

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：34524

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26750028

研究課題名(和文) 乳酸発酵豆乳中のイソフラボンアグリコンの脂質代謝改善作用

研究課題名(英文) Lipid metabolism modulating effects of isoflavone aglycone in lactic acid-fermented soy milk

研究代表者

小林 麻貴 (Kobayashi, Maki)

兵庫大学・健康科学部・講師

研究者番号：70550789

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：豆乳を乳酸発酵処理することで脂質代謝改善作用が強まるため、脂質代謝改善作用に関与する乳酸発酵豆乳中の有効成分の検討を行った。豆乳の乳酸発酵処理によって脂質代謝改善効果が強まるが、その効果はイソフラボンアグリコンのみや大豆タンパク質のみの時ではなく、大豆タンパク質とイソフラボンアグリコンが共存時に効果を発揮することが示唆された。また、乳酸発酵処理によってオリゴペプチドが生成すること、各種ポリフェノールが配糖体からアグリコン型に変換すること、オルニチン量の増加することが、乳酸発酵豆乳の脂質代謝改善効果に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Treating soy milk with lactic acid fermentation improves its lipid metabolism-modulating effects. We analyzed the effects of the active ingredients in lactic acid-fermented soy milk that contribute to this improvement. Lactic acid fermentation of soy milk strengthened its lipid metabolism-modulating effects. However, this effect was not observed with isoflavone aglycone or soy protein alone, suggesting that the combination of soy protein and isoflavone aglycone produces the effect. In addition, lactic acid fermentation causes oligo peptides to form, converts the polyphenols from their glycoside to aglycone forms, and increases ornithine content. These changes could be contributing to the improvement in lipid metabolism seen with lactic acid fermented soy milk.

研究分野：栄養生化学

キーワード：lipid metabolism isoflavone soy protein

### 1. 研究開始当初の背景

近年、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。大豆には大豆タンパク質、イソフラボンが豊富に含まれ、脂質代謝改善作用を示すことが既に報告されている。申請者は豆乳に注目し、植物性食品由来の乳酸菌で発酵させた乳酸発酵豆乳を作製し、普通食、高コレステロール食、高脂肪食・高コレステロール食投与ラットにおいてイソフラボンのアグリコン割合の違う2種類の当該食品の効果を比較すると、イソフラボンのアグリコン割合の高い当該食品は脂質代謝改善作用が強いと推察された。乳酸発酵豆乳中の脂質代謝に關与する成分としてイソフラボンアグリコンと大豆タンパク質が考えられるが、両成分のそれぞれの働きは明確ではない。乳酸発酵処理は大豆タンパク質を部分分解し、大豆ペプチドを生成することで脂質代謝改善作用を促進している可能性もある。さらに、乳酸発酵処理により、その他の乳酸発酵生成物が脂質代謝に影響を及ぼしている可能性もあるため検討を行った。

### 2. 研究の目的

(1) 乳酸発酵豆乳中のイソフラボンと大豆タンパク質単独での脂質代謝に及ぼす影響と、イソフラボンと大豆タンパク質共存時の脂質代謝に及ぼす影響について

植物性食品由来の乳酸菌で発酵させた乳酸発酵豆乳は乳酸発酵処理によりイソフラボンがアグリコン型に変換することで、脂質代謝改善作用を促進することを推察している。しかし、乳酸発酵中のイソフラボンアグリコンのみ、大豆タンパク質のみ、イソフラボンアグリコンと大豆タンパク質共存時の脂質代謝に及ぼす影響は明らかではないためラットを用いて検討を行った。

(2) イソフラボン添加による肝臓脂質代謝関連遺伝子発現への影響

動物実験では、乳酸発酵豆乳摂取によりコレステロール異化代謝に関わる CYP7a1 遺伝子の発現が増加した。そこで、イソフラボンアグリコンの影響をさらに詳しく調べるため、細胞を用いてイソフラボンアグリコンが肝臓遺伝子発現に及ぼす影響について検討した。

(3) 豆乳および乳酸発酵豆乳オリゴペプチド添加による肝臓脂質代謝関連遺伝子発現への影響

大豆タンパク質は乳酸発酵処理により大豆ペプチドに分解され、大豆ペプチドを生成している可能性がある。また、生成した大豆ペプチドのうちオリゴペプチドは腸管から吸収され、脂質代謝改善作用に關与している可能性がある。そのため豆乳及び乳酸発酵豆乳からオリゴペプチドを精製して HepG2 細胞に添加した場合の肝臓脂質代謝関連遺伝子

子発現への影響を検討した。

(4) 豆乳および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のメタボローム解析

乳酸発酵処理によりイソフラボンがアグリコン型に変換すること、大豆タンパク質が部分分解し大豆ペプチドを生成すること以外にも乳酸発酵処理により成分変化が起きている可能性が高い。そのため、メタボローム解析を用いて豆乳および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の代謝物を分析し、成分の比較を行った。

### 3. 研究の方法

(1) 乳酸発酵豆乳中のイソフラボンと大豆タンパク質単独での脂質代謝に及ぼす影響と、イソフラボンと大豆タンパク質共存時の脂質代謝に及ぼす影響について

乳酸発酵豆乳から 70%エタノールを用いてイソフラボンを含む乳酸発酵豆乳抽出物を作成した。イソフラボンをほとんど含まない大豆タンパク質のみの乳酸発酵豆乳として乳酸発酵豆乳を 70%エタノールで洗浄した後の乳酸発酵豆乳エタノール抽出物残査を作成した。そして、高コレステロール食投与ラットに乳酸発酵豆乳抽出物(イソフラボン)、乳酸発酵豆乳エタノール抽出残査(大豆タンパク質)、乳酸発酵豆乳(イソフラボン+大豆タンパク質)を高コレステロール食投与7週齢 SD 系雄性ラットに摂取させ5週間飼育を行い、血液・肝臓成分の分析を行った。また肝臓遺伝子発現に及ぼす影響について Real time RT-PCR 法を用いて検討を行った。

(2) イソフラボン添加による肝臓脂質代謝関連遺伝子発現への影響

乳酸発酵豆乳中のイソフラボンが肝臓遺伝子発現に及ぼす影響について、ヒト肝がん由来 HepG2 細胞を用いて検討した。動物実験では乳酸発酵豆乳摂取によりコレステロール異化代謝に関わる CYP7a1 遺伝子の発現が増加したので、乳酸発酵豆乳投与ラットの肝臓イソフラボン濃度と同濃度になるように HepG2 細胞にイソフラボンを添加し、CYP7a1 遺伝子発現に及ぼす影響について検討を行った。また、乳酸発酵豆乳摂取時に FAS 遺伝子の発現に変化がみられることから FAS 遺伝子発現に及ぼす影響についても検討を行った。

(3) 豆乳および乳酸発酵豆乳オリゴペプチド添加による肝臓脂質代謝関連遺伝子発現への影響

腸管から吸収される大豆ペプチドは、1kDa 以下である可能性が高い。そのため、乳酸発酵豆乳オリゴペプチドを陽イオン交換クロマトグラフィーで精製した。その後、豆乳および乳酸発酵豆乳オリゴペプチドが肝臓脂質代謝関連遺伝子である CYP7a1 遺伝子、FAS

遺伝子発現に及ぼす影響を検討した。

#### (4) 豆乳および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のメタボローム解析

豆乳および *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* TUA4404L で発酵したイソフラボンのアグリコン割合の低い乳酸発酵豆乳、*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* TUA4408L で発酵したイソフラボンのアグリコン割合の高い乳酸発酵豆乳について CE-TOFMS のカチオンモード、アニオンモードによる測定を行った。また、LC-TOFMS のポジティブモードおよびネガティブモードによる測定を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 乳酸発酵豆乳中のイソフラボンと大豆タンパク質それぞれの働きと、イソフラボンと大豆タンパク質共存時の脂質代謝に及ぼす影響について

高コレステロール食投与ラットに乳酸発酵豆乳中のイソフラボンのみを摂取させた場合、高コレステロール食投与群よりも肝臓脂質量は高値を示した。大豆タンパク質のみを摂取させると肝臓脂質量は、高コレステロール食投与群と同様に高値を示した。一方で大豆タンパク質とイソフラボンが共存する場合には、肝臓脂質量は高コレステロール食投与群よりも有意に低値を示した。そのため、乳酸発酵豆乳は、イソフラボンアグリコン、大豆タンパク質が単独で存在する場合には効果がなく、イソフラボンアグリコンと大豆タンパク質が共存する際に脂質代謝改善効果が促進されることが示唆された (Figure 1)。

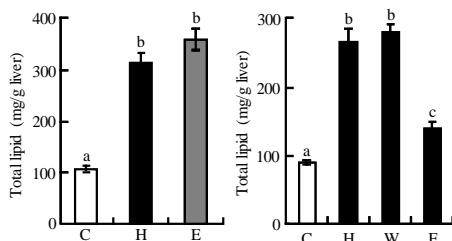


Figure 1. 乳酸発酵豆乳中のイソフラボンアグリコンのみ、大豆タンパク質のみ、イソフラボンアグリコンと大豆タンパク質共存時の肝臓脂質量

C: コントロール群 (AIN-93G 飼料)、H: 高コレステロール食群 (AIN-93G の一部を1% コレステロールで置換)、E: 高コレステロール食の乳酸発酵豆乳イソフラボン抽出物群、W: 高コレステロール食の乳酸発酵豆乳イソフラボン抽出残渣 (大豆タンパク質) 群、F: 乳酸発酵豆乳群 (イソフラボン + 大豆タンパク質) 値 ± SE a,b,c は Tukey の多重比較検定で  $p < 0.05$  以下の差があったものを表す (n=8)

#### (2) HepG2 細胞へのイソフラボン添加による脂質代謝関連遺伝子発現への影響

豆乳中に含まれるイソフラボンはダイゼインとその配糖体、ゲニステインとその配糖体がほとんどであることから、今回はアグリコンであるダイゼインとゲニステインについて検討を行った。

ゲニステインとダイゼインを HepG2 細胞

に添加したところ、CYP7a1 遺伝子の発現は有意に増加した。一方でイソフラボンは FAS 遺伝子の遺伝子発現に影響はなかった (Figure 2)。そのため、イソフラボンは CYP7a1 遺伝子発現を促進するが、FAS 遺伝子の発現には影響しないことが示唆された。

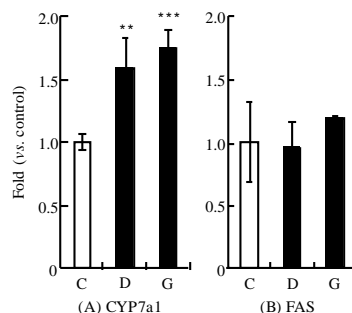


Figure 2. HepG2 細胞にダイゼインとゲニステインを添加した場合の遺伝子発現量の変化

C: コントロール、D: ダイゼイン、G: ゲニステイン 値 ± SD \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$  (n=5)

#### (3) HepG2 細胞への豆乳および乳酸発酵豆乳オリゴペプチド添加による脂質代謝関連遺伝子発現への影響

豆乳および乳酸発酵豆乳から 1kDa 以下のオリゴペプチドを精製した。これらを HepG2 細胞に添加して肝臓脂質代謝関連遺伝子影響確認したところ、豆乳及び乳酸発酵豆乳オリゴペプチドは CYP7a1 遺伝子の発現には影響はなく、FAS 遺伝子の発現は乳酸発酵豆乳オリゴペプチドのみ有意に低値を示した (Figure 3)。そのためイソフラボンは CYP7a1 の遺伝子発現を促進し、乳酸発酵大豆ペプチドは FAS 遺伝子の発現低下に関与することが示唆された。

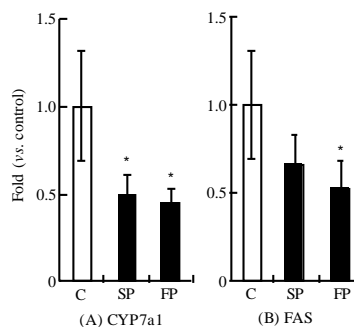


Figure 3. HepG2 細胞に豆乳ペプチドと乳酸発酵豆乳ペプチドを添加した場合の遺伝子発現量の変化

C: コントロール、SP: 豆乳ペプチド、FP: 乳酸発酵豆乳ペプチド 値 ± SD. \* $p < 0.05$  (n=5)

#### (4) 豆乳および2種類の乳酸発酵豆乳のメタボローム解析

豆乳およびイソフラボンのアグリコン割合の低い乳酸発酵豆乳 (4404 菌乳酸発酵豆乳)、イソフラボンのアグリコン割合の高い乳酸発酵豆乳中 (4408 菌乳酸発酵豆乳) に含まれる物質についてメタボローム解析を行ったところ、466 ピークが検出され、そのう

ち 361 ピークに代謝物質の候補、105 ピークに代謝ペプチドの候補が見つかった。それらを精査したところ、豆乳を乳酸発酵させることでポリフェノール類のアグリコン量が増加し、その効果は 4404 菌乳酸発酵豆乳よりも、4408 菌乳酸発酵豆乳のほうが強いこと、大豆タンパク質の分解が起こることで、アミノ酸量が増加すること、4408 菌乳酸発酵豆乳ではオルニチンの量が著しく増加することが明らかとなった。そのため、乳酸発酵豆乳の脂質代謝改善効果にはイソフラボンアグリコン、大豆タンパク質、大豆ペプチドだけでなく、ポリフェノールアグリコンや、脂質代謝への関連性が知られているオルニチン量の増加が関与している可能性が示唆された。

#### 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2件)

Maki Kobayashi, Shintaro Egusa, Mitsuru Fukuda, Isoflavone and Protein Constituents of Lactic Acid-Fermented SoyMilk Combine to Prevent Dyslipidemia in Rats Fed a High Cholesterol Diet. *Nutrients*, 6, 5704-5723 (2014)、査読有り

Maki Kobayashi, Shintaro Egusa, Mitsuru Fukuda, Isoflavone Aglycones and Oligopeptides in Lactic Acid-Fermented Soy Milk Differentially Regulated Lipid Metabolism-Related Gene Expression. *Food and Nutrition Science*, 7, 989-1009 (2016)、査読有り

##### [学会発表](計5件)

小林麻貴、江草信太郎、福田 満、乳酸発酵豆乳のイソフラボン含有量が高コレステロール食投与ラットの脂質代謝に及ぼす影響、第 68 回栄養食糧学会大会、2014 年 5 月 30 日～2014 年 6 月 1 日、酪農学園大学

小林麻貴、江草信太郎、福田 満、乳酸発酵豆乳抽出物が高コレステロール食投与ラットの脂質代謝に及ぼす影響、日本 26 日～2015 年 3 月 29 日、岡山大学

小林麻貴、江草信太郎、福田 満、Hypocholesterlomic Effects of Lactic Acid-Fermented Soymilk on Rats Fed a High Cholesterol Diet. 第 12 回アジア栄養学会議 (12th Asian Congress of Nutrition), 2015 年 5 月 14 日～2014 年 5 月 18 日、パシフィコ横浜

小林麻貴、江草信太郎、福田 満、乳酸発酵豆乳中のイソフラボンとタンパク

質は共存することで高コレステロール食投与ラットの脂質異常症を予防する、日本農芸化学会 2016 年度大会、2016 年 3 月 27 日～2016 年 3 月 30 日、札幌コンベンションセンター

小林麻貴、江草信太郎、福田 満、乳酸発酵豆乳中のイソフラボンアグリコンとオリゴペプチドの脂質代謝関連遺伝子発現に及ぼす影響について、第 70 回日本栄養食糧学会大会、2016 年 5 月 13 日～2016 年 5 月 15 日、武庫川女子大学

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

小林麻貴 (KOBAYASHI, Maki)

兵庫大学・健康科学部・講師

研究者番号：70550789