

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：30105

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H01473

研究課題名(和文)新規多機能糖質としてデザインされたイソマルトメガロ糖による生理作用とその発現機構

研究課題名(英文)Study on physiological effects of isomalto-megalo-saccharides

研究代表者

原 博(Hara, Hiroshi)

藤女子大学・人間生活学部・教授

研究者番号：70198894

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,900,000円

研究成果の概要(和文)：イソマルトメガロ糖は、 $\alpha$ -1,6結合グルコース主鎖の末端に、「堅い」 $\alpha$ -1,4結合のグルコース側鎖を持つ新規糖質である。本研究課題では、消化管上皮のバリア機能に与える効果、ケルセチンの吸収ならびに消化管ホルモンGLP-1の分泌に与える効果を、培養細胞試験ならびに動物試験にて検討した。細胞試験ではイソマルトメガロ糖は油脂酸化物による上皮バリア障害を抑制することが示唆された。動物試験では、イソマルトメガロ糖とケルセチンを組み合わせることで、ケルセチンの吸収が高まること、消化管ホルモンGLP-1の分泌が増強されることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本における糖質産業は、トレハロースや様々な難消化性オリゴ糖を開発し世界をリードしてきた。しかし、類似の技術によるオリゴ糖生産などが周辺国を中心に盛んになり、新たな技術による高機能な糖質の開発が強く求められている。申請課題は、糖質の持つ新たな可能性を拓くもので、日本の糖質産業が再び世界をリードする基盤的知見を提供できる。

研究成果の概要(英文)：Isomalto-megalo-saccharides are novel saccharides having unique structures. Various health promotive functions are expected due to their specific interactions with food components and with target cells in the gastrointestinal tract.

In an intestinal epithelial cell model (Caco2), isomalto-megalo-saccharides prevented impairment of gut barrier function by lipid oxidation products. In animal studies using rats, isomalto-megalo-saccharides enhanced intestinal absorption of quercetin. Furthermore, the combination of isomalto-megalo-saccharides and quercetin potently stimulated secretion of a gastrointestinal hormone, GLP-1.

These results demonstrate beneficial effects of isomalto-megalo-saccharides, as a functional food factor.

研究分野：食品栄養学

キーワード：イソマルトメガロ糖 消化管バリア 消化管ホルモン ケルセチン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

#### 学術的背景

イソマルトメガロ糖は、でんぷん部分加水分解物デキストリンを原料に、食品用の酢酸菌酵素、デキストリンデキストラナーゼを用いた糖転移反応で生産される新規糖質である。そのフレキシブルな -1,6 結合と適度な鎖長により、種々の食品成分や消化管上皮細胞表面分子と相互作用をして機能性を発揮する。

また -1,6 結合グルコース主鎖の末端に、「堅い」 -1,4 結合のグルコース側鎖を持ち、メガロ糖と他成分との分子間相互作用を安定化させるよう設計されている。-1,6 主鎖の長さや -1,4 鎖の長さでバリエーションがあり、また食品素材としての安全性も確認されている。

その機能性として、難溶性のフラボノイドを可溶化させその吸収を促進すること(Shinoki 2013)、タイトジャンクションを介した消化管の物理的バリア機能を増強することを見出した(原 2014)。さらに、この糖質は摂取されるとゆっくりと消化されるため下部消化管にその多くが到達すること、また、消化管上皮細胞表面分子と相互作用を有することから、上皮に存在する内分泌細胞からの消化管ホルモン分泌、特に下部消化管に産生細胞が分布する、抗糖尿病ホルモングルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) の分泌促進作用が期待された。

### 2. 研究の目的

新規に開発されたイソマルトメガロ糖の生理作用を明らかにし、その実用化に資する作用機構の解明を目的としている。特に、イソマルトメガロ糖と食品分子(フラボノイド)ないし消化管上皮細胞表面分子との相互作用と生理機能に着目し、以下を明らかにすることを目的とした。

- ・イソマルトメガロ糖による様々な難溶性フラボノイドの可溶性特性と、そのフラボノイド吸収促進作用の関連性を解明する。

- ・イソマルトメガロ糖による上皮細胞間タイトジャンクションを介した消化管バリア機能増強作用とその作用メカニズムを解明する。

- ・イソマルトメガロ糖による GLP-1、GLP-22、ペプチド-チロシンチロシン (PYY) などの消化管ホルモン分泌促進、また上部消化管から分泌される Glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP)、コレシストキニンなども含め、これらの分泌とその生理作用発現を検証する。

- ・消化管上皮細胞あるいは消化管内分泌細胞上に存在するイソマルトメガロ糖の標的分子を同定する。

- ・イソマルトメガロ糖の分子構造(-1,6 主鎖の長さ、-1,4 側鎖の長さ)とフラボノイド類、および消化管上皮細胞表面分子との相互作用を解析し、メガロ糖構造との活性相関を解明する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 細胞試験

ヒト結腸癌由来細胞株 Caco-2 を用いた。Caco-2 細胞をトランズウェル上に培養し、消化管上皮細胞様に分化させた。消化管管腔側に相当するインサート上部にイソマルトメガロ糖と蛍光色素マーカーを添加した。インサート下部のウェル内に移行した蛍光色素マーカーの量を経時的に測定した。また、専用電極を用いて経上皮電気抵抗を経時的に測定した。

#### (2) 動物試験

##### 長期摂取試験

ラット(Wistar 系、雄性)にイソマルトメガロ糖を添加した飼料を 5 週間ラットに自由摂取させた。試験期間中に一夜絶食させ、経口糖負荷試験を実施した。経時的に尾静脈より血液を採取し、血漿中のグルコース濃度、GLP-1 濃度を測定した。

##### 単回経口投与試験

ラット(Wistar 系、雄性)を用い、一夜絶食に水、イソマルトメガロ糖溶液、ケルセチン溶液、またはイソマルトメガロ糖とケルセチンの混合液を、フィーディングチューブを用いて胃内に投与した。経時的に尾静脈より血液を採取し、血漿中のグルコース濃度、GLP-1 濃度を測定した。門脈カテーテルを留置したラットにおいては、経時的に門脈血を採取し、血漿中のケルセチン代謝物の濃度を液体クロマトグラフィー質量分析装置(LC/MS/MS)にて測定した。

##### in situ 腸管結紮ループ試験

ラット(Wistar 系、雄性)を用い、一夜絶食に麻酔下にて、門脈に採血用のカテーテルを留置した。さらに、下部回腸に 20 cm の結紮ループ、または盲腸の上端下端を結紮した。それぞれの部位にケルセチン溶液を直接投与し、経時的に門脈血を採取した。採取した血漿中の GLP-1 濃度を測定した。

### 4. 研究成果

(1) ヒト結腸癌由来細胞株 Caco-2 を用いた物質透過性試験ならびに経上皮電気抵抗測定により、上皮バリア機能を評価した。油脂酸化物質アクリンによりバリア機能が障害を受けるモデル

系を構築し、ここにイソマルトメガロ糖を共存させると、アクロレインによるバリア機能障害（物質透過性亢進と経上皮電気抵抗値低下）が緩和され、イソマルトメガロ糖は油脂酸化物による上皮バリア障害を抑制することが示唆された。

(2) 門脈カテーテル留置ラットにおいて、ケルセチン単独または、ケルセチンとイソマルトメガロ糖を混合して胃内投与し、経時的に門脈血を採取した。その結果、ケルセチン単独投与に比べ、イソマルトメガロ糖併用群で、高い血中ケルセチン代謝物濃度を示した。このことがイソマルトメガロ糖は、ケルセチンの吸収を高める作用があることが明らかとなった。

(3) ヒト由来結腸上皮細胞株 Caco-2 単層膜を用い、いくつかの脂質酸化生成物を被験物質としてスクリーニングを実施したところ、アクロレインに加え trans,trans-2,4-decadienal ならびにエタノールによるタイトジャンクション透過性上昇すなわちバリア機能障害が観察された。同試験系にてイソマルトメガロ糖を共存させると、trans,trans-2,4-decadienal、にエタノールによるタイトジャンクション透過性上昇は抑制された。このことから、イソマルトメガロ糖はアクロレイン誘導性だけでなく種々の化学物質誘導性のバリア機能障害を緩和することが示された。

(4) 消化管ホルモン（GLP-1）分泌への影響を観察するため、イソマルトメガロ糖を添加した飼料を5週間ラットに摂取させた。4週後に実施した耐糖能試験ではメガロ糖摂取群において、コントロール群よりも血糖応答が低下する傾向が見られたが、GLP-1 分泌応答もイソマルトメガロ糖摂取群において低下が見られた。一方で空腹時の血中 GLP-1 濃度はメガロ糖摂取群で高い傾向が見られた。これらの結果よりメガロ糖の摂取が消化管ホルモン GLP-1 の産生や分泌に影響することが示唆された。

(5) イソマルトメガロ糖をラットに単回経口投与したところ、一過性の GLP-1 分泌応答が観察された。同試験にてケルセチン（多様な機能性を有することが知られるフラボノイド）を単回経口投与した群ではわずかな血中 GLP-1 濃度上昇が観察されたが、イソマルトメガロ糖とケルセチンを同時に投与した群では、イソマルトメガロ糖単独投与を大きく上回る GLP-1 濃度上昇が見られた。この時の血糖応答は、イソマルトメガロ糖にケルセチンを組み合わせることで、メガロ糖単独投与に比べて低下した。

(6) ケルセチンの GLP-1 分泌促進作用を麻酔下ラットにて検討したところ、回腸部にケルセチンを投与した際には GLP-1 分泌上昇が見られたが、盲腸内への投与では GLP-1 分泌は誘導されなかった。

これらの結果から、イソマルトメガロ糖そのものに GLP-1 分泌促進作用があること、メガロ糖とケルセチンを組み合わせることで強力（相乗的）な GLP-1 分泌促進作用を発揮することが明らかとなった。その作用は盲腸ではなく回腸で生じていること、ならびにこの強力な GLP-1 分泌促進作用が血糖上昇の抑制に寄与するものと考えられた。

#### <引用文献>

- ・Aki Shinoki, Weeranuch Lang, Charin Thawornkuno, Hee-Kwon Kang, Yuya Kumagai, Masayuki Okuyama, Haruhide Mori, Atsuo Kimura, Satoshi Ishizuka, Hiroshi Hara: A novel mechanism for the promotion of quercetin glycoside absorption by megalo -1,6-glucosaccharide in the rat small intestine. Food Chemistry 136(2): 293-296 (2013).
- ・原 博、木村淳夫、飯塚貴久: 腸管バリア機能亢進材、腸疾患治療および予防用医薬組成物 特許特願 2014-88832(2014.4.26)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hara Hiroshi, Kume Shunsuke, Iizuka Takahisa, Fujimoto Yoshinori, Kimura Atsuo	4. 巻 82
2. 論文標題 Enzymatically synthesized megalos-type isomaltosaccharides enhance the barrier function of the tight junction in the intestinal epithelium	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biosci Biotechnol Biochem.	6. 最初と最後の頁 629-635
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/09168451.2017.1398065	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Trakooncharoenvit Aphichat, Tanaka Seiya, Mizuta Erika, Hira Tohru, Hara Hiroshi	4. 巻 59
2. 論文標題 Water-soluble dietary fibers enhance bioavailability of quercetin and a fiber derived from soybean is most effective after long-term feeding in rats	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 European Journal of Nutrition	6. 最初と最後の頁 1389 ~ 1398
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00394-019-01992-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Trakooncharoenvit Aphichat, Tanaka Seiya, Mizuta Erika, Hira Tohru, Hara Hiroshi	4. 巻 58
2. 論文標題 Reply to the Letter: Increased bioavailability of plasma polyphenols via the intestinal fermentation of soybean fibers: a role for gut microbiome?	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 European Journal of Nutrition	6. 最初と最後の頁 2563 ~ 2563
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00394-019-02030-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 白戸しおり, 飯塚貴久, 藤本佳則, 舟根和美, Weeranuch Lang, 木村淳夫, 原博
2. 発表標題 小腸上皮バリア機能に対するアンカー型イソマルトメガロ糖の保護作用
3. 学会等名 日本応用糖質科学会平成29年度大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 尾山真菜実, 飯塚貴久, 藤本 佳則, Weeranuch Lang, 木村淳夫, 原 博
2. 発表標題 ケルセチンの吸収は中分子サイズのイソマルト糖 (メガロ糖) により増加する
3. 学会等名 日本ポリフェノール学会第11回学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 長瀬 僚介、比良 徹、原 博
2. 発表標題 ケルセチン配糖体の長期摂取によるGLP-1分泌能亢進の解析
3. 学会等名 第 72 回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長瀬 僚介、比良 徹、原 博
2. 発表標題 各種ケルセチン配糖体摂取による消化管ホルモン GLP-1 分泌能の適応的増強現象
3. 学会等名 日本食品科学工学会 第65回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Aphichat Trakooncharoenvit, Hiroshi Hara, Tohru Hira
2. 発表標題 Combined feeding of -glycosyl-isoquercitrin and soluble soybean fiber prevents glucose intolerance in rats
3. 学会等名 The 9th International Conference on Polyphenols and Health - ICPH2019 (国際学会)
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
研究 分担 者	比良 徹  (Hira Tohru)  (10396301)	北海道大学・農学研究院・准教授   (10101)	