

令和 元年 6 月 11 日現在

機関番号：17701  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2017～2018  
 課題番号：17K12902  
 研究課題名(和文) 肥満誘導性炎症を抑制する麹成分の同定とその生成機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of anti-inflammatory compounds in koji

## 研究代表者

神戸 果優(奥津果優)(Kambe, Kayu)

鹿児島大学・農学部・特任助教

研究者番号：60578433

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、麹が肥満に付随する炎症に対して抑制効果を有すると考え、パルミチン酸誘導性炎症に対する麹の効果はRaw264マウスマクロファージ細胞を用いて検討した。結果、白麹脂質抽出物はLPS誘導性の炎症には影響を与えずに、パルミチン酸曝露による炎症性メディエーター産生を特異的に抑制することが明らかになった。さらに活性成分の探索を目的として麹に含まれる遊離脂肪酸を分析した結果、麹には原料である米にはほとんど含まれない奇数脂肪酸が10mmol/kg、リノール酸やリノレン酸が5-10 mmol/kg程度含まれていることが分かり、これら不飽和脂肪酸にはパルミチン酸誘導性炎症特異的な抑制効果が見られた。

## 研究成果の学術的意義や社会的意義

肥満症の患者は、食事制限が必須となる一方で、過度な食事制限による栄養不良が原因で免疫機能が低下し、感染症にかかりやすくなる危険性がある。よって細菌感染などによって引き起こされる生体にとって必要な炎症反応を抑えることは、肥満症の患者にとって望ましくない。興味深いことに麹は、細菌の細胞壁成分であるLPSによって誘導された炎症、すなわち細菌感染性の炎症モデルには影響せず、肥満により増加するパルミチン酸によって誘導された炎症モデルにのみ効果を示すことが明らかになった。よって麹の摂取は、免疫力を低下させることなく、肥満誘導性の炎症を特異的に抑制する可能性があるといえる。

研究成果の概要(英文)：we investigated the effect of the lipid extract of koji (LEK) on the palmitate induced inflammation in rat macrophage cells, Raw264. LEK significantly inhibited generic expression of inflammatory cytokine such as TNF-alpha and IL-6 induced by palmitate. Exposure of palmitate increased generic expression of phosphorylated p38, and LEK suppressed this expression. Thus, LEK showed anti-inflammatory effect through the inhibition of p38 signaling pathway induced by palmitate. Furthermore, we investigated the active compounds in LEK. Although odd chain fatty acids that derived by koji making, did not showed anti-inflammatory effect, unsaturated free fatty acids such as linolenate, linoleate, and oleate were seemed to be one of anti-inflammatory compounds in LEK.

研究分野：発酵科学

キーワード：発酵 麹 肥満

様式 C-19, F-19-1, Z-19, CK-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

麴とは、米や麦などに麴菌を増殖させたもので、清酒、焼酎、醤油など日本の伝統的な発酵食品の製造に利用されている。麴の大きな利用目的は酵素作用である。麴菌が増殖する際に生成する様々な酵素により、食品中の多糖類やたんぱく質、脂質が分解されてオリゴ糖やペプチド、アミノ酸、脂肪酸などが生じ、発酵食品独自の風味を醸し出すようになる。一方で、麴は発酵食品の機能性にも寄与することが明らかになりつつある。これまでに我々は、麴や麴を用いた発酵食品に以下のような効果があることを明らかにしている。

### ① 清酒や焼酎の血糖値上昇抑制効果

6名の健康者に対して、夕食と共に水、ビール、清酒、焼酎を摂取させると、清酒及び焼酎を摂取した場合において、水と比べて有意に血糖値の上昇が抑えられた。この効果は、ビールでは見られなかったことから、清酒と焼酎の共通原料である麴の成分がインスリン感受性に寄与していることが示唆された (Kido *et al.*, 2016)。

### ② 麴の抗肥満効果

黄麴及び白麴の摂取は、高脂肪食により誘引した肥満モデルマウスの体重を減少させ、白麴の摂取は血中のグルコースやインスリン含量も低下させることがわかった (Yoshizaki *et al.*, 2014)。以上より、糖尿病を予防できる保健機能食品として麴が応用できる可能性がある。しかしながら、麴の抗肥満効果やインスリン抵抗性改善効果のメカニズムについては未だ不明である。肥満症においては、脂肪組織の炎症がインスリン抵抗性を引き起こすことが知られていることから、我々は①及び②の効果が、肥満によって誘導された炎症の抑制を介した作用であると仮定し、研究を進めることにした。

## 2. 研究の目的

本研究では、肥満により引き起こされる炎症に対する麴の効果及び活性成分を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 麴抽出物の調製

本研究では、Bligh-dyer 法により麴から脂質を抽出し、実験に用いることにした。抽出液を減圧濃縮・凍結乾燥し溶媒を完全に除去後、50 mg/ml の濃度になるように DMSO に溶解し、適宜希釈後細胞曝露実験の試料とした。

### (2) 麴抽出物の分画

得られた抽出物をケイ酸ガラスクロマトグラフィーによって分画した。抽出物を吸着させた後、クロロホルム、アセトン、メタノールで順次溶出した。それらの画分をエバポレーターで濃縮し、その後凍結乾燥機により乾固した。得られた画分は、50 mg/ml の濃度になるよう DMSO に溶解し、適宜希釈後細胞曝露実験の試料とした。

### (3) GC-MS による網羅的解析

白麴及び原料である蒸米の脂質抽出物を、脂肪酸メチル化キット (Nacalai tesque) によってメチル化後、GC-MS (GCMS-TQ8040, 島津) により解析を行なった。

### (4) LC-MS による脂肪酸の定量

白麴及び蒸米の脂質抽出物の遊離脂肪酸を LC-MS (3200 Q TRAP, AB sicex) により定量した。MRM トランジション (Q1/Q3) は、ミリスチン酸 (227/227), n-ペンタデカン酸 (241/241), パルミトオレイン酸 (253/253), パルミチン酸 (255/255), シス-10-ヘプタデカン酸 (267/267), マルガリン酸 (269/269), リノレン酸 (277/277), リノール酸 (279/279), ステアリン酸 (283/283), オレイン酸 (281/281), ノナデカン酸 (298/298), アラキジン酸 (311/311), ベヘン酸 (339/339), リグノセリン酸 (367/367) とした。

### (5) 炎症の誘導

RAW 264 細胞を  $1.5 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> の密度で播種し、37°C、5%CO<sub>2</sub>、加湿条件にて 24 時間前培養を行った。その後適宜希釈した試料を 100 μl 添加、1 時間培養した。LPS による炎症誘導は、終濃度 100 ng/ml になるよう曝露後 6 時間後に RNA を回収し、リアルタイム PCR を行った。パルミチン酸による炎症誘導は、終濃度 200 μM になるように曝露後、24 時間後に RNA 回収ならびに培養液上清の ELISA 解析を行った。タンパク質回収には 6 well プレートを用い、上記の 2 倍のスケールで同様に実験を行なった。LPS による炎症誘導は 30 分後に、パルミチン酸による炎症誘導は 6 時間後にタンパク質を回収し、ウェスタンブロッティングを行なった。

#### (6) リアルタイム PCR

RNA の回収は Sepasol (Naalai tesque 社) を用い、添付文書に記載の方法で実施した。RNA を High-capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher 社) を用いて逆転写し、cDNA を作成した。IL-6、COX2、TNF-α、IL-1β、iNOS の遺伝子発現量はリアルタイム PCR Thermal Cycler Dice Real Time System TP800 (タカラバイオ) を用いて測定した。遺伝子発現量は、ハウスキーピング遺伝子の GAPDH に対する相対値として表した。

#### (7) ELISA 解析

ELISA 法は Mouse TNF-α ELISA Kit (Invitrogen 社) および Mouse IL-6 ELISA Kit (Invitrogen 社) を用い添付文書に記載の方法で実施した。

### 4. 研究成果

#### (1) 麴脂質抽出物による炎症抑制効果

LPS 及びパルミチン酸により誘導される炎症の抑制効果を図 1 に示す。白麴抽出物は、LPS による炎症性メディエーターの遺伝子発現量を抑制せず、パルミチン酸による COX2 及び TNF-α の遺伝子発現量増加を濃度依存的に有意に抑制することが分かった。さらに IL-6 の遺伝子発現量増加についても濃度依存的に抑制傾向が見られた。ELISA 解析の結果からも、パルミチン酸曝露によって増加した TNF-α 及び IL-6 産生量が、麴を添加することにより有意に低下することが分かった (図 2)。このように白麴抽出物はパルミチン酸誘導性炎症に対してのみ抗炎症効果を発揮し、炎症誘発因子に選択的な作用であることが示唆された。

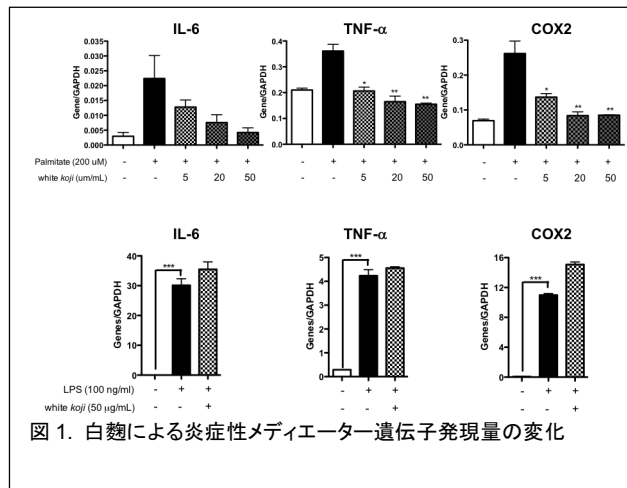


図 1. 白麴による炎症性メディエーター遺伝子発現量の変化

#### (2) 白麴抽出物に含まれる抗炎症成分の探索

パルミチン酸誘導性炎症に対する白麴抽出物の抗炎症効果が、脂質抽出物のどの成分由来であるかを調べるために脂質抽出物の分画を行った。一般に、クロロホルム溶出画分には中性脂質が、アセトン溶出画分にはリン脂質が、メタノール溶出画分には糖脂質が含まれると言われている。白麴脂質抽出物の中で最も多かったのはクロロホルム画分 (16.1 mg/g)、次いでメタノール画分 (2.5 mg/g)、アセトン画分 (1.5 mg/g) であった。これらの画分の抗炎症活性を測定したところ、クロロホルム画分は、パルミチン酸による TNF-α の産生量増

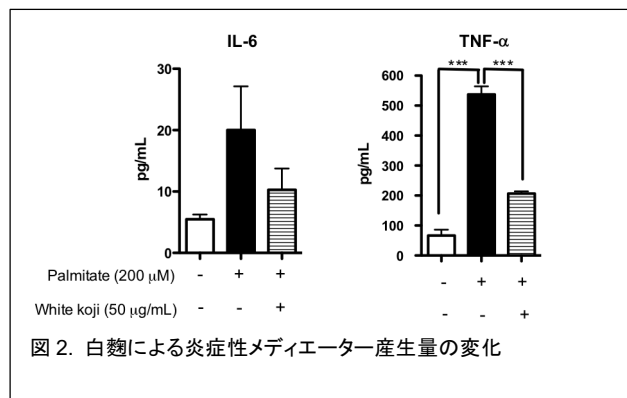


図 2. 白麴による炎症性メディエーター産生量の変化

加を有意に抑制し、IL-6分泌増加も抑制傾向であった(図3)。アセトン画分においても活性は低いもののTNF- $\alpha$ 及びIL-6産生量が抑制傾向にあった。一方、メタノール画分を曝露した場合はTNF- $\alpha$ およびIL-6の産生量増加の抑制は見られず、むしろ炎症を促進する傾向が見られた。糖脂質の中にはリポポリ多糖などの炎症誘導性物質が含まれる可能性があり、それらが炎症促進に働いたと推察された。

今後クロロホルム画分やアセトン画分のさらなる単離・精製を行う予定である。

一方、クロロホルムにより溶出される成分としては、中性脂質であるモノグリセリド、ジグリセリド、トリグリセリド、遊離脂肪酸、ステロール類などが挙げられる。本研究では脂肪酸に着目し、GC-MSを用いて、白麴抽出物の全構成脂肪酸の網羅的解析を行った。その結果、麴に含まれる主要な脂肪酸としては、オレイン酸やリノール酸、リノレン酸といった不飽和脂肪酸類が挙げられた。また興味深いことに蒸米から麴にすることでC15:0やC17:0といった奇数脂肪酸が顕著に増加することがわかった。

続いて、GC-MS分析により比較的多く存在

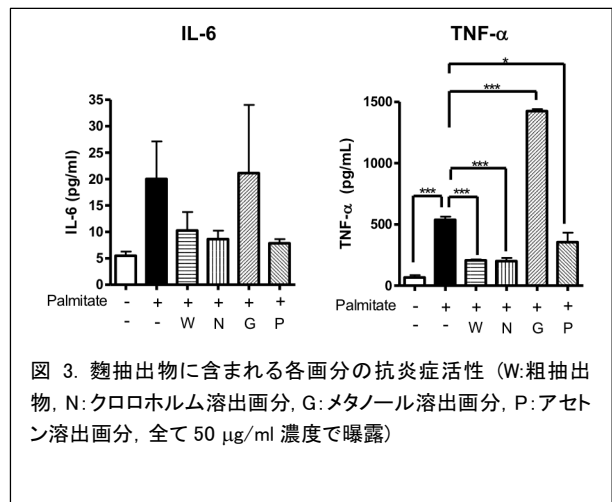


図3. 麴抽出物に含まれる各画分の抗炎症活性(W:粗抽出物, N:クロロホルム溶出画分, G:メタノール溶出画分, P:アセトン溶出画分, 全て50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度で曝露)

表1. 麴に含まれる脂肪酸含量

脂肪酸	炭素数	含量 ( $\mu\text{mol}/\text{g}$ )
Myristate	14:0	0.39
Pentadecanoate	15:0	8.61
Palmitate	16:0	0.63
Palmitoleate	16:1n-7	n. d.
Margarate	17:0	9.11
Stearate	18:0	n. d.
Oleate	18:1n-9	0.60
Nonadecanoate	19:0	0.82
Linoleate	18:2n-6	1.68
Arachisate	20:0	0.019
Linolenate	18:3n-3	5.33
Behenate	22:0	0.004
Lignocerate	24:0	0.031

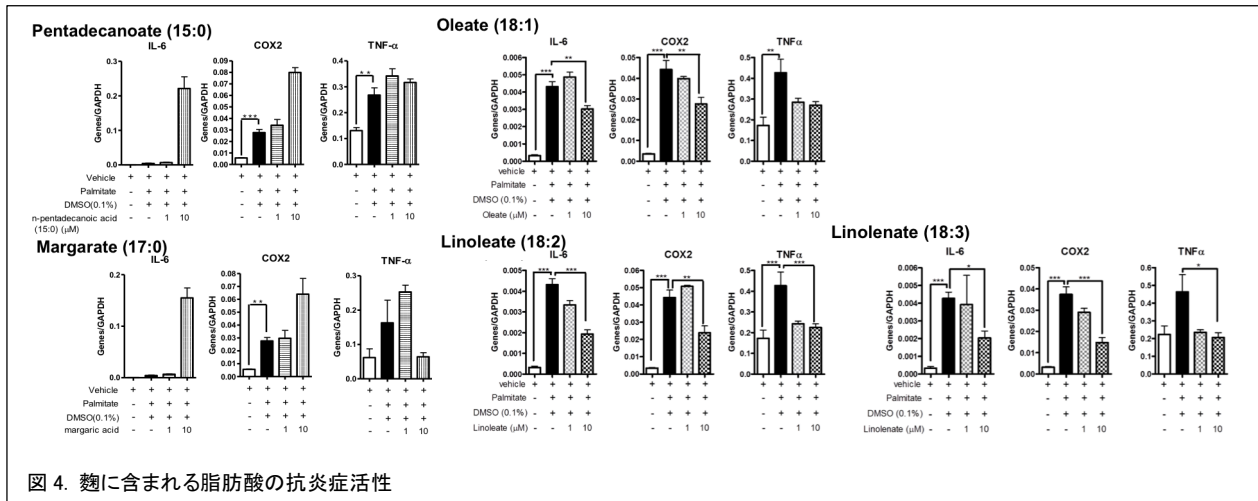


図4. 麴に含まれる脂肪酸の抗炎症活性

すると考えられた脂肪酸について、LC-MSによって直接定量を行なった。その結果、奇数脂肪酸であるペンタデカン酸やマルガリン酸は約10  $\mu\text{mol}/\text{g}$ 、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸といった不飽和脂肪酸は、約1-5  $\mu\text{mol}/\text{g}$ 含まれることが分かった(表1)。奇数脂肪酸は近年糖尿病、心臓疾患などに効果を示すことが報告されている。米から麴にすることで、このような奇数脂肪酸が顕著に増加することが本研究で明らかになり、麴のさらなる機能が期待された。

LC-MSにて定量した一部の脂肪酸(マルガリン酸、ヘプタデカン酸、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸)の抗炎症活性を調べた。その結果、奇数脂肪酸には活性が見られなかったものの、不飽和脂肪酸にはパルミチン酸誘導性炎症の抑制効果が見られた(図4)。データには示していないが、これら不飽和脂肪酸には、LPS誘導性炎症の抑制効果は見られず、麴抽出物の抗炎症活性の傾向と一致していたことから、不飽和脂肪酸が麴のパルミチン酸誘導性炎症抑制効果の一部を担っている可能性が示された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 6 件）

1. Taiki Futagami, Chihiro Kadooka, Yoshinori Ando, Kayu Okutsu, Yumiko Yoshizaki, Shinki Setoguchi, Kazunori Takamine, Mikihiro Kawai, Hisanori Tamaki., Multi-gene phylogenetic analysis reveals that shochu-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains form a distinct sub-clade of the Japanese sake cluster. *Yeast*, 査読有, 34, 407-415, 2017.
2. Kazuki Mori, Chihiro Kadooka, Chika Masuda, Ai Muto, Kayu Okutsu, Yumiko Yoshizaki, Kazuhiro Takamine, Taiki Futagami, Hisanori Tamaki. Genome Sequence of *Saccharomyces cerevisiae* Strain Kagoshima No. 2, Used for Brewing the Japanese Distilled Spirit Shōchū. *Genome Announcements*, 査読有, 5(41), pii: e01126-17., 2017.
3. Toshihiro Kojo, Chihiro Kadooka, Marisa Komohara, Shiori Onitsuka, Miya Tanimura, Yukiko Muroi, Shugo Kurazono, Yohei Shiraishi, Ken Oda, Kazuhiro Iwashita, Masahira Onoue, Kayu Okutsu, Yumiko Yoshizaki, Kazunori Takamine, Taiki Futagami, Kazuki Mori, Hisanori Tamaki. Characterization of amylolytic enzyme overproducing mutant of *Aspergillus luchuensis* obtained by ion beam mutagenesis. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 査読有, 63, 339-346, 2017.
4. 奥津果優, 吉崎由美子, 高峯和則, 栽培期間がサツマイモの品質及び芋焼酎の酒質に及ぼす影響, *日本醸造協会誌*, 査読有, 112 (8), 543-549, 2017.
5. 奥津果優, 門岡千尋, 小城章裕, 吉崎由美子, 二神泰基, 玉置尚徳, 高峯和則, 中国及び韓国の市場品「神麴」における菌叢と含有成分の実態調査, *生薬学雑誌*, 査読有, 71, 41-48, 2017.
6. Yen Yen Sally Rahayu, Yumiko Yoshizaki, Keiko Yamaguchi, Kayu Okutsu, Taiki Futagami, Hisanori Tamaki, Yoshihiro Sameshima, Kazunori Takamine, Key volatile compounds in red koji-shochu, a *Monascus*-fermented product, and their formation steps during fermentation, *Food Chemistry*, 査読有, 224, 398-406, 2017.

〔学会発表〕（計 15 件）

1. 王子泰, 奥津果優, 二神泰基, 吉崎由美子, 玉置尚徳, 丸山卓郎, 小松かつ子, 高峯和則, 漢方用薬「神麴」の菌叢構造と含有成分の実態調査, 第 25 回日本生物工学会九州支部鹿児島大会, 鹿児島, 12/1/2018.
2. 岩崎史奈, 奥津果優, 吉崎由美子, 二神泰基, 玉置尚徳, 高峯和則, 黒糖焼酎の香気に及ぼす石灰の影響, 第 25 回日本生物工学会九州支部鹿児島大会, 鹿児島, 12/1/2018.
3. 松尾郁弥, 岩崎史奈, 奥津果優, 吉崎由美子, 二神泰基, 玉置尚徳, 高峯和則, 原料サトウキビ品種の違いが黒糖焼酎香気に及ぼす影響, 第 25 回日本生物工学会九州支部鹿児島大会, 鹿児島, 12/1/2018.
4. 矢野真也, 藏菌秀伍, 南果, 奥津果優, 二神泰基, 吉崎由美子, 玉置尚徳, 高峯和則, 芋焼酎の酒質に与える製麴日数の影響, 第 25 回日本生物工学会九州支部鹿児島大会, 鹿児島, 12/1/2018.
5. 岩崎史奈, 奥津果優, 吉崎由美子, 二神泰基, 玉置尚徳, 高峯和則, 製糖時の石灰添加量が黒糖焼酎の香気に及ぼす影響, 平成 30 年度日本醸造学会大会, 東京, 10/11/2018.
6. 曾伝涛, 吉崎由美子, 奥津果優, 二神泰基, 玉置尚徳, 高峯和則, 紅麴品質における水浸漬工程の影響, 第 68 回日本生物工学会大会, 大阪, 9/6/2018.
7. 王子泰, 奥津果優, 二神泰基, 吉崎由美子, 玉置尚徳, 丸山卓郎, 小松かつ子, 高峯和則, 中国及び韓国産「神麴」の菌叢構造と有用成分の実態調査, 第 35 回和漢医薬学会学術大会, 岐阜, 9/1/2018.
8. 奥津果優, 吉崎由美子, 二神泰基, 玉置尚徳, 高峯和則, 漢方生薬「神麴」の発酵による成分変化, 日本薬学会第 38 年会, 石川, 3/27/2018.
9. 王甜甜, 吉崎由美子, 花城勲, 奥津果優, 二神泰基, 玉置尚徳, 高峯和則, 製麴段階におけるデンブン構造の変化, 第 24 回日本生物工学会九州支部沖縄大会, 沖縄, 12/9/2017.
10. 曾伝涛, 吉崎由美子, 奥津果優, 二神泰基, 玉置尚徳, 高峯和則, 紅麴の製麴中における水

- 浸漬の効果, 第 24 回日本生物工学会九州支部沖縄大会, 沖縄, 12/9/2017.
11. 矢野真也, 白石洋平, 原口愛美, 奥津果優, 二神泰基, 吉崎由美子, 玉置尚徳, 高峯和則, プロテアーゼ高生産黒麹菌を用いた芋焼酎の製造, 第 24 回日本生物工学会九州支部沖縄大会, 沖縄, 12/9/2017.
  12. 横山智久, 神戸悠輝, 大城沙織, 奥津果優, 吉崎由美子, 高峯和則, 宮田篤郎, パルミチン酸誘導性炎症に対する白麹の抗炎症効果, 第 70 回日本薬理学会西南部会, 鹿児島, 11/18/2017.
  13. 印璇, 竹内春佳, 吉崎由美子, 奥津果優, 二神泰基, 玉置尚徳, 高峯和則, 中国で市販されている小曲米酒の風味の特徴, 平成 29 年度日本醸造学会大会, 東京, 10/12/2017.
  14. Xuan Yin, Yumiko Yoshizaki, Kayu Okutsu, Taiki Futagami, Hisanori Tamaki, Kazunori Takamine, New significance of the solid-state saccharification process in xiaoqu-mijiu production, 日本応用糖質科学会平成 29 年度大学(第 66 回), 神奈川, 9/7/2017.
  15. 奥津果優, 門岡千尋, 小城章裕, 吉崎由美子, 二神泰基, 玉置尚徳, 高峯和則, 中国及び韓国の市場品「神麴」における菌叢と含有成分の実態調査, 第 34 回和漢医薬学会学術大会, 福岡, 8/26/2017.

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1) 研究分担者 なし

(2) 研究協力者 なし

※科研費による研究は, 研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため, 研究の実施や研究成果の公表等については, 国の要請等に基づくものではなく, その研究成果に関する見解や責任は, 研究者個人に帰属されます。