

(原著論文) 日本食品科学工学会誌 **70** (5), 177-185, 2023

低タンパク質米製造過程で生じる抽出米タンパク質分解物が脂質代謝に及ぼす影響

松本雄宇^{1,3}、岩崎優²、細川恵²、鈴木司¹、井上順¹、重村泰毅²、高野克己¹、
山本祐司^{1*}

¹ 東京農業大学応用生物科学部農芸化学科

² 東京家政大学家政学部栄養学科

³ 駒沢女子大学人間健康学部健康栄養学科

キーワード：抽出米タンパク質分解物、抗肥満作用、ペプチド、遊離アミノ酸

要約

低タンパク質米製造過程で生じる米由来タンパク質画分は肥満を抑制する

背景

メタボリックシンドロームは内臓脂肪蓄積型肥満に加え、高血糖、高血圧、脂質異常の2つ以上をあわせもった状態を指し、日本においては食生活の欧米化や運動不足による肥満者が増加している。糖尿病は2016年国民健康・栄養調査では1,000万人を超え、いまだ増加傾向を示しており、メタボリックシンドロームはその発症原因の一因でもある。さらに糖尿病に起因した腎臓疾患も近年増加傾向にあり、これら、腎臓疾患患者には腎臓への負担を軽減する目的でタンパク質摂取量を減らす必要があり、これら患者の生活を維持するために低タンパク質米が開発されている。一般に低タンパク質米は白米をタンパク質分解酵素で処理をするなどしてタンパク質を除去しているが、この除去したタンパク質加水分解物は産業廃棄物として処理されており、利用法の開発が求められていた。

そこで、このタンパク質加水分解物の利活用を目的に、これらの機能性の有無について解析を行った。一般にタンパク質加水分解物は単離したタンパク質よりも溶解度が高く、多様な用途にこたえることができる食品素材である。最近ではプロテイン市場の高まりもあり、タンパク質の消化吸収率を高めた加水分解物が販売されており、さらに、カツオのタンパク質分解ペプチドなどのように一部のタンパク質では、加水分解してできたペプチドが、生体内で生理活性物質として機能することが報告されている。また、近年の研究で、米タンパク質が有する多様な健康効果が明らかとなっており、特に、肥満や糖尿病といった生活習慣病への効果は注目すべきところである。また、日本の生活習慣病罹患患者数は米を主食としない欧米などと比べて低いことから、日本人の健康に米タンパク質が与える影響は大きいと考えられる。

先行研究においても、米タンパク質は脂質代謝などに効果を示すことが報告していることから、今回の低タンパク質米製造過程で生じる副産物のタンパク質の加水分解物(RPH)にも同様の効果を示す可能性があると予想した(図1A)。そこで、本研究では、

RPH の機能性について 2 型糖尿病モデルマウスである KK-Ay マウスを用いて RPH が生体内の脂質代謝に及ぼす影響を検討した(図 1 B)。

実験方法

1. 米タンパク質加水分解物と物理化学的特性の解析

RPH は木徳神糧株式会社より提供されたものを使用した。はじめに、RPH のタンパク質組成およびおおまかな分子量解析を行った。アミノ酸組成は、Laemmli の方法に従い、分子量は SDS-PAGE 分析法にて解析をした。

1. 実験動物および飼育条件

本試験は東京農業大学動物実験委員会の承認を得た後に実施した。すべての動物は、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」(平成 18 年 4 月 28 日、環境省告示第 88 号)に従い取り扱った。日本クレアより雄性 KK-Ay マウスを購入し 60% 高脂肪飼料を与えた(対照群: 以下 Cont 群)と 60%高脂肪飼料の組成を基に RPH で置き換えた飼料を与えた群(RPH 群)を 4 週間飼育した。なお、各飼料は、Cont 群と RPH 群のタンパク質、脂質、炭水化物のエネルギー比がほぼ同一になるように調製した。

飼育終了 3 日前からフンを採取し、分析まで -20°C で保存した。飼育終了日は 6 時間の絶食後体重を測定した。肝臓、腸間膜脂肪および精巣周囲脂肪について解剖後ただちに重量を測定した。

2. 血中生化学的検査

血液を採取後、血中トリグリセリド(TG)濃度、グルコース(Glu)濃度および肝臓の炎症マーカーのアラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)活性の測定は委託解析し、血中遊離脂肪酸(FFA)濃度は、ラボアッセイTM NEFA(富士フイルム和光純薬株式会社)を用いて測定した。

3. 肝臓中脂質、フン中脂質測定

肝臓中脂質およびフン中脂質の測定は、Miyata *et al.*の方法に準じた。肝臓にクロロホルム/メタノール(2:1, v/v)を加えホモジナイズし抽出後、TG および FFA 濃度は、市販の測定キットであるラボアッセイTM トリグリセライドとラボアッセイTM NEFA(ともに富士フイルム和光純薬株式会社)を用いて測定した。

4. 血中遊離アミノ酸組成

血中遊離アミノ酸濃度の測定試料には、血液を血漿に調整後、イソチオシアン酸フェニル(PITC)を用いたプレカラム誘導体化法を導入した HPLC によって分析した。

5. 遺伝子発現解析

肝臓からの mRNA を RNAiso Plus(タカラバイオ株式会社)を用いて抽出した後、Prime Script RT Master Mix(タカラバイオ株式会社)を用いて cDNA に変換した。cDNA を Fast SYBR Green Master Mix(Thermo Fisher Scientific, US)と反応させ、StepOne Real Time PCR system(Thermo Fisher Scientific, US)を用いて定量 PCR を行った。各標的

遺伝子の発現量は、内部標準(β -actin)の発現量で補正し、Cont 群を 1 とした相対比で表した。

6. 統計解析

値は平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。各群のデータの正規性を Shapiro-Wilk 検定により確認した。正規性が棄却されなかった場合、F 検定により等分散性を検定した。等分散性が棄却されなかった場合は 2 群間の差を Student の t 検定により解析し、等分散性が棄却された場合は Welch の t 検定により解析した。一方、正規性が棄却された場合、2 群間の差を Mann-Whitney の U 検定により解析した。各データの相関性はスピアマンの順位相関係数を求めた。統計ソフトは EZR ver. 1.54 (自治医科大学) を使用した。有意差の判定は、 $p < 0.05$ の水準で行った。

実験結果

1. RPH の成分組成

一般的に動物試験で用いられるタンパク質源であるカゼインの日本食品標準成分表 2020 年版に記載の総アミノ酸量と比較した結果、RPH では Pro や Lys 含量が低く、Arg 含量は多かった。また、SDS-PAGE の解析結果からは RPH には米タンパク質であるグルテリンやアルブミン、プロラミンといったタンパク質は確認できず、さらに HPLC による分子量の解析結果からは、約 103 から 213 程度の分子量の成分が大半を占めたため、RPH はアミノ酸やペプチドが中心の成分と予想された。RPH のアミノ酸組成を図 1C に示した。

1. 体重、摂食量および臓器重量

マウスの体重変化を図 2A に示した。試験 5 日以降から、試験 24 日目を除き RPH 群の体重は Cont 群と比較して低値で推移した。摂食量、解剖前体重および臓器重量を表 2 に示した。両群間で摂食量に有意な差は認められなかった。解剖前の体重と精巣周囲相対重量は、Cont 群と比べ RPH 群で有意に低値を示した。一方、肝臓相対重量と腸間膜脂肪相対重量に有意な差は認められなかった(図 2B)。

2. 血中生化学検査

血中 FFA、TG および Glu 濃度は両群間で有意な差は認められなかったが、FFA と TG 濃度では Cont 群と比べ RPH 群で高値傾向 (FFA; $p = 0.08$, TG; $p = 0.07$) を示した (図 2B)。

3. フン重量およびフン中 TG 量

フン重量とフン中 TG 量は、Cont 群と比べ RPH 群で有意に高値を示した (図 3A)。

4. 血中 ALT 活性と肝臓脂質量

血中 ALT 活性は Cont 群と比べ RPH 群で有意に低値を示した。また、肝臓中 FFA 量は Cont 群と比べ RPH 群で低値傾向 ($p = 0.09$) であった。一方、肝臓中 TG 量については両群間で有意な差は認められなかった (図 4A)。

5. 血中遊離アミノ酸組成

多くのアミノ酸 (Asp、Asn、Gln、Glu、Val、Leu、Ile、Ser、Gly、Ala、Lys、His、Try、Phe、Hyp) で Cont 群よりも RPH 群で有意に高値を示した。Arg は Cont 群よりも RPH 群で高値傾向を示した ($p = 0.07$)。一方、Glu から合成される GABA は Cont 群よりも RPH 群で有意に低値を示した。Thr、Arg、Met、Cys、Pro については両群間で有意な差は認められなかった (図 5A)。

考察

1) 脂肪の吸収阻害効果の可能性について

本研究では、RPH が脂質代謝に及ぼす影響について検討した結果、RPH を高脂肪食と一緒に摂取すると、高脂肪食摂取による体重および脂肪組織重量の増加が抑制された。その原因として、今回の研究結果から RPH 摂取によりフン中 TG 量の増加が認められ、さらに、フン中 TG 量は体重や精巣周囲脂肪重量と有意な負の相関を示したことから (図 4B)、RPH による肥満予防効果は、脂質排泄量の増加が一端を担っていると考えられ、そのメカニズムとして脂質の吸収の阻害が関与している可能性が考えられた。米タンパク質によるコレステロール吸収阻害効果には、プロラミンの低い消化率が関係していることが報告されている。Ketprayoon らは、脱脂した米糠の酵素処理により腓リパーゼを阻害するペプチドを同定していることから、RPH にも腓リパーゼ阻害活性を持つペプチドが含有している可能性が考えられる。HPLC の結果から、RPH は主にペプチド態で構成されていることが明らかとなったことから難消化性タンパク質のみならず、ペプチドによる脂質吸収の阻害効果も米タンパク質、さらには RPH にもその効果があることが期待される。RPH による肥満予防効果の作用機序については今後の検討課題である。

2) 特定血中アミノ酸の増加の効果

本研究で示された RPH の有益な効果は主にペプチドに由来すると考えられるが、体重や血中 ALT 活性といくつかの血中遊離アミノ酸濃度との間に有意な相関関係が認められことは注目に値する。遊離アミノ酸が脂質代謝を制御する可能性については報告されており、本研究でも Asp、Ser、Asn、Glu、Gln、Gly、Ala、Val、Ile、Leu、Tyr、Phe、His、Lys の血中濃度が有意に RPH 摂取で上昇したことから、これらアミノ酸の作用である可能性が示唆された。特に、肝臓中の脂質 (TG および FFA) 量、および肝臓中 FFA 量と血中 Gly 濃度の相関関係について解析したところ肝臓中 TG 量については両群間で有意な差は認められなかったが、肝臓中 FFA 量は血中 Gly 濃度と有意な負の相関を示した (図 4B)。また、RPH 摂取により血中濃度が増加した遊離アミノ酸のうち Ser、Asn、Gly、Tyr、Lys の血中濃度と精巣周囲脂肪重量との間に有意な負の相関関係が認められた (図 5B)。メカニズムについては不明な点が多いが、Ser の投与と糖尿病改善の報告もあることから、RPH 摂取による糖尿病改善効果も期待される。また、Gly は肥満だけでなくエンドトキシン誘発性、アルコール性、非アルコール性といった様々なタイプの肝障害を予防することも報告されている。本研究においてはさらに、血中 Gly 濃度と血中 ALT

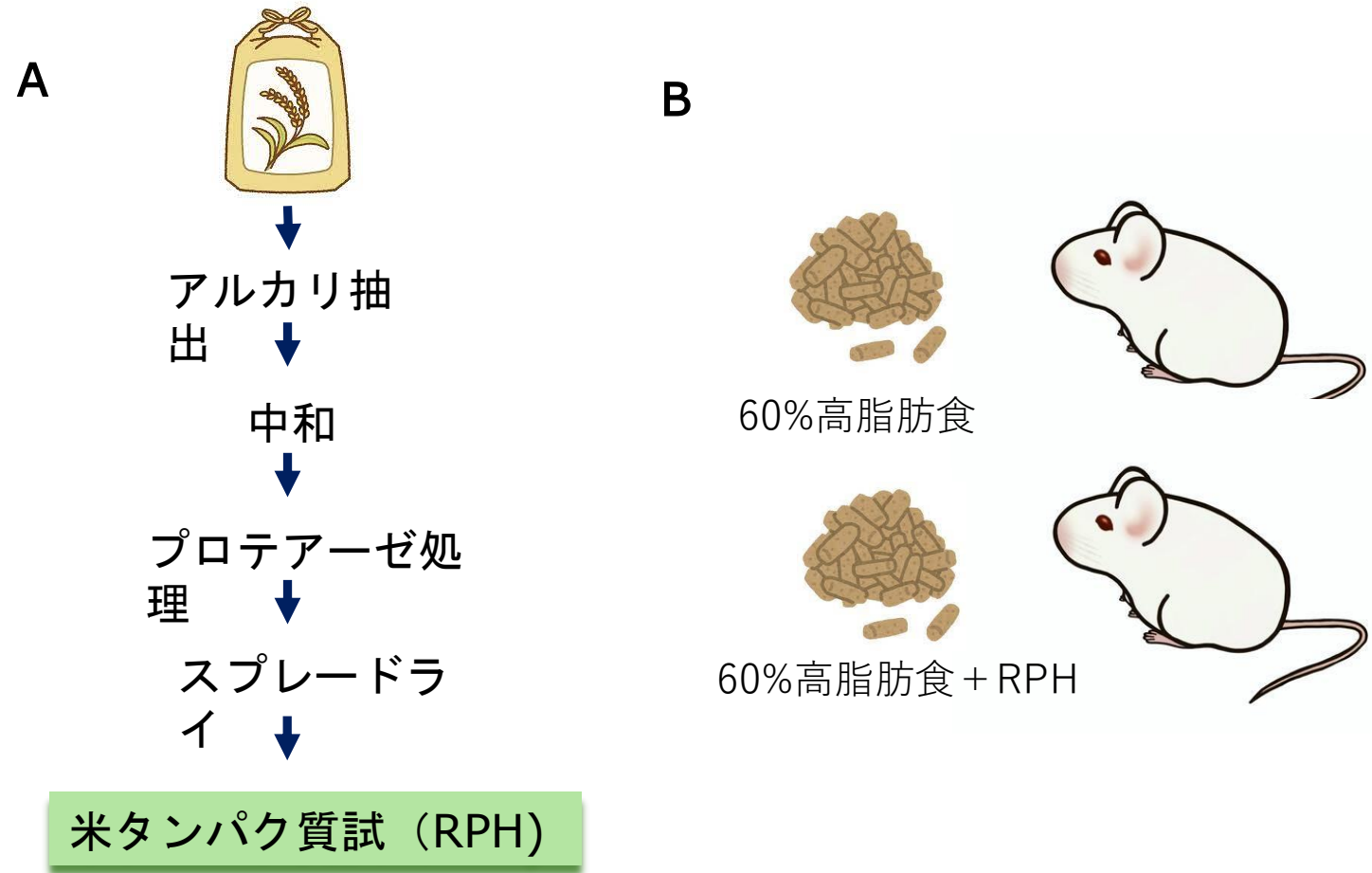
活性と有意な負の相関関係を示したことから、RPH による肥満および肝障害予防効果には主に Ser と Gly の遊離アミノ酸が関与している可能性がある。

3) まとめ

以上をまとめると、RPH は高脂肪食によって起こる肥満や肝障害の予防に効果的であることが示唆された。これは、加水分解によって生成したペプチドや遊離アミノ酸に起因するものと考えられる。興味深いことに、本研究の結果には米タンパク質を用いた先行研究の結果と異なる部分も見受けられた。RPH は米タンパク質と同様に必須アミノ酸である Lys が少なく、血中 Lys 濃度が低い値となると予想されたが、血中 Lys 濃度はむしろ高い値を示した。また Lys だけでなく他のアミノ酸も RPH 摂取により血中濃度が高い値を示していたことから、RPH はカゼインや米タンパク質より消化吸収率が良い素材であると考えられ、アミノ酸の供給源としての利活用も期待できる。RPH のさらなる研究により、米タンパク質にはない RPH 特有の機能性も期待できる。

米の消費拡大のため米飯給食の推進や米の健康効果についての普及・啓発に加え、米の新たな利用価値を見出す取り組みも行われている。例えば、米粉はグルテンフリーに対する需要の高まりから海外への輸出量が増加している。本研究成果は、米を白米として食べるという従来型の消費に加え、食品素材としての利用を促進することで、さらなる米の消費拡大につながるものと考えられる。

図 1



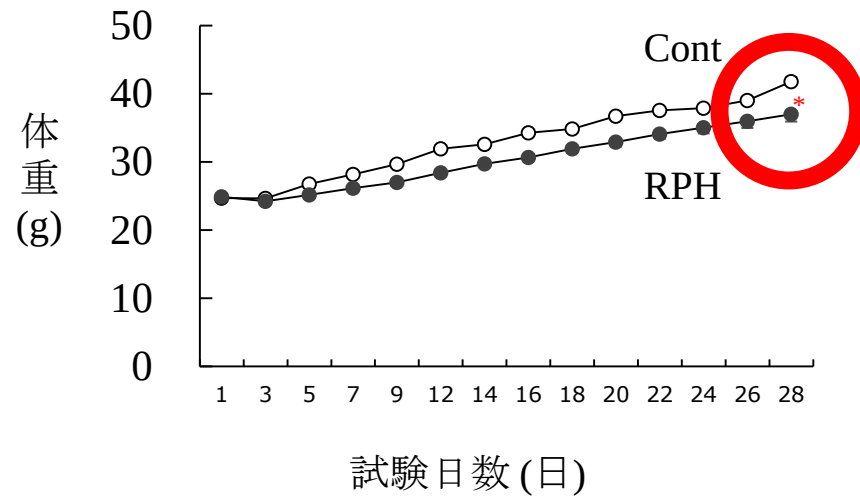
C

	アミノ酸組成		
	カゼイン ¹	うるち米 ²	RPH
	g/100 g		
Asp	6.3	0.6	6.5
Thr	4.0	0.2	2.8
Ser	5.2	0.4	4.4
Glu	19.0	1.1	14.1
Gly	1.7	0.3	3.5
Ala	2.7	0.3	4.5
Val	6.2	0.4	4.7
Ile	5.0	0.3	3.5
Leu	8.5	0.5	6.6
Cys	0.4	0.1	1.1
Met	2.7	0.2	1.9
Tyr	5.2	0.2	3.0
Phe	4.6	0.3	4.0
His	2.7	0.2	2.3
Lys	7.2	0.2	2.2
Arg	3.4	0.5	6.6
Pro	10.0	0.3	3.6

¹日本食品標準成分表2020年版（八訂）アミノ酸成分表編 <牛乳及び乳製品>（その他）カゼイン
²日本食品標準成分表2020年版（八訂）アミノ酸成分表編 <穀類>こめ [水稻穀粒] 精白米 うるち米

図 2

A 体重変化



平均値±標準誤差 (n=9-10), Cont群との比較 ; * $P < 0.05$

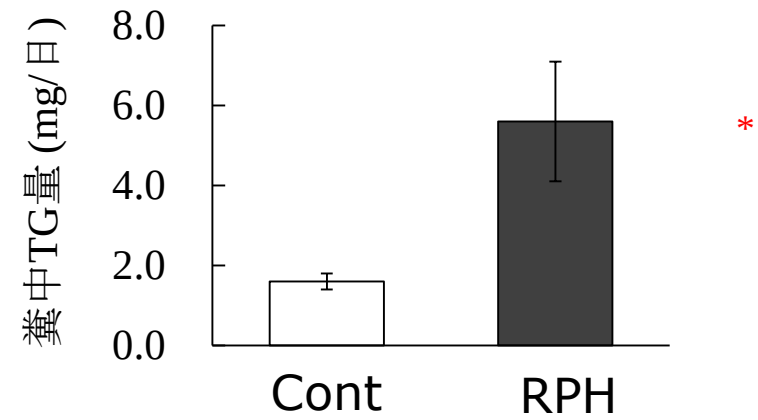
B 解剖前体重、摂食量、組織重量および血中生化学的検査値

	Cont	RPH
解剖前体重 (g)	40.7 ± 0.7	35.7 ± 1.3*
摂食量 (g)	98.9 ± 0.9	100.8 ± 4.5
組織重量 (g)		
肝臓	1.92 ± 0.06	1.99 ± 0.18
腸間膜脂肪	1.01 ± 0.08	0.94 ± 0.13
精巣周囲脂肪	1.69 ± 0.07	1.39 ± 0.08*
血中生化学的検査値		
TG (mg/dl)	170.2 ± 32.1	228.9 ± 34.0
FFA (mEq/L)	0.9 ± 0.1	1.2 ± 0.1
Glu (mg/dl)	503.5 ± 32.4	505.4 ± 59.3

平均値±標準誤差 (n=9-10), Contとの比較 ; * $P < 0.05$

図 3

A



平均値±標準誤差 (n=9-10), Cont群との比較 ; * $P < 0.05$

B

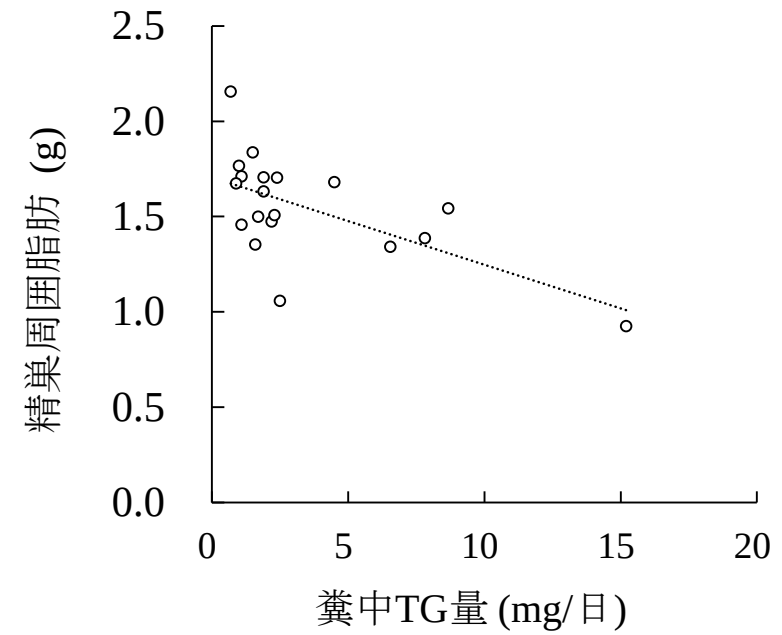
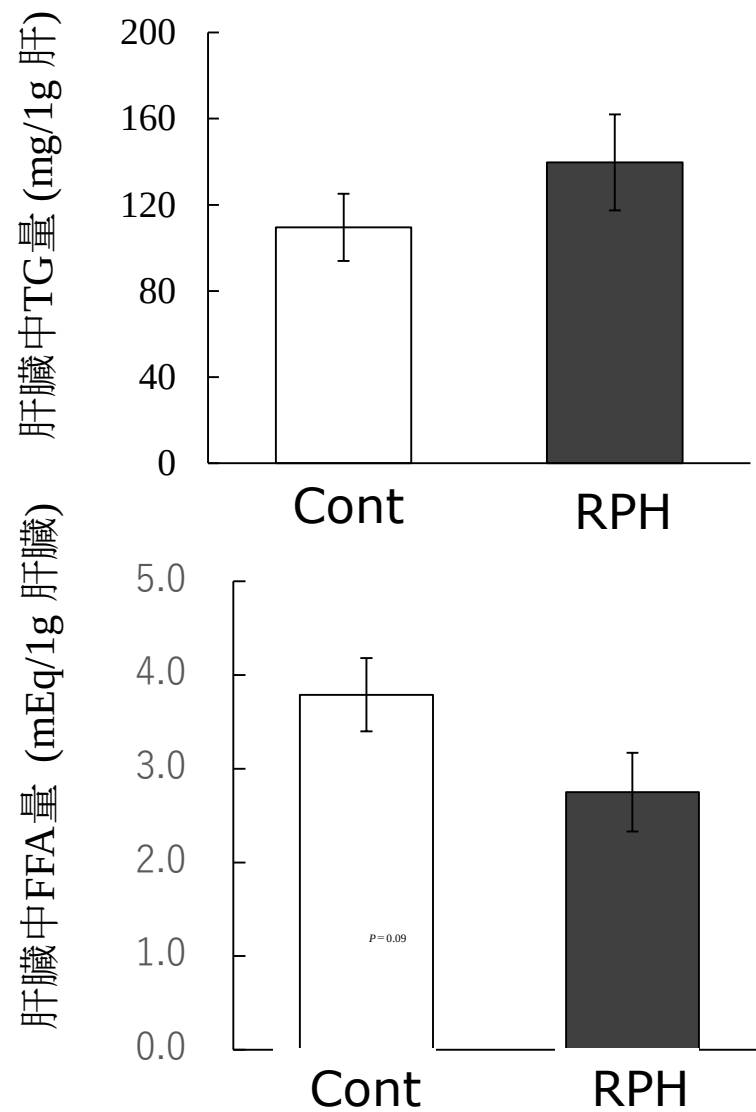
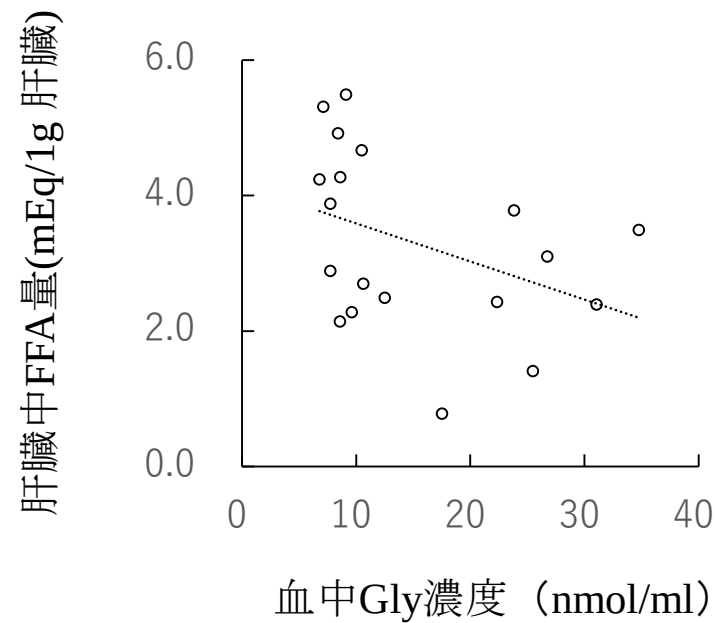


図4

A



B



平均値±標準誤差 (n=9-10) Cont群との比較 ; * $P < 0.05$

図5

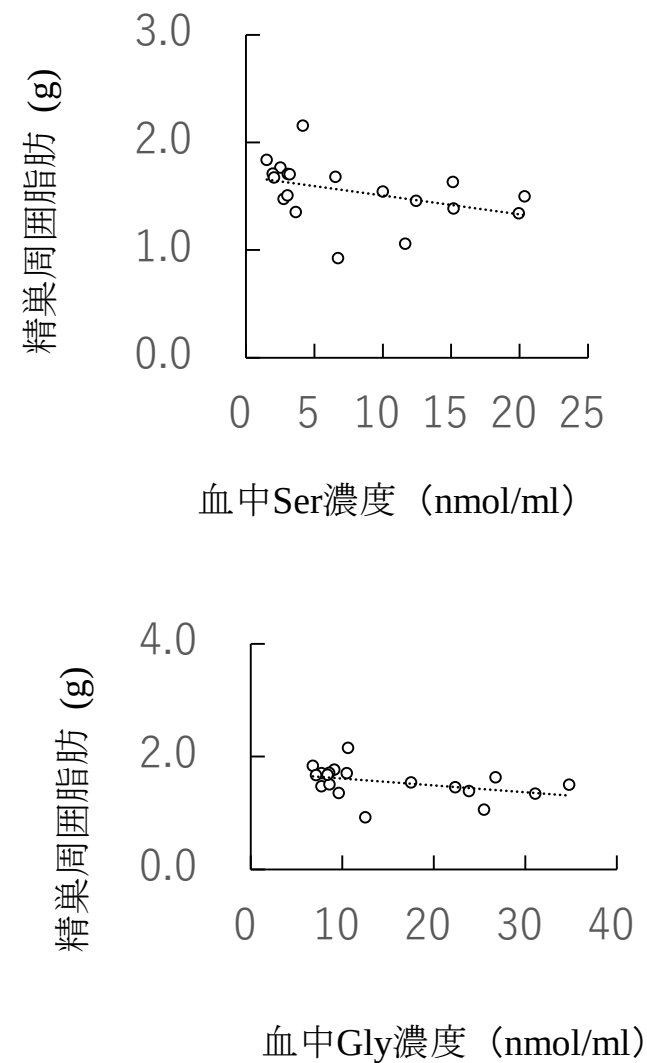
A

血中遊離アミノ酸組成

	Cont			RPH		
	nmol/ml					
Asp	0.38	±	0.15	1.38	±	0.25*
Thr	6.06	±	0.47	7.38	±	1.07
Ser	2.80	±	0.25	13.11	±	1.68*
Asn	1.38	±	0.12	2.35	±	0.28*
Glu	0.22	±	0.05	4.95	±	0.37*
Gln	38.56	±	2.85	56.23	±	7.08*
Gly	8.64	±	0.42	22.52	±	2.83*
Ala	24.50	±	1.45	66.12	±	11.55*
Val	13.18	±	1.07	23.33	±	2.99*
Ile	5.83	±	0.51	9.55	±	1.21*
Leu	11.39	±	0.78	20.79	±	2.70*
Cys	1.57	±	0.10	1.24	±	0.25
Met	0.89	±	0.13	0.64	±	0.19
Tyr	4.88	±	0.35	14.83	±	2.00*
Phe	4.27	±	0.29	6.33	±	0.69*
His	4.84	±	0.29	18.20	±	2.72*
Lys	4.84	±	0.51	25.27	±	3.67*
Arg	3.20	±	0.32	4.74	±	0.71
Pro	27.22	±	2.99	30.57	±	4.11

平均値±標準誤差 (n=9-10), Contとの比較 ; * $P < 0.05$

B



RPHは肥満に対して有効な機能性成分である可能性がある

- 1) RPHはジペプチドやトリペプチド、遊離アミノ酸で構成される
- 2) RPHの摂取は抗肥満効果を有する
- 3) RPHの抗肥満効果の一部は脂質吸収阻害である
→リパーゼ阻害の可能性
- 4) RPHは精巣周囲脂肪組織の重量の増加を抑制した
→セリンやグリシンによる効果の可能性