



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

米糠タンパク質のコレステロール代謝改善作用に関する研究

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2018-08-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: WANG JI LI TE メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/56219

氏 名 (本 国 籍)	WANG JI LI TE (中華人民共和国)
学 位 の 種 類	博士 (農学)
学 位 記 番 号	農博甲第671号
学 位 授 与 年 月 日	平成29年3月13日
研 究 科 及 び 専 攻	連合農学研究科 生物資源科学専攻
研究指導を受けた大学	岐阜大学
学 位 論 文 題 目	米糠タンパク質のコレステロール代謝改善作用に関する研究
審 査 委 員 会	主査 岐阜大学 教授 早川 享 志 副査 岐阜大学 教授 長岡 利 副査 静岡大学 教授 河合 真 吾 副査 岐阜大学 准教授 島田 昌 也

論 文 の 内 容 の 要 旨

高コレステロール (CHOL) 血症は心臓血管疾患の重要な危険因子の一つであり、食餌調節による予防または改善作用が非常に重要であると考えられている。近年では食餌タンパク質の CHOL 血症低下作用が盛んに行われ、動物性タンパク質より植物性タンパク質の血清 CHOL 低下作用が優れることが報告されている。米糠は、玄米から精白米を作る際の副産物で、果皮、種皮、糊粉層及び胚芽部分及びデンプン性胚乳の外層が含まれており、10-16%の高い栄養性タンパク質を含んでいる。米糠タンパク質 (RBP) の低アレルギー性および抗癌性が報告された。しかし、RBP の CHOL 代謝に対する影響についての報告は少ない。Elisa R らは高 CHOL 血症ラットにおいて、米糠の水溶性酵素抽出物である RBEE (タンパク質 38.1%) が血清 CHOL レベルを有意に低下することを報告した。しかし、RBEE にタンパク質以外にも γ -オリザノールなどの成分が含まれているため、RBP が血清 CHOL を減少させるかどうかについて、明確な証拠はない。Zhang らは膵臓ペプチダーゼトリプシンによる RBP の加水分解物が *in vivo* ではなく、*in vitro* で CHOL ミセル溶解性を阻害することを示した。そこで、本研究では、*in vivo* 及び *in vitro* 実験により RBP の CHOL 代謝改善作用を明らかにすることと、胆汁酸結合能や CHOL ミセル溶解性のような *in vitro* 試験における評価を指標に活性画分を液体クロマトグラフィーなどにより分離・精製し、活性タンパク質を同定することを目的とした。

まず、RBP の *in vivo* 及び *in vitro* における CHOL 代謝に対する影響を評価した。Wistar 系雄ラット (5 週齢) に RBP を 5%または、10%添加した高 CHOL 食を与え、21 日間または、10 日間飼育後、血清脂質、肝臓脂質と糞中ステロイド排出量を定量した。また、RBP を [14 C]-CHOL を含むミセル溶液に添加し、*in vitro* での CHOL ミセル溶解性に対する影響、 [14 C]-タウロコール酸を含むタウロコール酸溶液に添加し、*in vitro* での胆汁酸結合能を評価した。その結果、5%添加の RBP では対照群と比較して、血清総 CHOL、肝臓 CHOL が有意に低下し、10%添加の RBP では

糞中の胆汁酸及び CHOL 排出量が有意に増加することを明らかにした。また、*in vitro* 試験では CHOL ミセル溶解性が有意に低下し、胆汁酸とも結合能を持つことを明らかにした。

次に、RBP から胆汁酸結合タンパク質を分離・精製・同定した。0.02% NaN₃を含む 10mM Tris-HCl (pH8.0) に溶解させた 5mg/ml RBP を胆汁酸結合カラムにアプライし、アフィニティークロマトグラフィーを行い、カラムに特異的に結合したタンパク質を溶出した。また、SDS-PAGE を行い、MALDI-TOF/MS 分析した。その結果、画分 No.11、No.12 と No.13 に胆汁酸結合タンパク質が得られ、Hypothetical protein OsJ_13801(54.5KDa) (NCBI accession no. EAZ29742)と同定した。

次に、RBP をゲルろ過クロマトグラフィーまたは、逆相クロマトグラフィーで分画し、*in vitro* における CHOL ミセル溶解性を指標に、活性タンパク質を特定した。RBP を 10mM Tris-HCl (pH8.0)に溶解させ、遠心分離 (25,000×g、4℃、20 分) して上清を集め、HiLoad 26/60 Superdex 200 pg カラムにアプライして、ゲルろ過クロマトグラフィーを行った。分子量で分画されたピークを RBPF1~RBPF6 に分けて、それぞれ回収し、脱塩して凍結乾燥したものをサンプルとし、[¹⁴C]-CHOL を含むミセル溶液に添加し、CHOL ミセル溶解性に対する影響を評価した。その結果、RBPF3 (47.6%) が RBP の上清 (49.7%) と同様で、RBPF1 (68.0%)、RBPF2 (73.5%)、RBPF4 (75.3%) または、RBPF5 (75.6%) と比較して CHOL ミセル溶解性を有意に低下させた。これらの結果は、CHOL ミセル溶解性の阻害作用に関連する RBP の上清の活性タンパク質が他の画分よりも RBPF3 に濃縮されていることを示している。

RBP から精製した RBPF3 画分を 0.065%トリフルオロ酢酸 (TFA) が含まれる 2%アセトニトリルに溶解させ (10mg/ml)、SOURCE 5RPC ST 4.6/150 カラムを用い、0.050% TFA を含む 80%アセトニトリル溶液でグラジエントをかけた。現れたピークを RBPF3A、RBPF3B と RBPF3C 画分に分けて回収し、凍結乾燥したものをサンプルとし、[¹⁴C]-CHOL を含むミセル溶液に添加し、CHOL ミセル溶解性に対する影響を評価した。その結果、RBPF3A (79.9%) または、RBPF3B (81.9%) と比較して RBPF3C (10.1%) は CHOL 溶解性を有意に低下させた。

また、RBPF3C の CHOL ミセル溶解性の阻害活性に関連する活性タンパク質を MALDI-TOF/MS 分析で同定した結果、分子量が 11.3KDa の non-specific lipid-transfer protein 1 (LTP1) (NCBI accession No.A2ZHF1) と分子量が 22.7KDa の lectin (NCBI accession No.Q01MB6) が含まれることを明らかにした。

以上の結果により、RBP は食餌性高 CHOL 血症の動物において、糞中のステロイド排出量を増加させることで血清 CHOL が低下すること、また、*in vitro* において、胆汁酸と結合して CHOL ミセル溶解性を低下させることを明らかにした。私は初めて RBP 由来の新規胆汁酸結合タンパク質として Hypothetical protein OsJ_13801、新規 CHOL ミセル溶解性阻害性タンパク質として non-specific lipid-transfer protein 1 (LTP1) 及び lectin を同定し、RBP の CHOL 代謝改善低下作用機構に関与する可能性があることを明らかにした。

審査結果の要旨

高脂血症、特に高コレステロール (CHOL) 血症は心臓血管疾患の重要な危険因子の一つであり、食餌調節による予防または改善作用が非常に重要であると考えられている。また、近年では食餌タンパク質の CHOL 血症低下作用が盛んに行われ、動物性タンパク質より植物性タンパク質の血清 CHOL 低下作用が優れることが報告されている。

米糠は、玄米から精白米を作る際の副産物で、果皮、種皮、糊粉層及び胚芽部分及びデンプン性胚乳の外層が含まれており、10-16%の高い栄養性タンパク質を含んでいる。米糠タンパク質 (RBP) の低アレルギー性および抗癌性が報告された。しかし、RBP の CHOL 代謝に対する影響についての報告は少ない。Elisa R らは高 CHOL 血症ラットにおいて、米糠の水溶性酵素抽出物である RBEE (タンパク質 38.1%) が血清 CHOL レベルを有意に低下することを報告した。しかし、RBEE にタンパク質以外にも γ -オリザノールなどの成分で含まれているため、RBP が血清 CHOL を減少させるかどうかについて、明確な証拠はない。Zhang らは膵臓ペプチダーゼトリプシンによる RBP の加水分解物が *in vivo* ではなく、*in vitro* で CHOL ミセル溶解性を阻害することを示した。そこで、本研究では、*in vivo* 及び *in vitro* 実験により RBP の CHOL 代謝改善作用を明らかにすることと、胆汁酸結合能や CHOL ミセル溶解性のような *in vitro* 試験における評価を指標に活性画分を液体クロマトグラフィーなどにより分離・精製し、活性タンパク質を同定することを目的とした。

(1) RBP の *in vivo* における CHOL 代謝改善作用及び *in vitro* における CHOL ミセル溶解性、胆汁酸結合性に対する影響

Wistar 系雄ラット (5 週齢) に RBP を 5% または、10% 添加した高 CHOL 食を与え、21 日間または、10 日間飼育後、血清脂質、肝臓脂質と糞中ステロイド排出量を定量した。また、RBP を [14 C]-CHOL を含むミセル溶液に添加し、*in vitro* での CHOL ミセル溶解性に対する影響、[14 C]-タウロコール酸を含むタウロコール酸溶液に添加し、*in vitro* での胆汁酸結合能を評価した。その結果、5% 添加の RBP では対照群と比較して、血清総 CHOL、肝臓 CHOL が有意に低下し、10% 添加の RBP では糞中の胆汁酸及び CHOL 排出量が有意に増加することを明らかにした。また、*in vitro* 試験では CHOL ミセル溶解性が有意に低下し、胆汁酸とも結合能を持つことを明らかにした。

(2) RBP の胆汁酸結合タンパク質の分離・精製・同定

0.02% NaN_3 を含む 10mM Tris-HCl (pH8.0) に溶解させた 5mg/ml RBP を胆汁酸結合カラムにアプライし、アフィニティークロマトグラフィーを行い、カラムに特異的に結合したタンパク質を溶出した。また、SDS-PAGE を行い、MALDI-TOF/MS 分析した。その結果、画分 No.11、No.12 と No.13 に胆汁酸結合タンパク質が得られ、Hypothetical protein OsJ_13801(54.5KDa) (NCBI accession no. EAZ29742) と同定した。

(3) RBP のゲルろ過クロマトグラフィー及び *in vitro* における CHOL ミセル溶解性に対する影響

RBP を 10mM Tris-HCl (pH8.0) に溶解させ、遠心分離 (25,000 \times g、4 $^{\circ}$ C、20 分) して上清を集め、HiLoad 26/60 Superdex 200 pg カラムにアプライして、ゲルろ過クロマトグラフィーを行った。分子量で分画されたピークを RBPF1~RBPF6 に分けて、それぞれ回収し、脱塩して凍結乾燥したものをサンプルとし、[14 C]-CHOL を含むミセル溶液に添加し、CHOL ミセル溶解性に対する影響を評価した。その結果、RBPF3 (47.6%) が RBP の上清 (49.7%) と同様で、RBPF1 (68.0%)、RBPF2 (73.5%)、RBPF4 (75.3%) または、RBPF5 (75.6%) と比較して CHOL ミセル溶解性を有意に低下させた。これらの結果は、CHOL ミセル溶解性の阻害作用に関連する RBP の上清の活性タンパク質が他の画分よりも RBPF3 に濃縮されていることを示している。

(4) RBPF3 の逆相クロマトグラフィー及び *in vitro* における CHOL ミセル溶解性に対する影響

上記の(3)で精製した RBPF3 画分を逆相クロマトグラフィーで分画し、活性画分を探索・特定することを目的とした。RBPF3 画分を 0.065% トリフルオロ酢酸(TFA)が含まれる 2% アセトニトリルに溶解させ (10mg/ml)、SOURCE 5RPC ST 4.6/150 カラムを用い、0.050% TFA を含む 80% アセトニトリル溶液でグラジエントをかけた。現れたピークを RBPF3A、RBPF3B と RBPF3C 画分に分けて回収し、凍結乾燥したものをサンプルとし、[14 C]-CHOL を含むミセル溶液に添加し、CHOL ミセル溶解性に対する影響を評価した。

その結果、RBPF3A (79.9%) または、RBPF3B (81.9%) と比較して RBPF3C (10.1%) は CHOL 溶解性を有意に低下させた。

また、RBPF3C の CHOL ミセル溶解性の阻害活性に関連する活性タンパク質を MALDI-TOF/MS 分析で同定した結果、分子量が 11.3KDa の non-specific lipid-transfer protein 1 (LTP1) (NCBI accession No.A2ZHF1) と分子量が 22.7KDa の lectin (NCBI accession No.Q01MB6) が含まれることを明らかにした。

以上の結果により、RBP は食餌性高 CHOL 血症の動物において、糞中のステロイド排出量を増加させることで血清 CHOL が低下すること、また、*in vitro* において、胆汁酸と結合して CHOL ミセル溶解性を低下させることを明らかにした。私は初めて RBP 由来の新規胆汁酸結合タンパク質として Hypothetical protein OsJ_13801、新規 CHOL ミセル溶解性阻害性タンパク質として non-specific lipid-transfer protein 1(LTP1) 及び lectin を同定し、RBP の CHOL 代謝改善低下作用機構に関与する可能性があることを明らかにした。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合農学研究科の学位論文として十分価値あるものと認めた。

【学位論文の基礎となる学術論文】

1. 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.* 2014;79:456-461
2. Wang J, Shimada M, Nagaoka S. Identification of the active protein in rice bran protein having an inhibitory activity of cholesterol micellar solubility. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* “in press” (2017)