

平成 30 年 5 月 22 日現在

機関番号：30105

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K00836

研究課題名(和文) 大腸ALP及び β -グルコシダーゼの新規生理的意義と食品因子による制御作用の解明

研究課題名(英文) Elucidation of physiological function of colonic ALP and beta-glucosidase activities, and the effects of food factors on these enzymes

研究代表者

岡崎 由佳子 (OKAZAKI, Yukako)

藤女子大学・人間生活学部・准教授

研究者番号：80433415

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)：本研究では、腸内環境改善作用のある水溶性食物繊維やオリゴ糖等の発酵性難消化性糖質が共通して、高脂肪食摂取ラットの大腸ALP活性を特異的に増加させ、この増加にIAP-1遺伝子発現の誘導が関与していることを明らかにした。一方で、 β -グルコシダーゼ活性については共通した影響は認められなかった。大腸ALP活性については、腸内環境改善に関わる腸管の種々の因子と正の相関関係にあることが認められた。これらの結果より、発酵性の難消化性食品因子による大腸ALP活性の増加は、大腸内環境の保全に関与する可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：This study demonstrated that consumption of fermentable non-digestible carbohydrates, including soluble dietary fiber and oligosaccharides, commonly elevated colonic ALP activity by up-regulation of the expression of IAP-1 in rats fed a high-fat diet. On the other hand, β -glucosidase activity was not affected by the present dietary manipulation. Colon ALP correlated with colonic luminal variables such as mucins, cecal n-butyrate and fecal ratio of Bifidobacterium spp. that are associated with improvement of colonic environment. These results suggest that the elevating effects of fermentable non-digestible carbohydrates on colonic ALP might be important for protection of gut epithelial homeostasis.

研究分野：食物学，栄養学

キーワード：大腸ALP活性 ALP遺伝子 水溶性食物繊維 難消化性オリゴ糖 大腸内環境 ラット

1. 研究開始当初の背景

現代の食生活は欧米食の普及に伴い、高脂肪食、低食物繊維食の傾向となっている。その結果、腸内環境の悪化に伴う大腸がん、炎症性大腸炎などの大腸疾病やメタボリックシンドロームが増加し、社会的問題となっている。これらの疾病を防ぐためには腸内環境の改善が必要とされており、特に食生活習慣の面から新たな対策を講じることが求められている。

これまでの研究において、水溶性食物繊維のグルコマンナンを多く含む食品（ユリネ）の摂取が、炎症性大腸炎モデルラットの病態症状を改善させるとともに、大腸の Alkaline phosphatase (ALP) 活性を上昇させるという興味深い現象を発見した(引用文献①)。また、ユリネ摂取により腸内環境が改善されるとともに、糞中の β -グルコシダーゼ活性が上昇することも見出した。

ALP は、アルカリ性条件下でリン酸化合物を分解する酵素であり、肝臓、腎臓、小腸、大腸をはじめ全身に分布している。近年、小腸由来の ALP は炎症作用に対して防御的に働くことが指摘されており、ビタミン A, D, E, K, 乳糖などの栄養素による上昇が報告されている。一方で大腸の ALP 活性についてはほとんど検討されておらず、その生理的意義も明らかになっていない。 β -グルコシダーゼは糖の β -グルコシド結合を加水分解する酵素であるが、大腸での生理的意義は分かっていない。

2. 研究の目的

上述の研究背景から本研究では、難消化性食品因子が普遍的に大腸 ALP と β -グルコシダーゼ活性を誘導するか否かを検討し、食品因子による大腸の防御機構を解明することを目的としている。また、これらの検討を通して、上記酵素の大腸における生理的意義を明らかにすることも本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) 食物繊維摂取による大腸 ALP 活性と β -グルコシダーゼ活性への影響

①大腸 ALP 活性と β -グルコシダーゼ活性に対する食物繊維の影響の比較検討

実験動物として、4 週齢の SD 系雄ラットを用いた。実験 1 では高脂肪 (30% Lard) の 5% セルロース食を、実験 2 では低脂肪 (5% Corn oil) の 5%セルロース食を基本食とした。各実験食には、水溶性食物繊維の高粘度グルコマンナン(HGM)、低粘度グルコマンナン(LGM)、ペクチン(Pec)、イヌリン(Inu)、および不溶性食物繊維のキトサン(Chi)をセルロースに置き換えて 4%添加した。実験飼料と脱イオン水を自由摂取させて 14 日間飼育した。12~14 日目に糞を採取し、凍結乾燥後に粉末化した。飼育終了後、糞、盲腸内容物、大腸、小腸の ALP 活性および糞中の β -グルコシダーゼ活性、細菌叢 (qPCR 法)、Mucin (蛍光光度法)、

IgA (ELISA 法) を測定した。

②グルコマンナンの摂取が高脂肪食摂取ラットの 大腸 ALP 遺伝子発現に及ぼす影響の検討

実験動物として、4 週齢の SD 系雄ラットを用い、高脂肪 (30% Lard) の 5%セルロース食を基本食として、高粘度グルコマンナン(HGM) と低粘度グルコマンナン(LGM)をセルロースに置き換えて 4%添加した飼料を与え、14 日間飼育した。飼育終了後、糞と大腸の ALP 活性を測定した。大腸 ALP 活性に与える各種阻害剤の影響を検討するため、阻害剤 (L-phenylalanine, L-homoarginine, levamisole) 存在下での ALP 活性を測定した。さらに、大腸の ALP 遺伝子発現の解析 (RT-PCR 法) と、盲腸内容物の有機酸分析 (HPLC 法) を行った。

③グルコマンナンの摂取が大腸炎モデルラットの ALP 活性と炎症性サイトカインに及ぼす影響の検討

実験動物として、5 週齢の SD 系雄ラットを用いた。高脂肪食 (30% Lard) を基本食として、Control 群、DSS 群、DSS+4%高粘度グルコマンナン (HGM)、DSS+4%低粘度グルコマンナン (LGM) の 4 群を設け、14 日間飼育した。飼育 7 日目~14 日目に 1.5%DSS を溶解した飲水を与えた。飼育終了後、大腸 ALP 活性と炎症性サイトカインの遺伝子発現解析を行った。

(2) オリゴ糖類の摂取が高脂肪食摂取ラットの 大腸 ALP 活性と ALP 遺伝子発現に及ぼす影響の比較検討

数種のオリゴ糖を用いて大腸 ALP と遺伝子発現への影響の比較検討を行うとともに、大腸 ALP と腸内環境関連因子 (Mucin, 有機酸, 腸内細菌叢) との相関を調べた。

実験動物として、4 週齢の SD 系雄ラットを用いた。基本食として、30% Lard・5%セルロース食を用いた。実験食には、難消化性オリゴ糖のフルクトオリゴ糖 (FOS)、ガラクトオリゴ糖 (GOS)、ラフィノース (RAF) およびラクチュロース (LAC) と、一部消化性オリゴ糖のイソマルトオリゴ糖 (IMOS) を用い、セルロースに置き換えて 4%添加した。実験飼料は 14 日間自由摂取させた。飼育終了後、大腸および小腸の ALP 活性の測定と、ALP 遺伝子の発現解析 (RT-PCR 法) を行った。また、糞中 Mucin、盲腸有機酸、糞中の腸内細菌叢を解析した。さらに、ALP とメタボリックシンドローム予防との関係性が指摘されていることから、腸管の脂質代謝関連遺伝子の発現解析を行った。

4. 研究成果

(1) 食物繊維摂取による大腸 ALP 活性と β -グルコシダーゼ活性への影響

①大腸 ALP 活性と β -グルコシダーゼ活性に対する食物繊維の影響の比較検討

実験 1 の高脂肪食条件の結果より、糞と大腸組織の ALP 活性は、Control 群と比較して、

水溶性食物繊維添加食 4 群で有意に増加することが明らかになった(図 1)。小腸 ALP 活性は、本実験条件による顕著な影響を受けなかった。腸管免疫機能の指標である糞中 IgA と、腸管バリア機能の指標である Mucin 含量も、大腸 ALP 活性の場合と同様に、水溶性食物繊維添加食 4 群で有意に増加した。一方、不溶性食物繊維の Chi 添加食群による、大腸 ALP 活性、IgA、Mucin への影響は認められなかった。また、糞中 β -グルコシダーゼ活性については、本実験条件による影響を受けなかった。糞中細菌叢の *Clostridium coccoides* の割合は、水溶性食物繊維 4 群で有意に低下した。糞中 IgA および Mucin 含量と大腸 ALP 活性の間には、有意な正の相関関係が認められた。

実験 2 の低脂肪食条件の結果より、HGM と Pec 摂取により、大腸 ALP 活性の若干の増加がみられたが、他の水溶性食物繊維による影響は認められなかった。

以上の結果より、水溶性食物繊維は共通して、小腸には影響を与えずに、大腸 ALP 活性を特異的に増加させることが明らかになり、腸管免疫やバリア機能に関わる因子との相関も認められた。また、水溶性食物繊維による大腸 ALP 増加作用は、低脂肪食よりも特に高脂肪食の栄養条件下で顕著である可能性が示された。

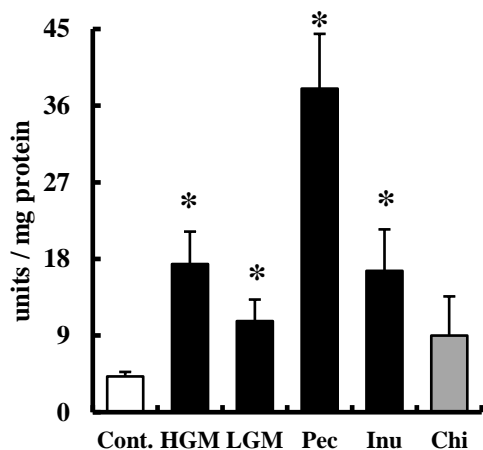


図 1 水溶性食物繊維による高脂肪食摂取ラットの大腸 ALP 活性増加作用
* P < 0.05

②グルコマンナンの摂取が高脂肪食摂取ラットの大腸 ALP 遺伝子発現に及ぼす影響の検討

大腸 ALP 活性は、HGM および LGM の摂取により有意に増加した。各種阻害剤を用いた検討から、大腸 ALP のタイプは小腸型の ALP であることが示された。また、大腸における ALP 遺伝子発現の解析を行った結果、小腸上部由来の *Akp3* および骨、肝臓、腎臓由来の *Alpl* の発現は、グルコマンナン摂取による影響を受けなかったが、小腸全域に局在する *IAP-I* の発現が、HGM および LGM 摂取により有意に増加することが新たに見出された(図 2)。盲腸内容物の n-酪酸、プロピオン酸、乳酸は、

HGM 及び LGM 摂取により有意に増加し、これら腸内発酵産物と大腸 ALP 活性との間には統計的に有意な正の相関関係が認められた。

以上の結果より、グルコマンナン摂取による大腸 ALP 活性の増加には、*IAP-I* 遺伝子発現の誘導が関与していると推定された。また、水溶性食物繊維による大腸 ALP 活性の誘導には、腸内発酵産物の増加が関与している可能性が示唆された。

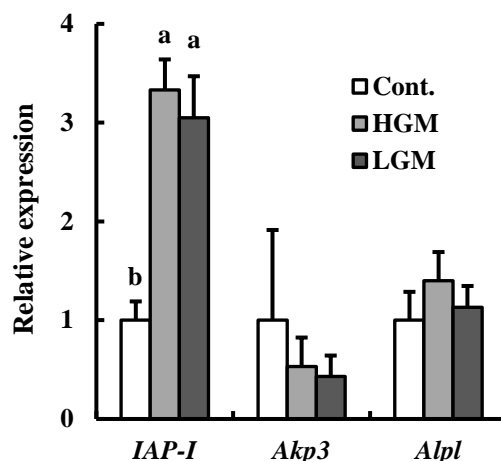


図 2 グルコマンナンによる高脂肪食摂取ラットの大腸 *IAP-I* 発現誘導作用
^{a, b} P < 0.05

③グルコマンナンの摂取が大腸炎モデルラットの ALP 活性と炎症性サイトカインに及ぼす影響の検討

グルコマンナンがデキストラン硫酸ナトリウム(DSS)誘導大腸炎モデルラットの大腸 ALP 活性に及ぼす影響について検討した結果、グルコマンナンの摂取は、DSS 投与ラットの大腸 ALP 活性を増加させる傾向を示し、炎症性サイトカインである大腸 TNF- α 遺伝子の発現を抑制する傾向を示すことが認められた。

(2) オリゴ糖類の摂取が高脂肪食摂取ラットの大腸 ALP 活性と ALP 遺伝子発現に及ぼす影響の比較検討

大腸 ALP 活性は FOS と RAF 添加食群により有意に増加し、GOS と LAC 添加食群で同様の増加傾向が示された(図 3 A, B)。大腸 ALP 遺伝子発現については、小腸全域に局在する *IAP-I* 発現が FOS、GOS および RAF 添加食群で有意に増加し、LAC 添加食群で同様の増加傾向を示した。小腸 ALP 活性については、本実験条件による顕著な影響は認められなかった。腸内環境関連因子である Mucin、n-酪酸、*Bifidobacterium* spp. の割合は FOS、GOS、RAF および LAC 添加食群で有意に増加し、*Clostridium coccoides* の割合は有意に低下した。一方、一部消化性の IMOS 添加食群は、大腸 ALP 活性、ALP 遺伝子発現、Mucin、有機酸、腸内細菌叢に対してほとんど影響を示さなかった。大腸 ALP 活性と腸内環境関連因子との相関を調べたところ、Mucin、n-酪酸、

Bifidobacterium spp. との間には有意な正の相関が認められ、*Clostridium coccooides* との間には負の相関関係が示された。

以上より、難消化性オリゴ糖は、水溶性食物繊維と同様に大腸 ALP 活性と *IAP-I* 遺伝子発現を誘導することが明らかとなり、これらの誘導は発酵性難消化性物質に共通した作用であると推定された。

また、ALP とメタボリックシンドローム予防との関係性が指摘されていることから、腸管の脂質代謝関連遺伝子について検討したところ、発酵性難消化性オリゴ糖は、腸管の脂質分解系遺伝子発現を誘導する可能性が新たに示された。

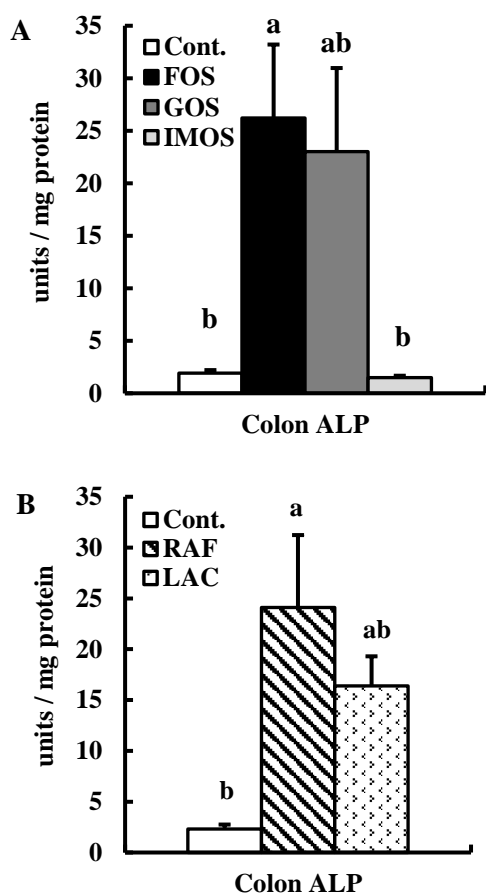


図 3 難消化性オリゴ糖による高脂肪食摂取ラットの大腸 ALP 活性増加作用

^{a, b} $P < 0.05$

本研究より、腸内環境改善作用のある水溶性食物繊維やオリゴ糖等の発酵性難消化性糖質が共通して、高脂肪食摂取ラットの大腸 ALP 活性を特異的に増加させ、この増加に *IAP-I* 遺伝子発現の誘導が関与していることが明らかにされた。一方で、 β -グルコシダーゼ活性については共通した影響は認められなかった。大腸 ALP 活性については、腸内環境改善に関わる腸管の種々の因子と正の相関関係にあることが認められた。これらの結果より、発酵性の難消化性食品因子による大腸 ALP 活性の増加は、大腸内環境の保全に関与する可能性

が推察された。今後は、これらの食品因子による大腸 ALP の誘導がリポポリサッカライド (LPS) の分解に関与しているかどうかについて検討する必要がある。

<引用文献>

① Okazaki Y, Chiji H, Kato N. Protective effect of dietary lily bulb on dextran sulfate sodium-induced colitis in rats fed a high-fat diet. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 62, 206-212, 2016.

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 1 件)

① Okazaki, Y., Katayama, T. Glucomannan consumption elevates colonic alkaline phosphatase activity by up-regulating the expression of *IAP-I*, which is associated with increased production of protective factors for gut epithelial homeostasis in high-fat diet-fed rats. *Nutr. Res.*, 43, 43-50, 2017. 査読有
DOI: 10.1016/j.nutres.2017.05.012

[学会発表] (計 7 件)

① 岡崎由佳子, 久保葉月, 本間れいか, 関根史織, 高橋李奈, オリゴ糖類の摂取が高脂肪食摂取ラットの腸管 ALP 活性と ALP 遺伝子発現に及ぼす影響の比較検討, 日本農芸化学会 2018 年度大会, 2018 年

② 岡崎由佳子, 久保葉月, 関根史織, 前川真理, 難消化性オリゴ糖は *IAP-I* 遺伝子発現の増加を介して大腸 Alkaline phosphatase 活性を増加させる, 日本食品科学工学会第 64 回大会, 2017 年

③ 岡崎由佳子, 家入千弓, 前川真理, 杉本佳奈, グルコマンナンと難消化性オリゴ糖の摂取が高脂肪食摂取ラットの腸管 Alkaline phosphatase 活性と遺伝子発現に及ぼす影響, 日本農芸化学会 2017 年度大会, 2017 年

④ 岡崎由佳子, 家入千弓, 関田彩夏, 加藤範久, 数種の水溶性食物繊維はラット腸管 IgA やムチン含量と共に大腸 Alkaline phosphatase 活性を増加させる, 日本食品科学工学会第 63 回大会, 2016 年

⑤ 岡崎由佳子, 家入千弓, 五十嵐麻美, 杉本佳奈, グルコマンナンの摂取が大腸 Alkaline phosphatase 遺伝子発現に及ぼす影響, 平成 28 年度 日本農芸化学会 北海道支部会, 2016 年

⑥ 岡崎由佳子, 関田彩夏, 田中文, 清水寿夫, 知地英征, 加藤範久, 水溶性食物繊維は高脂肪食摂取ラットの腸管 Alkaline phosphatase 活性を増加させる, 日本農芸化学会 2016 年度大会, 2016 年

- ⑦ 岡崎由佳子, 田中文, 高橋あずさ, 清水寿夫, 知地英征, 加藤範久, 水溶性食物繊維が高脂肪食摂取ラットの ALP 活性に及ぼす影響, 日本栄養・食糧学会東北支部会北海道支部会合同支部大会, 2015年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡崎 由佳子 (OKAZAKI, Yukako)
藤女子大学・人間生活学部・准教授
研究者番号：80433415