

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：12611

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2019

課題番号：16K14922

研究課題名(和文) 蛋白糖鎖を介した食物繊維の新規高血糖制御メカニズムの解明と応用性の検討

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of antihyperglycemic property of dietary fiber via glycoprotein glycans

研究代表者

飯田 薫子 (Iida, Kaoruko)

お茶の水女子大学・基幹研究院・教授

研究者番号：50375458

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では食物繊維の一種であるマンナンの血糖制御機構を検討した。その結果マンナンが腸細胞において、アミラーゼ(PA)により増強されるスクラーゼ・イソマルターゼ(SI)活性を抑制する可能性を明らかとした。一方生体内では、マンナン摂取はPAとSIの相互作用や、SI活性に影響を与えなかった。そこでマンナンにより腸内細菌叢で増加するとされるBacteroidesに着目し、Bacteroides fragilis(B.fragilis)の内毒素の影響を検討した結果、B.fragilisの内毒素が大腸菌の内毒素による炎症誘導を抑制すること、そのメカニズムとしてNF- κ B経路が関わることを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病は世界が抱える健康問題であり、日本でも糖尿病やその予備軍の数は2000万人に上る。このため、合併症発症の直接の原因となる高血糖の効果的な予防改善方法の開発は急務の課題である。本研究では食物繊維の一種であるマンナンを用い、食物繊維が高血糖を改善する特異的なメカニズムを明らかとすることを目的とした。本研究で得られた知見はいずれも新規性が高く、また食品因子による高血糖の改善のための戦略を構築する上で、その一端を担う知見であると考えられる。食事や食品という身近な因子でその病態を改善し得る可能性を提唱できれば、その研究的、社会的意義は極めて大きいといえる。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to assess the mechanism of anti-hyperglycemic effect of mannan, a dietary fiber. In the cell experiments, we found that pancreatic amylase (PA) directly enhanced sucrase-isomaltase (SI) activity in human intestinal Caco-2 cells, and that mannan inhibited the increase in SI activity induced by PA. In the animal experiments, however, glucomannan had no effect on interaction between PA and SI and on SI activity. To explore another mechanism of action of mannan, we examined the effect of endotoxin from Bacteroides fragilis (BF), that was reported to be increased in the intestinal flora by mannan ingestion, on Raw 264 mouse macrophage cell line. We demonstrated that BF endotoxin suppressed the inflammatory change in Raw 264 cells stimulated with Escherichia coli endotoxin and that NF- κ B pathway was involved in the mechanism of anti-inflammatory effect of BF endotoxin.

研究分野：応用栄養学、食品科学

キーワード：食物繊維 食後高血糖 アミラーゼ 消化酵素 マンナン 腸内細菌 炎症

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

糖尿病は世界が抱える健康問題であり、日本でも「糖尿病が強く疑われる人」と「糖尿病の可能性を否定できない人」を合わせるとその数は 2000 万人に上り、国民の 5 人に 1 人が該当する。特に食後に急激におこる高血糖、すなわち「食後高血糖」は糖尿病合併症の主要要因の 1 つであることが明らかとなっており、「食後高血糖」の効果的な予防・治療法の開発は急務の課題である。この食後高血糖を是正する食品として、食物繊維がよく知られているが、その作用メカニズムについては未だ不明の点が多い。一般には、食物繊維が形成する粘性ゲルが炭水化物を取り込んで拡散を阻害し、さらに胃に停滞させることにより糖の吸収を抑制する、という説が支持されている。しかしながら、同程度の粘度の食物繊維でも血糖上昇抑制効果に差異が認められるという報告も数多くあり、食物繊維の種類に依存した特異的な血糖抑制作用の存在が示唆されてきた。

この食後の血糖上昇の原因の多くは、食事由来の炭水化物によるものである。炭水化物は膵臓から分泌されたアミラーゼ (Pancreatic α -amylase : PA) によって二糖類に分解されたのち、小腸粘膜上皮の刷子縁に局在する二糖類分解酵素スクラーゼ・イソマルターゼ (Sucrase-Isomaltase : SI) により単糖に分解され、血中に吸収される。アミラーゼはこれまで膵臓から分泌され、小腸腔内でデンプンと結合して働く消化酵素と考えられていた。ところが近年、膵アミラーゼはスクラーゼ・イソマルターゼ (SI) の糖鎖を認識して結合し、その活性を促進することが報告された。

2. 研究の目的

このアミラーゼが認識する「糖鎖」とは蛋白質に翻訳後付与される機能鎖であり、複数種類の糖残基が鎖状に連なった構造をしている。報告によると、アミラーゼは主に N 型とよばれる糖鎖のマンノース残基に結合すること、またマンノースの単体やマンノース多糖であるマンナンが、アミラーゼの SI に対する結合や活性増強作用を阻害することが示されている。一方で、食物繊維も同様に糖残基が鎖状に結合した構造を有している。我々はこの機能性「糖鎖」と食物繊維の構造上の類似性に着目し、特にマンノースを多く有する食物繊維であるマンナン類が「アミラーゼの SI 上の糖鎖への結合を競合阻害し、SI の活性化を抑制する」という仮説に基づき、食物繊維の新たな血糖制御メカニズムについて、*in vitro*, *in vivo* において横断的に明らかにすることを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

➤ *In vitro* における検討 #1

マンナンの影響を検討するに先だち、培養系腸細胞を用いて PA が SI のマルトース分解活性を増強し得るかについて検討を行った。メンブレンインサート上で小腸上皮細胞様に分化させた Caco-2 細胞を用い培養上清にマルトースと共に PA を添加し、生成したグルコースを定量することによりマルトース分解活性を評価した。さらに食物繊維であるグルコマンナンを添加し、同様の方法で、PA が SI 活性に与える効果に対するグルコマンナンの影響を検討した。

➤ *In vitro* における検討 #2

食品由来マンナンについては、既存の報告にて *Bacteroides* 属の腸内細菌がマンナンを栄養源として優先的に利用することや、マンナンが腸内の *Bacteroides* 属の菌数を増加させ血中コレステロールを低下させることなどが報告されている。そこで本研究では *Bacteroides* 属の関与も想定し、腸内の *Bacteroides* 属主要菌株である *Bacteroides fragilis* (*B. fragilis*) の内毒素である lipopolysaccharide (LPS) が炎症細胞に与える影響について検討を行った。細胞は培養系マクロファージ細胞である マウス Raw264 細胞およびヒト THP-1 細胞を用いた。培養上清に *B. fragilis* LPS を添加し、炎症性遺伝子発現の変化を Real-time PCR で、シグナル伝達経路を Western 法にて検討した。

➤ *In vivo* における検討

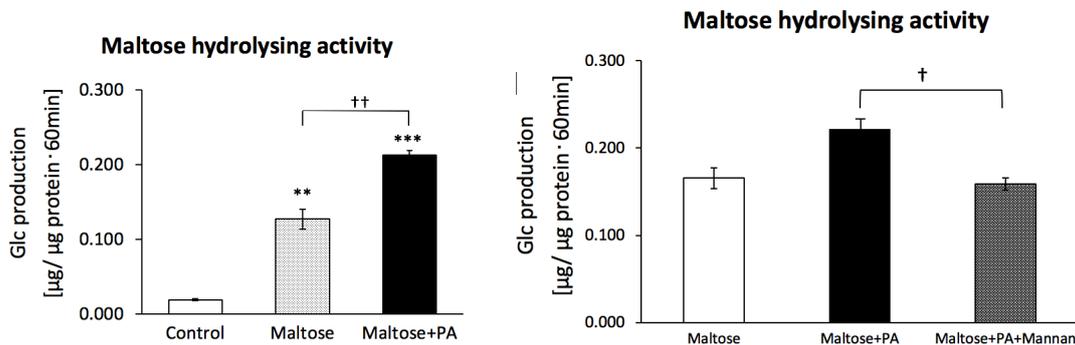
既報で報告されている PA と SI の結合が生体内でも観察しうるかを検討するために、マウス小腸サンプルを用いて、PA と SI の免疫二重染色法の条件検討を行い、その手技を確立した。さらに雄性 ICR マウスにおいて、絶食下、デンプン負荷、デンプン+グルコマンナン負荷時の血

糖変化を検討するとともに、PA と SI の結合性の変化について二重染色法を用いて検討を行った。また採取した小腸粘膜組織を用い、#1 で用いた手法を用いてマルトース分解活性を評価した。

4. 研究成果

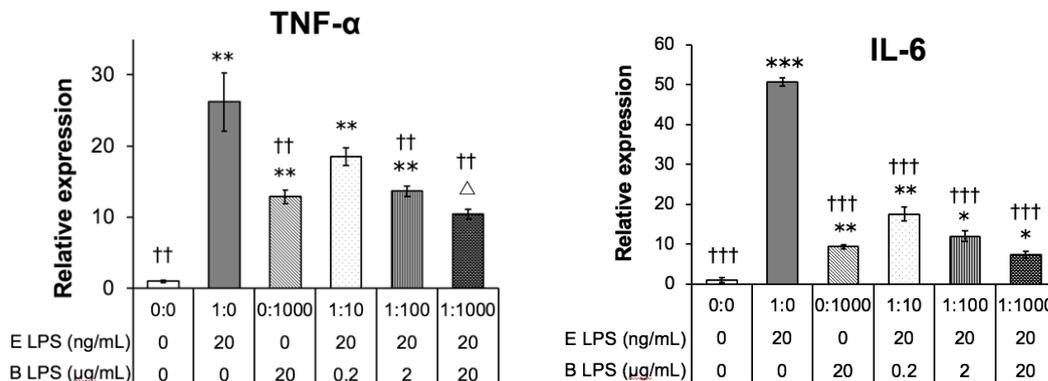
【In vitro における検討】

分化した Caco-2 細胞において SI が発現していることを確認するために、分化前、分化後 7 日目、14 日目で細胞を回収し SI の遺伝子発現およびマルトース分解活性を検討した。その結果、分化後 14 日目には SI 遺伝子の発現が分化前の 50 倍程度上昇し、またマルトース分解活性も 10 倍程度増強することを確認した。そこで分化 14 日目の細胞を用い、培養上清にマルトース共に PA(100 μ g/ml)、もしくは PA とマンナン(3mg~10mg/ml)を添加し、PA の有無によるマルトース分解活性の変化、およびマンナンの影響を評価した。この結果、PA が SI のマルトース分解活性を有意に増強すること、高濃度のマンナンが PA の SI 活性増強作用を抑制することを確認した (図 1)。

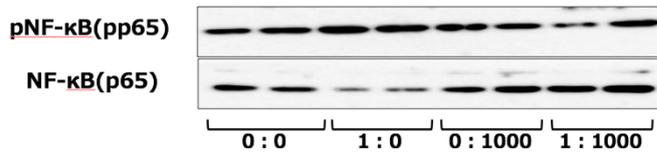


(図1) 左; PA 負荷時の Caco-2 細胞の SI のマルトース分解活性. 右; PA、マンナン負荷時の Caco-2 細胞の SI のマルトース分解活性. **, p<0.01 vs. Control, ***, p<0.001 vs. Control, †; p<0.05, ††; p<0.01 vs. Maltose

一方、Bacteroides 属の検討においては、B.fragilis LPS がマクロファージの炎症性サイトカイン(TNF α , IL-6) 遺伝子発現に与える効果を、同じグラム陰性桿菌であり強い炎症誘導作用を有する Escherichia coli (E.Coli) の LPS の効果と比較した。この結果、B.fragilis LPS は E.Coli LPS に比べ、炎症性遺伝子の発現誘導能が有意に低かった。さらに B.fragilis LPS を E.Coli LPS とともに細胞に負荷すると、E.Coli LPS により誘導される TNF α , IL-6 遺伝子発現を B.fragilis LPS が濃度依存的に抑制することを見出した (図 2)。またシグナル伝達経路の検討においては、E.coli LPS による NF-kB の活性化を B.fragilis LPS が抑制することを明らかとした (図 3)。



(図2) Tumor necrosis factor α (TNF- α), Interleukin-6 (IL-6) の遺伝子発現に与える各 LPS の影響。
 Δ ; p<0.1, **, p<0.01, ***, p<0.001 v.s. 0:0 ††; p<0.01, †††p<0.001 v.s. 1:0

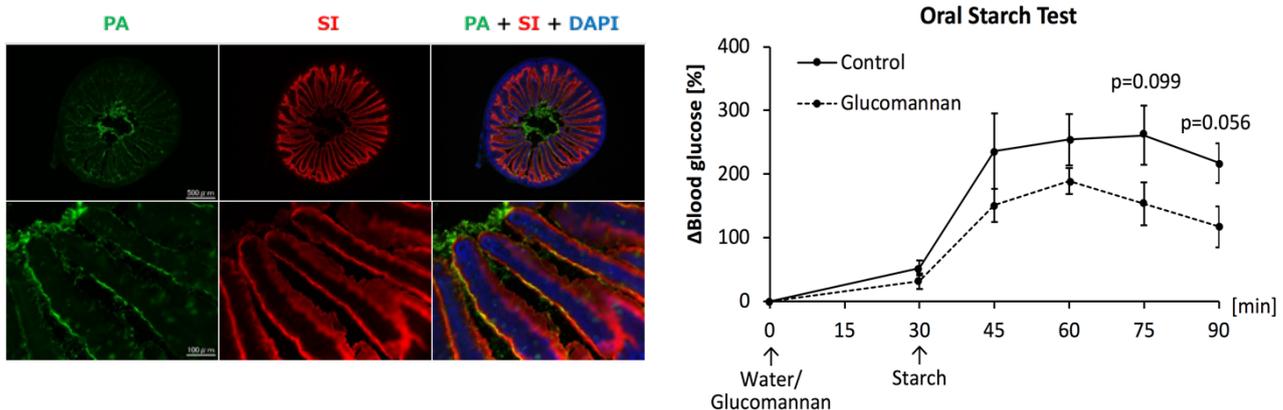


(図3) 図2の各条件下における pNF-κB, NF-κB の発現

【In vivo における検討】

免疫二重染色法により PA と SI の局在を検討したところ、摂食下のマウス小腸において、PA と SI が共局在することが明らかとなった。この共局在は刷子縁において観察され、特に胃直下 3cm 付近の部位において共局在が強く認められた (図 4)。また絶食下においても PA と SI の共局在が刷子縁で観察されたが、その程度は、摂食下と比べ程度が弱かった (データ非表示)。

次に、グルコマンナンが糖代謝に与える影響、および PA の局在や SI 活性に与える影響を検討した。マウスにグルコマンナンをあらかじめ投与した後、デンプン溶液を投与し、経時的に血糖を測定したところ、グルコマンナンを投与群ではコントロール群と比べ、血糖上昇が抑制された (図 4)。そこでデンプン投与後のマウスより小腸を採取し、小腸粘膜の PA の局在やマルトース分解活性について検討を行った。しかしながら、グルコマンナンの投与時間や投与量を様々に変化させても投与群とコントロール群の間で、小腸粘膜の PA の局在や SI のマルトース分解活性には有意な変化は認められなかった (データ非表示)。



(図 4) 左 ; 摂食下マウス小腸胃直下 3cm 部位における PA と SI の局在の比較. 右 ; グルコマンナン投与有無によるデンプン摂取後の経時的血糖変化.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 横濱茉生、十文字沙樹、伊達公恵、角佳奈子、清水梢、小川 温子、飯田薫子
2. 発表標題 小腸における腓 -アミラーゼのスクラーゼ・イソマルターゼに及ぼす影響の検討
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 佐々木瑞穂 , 横濱茉生, 細川香奈, 北村香織, 伊坂亜友美, 鈴木恵美子, 飯田薫子
2. 発表標題 Escherichia coli および Bacteroides fragilis 由来の LPS が炎症反応に与える影響の差異
3. 学会等名 第17回日本機能性食品医用学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----