemic response and fiber content of some foods. *Am. J. Clin. Nutr.* **54**, 414-419.

Oneda, H., Lee, S., Inouye, K. (2004) Inhibitory effect of 0.19  $\alpha$ -amylase inhibitor from wheat kernel on the activity of porcine pancreas  $\alpha$ -amylase and its thermal stability. *J. Biochem.* **135**, 421–427.

Otte, K., Zakora, M., Qvist, K. B. (2000) Involvement of disulfide bonds in bovine  $\beta$ -lactoglobulin B gels set thermally at various pH. *J. Food Sci.* **65** (3), 384–389.

Ou, S., Kwok, K.-c., Li, Y., Fu, L. (2001) *In vitro* study of possible role of dietary fiber in lowering postprandial serum glucose. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 1026 – 1029.

O'Connor, C. M., McGeeney, K. F. (1981) Interaction of human  $\alpha$ -amylases with inhibitors from wheat flower. *Biochim. Biophys. Acta.* **658**, 397–405.

O'Donnell, M. D., McGeeney, K. F. (1976) Purification and properties of an  $\alpha$ -amylase inhibitor from wheat. *Biochim. Biophys. Acta.* **422**, 159–169.

Petrucci, T., Rab, A., Tomasi, M., Silano, V. (1976) Further characterization studies of the  $\alpha$ -amylase protein inhibitor of gel electrophoretic mobility 0.19 from the wheat kernel. *Biochim. Biophys. Acta.* **420**, 288–297.

Puls, W., Keup, U. (1973) Influence of an  $\alpha$ -amylase inhibitor (BAY d 7791) on blood glucose, serum insulin and NEFA in starch loading test in rats, dogs and man. *Diabetologia.* **9**, 97–101.

Qi, J., Li, Y., Masamba, K. G., Shoemaker, C. F., Zhong, F., Majeed, H., Ma, J. (2016) The effect of chemical treatment on the *in vitro* hypoglycemic properties of rice bran insoluble dietary fiber. *Food Hydrocoll.* **52**, 699–706.

Radovic, R. S., Maksimovic, R. V., Brkljacic, M. J., Varkonji Gasic, I. E., Savic P. A. (1999) 2S Albumin from Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) Seeds. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 4, 1467–1470.

Raikos, V., Campbell, L., Euston, S. R. (2007) Effects of sucrose and sodium chloride on foaming properties of egg white proteins. *Food Res. Int.* **40** (3), 347–355.

Raikos, V., Neacsu, M., Russell, W., Duthie, G. (2014) Comparative study of the functional properties of lupin, green pea, fava bean, hemp, and buckwheat flours as affected by pH. *Food Sci. Nutr.* **2** (6), 802–810.

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

Shainkin, R., Birk, Y. (1970)  $\alpha$ -Amylase inhibitors from wheat. Isolation and characterization. *Biochim. Biophys. Acta*. **221**, 502-513.

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

Silano, V., Zahnley, J. C. (1978) Asspcoatopm of Tenebrio molitor L.  $\alpha$ -amylase with two protein inhibitors – one monomeric, one dimeric – from wheat flour: Differential scanning calorimetric comparison of heat stabilities. *Biochem. Biophys. Acta*. **533**, 181–185.

Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., Klenk, D. C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem*. **150** (1), 76-85

Suhaimi, H. Das, D. B. (2016). Glucose diffusion in tissue engineering membranes and scaffolds. *Rev. Chem. Eng.* **32**, 629-650.

Suhaimi, H., Wang S., Thornton, T., Das. D. B. (2015) On glucose

diffusivity of tissue engineering membranes and scaffolds. *Chem. Eng. Sci.* **126**, 244-256.

Svensson, B., Fukuda, K., Nielsen, P. K., Bønsager, B. C. (2004) Proteinaceous  $\alpha$ -amylase inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta.* **1696**, 145–156.

Takano, K., Hattori, M., Yoshida, T., Kanuma, S., Takahashi, K. (2007) Porphyrin as a functional modifier of a soybean protein isolate through conjugation by the Maillard reaction. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 5796–5802.

Tang, C.-H. (2007) Functional properties and *in vitro* digestibility of buckwheat protein products: Influence of processing. *J. Food Eng.*, **82**, 568–576.

Tomotake, H., Shimaoka, I., Kayashita, J., Yokoyama, F., Nakajoh, M., Kato, N. (2000) A buckwheat protein product suppresses gallstone formation and plasma cholesterol more strongly than soy protein isolate in hamsters. *J. Nutr.* **130**, 1670–1674.

Tormo, M. A., Gil-Exojo, I., Romero de Tejada, A., Campillo, E. (2004) Hypoglycaemic and anorexigenic activities of an  $\alpha$ -amylase inhibitor from white kidney beans (*Phaseolus vulgaris*) in Wistar rats. *Br. J. Nutr.* **92**, 785–790.

Tormo, M.A., Gil-Exojo, I., Romero de Tejada, A., Campillo, E. (2006) White bean amylase inhibitor administered orally reduces glycaemia in type 2 diabetic rats. *Br. J. Nutr.* **96**, 539–544.

Van de Laar, F. A., Lucassen, P. L., Akkermans, R. P., van de Lisdonk, E. H., Rutten, G. E., van Weel, C. (2004)  $\alpha$ -Glucosidase inhibitors for patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care.* **28**, 154–163.

Ven der Ven, C., Gruppen, H., De Bont, D. B. A., Voragen, A.G. J. (2001) Emulsion properties of casein and whey protein hydrolysates and the relation with other hydrolysate characteristics. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 5005–5012.

Walstra, P., Smulders, I. (1997) Making Emulsions and Foams: An overview. In Food colloids: proteins, lipids and polysaccharides; Dickinson, E., Bergenstahl, B., Eds.; The Royal Society of Chemistry: Cambridge, pp 367–381.

Weselake, R. J., MacGregor, A. W., Hill, R. D. (1983a) An endogenous  $\alpha$ -amylase inhibitor in barley kernels. *Plant Physiol.* **72**, 809–812.

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

Westermeier, R. (2011) Electrophoresis in gels. In Protein Purification:

Principles, High Resolution Methods, and Applications, 3rd ed., J.-C. Janson, Ed.; John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, pp. 365–377.

Wetzel, R., Perry, L. J., Baase, W. A., Becktel, W. J. (1988) Disulfide bonds and thermal stability in T4 lysozyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**, 401–405.

Wijngaard, H. H., Arendt, E. K. (2006) Buckwheat (review). *Cereal Chem.* **83** (4), 391–401.

Wolever, T. M., Jenkins, D. J. (1986) The use of the glycemic index in predicting the blood glucose response to mixed meals. *Am. J. Clin. Nutr.* **43**, 167-172.

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

Yan, J., Zhao, J., Yang, R., Zhao, W. (2019) Bioactive peptides with antidiabetic properties: A review. *Int. J. Food Sci. Technol.* **54** (6) 1909–1919.

Yasui, Y., Hirakawa, H., Ueno, M., Matsui, K., Tanaka-Katsube, T., Jung Yang, S., Aii, J., Sato, S., Moti, M. (2016) Assembly of the draft genome of buckwheat and its applications in identifying agronomically useful genes. *DNA Res.* **23**(3) 215–224.

Yilmaz, H. Ö., Ayhan, N. Y., Meriç, Ç. S. (2020) Buckwheat: A useful food and its effects on human health. *Curr. Nutr. Food Sci.* **16**, 29–34.

Yu, Z., Yin, Y., Zhao, W., Liu, J., Chen, F. (2012) Anti-diabetic activity peptides from albumin against  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase. *Food Chem.* **135**, 2078-2085.

Zeng, M., Adhikari, B., He, Z., Qin, F., Huang, X., Chen, J. (2013) Improving the foaming properties of soy protein isolate through partial enzymatic hydrolysis. *Drying Technology.* **31**, 1545–1552.

Zhang, W., Nasset, J. E., Rao, R., Finch, J. A. (2012) Characterizing frothers through critical coalescence concentration (CCC)95-hydrophile-lipophile balance (HLB) relationship. *Minerals.* **2**, 208-227.

Zhu, K. X., Zhou, H. M., Qian, H. F. (2006) Proteins extracted from defatted wheat germ: nutritional and structural properties. *Cereal Chem.* **83** (1), 69–75.

## 謝辞

本論文の執筆にあたり、終始懇篤な御指導、御鞭撻を賜りました日本大学 生物資源科学部 生命化学科 食品化学研究室、熊谷日登美教授ならびに山口勇将専任講師に心より感謝申し上げます。また、貴重な御助言、御指導、御鞭撻を賜りました共立女子大学 家政学部 食物栄養学科 化学研究室、熊谷仁教授に深甚なる感謝の意を表します。

日本大学 生物資源科学部 暮らしの生物学科 暮らしの園芸研究室、新町文絵教授にはペプチドの解析等、多大なるご指導、ご助言をいただきました。生命化学科 食品化学研究室、赤尾真元専任講師、研究員の若林秀彦博士および稲成信博士には、有意義な御意見を賜りました。また、共同実験者の同研究室、下平史哉さん（平成22年度卒）、中谷友美さん（平成22年度卒）、宮地由貴子さん（平成23年度卒）、森麻由美さん（平成23年度卒）、雨森秀介さん（平成24年度卒）、瀬上雅人さん（平成24年度卒）、谷口朋子さん（平成27年度卒）、福井三晃さん（平成27年度卒）、鈴木雄貴さん（平成28年度卒）、藤原里美さん（平成28年度卒）、中村華恵さん（平成30年度卒）、濱田彩さん（平成30年度卒）、山田勇太さん（令和2年度卒）、渡邊晃太郎さん（令和2年度卒）、森千将さん（令和3年度卒）、小川里桜さんには、多大な御協力、御意見を頂きました。また、同研究室の皆様には、研究全般にあたり多大なご協力を頂きました。ここに厚く御礼申し上げます。

日本大学 生物資源科学部 生命化学科 栄養生理化学研究室、関泰一郎教授、細野崇准教授には、実験機器を快く貸して頂きまし

た。ここに厚く御礼申し上げます。

最後に、本研究に携わった実験動物に感謝するとともに、御冥福をお祈りいたします。