

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：18001

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2016

課題番号：24700834

研究課題名(和文) 沖縄伝統食材「田芋」の疾病予防・健康増進作用

研究課題名(英文) Disease-preventive and health-promotion effects of Okinawan traditional food 'Taro'

研究代表者

宮良 恵美 (MIYARA, Megumi)

琉球大学・医学部・助教

研究者番号：50457686

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は沖縄の伝統食材である田芋の疾病予防・健康増進作用を調べる目的で行った。田芋アラビノガラクトンプロテイン(AGP)はマウスマクロファージ細胞株の抗ウイルス因子の一つである2'-5'オリゴアデニル酸合成酵素を増加させる傾向にあり、乳酸菌類にも利用されて腸内環境を改善する作用が示唆され、健康食品の素材として有用であることが明らかになった。しかし、生活習慣病予防効果の解明には至らなかったため、今後、適切な生活習慣病モデル試験を用いて田芋AGPの作用を検討する必要がある。

研究成果の概要(英文)：The objective of this study was to investigate disease-preventive and health-promotion effects of arabinogalactan(AG)-protein(P) in taro which is a traditional food in Okinawa, Japan. AGP purified from taro tended to increase 2'-5' oligoadenylate synthase, one of the antiviral agents, in mouse macrophage and might exert immunomodulatory activity. Some lactic acid bacteria degraded and utilized AG in culture test, indicating the improvement of intestinal condition. Thus, AGP in taro may be a valuable source for functional foods. However, effects of AGP on prophylaxis of lifestyle-related diseases have not been clarified in this study, so that further study using more appropriate test would be required.

研究分野：免疫学、健康食品学

キーワード：アラビノガラクトンプロテイン 免疫調節作用 生活習慣病予防

## 1. 研究開始当初の背景

地域の食生活に溶け込んだ伝統食材は経験的に様々な効能が知られており、近年、その活性成分と生理作用を科学的に証明することで、伝統食の見直しや新たな利用方法の開発、延いては地域の活性化にも貢献している。沖縄県の伝統食材「田芋(方言名: ターンム、学名: *Colocasia esculenta* L.)」は水芋、タロイモと呼ばれる里芋の一種で、子孫繁栄の象徴としてお祝い事やおせち料理等、年中行事には欠かせない食材である。栄養学的には高栄養価(易消化性デンプン、豊富なミネラル・ビタミン類を含有)であるとともに、地元では特徴的な粘りが「整腸作用・保湿・滋養強壮」に良いと愛用されている。海外ではハワイのタロイモ発酵食品「ポイ」が乳幼児の離乳食として利用されており、幼児のアレルギーが減少したという報告(Brown A.C. *et al.*, 2004)やその抽出物で抗大腸癌作用の報告(Brown A.C. *et al.*, 2005)があるが、活性物質について詳細は明らかになっていない。

沖縄やハワイで謳われている田芋・タロイモの効能の根底には免疫調節作用が関わっていると推測され、特徴的な粘り物質である「アラビノガラクトタンパク質(AGP)」に着目した。本物質は主にアラビノースからなる多糖にタンパク質が10%程度結合した水溶性の食物繊維である。予備的な検討において、田芋の粗粘性物質を培養したマウスの脾臓細胞に添加するとTh1型サイトカイン(インターフェロン- $\gamma$ ; IFN- $\gamma$ )が増大したことから、ヘルパーT細胞バランス(Th1/Th2)を正常化するという免疫調節機能の可能性が示唆された。これにより若年層で特に問題となっているアレルギー体質の改善が期待される。また、コーヒー豆由来のアラビノガラクトタン(AG)ではビフィズス菌増殖効果が報告されており(堀牧ら, 2007)、田芋のAGPについても腸内フローラの改善と腸管免疫の刺激により、免疫力の低下した高齢者で特に問題となる感染症や大腸癌をはじめとする悪性腫瘍の予防効果も期待されるが、詳細な検討はまだ行われていない。さらに一般的に多くの水溶性食物繊維が過剰に摂取した糖質・脂質の吸収を抑制して糖尿病や肥満症の改善作用も併せもつことから、中年層で特に問題となる生活習慣病に対する効果も期待される。田芋由来AGPの免疫調節機能や生活習慣病予防効果が科学的に検証されれば、伝統的な食生活のメリットが裏付けられ、幅広い年齢層の疾病予防ならびに健康増進に貢献できる。

## 2. 研究の目的

上記の背景および予備的な検討結果を踏まえて、本研究は田芋AGPの性状を検討するとともに、免疫調節機能および生活習慣病予防効果等の機能性を明らかにすることを目的とした。

具体的な目的は以下の4項目とした。

- (1) 田芋AGPの精製・成分分析
- (2) 免疫細胞株を用いた田芋AGPの免疫調節作用の検討
- (3) 腸内細菌株を用いた田芋AGPの腸内環境改善作用の検討
- (4) 田芋AGPの生活習慣病予防効果の検討

## 3. 研究の方法

### (1) 田芋AGPの精製および成分分析

凍結乾燥した田芋粉末と5倍容の蒸留水を混合後、トリクロロ酢酸(最終濃度4%)を添加して攪拌した(4℃, 5分間)。遠心分離(10,000 rpm, 4℃, 10分間)後、上清にエタノール(最終濃度80%)を添加して攪拌した(室温, 5分間)。遠心分離(10,000 rpm, 4℃, 10分間)後、沈殿物を5倍容のエタノールとアセトンで3回洗浄した。その後、沈殿物を蒸留水で溶解し、透析・凍結乾燥して田芋AGPを得た。

糖濃度はフェノール硫酸法(標準物質: ガラクトン)で測定した。構成単糖は1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone (PMP)誘導体化法(Honda S. *et al.*, 1989)(標準物質: D-ガラクトース、D-アラビノース、D-グルコース、D-マンノース、D-フルクトース、L-フコース、D-ガラクトツロン酸、D-グルクロン酸)により分析した。タンパク質はDCプロテインアッセイ法(BioRad製、標準物質: ウシ血清アルブミン)により定量した。

### (2) 免疫細胞株におけるAGPの作用

マウスのマクロファージ(M $\phi$ )細胞株であるRAW264.7を用いて以下3項目の試験を行った。

#### 田芋AGPの細胞毒性試験

10%FBS添加DMEM培地を用いて96ウェルプレートにRAW264.7( $2 \times 10^5$ 個/ウェル)を5%CO $_2$ 存在下、37℃、2時間培養後、田芋AGP(最終濃度100 $\mu$ g/mlまで)を添加して24時間培養した。Cell counting kit-8(DOJINDO製)を添加・反応させ、450nmにおける吸光度を測定した。AGPの代わりに滅菌水を添加したコントロールの細胞生存率を100%として、AGP添加後の生存率を算出した。比較対象としてカラマツAGを用いた。

#### DNAマイクロアレイ解析

25cm $^2$ フラスコにRAW264.7( $7.5 \times 10^5$ 個/フラスコ)を5%CO $_2$ 存在下、37℃、24時間培養した。AGP(最終濃度50 $\mu$ g/ml)を添加して24時間培養後、細胞を回収してtotal RNAを抽出した(RNeasy Mini Kit, QIAGEN製)。株式会社タカラバイオに委託してMouse Sure Print G3(8 $\times$ 60K)マイクロアレイ解析(Agilent製)を行った。

遺伝子(mRNA)発現量およびタンパク質発現量の測定

「DNAマイクロアレイ解析」で変動が認められたサイトカイン類および酵素の遺伝

子発現量を測定するため、と同様に調製した total RNA 2 µg を cDNA に逆転写した (High capacity RNA-to-cDNA Kit, LifeScience 製) 逆転写産物をテンプレートとして TaqMan Fast Gene Expression Assays を用いて、試薬の推奨条件でリアルタイム PCR を行った (StepOnePlus, LifeScience 製)。

また、培養上清に含まれるサイトカイン類および酵素タンパク質は市販の ELISA キットを用いて定量した [Mouse IL-10 および IFN λ<sub>3</sub> ELISA Ready-Set Go! (affymetrix 製) ELISA Kit for 2'-5'-OAS1 (Uscn Life Science 製)]。なお、予備実験において、培養上清はそのままでは全てのタンパク質が ELISA の検出限界以下の濃度であったため、分子量 10,000 分画の限外ろ過膜を用いて培養上清を 10 倍濃縮してから測定を行った。

遺伝子発現量およびタンパク質発現量はコントロール (滅菌水添加) と田芋 AGP について *t* 検定 (SAS University Edition) で比較検討した。

### (3) 腸内細菌株による分解性試験

腸内細菌用の培地をオートクレーブ滅菌する際、田芋 AGP はタンパク質が変性して沈殿してしまうため、トリプシンでタンパク質を分解・除去した AG にして、再抽出後、培地に添加した。GAM 半流動培地に AG またはコントロール物質 (グルコース、ガラクトース、アラビノース、カラマツ AG) を最終濃度が 1.0% となるように添加後、115、15 分間オートクレーブ滅菌して実験に用いた。供試菌株には *Bifidobacterium bifidum* NBRC 100015<sup>T</sup>、*Bifidobacterium longum* JCM 1217<sup>T</sup>、*Bifidobacterium pseudocatenulatum* JCM 1200<sup>T</sup>、*Lactobacillus gasseri* JCM 1131<sup>T</sup>、*Lactococcus lactis* NBRC 100933<sup>T</sup>、*Escherichia coli* NBRC 3301、*Enterococcus faecalis* NBRC 100480、*Clostridium butyricum* NBRC 3315、*Clostridium sporogenes* NBRC 13950<sup>T</sup> の 9 菌株を用いた。前培養した菌株を培地に接種し (n = 3)、嫌気培養ジャーにて CO<sub>2</sub> 発生剤 (アネロパック) を用いて 37 °C で 7 日間嫌気培養した。その後、培地を遠心分離 (1,500 rpm, 3 分間) し、上清の 660 nm における吸光度を測定して菌の増殖を判定した。糖の分解性は培地 pH の変化により判定した。判定基準は光岡の方法 (光岡, 1990) に準じ、菌未接種で糖無添加培地の pH を A、菌未接種で糖添加培地の pH を B、菌接種で糖無添加培地の pH を C、菌接種で糖添加培地の pH を D とし、(B - D) - (A - C) = 0.35 以上を糖分解 (+) とした。乳酸菌 5 種類については、糖添加培地において糖の分解が認められた *B. bifidum*、*B. longum*、*B. pseudocatenulatum*、*L. gasseri*、*L. lactis* について、培地上清の乳酸を不揮発性脂肪酸の測定法 (日本細菌学会教育委員会編, 1982)

に従い GC-FID により定量した。

### (4) 培養細胞株における生活習慣病予防効果の検討

マウス前駆脂肪細胞 3T3-L1 を用いて田芋 AGP が脂肪蓄積に及ぼす影響を検討しようとして試みた。3T3-L1 を Reed BC らの方法 (Proc Natl Acad Sci USA, 77, 285-289, 1980) に従い、イソブチルキサンチンおよびインスリン、デキサメタゾンを用いて脂肪細胞へ分化誘導し、オイルレッド O 染色により細胞内の脂肪を確かめた。

## 4. 研究成果

### (1) 田芋 AGP の精製・成分分析

田芋凍結乾燥粉末 1.03 kg から AGP 4.98 g を精製した (収率 0.48%)。AGP 1 mg/ml 溶液の糖濃度は 0.56% であり、構成単糖はガラクトース 49.3%、ガラクトツロン酸 27.0%、アラビノース 14.8%、グルコース 7.3%、マンノース 1.8% であった。グルクロン酸およびフルクトース、フコースは含有していなかった。タンパク質濃度は 0.31 mg/ml であった。

### (2) 免疫細胞株における AGP の作用

#### 田芋 AGP の細胞毒性試験

田芋 AGP 添加時の RAW264.7 細胞の生存率を図 1 に示す。田芋 AGP は 60 µg/ml まで生存率に影響を与えず、M<sub>1</sub> の増殖を亢進するような作用は認められなかったが、細胞毒性もないことを確認した。

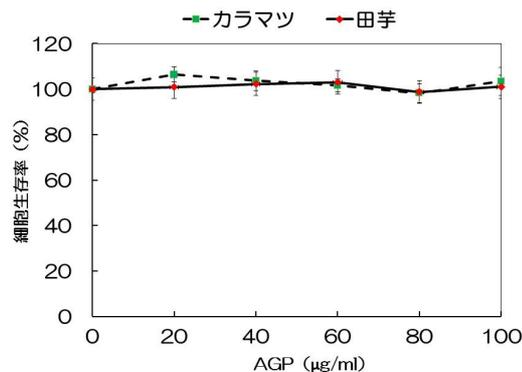


図 1. 田芋 AGP が RAW264.7 細胞の生存率に及ぼす影響

#### DNA マイクロアレイ解析

田芋 AGP が M<sub>1</sub> に及ぼす影響について DNA マイクロアレイを用いて網羅的に解析した。表 1 にコントロールと比較して発現率が 2 倍以上に増大した遺伝子数または 1/2 以下に低下した遺伝子数を示す。

表 1. DNA マイクロアレイ解析結果

	2倍以上	1/2以下
変動遺伝子数 (アノテーション有)	763 (307)	796 (353)
血液・免疫関連遺伝子	43	48

免疫関連遺伝子では、インターロイキン (IL) -10 およびインターフェロン (IFN) -3 という 2 種類のサイトカインと 2'-5'オリゴアデニル酸合成酵素 (OAS) の遺伝子発現量をそれぞれ 2.5 倍、2.4 倍、3.6 倍に増大させ、免疫調節作用があることが示唆された。IL-10 および IFN-3 はともに IL-10-IFNファミリーのサイトカインであり、サイトカイン受容体ファミリー 2 (CRF2) を介して作用する (角田茂: 炎症と免疫, 15, 190-196, 2007)。特に、IFN-3 は古典的な抗ウイルス機構として知られる「2-5A システム」を活性化する。図 2 に示したように、IFN-3 が CRF2 に結合すると OAS の発現量が増加し、ウイルス RNA の分解が亢進する。このことから、田芋 AGP が IFN-3 や OAS を介して間接的に抗ウイルス作用を活性化する可能性が示唆された。そこで、これら抗ウイルス因子の遺伝子 (mRNA) およびタンパク質発現量を定量した。

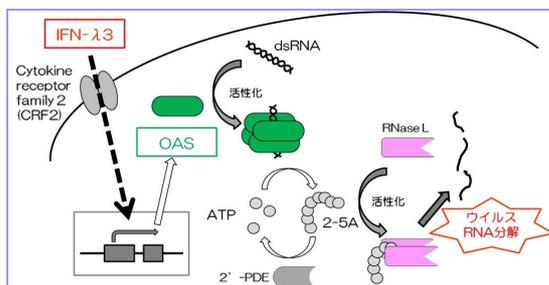


図 2. 抗ウイルス機構「2-5A システム」

抗ウイルス因子の mRNA 発現量およびタンパク質発現量の測定

IL-10、*Ifn-3* および *Oas1a* の mRNA 発現量を図 3 に示した。縦軸に示した相対定量値 (RQ 値) は、滅菌水を添加したコントロールの値を 1 とした場合における田芋 AGP 添加時の mRNA 発現量の相対値であり、コントロールと AGP 添加について *t* 検定を行った。IL-10 については培養 8 時間後に AGP を添加した細胞で発現量の低下がみられた ( $p < 0.05$ ) が、培養 24 時間後にはコントロールと同等の RQ 値であった [図 3 (A)]。 *Ifn-3* については AGP 添加により培養 8 時間後から発現量の増加傾向がみられ、コントロールと比較して有意差はないものの、培養 24 時間後には RQ 値が 2.7 倍に増大する傾向が認められた ( $p = 0.066$ ) [図 3 (B)]。 また、 *Oas1a* については培養 24 時間後、AGP 添加により RQ 値が 1.20 と僅かながら増大した ( $p < 0.05$ ) [図 3 (C)]。

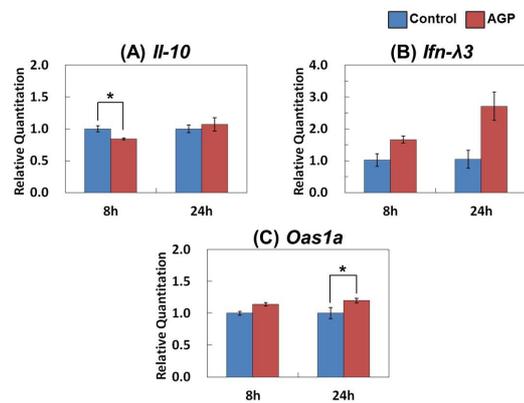


図 3. 抗ウイルス因子の mRNA 発現量  
\*有意差あり ( $p < 0.05$ )

ELISA 法によるタンパク質定量の結果を図 4 に示す。IL-10 については培養 24 時間後に AGP を添加した細胞で低下傾向にあった [図 4 (A)]。 IFN-3 については培養 8 時間後、僅かに検出されたが、コントロールと AGP で同程度の濃度であった [図 4 (B)]。 OAS1a は培養 8 時間後および 24 時間後、AGP 添加により発現量が僅かながら増加する傾向がみられた。

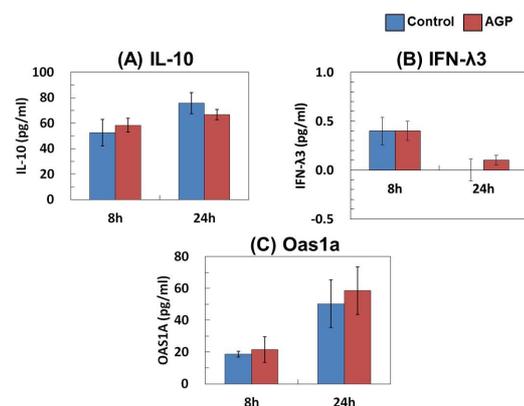


図 4. 抗ウイルス因子のタンパク質発現量

### (3) 腸内細菌株による分解性試験

各被験物質を唯一の糖質源として 9 種類の腸内細菌を培養した結果、図 5 に示したとおり、菌の増殖が認められた。田芋 AG を添加した培地は比較対象としたカラマツ AG に比べて菌が良好に発育する傾向がみられた。田芋 AG 添加培地において、*C. butyricum*, *C. sporogenes* が良好に発育した要因は、培地作製の際、田芋 AG が試験管の底に沈殿して空気の触れにくい底部分で高濃度になってしまい、偏性嫌気性である *C. butyricum*, *C. sporogenes* の発育により適した条件となったことが原因と考えられた。また、コントロールとして用いたグルコース添加培地において *E. coli* の増殖がみられなかったのは、増殖速度が速く対数増殖期での測定を逃したことが原因であると考えられた。本研究の田芋 AG 精製量では追加試験が難しかった

め、糖質濃度が均一な培地を用いた各菌による糖質源の利用効率の検討は今後の課題である。

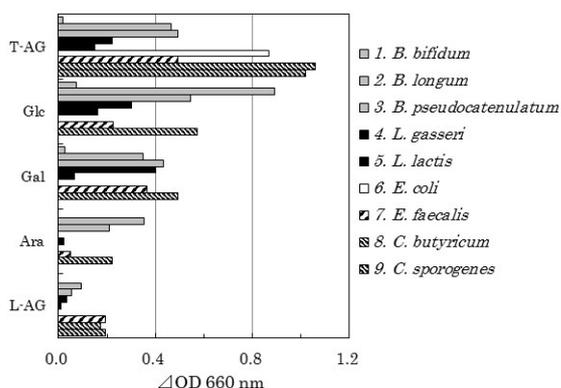


図5. 腸内細菌株の増殖

T-AG: 田芋アラビノガラクトン、Glc: グルコース、Gal: ガラクトース、Ara: アラビノース、L-AG: カラマツアラビノガラクトン

表2に糖分解および乳酸菌が産生した培地中乳酸濃度を示す。グルコース、ガラクトース、アラビノースの単糖3種類については、既に報告されている供試菌株の糖分解と同様の結果であり、試験の妥当性が確かめられた。単糖3種類より乳酸菌類が産生した乳酸濃度については、*B. bifidum*は比較的低い値であったが、それ以外では $43.0 \pm 4.14 \sim 158.9 \pm 4.79$  mMという高値であった。田芋AG添加培地について糖分解(+)であった*B. longum*および*B. pseudocatenulatum*の培地上清では乳酸濃度が $4.7 \pm 0.59 \sim 8.0 \pm 0.37$  mMであり、カラマツAG添加培地では $3.3 \pm 0.37 \sim 7.6 \pm 0.42$  mMであった。このことから、田芋AGはいわゆる善玉菌として知られる乳酸菌*B. longum*および*B. pseudocatenulatum*に分解・利用されることが確認され、腸内環境改善に寄与することが示唆された。今後、田芋AG粉末サプリメントや乳酸発酵食品へ利用して、整腸作用を詳細に検討したい。

表2. 糖分解および培地中乳酸濃度

	T-AG	Glc	Gal	Ara	L-AG
1. <i>B. bifidum</i>	-	+	+	-	-
2. <i>B. longum</i>	+	43.0	8.6	+	+
3. <i>B. pseudocatenulatum</i>	+	+	+	+	+
	4.7	58.1	65.1	52.6	3.3
4. <i>L. gasseri</i>	-	+	+	-	-
		158.9	137.3		
5. <i>L. lactis</i>	-	+	+	-	-
		120.4	54.7		
6. <i>E. coli</i>	-	+	+	+	-
7. <i>E. faecalis</i>	-	+	+	-	-
8. <i>C. butyricum</i>	+	+	+	-	-
9. <i>C. sporogenes</i>	+	+	-	-	-

T-AG: 田芋アラビノガラクトン、Glc: グルコース、Gal: ガラクトース、Ara: アラビノース、L-AG: カラマツアラビノガラクトン

(4) 培養細胞株における生活習慣病予防効果の検討

マウス前駆脂肪細胞 3T3-L1 を用いて田芋AGPが脂肪蓄積に及ぼす影響を検討しようと試みたが、オイルレッドO染色で脂肪の蓄積がみられず脂肪細胞へ分化誘導されていなかったため、田芋AGPの作用検討まで至らなかった。今後、分化誘導ステップを確認し方法を修正して、田芋AGPの生活習慣病予防効果を調べたい。

<引用文献>

Brown A.C. *et al.*, Nutr Clin Care, 7, 69-74, 2004.  
 Brown A.C. *et al.*, Phytother Res, 19, 767-771, 2005.  
 堀牧恵ら, 日本食品微生物学会雑誌, 24, 163-170, 2007.  
 Honda S. *et al.*, Analyt Biochem, 180, 351-357, 1989.  
 光岡知足: 腸内細菌学, 496, 朝倉書店, 東京, 1990.  
 日本細菌学会教育委員会編: 嫌気性菌の分離と同定法, 116, 菜根出版, 東京, 1982.  
 Reed B.C. *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA, 77, 285-289, 1980.

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔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 無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮良 恵美 (Miyara Megumi)  
 琉球大学・医学部・助教  
 研究者番号: 50457686

(2) 研究協力者

宮城 和文 (Miyagi Kazufumi)