

米糠乳酸発酵抽出物の高脂肪食負荷ラットにおける脂質異常改善作用

大友 理宣^a, 高嶋 亜希子^a, 菊池 継夫^a,
高橋 純一郎^b, 戸枝 一喜^c, 畠 恵司^{c*}

^a 秋田銘醸株式会社, ^b 株式会社スカイライト・バイオテック, ^c 秋田県総合食品研究センター

Effects of Rice Bran Fermented Extract on Lipid Metabolism in High-Fat Diet Fed Rats

Masanobu Ohtomo^a, Akiko Takashima^a, Tsugio Kikuchi^a,
Jyunichiro Takahashi^b, Kazuki Toeda^c and Keishi Hata^{c*}

^a Akitameijou Co., Ltd., 4-23 Daikumachi, Yuzawa, Akita 012-0814, Japan,

^b Skylight Biotech Inc., 100-4 Sunada, Iijima, Akita 010-0911, Japan,

^c Akita Research Institute for Food & Brewing (ARIF), 4-26 Sanuki, Arayamachi, Akita 010-1623, Japan

(Received August 2, 2010)

We previously developed the fermented extract of rice bran (RBEF) with *Lactobacillus brevis* IFO12005. RBEF is rich in γ -amino butyric acid (GABA) from L-glutamic acid produced by *L. brevis*. In the present study, we demonstrated that RBEF reduces the accumulations of adipose tissues and normalizes the serum triglycerides and cholesterol level in high-fat diet fed rats. Furthermore, RBEF reduced the lipid synthesis and secretion from HepG2 human hepatoma cells, by attenuation of the expressions of lipogenic and cholesterologenic enzymes in the cells.

Keywords: rice bran, *lactobacillus brevis*, antihyperlipidemic activity, triglyceride, hepatoma cell

1. 緒言

食品産業から排出される米糠は、我が国の主な農産廃棄物のひとつで、その有効利用は重要な問題である。米糠は、清酒の製造工程における精米かすとしても排出され、玄米の外層側から30% (w/w) の部分の米糠だけでも、その量は全国で年間9万トンにも達する。さらに、我々が普段食している白米の精米において排出される米糠を含めると莫大な量と推測される。米糠には良質な油脂、タンパク質、ビタミン、食物繊維などの機能性成分が豊富に含まれているが、その一部が家畜飼料、堆肥、米糠油脂などに利用されるにとどまっている。前報において、我々は米糠の有効利用を目的に、乳酸菌による発酵工程を経た γ -アミノ酪酸 (γ -amino butyric acid, GABA) 高含有米糠乳酸発酵素材の開発に成功し、種々の食品に活用している¹⁾。

一方、食の欧米化ならびに過食による脂質異常症 (高中

性脂肪血症ならびに高コレステロール血症) 患者の急激な増加は、それに伴う種々の合併疾患を含め、社会問題にまで発展している。そこで、本研究では、米糠乳酸発酵素材の更なる用途開発を目的に、米糠発酵素材に含まれる脂質代謝正常化作用について検討した。

2. 材料および方法

2.1 米糠乳酸発酵抽出物の調製

米糠乳酸発酵液は既報¹⁾に従い調製し、NaOH で pH7.0 に調整したのちに、凍結乾燥を行い、本研究で用いた米糠乳酸発酵抽出物 (rice bran fermented extract; RBEF, Table 1) とした。なお、RBEF はアミノ酸分析結果より¹⁾、100 g 中 9.12 g の GABA を含有する。

2.2 ラット高脂肪食負荷試験

本研究全ての事柄について、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛軽減に関する基準」(環境省)および「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」(日本学会議)を遵守したうえで行った。

Sprague-Dawley ラット (SD ラット, 6 週齢) に, 高脂肪食 (日本クレア HF-32) を給与し 2 週間予備飼育した. 本試験として, 高脂肪食のみと RBE を 2.0% (W/W) 混合した高脂肪食 (Table 2) を 3 週間給与した. 3 週間後に体重測定後に解剖し, 肝臓重量, 腸間膜周囲脂肪, 精巣周囲脂肪重量を測定した. 同時に採取した血液を遠心分離後, 血清中 中性脂肪値, コレステロール値, 糖濃度, アスパラギン酸アミノ基転移酵素値 (Aspartate aminotransferase, AST), アラニンアミノ基転移酵素 (Alanine aminotransferase, ALT), アルブミン値について, ドライケムシステム (フジフィルム株式会社) を用いて測定した.

2.3 HepG2 細胞より分泌されるリポタンパク質の回収

HepG2 ヒト肝臓癌細胞 (1×10^5 個) を 10% 牛胎児血清 (fetal calf serum, FCS) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, 1 ml) に懸濁し 24 穴に播種後, 2 日間前培養を行った. 細胞を PBS で 2 度洗浄後に, 被検試料 0.1% (W/W) 牛血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA) を含む DMEM (300 μ l) に交換し, さらに 4 日間培養した. 細胞培養液は 15,000 \times g, 5 分間遠心分離を行い, リポタンパク質解析に供した.

2.4 リポタンパク質解析

HepG2 細胞培養上清中の 3 種主要クラスリポタンパク質, 超低密度リポタンパク質 (very low density lipoprotein, VLDL), 低密度リポタンパク質 (low density lipoprotein, LDL) および高密度リポタンパク質 (high density lipoprotein, HDL) の分離ならびに定量は既報に従って行った²⁾. 細胞培養上清 (80 μ l) をゲル濾過 HPLC システムで分離し, 中性脂肪の測定には Diacolor Liquid TG-S をコレステロールには Cholesterol Liquid Kit for cholesterol (東洋紡績株式会社) を使用した. 3 種主要クラスリポタンパク質中の TG およびコレステロール濃度は, 標準血清 (協和発酵キリン株式会社) を標準として, スカイライト・バイオテック社独自のコンピュータープログラムを用いて解析した^{3,4)}.

2.5 発現遺伝子解析

HepG2 細胞を (2.5×10^5 個) を 12 穴マイクロプレートに

播種し, 2 日間 10% FCS を含む DEM 培地で前培養後, 1.0% BSA および 750 μ M オレイン酸, RBE (終濃度 1.0 mg/ml) を添加した DMEM に交換し, さらに 2 日間培養を続けた. 総 RNA は Total QuickGene RNA cultured cell kit S (フジフィルム株式会社) を用いて回収し, 鋳型 cDNA 合成は PrimeScript RT reagent Kit (タカラバイオ株式会社) を用いて合成した.

リアルタイム RT-PCR は既報に従って行った²⁾. 目的遺伝子の発現量は, β -アクチン mRNA (forward primer, 5'-CATCCGTAAAGACCTCTATGCCAAC-3'; reverse primer, 5'-ATGGAGCCACCGATCCACA-3') に対する相対発現量で表し, 未処理の区を 100 とした.

2.6 統計処理

すべての測定値は, 平均値 \pm 標準偏差 (SD) で示した. 有意差検定には, 市販のソフトウェア GraphPad Prism 5.0-J (GraphPad Software 社) を用いて, *t*-検定 (Table 3) ならびに Tukey 法の多重比較検定 (Table 4 および Fig. 2) を行い, 有意水準を 5% 以下とした.

3. 結果および考察

3.1 高脂肪食負荷ラットに対する影響

Table 3 に RBE の高脂肪食負荷ラットの各種臓器重量ならびに血液成分値に対する影響をまとめた. RBE を 2.0% まで高脂肪食混合餌の摂取量は変化がなかった. SD ラットに, 3 週間の高脂肪食ならびに RBE 混合高脂肪食を給与した結果, 一日あたりの体重増加が 7.0 g/個体ならびに 7.1 g/個体であり, 有意な差は認められなかった. しかしながら, RBE は高脂肪食給与による肝臓重量, 腸間膜周囲脂肪重量ならびに, 精巣周囲脂肪重量の増加を顕著に抑制した. さらに, 血液成分値を測定した結果, 2.0% RBE 混合した高脂肪食給与区のラットは, 高脂肪食のみを与えた区と比較して, 血中中性脂肪値ならびにコレステロール値に有意な正常化作用が認められた (いずれも $p < 0.05$). しかしながら, RBE はラットの血糖値には影響を与えなかった. さらに, 肝機能マーカーである AST, ALT あるいはアルブミン値は有意な差がなかった. これらの結果より, RBE には, 高脂肪食負荷ラットにおける肝臓や脂肪組織における脂肪蓄積を低減する作用ならびに, 血中脂質値 (中性脂肪およびコレステロール値) を正常化する作用があることが判明した.

Table 1. Composition of RBF E

Composition (g/100 g)	
Moisture	3.4
Carbohydrate	67.5
Crude protein	14.6
Crude lipid	2.0
Ash	14.5

Table 2. Composition and nourishment analysis value for the experimental diet

		HFD	HFD+RBF E
Composition (%)	Milk casein	24.4	24.0
	Albumin powder	5.0	4.9
	Cystein	0.4	0.4
	Beef tallow	15.9	15.5
	Safflower oil	20.0	19.6
	Cellulose powder	5.5	5.4
	Maltodextrin	8.3	8.1
	Lactose	6.9	6.8
	Sucrose	6.8	6.7
	AIN-93 vitamin mixture	1.4	1.3
	AIN-93 G mineral mixture	5.0	4.9
	Choline bitartrate	0.4	0.4
	RBF E	—	2.0
	Nourishment analysis value	Moisture (g/100g)	6.1
Protein (g/100g)		25.4	25.7
Fat (g/100g)		32.7	32.8
Ash (g/100g)		3.6	3.7
Carbohydrate (g/100g)		32.2	33.5
Fiber (g/100g)		5.5	5.6
Energy (kcal/100g)		524.7	532.3

Table 3. Body weight, tissue weight, and serum parameters for SD rats

	HFD	HFD+RBF E
Food intake (g/day)	18.3 ± 1.9	17.0 ± 1.6
Initial body weight (g)	313.4 ± 16.1	311.2 ± 14.6
Body weight gain (g/day)	7.1 ± 1.3	7.0 ± 1.0
Liver weight (g)	17.0 ± 2.5	13.9 ± 0.9 *
Adipose tissue weight (g)		
Mensenteric	7.6 ± 2.7	4.9 ± 0.7 *
Epididymal	11.3 ± 2.8	7.8 ± 0.9 *
Serum triglyceride (mg/dL)	121.2 ± 34.6	71.2 ± 19.9 *
Serum cholesterol (mg/dl)	87.2 ± 8.1	62.6 ± 16.2 *
Serum glucose (mg/dL)	173.2 ± 57.5	165.0 ± 47.6
AST (U/L)	99.0 ± 17.2	81.2 ± 19.0
ALT (U/L)	25.8 ± 8.1	23.0 ± 4.3
Serum albumin (g/L)	3.7 ± 0.3	3.8 ± 0.2

Data represent mean ± SD (n=6, * p<0.05)

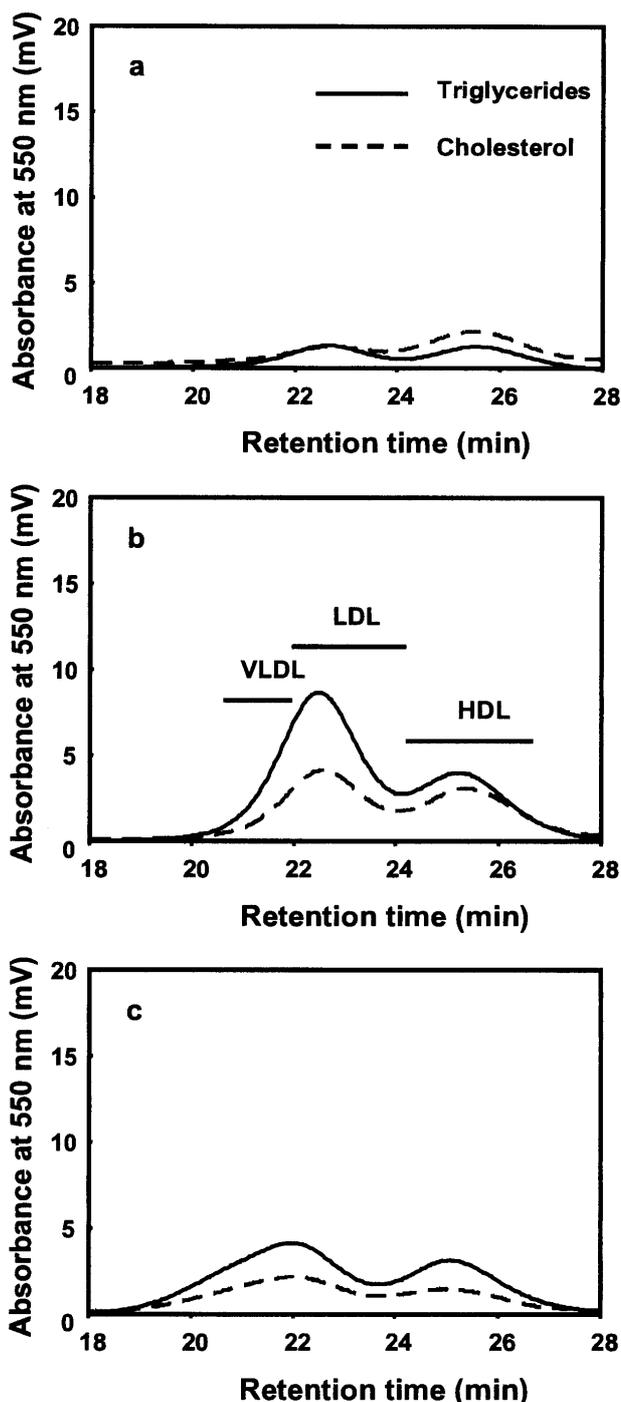


Fig. 1 Effects of RBF L on lipoprotein profiles of HepG2 cells
 Following HepG2 cell precultured in DMEM containing 10% FCS for 2 days, the cells were cultured in serum-free DMEM containing 0.1% BSA without (a), or 0.75 mM sodium oleate (b), or sodium oleate plus 1.0 mg/ml RBF E (c) for 4 days, and the levels of TG and cholesterol in the culture medium were determined. The data are mean ± SD (n=4).

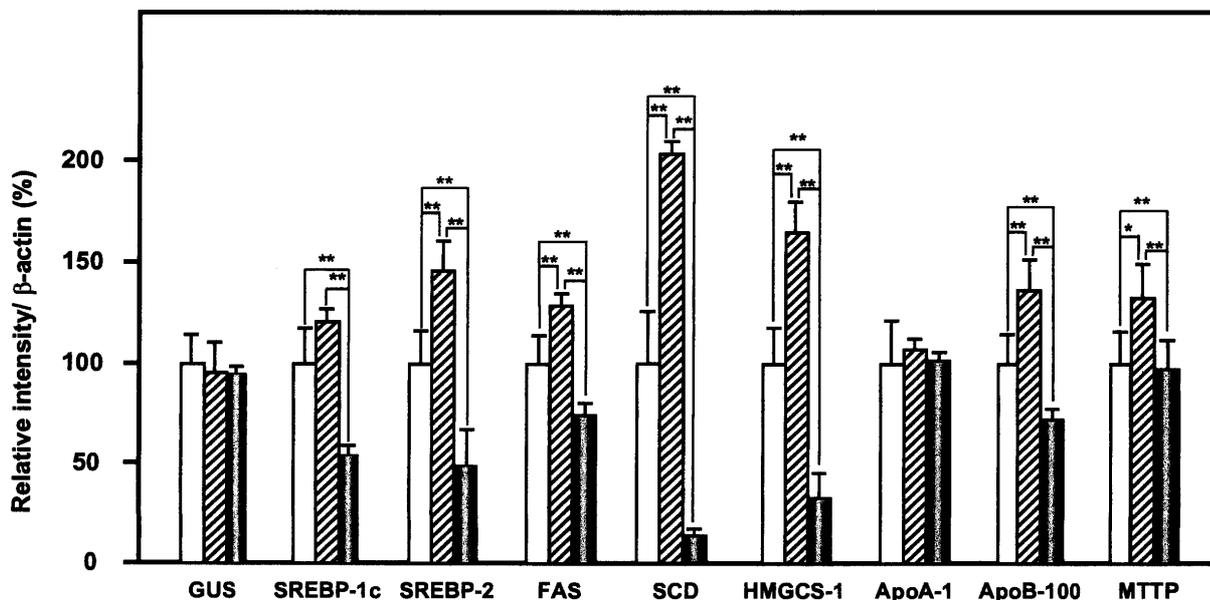
Table 4. Effect of RBF E on levels of TG and cholesterol secretion from HepG2 cells

sodium oleate (mM)	RBF E					Fenofibrate
	0	0.75	0.1 mg/ml 0.75	1.0 mg/ml 0.75	10.0 mg/ml 0.75	500 μ M 0.75
cell number ($\times 10^5$)	2.7 \pm 0.1	2.8 \pm 0.3	2.6 \pm 0.2	2.9 \pm 0.2	2.8 \pm 0.2	2.6 \pm 0.3
triglyceride (μ g/ 10^6 cells)						
total	2.3 \pm 0.4	12.8 \pm 0.3	13.8 \pm 0.3	7.6 \pm 0.3**	1.3 \pm 0.4**	5.1 \pm 0.2**
VLDL	0.2 \pm 0.1	2.0 \pm 0.2	2.1 \pm 0.4	1.5 \pm 0.3*	0.2 \pm 0.1**	1.0 \pm 0**
LDL	1.5 \pm 0.1	7.4 \pm 0.8	8.0 \pm 0.7	3.5 \pm 0.1**	1.0 \pm 0.2**	2.1 \pm 0.3**
HDL	2.7 \pm 0.1	2.8 \pm 0.3	3.7 \pm 0.1	2.6 \pm 0.3	0.1 \pm 0.1**	2.0 \pm 0.1**
cholesterol (μ g/ 10^6 cells)						
total	3.2 \pm 0.4	4.1 \pm 0.4	4.0 \pm 0.4	2.7 \pm 0.1**	0.4 \pm 0**	1.9 \pm 0.4**
VLDL	0.5 \pm 0.3	0.5 \pm 0	0.6 \pm 0.1	0.7 \pm 0.1	0 \pm 0**	0.6 \pm 0.1
LDL	0.6 \pm 0.1	1.5 \pm 0.2	1.5 \pm 0.2	0.7 \pm 0**	0 \pm 0**	0.5 \pm 0.1**
HDL	2.1 \pm 0.5	2.1 \pm 0.2	1.9 \pm 0.3	1.3 \pm 0.1**	0.4 \pm 0**	0.8 \pm 0.2**

Following HepG2 cell precultured DMEM containing 10% FCS for 2 days, the cells were cultured in serum-free DMEM containing 0.1 % BSA with or without sodium oleate, sodium oleate plus RBF E, or sodium oleate plus 500 μ M fenofibrate for 2 days, and the levels of triglycerides and cholesterol in the culture medium were determined. Data represent means \pm SD (n=4, * p <0.05, ** p <0.01).

Table 5. Gene-specific primers used for quantitative real-time RT-PCR

Gene name	Forward	Reverse
GUS	5'-CATTATTCAGAGCGAGTATGGAGCA-3'	5'-TCTTCAGTGAACATCAGAGGTGGA-3'
SREBP-1c	5'-CTATGGAGCAGCCTCAACGTCA-3'	5'-CAGCCAGTGGATCACCACA-3'
SREBP-2	5'-CAGCAGITCACGGACATGGAG-3'	5'-CCGTAGCGACAGTAGCAGGTCA-3'
FAS	5'-GTATGCCCTGGTAGTTGCAGGAG-3'	5'-CGGCACGCAGCTTGTAGTAGA-3'
SCD	5'-TGAACAGTGCTGCCACCTC-3'	5'-CGGCCATGCAATCAATGAAG-3'
HMGCS-1	5'-TGTGTACGTGGATGTGCTCAAAGA-3'	5'-TGTTGCATATGTGTCCACGAA-3'
ApoA-1	5'-TGTGTACGTGGATGTGCTCAAAGA-3'	5'-GTCACGCTGTCCAGTTGTCA-3'
ApoB-100	5'-TCGCCTGCCAAACTGCTTC-3'	5'-CATTGGTGCCTGTGTTCATTTC-3'
MTP	5'-TCTTACTCGGGTCTGGCATTCTA-3'	5'-GCTGCGATTAAGGCTTCCAGTC-3'

**Fig. 2 Effects of RBF E on mRNA expressions of responsible for lipoprotein synthesis in HepG2 cells**

HepG2 cells were incubated without (□), or with 0.75 mM sodium oleate (▨), or sodium oleate plus 1.0 mg/ml RBF E (■) for 4 days, and mRNA expression was analyzed by real-time RT-PCR. Data are expressed relative to untreated control cells and represent means \pm SD (n=4, * p <0.05, ** p <0.01).

3.2 肝臓細胞に対する影響

RBFEの高脂肪食負荷ラットの臓器脂肪蓄積抑制作用ならびに、血中中性脂肪値正常化作用のメカニズム解明のため、ヒト肝臓癌細胞 HepG2 の脂質代謝に対する影響を検討した。まず、種々の濃度の RBFE ならびに 500 μ M fenofibrate を HepG2 細胞に添加し、分泌される主要リポタンパク質中の中性脂肪ならびにコレステロール値に対する影響を調べた (Table 4)。HepG2 細胞は、0.75 mM のオレイン酸ナトリウム負荷により、培養液に分泌される総中性脂肪値が約 5.6 倍、総コレステロール値が約 1.3 倍に増加する。陽性対象として使用した fenofibrate はオレイン酸添加による中性脂肪ならびにコレステロールの分泌量促進を抑制した。これに対して 0.1 mg/ml の添加濃度では、RBFEはオレイン酸付加した HepG2細胞からの中性脂肪ならびにコレステロール分泌量にほとんど影響を与えなかったが、1.0 mg/ml 以上の濃度では、オレイン酸添加にともなう両者の分泌促進を濃度依存的に有意に抑制した (Table 3)。また、1.0 mg/ml の RBFE 添加による HepG2 細胞より分泌される培養液中の中性脂肪ならびにコレステロールプロファイル変化を Fig. 1 に示した。HepG2 細胞はオレイン酸負荷により、特に VLDL/LDL 画分に含まれる中性脂肪濃度が上昇したが (Fig. 1b), 1.0 mg/ml の RBFE 添加により、VLDL/LDL 画分の中性脂肪値の上昇は抑制された (Fig. 1c)。

次に、RBFEによる HepG2 細胞からの 1.0 mg/ml 添加した HepG2 細胞における脂質合成に関与する遺伝子群 (Table 5)の発現量の変化をリアルタイム RT-PCR により解析した (Fig. 2)。Housekeeping 遺伝子である β -glucuronidase 遺伝子 (GUS)発現量は、オレイン酸処理あるいは RBFE 添加に関わらず一定であった。脂肪酸合成系の転写因子である sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c)ならびに中性脂肪合成酵素である fatty acid synthase (FAS)および steroyl-CoA desaturase-1 (SCD)遺伝子の発現は、コントロール区と比較して、オレイン酸負荷区では、各々 1.2 倍、1.2 倍ならびに 2.1 倍に増加した。しかしながら、同時に 1.0 mg/ml の RBFE 添加区では、オレイン酸負荷区と比較して 44.7%, 57.4%および 6.0 %に抑制された (コントロールを対象とした場合は、53.7%ならびに 73.7%, 12.5% の抑制)。さらに、コレステロール合成系の転写因子である SREBP-2 およびコレステロール合成系の酵素である 3-hydroxy- 3-methylglutaryl-CoA synthase-1 (HMGCS-1)遺伝子の発現は、オレイン酸負

荷により約 1.5 倍、1.6 倍にそれぞれ上昇したが、RBFE をオレイン酸と同時に添加した区では、オレイン酸負荷区と比較して、それぞれ 33.1 %と 19.8%まで抑制された (コントロール区の 48.2%ならびに 32.6%)。VLDL/LDL の構造タンパク質であるアポリポタンパク質 (apolipoprotein: apo)B-100 の発現量は、コントロールと比較して 72.0%, オレイン酸負荷区と比較して 52.8%まで抑制された。さらに、リポタンパク質に、中性脂肪を転移させるミクロソーム中性脂肪転移タンパク質 (microsomal triglyceride transfer protein, MTTP)の mRNA レベルはオレイン酸負荷により、1.4 倍まで増加する。しかしながら、同時に RBFE 添加した区では、発現量がコントロール区と同等であった。一方、HDL の構成タンパク質である apoA-1 の発現には、オレイン酸負荷の影響は認められず、また、RBFE の抑制効果も認められなかった。

これまで、米糠の脂質異常症改善作用に関しては幾つか報告がある。高コレステロール症患者に米糠を配合した食事を給与した結果、血中 LDL コレステロールならびに apoB-100 レベルの低下が観察された結果⁵⁾や、2 型糖尿病誘発モデルラットにおいて、米糠油を食餌に混合したところ、血中の HDL コレステロールの増加ならびに肝臓の総コレステロール値の低減など脂質異常に対する正常化が認められた⁶⁾。また、米糠に含まれる成分としては、ビタミン E 群^{7,8)}、phytic acid⁹⁾などが、脂質代謝改善作用を有すること知られている。特に、ビタミン E の一種である tocotorienol は脂肪細胞の分化抑制することで、脂肪蓄積を制御するなど作用機構の一部が解明されている¹⁰⁾。RBFE は、これら米糠由来成分に加えて、乳酸菌発酵過程により高濃度の GABA を含有する素材である。この GABA にも脂質異常改善作用が報告されている¹¹⁾。

現時点では、主たる活性成分の同定には至っていないが、本研究における結果を総括すると、米糠乳酸発酵素材である RBFE は肝臓細胞における脂質合成遺伝子の発現制御により、高脂肪食負荷ラットの血中脂質値を正常化し、最終的には内臓脂肪蓄積を抑制すると推察された。今後は、活性物質の単離・構造解析を進めると共に、高脂肪食負荷動物の肝臓における発現遺伝子解析を行い、ヒト肝臓細胞に対する作用との相関関係を調べていきたい。

4. 謝辞

本研究の一部は経済産業省「地域資源活用型研究開発事

業」(平成 19~20 年度)の助成により行われたものである。

5. 引用文献

- 1) Ohtomo M., Watanabe S., Toeda K., *Seibutsu-kogaku*, **84**, 479-483 (2006).
- 2) Itoh M., Abe Y., Iwama Y., Kimura F., Shoji M. Takahashi J., Toshima G., Sasaki H., Hata K., *Biotech. Lett.*, **31**, 953-957 (2009).
- 3) Okazaki M., Usui S., Ishigami M., Sakai N., Nakamura T., Matsuzawa Y., Yamashita S., *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.*, **25**, 578-584 (2005).
- 4) Usui S., Hara Y., Hosaki S., Okazaki M., *J. Lipid. Res.*, **43**, 805-814 (2002).
- 5) Gerhardt A. L., Gallo N. B., *J. Nutr.*, **128**, 865-869 (1998).
- 6) Chou T. W., Ma C. Y., Cheng H. H., Chen Y. Y., Lai M. H., *J. Clin. Biochem. Nutr.*, **45**, 29-36 (2009).
- 7) Jack Yang N. Y., Desai I. D., *J. Nutr.*, **107**, 1418-1426 (1997).
- 8) Qureshi A. A., Bradlow B.A., Brace L., Manganello J., Peterson D. M., Pearce B. C, Wright J.J., Gapor A., Elson C.E., *Lipids*. **30**, 1171-1177 (1995).
- 9) Onomi S., Okazaki Y., Katayama T., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68**, 1379-1381 (2004).
- 10) Uto-Kondo H., Ohmori R., Kiyose C., Kishimoto Y., Saito H., Igarashi O., Kondo K., *J. Nutr.*, **139**, 51-57 (2009).
- 11) Horie K., Higashiguchi N., Yokogoshi H., *FOOD Style* **21**, 8, 64-68 (2009).