

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：34416

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K00833

研究課題名(和文)加熱調理による魚肉たんぱく質の糖・脂質代謝改善機能の向上作用の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the improvement of glycemic and lipid metabolism of heat-treated fish protein

研究代表者

福永 健治 (Fukunaga, Kenji)

関西大学・化学生命工学部・教授

研究者番号：30278634

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、加熱処理による魚肉タンパク質の消化性および健康増進機能の変化を明らかにすることを目的とした。実験の結果、加熱処理により魚肉タンパク質の表面疎水度が増加し、消化管で生成する不溶性成分が増大する可能性が示された。また、加熱処理した魚肉タンパク質の摂取は、ラットを用いたインスリン負荷試験において、インスリンの作用を向上させることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

加熱処理した魚肉の摂取によって血糖値コントロールに重要なインスリンの作用が向上することは、これまでに報告がなく食品化学分野の新たな知見になる。また魚肉の摂取による糖尿病予防にはエイコサペンタエン酸およびドコサヘキサエン酸といった脂質成分だけではなく、タンパク質成分も寄与しているという新たなエビデンスになることが期待される。さらに本研究で得られた知見は魚の消費増大、機能性食品素材の開発などにつながり、食を通じて日本人の健康維持に貢献できる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to elucidate the changes in the digestibility and health-promoting function of fish protein after heat treatment. The heat treatment of fish protein may increase the surface hydrophobicity and increase the insoluble components produced in the gastrointestinal tract. In addition, the heat-treated fish protein intake had the improvement of insulin action in the insulin tolerance test.

研究分野：食品化学

キーワード：魚肉タンパク質 加熱 消化 インスリン

## 1. 研究開始当初の背景

「和食」がユネスコ無形文化遺産に登録され、以前にも増して日本型食生活が世界で注目されるようになった。一般的な欧米食と比較し、日本食は循環器系疾患をはじめとする生活習慣病の発症を抑制し、健康寿命の延伸に十分寄与できると評価されている<sup>1)</sup>。日本型食生活の健康維持に寄与する食材として魚介類があげられる。これまで日本で行われた疫学調査において、魚介類をよく摂取する人は虚血性心疾患発症や肝臓がん発生のリスクが低いことが報告されている<sup>2,3)</sup>。ヒトの健康に寄与する魚肉の成分として、第一に脂質成分に含まれるエイコサペンタエン酸 (EPA) やドコサヘキサエン酸 (DHA) が挙げられ、血栓予防、血中中性脂質濃度低下、血小板凝集抑制効果など循環器疾患の抑制に有効である。そのため、魚油は健康食品やサプリメントに利用されている。しかし、EPA や DHA の強い生理機能のために、魚肉の脂質以外の成分はあまり注目されてこなかった。われわれは、あまり注目されていなかった魚肉由来タンパク質 (FP) 摂取による健康機能性の評価を行い、血清コレステロール濃度低下、脂肪肝抑制作用などの成果を動物実験で明らかにしてきた<sup>4,5)</sup>。また他の研究者らによって、血糖値上昇抑制効果や抗肥満作用が報告されている<sup>6,7)</sup>。このような FP の健康機能は、消化によって生成したペプチドや非消化性タンパク質の寄与が大きいことが示唆されている。

魚は刺身や寿司として生で提供されるほか、焼く、蒸す、ゆでるなどの加熱調理を行って提供される。特に白身魚はすりつぶして蒸すことによって、タンパク質の構造が変化するため、かまぼこなどの練り製品に利用されている。これまで FP の加熱処理による、練り製品の物性、栄養成分の変化に関する研究は行われているが、生体調節機能に対する影響については明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、加熱処理による FP の消化性および生体調節機能の変化を明らかにすることを目的とした。消化性および非消化性タンパク質の生成の影響を検討するために、人工消化試験を実施した (*in vitro* 試験)。また、FP の加熱処理の有無が糖・脂質代謝に与える影響を評価するために、ラットを用いてグルコース負荷およびインスリン負荷試験、血清脂質濃度の測定を行った (*in vivo* 試験)。

## 3. 研究の方法

### *in vitro* 試験

#### 1) 加熱がマダラの消化性に及ぼす影響

生マダラフィレおよびこれを 160 で 15、30、60 分間蒸煮したものをを用いた。生および加熱マダラをホモジナイズした後、ペプシンを加え、人工消化 (pH 2.0、37、60 分) を行った。NaOH を用いて pH 7.4 に調整し、続いてパンクレアチンを加え、37、120 分間消化を行った。その後、100 温浴で 20 分間加熱し、酵素反応を停止した。

#### 2) タンパク質消化率

人工消化中に消化液の一部を採取し、ピクリルスルホン酸によるアミノ酸の定量を行い、タンパク質消化率の変化を求めた。

#### 3) 不溶性成分の生成率

人工消化試験後の消化液を遠心分離 (2,000 × *g*, 10 分) した。遠心後の沈殿を定量的に移すに移し、105 で 24 時間加熱、沈殿の重量から不溶性成分の生成率を求めた。

#### 4) 表面疎水度

生および加熱マダラタンパク質の表面疎水度をプロモフェノールブルー (BPB) との結合量から求めた。

### *in vivo* 試験

#### 1) 動物試験

被験動物は 5 週齢雄性 Wistar 系ラットを用いた。試験餌料は AIN93G (大豆油 7%、カゼイン 20%) とする CAS 餌料、タンパク質源を生スケトウダラタンパク質 (NFP) または加熱処理スケトウダラタンパク質 (BFP) に置換した NFP および BFP 餌料を調製した。餌および水は自由摂取とした。飼育 6 および 7 週目に一晩絶食後、インスリン負荷試験 (IPITT) およびグルコース負荷試験 (IPGTT) をそれぞれ行った。その後 56 日間飼育後、常法により解剖を行い、血清を得た。また解剖日前日 1 日分の糞を採取した。

#### 2) IPITT および IPGTT

血糖値は、尾静脈より採取した血液を用いて測定した。IPITT は、インスリン (0.75 U/kg 体重) を腹腔内注射した後、0、30、60、90、120、150 および 180 分後に血糖値を測定した。IPGTT については、グルコース (1.5 g/kg 体重) を腹腔内注射した後、0、15、30、60、120 および 180 分後に血糖値を測定した。

#### 3) 腸内細菌叢の解析

糞便 DNA は Ion 16S™ Metagenomics Kit を使い、Primer set V2-4-8 および Primer set V3-6、7-9 を用いて PCR 増幅した。増幅産物を Ion PGM 次世代シーケンサーで解析後、Metagenomics 16S 解析ツール (Thermo Fisher Scientific) にて各シークエンスの operational taxonomic unit (OTU) を決定し、細菌の門から属レベルまでの構成比を算出した。QIIME を用いて 多様性および 多様性を求めた。また、各群の門レベルの構成比率を求めた。

#### 4. 研究成果

##### *in vitro* 試験

##### 1) 加熱がマダラの消化性および不溶性成分生成に及ぼす影響

人工消化中のタンパク質消化率は、生および加熱マダラで大きな変化は見られなかった。一方、不溶性成分の生成率は、生マダラで 3.6% (w/w) および加熱マダラ (加熱処理時間 15、30 および 60 分間) では約 6% (w/w) であった (図 1A)。生マダラを 160 で 15 分間以上蒸煮することによって、不溶性成分が増加することがわかった。また、不溶性成分の生成にマダラの加熱 (蒸煮) 時間の長短による影響は見られなかった。

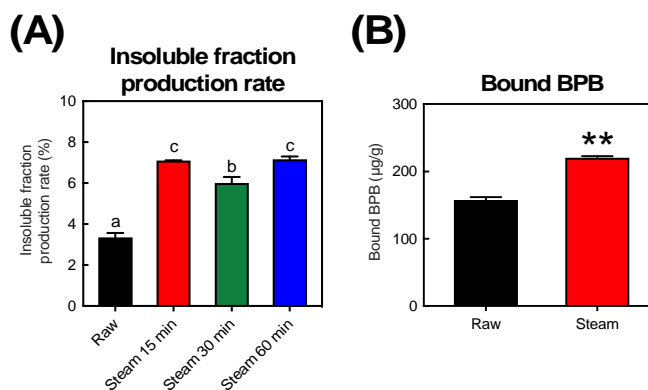


図 1 *in vitro* 試験の結果  
(A)不溶性成分生成率、(B)表面疎水度  
平均値 ± 標準誤差

異なるアルファベット間で有意差あり ( $p < 0.05$ )

##### 2) 加熱による表面疎水度の変化

生および加熱マダラの BPB 結合量を比較すると、加熱後は表面疎水度が高かった。そのため加熱処理がマダラのタンパク質の表面疎水度に影響することがわかった (図 1B)。

このように加熱処理したマダラは、加熱処理を行っていない生マダラと比較して、人工消化試験における不溶性成分生成率が高まることが確認された。さらに、加熱処理によりマダラタンパク質の表面疎水度が向上した。このことから、加熱処理によって不溶性成分生成率が高まった要因として、加熱処理により表面疎水度が向上したことにより、消化酵素との反応性が低下したことが影響していると考えている。今後、より詳細な作用機序の解明を行っていく予定である。

##### *in vivo* 試験

##### 1) IPITT および IPGTT

飼育 6 週目に IPITT (図 2A)、7 週目に IPGTT を行った (図 2B)。IPITT の結果、CAS および NFP 群と比較して、BFP 群でインスリン投与後の血糖値低下が持続していた (インスリン負荷後 90、120、150 分)。この結果より、BFP の給餌は、インスリンの作用を高める効果がある可能性が考えられる。

一方、IPGTT の結果、NFP および BFP 群は、CAS 群と比較して、糖負荷 15 および 30 分後の血糖値の低下傾向が観察された。この結果より、NFP および BFP の給餌は、血糖値上昇を抑制する効果が確認された。これらの結果から、魚肉の加熱処理の有無によって IPITT 時の血糖値低下の持続時間が異なることが示された。これは、加熱処理した魚肉を摂取することによって生体調節機能の 1 つであるインスリン作用の向上が期待されるものである。

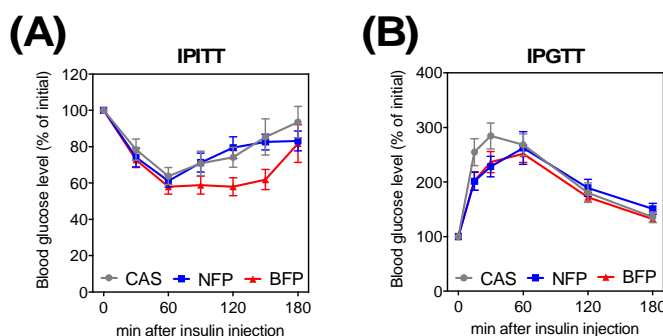


図 2 IPITT(A)および IPGTT 時の血糖値変化  
IPITT, インスリン負荷試験; IPGTT, 糖負荷試験

##### 2) 血清脂質濃度

血清総脂質、中性脂肪、リン脂質、総コレステロール、高密度リポタンパク質コレステロール濃度には、各群間で有意な変化はみられなかった。

##### 3) 腸内細菌叢の解析

近年、ゲノム解析技術の発展によって、16S rRNA 系統解析やメタゲノム解析が可能になっ

たことで腸内細菌の研究は著しく発展した。その中で腸内細菌叢の変化によって、生体内の糖代謝が変化することが報告されている<sup>8)</sup>。上記の *in vitro* 実験において、魚肉の加熱処理によって消化過程で生成する不溶性成分が増大する可能性が得られているため、この不溶性成分が盲腸および大腸にまで到達し、腸内細菌叢に影響を及ぼす可能性が考えられる。しかし、これまでに BFP の摂取が腸内細菌叢に及ぼす影響について研究報告はない。そこで BFP の給餌によってインスリンの作用が向上した要因を腸内細菌叢に求め、次世代シークエンサーを用いた腸内細菌叢の網羅的解析を実施した。

細菌叢の解析において、各個体の試料から 401,555 ± 31,397 リードの配列データが得られ、低品質のデータを除いた 345,305 ± 26,501 リードの配列データを解析に用いた。また、各群の平均リード数には有意差はなかった。属レベルの Chao1 推定量において、NFP および BFP 給餌群で対照群と比較して、有意な高値がみられた。一方、属レベルの Simpson 指数において、各群間で有意な変化は見られなかった。このことから、NFP および BFP 給餌によって、検出される菌種は増加するが、この増加した菌種の構成比率は低いと考えられる。

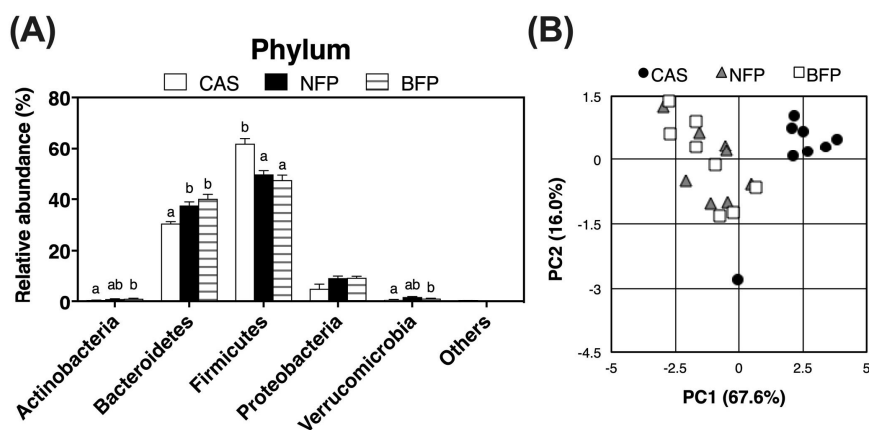


図3 門レベルの細菌叢の構成比 (A) および主成分分析 (B)  
 平均値 ± 標準誤差 異なるアルファベット間で有意差あり (p < 0.05)  
 構成比率が 0.5% 以下の門は Others にまとめた

図3に門レベルの細菌叢の構成比 (A) および主成分分析 (B) の結果を示した。門レベルの構成比率を見ると、Firmicutes、Bacteroidetes、Actinobacteria および Proteobacteria 門で 98% 以上が構成されていた。対照群と比較して、FP 給餌群において Bacteroidetes 門の構成比率の有意な増加および Firmicutes 門の構成比率の有意な低下が認められた。これまでに高脂肪餌料によって肥満を呈したマウスでは、Firmicutes 門に分類される細菌が増加し、Bacteroidetes 門に分類される細菌が減少することが報告されている。そのため、FP (NFP および BFP) を給餌したラットでは、肥満でみられる腸内細菌叢の変化とは逆の変化がみられた。また、主成分分析の結果、FP (NFP および BFP) の給餌は対照群と比較して異なる影響を与えることが示唆された。しかし、NFP と BFP 間に大きな違いはみあたらなかった。

以上のことから、カゼインの給餌と比較して、NFP および BFP の給餌はラットの腸内細菌叢に及ぼす影響が異なることが示唆された。しかし、摂取する魚肉の加熱処理の有無によって、腸内細菌叢が大きく変化することはなかった。そのため今回明らかにすることができなかった、魚肉の加熱処理によるインスリン作用の向上機序の解明を今後も続けていく予定である。

#### 引用文献

- 1) Ueshima H, Okayama A, Saitoh S, et al. Differences in cardiovascular disease risk factors between Japanese in Japan and Japanese-Americans in Hawaii: the INTERLIPID study. *J Hum Hypertens.* 2003;17(9):631-639. doi:10.1038/sj.jhh.1001606
- 2) Sawada N, Inoue M, Iwasaki M, et al. Consumption of n-3 fatty acids and fish reduces risk of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology.* 2012;142(7):1468-1475. doi:10.1053/j.gastro.2012.02.018
- 3) Miyagawa N, Miura K, Okuda N, et al. Long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids intake and cardiovascular disease mortality risk in Japanese: a 24-year follow-up of NIPPON DATA80. *Atherosclerosis.* 2014;232(2):384-389. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2013.11.073
- 4) Hosomi R, Maeda H, Ikeda Y, Toda Y, Yoshida M, Fukunaga K. Differential Effects of Cod Proteins and Tuna Proteins on Serum and Liver Lipid Profiles in Rats Fed Non-Cholesterol- and Cholesterol-Containing Diets. *Prev Nutr Food Sci.* 2017;22(2):90-99. doi:10.3746/pnf.2017.22.2.90
- 5) Hosomi R, Fukunaga K, Arai H, Kanda S, Nishiyama T, Yoshida M. Effect of combination of dietary fish protein and fish oil on lipid metabolism in rats. *J Food Sci Technol.* 2013;50(2):266-274. doi:10.1007/s13197-011-0343-y

- 6) Oishi Y, Dohmoto N. Alaska pollack protein prevents the accumulation of visceral fat in rats fed a high fat diet. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 2009;55(2):156-161. doi:10.3177/jnsv.55.156
- 7) Lavigne C, Marette A, Jacques H. Cod and soy proteins compared with casein improve glucose tolerance and insulin sensitivity in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2000;278(3):E491-E500. doi:10.1152/ajpendo.2000.278.3.E491
- 8) Zhao F, Zhou G, Liu X, et al. Dietary Protein Sources Differentially Affect the Growth of *Akkermansia muciniphila* and Maintenance of the Gut Mucus Barrier in Mice. *Mol Nutr Food Res*. 2019;63(23):e1900589. doi:10.1002/mnfr.201900589

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Maeda Hayato, Hosomi Ryota, Fukuda Mari, Ikeda Yuki, Yoshida Munehiro, Fukunaga Kenji	4. 巻 82
2. 論文標題 Dietary Tuna Dark Muscle Protein Attenuates Hepatic Steatosis and Increases Serum High-Density Lipoprotein Cholesterol in Obese Type-2 Diabetic/Obese KK-Ay Mice	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Food Science	6. 最初と最後の頁 1231 ~ 1238
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1111/1750-3841.13711	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 池田祐生, 細見亮太, 前多隼人, 下埜敬紀, 神田靖士, 西山利正, 吉田宗弘, 福永健治
2. 発表標題 スケトウダラ由来タンパク質の給餌による肥満/ 型糖尿病モデルob/obマウスの腸内細菌叢およびその代謝物に及ぼす影響
3. 学会等名 平成31年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西本彩乃, 細見亮太, 吉田宗弘, 福永健治.
2. 発表標題 スケトウダラ由来たんぱく質の給餌がラットの腸内細菌叢に及ぼす影響
3. 学会等名 第29回日本健康医学会総会
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	細見 亮太 (Hosomi Ryota) (20620090)	関西大学・化学生命工学部・准教授  (34416)	