

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：37303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24700854

研究課題名(和文) 豆乳の乳酸菌発酵物が示す脂質代謝改善作用の解析と肥満解消食品への応用研究

研究課題名(英文) Development effect of a fermented product of soybean milk by indigenous lactic acid bacteria on lipid metabolism

研究代表者

野嶽 勇一 (Nodake, Yuichi)

長崎国際大学・薬学部・講師

研究者番号：30332282

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：豆乳の乳酸菌発酵液PS-B1をマウス3T3-L1前駆脂肪細胞やラット肝実質細胞に対して作用させた結果、PS-B1が脂質代謝改善作用を示した。PS-B1が脂質代謝関連遺伝子群の発現を抑制することが示唆されたことから、生体の脂質代謝に対するPS-B1の影響を検討した。PS-B1を摂取して肥満症状が抑制されたC57BL/6Jマウスの肝臓では、39遺伝子の発現に変動が検出され、生体内の69経路の代謝がPS-B1の影響を受けたことが明らかとなった。これらの内の14経路では複数の遺伝子の発現量が変動していたことから、PS-B1が脂質代謝改善作用を示す上での重要な作用点となったことが考えられた。

研究成果の概要(英文)：PS-B1 is a fermented product cultivated from soybean milk using indigenous lactic acid bacteria. In this study, we obtained results showing that PS-B1 improved lipid metabolism by inhibiting lipid metabolism-related genes in mouse 3T3-L1 cells and rat hepatocytes. DNA microarray analysis suggested that PS-B1 controls the expression of 39 genes and has an effect on 69 metabolic pathways in hepatocytes in C57BL/6J mice, with 14 of these 69 pathways being strongly influenced by PS-B1.

研究分野：生化学

キーワード：乳酸菌生産物質 脂質代謝 機能性食品

## 1. 研究開始当初の背景

医療の高度化や環境衛生・食生活の向上によって、わが国の平均寿命は目覚ましい伸長を遂げた。今後、我々が新たに取り組むべき命題は、健康な状態で生活できる期間、すなわち「健康寿命」の伸長である。一方、周知のように、現代の医療・保険制度は既に極度の疲弊を来している。その破綻の回避や延命を目的とした医療費削減策の一つという意図も相まって、メタボリックシンドロームや生活習慣病に対して強い警鐘が鳴らされるに至っている。このような背景は、国民の間に「予防医学」の重要性を浸透させ、未曾有の健康ブームを巻き起こす要因となっている。実際、特定保健用食品をはじめとする機能性食品の台頭に代表されるように、食を介した健康維持・増進に対する意識が高まっている。なかでも、乳酸菌発酵食品の摂取から導かれる保健効果の検証やより高い食効を示す乳酸菌発酵製品の開発に関する研究が脚光を浴びている。

本申請者を中心とする研究グループにおいても、乳酸菌発酵食品の有用性に早くから着目してきた。すなわち、*Lactobacillus* 属を中心とした 16 種のヒト常在乳酸菌を用いた独自の 3 段階の複合培養法を開発し、この手法によって調製した「豆乳の新規乳酸菌発酵ろ液 PS-B1」が示す多様な有用作用を解析している (図 1)。

これまでに実施した培養細胞株への作用実験、



図1 PS-B1原液(左)と凍結乾燥粉末(右)

実験動物に対する摂取実験、お

よびヒトに対する服用試験等から、PS-B1 が、① ガン細胞特異的にアポトーシスを誘導し、ガン細胞の増殖を抑制すること、② アレルギー症状の慢性化に関与するサイトカインやメディエータータンパク質への作用を介して、アレルギー症状を低減化すること、③

肝障害因子 (アルコール・ウイルス・薬物等) による壊死から肝実質細胞を保護するとともに、肝星細胞のコラーゲン産生を抑制して、肝保全や肝機能の改善に効果を示すこと、等を明らかにしており、各生理作用上の特性や発現機序に関するエビデンスを数多く蓄積してきた<sup>1-4)</sup>。

## 2. 研究の目的

豆乳の新規乳酸菌発酵ろ液 PS-B1 が示す多様な有用作用を解析する一連の研究の中で、「PS-B1 が脂質代謝の改善に対して有効に機能する」ことを示唆する新規なデータを得るに至った。すなわち、PS-B1 の服用試験 (4 週間) において、脂質代謝に関するパラメーターの内、総コレステロール、LDL コレステロール、および中性脂肪の各濃度が低下し、HDL コレステロール濃度が増大すること、を見出した。一般に、乳酸菌発酵物の摂取が脂質代謝に及ぼす影響については未だ深く研究されておらず、肥満解消に効果を示す機能性食品の開発も中途である。

そこで、本研究では、実験動物への摂取実験や前駆脂肪細胞を用いた添加実験を介して PS-B1 が示す脂質代謝改善作用の特性を検証し、その作用機序の解明を図ることを主たる目的とする。さらに、PS-B1 中から脂質代謝改善作用の根拠となる乳酸菌生産物質を高純度で精製し、新規機能性食品を開発するための基盤とする。

## 3. 研究の方法

(1) マウス 3T3-L1 前駆脂肪細胞およびラット肝実質細胞に対する PS-B1 添加実験

マウス 3T3-L1 前駆脂肪細胞の培養液中に PS-B1 を添加し、脂肪細胞の肥大化に対する PS-B1 の影響を検討した。蓄積脂肪の定量は、Oil Red O 染色法に従った。また、ラット肝臓から調製した初代培養肝細胞を高グルコース条件下で培養し、脂肪合成・分解に関与

する酵素・転写因子群の発現量に対する PS-B1 の影響を定量的 PCR 法によって検討した。

#### (2) C57BL/6J マウスに対する PS-B1 摂取実験

4 週齢の雄性 C57BL/6J マウスに高スクロース飼料を 8 週間摂取させて肥満を誘導した。この食餌誘導性肥満モデルマウスを、①高スクロース飼料を継続して摂取させる群、② 3%PS-B1 含有飼料を摂取させる群、③ 5%PS-B1 含有飼料を摂取させる群、の 3 群 (n=6) に分けて、さらに 4 週間飼育した。飼育期間中はマウスの体重と食餌量を測定し、飼育終了後には全マウスを対象として採血・剖検を行い、肝臓と内臓脂肪の重量も測定した。得られた血清を臨床検査 kit に供して脂質代謝パラメーター等を測定した。

回収した肝臓を用いて肝実質細胞の mRNA を抽出し、これを対象とした DNA マイクロアレイ解析によって脂質代謝に関連する遺伝子群の発現状態を検討した。本解析から得られたデータを基盤として PS-B1 の影響を受けて有意に変動した遺伝子を割り出し、PS-B1 の作用点となった生体内の代謝経路を明らかにした。各群間の差異を検討し、PS-B1 の摂取によってもたらされる脂質代謝改善作用の特長および作用機序を包括的に検討した。

#### (3) 脂質代謝改善作用を示す乳酸菌生産物質の単離

PS-B1 を有機溶媒中で 24 時間攪拌して、PS-B1 抽出液を調製した。これを逆相、イオン交換、ゲルろ過等のカラムを配した HPLC に供した。得られた各画分について、マウス前駆脂肪細胞 3T3-L1 に対する脂肪蓄積抑制作用を指標に、生理活性作用を示す乳酸菌生産物質の単離を試みた。

## 4. 研究成果

### (1) PS-B1 の脂質代謝改善作用の特長と作用機序

3T3-L1 細胞に対する PS-B1 の添加実験から、PS-B1 が脂肪細胞内への脂肪滴の蓄積を有意に抑制し、脂肪細胞の肥大化を阻止することを示唆するデータを得た。また、高グルコース条件下で培養した肝細胞では脂質代謝関連遺伝子群 (脂肪酸合成酵素、アセチル CoA カルボキシラーゼ、糖質応答転写因子 (ChREBP) 等) の発現量が増加したが、PS-B1 を作用させた肝細胞ではこれらの遺伝子群の発現が抑制されていることが見出され、脂質合成関連遺伝子の発現レベルの調節に PS-B1 が関与したことが示唆された。PS-B1 により ChREBP 遺伝子の mRNA 発現が低レベルに制御され、それに続く脂質合成酵素群の発現抑制を介して、最終的にトリグリセリドの蓄積が抑制されることが明らかとなった。このように、PS-B1 が脂肪細胞や肝細胞に対して脂質代謝の改善作用を示したことから、PS-B1 を継続的に摂取した場合、生体に対しても脂質代謝の改善が図れることが期待された。

C57BL/6J マウスに対する PS-B1 の摂取実験の結果、高スクロース飼料を 12 週間与えた高スクロース飼料摂取群では、通常飼料摂取群よりも体重増加率が約 10% 上昇していたが、飼育開始 8 週間後に PS-B1 を混合した高スクロース飼料に切り替えてこれを 4 週間摂取させた場合、PS-B1 含有量に比例して体重増加の抑制が見られるようになった。この体重変化と同様に、PS-B1 の摂取によって腸管脂肪、精巣上体脂肪および肝重量の増加も抑制され、PS-B1 を 5% 含有した飼料を摂取した群では、ほぼ通常飼料群と同等の測定値を示した (図 2)。また、血漿トリアシルグリセロール値が低下し、病理組織学的解析においても肝臓への脂肪滴の沈着が軽度であった。肝線維化が抑制されていたことも併せ

て鑑みて、PS-B1 に生体の肝臓の状態や脂質代謝を改善する作用があることが強く示唆された。

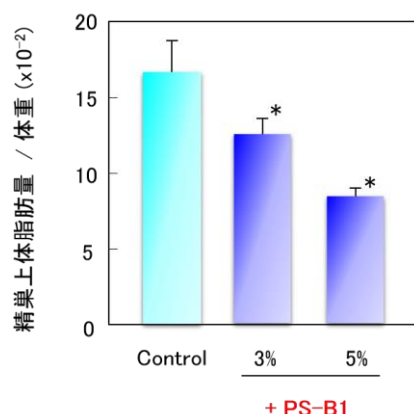


図2 PS-B1摂取による精巢上体脂肪の蓄積抑制

上記の PS-B1 摂取実験において各群のマウスから抽出した肝臓を用いて、肝実質細胞から mRNA を抽出した。この mRNA を対象として定量 PCR 法による発現試験を行った結果、高スクロース飼料の摂取が FAS、ACC1、ACC2、L-PK、および SREBP-1c の発現を mRNA レベルで 1.8~4 倍程度亢進させたが、PS-B1 の摂取によってこれらの発現が抑制されたことが明らかとなった。また、FAS や ACC の主要な転写因子である ChREBP においては、高グルコース摂取による発現の亢進は認められず、PS-B1 摂取によるわずかな発現抑制が見出されたのみであった。今回の結果より、PS-B1 が解糖・脂質合成系代謝酵素遺伝子の発現抑制を介して肥満を抑制することが示唆された。この実験結果から、PS-B1 の摂取によって生体内で発現状態が変動する遺伝子が存在することが明確となったことから、上述の解析で用いた mRNA を対象として、DNA マイクロアレイ解析実験を実施した。

遺伝子や代謝経路に関するデータベースを参照として得られた実験結果を解析した結果、PS-B1 の摂取によって 39 遺伝子に発現量の変動が検出された。これらの 39 遺伝子は生体内の 69 経路の代謝に関与している

ことも明らかとなり、PS-B1 が広く影響を及ぼしていることが示唆された。また、一つの連続した代謝経路上で複数の遺伝子の発現量の変動していたものが 14 経路 (20 遺伝子が該当) あったことから、PS-B1 が脂質代謝改善作用を示す上での重要な作用点となっていることが考えられた。今後の特許出願との兼ね合いのため上記結果の詳細を示すことは避けるが、前年度までに得ていた「FAS、ACC1、ACC2、L-PK、SREBP-1c 等の発現が PS-B1 によって抑制された」という定量 PCR による実験結果とよく合致していた。PS-B1 が示す脂質代謝改善作用の作用機序については未だ十分な解明には至っていないが、PS-B1 の摂取が一部の糖質・脂質代謝関連因子の制御に深く関与することが遺伝子レベルで示唆されたのは、大変重要な知見であると評価した。

未曾有の健康ブームを背景に、「〜に効果を示す乳酸菌〇〇株」を謳う乳酸菌株探索研究とその機能性食品化が隆盛を極めていますが、市場では既に打ち止め感とも言うべき閉塞感も散見されるに至っている。その一方で、「微生物の代謝を介して産生された物質」と定義され、生体に直接的に保健効果をもたらすことが期待される「バイオジェニクス」は、今後の発展が特に期待されている研究分野の一つである。豆乳の乳酸菌発酵物のろ液である PS-B1 はこのバイオジェニクスに分類され、乳酸菌体自体を含まない。このようなバイオジェニクスの摂取が脂質代謝の改善に効果を示したという報告は世界的にも珍しく、食生活を介して脂質代謝の改善を図ろうとする研究の独創性も他に比肩するものはないと考える。

## (2) 脂質代謝改善作用を示す乳酸菌生産物質の単離

研究開始当初から予想していたように、PS-B1 が示す脂質代謝改善作用の本質とな

る生理活性物質の精製・同定については、解析途中のために未だ十分な研究成果を得るに至っていない。これまでに蓄積した知見を基盤として、今後も PS-B1 に含まれる生理活性物質の探索研究に精力的に取り組むが、生理活性の発現には複数の因子が関与している可能性もあることから、可能な限り幅広い条件下でスクリーニングを展開する。最終的には、精製・同定に至った生理活性物質を利用した生化学的、分子生物学的、および薬理的解析から、多面的かつ包括的な作用機序の解明を図る。

#### <引用文献>

- ① 野嶽勇一, 松本菜季, 本多英俊, 榊原隆三, 乳酸菌生産物質の機能性と基礎化粧品への応用, フレグランスジャーナル, **42**, 28-34 (2014).
- ② 野嶽勇一, ヒト常在乳酸菌生産物質の生理活性解析研究, 日本食生活学会誌, **23**, 65-69 (2012).
- ③ 野嶽勇一, 深澤昌史, 荒川正幸, 榊原隆三, 乳酸菌代謝生産物質 PS-B1 における肝機能および脂質代謝改善作用について, 日本食生活学会誌, **22**, 13-19 (2011).
- ④ 榊原隆三, 石橋源次, 小笠原正良, 野嶽勇一, 乳酸菌生産物質 (バイオジェニックス) の可能性 ~乳酸菌生産物質 PS-H1 及び PS-B1 の機能特性に関する研究~, 権歌書房 (2009).

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① 野嶽勇一, 松本菜季, 本多英俊, 榊原隆三, 乳酸菌生産物質の機能性と基礎化粧品への応用, フレグランスジャーナル, **42**, 28-34 (2014).
- ② 野嶽勇一, ヒト常在乳酸菌生産物質の生理活性解析研究, 日本食生活学会誌, **23**, 65-69 (2012).

DOI: <http://doi.org/10.2740/jisdh.23.65>

[学会発表] (計 2 件)

- ① 深澤昌史, 野嶽勇一, 千布将平, 本間詞子, 三浦良子, 榊原隆三, 豆乳の乳酸菌発酵物 PS-B1 摂取による肥満抑制効果, 第 30 回日本薬学会九州支部会 (佐世保) 2013.12.7
- ② 野嶽勇一, ヒト常在乳酸菌生産物質の生理活性解明研究, 日本食生活学会第 44 回大会 (東京) 2012.5.26

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 乳酸菌生産物質の製法及び乳酸菌生産物質

発明者: 野嶽勇一, 榊原隆三, 本多英俊, 松本菜季, 三浦良子

権利者: 学校法人九州文化学園, 株式会社バイオジェノミクス

種類: 特許

番号: 特許願 2014-55814

出願年月日: 平成 26 年 3 月 19 日

国内外の別: 国内

[その他]

- ① 長崎国際大学薬学部生化学研究室ホームページ, [http://www.niu.ac.jp/~pharm1/lab/biochemistry/biochem\\_index.html](http://www.niu.ac.jp/~pharm1/lab/biochemistry/biochem_index.html)
- ② 日本農芸化学会ホームページ, 2013 年度大会発表演題報道メディア一覧, 乳酸菌生産物質に関する研究, 2013 年 5 月 31 日

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

野嶽 勇一 (NODAKE, Yuichi)

長崎国際大学・薬学部・講師

研究者番号: 30332282