

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：81101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07449

研究課題名(和文)新規に得られたグルテリン前駆体蓄積米の栄養学的意義の解明

研究課題名(英文) Study about the nutritional role of the glutelin precursor accumulation rice which is a new type

研究代表者

齋藤 知明(saito, tomoaki)

地方独立行政法人青森県産業技術センター・工業部門・総括研究管理員

研究者番号：60505569

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：57kDaのグルテリン前駆体(プログルテリン)を多量に蓄積する酒造好適米「華さやか」を材料に、プログルテリンが生体機能に及ぼす効果について酵素処理による酒粕および米のタンパク濃縮物を用いて検討した。in vitroでは脂質吸着性が高く、電気泳動結果からプログルテリンは人工消化液で分解されることが明らかになった。KK-Ayマウスによる実験では酒粕飼料の摂取により腸間膜白色脂肪組織重量が有意に低下し、糞便の脂質排出量は増加した。また、米タンパク濃縮物においては血糖値が有意に低下した。これらの結果から、プログルテリンは体内の脂質の吸着作用を有し、レジスタントプロテイン様作用を示すことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The biofunction of the 57-kD glutelin precursor (proglutelin) was investigated using the enzyme treatment protein concentrates of sake lees and rice from the brewing suitable rice "hanasayaka" which accumulated a proglutelin. In vitro lipid adsorption characteristics of "hanasayaka" were high, and it was shown that the proglutelin was broken down in artificial digestive juice by an electrophoretic analysis. The weight of mesentery white adipose tissue on the KK-Ay mice significantly decreased in the sake lees feed, and the lipid discharges of feces increased. In addition, blood sugar level significantly decreased in the rice protein concentrate feed. These results suggest that proglutelin shows lipid adsorption in the body, and they have resistant protein-like action.

研究分野：食品加工、醸造

キーワード：米タンパク プログルテリン グルテリン前駆体 レジスタントプロテイン 酒粕 酒造好適米 華さやか

1. 研究開始当初の背景

米は日本人にとって主たるエネルギー供給源であり、栄養学的にはデンプンを主とした研究や物性、美味しさに関する研究が行われてきた。

近年、レジスタントプロテインと呼ばれる難消化性のタンパク質が注目されている。レジスタントプロテインとは広島大学の加藤範久教授らが提唱した概念で、ソバのタンパク質が消化抵抗性であり、血中コレステロール低下作用を示すことから、このような機能をもつ難消化性タンパク質をレジスタントプロテインと呼んでいる。また、加藤らは清酒製造後の麹酵素消化残渣である酒粕から未消化タンパク質と食物繊維の濃縮物を調整し、動物実験で肥満抑制作用、血中コレステロール低下、胆石形成抑制効果を見出している。

我々はこれまでの研究で青森県の酒造好適米である「華さやか」の主要なタンパク質は分子量約 57kDa のグルテリン前駆体（以下プログルテリン）であり、清酒醸造中に麹酵素で分解され難いことから、当タンパクはレジスタントプロテインの可能性が高いと考えた。そこで通常の米を使用した酒粕と「華さやか」を使用した酒粕を用い、予備的に油分を含む水に分散させたところ、粕の挙動に明らかな差異があり、「華さやか」を使用した酒粕は油分の吸着性に特徴があることを観察した。これまで米の難消化性タンパク質はプロテインボディ（PB-1）に集積しているプロラミンと呼ばれるタンパク質であり、胆汁酸吸着性が高いなどの機能性が報告されている。しかし、プログルテリンに関する栄養学的な報告はなかった。

2. 研究の目的

本研究は日本唯一の分子量 57kDa のプログルテリンを多量に蓄積する酒造好適米「華さやか」を研究素材として米、清酒製造過程で派生する精米粉および醸造後の酒粕を研究素材とし、プログルテリンが生体機能に及ぼす効果について検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 人工消化率

米は青森県産の「華さやか」、「まっしぐら」を使用し、60%精米で醸造した純米酒の酒粕凍結乾燥物を使用し、飯米は「華さやか」、「まっしぐら」を炊飯したものを凍結乾燥し試料とした。試料 1g にペプシン 0.1%、0.2% NaCl を含む人工胃液 (pH 1.2)、50ml を加え、37℃、60 分反応させたのち、0.9N の NaHCO₃ で pH 6.8 に中和しパンクレアチン 40 mg を添加、37℃、4 時間反応させ、消化率を求めた。タンパク質はケルダール法、デンプンはレジスタントスターチ測定キット（メガザイム社）により測定した。

(2) 消化後のタンパク組成

タンパク組成は試料に 0.1% SDS、6M 尿素、1M チオ尿素を含む 0.1M Tris-HCl 緩衝液を加え、常温で一晩、緩やかに攪拌しながら抽出し、遠心分離より得た上清をバイオアナライザー（アジレント社製）による電気泳動で解析した。

(3) コレステロール吸着性

試料 50~250 mg に 0.5% コレステロール溶液 1ml を加え、37℃ で 60 分反応後、遠心し、上清の液量と濃度より吸着量を求めた。コレステロール濃度はコレステロール測定キットワコーにより定量し、試料 1 mg 当たりの吸着量で表した。

(4) 胆汁酸吸着性

試料 10~25mg に 500 μM コール酸またはデオキシコール酸 (PBS 溶解、pH 7.2) 1.5ml を加え、37℃、十分に攪拌しながら 30 分間反応させた後、胆汁酸測定キットワコーにより濃度を求め、試料 1 mg 当たりの吸着量で表した。

(5) プログルテリンを含む酒粕由来粉末による脂質異常症の改善作用

酒粕はプログルテリンが多く含まれる「華さやか」とプログルテリンが少ない「華吹雪」の 60% 精米による純米酒由来の酒粕を用い、3 倍量の水を入れ、アクレモセルラーゼ KM (協和化成株式会社) を 0.1%、ラクターゼ 2000 (洛東化成工業株式会社) 0.05% を添加し、55℃ で 2 時間の酵素処理をおこなった。反応後、遠心分離をおこない、残渣を回収し凍結乾燥し、酒粕由来粉末を調製した。調整した試料のタンパク質は約 40% だった。

4 週齢オスの KK-Ay マウスをコントロール群、華さやか群、華吹雪群の 3 群に分けて動物実験をおこなった。実験飼料はコントロール群の 20% 脂質含有の高脂肪食に対して、酒粕由来粉末を 10% 置換した飼料を使用した。なお各群飼料のカロリーが同じになるよう、飼料中の他の成分量を調節した。実験飼育を 4 週間おこない、体重、飲水量、糞便量の測定をおこなった。実験飼育終了後、解剖し血液成分、各種臓器重量の測定をおこなった。

(6) プログルテリンによる脂質異常症の改善作用

酒粕の効果が米由来以外の影響を受けている可能性があることから、米の糖質を酵素処理により一部除去した米由来タンパク質試料を調整した。原料米はタンパク組成の異なるプログルテリン主体の「華さやか」、グルテリン主体の通常の飯米である「まっしぐら」、プロラミン主体の低グルテリン米「春陽」の 3 品種を用いた。酵素処理は白米を粉碎後 2 倍量の水を加え、ラクターゼ 2000 を 0.05%、ラクターゼ THR100 (洛東化成工業株

株式会社) 0.05%、アクレモセルラーゼ KM を 0.05%、スミチーム X (新日本化学工業株式会社) 0.02% を添加した後、品温 55 で 0.5 時間反応させ、そのまま 70 に昇温して 1 時間反応、さらに 90 で 0.5 時間反応させた。酵素処理後は遠心分離し、60 の温水にて洗浄し、再度遠心分離し残渣を回収した。回収した残渣は凍結乾燥し、米由来タンパク質試料を調整した。調整した試料のタンパク質は約 65% だった。これらの高タンパク質試料による脂質(コレステロール、胆汁酸)吸着能を評価した。次に 4 週齢オスの KK-Ay マウスに対し、この米由来タンパク質試料を添加した高脂肪食にて 6 週間実験飼育をおこなった。実験飼育後、血液成分、臓器重量、及び盲腸内容物の分析をおこなった。

4. 研究成果

(1) 人工消化率

人工消化性は表 1 に示したとおり「華さやか」酒粕のタンパク消化率がまっしぐら酒粕より 4 割低かった。また、飯米の状態では消化率に差がないことから、華さやか酒粕では非消化性タンパク質の比率が高いことに起因していると考えられた。

表 1 人工消化率

	乾物	タンパク質	デンプン
華さやか酒粕	80.4	45.0	90.3
まっしぐら酒粕	76.9	72.6	88.2
華さやか飯米	86.1	78.0	97.5
つがるロマン飯米	88.6	78.1	97.6

(2) 消化後のタンパク組成

電気泳動の結果はゲルイメージで図 1 に示した。消化試験後の飯米、酒粕試料とも 57kDa 付近のプログルテリンのバンドが消失していることから、プログルテリンは人工消化液で分解を受けていることが示された。一方、13kDa 付近のプロラミンのバンドは残り、より消化を受けづらいことを示している。すなわちプログルテリンは醸造中では難消化性を示すが、人工消化実験では消化されることが明らかになった。

「華さやか」酒粕で人工消化率が低かったことは、もともとの酒粕中のプロラミン比率が高いことや、プログルテリンによる何らかの影響があったことが予想されるが今後の検討課題として残った。

(3) コレステロール吸着性

コレステロールの吸着性は図 2 に示したとおり、華さやか酒粕で特異的に高く、まっしぐら酒粕の 2 倍の吸着能だった。人工消化物残渣はコレステロール、胆汁酸吸着性が強化されており、特に酒粕消化物の吸着性は高か

った。吸着の様子は写真 1 に示したとおり、外観上、明らかに差異があった。

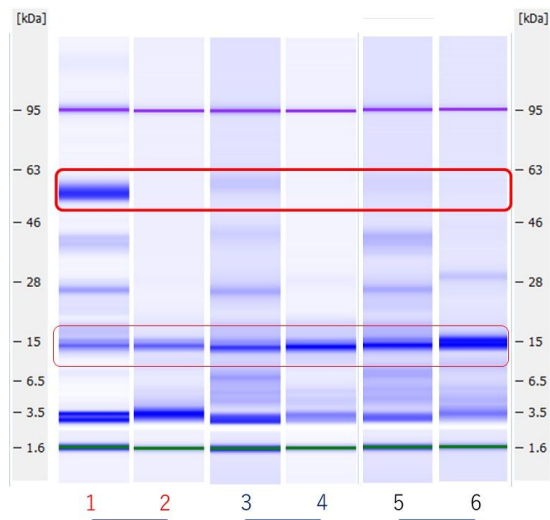


図 1 人工消化前後のタンパク組成

レーン:

- 1: 華さやか飯米
- 2: 華さやか飯米人工消化後
- 3: 華さやか酒粕
- 4: 華さやか酒粕人工消化後
- 5: まっしぐら酒粕
- 6: まっしぐら酒粕人工消化後

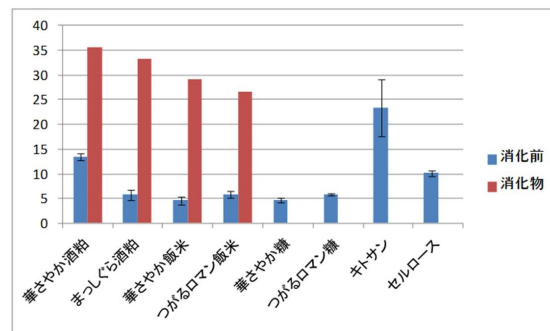


図 2 試料 1g 当たりのコレステロール吸着量 (mg、試料乾物換算)

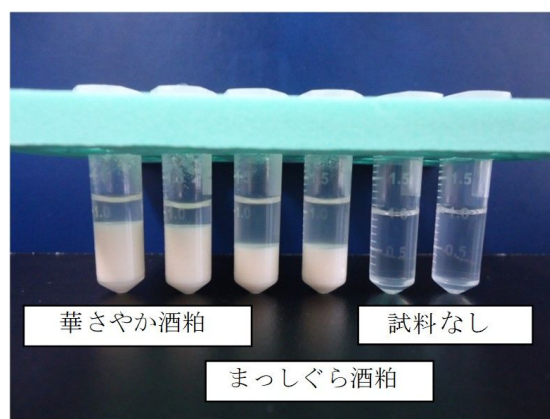


写真 1 コレステロール吸着性

試料に 0.5% コレステロール溶液を加え、攪拌した。華さやか酒粕はまっしぐら酒粕と比べ、コレステロール溶液に吸着し、残渣の高が高い。

(4) 胆汁酸吸着性

胆汁酸の吸着能は図 3、4 に示したとおり米の品種による差はなかったが吸着能が高いとされるキトサンと比べ高い吸着を示した。

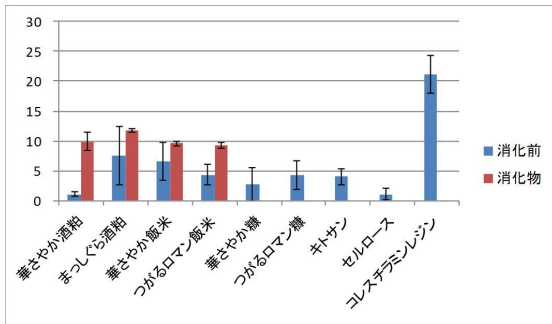


図3 試料1g当たりのコール酸吸着量 (μM、試料乾物換算)

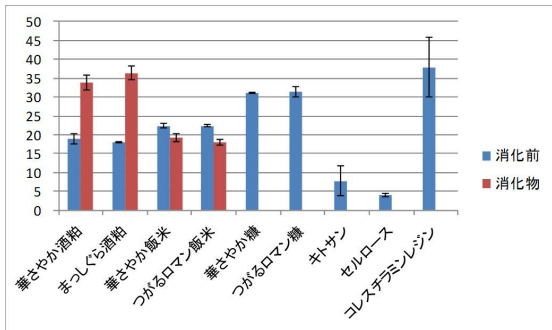


図4 試料1g当たりのデオキシコール酸吸着量 (μM、試料乾物換算)

(5) プログルテリンを含む酒粕由来粉末による脂質異常症の改善作用

実験飼育中、各群で摂食量、飲水量、糞便量に違いは認められなかった。血清成分ではコントロール群と比較し華さやか群、華吹雪群において中性脂肪値、GPT が低下傾向を示した(図5)。また臓器重量は腸間膜白色脂肪組織重量がコントロール群と比較し華さやか群で有意に低下した(図6)。更に図7に示したとおり酒粕投与群ではコントロール群と比較し、糞中のコレステロール、胆汁酸、遊離脂肪酸量が有意に上昇し、腸管内での脂質の体内吸収阻害効果を示された。また図8に示したとおり盲腸内容物のpHが低下したことから、善玉菌が増加していることが示唆された。

以上の結果から、プログルテリンを含む華さやか酒粕タンパク質には脂質の吸収を抑え、内臓脂肪の蓄積抑制作用を示すとともに、腸内環境を整える効果を示すことが示唆された。

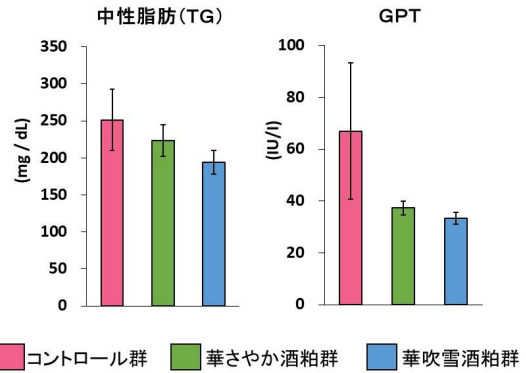


図5 酒粕投与による血漿成分値

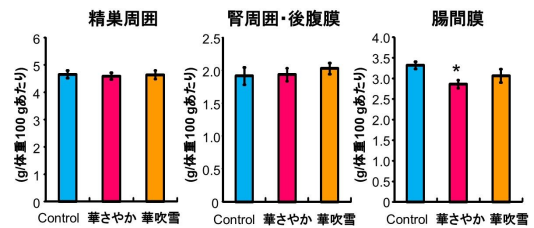


図6 酒粕投与による白色脂肪組織重量

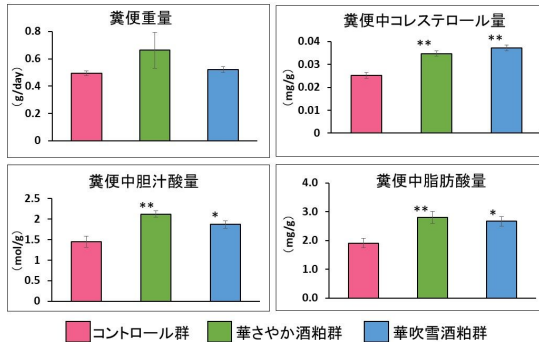


図7 酒粕投与による糞便分析値

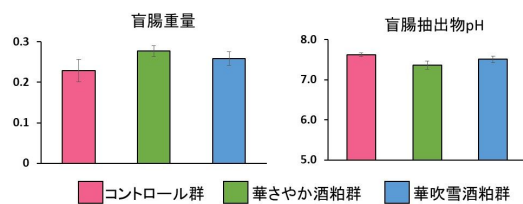


図8 酒粕投与による盲腸分析値

(6) プログルテリンによる脂質異常症の改善作用

「華さやか」高タンパク質試料では胆汁酸の吸着量が高いことが示された(図9)。また動物実験の結果、「華さやか」投与群で血糖値が低下した。また有意差はないが総コレステロール、リン脂質、中性脂肪において「華さやか」と「春陽」は同様に低下傾向を示した。盲腸内容物のpHは米タンパク質投与群で低下傾向を示した(図10)。これらの結果

は酒粕タンパク質の実験で確認された脂質異常改善効果ほど明確ではないがプログルテリンはプロラミンと同様にレジスタントプロテイン様作用を示し、その効果は麹酵素消化を受けた酒粕において大きいことが示唆された。

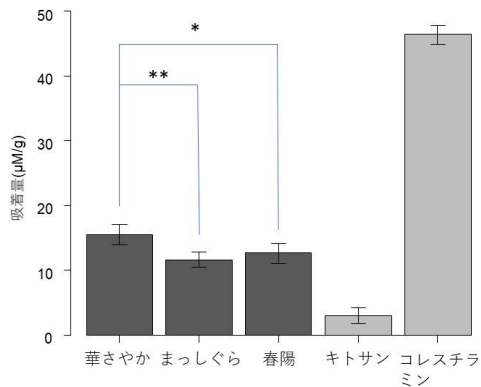


図 9 米由来タンパク質試料のデオキシコール酸吸着性

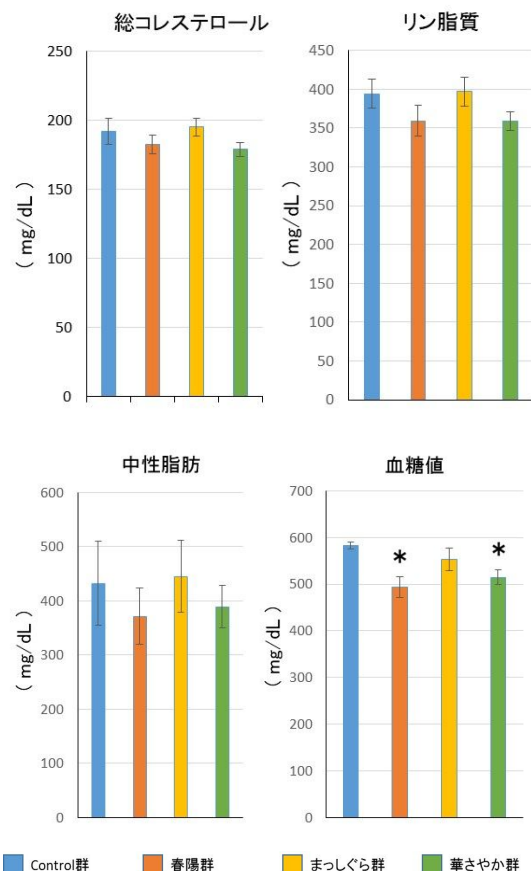


図 10 米由来タンパク質試料投与による血漿成分

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Maeda, H., R. Hosomi, M. Fukuda, Y.

Ikeda, M. Yoshida, K. Fukunaga: Dietary tuna dark muscle protein attenuates hepatic steatosis and increases serum high-density lipoprotein cholesterol in obese type-2 diabetic/obese KK-Ay mice. Journal of Food Science. 82: 1231-1238, 2017. 査読有
DOI:10.1111/1750-3841.13711

Tomoaki saito, Japanese Sake-brewing rice "Hanasayaka" with mutants of rice storage proteins - Brewing properties and regulatory functions of sake quality -, Journal of the Brewing Society of Japan, 110(7): 470-478, 2015. 査読有
DOI:10.6013/jbrewsocjapan.110.470

Maeda H., R. Hosomi, M. Koizumi, Y. Toda, M. Mitsui, K. Fukunaga: Dietary cod protein decreases triacylglycerol accumulation and fatty acid desaturase indices in the liver of obese type-2 diabetic KK-Ay mice. Journal of Functional Foods. 14: 87-94, 2015. 査読有
DOI:10.1016/j.jff.2015.01.038

〔学会発表〕(計 3 件)

齋藤 知明, 横山 智久, 川畑 咲絵, 前多 隼人, 難消化性の米タンパク質プログルテリンの消化性とコレステロール吸着性, 日本食品科学工学会第 65 回大会, 東北大学川内北キャンパス, 仙台市, 宮城県, 2018 年 8 月

齋藤 知明, 川畑 咲絵, 前多 隼人, 酒造好適米「華さやか」に含まれるプログルテリンによる難消化性作用, 日本食品科学工学会第 64 回大会, 日本大学湘南キャンパス, 藤沢市, 神奈川県, 2017 年 8 月 30 日

前多 隼人, 川畑 咲絵, 齋藤 知明, 難消化性米タンパク質プログルテリンを含む「華さやか」による内臓脂肪蓄積抑制作用, 日本食品科学工学会第 64 回大会, 日本大学湘南キャンパス, 藤沢市, 神奈川県, 2017 年 8 月 30 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 知明 (SAITO, Tomoaki)

青森県産業技術センター・弘前工業研究所・総括研究管理員

研究者番号: 60505569

(2) 研究分担者

前多 隼人 (MAEDA, Hayato)

弘前大学・農学生命科学部・准教授

研究者番号: 80507731