

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 12 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25350120

研究課題名(和文) 真菌類を利用した新規生活習慣病予防食品素材の開発

研究課題名(英文) Development of novel food materials for lifestyle disease prevention using edible fungi

研究代表者

玖村 朗人 (KUMURA, HARUTO)

北海道大学・農学研究院・教授

研究者番号：00241365

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：紅麹菌は動脈硬化のリスク低減を目的とした機能性食品素材の開発に有効な二次代謝産物を産生する食用微生物である。しかし一方で肝腎障害に関わるシトリンを同時に産生する場合があります。食品素材への紅麹菌の応用に際しては適切な菌株選択と厳密な培養制御が必要である。そこで申請者は広汎な条件設定にも対応可能な上に調製が容易で、得られる培養産物を ready to eat で利用可能な固体培養基剤を用いて菌株や培養条件を精査し、得られる紅麹菌培養物を実験動物に給餌して機能性を評価する研究プログラムを立案した。

研究成果の概要(英文)：Monascus species, known as red-mold has the ability to produce diverse functional secondary metabolites such as lovastatin, monascin and ankaflavin which are responsible for health benefits including risk reduction of arteriosclerosis. It would be applicable for development of functional foods, however, some strains of Monascus sp. produce nephrotoxin, citrinin. Therefore, strain and culture condition should be carefully selected. In addition to the selection of test strains, we focused on the materials for culture substrate, which should be solid with convenience for preparation, if necessary, capability to add nutritional supplements, applicability to wide pH range and "ready to eat" property of the culture products. Following the screening of the suitable strain and culture condition, the resulting culture products were fed to experimental animals whether it could exert predicted biological effects.

研究分野：食品科学

キーワード：紅麹菌 機能性代謝産物 脂質代謝

1. 研究開始当初の背景

紅麹菌は古くから中国や台湾等で主に米の発酵に用いられてきたが、我国においては食用色素の産生菌として、もしくは沖縄などのごく限られた地域で大豆食品の発酵に利用されているに過ぎない。紅麹菌の中にはコレステロール低下作用や、高血圧抑制作用、抗酸化作用を有するロバスタチンやアンカフラビン、モナシンといった熱に安定な二次代謝産物を産生する菌株があり、動脈硬化のリスク低減を目的とした新規機能性食品素材の開発に有望な食用微生物である。しかし一方で肝腎障害に関わるシトリニンを産生する懸念も持ち併せているため、シトリニン非産生性で多量の有用二次代謝産物を産生する菌株のスクリーニングが必要となる。紅麹菌は他の多くの真菌類と同様に僅かな培養環境の違いによって発育や代謝産物の産生に大きく影響を受けるが、紅麹菌の良好な発育と多量の二次代謝産物を得るためには液体培地中よりも固形培地上の方が望ましいという点はこれまでの多くの研究において共通な見解で、発酵素材（培地）としては米以外にもヤマモモやニンニク等も利用された。その結果、これらの条件下では上記の有用二次代謝産物とシトリニンは常に同時に産生されたものの、同じ菌株でもそれぞれの培養環境に応じて得られる有用二次代謝産物とシトリニンの産生比率が大きく変動することが明らかとなった。このことは厳密な培養環境の制御によって有用二次代謝産物の多量取得とシトリニン代謝経路の回避が可能であることを示唆している。しかしながら従来のような植物を発酵素材とする方法ではその品種や由来（産地）等による影響を受け、安定した培養産物の取得が困難である。そこでチーズ製造時の余剰産物として得られるホエータンパク質が加熱変性によって容易にゲル化する性質を利用することとした。この培地調製法は前述の植物上で培養を行う場合よりも遥かに多様で安定した条件

設定（水分や pH、各種成分組成）が可能である上、得られた培養物を ready to eat で使用出来る。これらの利点を生かせば紅麹菌の培養条件の精査が可能となり、その培養産物を安全で機能性成分を豊富に含む食品原料として応用出来るのではないかと考えた。今回の一連の研究においては紅麹菌をホエー固形培地上で培養し、ロバスタチンを産生する一方でシトリニンを産生しない菌株と培養条件を決定した後、

ここで得られる培養産物をチーズに添加し、熟成に供したものを調製し、それが機能性を発揮し得るかどうかについて検証した。

2. 研究の目的

紅麹菌を用いたチーズが脂質代謝調節機能に影響するかどうかを動物実験によって確認し、紅麹菌チーズの有効性について明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 供試菌株と培養条件の検討

Monascus pilosus (AHU 9090, NBRC 4520)、*M. purpureus* (AHU 9085, AHU 9087, AHU 9451, NBRC 4513)、*M. ruber* (NBRC 4532, NBRC 9203, NBRC 32318) の 9 株を用いた。

タンパク質濃縮ホエーパウダー（WPC80）と純水を重量比 1:3 で混合した溶液をリン酸水素二ナトリウムで pH 6.5 に調整した後、ラクターゼ（*Kluyveromyces lactis* 由来）を添加し、5 °C で 24 時間以上反応させた後、乳酸を用いて pH 6.5、6.0、5.5、5.0、4.5 または 4.0 に調整したのち、100 ml 容三角フラスコに 10 g 分注し、湿熱滅菌（121 °C、15 分）を行い、タンパク質を熱変性させることでホエー固形培地を調製した。

ポテトデキストロース寒天培地に紅麹菌を

植菌し、十分に繁茂した後、胞子を回収し、生理食塩水に懸濁した。調製した固形培地に 1.3×10^4 spores になるよう添加し、25 °C で 10 日間培養を行った。

(2) 代謝産物の抽出と定量

培養終了物サンプル 1 g に塩酸を 30 μ l 添加し、スパチュラで粉碎した後、酢酸エチル 10 ml を添加し 60 °C で 30 分間抽出処理を行った。その後 25 °C、15,000 \times g で 5 分間遠心分離し、その上清液を回収した。得られた上清液にトリフルオロ酢酸 (TFA) 100 μ l を添加してロバスタチンのラクトン化を行い、No. 5C の濾紙で濾過したものをエバポレーターで乾固して 1 ml のアセトニトリルに再溶解した。このサンプル溶液をフィルター濾過し、濾液を HPLC に供した。

HPLC による分析は Wu ら (2011) の方法を参考にして行った。固定相には J-Pak Supero C18 カラム (250 mm \times 4.6 mm、5 μ m 粒子サイズ) を、移動相には 0.05% TFA を含む 62.5% アセトニトリルの定組成溶離を用い、サンプルの注入量は 10 μ l、流速は 1.0 ml/min で 30 分間溶出した。カラム温度は 40 °C に設定した。ロバスタチンは UV 検出器で測定波長 234 nm、シトリニンは蛍光検出器で励起波長及び蛍光波長をそれぞれ 330 nm と 500 nm で測定した。ロバスタチン、シトリニンのそれぞれについて検量線を作成し、ピーク面積から定量化した。

(3) 給餌用チーズの調製

本学実験農場でホルスタイン種泌乳牛から得られた生乳から脱脂乳を分離し、72 15 秒間の加熱殺菌後、31 °C まで冷却し、チーズバ

ットに移した。この後、ゴーダタイプチーズの製法に従い調製したカードに対し添加サンプル (*M. ruber* NBRC 32318 培養物または菌を播種していないホエー固形培地) を 5% の割合で均一になるように混合し、1 kg 容モールドに詰めた。チーズプレス機を用いて一次プレスを行い、反転した後、二次プレスを行った。プレスしたカードを冷却し、11.5 °C の 25% 食塩水に 8 時間浸漬した。その後チーズを食塩水から取り出し、11.5 °C で 90 日間熟成させた。

(4) 動物実験

WKAH/Hkm Slc 雄性ラット (3 週齢) を 1 個体ずつケージに分けて 23 ± 1 °C、湿度 $60 \pm 5\%$ 、1 日 12 時間の明暗サイクルの条件下で、飼料及び水は自由摂取できるように飼育した。AIN-93G に準拠したデキストリンベースの基本飼料を 7~10 日間給与して馴化した後、4 群 (AIN-93G 準拠飼料: C 群、C 群食 + 0.05% コール酸添加飼料: CA 群、CA 群食と同量のタンパク質を脱脂チーズで置換した飼料: CAC 群、CA 群食と同量のタンパク質を紅麹チーズで置換した飼料: CAR 群) に分けて 14 日間給与した。

解剖前日に 89 mM 塩化クロム六水和物と 90 mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) \cdot ニナトリウム、6.7 mM 塩化カルシウムを含む混合液 pH 7.0 を 0.5 ml/100 g bw の割合でラットに投与した。解剖当日に 1 日分の糞および尿をそれぞれ回収した。

ソムノベンチルをラットに投与し、麻酔をかけて屠殺した。腹部大動脈血および門脈血を採取し、ヘパリンナトリウム 50 IU/ml blood およびアプロチニン、ウシ肺由来 200 IU/ml

blood を溶解した 0.9% NaCl 溶液で処理して氷上保存した後、遠心分離をして血漿を回収した。肝臓は採取後すぐに液体窒素で凍結し、-80 で保存した。肝臓の一部は凍結乾燥した後、乳鉢を用いて粉碎した。

以上、ラットの取り扱いには北海道大学動物実験に関する規定に従って実施した。

(5) 各種パラメーターの解析

胆汁酸解析

サンプルに内部標準 (23-nor-5 β -cholanic acid-3 β ,12 β -diol、以下 NDCA) を加え、ボルテックス、ホモジナイズ、超音波破碎機の順に処理をしてサンプルを粉碎した。次に、60 で 30 分間、沸騰水で 3 分間処理し、ボルテックスをかけた後、遠心分離を行って上清を回収した。これを遠心濃縮器 (TAITEC, VC-96N) によって乾固し、-40 の冷凍庫で保存した。

乾固したサンプルをメタノールで溶解させた。HLB カートリッジに酢酸アンモニウムを加えた後、ただちにサンプルを一定量加え、液が落ちるまで静置した。その後、新たなチューブに HLB カートリッジを設置し、HLB カートリッジにメタノールを加えることでトラップされた胆汁酸を回収した。

以上の工程で得た抽出物を一旦乾固し、再びメタノールに溶解させ、バイアル瓶に分注した。

UPLC の固定相には Waters C18 カラム (2.1 nm \times 50 mm、1.7 μ m 粒子サイズ) を、移動相には A 液 (10 mM 酢酸アンモニウム含有 20% アセトニトリル、80% MQW) および B 液 (10 mM 酢酸アンモニウム含有 80% アセトニトリル、20% MQW) の 2 種類の溶離液を使用した。サ

ンプルを注入し、所定のグラジエントをかけて溶出させることで MS に供した。

MS 解析は MS Orbitrap を使用し、イオン化はエレクトロスプレーイオン法のネガティブモード (ESI $^{-}$) で行った。各サンプルのピーク面積比を利用して検量線を作成し、各胆汁酸量を算出した。この際に内部標準である NDCA の回収率を算出し、これの逆数を乗じることで補正をした。

脂質分析

肝臓、糞についてトリグリセリド (TG) およびコレステロール分析を行った。

各試料にクロロホルムとメタノールの 2:1 (v/v) 混合液を加えて総脂質を抽出した。抽出後乾固した脂質をイソプロパノールに溶解し、TG の分析にはトリグリセリド E-テストワコー (和光純薬) を、コレステロールの分析にはコレステロール E-テストワコー (和光純薬) を使用した。

血中アディポネクチンの分析

動脈血漿のアディポネクチン分析にはマウス/ラットアディポネクチン ELISA キット (大塚製薬 Cat No.41071) を使用した。

尿中排泄クロム回収率分析

尿サンプルに 70% 過塩素酸と 0.2% 塩化アンモニウムを混合し、遠心分離によって得た上清を原子吸光光度計に供した。

統計処理

飼育試験の結果の検討には Tukey の多重比較を使用した。p<0.05 以下を有意差ありとした。

4. 研究成果

(1) 培養条件の違いが紅麹菌の代謝産物産生に及ぼす影響

供試した紅麹菌をホエー固形培地上で 25 °C で 10 日間培養したところ、その外観は菌株や培地 pH によって異なった。良好な発育と紅色色素産生を示したのは *M. purpureus* AHU9085、AHU9087、*M. ruber* NBRC9203、NBRC32318 の 4 株であったことから、これらのシトリンおよびロバスタチン産生について調べた結果、*M. purpureus* の 2 菌株がシトリンを産生し、特に AHU9087 において顕著であった。また、この 2 菌株はロバスタチンをほとんど産生しなかった。一方、*M. ruber* の 2 菌株ではシトリン産生が確認されず、ロバスタチンの産生が認められた。また、いずれの菌株にも共通して培地の pH が低いほど二次代謝産物の産生量が高い傾向が見られた。

(2) 紅麹チーズがラットの脂質代謝に及ぼす影響

解剖時の体重、総摂食量、肝臓重量を測定したところ、体重は各群間で有意差がなかった。総摂食量は CAC 群、および CAR 群で有意に増加していたものの、これらはチーズを給餌した群であり、チーズ中の水分 (44%) を差引くことで補正したところ、有意差はなくなった。肝臓重量は CA 群で増加する傾向が認められ、CAC 群および CAR 群では肝臓重量増加が抑制された (図 1)。

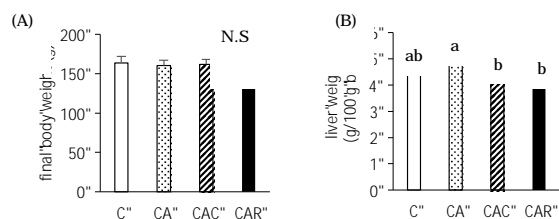


図 1 解剖時の体重および肝臓重量
(A) 体重、(B) ラット体重 100 g あたり肝臓重量
エラーバーは標準誤差を表す。C 群について n=7、CA、CAC、CAR 群について n=8。異なる文字間で有意差あり (p<0.05)

各サンプルの胆汁酸総量を図 2 に示す。糞と尿では同じような挙動を示した (図 2A、B)。コール酸給与によって CA 群では排泄される胆汁酸の総量が大きく増加し、CAC 群、CAR 群では排泄される胆汁酸総量が減少した。それに対して肝臓および門脈では各群間で有意な差はみられなかった (図 2C、D)。

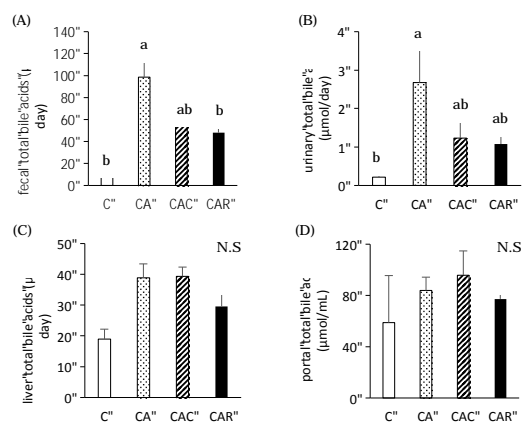


図 2 各サンプルにおける胆汁酸総量
(A) 糞、(B) 尿、(C) 肝臓、(D) 門脈
エラーバーは標準誤差を表す。C 群について n=7、CA、CAC、CAR 群について n=8。異なる文字間で有意差あり (p<0.05)

肝臓および糞中の TG 含量、Chol 含量を図 3 に示した。C 群と比較して CA 群では有意な TG および Chol の肝臓蓄積がみられた (図 3A、B)。CAC 群ではコール酸による TG の蓄積抑制傾向と Chol の蓄積抑制傾向がみられた (図 3A、B)。CAR 群ではコール酸による TG の蓄積抑制はほとんど見られなかったが、Chol の蓄積に関してはむしろ微増した。(図 3A、B)。これに対して糞中に排泄される TG は CAC 群で C 群に比べて有意に増加したが、C 群と CA 群間、CA 群と CAC 群間では大きな差はなかった (図 3C)。糞中に排泄される Chol 量は各群間で差はなかった (図 3D)。

腹部大動脈血漿のアディポネクチン濃度に関しては C 群に比べて CA 群ではアディポネクチン濃度が減少したが、CAC 群ではアディポネ

クチン濃度の減少が有意に抑制され、CAR 群では減少抑制傾向がみられた。

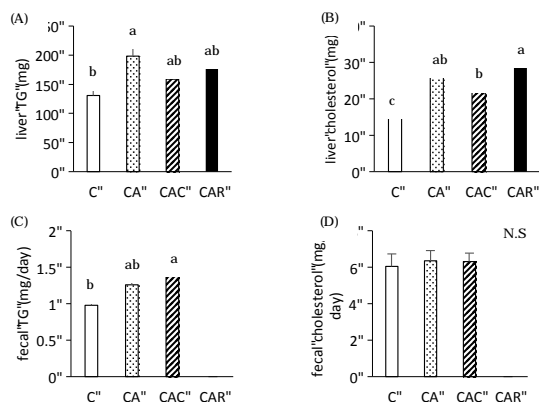


図3 肝臓、糞脂質含量
(A)肝臓TG、(B)肝臓コレステロール、(C)糞TG、(d)糞コレステロール
エラーバーは標準誤差を表す。C群についてn=7。
CA、CAC、CAR群についてn=8。異なる文字間で有意差あり(p<0.05)

尿中に排泄されるクロムから、C群と比べてCA群では消化管透過性の亢進が認められたが、CAC群およびCAR群ではこの透過性亢進作用を抑制する傾向があった。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計4件)

高橋 勇太郎、李 東根、李 娟美、趙 佳賢、加茂 佳恵、多田 幸司、堀 将太、花井 健人、竹内 あかり、田中 愛健、清水 英寿、若松 純一、原 博、石塚 敏、玖村 朗人

「胆汁酸誘導性未病状態の脱脂乳チーズによる改善作用」

日本農芸化学会 (2017年3月18日、京都女子大：京都市)

高橋 勇太郎、李 娟美、趙 佳賢、加茂 佳恵、多田 幸司、堀 将太、花井 健人、竹内 あかり、田中 愛健、清水 英寿、若松 純一、原 博、石塚 敏、玖村 朗人

「胆汁酸誘導性病態の発症に及ぼす脱脂乳チーズ摂取の作用」

日本農芸化学会北海道支部会 (2016年8月6~7日、ホテル函館ロイヤル：函館市)

大津山 建、小柳 遥佳、帯刀 実穂、小林 謙、石塚 敏、玖村 朗人

「ホエイ培地上における紅麹菌の二次代謝産物産生条件の検討」

日本農芸化学会北海道支部会 (2015年11月14日、北海道大学：札幌市)

大津山 建、小柳 遥佳、帯刀 実穂、小林 謙、石塚 敏、玖村 朗人

「ホエー培地上における紅麹菌の二次代謝産物産生条件の検討」

日本農芸化学会北海道・東北支部 合同支部会 (2014年9月23日、北海道大学農学部：札幌市)

[その他]

ホームページ等

<http://www.agr.hokudai.ac.jp/animproduct/foodsci/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

玖村 朗人 (KUMURA, Haruto)
北海道大学・農学研究院・教授
研究者番号：00241365

(2) 研究分担者

石塚 敏 (ISHIZUKA, Satoshi)
北海道大学・農学研究院・准教授
研究者番号：00271627