

令和 5 年 5 月 12 日現在

機関番号：34509

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K11061

研究課題名(和文) 乳酸発酵処理が引き起こす豆乳中の成分変化が脂質代謝改善作用に及ぼす影響

研究課題名(英文) Effect of changes in soymilk components caused by lactic acid fermentation on improving lipid metabolism

研究代表者

小林 麻貴 (Kobayashi, Maki)

神戸学院大学・栄養学部・助教

研究者番号：70550789

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：植物性食品由来の乳酸菌により発酵した豆乳(乳酸発酵豆乳)が脂質代謝改善作用を有することを明らかにし、その作用は乳酸発酵豆乳中で増加したオルニチンが関与している可能性を示した。またヒト肝由来HepG2細胞は培養液中に脂肪酸を添加することで細胞内脂質を蓄積するが、オルニチン処理によりこの蓄積が抑制されることを見出した。オルニチンのこの作用はトリグリセリドの合成に関与するタンパク質の抑制や脂肪酸のエネルギー代謝を促進するタンパク質の増加によるものであった。またオルニチンにはアンモニアやチオアセトアミドなどの薬剤による炎症性の肝障害を抑制することも本研究により明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義は、オルニチンの新規生理機能として、オルニチンが肝細胞におけるトリグリセリドの合成に関わる細胞内シグナルを抑制すると共に脂肪酸のエネルギー代謝を促進することを示したことである。つまり肝細胞内の脂肪蓄積をオルニチンが抑制することを明らかにしたことである。このことはオルニチンの摂取が非アルコール性脂肪性肝疾患の初期症状である脂肪肝を抑制する可能性があることを示しており、オルニチン含有飲料として乳酸発酵豆乳が有用であることを見出したという点が社会的に意義のあることである。

研究成果の概要(英文)：The study, at first, indicated that *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* TUA4408L-fermented soymilk contained 450-fold ornithine compared with plain soymilk and improved lipid metabolism. To elucidate a mechanism for improving lipid metabolism, the effects of ornithine on lipid accumulation in hepatocytes were investigated using human hepatocarcinoma HepG2 cells. Addition of fatty acid to the culture medium increased lipid accumulation on HepG2 cells. On the other hand, treatment with ornithine suppressed the suppression of triacylglycerol synthesis-related proteins and increased fatty acid β -oxidation-related proteins, resulting in the inhibition of lipid accumulation caused addition of fatty acid. This study also revealed that ornithine suppresses inflammatory damage caused by drugs such as ammonia and thioacetamide in hepatocytes or liver.

研究分野：食生活学

キーワード：オルニチン 乳酸発酵 脂質代謝 肝細胞 脂質蓄積 中性脂肪合成 エネルギー代謝 脂肪性肝疾患

1. 研究開始当初の背景

豆乳を植物性食品由来の乳酸菌で発酵させた乳酸発酵豆乳は、イソフラボンアグリコンと大豆タンパク質が共存するため、強い脂質代謝改善効果を示すことを報告した。しかし、乳酸発酵豆乳から各有効成分を抽出して実験を行ったところ、それぞれ単独では脂質代謝改善作用が見られなかった。そのため、豆乳と乳酸発酵豆乳のメタボローム解析を行い、成分の違いを詳細に分析したところ、乳酸発酵豆乳は豆乳と比較してオルニチンが 430 倍に増加することが明らかとなった。さらに、HPLC (アミノ酸分析計) を用いてオルニチンの定量をしたところ、乳酸発酵豆乳は豆乳と比較してオルニチンが 450 倍となった。そこで本研究では、乳酸発酵豆乳中のオルニチンが脂質代謝に及ぼす影響について検討を行った。

2. 研究の目的

(1) 近年、非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) が増加している。NAFLD は、脂肪肝から脂肪性肝炎、肝硬変に至る一連の肝疾患であり、肝臓がんにも進行することもあるため、初期の脂肪肝を予防することが重要である。そこで脂肪肝に対するオルニチンの効果を明らかにするため、本研究ではその基礎的研究として肝細胞の脂質蓄積に及ぼすオルニチンの影響を調べた。

(2) 肝臓は、脂肪酸合成、トリグリセリド合成、コレステロール合成などの脂質代謝の重要な臓器である。一方、肝臓は有毒なアンモニアを尿酸に解毒する尿素回路を備えており、オルニチンはその尿素回路の中間体を担っている。これらのことから肝機能不全は脂質代謝および尿素回路の恒常性の維持の大きな影響を与える。そこで肝臓および肝細胞の障害に及ぼすオルニチンの保護効果について調べた。

3. 研究の方法

(1) 肝細胞としてヒト肝がん由来 HepG2 細胞を用いた。HepG2 細胞をオルニチンで前処理した後、脂肪酸を培養液に添加することで、HepG2 細胞の脂質蓄積を促した。細胞内に蓄積した脂質はオイルレッド O 染色により評価した。また、細胞内の脂質代謝に関わるタンパク質の変化についてウェスタンブロットング法によって評価した。

(2) 肝細胞としてマウス肝がん由来 Hepa1c1c7 細胞とヒト肝がん由来 HepG2 細胞を用いた。細胞にオルニチンおよび/またはアンモニアを処理し、24 時間後の細胞生存率を MTS 試験により評価した。また培養液中に分泌された尿素濃度および細胞溶解液中のオルニチン濃度やアルギニン濃度を HPLC で定量した。

(3) ICR マウス (6 週齢・雄) にオルニチンを 1 日 1 回、4 日間経口投与し、肝障害を誘導するために 2 回目の経口投与時にチオアセトアミド (300mg/kg 体重) を腹腔内に投与した。4 回目の経口投与の翌日に解剖し、肝障害の指標として血清 ALT および AST 活性を測定した。また、HE 染色により肝臓の組織像を評価した。

4. 研究成果

(1) HepG2 細胞の脂肪酸処理は細胞内への脂質蓄積を著しく増加させたが、オルニチンの前処理はこの脂質蓄積の増加を顕著に抑制した。また脂肪酸添加は AMPK の活性を抑制したが、オルニチンの前処理はこの AMPK の不活化をキャンセルし、その下流シグナルにある脂肪酸の酸化に関連するタンパク質 (PPAR、CPT2) を増加させることでエネルギー産生を促進した。また AMPK の下流シグナルであり、トリアシルグリセロール合成に関与するタンパク質 (SREBP1c、DGAT1) を減少することで脂質蓄積を抑制した。一方、脂質分解に関わるオートファジー (リポファジー) も AMPK/mTOR 経路を介して脂質の蓄積を減少させることも報告されているが、オルニチン処理による mTOR レベルに有意差が見られなかったことから、リポファジーはオルニチンの脂質蓄積阻害効果に関与していないと考えた。

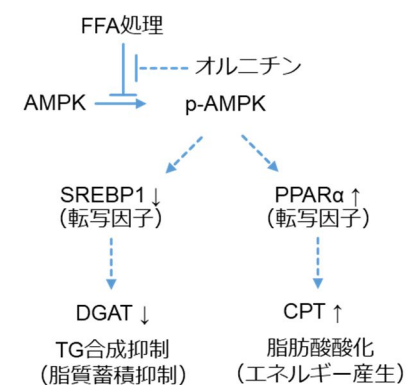


図1. 脂質添加によるAMPKの不活化をオルニチンが抑制する

(2) 40 mM のアンモニア処理は、マウス由来 Hepa1c1c7 細胞の細胞生存率を有意に低下したが、オルニチン処理はこの細胞死を有意に抑制した。アンモニアおよびオルニチンで処理した際には培養液中の尿素濃度は、オルニチンで処理しない場合 (アンモニアのみで処理した場合) と比較して有意に増加した。また細胞溶解液中のオルニチン濃度もオルニチン処理していない細胞

群と比較して有意に上昇していた。つまり、オルニチンの肝細胞保護効果はアンモニア代謝を促進することで、有害なアンモニアが尿素に代謝されたと考えた。また、ヒト由来の HepG2 細胞においてもオルニチンはアンモニア誘導性細胞死を抑制し、細胞溶解液中のオルニチン濃度および尿素回路に参与するアルギニン濃度が上昇していた。以上の結果から、オルニチンは、尿素回路の亢進によってアンモニア代謝を促進することでアンモニアによる肝細胞死を抑制することが示唆された。

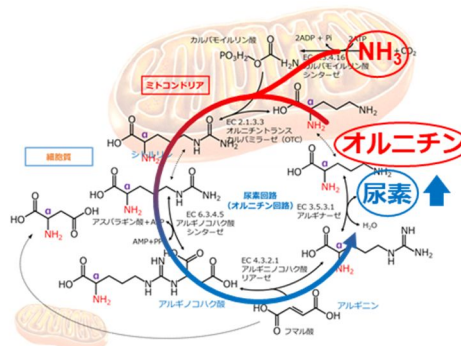


図2. オルニチン処理による尿素回路の亢進

(3) チオアセトアミドの腹腔内投与 (300 mg/kg 体重) は血清中の ALT 活性および AST 活性を著しく増加させ、肝障害を誘導した。また、既に肝障害に対する抑制効果が報告されているオルニチン・アスパラギン酸塩の経口投与 (2 g/kg 体重) はチオアセトアミド非投与レベルまで血清中の ALT 活性および AST 活性を低下させた。一方、オルニチンの経口投与もチオアセトアミドによる肝障害を抑制することが明らかになったが、その効果は少なくとも血中 ALT 活性については投与量が 1 g/kg 体重よりも 2 g/kg 体重の方が強かった。また、HE 染色による肝臓の組織像もこれらの結果と矛盾することなく、チオアセトアミド処理による肝細胞索の崩壊が、オルニチン処理により保護されていることが確認された。これらのことより、オルニチンの経口摂取は肝障害に対する予防効果があると考えた。

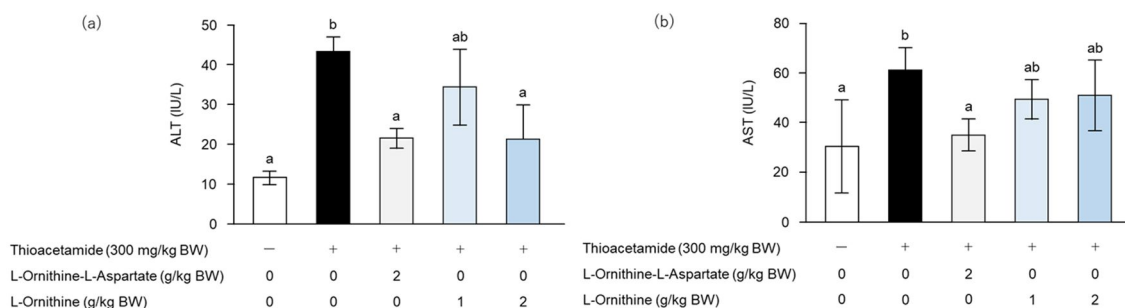


図3. チオアセトアミド誘導性肝障害におよぼすオルニチンの影響 (a) 血清ALT活性、(b) 血清AST活性

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 1件）

1. 著者名 Kobayashi, M., Shima, T. and Fukuda, M.	4. 巻 9
2. 論文標題 Metabolite Profile of Lactic Acid-Fermented Soymilk	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Food and Nutrition Sciences	6. 最初と最後の頁 1327-1340
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4236/fns.2018.911095	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 楊 箏、小林 麻貴、橋本 堂史
2. 発表標題 HepG2細胞における脂質蓄積に及ぼすオルニチンの影響
3. 学会等名 第75回日本栄養・食糧学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹本 孝多、小林 麻貴、橋本 堂史
2. 発表標題 アンモニア誘導性細胞死に及ぼすオルニチンの影響
3. 学会等名 第75回日本栄養・食糧学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林麻貴, 江草 信太郎, 福田 満
2. 発表標題 Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii TUA4408Lによる豆乳の乳酸発酵代謝物解析
3. 学会等名 第72回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2018年

〔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	橋本 堂史 (Hashimoto Takashi) (90362764)	神戸大学・農学研究科・准教授 (14501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------