

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：12604

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500951

研究課題名(和文)食物繊維の生体内での役割—生活習慣病予防の観点から

研究課題名(英文)Role of dietary fiber in the body-Prevention from the lifestyle related disease-

研究代表者

南 道子(Minami, Michiko)

東京学芸大学・教育学部・教授

研究者番号：70272432

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：40週令のウィスター系のオスラットを、セルロース10%、5%、2%含有した餌で1週間飼育した。セルロースの多い餌で飼育したラットの肝臓の遺伝子発現は、脂質合成系が抑制されるということが示された。また、肝臓の脂質の分析結果では、総コレステロールの含有量が、セルロースの摂取を多くすると増加したが、血中濃度はセルロースの量には依存しなかった。腸内細菌叢は食物繊維の摂取量の違いで、有意に変動が認められた。

研究成果の概要(英文)：In 40-week-old male wister rats reared for one week with food containing 10%, 5%, and 2% cellulose as dietary fiber, suppression of lipid synthesis system was seen in the gene expression of the liver. Although, in regard to lipid levels in liver, the total cholesterol level was seen to significantly increase by increasing the intake of cellulose. Also, a significant variation in the intestinal flora due to the variation of dietary fiber intake was detected. The observation of the change in gastrointestinal gene expression due to the amount of cellulose intake is the report which shows that cellulose that is not absorbed into the body has a function to indirectly control the gene expression in the body.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：食物繊維 腸内細菌叢 DNAマイクロアレイ ラット

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 食物繊維はながらくヒトが消化酵素をもたないので、その研究は腸内細菌叢の変化や、血中の成分変化に重点が置かれていた。血糖値の上昇遅延や、血中コレステロールの濃度の低下という作用が見いだされていたのは、それら糖質や脂質と食物繊維が物理的な吸着により体内に吸収される栄養素の量が異なり、その結果、血中の値に反映されると考えられていた。

(2) しかし近年疫学調査の結果から野菜や果物を多くとると、心疾患の患者で血中濃度が高くなる PAI-1 の血中濃度が低くなるという報告や、高脂肪食で飼育したマウスで乾燥野菜の添加により、アディポカインである、レプチンや PAI-1 の脂肪組織での発現量が変化したとの報告があり、食物繊維が単に物理的な作用だけではなく、他の生理作用があるのではないかと考えられた。

## 2. 研究の目的

(1) 食物繊維が物理的な吸着や腸内細菌叢の変化だけでなく、一部腸内細菌で分解され、もしくは生成した物質が、体内に吸収される事により、未知の生理作用を発揮しているのではないかと考えた。本研究は動物を使った栄養学実験で、食物繊維による腸内細菌叢の変化と血清 PAI-1 量、臓器での遺伝子発現の変化との相関関係を検討しようというものである。予備実験では、ラット肝臓の DNA マイクロアレイの解析結果により、食餌中の食物繊維の量により遺伝子発現変化を起こす事が明らかになった。これは単に栄養素の吸収に差があったためか、腸内細菌叢の変化により生成した物質が一部吸収されて、遺伝子発現調節にも変化をもたらせたのかどちらかである事が、考えられた。

(2) 予備実験の結果から、血清 PAI-1 量が食物繊維の食事の量により、変化をする事がわかったが、それが肝臓で産生されるものか、血管内皮で産生されるものか、脂肪細胞由来のものかを明らかにする目的で、RT-PCR を行う事により各臓器での PAI-1 の mRNA 発現量の変化を検討した。

また、腸内細菌叢と遺伝子発現の網羅的な解析を相関させて考察することは今まで行なわれておらず、これらの事が分かれば、個々の食物繊維の詳細な検討が進み、今まで、非栄養素として研究が進まなかった領域にスポットがあたり、研究が加速すると考えられた。さらに、いままで物理的な吸着で、血中の脂質量や血糖値の上昇を緩慢にするという面でのクローズアップのされ方をしてきた食物繊維が、PAI-1 のように腺溶系で重要な働きをしている物質の産生に関与する事がわかってきたので、食物繊維のもつ新たな機能の面での研究、推奨量の検討など、あらたな研究が行われる必要があ

ると考えられる。

## 3. 研究の方法

### (1) 動物飼育

40 週令の Wister 系の雄ラット 21 匹を用いた。食物繊維として日本 LSG 社のセルロースを使用し、2%、5%、10%含有量になるように AIN-93M のセルロース抜き飼料に加え調整した。予備飼育のセルロース 5% 飼料で一週間飼育したのちに、平均体重が同じになるように 3 群に分け、試験飼料で更に一週間飼育した。

### (2) DNA マイクロアレイ

ラットの肝臓と小腸上皮細胞から isogene もしくは TRIzol で totalRNA をそれぞれ抽出し、bioanalyser にて totalRNA の質と量を検討した。次に Affymetrix 社の cDNA 合成キット、ラベリングキットを用いて mRNA を鋳型にして cDNA、さらにビオチン化とともにプローブとなる cRNA を合成した。それを Affymetrix 社の GeneChip Rat Genomewar 230 2.0 Array に各ラットの cRNA のプローブをハイブリダイズした。同社のラットのチップには約 3 万個の遺伝子が搭載されている。同社の Fluidic Station 450 にてプローブを蛍光標識し、Gene chip Reader 3000 で検出した。得られた CEL ファイルを用い、統計環境 R にて DFR、qFARMS、RMA、MAS5 のいずれかによる正規化を行なった。その後、2%と 5% との 2 群間比較解析を実施し、FDR (false discovery rate) < 0.05 と判定されたプローブセットを抽出した。

### (3) 血清分析

各ラットの血清は解剖時に処理し、実験するまで -80 で保存した。PAI-1 については、molecular innovation 社製の Kit を用いた。血中の成分分析は長浜にあるオリエンタル酵母(株)長浜研究所・長浜ライフサイエンスラボラトリー社に送付し、総コレステロール、LDL コレステロール、HDL コレステロール、中性脂肪、アルブミン、GOT、GPT、LDH、LAP、 $\gamma$ -GT、コリンエステラーゼ、グルコース、Fe、P、Ca、Cl、K、Na、IP、CRE、BUN、A/G、TBA、T-BIL、BIL-F について測定を依頼した。

### (4) 腸内細菌叢の解析

盲腸内容物を採取し、存在する菌からゲノム DNA を抽出し、FAM で末端標識したプライマーで 16S rRNA 遺伝子の特定の領域を PCR で増幅後、制限酵素である HhaI MspI 処理を行なった。次に、その断片を ABI のキャピラリー電気泳動装置で FAM を含む断片を分離し、DNA 断片長毎の蛍光強度(ピーク面積)を得た。これをもとに、ラットの個体毎に、各 DNA 断片長の蛍光強度

の比率(ピーク面積比)を算出した。そのうち、全体の2%以上のピーク面積比を持つDNA断片長のデータのみを解析に採用した。その得られたデータは、個体別にDNA断片ごとのピーク面積比(2%以上のもののみ)を算出して多変量データとして結果を得た。次に、多変量解析手法の一つである主成分分析(principal component analysis: PCA)を実施し、食物繊維量の違いによるラットの腸内細菌叢について各群がクラスターを形成するか検討した。

#### (5) RT-PCR

今回の実験ではラットの脂肪細胞からtotal RNAを抽出し、アディポカインであるアディポネクチン、レプチンについておこなった。TaqMan Gene Expression Assays systemを用い、Applied Biosystems社のRT-PCR(step one)を用いて解析した。各サンプルは、3連で行い、検量線や、各プライマーの増幅効率について検討し、値を出した。

#### (6) 肝臓の脂質分析

論文作成にあたり、生体内の脂質代謝に関する情報を得る目的で、秋田にあるスカイライトバイオテック社に肝臓を送り、胆汁や各種コレステロール、中性脂質の分析を依頼した。

#### (7) ペクチン食での検討

食物繊維は野菜等の含まれる不溶性のセルロース以外に、果物に含まれるペクチンなども日常に摂取する食物繊維として摂取量の多いものがある。そこで、セルロースの代わりにペクチンを含んだ食餌で飼育し、PAI-1,レプチンについてELISAによる血液分析を行った。ペクチン含有量がセルロースと同様の量の餌を調整し、ラットの飼育を行った。解剖の後、血清を調整しアディポカインについて血液分析を行い、セルロースの結果と比較した。DNAマイクロアレイは予算の関係から、未試行である。

### 4. 研究成果

#### (1) 体重及び摂食量

食物繊維の量を変化させて、1群7匹ずつ3グループで飼育したが、どの固体も体重は毎日わずかながらであるが、同様に増加し、各群間の体重における有意差は認められなかった。また、食餌の摂食エネルギー量にも有意差が認められなかった。このことから、10%の食物繊維量が体重増加に影響しない事がわかった。

#### (2) DNAマイクロアレイ

ラットの肝臓、脂肪組織からそれぞれのラット、臓器毎に得られた結果は、Affymetrix社のプロトコールに従い、マイクロアレイデータ(CELファイル)を取得した。統計解析のソフトRを用いて解析し、正規化はFactor Analysis for Robust Microarray

Summerizationのデフォルト手法であるqFARMSを行ったが、群間でのクラスターは明確には分かれなかったが、食物繊維の多い群に関しては、まとまる傾向にあることがわかった。発現変動遺伝子に着目できるRank Products法を用い、さらにGene enrichment analysisの結果、食物繊維の多い群に着目すると、肝臓では、脂肪の酸化、コレステロールの生合成、抗アポトーシスなどに関わる遺伝子の割合が有意に高まっている事が確かめられた。これらは、現在個々の代謝経路に関する検討を行い、各々の酵素の遺伝子変動について詳細に検討を行っている。小腸の上皮細胞についても同様にAffymetrix社のチップで検討を行ったが、食物繊維量の違いによる、肝臓のような遺伝子の発現変動の顕著な違いは認められなかった。

#### (3) 血液分析

長浜ライフサイエンスラボラトリーに依頼した血液分析を行った結果を群毎に、Turkey's s-testを行った結果、食物繊維の量により、血中の各分析項目での有意差はみられなかった。食物繊維量が多すぎると、ミネラルの吸収が悪くなり、血中のミネラルの値が減少するが、各群のミネラルの値にもほとんど差が見られず、今回設定した10%食物繊維の量は過剰ではない事が証明された。血液分析は、業者に委託分析を行った以外に、ELISAのKitを用いて解析したが、インスリン量は5%が高く、次いで10%群、2%群と続いた。PAI-1については、食物繊維の量が多くなるほど、血中濃度は高くなった。レプチンについては、有意差が認められなかったが、2%群がやや高い傾向があった。

#### (4) 腸内細菌叢の検索

糞の個数は食物繊維量に比例して増加し、2%と10%ではほぼ2倍であった。それぞれの個数をTurkey's s-testを行ったところ、2%と10%だけでなく、2%と5%、5%と10%でも有意差のある日が多かった。解剖時に採取した盲腸内容物中の菌から抽出した16SrRNAを鋳型にしたT-RFLP法で得られた結果をマイクロアレイと同じ手法で階層的クラスター解析を行ったところ、それぞれがクラスターを形成し、食物繊維の量によって菌叢が違う事が判明した。これは予備実験の結果では、食物繊維が少ない群では腸内細菌の種類が多く、多い群では少ないという結果であったが、それらを反映している可能性が示唆された。

#### (5) RT-PCR

ELISAで解析したPAI-1,レプチンについては、主に脂肪細胞で合成されるアディポカインであるので、脂肪細胞からRNAを抽出して、RNAレベルでの遺伝子発現の量的な変化を調べた。PAI-1は食物繊維が多いほど発現量が少なくなる傾向である事がわかった。PAI-1の血液分析の結果は、脂肪細胞のRT-PCRの

結果と違う事から、血中の PAI-1 の濃度は、脂肪細胞だけでつくられるのではなく、血管内皮細胞と肝臓由来のものも大であると考えられたが、DNA マイクロアレイの結果から肝臓での PAI-1 の遺伝子の発現には差が見られなかったことから、血管内皮で作られる PAI-1 量が血液濃度に貢献していると考えられた。今回の結果は疫学調査の結果と反対であるので、今後更なる検討が必要と思われる。アディポネクチンやレプチンは差があまりなかったが、いずれも個体差が大きく、増加や減少傾向である程度に留まった。

#### (6) 肝臓の脂質分析

DNA マイクロアレイでの結果から、脂質代謝に影響がある事がわかったが、血液分析の結果では、脂質成分の血中濃度は有意差が見られなかった事から、肝臓中の脂質成分に違いが見られるのではと考えて、当初の計画にはなかった肝臓中の脂質分析を行った。その結果、総コレステロールの値が食物繊維の量が多いと増加傾向であった。これは、肝臓の DNA マイクロアレイの脂質代謝の抑制の結果と照らし合わせると、ちょうど反対の結果となり、生体内の代謝のダイナミックな変動の一端が伺えた。

#### (7) ペクチン食での検討

セルロースと同様の濃度のペクチンを含んだ飼料で飼育したラットの血液中のレプチン濃度は、ペクチンの量が 2%、5% では殆ど変化がなかったが、10% 食で血中濃度が減少した。また、PAI-1 量は食物繊維の量が増えるほど血中濃度の増加がみられた。これは、セルロースとほぼ同様の結果が得られ、食物繊維の摂取が PAI-1 量を増加させるという、疫学調査の結果とは違う結果になった。そもそも、PAI-1 の血中濃度の最適値については不明であり、心疾患の患者の PAI-1 量は、健康人の 4-5 倍であること、最近の研究で肝臓の再生には PAI-1 の発現が必要な事などが報告されていて、食物繊維の増加で増えた PAI-1 量が、健康に不利になる量であるかは不明であり、今後の検討課題である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

#### [雑誌論文](計3件)

Keisuke Fukunaga, Takaaki Hatanaka, Yuji Ito, Michiko Minami and Masumi Taki. Construction of a crown ether-like supramolecular library by conjugation of genetically-encode peptide linkers displayed on bacteriophage T7. Chemical communication 査読有り 50 (30) (2014) 3887-4012 DOI:10.1039/c4cc00811a

Effects of inhaled(S)-linalool on

hypothalamic gene expression in rats under restraint stress. Yamamoto N., Fujiwara S., Saito-Iisumi K., Kamei A., Shinozaki F., Watanabe Y., Abe K. and Nakamura A. Biosci. Biotechnol. Biochem. 査読有り 77(12):2013-8 (2013) DOI:10.1271/bbb.130524

Influence of a short-term iron-deficient diet on hepatic gene expression on profiles in rats. Kamei A. Watanabe Y, Kondo K, Okada S, Shinozaki F. Ishijima Y, Nakai Y, Kondo T, Arai S, and Abe K. PloS One. 査読有り Jun 5;8(6)e65732 DOI:10.1371/journal.pone.0065732 (2013)

#### [学会発表](計3件)

福居篤子、南道子、朝倉富子  
喉越しを数値化する～オトガイ下筋の筋電位に及ぼすゼリー状オブラートの効果～  
第28回日本薬剤学会 2013年5月23日  
名古屋 ウィンクあいち

西原百合枝、南道子、新垣有紀、川原志織、柴田有理、江藤和佳子、朝倉富子、舟木淳子  
セルロース及びセルロース誘導体添加パンの品質  
日本調理科学会平成25年度年度大会  
2013年8月24日 奈良市 奈良女子大学

西原百合枝、南道子、江藤和佳子、朝倉富子、舟木淳子  
製パンへのセルロース及びセルロース誘導体添加の影響 第65回日本家政学会  
2013年5月18日 東京 昭和女子大

#### [図書](計2件)

吉田 勉 監修、南道子、舟木 淳子  
編著 高崎 禎子、柘植 光代、宅間 真佐代、松藤 泰代、平 和香子、三宅 紀子、畦 五月 調理学-生活の基盤を考える-学文社(2013)全192頁、1-2, 58-73, 182-187頁

南道子 他279名 看護学大事典、メディカルフレンド社 (2012)全2453頁、393, 742, 1602, 1557頁

#### [産業財産権] 出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

南 道子 (Minami Michiko)  
東京学芸大学 教育学部 生活科学  
研究者番号：70272432

(2) 研究分担者

( )  
研究者番号：

(3) 連携研究者

亀井 飛鳥 (Kamei Asuka)  
(神奈川科学アカデミー・アンチエイジ  
ングプロジェクト・研究員)  
研究者番号：40514112

篠崎 文夏 (Shinozaki Fumika) (神奈川  
科学アカデミー・アンチエイジングプロジ  
ェクト・研究員)  
研究者番号：00359647