

平成30年6月20日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07706

研究課題名(和文)反芻動物ルーメンにおけるフィタン酸の生成機構と機能性評価に関する研究

研究課題名(英文) Study on the formation mechanism and its function of phytanic acid in food from ruminants

研究代表者

河原 聡 (Kawahara, Satoshi)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号：30284821

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)：反芻動物由来食品に特長的に含有される分岐鎖脂肪酸，フィタン酸の生成・蓄積機構を解明し，牛乳や牛肉の高付加価値化に資する知見を得る目的で研究を行った。国内で飼育される乳牛から採取したルーメン微生物は，クロロフィルあるいはフィトールから極わずかな量のフィタン酸しか合成しなかった。このことを一部反映して，外国産の乳製品・肉と比較して，国産の牛乳・牛肉のフィタン酸含量は低値であり，フィタン酸の代謝物であるプリスタン酸が主要な分岐鎖脂肪酸であった。また，フィタン酸およびプリスタン酸はT細胞からのインターフェロン産生を抑制し，自己免疫疾患の改善に役立つ可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We studied the mechanism of production and accumulation of a branched-chain fatty acid, phytanic acid, which is characteristically contained in foods from ruminant animals, and studied for the purpose of obtaining knowledge that contributes to increasing the added value of ruminant-derived foods. Rumen microorganisms collected from domestically raised cows produced a quite small amount of phytanic acid from chlorophyll or phytol. Reflecting this partly, the phytanic acid content of domestic milk and beef was lower than that of imported dairy products and beef. Alternatively, the pristanic acid which is a metabolite of phytanic acid was the dominant branched-chain fatty acid in domestic milk and beef. In addition, it was suggested that phytanic acid and pristanic acid inhibit interferon- $\gamma$  production from T cells of mice, which suggests those potential improving autoimmune diseases.

研究分野：農学

キーワード：フィタン酸 ルーメン微生物 牛乳 牛肉 プリスタン酸 T細胞 抑制 自己免疫疾患

## 1. 研究開始当初の背景

近年、反芻動物由来脂肪中に見出されたフィタン酸 (3,7,11,15-tetramethyl hexanoic acid) が新規の機能性脂肪酸として注目を集めている。フィタン酸はペルオキシーム増殖剤応答性受容体 (PPARs) の外因性リガンドとなることが示され、肥満や糖尿病との関連が深いインスリン抵抗性や高脂血症の改善に繋がる新たな食餌性成分となる可能性が示されている。この点について、フィタン酸は PPAR の中でも特に免疫細胞で多く発現している PPAR $\gamma$  との親和性が高いことが報告され、免疫系に対して生理活性を示すことも期待できる。

フィタン酸は炭素数 16 の主鎖にメチル基分岐を 4 つ持つ分岐鎖脂肪酸で、クロロフィルから遊離したフィトールから反芻胃 (ルーメン) 内の微生物の作用により生成すると考えられている (図 1)。そのため、天然の食品中では、反芻動物由来の乳・肉に多く含まれ、海外からの報告例では牛乳脂肪中に 30-450 mg/100g 脂肪、牛肉脂肪中には 4-300 mg/100g 脂肪の範囲で検出されるとされる。しかし、現在のところ、日本国内で生産・流通される乳・肉およびそれらの加工品についてのフィタン酸含量については報告例がない。また、フィタン酸の一連の生成機構において、どの過程が律速段階であるかという観点での研究は行われていないのが現状である。

フィタン酸の定量分析はガスクロマトグラフ質量分析計や超高速液体クロマトグラフ質量分析計を用いた方法が主流となっている。これは、フィタン酸の 3, 7, 11 位の炭素が不正炭素であるため、3 種のジアステレオマー (立体異性体) を持ち、それらを分離・同定するために質量分析計を用いていることによる。しかし、これら高額機器を用いた分析法は汎用性に乏しく、畜産食品中のフィタン酸含量に焦点を当てた研究を、一部の研究機関に独占させる要因となっている。そこで、申請者はこれまでに、最も汎用性が高く、質量分析器よりも定量性に優れた水素炎イオン化検出器 (FID) を装着したガスクロマトグラフ (GC) によるフィタン酸の分析法を検討してきた。その結果、GC/FID 法によるフィタン酸およびその牛体内代謝物であるプリスタン酸のメチルエステル誘導体を、ジアステレオマーのレベルで分離・定量することが可能となった。

## 2. 研究の目的

上記の背景およびこれまでの検討結果に基づき、本研究では畜産食品に由来する新規機能性脂肪酸として期待されるフィタン酸に着目し、反芻動物由来の乳・肉の付加価値向上を目指した研究に取り組む。具体的には以下の 3 点について検討を行うこととした。

## 3. 研究の方法

ルーメン微生物は、宮崎大学附属住吉牧場で飼養されているホルスタイン種乳用牛の第一胃から採取したルーメン液から調製した。ルーメン微生物は牛だ液に含まれるミネラル、炭素源のセルロース等を含む培地中で最長 24 時間まで培養した。培養液からの総脂質抽出は Bligh と Dyer の方法で行った。

脂肪酸の定量分析は、総脂質を 0.5 M KOH メタノール溶液でけん化した後、HCl メタノール溶液でメチル化し、FID-GC により行った。GC カラムは SGE 社製 BPX90 (0.25 mm ID  $\times$  100 m, 膜厚 0.25  $\mu$ m) を用い、トリコサン酸を用いた内部標準法で定量した。一方、フィトールの分析は、総脂質画分をトリメチルシリル化し、GC 分析により行った。GC カラムは RESTEK 社製 Rtx-2330 (0.25 mm ID  $\times$  30 m, 膜厚 0.2  $\mu$ m) を用い、1-ヘプタデカノールを用いた内部標準法で定量した。

フィタン酸およびプリスタン酸が免疫細胞に及ぼす影響の評価は、マウス脾臓細胞を用いて行った。ポークウィードマイトジェン共存下で培養した脾臓細胞に、DMSO に溶解した各種脂肪酸標品を添加し、培養した。培養上清中に分泌されたサイトカイン類の定量は ELISA 法により行った。

## 4. 研究成果

(1) ルーメン微生物を用いたフィタン酸生成の律速段階に関する検討

ルーメンは反芻動物における唯一のフィタン酸生成の場であり、飼料に由来するクロロフィルからのフィトールの遊離、フィトールの酸化および水素添加反応を経て、フィタン酸が生成する。本研究では、このフィタン酸生成経路における律速段階を明確にする目的で、宮崎大学農学部附属住吉牧場で飼養されている乳牛から採取したルーメン液を用いて *in vitro* での消化試験と同様の手法により、フィトールあるいはクロロフィルを添加した培養液中でルーメン微生物を培養し、培地中に放出されたフィトールおよびフィタン酸量を経時的にガスクロマトグラフにより定量した。データは、前駆物質であるフィトールあるいはクロロフィルを含まない条件下でルーメン微生物を培養した培養液中のフィトールおよびフィタン酸の定量値を減じて、前駆物質の添加に起因して増加した両物質の濃度として求めた。

クロロフィル添加培地中でのフィトールおよびフィタン酸の生成量を検討した結果、培地中のクロロフィルはフィトールおよびフィタン酸の生成に明確な影響を及ぼさなかった。このことから、クロロフィルからのフィトール生成はルーメン微生物によらないことが示唆された。

一方、培養液にフィトールを添加した場合、培地中のフィトール濃度は培養開始から 1 時間でおおよそ半減したが、その後の変化は小さかった。また、培養 24 時間までの間には明確なフィタン酸濃度の増加は認められな

かった。ルーメン微生物によるフィタン酸の生成については、2つの経路が提唱されている (Islam *et al.*, 2015; Wanders *et al.*, 2011)。本研究では中間代謝物の消長を確認しなかったため、いずれの経路でフィトールが代謝されたかは不明である。しかしながら本研究の結果は、ルーメン微生物により比較的速やかに代謝されるが、中間代謝物で反応が停止し、フィタン酸まで代謝されないことを強く示唆するものである。今後、代謝過程で生成する中間代謝物の同定、中間代謝物からフィタン酸への変換を担う鍵酵素の同定やこの酵素をもつルーメン微生物の単離・同定などを行う必要があると考えられた。

## (2) 国内を流通する乳・肉のフィタン酸含量

日本各地で流通する市乳中のフィタン酸およびプリスタン酸含量を調査した。生産地に関わらず、国内で生産される牛乳にはフィタン酸は極僅かにしか含有されておらず、プリスタン酸が主要な分岐鎖脂肪酸であった。海外製の乳製品について確認するため、日本国内で入手可能な乳製品(チーズ)についても同様の分析を行ったところ、海外の製品は日本の製品の約20~50倍のフィタン酸が含有されており、プリスタン酸も国内産の製品と同等~2倍程度含有されていた。

国産および外国産の牛肉について、フィタン酸およびプリスタン酸含量を調査した結果、乳の場合と同様に、外国産牛肉中のフィタン酸含量は、国産のそれと比較して、約10~60倍の高値を示した。一方、プリスタン酸含量は乳の場合ほどの差異は認められなかった。プリスタン酸はフィタン酸が酸化による代謝を受けて生成する分岐鎖脂肪酸であり、乳中に生成するものは消化管から吸収されたフィタン酸がウシの肝臓において代謝された産物であると考えることが合理的である。つまり乳中のフィタン酸とプリスタン酸の総量は、ルーメン内で生成したフィタン酸の量を反映すると考えられる。乳と比較して、肉では比較的長期間に亘って食餌等に由来する脂肪酸が脂肪に蓄積する。そのため、ウシ体内で生成したプリスタン酸が脂肪組織に一定量蓄積したものと考えられた。

以上の結果から、外国で飼養されたウシと比較して、日本国内で飼養されたウシではフィタン酸の生成量が少ないことが示唆された。これらの結果は、国内の乳用牛から採取したルーメン微生物によるフィタン酸合成量が非常に少なかったという、上述の結果と良く符合していた。文献等によれば、反芻動物ルーメン内でのフィタン酸の生成量は粗飼料給与により高められると報告されている。これは、フィタン酸の前駆物質であるクロロフィルあるいはフィトールの摂取量が増加することに起因する。日本と諸外国でのウシの飼養形態の違いを考慮すると、濃厚飼料に依存した飼料構造は、国産および外国産の乳・肉中のフィタン酸含量が少ない一因と

考えることは可能である。しかしながら、本研究の結果は飼料以外の要因、例えばルーメン微生物の構成や家畜自体の脂肪酸代謝など、飼料以外の根本的な要因が存在することが示唆された。

## (3) フィタン酸が免疫細胞の機能に及ぼす影響

フィタン酸は、肥満や糖尿病との関連が深いインスリン抵抗性や高脂血症の改善に繋がる新たな食事性成分の候補として期待されている。その根拠として、フィタン酸がペルオキシーム増殖剤応答性受容体 (PPARs) の外因性リガンドとなることが示されている。我々はこの点に着目し、PPARsが細胞機能の調節に重要な役割を果たしていることが知られているT細胞にフィタン酸およびプリスタン酸が及ぼす影響について検討した。その結果、フィタン酸は健康者の血中レベルにおいて、ポークウィードマイトジェンで刺激したT細胞からのインターフェロン (IFN- $\gamma$ ) およびIL-17の産生を有意に抑制した。

上述の知見は8種類の異性体混合物である市販の標品を用いて行ったものであり、天然に存在するRRR型あるいはSRR型以外の異性体も含まれる。そこで、天然型フィタン酸による作用をより明確に示すため、RRR/SRR型フィタン酸を特異的に化学合成する手法の開発に着手し、技術の確立に成功した。この手法により合成したフィタン酸を用いて同様の検証を実施した結果、RRR/SRR型フィタン酸は市販標品と同等の免疫抑制作用を有することを明らかにした。

以上の結果は、フィタン酸がT細胞に起因する自己免疫疾患の改善に有効である可能性を示唆するものである。一部の作用については、フィタン酸と比較して作用濃度が高いものの、プリスタン酸にも認められたことから、反芻動物脂肪に由来する分岐鎖脂肪酸は新規な機能性脂肪酸として、乳・肉の付加価値向上に貢献し得るものと考えられた。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3件)

Nakanishi T., Motoba I., Anraku M., Suzuki R., Yamaguchi Y., Erickson L., Eto N., Sugamoto K., Matsushita Y., Kawahara S. Naturally occurring 3RS, 7R, 11R-phytanic acid suppresses T-cell production of interferon-gamma. *Lipids in Health and Disease*, in printing, 2018. (査読有)

Suzuki R., Nakanishi T., Matsushita Y., Kawahara S. Phytanic acid and pristanic acid contents in milk and dairy products originated from Japan and European countries. *Proceedings*

of the 17th AAAP Animal Science Congress,  
Vol.1, 361, 2016. (査読有)

Nakanishi T., Anraku M., Suzuki R., Kono T.,  
Erickson L., Kawahara S. Novel immuno-  
modulatory effects of phytanic acid and its  
related substances in mice. Journal of Functional  
Foods, Vol.21, 283-289, 2016. (査読有)

〔学会発表〕(計 2件)

安樂真悠子, 鈴木遼司, 河野智哉, 河原 聡,  
仲西友紀. 反芻動物由来の分岐鎖脂肪酸フィ  
タン酸およびプリスタン酸の定量法. 日本畜  
産学会第 121 回大会, 日本獣医畜産大学, 2016.

鈴木遼司, 仲西友紀, 河原 聡. 反芻動物  
由来の分岐鎖脂肪酸フィタン酸およびプリ  
スタン酸の定量法. 日本畜産学会第 120 回大  
会, 酪農学園大学, 2015.

〔図書〕(計 1件)

河原 聡, 畜産物に含まれる機能性脂肪酸,  
機能性脂質の基礎と応用 (池田郁男 監修).  
p22-31, シーエムシー出版, 2018.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況 (計 0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

河原 聡 (KAWAHARA Satoshi)  
宮崎大学・農学部・教授  
研究者番号: 30284821

### (2) 研究分担者

仲西 友紀 (NAKANISHI Tomonori)

宮崎大学・農学部・准教授  
研究者番号: 20717889

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号:

### (4) 研究協力者

( )