

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：34517

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700811

研究課題名(和文) Cyp7a1 遺伝子発現を促進する乳酸発酵豆乳中の作用因子と促進メカニズム

研究課題名(英文) Promotion Mechanism and Factor in Lactic Acid-Fermented Soymilk on the Gene Expression of Cyp7a1

研究代表者

小林 麻貴 (KOBAYASHI, Maki)

武庫川女子大学・生活環境学部・助手

研究者番号：70550789

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000 円、(間接経費) 960,000 円

研究成果の概要(和文)：近年、脂質異常症が増加傾向にあり、その予防に効果的な豆乳に期待が寄せられている。申請者は乳酸発酵豆乳の脂質代謝改善作用の一因としてコレステロール異化経路の遺伝子発現促進作用を認めたので、当該作用を誘導する作用因子の検討を行った。乳酸発酵豆乳は乳酸発酵により豆乳中のイソフラボンを配糖体からアグリコンに変換し、小腸から吸収を促進しCyp7a1遺伝子の発現を促進することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The incidence of hyperlipidemia has increased in recent years. It has been suggested that soymilk can prevent hyperlipidemia. We confirmed that fermented soymilk has lipid metabolism-modulating effects whereby it promotes cholesterol catabolism-related gene expression. Thus, we investigated the lipid metabolism-modulating factor in lactic acid-fermented soymilk.

Isoflavone in fermented soymilk converted from glycone to aglycone by lactic acid fermentation appears to promote intestinal absorption. Thus, it is suggested that fermented soymilk containing a high ratio of isoflavone aglycone may promote lipid metabolism-modulating effects and the gene expression of Cyp7a1.

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：脂質 発酵 栄養学 遺伝子 シグナル伝達

### 1. 研究開始当初の背景

近年、食生活の欧米化や運動不足により脂質異常症が増加傾向にあり、その予防に有効な大豆食品に期待が寄せられている。大豆には機能性因子である大豆たんぱく質、イソフラボンが豊富に含まれ、脂質代謝改善作用がすでに報告されている。申請者は機能性因子に富む豆乳に注目し、さらに乳酸発酵させた豆乳に焦点を絞り、脂質代謝改善作用を調べた。乳酸発酵豆乳には脂質代謝改善作用があり、豆乳投与時と比較して、コレステロール異化代謝経路の律速酵素 cytochrome p450 family 7 subfamily a polypeptide 1 (Cyp7a1) の遺伝子発現量の顕著な増加を認めた。そのため乳酸発酵豆乳中の Cyp7a1 遺伝子発現を促進する作用因子の検討を行った。

### 2. 研究の目的

(1)豆乳の乳酸発酵処理によるイソフラボンのアグリコン割合の増加がラット肝臓 Cyp7a1 遺伝子発現促進作用に及ぼす影響と、大豆タンパク質の必要性

乳酸発酵処理により、豆乳中のイソフラボン配糖体は吸収性のよいアグリコン型に変換する。そのため豆乳の乳酸発酵処理によるイソフラボンのアグリコン割合の増加が脂質代謝改善作用を促進し、ラット肝臓中の Cyp7a1 遺伝子発現を促進した可能性が高い。そこで、豆乳及び乳酸発酵豆乳よりイソフラボンを含む抽出物を調製し、ラットに摂取させた場合の脂質代謝改善作用と Cyp7a1 遺伝子の発現に及ぼす影響を検討した。また、イソフラボンの脂質代謝改善作用は未解明の部分が多く、大豆タンパク質の有無によってイソフラボンの脂質代謝に及ぼす影響が変動する可能性が高い。そのため大豆タンパク質共存時と非共存時のイソフラボン抽出物の脂質代謝改善作用を比較し、イソフラボンの脂質代謝改善作用における大豆タンパク質の必要性についても検討した。

(2)大豆タンパク質共存時にイソフラボンのアグリコン割合の増加が脂質代謝に与える影響

大豆タンパク質共存時にのみイソフラボンが脂質代謝改善作用を促進する事を詳しく検討するため、乳酸発酵豆乳作製に使用した乳酸菌と同じ乳酸菌種で、菌株の異なる乳酸菌を用いてイソフラボンのアグリコン割合の低い乳酸発酵豆乳を作製し、イソフラボンのアグリコン割合の高い乳酸発酵豆乳と比較することで、イソフラボンのアグリコン割合の増加が高脂肪・高コレステロール食投与ラットの脂質代謝に与える影響の検討を行った。

(3)高コレステロール食投与ラットの乳酸発酵豆乳摂取による脂質代謝改善作用

通常の食事では、コレステロールが含まれていることが多いため、脂質異常症予防の観

点から高コレステロール食投与ラットにおいて乳酸発酵豆乳の脂質代謝改善作用について検討した。

(4)イソフラボンによる Cyp7a1 遺伝子発現促進メカニズムの解明

乳酸発酵豆乳中のイソフラボンによる Cyp7a1 遺伝子発現促進メカニズムの検討は動物実験で明らかにすることが難しいため、培養細胞を用いて検討した。

### 3. 研究の方法

(1)豆乳の乳酸発酵処理によるイソフラボンのアグリコン割合の増加がラット肝臓 Cyp7a1 遺伝子発現促進作用に及ぼす影響と、大豆タンパク質の必要性

豆乳は凍結乾燥物を用いた。乳酸発酵豆乳は豆乳を植物性乳酸菌 (*Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii* 菌株 TUA4408L) で 15 時間発酵後の凍結乾燥物を用いた。また豆乳及び乳酸発酵豆乳抽出物は、乾燥豆乳及び乾燥乳酸発酵豆乳を 70% エタノールで抽出したものをを用いた。イソフラボンの脂質代謝改善効果として大豆タンパク質共存下でのみ脂質代謝改善効果を示すという先行研究もあるため、大豆タンパク質非共存下及び共存下で、豆乳及び乳酸発酵豆乳のイソフラボン抽出物の脂質代謝改善効果を比較検討した。まず、大豆タンパク質非共存下の実験として、7 週齢 SD 系雄性ラットに基準食 (AIN-93G) を投与して 1 週間予備飼育を行った後、コントロール食 (AIN-93G) 豆乳のイソフラボン抽出物食、

乳酸発酵豆乳のイソフラボン抽出物食で 5 週間飼育した。次に、大豆タンパク質共存下の実験として コントロール食 (AIN-93G) 脂質代謝改善効果の少ない濃度の豆乳食 (飼料中の大豆タンパク質濃度 4%) 豆乳 + 豆乳のイソフラボン抽出物食 (飼料中の大豆タンパク質濃度 4%) 豆乳 + 乳酸発酵豆乳のイソフラボン抽出物食 (飼料中の大豆タンパク質濃度 4%) を投与して 5 週間飼育した。飼育期間中週一回尾動脈採血を行い血液成分の分析を行った。また解剖時に肝臓を摘出し、肝臓成分の分析、肝臓遺伝子発現量の定量を行った。

脂質代謝改善効果の少ない濃度の豆乳食 (飼料中の大豆タンパク質濃度 4%) 豆乳 + 豆乳のイソフラボン抽出物食 (飼料中の大豆タンパク質濃度 4%) 豆乳 + 乳酸発酵豆乳のイソフラボン抽出物食 (飼料中の大豆タンパク質濃度 4%) を投与して 5 週間飼育した。飼育期間中週一回尾動脈採血を行い血液成分の分析を行った。また解剖時に肝臓を摘出し、肝臓成分の分析、肝臓遺伝子発現量の定量を行った。

(2)大豆タンパク質共存時にイソフラボンのアグリコン割合の増加が脂質代謝に与える影響

乳酸発酵豆乳作製に使用している植物性乳酸菌は乳酸発酵豆乳中のイソフラボン配糖体をアグリコン型に変換する能力が高いが、この乳酸菌と同じ乳酸菌種でイソフラボンをアグリコン型に変換する能力の低い乳酸菌 (*Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii* 菌株 TUA4404L) でアグリコン割合の低い乳酸発酵豆乳を作製し、脂質代謝改善作用を比較した。7 週齢 SD 系雄性ラットを基準食 AIN-93G で 1 週間予備飼育を行

った後、高脂肪・高コレステロール食(15% TG、0.125%コレステロール) イソフラボンのアグリコン割合の低い 4404 菌乳酸発酵豆乳(飼料中の大豆タンパク質濃度 10%)を含む高脂肪・高コレステロール食、イソフラボンのアグリコン割合の高い 4408 菌乳酸発酵豆乳(飼料中の大豆タンパク質濃度 10%)を含む高脂肪・高コレステロール食で 5 週間飼育した。分析は(1)と同様に行った。

### (3)高コレステロール食投与ラットの乳酸発酵豆乳投与による脂質代謝改善作用

7 週齢 SD 系雄性ラットに基準食 AIN-93G を投与し 1 週間予備飼育を行った後、1% コレステロール食、乳酸発酵豆乳(飼料中の大豆タンパク質濃度 5%)を含む 1% コレステロール食、乳酸発酵豆乳(飼料中の大豆タンパク質濃度 10%)を含む 1% コレステロール食を投与して 5 週間飼育した。分析は(1)と同様に行った。

### (4)イソフラボンによる Cyp7a1 遺伝子発現促進メカニズムの解明

ヒト肝ガン由来 HepG2 細胞を無血清培地で 24 時間培養し、ゲニステイン、ダイゼイン、エクオールを 0~20 $\mu$ M 添加し、24 時間培養後の Cyp7a1 遺伝子の発現量を real time RT-PCR 法を用いて検討した。

## 4. 研究成果

(1)豆乳の乳酸発酵処理によるイソフラボンのアグリコン割合の増加がラット肝臓 Cyp7a1 遺伝子発現促進作用に及ぼす影響と、大豆タンパク質の必要性

豆乳および乳酸発酵豆乳イソフラボン抽出物の脂質代謝改善作用は、大豆タンパク質の共存時のみ、豆乳 + 乳酸発酵豆乳イソフラボン抽出物群で血中 TG 濃度と肝臓の脂質量の両者に低下を認めた。血中 TG 濃度の低下効果は豆乳群、豆乳 + 豆乳イソフラボン抽出物群と比較しても低値を示した。

肝臓遺伝子発現量の変化では、大豆タンパク質非共存下で豆乳および乳酸発酵豆乳のイソフラボン抽出物を摂取させるとコレステロール異化系の遺伝子だけでなく、コレステロールの合成系および脂肪酸合成系遺伝子の発現も促進された。しかし、大豆タンパク質と豆乳および乳酸発酵豆乳のイソフラボン抽出物が共存すると、脂肪酸合成系遺伝子の発現が抑制され、コレステロール合成および異化系の遺伝子発現量は促進された。そのため、大豆タンパク質は主に脂肪酸合成系の遺伝子発現を抑制し、イソフラボンはコレステロール合成および異化系の遺伝子発現を促進する可能性が示唆された。またコレステロールの異化代謝にかかわる Cyp7a1 遺伝子の発現は大豆タンパク質共存時、非共存時ともに豆乳イソフラボン抽出物群よりも乳酸

発酵豆乳イソフラボン抽出物群で促進したので、イソフラボンのアグリコン割合の増加が Cyp7a1 遺伝子の発現を促進したと示唆された(図 1)。

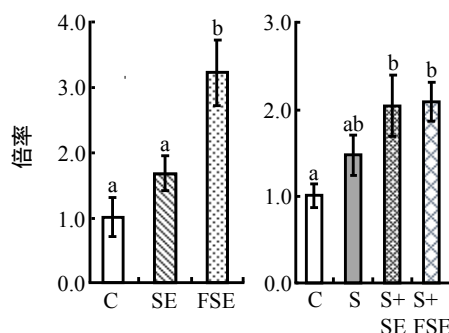


図 1 大豆タンパク質共存下、非共存下でのイソフラボン抽出物の肝臓 Cyp7a1 遺伝子発現促進作用  
C:コントロール食、SE:豆乳抽出物食、FSE:乳酸発酵豆乳抽出物食、S:豆乳、S+SE:豆乳+豆乳抽出物、S+FSE:豆乳+乳酸発酵豆乳抽出物  
値は標準±SE (n=6)  
a、b は有意差を表す (p<0.05)

(2)大豆タンパク質共存時にイソフラボンのアグリコン割合の増加が脂質代謝改善作用に与える影響

高脂肪・高コレステロール食群と比較して 4404 菌乳酸発酵豆乳を含む高脂肪・高コレステロール食群、4408 菌乳酸発酵豆乳を含む高脂肪・高コレステロール食群のどちらも血中脂質濃度上昇抑制作用と肝臓脂質蓄積抑制作用を示した。また、その作用は 4404 菌乳酸発酵豆乳を含む高脂肪・高コレステロール食群よりも 4408 菌乳酸発酵豆乳を含む高脂肪・高コレステロール食群の方が強く現れた。肝臓のイソフラボンアグリコン濃度は 4404 菌乳酸発酵豆乳を含む高脂肪・高コレステロール食群と比較して 4408 菌乳酸発酵豆乳を含む高脂肪・高コレステロール食群で若干高値を示した。また肝臓の脂質代謝関連遺伝子発現量の変化も高脂肪・高コレステロール食群と比較して 4408 菌乳酸発酵豆乳を含む高脂肪・高コレステロール食群では顕著な変化が認められた(図 2)。以上の結果から、乳酸発酵豆乳の脂質代謝改善作用は TUA4404L 株乳酸発酵豆乳よりも、TUA4408L 株乳酸発酵豆乳の方が強いことが明らかになった。以上の結果は日本食品科学工学会誌、60, 509-515 (2013)に掲載された。

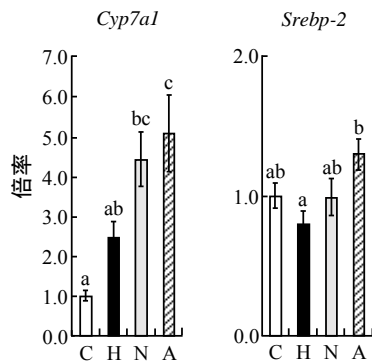


図 2 高脂肪・高コレステロール食投与ラットにイソフラボンのアグリコン割合の違う 2 種類の乳酸発酵豆乳を摂取させた場合の肝臓遺伝子発現量  
 C: コントロール食、  
 H: 高脂肪・高コレステロール食、  
 N: 4404 菌乳酸発酵豆乳食、  
 A: 4408 菌乳酸発酵豆乳食  
 値は標準±SE (n=6) a、b は有意差を表す ( $p<0.05$ )  
 Srebp-2; Sterol regulatory element binding protein-2

### (3)高コレステロール食投与ラットの乳酸発酵豆乳投与による脂質代謝改善作用

高コレステロール食投与ラットにおいて飼料中の大豆タンパク質濃度 5%, 10% を含む乳酸発酵豆乳投与により、濃度依存的に肝臓脂質蓄積抑制効果が認められた。また血中 TC 濃度および non-HDL-C 濃度は飼料中大豆タンパク質濃度 10% の乳酸発酵豆乳でさらに低値を示した。一方、乳酸発酵豆乳の投与は肝臓 Cyp7a1 遺伝子の発現を促進し、高コレステロール食のためコレステロール合成系 Srebp-2 遺伝子の発現を抑制することによって肝臓のコレステロール蓄積を抑制したと推定した(図 3)。以上の結果は *Nutrients* 4, 1304-1316(2012)に掲載された。

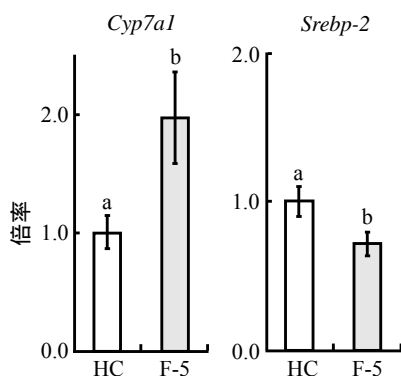


図 3 高コレステロール食投与ラットに乳酸発酵豆乳を摂取させた時の肝臓遺伝子発現量の変化  
 HC: 高コレステロール食、  
 F-5: 乳酸発酵豆乳食 (大豆タンパク質 5%)  
 値は標準±SE (n=8) a、b は有意差を表す ( $p<0.05$ )

### (4)イソフラボンによる Cyp7a1 遺伝子発現促進メカニズムの解明

豆乳中に含まれる代表的なイソフラボン

であるゲニステインおよびダイゼインはどちらも 20  $\mu$ M の濃度でコレステロール異化代謝にかかわる Cyp7a1 遺伝子の発現を増加させた。また、ダイゼインは腸内細菌により代謝されてエクオールを生成する。エクオールは生理活性が高く、アグリコン割合の高いイソフラボンを摂取すると肝臓で蓄積する現象を確認している。そのためエクオールの Cyp7a1 遺伝子発現促進作用についても検討を行ったところ、エクオールは 5  $\mu$ M の濃度で Cyp7a1 遺伝子発現量を増加させることが示唆された。

乳酸発酵豆乳は大豆タンパク質とアグリコン割合の高いイソフラボンを含み、普通食投与ラットだけでなく、高コレステロール食、高脂肪・高コレステロール食投与ラットにおいても脂質代謝改善作用を示し、Cyp7a1 遺伝子の発現を増加させた。また、細胞実験でもイソフラボン添加により Cyp7a1 遺伝子発現を促進した。そのため Cyp7a1 遺伝子発現にはイソフラボンアグリコンが関与している可能性が示唆された。また、豆乳を乳酸発酵することで大豆ペプチドが生成する可能性があるため、今後検討予定である。

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件)

小林麻貴, 榊原里恵, 江草信太郎, 福田満 乳酸発酵豆乳中のイソフラボンのアグリコン割合が高脂肪高コレステロール食投与ラットの肝臓脂質代謝へ及ぼす影響, 日本食品科学工学会誌, 60, 509-515 (2013). 査読あり 10.3136/nskkk.60.509

Kobayashi, M., Hirahata, R., Egusa, S. and Fukuda, M., Hypocholesterolemic Effects of Lactic Acid-Fermented Soymilk on Rats Fed a High Cholesterol Diet. *Nutrients.*, 4, 1304-1316 (2012). 査読あり 10.3390/nu4091304

[学会発表](計 4 件)

Maki Kobayashi, Kimiko Tsuzuki, Mitsuru Fukuda, Effects of Lactic Acid-fermented Soymilk on Lipid Metabolism-related Gene Expression in Rat Liver. 20th International Congress of Nutrition 2013 年 9 月 15 日~09 月 20 日, グラナダ, スペイン

小林麻貴, 榊原里恵, 江草信太郎, 福田満 乳酸発酵豆乳中のイソフラボンのアグリコン割合がラットの脂質代謝へ及ぼす影響, 日本栄養・食糧学会大会, 2013 年

05月24日～05月26日、名古屋大学

小林麻貴，平畑理映，江草信太郎，都築公子，福田満，乳酸発酵豆乳摂取時のラットの血中イソフラボン・ポリアミン濃度と炎症抑制作用，日本栄養・食糧学会大会，2012年05月18日～5月20日，東北大学

小林麻貴，平畑理映，榊原里恵，江草信太郎，福田満，高脂肪高コレステロール食摂取ラットにおける肝臓脂質代謝に及ぼす乳酸発酵豆乳の影響，日本農芸化学会，2012年03月24日～03月27日，東北大学

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

小林 麻貴 (KOBAYASHI, Maki)  
武庫川女子大学 生活環境学部・助手  
研究者番号：70550789