

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K11691

研究課題名(和文) 食用きのこ発酵乳に見いだしたDPP-4阻害ペプチドによる2型糖尿病の予防と改善

研究課題名(英文) Prevention and improvement of type 2 diabetes by DPP-4 inhibitory peptides found in fermented mushroom milk

研究代表者

岡本 賢治 (Kenji, Okamoto)

鳥取大学・工学研究科・教授

研究者番号：80283969

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：食用きのこエノキタケ、マイタケを牛乳または豆乳中で生育させ、血糖値抑制に関与するDPP-4阻害ペプチドが特異的に蓄積することを明らかにした。エノキタケ発酵豆乳を高脂肪食で育てたマウスに投与したところ、食後血糖値の上昇を穏やかにする傾向が示唆された。一方、豆乳の発酵過程で体内吸収の良いイソフラボンアグリコンへの変換を認めた。また、発酵豆乳には抗酸化活性が認められ、主成分をエルゴチオネインと同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では2型糖尿病治療のターゲットの一つとされるDPP-4阻害に着目し、身近な食用きのこを牛乳や豆乳を原料に生育させることでDPP-4阻害活性を示すペプチドの効率的な遊離を見いだした。発酵豆乳には食後血糖値の上昇を穏やかにする傾向が示唆された。さらに、体内吸収性が高いイソフラボンアグリコンや抗酸化物質の存在も明らかになるなど、生活習慣病の予防と健康維持に関わる新たな食素材への応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Edible mushrooms *Flammulina velutipes* and *Grifola frondosa* were grown in milk or soymilk, and it was clarified that the DPP-4 inhibitory peptide involved in blood glucose suppression was specifically accumulated. When fermented soymilk with *F. velutipes* was administered to mice fed a high-fat diet, it showed a tendency to moderate the increase in postprandial blood glucose level. On the other hand, in the fermentation process of soymilk, conversion to isoflavone aglycone, which is well absorbed in the body, was observed. In addition, fermented soymilk was found to have antioxidant activity, and the main component was identified as ergothioneine.

研究分野：応用微生物学

キーワード：DPP-4阻害ペプチド 食用きのこ *Flammulina velutipes* *Grifola frondosa* 発酵 イソフラボン エルゴチオネイン

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、研究者個人に帰属します。

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

平成26年の厚労省調査によると、糖尿病の総患者数は316万6,000人であり、前回の調査よりも46万人以上増加している。また、糖尿病が疑われる成人の推計が約1,000万人、発症に至らない糖尿病予備群が約1,000万人となっている。糖尿病には、子供の頃に急に発症する1型糖尿病と、大人になって進行するインスリン分泌の低下によって発症する2型糖尿病がある。2型糖尿病の発症要因として年齢と生活習慣がある。日本人の糖尿病の多くは2型糖尿病なので、人口の高齢化によって今後さらに患者数が増えると予想されている。2型糖尿病の治療薬には様々なタイプが存在する。その一つとして、ジペプチジルペプチダーゼIV (DPP-4) 阻害薬がある。DPP-4は膜結合型プロテアーゼの一つで、腎臓、肝臓、腸、リンパ球及び血管内皮細胞など多くの組織において広く発現している。DPP-4の生理的基質のうち重要なものはグルコース恒常性の維持にかかわるホルモンのインクレチンと呼ばれるグルカゴン様ペプチド1 (GLP-1) とグルコース依存性インスリン分泌刺激ポリペプチド (GIP) である。そのため、DPP-4のペプチダーゼ活性を阻害することにより、これらの内因性インクレチンホルモンレベルの上昇によりインスリン分泌が上昇し、グルカゴン放出が抑制される。GLP-1とGIPはいずれも、強力なグルコース依存性インスリン分泌刺激作用を発揮し、この作用により食後の血糖コントロールを改善する。ヒト血液系におけるインクレチン (GLP-1) 作用の増強によるインスリン分泌の調節は、II型糖尿病治療のための重要なアプローチである。DPP-4阻害薬としてシタグリプチン (STP)、ビルダグリプチン、サキサグリプチンが臨床的に使用されているほか、DPP-4阻害薬の開発は世界中で積極的に行われている。糖尿病治療薬の副作用として最も注意すべきは、血糖値を下げ過ぎることで急激な低血糖状態に陥る点であり、発作により意識を失い、特に高齢者の場合は生命の危機に瀕する。

現在、薬よりも力価は低いものの血糖値低下作用が期待でき、かつ副作用の懸念がないものとして、タンパク質を酵素消化して得られたペプチドがDPP-4阻害剤として研究されている。しかし、酵素法では特定のペプチド配列のみを選別的に確保するのは難しく、化学合成法は製造原価が安いものの副生成物の混入があるため食品添加上で問題視される。我々は、食用きのことして知られるエノキタケ *Flammulina velutipes* を用いた発酵牛乳が比較的高レベルのDPP-4阻害活性を示すことを見いだした。対して、市販の特定保健用食品や機能性表示食品には有効な阻害活性は認められなかった。また、きのこ類を生育させる際に通常用いる栄養培地では阻害活性がなく、牛乳中のカゼイン由来ペプチドによると推測した。発酵乳中に蓄積するペプチドの一つとしてTyr-Pro (YP) を単離し、これが比較的高いDPP-4阻害活性を示すことから裏付けられる。きのこに潜在する未知の乳発酵能に着目し、得られるDPP-4阻害ペプチドの機能や生産について明らかにすることは、2型糖尿病の予防と改善に向けた機能性食素材への応用に発展する。

### 2. 研究の目的

本研究ではエノキタケ *Flammulina velutipes* ならびにマイタケ *Grifola frondosa* 発酵牛乳または発酵豆乳中に生産されるDPP-4阻害に関わるペプチドを明らかにし、きのこを用いた機能性ペプチドの生産ならびにDPP-4阻害活性の生体へ及ぼす効果、そしてDPP-4阻害以外の生理機能について調査・解析することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 食用きのこの培養

MYG平板培地 (麦芽エキス1.0%、酵母エキス0.4%、グルコース0.4%、寒天1.5%) で生育させた *F. velutipes*、*G. frondosa* を牛乳 (大山乳業農協製) または無調整豆乳 (マルサンアイ社製) に接種し、24°Cで振盪培養した。

#### (2) ジャーファーメンターでの大量培養

牛乳または無調整豆乳で生育させた *F. velutipes* の発酵物を牛乳または無調整豆乳が3L入ったジャーファーメンター (MBF-800ME、EYELA社製) にて最適な条件 (温度24°C、通気量1L/min、攪拌速度250rpm、pH制御なし) を設定し、大量培養を行った。

#### (3) 発酵牛乳ならびに発酵豆乳中のDPP-4阻害活性の測定

発酵物のDPP-4阻害活性は発酵ろ液をDPP-4 Drug Discovery Kit (Enzo Life Sciences社製) を用いて測定した。阻害活性の指標としてキットに含まれるDPP-4阻害剤P32/98の濃度1 $\mu$ Mを基準に、これに匹敵する値を有効な阻害レベルと評価した。

#### (4) ペプチドの分析

経日的にサンプリングした培養液を遠心分離後、0.22 $\mu$ mのフィルター (ミリポア社製) で処理し、逆相カラム (Cadenza CL-C18、Imtakt社製) を装着した高速液体クロマトグラフィーならびにLC-MSにて分析した。

#### (5) マウスへの投与試験

マウス (BALB/c、雄、5週齢、日本クレア社製) に対し、標準食 (CE-2、日本クレア社製) を摂食させて予備飼育した後、高脂肪食 (HFD32、30%コレステロール含有、日本クレア社製) を

7日間給餌し、経口糖負荷試験を行った。経口糖負荷試験では、マウスを一夜絶食後、対照群にはブドウ糖 (2 g/kg wt) + 蒸留水 (10 mL/kg wt) の溶液を、試験群にはブドウ糖 (2 g/kg wt) + *F. velutipes* 発酵牛乳または発酵豆乳 (各 10 mL/kg wt) のろ液 (遠心分離後の上清を 0.22  $\mu$ m のフィルター処理したもの) を胃ゾンデを用いて単回投与し (各 n=5)、投与前、投与 30 および 60 分後に採血した後、血清の血糖値を測定した。

#### (6) イソフラボンの定量

*F. velutipes*、*G. frondosa* 菌糸体を無調整豆乳で振盪培養し、経日的に培養物を回収、冷凍した後、凍結乾燥処理を行い、その乾燥物を乳鉢で細かく砕き 70%エタノールで抽出、上清を逆相カラム (YMC-Pack Pro CL-C18, YMC 社製) を装着した高速液体クロマトグラフィー (HPLC) にて分析した。サンプル中の配糖体 (ダイジン、グリシチン、ゲニスチン) とアグリコン (ダイゼイン、グリシテイン、ゲニステイン) の各濃度はそれぞれの標準物質を指標として算出した。

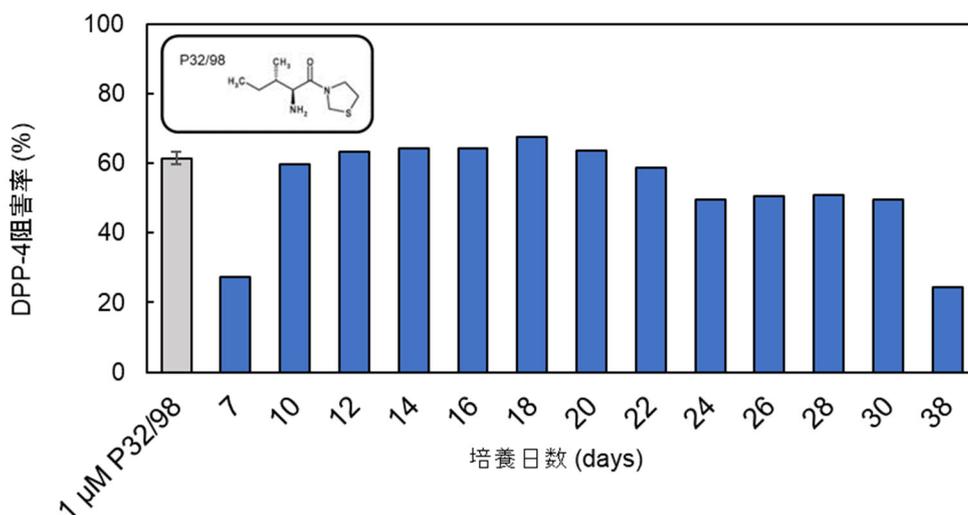
#### (7) 抗酸化活性の測定

(6) で得た *F. velutipes*、*G. frondosa* 発酵豆乳由来のエタノール抽出液の抗酸化活性は DPPH を用いた方法で測定し、Trolox 当量で算出した。

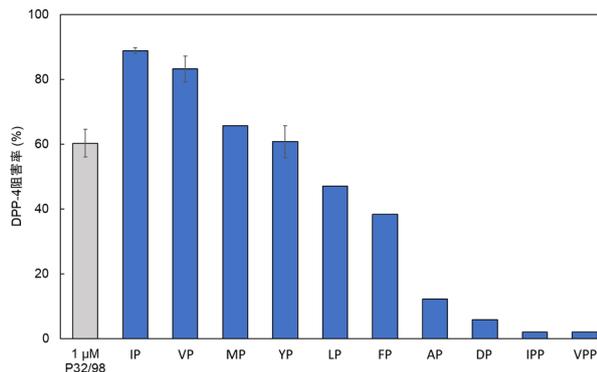
### 4. 研究成果

#### (1) きこの発酵牛乳における DPP-4 阻害活性と関連ペプチド

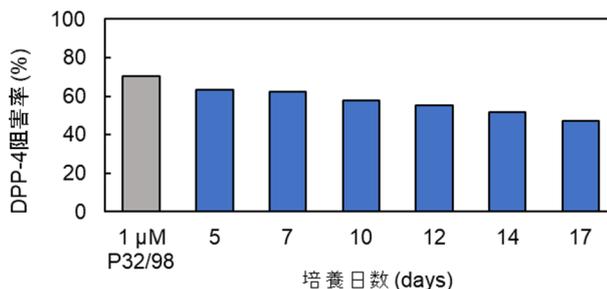
*F. velutipes* が牛乳中で良好に生育する条件を調べたところ、静置培養よりも振盪培養が適しており、10 倍希釈した培養ろ液の DPP-4 阻害活性の経日的変化は以下ようになった (下図)。



本条件で得られた発酵牛乳中に存在する DPP-4 阻害ペプチドの探索を行った結果、Xaa-Pro 配列をもつジペプチドが顕著に蓄積していた。LC-MS 分析によって Ile-Pro、Val-Pro、Met-Pro、Tyr-Pro、Leu-Pro、Phe-Pro、Ala-Pro、Asp-Pro を同定した。そこで、純度を揃える目的でこれらジペプチドを化学合成し、各 100  $\mu$ g/mL における DPP-4 阻害活性を測定したところ、Ile-Pro、Val-Pro が最も強く、次いで Met-Pro > Tyr-Pro の順となった。一方、強力なアンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害活性ペプチドの Ile-Pro-Pro や Val-Pro-Pro (各 100  $\mu$ g/mL) には DPP-4 阻害活性がほぼ認められなかった (右上図)。



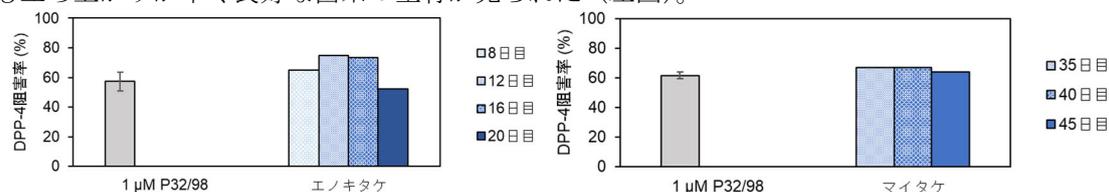
また、*G. frondosa* の発酵牛乳においても生育が遅いため時間を要するものの同等の DPP-4 阻害活性を示すことが明らかとなった。発酵液中に遊離するペプチド類もほぼ同様であった。



生育が速い *F. velutipes* を用いたジャーファーメンターによる牛乳の培養でもフラスコ培養時のような DPP-4 阻害活性を示し (10 倍希釈ろ液)、大量生産の可能性が示唆された (右下図)。

## (2) 発酵豆乳における DPP-4 阻害活性

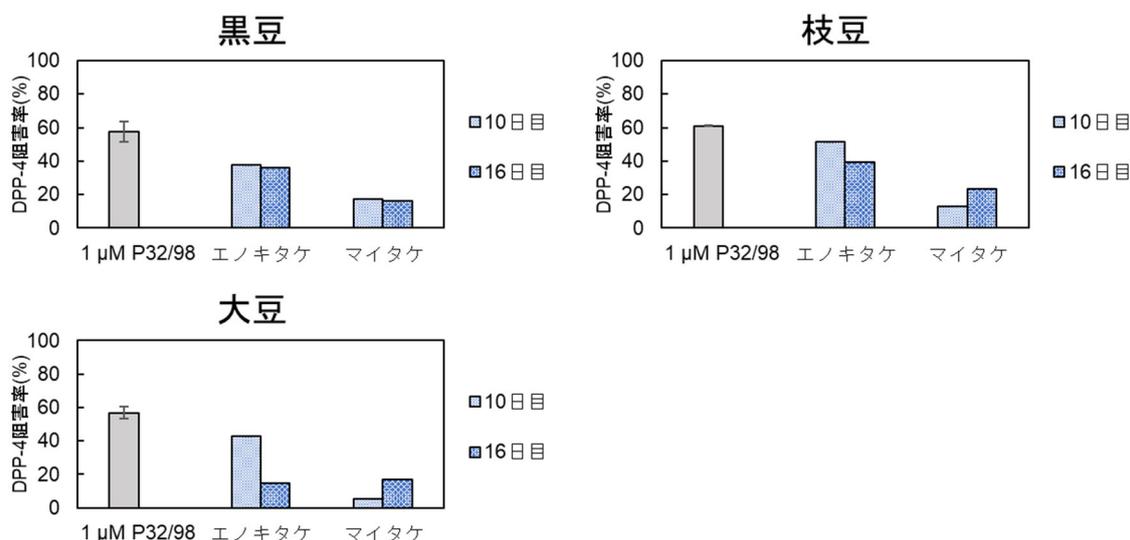
使用した豆乳は糖などが添加されていない無調整豆乳で、4.2%のタンパク質を含む。食用きのこの中でも比較的生育の早いエノキタケ *F. velutipes* とタンパク質分解能力が高いことで知られるマイタケ *G. frondosa* を無調整豆乳に接種し、経日的にサンプリングしたる液を 2.5 倍希釈後に DPP-4 阻害活性を測定した結果を以下に示す。*F. velutipes* は豆乳のみという環境でも立ち上がりやすく良好な菌糸の生育が見られた (左図)。



DPP-4 阻害活性は培養 8 日目で既に上昇しており、12 日目前後にピークを迎え、その後は減少した。この培養後半で低下する理由としては、*F. velutipes* が分泌する酵素ペプチダーゼによって DPP-4 阻害に働くペプチドそのものが次第に分解されていくためと考える。一方、*G. frondosa* の場合、きのこの中でも生育が緩やかな部類に入ることから、豆乳中でも生育が遅いため阻害活性を示すようになるまで 1 ヶ月以上の培養日数を要したが、35 日~45 日にかけて *F. velutipes* と同等レベルの阻害活性を認めた (右図)。これら発酵豆乳中には発酵牛乳の場合と同様の配列をもつペプチドが存在した。

## (3) 豆類を原料とした場合の DPP-4 阻害活性

黒豆、枝豆、大豆の乾燥固形物を水に対して 10%濃度で添加したものを調製し、この時、原料の豆はあえて破碎処理せずに用い、酵母エキスなどの窒素源は何も添加しなかった。オートクレーブ殺菌後にエノキタケ *F. velutipes* およびマイタケ *G. frondosa* 菌糸をそれぞれ接種し、観察した。いずれの区分でも *F. velutipes* と *G. frondosa* の生育は豆乳の場合と比べると低下した。各区分において、10 日目と 16 日目に採取したサンプル希釈液 (2.5 倍) の DPP-4 阻害活性を測定した結果を以下に示す。まず、黒豆培養区分での DPP-4 阻害活性は、*F. velutipes*、*G. frondosa* とともに豆乳の時よりも低い値となった。この *F. velutipes* と *G. frondosa* 間の阻害活性の差は両者の生育速度の違いによると推測する。同様に、枝豆や大豆の培養区分でも豆乳の時よりも DPP-4 阻害活性は下がり、*F. velutipes* の方が *G. frondosa* よりも高い傾向を示した。今回、豆乳よりも生育や DPP-4 阻害活性が低くなってしまったのは、豆の破碎処理をしていなかったため、きのこ菌糸が分泌する分解酵素が各豆の内部にまで十分浸透しにくい状況であったことが影響したのかもしれない。

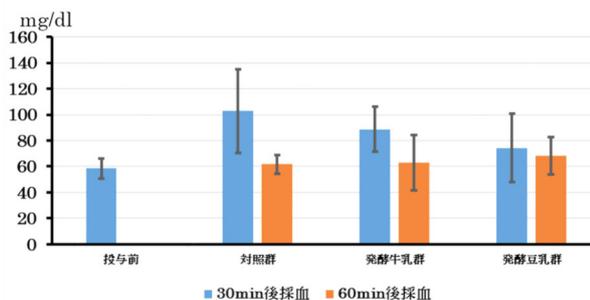


豆乳の場合と比べると生育や阻害活性は低下したものの、こうした豆を未処理の状態でも発酵の経過に伴って DPP-4 阻害ペプチドが遊離し、阻害活性は認められた。よって、豆を細かく砕いた状態で用いたなら、豆乳の場合に近い阻害活性が得られるのではないかと考える。

## (4) きこの発酵牛乳および発酵豆乳の血糖値低下作用

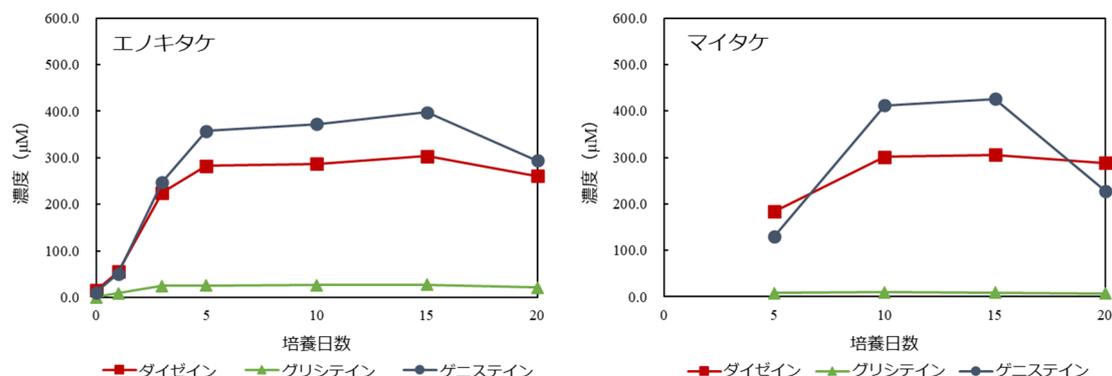
各群の血糖値の推移を次頁に示した。まず、投与前群では  $58.4 \pm 7.9$  mg/dl だった。対照群では、ブドウ糖を投与してから 30 分後に血糖値が  $102.8 \pm 32.4$  mg/dl と有意に上昇し、60 分後には  $61.6 \pm 7.2$  mg/dl とほぼ投与前のレベルにまで減少した。発酵牛乳群の 30 分後では対照群とほぼ同様に  $88.8 \pm 17.3$  mg/dl と有意に上昇したが、発酵豆乳群では  $74.3 \pm 26.3$  mg/dl と投与前群と比べて特に差はなく、血糖値の上昇がやや穏やかな傾向を示した。ブドウ糖投与 60 分後に 3 群間に有意差はみられなかった。また、体重に関しても 3 群間に有意差は認められなかった。

生活習慣病状態の高脂肪食を給餌したマウスに対して、*F. velutipes* 発酵豆乳を投与することで食後高血糖を改善する傾向が示唆された。発酵豆乳に比べて発酵牛乳で血糖値が高くなった理由としては、後者に含まれるラクトースやグルコースの残存がペプチド以上に影響しているのではないかと推測する。よって、糖質をほとんど含まない発酵豆乳の方が血糖値を下げるには有効であろう。なお、供試した発酵牛乳および発酵豆乳はフィルター処理しており、血糖値低下傾向は菌糸体や食物繊維によって腸管を覆うことによる糖の吸収阻害とは異なる機構と考えている。



#### (5) 豆乳をきのこで発酵させることによるイソフラボンアグリコンへの変換

エノキタケ *F. velutipes* 発酵豆乳抽出物を HPLC 分析した結果、培養 1 日目から配糖体（ダイゼイン、グリシチン、ゲニステイン）の減少が認められ、マイタケ *G. frondosa* の発酵豆乳抽出物と比較すると（右図）、*F. velutipes* の方が培養初期にイソフラボンアグリコンのダイゼイン、グリシチン、ゲニステインの各濃度は高い傾向を示した。これは、きのこ間の生育速度が異なり、*F. velutipes* は他の培地と同様に生育の立ち上がりが良好であったことに起因する。

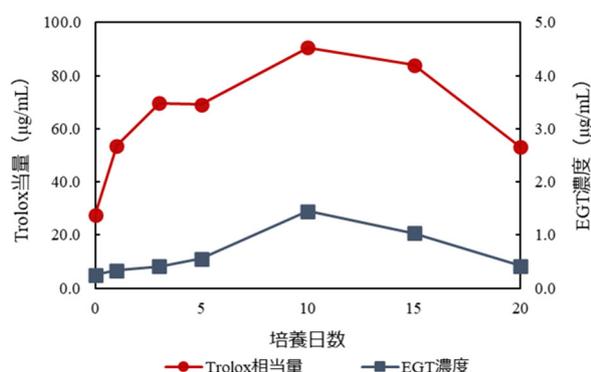


#### (6) きのこと発酵豆乳抽出物の抗酸化活性

*F. velutipes* 発酵豆乳抽出物を DPPH 法にて測定した結果、抗酸化活性は経日的に増加した。一方、対照として行った菌を接種せず単に振盪しただけの無調整豆乳抽出物ではほとんど変化しなかったことから、発酵によって抗酸化物質が生産されたと判断した。しかし、*F. velutipes* 発酵豆乳抽出物ではアグリコンの増加と抗酸化活性の間に比例の関係は認められなかった。そこで、イソフラボン標準物質の抗酸化活性を調べたところ、配糖体およびアグリコンともに抗酸化活性を示さず、これはイソフラボン以外の他成分によるものであることが示唆された。

#### (7) 抗酸化活性に関わる物質の探索

*F. velutipes* 発酵豆乳抽出物の HPLC 分析の結果から経日的に変動しているピーク類を詳細に調査していったところ、一つのピークに着目した。該当物質について調べた結果、きのこに含まれる希少アミノ酸のエルゴチオネイン (EGT) と同定した。EGT 標準物質が濃度依存的に抗酸化活性を示すことを確認後、*F. velutipes* 発酵豆乳抽出物の抗酸化活性と含有する EGT 濃度を測定したところ、概ね比例の関係が認められたことから（右図）、発酵豆乳が示す抗酸化活性は主として EGT に由来すると判断した。



以上のように、本研究結果から食用きのこ *F. velutipes* および *G. frondosa* を牛乳または豆乳にて生育させた場合、その発酵牛乳や発酵豆乳中に機能性ペプチドが特異的に蓄積し、血糖値改善に有効な DPP-4 阻害活性を示した。また、きのこを利用することでタンパク質の分解のみならず、アンチエイジング物質のイソフラボンアグリコンや抗酸化物質エルゴチオネインも同時に生産することを見いだした。その他、発酵液中には必須アミノ酸、血圧降下に寄与するペプチド類なども存在することから、きのこによって牛乳または豆乳を発酵させる方法で生活習慣病の予防と健康維持に関わる食素材を効果的に生産できることが明らかとなった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Mahal Zinat, Matsuo Hiroyuki, Zahid Hasan M., Notsu Yoshitomo, Ohara Hiroki, Okamoto Kenji, Nabika Toru	4. 巻 31
2. 論文標題 Milk Fermented with Mushrooms Prevents Stroke in the Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats Independently of Blood Pressure	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases	6. 最初と最後の頁 106421 ~ 106421
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2022.106421	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Okamoto Kenji, Ito Ryosuke, Hayashi June, Tagawa Mizuki	4. 巻 2
2. 論文標題 Production of the Antihypertensive Peptide Tyr-Pro from Milk Using the White-Rot Fungus <i>Peniophora</i> sp. in Submerged Fermentation and a Jar Fermentor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Dairy	6. 最初と最後の頁 452 ~ 461
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/dairy2030036	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 -
1. 著者名 Okamoto Kenji, Goda Takato, Yamada Takeru, Nagoshi Masafumi	4. 巻 7
2. 論文標題 Direct Ethanol Production from Xylan and Acorn Using the Starch-Fermenting Basidiomycete Fungus <i>Phlebia acerina</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Fermentation	6. 最初と最後の頁 116 ~ 116
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/fermentation7030116	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 -
1. 著者名 Okamoto Kenji, Kawamura Sayo, Tagawa Mizuki, Mizuta Toshifumi, Zahid Hasan M., Nabika Toru	4. 巻 246
2. 論文標題 Production of an antihypertensive peptide from milk by the brown rot fungus <i>Neolentinus lepideus</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 European Food Research and Technology	6. 最初と最後の頁 1773-1782
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00217-020-03530-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 岡本賢治	4. 巻 4
2. 論文標題 食用きのこ発酵乳由来のDPP-4阻害ペプチド	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 54～55
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 伊藤諒祐, 林寿音, 安藤彰悟, 並河徹, 岡本賢治
2. 発表標題 白色腐朽菌の牛乳発酵による機能性ペプチドの生産
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度西日本・中四国支部合同沖縄大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 ジベプチジルペプチターゼ 阻害活性が高い豆類発酵物およびその製造方法	発明者 岡本賢治	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-225717	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 DPP-4阻害ペプチドを含有するきのこ発酵乳を活用した抗糖尿病食品の開発	発明者 岡本賢治	権利者 鳥取大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-013247	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------