九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

大麦焼酎粕を原料として精製および生産される生理機能成分に関する研究

上原，絵理子

https://hdl.handle.net/2324/7157411

出版情報：Kyushu University, 2023, 博士（農学）, 論文博士
バージョン：
権利関係：

氏　　名　：上原 絵理子

論文題名　：大麦焼酎粕を原料として精製および生産される生理機能成分に関する研究

区　　分　：乙

論　文　内　容　の　要　旨

焼酎は日本の伝統的な蒸留酒である。アルコール発酵したもろみを蒸留した後に残った液体は一般的に「焼酎粕」と呼ばれるが、我々はその上清画分を「発酵大麦エキス（Fermented Barley Extraction, FBE）」として製造し、調味料や微生物培養基材として利用している。また、FBE は抗炎症効果および尿酸値低減効果を有することが報告されている。本研究では炎症が発症の一因とされるロコモティブシンドローム(ロコモ)を抑制する成分と、尿酸値低減効果をもたらす成分の探索および同定を行った。一方、我々は FBE を培地とした乳酸菌培養によって γ–アミノ酪酸（以下、GABA）を生産している。GABA を摂取することにより、肌の弾力および筋肉量が維持されることが報告されている。本研究では GABA が肌弾力および筋肉量を維持する作用機序を細胞実験によって明らかにした。

1. FBE に含まれる抗ロコモ成分の同定と細胞および生体に与える影響

マトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）-13 はリウマチおよび変形性膝関節症の発症に関与する軟骨分解酵素である。そこで、FBE の樹脂処理乾燥物 100 μg/mL もしくは HPLC 分画乾燥物 30-50 μg/mL を含む培地で、ヒト軟骨肉腫細胞 OUMS-27 を培養した。mRNA 測定用細胞は 24 時間、タンパク測定用細胞は 5 日間培養した。また、試料添加直後、炎症性サイトカインであるインターロイキン（IL）-1β 5.5 ng/well を添加した後、MMP-13 の発現に与える影響を検討した。FBE の精製画分 FBE-P40-5 に含まれるピログルタミルテトラペプチド pEPYP（pyro-Glu-Pro-Tyr-Pro、分子量 486、分子式 $C_{24}H_{30}N_4O_7$）0.1 μg/mL 以上を含む培地で培養した結果、MMP-13 の遺伝子およびタンパク質の発現が有意に減少した。また、pEPYP を 0.3 μg/mL 以上と IL-6 を 50 ng/well 含む培地でヒト急性 T リンパ芽球性細胞 TALL-1 を培養した結果、抗炎症性サイトカインである IL-10 の遺伝子およびタンパク質の発現が有意に増加した（培養時間は OUMS-27 と同様）。次にリウマチモデルラットに pEPYP 含有飼料を強制経口投与した。その結果、対照群に比べ、pEPYP 20 mg/kg B.W./day 以上の投与群おいて、足根部の浮腫スコアおよび血清中の抗Ⅱ型コラーゲン IgG 抗体濃度を低値に抑えた。病理学的検査では、pEPYP 40 mg/kg B.W./day 投与群において、対照群に比べ、炎症性細胞の浸潤箇所が少ない個体が見られた。さらに膝関節に痛みや違和感のある健常男女に pEPYP 15 mg/day を 12 週間連続摂取させた結果、プラセボ群と比べ、日本語版変形性膝関節症患者機能評価尺度(Japanese Knee Osteoarthritis Measure、JKOM)の「痛み・こわばりスコア」の変化量が有意に低下した。以上の結果から、FBE に含まれる pEPYP は抗ロコモ効果を有することが明らかとなった。

2. FBE に含まれる尿酸値低減成分の同定

尿酸排泄機構の一つである尿酸トランスポーターATP binding cassette subfamily G member（ABCG）2 の発現を増加させる成分を探索した。ヒト結腸癌由来細胞 (Caco-2 細胞)に FBE の樹脂処理乾燥物 2 mg/mL および HPLC 分画乾燥物 0.5-100 μg/mL 含む培地で培養した。mRNA 測定用細胞は 24 時間、タンパク測定および免疫染色用細胞は 5 日間培養した。FBE の精製画分 FBE-P60-4-6 に含まれるピログルタミルプロリン pEP（pyro-Glu-Pro、分子量 226、分子式 $C_{10}H_{15}N_2O_4$）1 μg/mL 以上を含む培地で培養した結果、ABCG2 の遺伝子およびタンパク質の発現が有意に増加した。

3. FBE を培地とした乳酸菌培養によって生産された GABA が皮膚細胞に与える影響

FBE を培地とし、乳酸菌を培養することによって生産された GABA 0.1-10 μg/mL を含む培地で正常ヒト真皮線維芽細胞 (NHDF)を 24 時間培養した。その結果、1-10 μg/mL の GABA は I 型コラーゲン（COL1A1）およびエラスチン関連遺伝子の発現を有意に増加させ、コラーゲン分解酵素 MMP-1 の遺伝子の発現を有意に減少させた。さらに 10 μg/mL の GABA を含む培地で 7 日間培養し免疫蛍光染色を行った結果、エラスチンタンパク質の発現が増加した。つまり、GABA は皮膚細胞によるコラーゲンおよびエラスチンの産生を促進することによって、肌の弾力を維持することが判明した。

4. FBE を培地とした乳酸菌培養によって生産された GABA が筋芽細胞に与える影響

GABA10–100 μg/mL を含む培地で筋芽細胞（C2C12 細胞）を培養し、筋肉量制御関連因子に与える影響を検討した。細胞数および mRNA 測定用細胞は 4 日間、タンパク測定用細胞は 5 日間培養した。myogenic determination gene number 1（MyoD）は筋管細胞への分化を促進する因子である。peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha （PGC-1α）はミトコンドリアのエネルギー産生に関わる因子である。myostain は筋肉量を負に調節する因子である。細胞実験の結果、100 μg/m 以上の GABA は C2C12 細胞の増殖を有意に増加させた。また、10 μg/m 以上の GABA は MyoD と PGC-1α の遺伝子およびタンパク質の発現を有意に増加させた。さらに 10 μg/m 以上の GABA は myostatin の遺伝子およびタンパク質の発現を有意に減少させた。つまり、GABA は筋肉細胞に直接的に作用し、筋肉量を維持することが判明した。

以上の知見を総合し、FBE は pEPYP および pEP を含有し、それぞれ抗ロコモおよび尿酸値低減効果を有することを明らかにした。また、GABA が有する肌弾力および筋力維持効果の作用機序を解明することができた。