

氏名	松本雄宇
学位(専攻分野の名称)	博士(農芸化学)
学位記番号	乙第922号
学位授与の日付	平成29年2月20日
学位論文題目	脱脂大豆と大豆乳酸菌発酵物が生体の脂質代謝に及ぼす影響の解析
論文審査委員	主査 教授・農学博士 山本祐司 教授・博士(農芸化学) 内野昌孝 教授・農学博士 上原万里子 博士(歯学) 石見佳子*

## 論文内容の要旨

### 背景・目的

大豆は世界各地で栽培されているマメ科の一年草であり、タンパク質をはじめ、脂質、ビタミン、ミネラルおよび食物繊維が豊富な栄養学的に優れた食材である。現在に至るまで、大豆の用途はタンパク質源としての一次機能に焦点をあてたものがほとんどであったが、肥満や糖尿病といった生活習慣病の増加から、近年では大豆の健康性機能や生体調節機能といった三次機能に関する研究、開発が行われている。

大豆の生体調節機能に関する研究は、主に大豆タンパク質や大豆イソフラボンといった含有成分を中心に行われ、特に脂質代謝系に対して数多くの知見を得てきた。したがって、これらの生物活性物質が混在する大豆そのものにおいても、生物活性物質単体の影響と同等もしくはそれ以上の効果が期待される。しかしながら、大豆そのものを用いた機能性評価の報告については、多くは表現系のみを解析にとどまっており、詳細な分子メカニズムの解明が今後の課題である。

一方で、大豆はトリプシン・インヒビター (TI) やレクチンといった有害物質も含有していることから、大豆を生食することはできない。そのため摂取には加熱や発酵などの加工処理を行い、これらの物質を不活性化させる必要がある。大豆加工品は日本の伝統的な食品である納豆、味噌および醤油をはじめ、主にアジア地域を中心に多く存在する。この他に、アジアだけでなく世界的に生産されている大豆加工品として脱脂大豆があげられる。

脱脂大豆は、大豆から油脂を抽出した後の残渣のことであり、主に醤油や大豆タンパク質などの原料や家畜の飼料として使用されているが、ヒトが摂取する機会はほ

とんどない。しかしながら、食用大豆加工品と同様豊富なタンパク質や種々の生物活性物質が残存していると考えられ、また油脂抽出行程にて加熱処理が施されることから、TIをはじめとした有害物質が不活性化している可能性もある。したがって、脱脂大豆はヒトに有益な効果を及ぼす食材であると考えられる。

一方、食材を乳酸菌にて発酵させると、食材が持つ機能性が強化もしくは新規機能性が付加されることが知られている。代表的な食材としては牛乳の乳酸発酵物であるヨーグルトが挙げられる。ヨーグルトには腸管免疫の改善やカルシウムの吸収率の上昇など、乳酸菌発酵により機能性の付加と強化がなされている。したがって、大豆を乳酸菌にて発酵させることで、大豆が本来有する機能性の強化や大豆とは異なる機能性の付加が期待されるものの、実験的な検証は行われていない。

そこで本研究の実験1では、高脂肪食条件下における脱脂大豆摂取が、脂質代謝に及ぼす影響とその分子メカニズムの解明を試みた。また実験2では、大豆乳酸菌発酵物 (FS) と未発酵大豆が脂質代謝に及ぼす影響の差異を検討することで、大豆の機能性に対する発酵プロセスの有用性を評価した。

### 実験1. 高脂肪食条件下における脱脂大豆の摂取が脂質代謝に及ぼす影響の解析

#### 1. 実験デザイン

本研究で用いた脱脂大豆は、日清オイリオ株式会社より提供されたものを使用した。大豆油脂の抽出方法は溶媒抽出法と圧搾法があるが、本研究では溶媒抽出法にて脱脂されたものである。

5週齢の Sprague-Dawley (SD) 系雄性ラット ((株)

\* 国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 国立健康・栄養研究所 食品保健機能研究部 部長

日本クレア)を、Control (CO) 群 (AIN-93G を給餌した群)、高脂肪食 (HFD) 群 (AIN-93G をもとに牛脂を加えて脂質エネルギー比率を 40% にした群)、脱脂大豆 (SBM) 群 (HFD の内 30% [重量 %] を脱脂大豆に置き換えた群) の 3 群に分け 4 週間飼育した。ただし、脱脂大豆に含まれるタンパク質、脂質、食物繊維はそれぞれカゼイン、大豆油、セルロースと重量置換した。その他の成分はコーンスターチと重量置換した。飼育最終日は 16 時間の絶食後、腹腔内ペントバルビタール麻酔下で開腹し、心臓より採血し血漿を得た。臓器は摘出後直ちに秤量し、一部は分析時まで凍結保存した。肝臓は一部生理食塩水にて灌流後、凍結保存した。飼育最終日の 2 日前にフンを採取し、重量を測定した。

## 2. 結果

### 2-1 脱脂大豆が体重および臓器重量に及ぼす影響

肥満は白色脂肪組織への脂肪蓄積を伴う体重増加によって特徴付けられている。したがって、高脂肪食摂取により体重および白色脂肪組織の重量が増加するか確認をしたところ、CO 群に対して HFD 群で有意な増加が認められた。一方、高脂肪食による白色脂肪組織の重量の増加は脱脂大豆摂取により抑制され、体重の増加も脱脂大豆摂取により抑制傾向を示した。さらに、脱脂大豆摂取は肝臓および赤筋重量にも影響することが明らかとなった。

大豆には TI が含まれており、過剰な摂取は膵臓肥大を引き起こすと報告されている。Struthers らは、ラットに生大豆 (TI 活性: 115~130 TIU/mg) を摂取させたところ、膵臓重量が増加したこと、さらに、加熱処理をした大豆では、TI 活性が 4~8 TIU/mg と生大豆と比べて TI 活性が低下しており、膵臓重量にも変化は認められなかったことを報告している。本研究にて使用した脱脂大豆の TI 活性は 5.2 TIU/mg であり、また膵臓重量にも変化は認められなかった。したがって、本研究で用いた脱脂大豆摂取量は、膵臓を肥大させず、高脂肪食による肥満を抑制すると考えられた。

### 2-2 脱脂大豆が血中、肝臓中およびフン中脂質量に及ぼす影響

上記の結果から、著者は脱脂大豆が脂質代謝を変化させると予想し、血中、肝臓中およびフン中の脂質量を測定した。その結果、SBM 群の血中、肝臓中トリアシルグリセロール (TAG)、総コレステロール (CHOL) 量は HFD 群と比べ有意に低値を示した。一方、SBM 群のフン中に排泄された TAG 量は HFD 群と比べ有意に高値を示したが、2 群間のフン中 CHOL 量に有意差は

認められなかった。したがって脱脂大豆摂取は TAG の吸収、そして肝臓中の TAG や CHOL 代謝を変化させることが示唆された。

### 2-3 脱脂大豆が肝臓脂質代謝関連遺伝子に及ぼす影響

肝臓中の TAG 量が減少する要因として、TAG 合成量の低下、脂肪酸の  $\beta$  酸化の亢進および VLDL 分泌の増加などの代謝変動が考えられる。そこで、これらの代謝に関連する酵素の mRNA 発現量を Real-time PCR 法を用いて解析した。

その結果、TAG 合成に関連する酵素 (FAS, GPAT, SCD-1) の mRNA 発現が脱脂大豆摂取によりすべて低下していた。さらに、これらの遺伝子発現を制御することで知られる SREBP-1c の mRNA 発現も脱脂大豆摂取により有意に低下していた。一方、脂肪酸の  $\beta$  酸化および VLDL 分泌に関する酵素の mRNA 発現量に変化は認められなかった。

以上より、脱脂大豆摂取による血中および肝臓中 TAG 量の減少は、SREBP-1c mRNA 発現量の減少による TAG 合成量の低下が原因であることが示唆された。

### 2-4 SREBP-1c mRNA 発現量は SHP によって制御される

大豆タンパク質は血中インスリン濃度を低下させることで、肝 SREBP-1c mRNA 発現量を低下させることが知られている。そこで、血中インスリン濃度を測定したところ、HFD 群に対して SBM 群で有意に低値を示した。しかしながら、SREBP-1c mRNA 発現量と血中インスリン濃度は相関していなかった。

一方、機序は不明であるものの、大豆タンパク質はインスリン非依存的に肝 SREBP-1c mRNA 発現量を低下させることも報告されている。著者は、オーファン核内受容体の一つであり、様々な転写因子の活性を負に制御するタンパク質である SHP が、本研究結果の SREBP-1c mRNA 発現量の低下に関与すると予想した。そこで、SHP の mRNA 発現量を測定したところ、HFD 群に対して SBM 群で有意に高値を示した。さらに、SHP mRNA 発現量は SREBP-1c mRNA 発現量と有意な負の相関を示した。以上より、脱脂大豆摂取による SREBP-1c mRNA 発現量の低下は、SHP による転写因子の不活性化が関係していることが示唆された。

### 2-5 SHP mRNA 発現量は PPAR $\gamma$ によって制御され、糖新生酵素の遺伝子発現を抑制する

SHP は脂質代謝だけでなく、FOXO1 や HNF4 $\alpha$  を介した糖新生酵素の発現も負に制御することが知られている。そこで、肝臓の糖新生に関わる G6Pase および PEPCCK の mRNA 発現量を Real-time PCR 法にて測定

した。その結果、肝 G6Pase mRNA 発現量は、HFD 群に対して SBM 群で有意に低値を示した。一方、肝 PEPCK mRNA 発現量に変化は認められなかった。核内受容体の一つである PPAR $\gamma$  は RXR $\alpha$  と二量体を形成し、SHP の発現を正に制御することが報告されている。さらに、PPAR $\gamma$  は糖新生酵素の発現を抑制することが知られているが、このメカニズムには SHP が関係していると示唆されている。したがって、本研究における SHP の mRNA 発現量の増加と、G6Pase の mRNA 発現量の低下に PPAR $\gamma$  が関係していると予想し、肝 PPAR $\gamma$  の mRNA 発現量を測定したところ、HFD 群に対して SBM 群で有意に高値を示した。以上より、脱脂大豆摂取による SHP mRNA 発現量の上昇に PPAR $\gamma$  の関与が示唆された。さらに、脱脂大豆摂取による糖新生酵素の発現低下には、PPAR $\gamma$  によって発現が増加した SHP が関係していると推察された。

#### 2-6 脱脂大豆は肝臓におけるインスリン抵抗性を抑制する

肝臓における脂肪蓄積はインスリン抵抗性を引き起こすことが報告されていることから、脱脂大豆摂取による肝臓での脂肪蓄積の抑制はインスリン抵抗性の抑制に繋がると予想される。事実脱脂大豆の摂取は高脂肪食による血中インスリン濃度の増加を抑制していた。したがって、血中グルコース濃度を測定したところ、CO 群に対して HFD 群で有意に高い値を示し、HFD 群に対して SBM 群で低値傾向を示した。さらに、インスリン抵抗性の指標である HOMA-IR は、CO 群に対して HFD 群で有意に高値を示し、HFD 群に対して SBM 群で有意に低値を示した。

インスリン抵抗性ではインスリンシグナルの中心的な役割を担う AKT のリン酸化量が低下することが知られているが、近年の研究で、食事性肥満の初期では既報とは逆に AKT のリン酸化量が増加することが報告されている。したがって、AKT のリン酸化状態を Western blot 法にて確認したところ、高脂肪食摂取によりリン酸化 AKT 量が増加し、脱脂大豆摂取により通常レベルまで低下していた。以上より、脱脂大豆摂取は高脂肪食による肝臓でのインスリン抵抗性を抑制することが示唆された。

#### 3. 小括

以上の結果から、脱脂大豆は腸管での脂肪吸収の阻害や、肝臓の脂肪合成関連遺伝子の発現量を低下させることで、食事誘導性肥満、肝臓脂肪の蓄積およびインスリン抵抗性を抑制することが示唆された。さらに、大豆が

有する脂質代謝改善効果の新たな作用経路を明らかとした。

### 実験 2. 高脂肪食条件下における大豆乳酸菌発酵物の摂取が脂質代謝に及ぼす影響の解析

#### 1. 実験デザイン

本研究で用いた大豆乳酸菌発酵物 (FS) は、大豆の乳酸菌発酵物としてすでに市販されている FiLact<sup>®</sup> (ビーアンドエスコポーレーション株式会社) を使用した。また未発酵大豆 (SOY) も FS 同様ビーアンドエスコポーレーション株式会社より提供されたものを使用した。FS は大豆そのものを 16 種類の乳酸菌で発酵させ、パウダー状にしたものである。FS の形状は、表面が平坦な未加工大豆と違いスポンジ状に変形していることから、様々な化学物質を吸着する能力を保持していると考えられる。

実験 1 と同様に、5 週齢の Sprague-Dawley (SD) 系雄性ラット ((株)日本クレア) を、対照群 (AIN-93G をもとに牛脂を加えて脂質エネルギー比率を 40% にした群)、未発酵大豆群 (対照群飼料の内 5% [重量 %] を SOY に置き換えた群)、大豆乳酸菌発酵物群 (対照群飼料の内 5% [重量 %] を FS に置き換えた群) の 3 群に分け 4 週間飼育した。ただし、大豆粉末および FS 粉末に含まれるタンパク質、脂質、食物繊維はそれぞれカゼイン、大豆油、セルロースと重量置換した。その他の成分はコーンスターチと重量置換した。飼育最終日は 16 時間の絶食後、腹腔内ペントバルビタール麻酔下で開腹し、心臓より採血し血漿を得た。臓器は摘出後直ちに秤量し、一部は分析時まで凍結保存した。肝臓は一部生理食塩水にて灌流後、凍結保存した。飼育最終日の 2 日前にフンを採取し、重量を測定した。

#### 2. 結果

##### 2-1 FS が血中および肝臓中脂質量に及ぼす影響

血中 TAG 濃度は、SOY および FS 摂取により低下した。一方、肝臓中 TAG 濃度は SOY および FS 摂取にて低下したものの、SOY 摂取では統計的な有意差は認められなかった。もともと、大豆タンパク質や大豆由来のペプチドは脂質排泄を促す効果が有ること、また FS の特殊な形状から、FS 摂取によりフン中の脂質排泄量が増加すると予想した。しかし、フン中 TAG 濃度に各群変化は認められなかった。これらの結果から、SOY および FS 摂取による血中 TAG 濃度の低下は、肝臓での TAG 濃度の低下に伴う血中放出量の低下によるものと考えられた。

## 2-2 FSが肝臓脂質代謝関連遺伝子に及ぼす影響

次に、肝臓における脂質代謝関連遺伝子を Real-time PCR 法にて測定した。まず、脂肪酸合成に関わる FAS, SCD-1 および ACC について解析したところ、これらの遺伝子発現量に各群変化は認められなかった。したがって、本研究における肝臓 TAG 濃度の低下に、脂肪酸合成量は関与しないことが示唆された。一方、脂肪酸から TAG を合成する経路の律速酵素である GPAT の遺伝子発現量を測定したところ、SOY および FS 摂取により有意な低下が認められた。したがって、SOY および FS 摂取による肝臓中 TAG 濃度の減少は、TAG 合成が減少したことに起因することが示唆された。

次に、先の実験と同様に SHP の mRNA 発現量を測定したところ、対照群に対して未発酵大豆および大豆乳酸菌発酵物群で高い値を示したが、大豆乳酸菌発酵物群にのみ統計的有意差が認められた。したがって、大豆乳酸菌発酵物群では SHP による SREBP-1c の mRNA 発現量が減少していると予想したが、有意な変化はなかった。さらに、SREBP-1c 以外に GPAT を制御することで知られる ChREBP の mRNA 発現量を測定した。その結果、SREBP-1c 同様有意な変化は認められなかったが、SHP mRNA 発現量と GPAT mRNA 発現量は有意な負の相関を示した。したがって、SOY および FS 摂取による GPAT 遺伝子発現量の低下は、SHP による転写因子の不活性化が関係していることが示唆された。

## 2-3 FSはNrf2を活性化させることでSHPのmRNA発現量を増加させる

次に、SHP の発現を上昇させる因子について解析した。近年の研究で、抗酸化関連酵素の発現に寄与する Nrf2 が、SHP の発現を制御する新たな因子として報告された。そこで、Western blot 法を用いて Nrf2 を解析したところ、SOY および FS 摂取により Nrf2 の核内移行が亢進していることが明らかとなった。これらの結果から、本研究における SHP 遺伝子発現量の増加は、Nrf2 活性化を介している可能性が示された。本研究は、大豆加工品摂取による脂質代謝改善効果に、Nrf2 が関与していることを示唆した初めての報告である。

## 3. 小括

以上の結果から、大豆には Nrf2/SHP 経路を介した血中および肝臓中脂質低下作用を有することが示唆された。一方、SOY と FS との間に顕著な違いは認められなかったが、いくつかのパラメーターで SOY 摂取より

も FS 摂取で強い作用を示していた。したがって、FS は乳酸菌発酵により大豆が本来有する機能性が強化されたと食品素材であると考えられる。

## 総括

大豆は、古来よりタンパク質源という栄養学的機能が主な用途であった。しかし、近年の健康への関心からその生体調節機能が着目され、脂質代謝改善効果が期待できる機能性食品のさきがけとして研究、開発がなされてきた。大豆の脂質代謝改善メカニズムの一つとして、血中インスリン濃度の低下に伴う肝臓での脂質合成酵素の遺伝子発現の抑制が報告されている。その一方で、インスリン非依存的なメカニズムも存在することを示唆する報告もあり、その詳細な機序を説明するには至っていない。著者は実験 1, 2 の結果から、1) 脱脂大豆および FS は脂質代謝改善効果を有すること、2) 大豆摂取による脂質合成酵素の発現抑制は、転写因子の活性を負に制御する核内受容体である SHP を介する可能性を示唆したこと、さらに、3) 発酵プロセスを経ることで、大豆が有する脂質代謝改善効果を強める可能性が示唆された。

今後はヒトでの詳細な検討が必要であるが、本研究の結果が、大豆のさらなる消費拡大と人々の健康に役立つことを期待する。

## 【Abbreviations】

FAS, Fatty acid synthase

ACC, Acetyl CoA carboxylase

GPAT, Glycerol-3-phosphate acyltransferase

SCD-1, Stearoyl-CoA desaturase 1

SREBP-1c, Sterol regulatory element binding protein 1c

SHP, Small heterodimer partner

PPAR $\gamma$ , Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$

RXR $\alpha$ , Retinoid X receptor  $\alpha$

FOXO1, Forkhead box protein O1

HNF4 $\alpha$ , Hepatocyte Nuclear Factor 4 $\alpha$

G6Pase, Glucose 6-phosphatase

PEPCK, Phosphoenolpyruvate carboxykinase

ChREBP, Carbohydrate-responsive element-binding protein

Nrf2, NF-E2-related factor 2

## 審査報告概要

本研究は、高脂肪食条件下における脱脂大豆の摂取が、脂質代謝に及ぼす影響とその分子メカニズムの解明を試みた。さらに、大豆乳酸菌発酵物（FS）と未発酵大豆が脂質代謝に及ぼす影響の差異を検討することで、大豆の機能性に対する発酵プロセスの有用性を評価した。その結果、1) 脱脂大豆およびFSは脂質代謝改善効果を有すること、2) 大豆摂取による脂質合成酵素の

発現抑制は、転写因子の活性を負に制御する核内受容体である SHP を介する可能性を示唆したこと、さらに、3) 発酵プロセスを経ることで、大豆が有する脂質代謝改善効果を強める可能性が示唆された。これらの研究成果等を詳細に検討した結果、審査員一同は博士（農芸化学）の学位を授与する価値があると判断した。