

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：81409

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K13509

研究課題名(和文)発酵食品に高含有されるD-アミノ酸の生体調節機能とその機序の解明

研究課題名(英文)Bioregulatory function of D-amino acids contained in fermented food

研究代表者

佐藤 友紀 (Sato, Tomonori)

秋田県総合食品研究センター・醸造試験場・研究員

研究者番号：40807723

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)：ヒト肝癌由来HepG2細胞において、脂肪酸処理によって細胞内に脂肪滴を蓄積させ、脂肪肝モデル化する条件を確認した。脂肪酸存在下でHepG2細胞をD-アミノ酸で処理し、そのうちD-AlaとD-SerはD体特異的に脂質蓄積を抑制する可能性を示唆した。D-Alaについては遺伝子発現の解析によりその作用機序を一部明らかにした。哺乳動物での効果を確認するため、D-Ala、L-Ala、D-Ser、L-Serを高脂肪食に加え、ラットに与えた。ラットにおいては、D-Ala、D-Ser共に脂肪肝の緩和効果は認められなかった。そのため、D-AlaとD-Serによる抗脂肪肝効果はラットでは生じないことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでにD-アミノ酸の抗脂肪肝効果について、細胞と動物の両実験系を用い、さらにL-アミノ酸と比較して検証した例はなかった。また、細胞実験においてはD体とL体の生理機能の差異も示唆しており、学術的意義を示すことができたと考えている。

また、D-アミノ酸は発酵食品に高含有されることから、D-アミノ酸に特異的な生理機能を見出すことができれば社会的意義は大きいと考える。本研究において、D-アミノ酸によるラットでの抗脂肪肝効果を確認することができなかったが、細胞レベルでのD-アミノ酸とL-アミノ酸の生理機能の差異を示唆しており、D-アミノ酸特有の生理機能の解明が今後の研究に期待される。

研究成果の概要(英文)：In human hepatocarcinoma-derived HepG2 cells, fatty acid treatment induced intracellular accumulation of lipid-droplets, confirming conditions for the fatty liver modeling. D-Ala and D-Ser were found to suppress the lipid accumulation in a D-amino acid specific manner in the HepG2 cells in the presence of fatty acids. To confirm the effects in mammals, D-Ala, L-Ala, D-Ser, and L-Ser were added to a high-fat diet and fed to rats. In rats, neither D-Ala nor D-Ser was found to alleviate fatty liver. Therefore, it was suggested that the anti-fatty liver effect of D-Ala and D-Ser did not occur in rats.

研究分野：醸造

キーワード：発酵食品 D-アミノ酸

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

D-アミノ酸は、かつては非天然型のアミノ酸とも称されていたように、一般的な食品に含まれる量は極めて微量である。一方、近年の分析技術の発展によって、微生物が介在する「発酵食品」には D-アミノ酸は豊富に存在することが明らかとなった。D-アミノ酸の食品機能性は未検討の部分が多く、L-アミノ酸と同様の機能を有するのか、それとも差異があるのか不明である。

### 2. 研究の目的

研究の目的は、肝臓の脂質代謝に及ぼす D-アミノ酸の効果を明らかにすることである。特に、実験によって抗脂肪肝効果が期待された D-アミノ酸については、L-アミノ酸との比較を行い、D 体特異的な機能かどうかを明らかにする。

### 3. 研究の方法

はじめに、ヒト肝癌由来 HepG2 細胞を用いた実験を行った。HepG2 細胞の培地を、オレイン酸とパルミチン酸を含む脂肪酸含有培地に替え、肝細胞への脂質蓄積を Oil Red O 染色によって評価した。脂肪酸存在下で、14 種類の D-アミノ酸をそれぞれ培地に加え、細胞内への脂質蓄積の影響を検討した。Ala、Ser、Arg については、D 体と L 体による細胞内脂質蓄積への影響を比較した。Ala については、作用機序を明らかにするため、脂肪酸存在下で D-Ala または L-Ala で HepG2 細胞を処理し、RNA を抽出して脂肪酸に関連する遺伝子発現を評価した。

次に、動物実験を行った。高脂肪食に D-Ala または L-Ala を添加した食餌を正常ラットに 4 週間供与した。摂食量と体重を経時的に測定し、飼育最終日に麻醉下で採血して安楽死後に組織を採取した。肝臓中のトリグリセリドと総コレステロールの量を測定し、血漿におけるトリグリセリドと総コレステロールの量を測定した。動物実験は秋田大学バイオサイエンス教育・研究サポートセンターで行った。また、D-Ser、L-Ser、D-Lys についても高脂肪食に添加した食餌を調製し、正常ラットに 4 週間供与した。同様に、摂食量と体重を経時的に測定し、飼育最終日に麻醉下で採血し、安楽死後に組織を採取した。肝臓中のトリグリセリドと総コレステロールの量を測定し、血漿におけるトリグリセリドと総コレステロールの量を測定した。

### 4. 研究成果

HepG2 細胞への脂質蓄積については、オレイン酸とパルミチン酸の比率や処理時間等を検討し、細胞内に脂質蓄積が認められる条件を見出した。脂肪酸存在下で 14 種類の D-アミノ酸で HepG2 細胞を処理した結果、数種類の D-アミノ酸で脂質蓄積の抑制効果が見られた。そのうち、特に D-Ala、D-Ser、D-Arg による抑制効果が顕著であったため、この 3 種については L 体との比較を行った。その結果、Arg による脂質蓄積抑制効果は D 体と L 体で差がなかった一方で、Ala と Ser は L 体に比べて D 体による脂質蓄積抑制作用が強い可能性が示唆された。D-Ala については、発酵食品において特に豊富に含まれることから優先的に解析を進めた。D-Ala または L-Ala で処理した HepG2 細胞の遺伝子発現を評価し、解析（発現変動比較解析・GO 解析）したところ、L-Ala 処理した細胞に比べて、D-Ala 処理した細胞で減少した遺伝子群として「脂肪酸合成」のタグがヒットした。また、D-Ala 処理した HepG2 におけるリポファジーの挙動を確認するため、オートファジーのマーカー（LC3、p62）を評価したが影響は認められず、D-Ala による脂質蓄積抑制効果にリポファジーは関与しないことが示唆された。また、脂肪細胞への分化に関しては D-Ala および D-Ser による制御作用は認められなかった。

次に、*in vivo* における D-Ala の効果を L-Ala と比較するため、動物実験を行った。予想外なことに、D-Ala を高脂肪食に添加することによって摂食量が有意に増加した。L-Ala を高脂肪食に添加しても摂食量に影響はなかった。D-Ala は特有の甘味を有するため、ラットの食欲を増進した可能性がある。脂肪組織として、精巣周囲脂肪や腎周囲脂肪を摘出し、重量を測定した。その結果、D-Ala を添加した高脂肪食を供与したラットでは、通常の高脂肪食を供与したラットに比べて精巣周囲脂肪と腎周囲脂肪の重量がむしろ有意に重かった。また、肝臓重量、肝臓中トリグリセリド、肝臓中総コレステロール、血漿中トリグリセリド、血漿中総コレステロール、血漿中 ALT、血漿中 AST はいずれの群間でも差はなかった。したがって、D-Ala には、細胞実験で示唆されていた抗脂肪肝効果がラットにおいて確認できなかった。

続いて、*in vivo* における D-Ser の効果を L-Ser と比較するため、動物実験を行った。内容としては、Ala と同様内容を実施した。D-Ser の場合、実験食に添加しても摂食量の増減は認められなかった。体重の推移や解剖時体重、組織重量、肝臓中トリグリセリド、肝臓中総コレステロール量は群間で差はなかった。すなわち、D-Ala と同様に、D-Ser も細胞レベルで示唆されていた肝臓への脂質蓄積抑制効果は、*in vivo* では認められなかった。また、D-Lys についても高脂肪食に添加した食餌をラットに供与したが、抗脂肪肝や抗肥満効果は確認されなかった。なお、令和 5 年に入ってすぐに当センターの排水設備に不調が発生し、2 月から 10 月までの期間、実

験を行うことができなかった。そのため、計画途中までは順調であったが、終盤は動物実験に専念する形となった。

以上の実験から、D-アミノ酸、特に D-Ala と D-Ser については D 体特異的な脂質蓄積抑制作用が認められた一方で、哺乳動物、本実験においてはラットでは抗脂肪肝効果を確認することはできなかった。したがって、経口摂取された D-アミノ酸が肝臓に十分量供給されていないか、D-アミノ酸酸化酵素の働きで速やかに代謝されているか、などといった生体特有の原因が考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 佐藤友紀、森あすか、前川佳花、伊藤謙、中村啓哉、瀧口裕明、福崎英一郎、進藤昌
2. 発表標題 酒粕におけるD-アミノ酸の分析と その生理機能の評価
3. 学会等名 第74回日本生物工学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤友紀、梅川結、進藤昌
2. 発表標題 ヒト肝細胞におけるD-アミノ酸の抗脂肪肝作用とRNA-seqによる機序の解析
3. 学会等名 第75回 日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤友紀、梅川結、進藤昌
2. 発表標題 HepG2 における発酵食品中 D アミノ酸組成の抗脂肪肝効果
3. 学会等名 第73回日本生物工学会沖縄大会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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