

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25750039

研究課題名(和文) 米糠由来新規胆汁酸結合タンパク質のコレステロール代謝改善作用

研究課題名(英文) Cholesterol-Lowering Effect of Novel Bile Acid-Binding Proteins from Rice Bran

研究代表者

島田 昌也 (Shimada, Masaya)

岐阜大学・応用生物科学部・助教

研究者番号：10576755

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：カゼイン食と比較し米糠タンパク質食を10日間摂取したラットでは、血清コレステロール濃度が低下し、糞中へのステロイド排泄量が増加した。

In vitro試験において、カゼインと比較し米糠タンパク質は、タウロコール酸に強力に結合し、コレステロールミセル溶解性を低下させた。

コール酸を結合したクロマトグラフィーカラムを用いて、米糠タンパク質から胆汁酸結合タンパク質を溶出し、その胆汁酸結合タンパク質の一つをMALDI-TOF/MS解析によりhypothetical protein OsJ_13801 (NCBI accession no. EAZ29742)であると同定した。

研究成果の概要(英文)：Rats fed dietary RBP for 10d had lower serum total cholesterol levels and increased excretion of fecal steroids, such as cholesterol and bile acids, than those fed dietary casein. In vitro assays showed that RBP strongly bound to taurocholate, and inhibited the micellar solubility of cholesterol, compared with casein.

The bile acid-binding proteins of the RBP were eluted by a chromatographic column conjugated with cholic acid, and one of them was identified as hypothetical protein OsJ_13801 (NCBI accession no. EAZ29742) using MALDI-TOF mass spectrometry analysis.

研究分野：機能性食品科学

キーワード：米糠タンパク質 コレステロール 胆汁酸 ミセル クロマトグラフィー

1. 研究開始当初の背景

植物性タンパク質の摂取は、血清コレステロール濃度を低下させることが知られている(引用文献)。白米や大豆は世界で消費されている主要な穀類であり、白米由来および大豆由来のタンパク質の摂取は、血清コレステロール濃度低下作用および糞中へのステロイド排泄促進作用を発揮することが報告されている(引用文献)。これらの報告から、白米由来および大豆由来のタンパク質は腸管においてコレステロールや胆汁酸の吸収を阻害することにより、血清コレステロール濃度低下作用を発揮することが示唆される。白米由来のタンパク質とは対照的に、精米時の副産物である米糠由来のタンパク質には、栄養価の高いタンパク質が 10-16%含まれているにも関わらず(引用文献)、米糠タンパク質のコレステロール代謝に与える影響については、ほとんど研究が行われていない; 試験管実験において、トリプシン処理した米糠タンパク質が腸管でのコレステロール吸収に重要なステップであるコレステロールミセル溶解性を低下させることが報告されている(引用文献)。それゆえ、米糠タンパク質も白米タンパク質や大豆タンパク質のようなコレステロール低減化作用を発揮する可能性が考えられた。

2. 研究の目的

(1) 米糠タンパク質のコレステロール代謝改善作用、特に腸におけるコレステロール吸収抑制作用を動物実験および試験管実験(胆汁酸結合能試験およびコレステロールミセル溶解性試験)で検証することを目的とした。
(2) 米糠タンパク質の中から、胆汁酸結合タンパク質、すなわちコレステロール吸収抑制タンパク質を分離・同定することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ウィスター系ラット(雄、5 週齢)をカゼイン群および米糠タンパク質群の 2 群に分けた。カゼイン群には、食餌タンパク質供給源をカゼイン(20%)とした 0.5%コレステロールおよび 0.25% コール酸ナトリウムを含む AIN-93 組成に準じた実験食(カゼイン食)を与えた。一方、米糠タンパク質群には、カゼイン食の 20%カゼインのうち半分を米糠タンパク質に置換えた実験食(10%米糠タンパク質食)を与えた。それぞれの群にカゼイン食あるいは 10%米糠タンパク質食を 10 日間自由摂取させた。実験開始 9 日目に 18 時間絶食した後、麻酔下で心臓採血し、血清を調製した。また、試験開始 6 日目から 8 日目までの 3 日間の糞を回収した。

(2) 血清総コレステロール濃度を酵素法により測定した。糞からステロイドを熱エタノール抽出し、糞中中性ステロイド濃度をガスクロマトグラフィーにより、糞中酸性ステロイ

ド濃度を酵素法により測定した。

(3) 0.1 mol/L トリス塩酸緩衝液 (pH7.4) に 1.85 kBq/mL [カルボニル-¹⁴C] タウロコール酸、0.1 mmol/L のタウロコール酸および米糠タンパク質濃度 100 mg/mL となるように加え、その混合物をインキュベート (37 度、2 時間) した後、遠心分離 (15,000×g, 37 度、15 分) した。その後、上清の放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。

(4) 6.6 mmol/L タウロコール酸ナトリウム、0.5 mmol/L コレステロール、1 mmol/L オレイン酸、5.0 mmol/L モノオレイン、0.6 mmol/L フォスファチジルコリン、132 mmol/L 塩化ナトリウム、15 mmol/L ナトリウムリン酸緩衝液 (pH 7.4) を含むミセル溶液を超音波破碎によって調製した。その後、混合物を保温 (37 度、24 時間) した。保温ミセル溶液を米糠タンパク質濃度 10 mg/mL となるように加え、保温 (37 度、1 時間) した。その後、遠心分離 (100,000×g, 37 度、1 時間) した上清の放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。

(5) 米糠タンパク質を 0.02% NaN₃ を含む 10mM トリス塩酸緩衝液 (pH 6.4) に溶解し、0.2 μm フィルターで処理し、米糠タンパク質溶液 (5 mg タンパク質/mL) を調製した。この米糠タンパク質溶液 5 mL を胆汁酸結合カラムクロマトフィーに供し、胆汁酸結合タンパク質の溶出を行った。

(6) 胆汁酸結合カラムクロマトフィーによって溶出した胆汁酸結合タンパク質画分を、SDS-PAGE に供した後、CBB 染色を行った。推定分子量 55.1kDa のタンパク質をゲルから切り出しトリプシン消化を行った。脱塩、濃縮処理を行った後、MALDI-TOF/MS に供した。

4. 研究成果

(1) 表 1 に示すように、カゼイン群と米糠タンパク質群の間で、増体重、摂食量および肝臓重量に有意な差はなかった。一方、カゼイン群と比較し米糠タンパク質群で、血清総コレステロール濃度が有意に 45%低下した。また、カゼイン群と比較し米糠タンパク質群で、糞重量が増加傾向 (p = 0.06) を示した。さらに、カゼイン群と比較し米糠タンパク質群で、糞中の中性ステロイド (コレステロール+コプロスタノール) 濃度および酸性ステロイド (胆汁酸) 濃度が、それぞれ有意に 2.0 倍および 1.4 倍上昇した。

	カゼイン群	米糠タンパク質群
増体重 (g/10日)	26.8 ± 1.0	23.7 ± 1.1
摂食量 (6日目, g/d)	14.5 ± 0.5	14.6 ± 0.7
肝臓重量 (g/100g体重)	4.01 ± 0.10	3.81 ± 0.09
血清総コレステロール濃度 (mg/dL)	130.8 ± 8.5	72.0 ± 3.4**
糞		
乾燥重量 (g/3日)	3.30 ± 0.05	3.95 ± 0.25
中性ステロイド (mg/3日)	89.3 ± 4.1	174.0 ± 29.8*
酸性ステロイド (mg/3日)	69.9 ± 3.3	95.0 ± 3.3**

表1 食餌誘発性高コレステロール血症ラットの生化学的指標に対する米糠タンパク質の影響

*p < 0.05, **p < 0.01 (スチューデントのt検定)

(2) 図1に示すように、カゼインの胆汁酸結合能と比較し、米糠タンパク質のものは、有意に3.6倍上昇した。

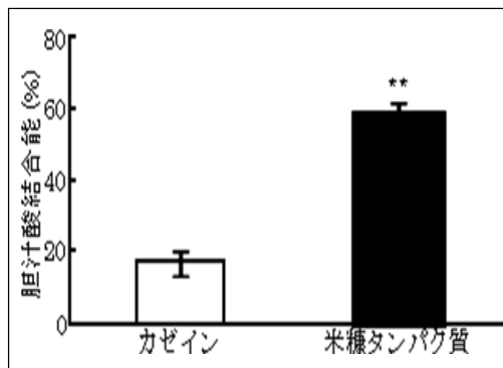


図1 米糠タンパク質の胆汁酸結合能 **p < 0.01 (スチューデントのt検定)

(3) 図2に示すように、米糠タンパク質のコレステロールミセル溶解性は、カゼインのものと比較し有意に84%低下した。

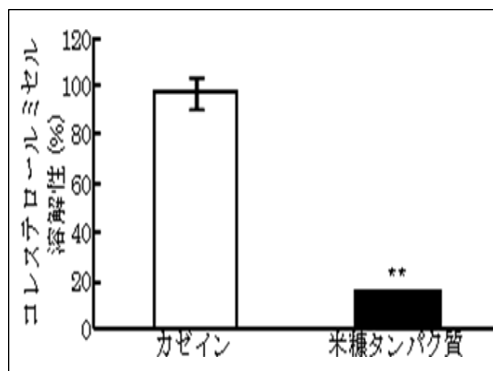


図2 米糠タンパク質のコレステロールミセル溶解性に与える影響

**p < 0.01 (スチューデントのt検定)

研究成果(1)~(3)から、世界の主要食糧資源である大豆や米由来のタンパク質と同様に(引用文献~),米糠由来のタンパク質にも、強力な血清コレステロール濃度低下作用および糞中へのステロイド排泄促進作用があることがわかった。したがって、未利用資源である米糠の生活習慣病予防・改善に対する有効利用が期待できる。

(4) 胆汁酸結合カラムクロマトフィーによって溶出した米糠タンパク質由来の胆汁酸結合タンパク質画分を、SDS-PAGEに供した結果、複数の胆汁酸結合タンパク質が存在することがわかった(図3)。さらに、移動度から推定した分子量55.1 kDaのタンパク質を、MALDI-TOF/MSに供した結果、このタンパク質由来のペプチドはhypothetical protein OsJ_13801 (NCBI accession no. EAZ29742; 54.5 kDa)と高い相同性(45%)を示した、すなわちhypothetical protein OsJ_13801であると同定した(図4)。

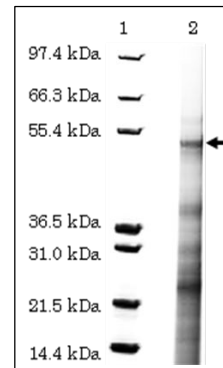


図3 米糠タンパク質から溶出した胆汁酸結合タンパク質のSDS-PAGE

矢印: MALDI-TOF/MSに供したタンパク質, 1: 分子量マーカー, 2: 胆汁酸結合タンパク質画分

```

1 MATRARATIL LLIAAVLFMA AAAASGEERR RETSLRCLQ RCEQDRPPYE
51 RARCVQCKFD QQQQQQERRR EHGHDHDDR DRDRRGESS EEDDEGRERG
101 SRRRPYVGR RSRFQVRSQ QGSVLLPPF STRFPASCAA SRTTASRCSS
151 RTRAPSSCRP TRTRTASATS PKISEEKLEK LLGKQDKGVI IRASEEQVRE
201 LRRHASEGGH GPHWLPFPF ESSRCFPNLL EQRFREFNRH GRLYEADARS
251 PHDLAEHDIR VAVWNITAGS MNAFFYNTRS VKVAVYLDGE GEARI VCPHL
301 SRGGREGGEE ERRRERGRKQ VREEEEEE QQKQGESEE EQVGQGYETI
351 RARLSRGTVF VVPSGHP1VW TSSRDSTLQI VCPDVHANNN ERMVLAGMNS
401 VLKLDLQAK ELAFAASARE VDELLNAQQE SAFLAGPEKS GRRGEESEDE
451 DRRRRRSHRG RGDEAVETLL RMAAAAV

```

図4 hypothetical protein OsJ_13801のアミノ酸配列

太字: NCBI データベース上の配列と一致したペプチド

研究成果(4)から、未利用資源である米糠から新規胆汁酸結合タンパク質 hypothetical protein OsJ_13801を同定した。このタンパク質の詳細はまだ明らかとなっていないが、

稲種子における機能の分類では、疾患/防御に分類されることが報告されている(引用文献)。今後、様々なクロマトグラフィーを駆使してhypothetical protein OsJ_13801を単離・精製することと、この単離・精製したタンパク質を用いて、試験管実験、培養細胞実験および動物実験を行うことにより、hypothetical protein OsJ_13801のコレステロール代謝改善作用を明らかにすることが課題である。また現在、コレステロールミセル溶解性低下能を指標として、米糠タンパク質水溶性画分をゲルろ過クロマトグラフィーおよび逆相クロマトグラフィーにより分離・精製中であり、新たな米糠由来のコレステロール吸収抑制タンパク質の発見に結びつくことが期待できる。

<引用文献>

Carroll, K.K., Hamilton, R.M.G., Effects of dietary protein and carbohydrate on plasma cholesterol levels in relation to atherosclerosis. *J. Food Sci.*, 48, 1975, 18-23

Morita, T., Oh-hashii, A., Kasaokam, S., Ikai, M., Kiriyaama, S., Rice protein isolates produced by the two different methods lower serum cholesterol concentration in rats compared with casein. *J. Sci. Food Agric.*, 71, 1996, 415-424.

Morita, T., Oh-hashii, A., Takei, K., Ikai, M., Kasaoka, S., Kiriyaama, S., Cholesterol-lowering effects of soybean, potato and rice proteins depend on their low methionine contents in rats fed a cholesterol-free purified diet. *J. Nutr.*, 127, 1997, 470-477

Sugano, M., Goto, S., Yamada, Y., Yoshida, K., Hashimoto, Y., Matsuo, T., Kimoto, M., Cholesterol-lowering activity of various undigested fractions of soybean protein in rats. *J. Nutr.*, 120, 1990, 977-985

Sugano, M., Yamada, Y., Yoshida, K., Hashimoto, Y., Matsuo, T., Kimoto, M., The hypocholesterolemic action of the undigested fraction of soybean protein in rats. *Atherosclerosis.*, 72, 1988, 115-122.

Saunders, R.M., The properties of rice bran as a food stuff. *Cereal Food World.*, 35, 1990, 632-636

Zhang, H., Yokoyama, W.H.,

Concentration-dependent displacement of cholesterol in micelles by hydrophobic rice bran protein hydrolysates. *J. Sci. Food Agric.* 92, 2012, 1395-1401

Yang, Y., Dai, L., Xia, H., Zhu, K., Liu, H., Chen, K., Protein profile of rice (*Oryza sativa*) seeds. *Genet. Mol. Biol.*, 36, 2013, 87-92

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

Wang, J., Shimada, M., Kato, Y., Kusada, M., Nagaoka, S., Cholesterol-lowering effect of rice bran protein containing bile acid-binding proteins. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 査読有, 79, 2015, 456-461
DOI: 10.1080/09168451.2014.978260.

[学会発表](計1件)

王 吉力特, 加藤 由喜奈, 下田 博司, 島田 昌也, 長岡 利. 米糠タンパク質による新規コレステロール代謝改善食品開発に関する研究, 日本農芸化学会中部支部第171回例会, 2014年10月11日, 名古屋大学(愛知県名古屋市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

島田 昌也 (SHIMADA Masaya)
岐阜大学・応用生物科学部・助教
研究者番号: 10576755