

称号及び氏名	博士（応用生命科学）	中屋 慎
学位授与の日付	平成26年3月31日	
論文名	Hypolipidemic effects of <i>wx/ae</i> double-mutant rice and its components in model mice (モデルマウスを用いた <i>wx/ae</i> 二重変異体米およびその成分の脂質代謝改善効果に関する研究)	
論文審査委員	主査	北村 進一
	副査	谷森 紳治
	副査	山地 亮一

## 論文要旨

### 緒論

近年，生活習慣病予防の観点から，多くの「健康食品」「機能性食品」と呼ばれる食品が開発されている．我が国は古来より米を主食とし，また，高度な栽培技術を有しているため，米は原料供給力や消費者の嗜好の普遍性の点で生活習慣病予防のための食品素材として理想的である．

イネ *waxy/amylose-extender* (*wx/ae*) 二重変異体 (AMF18) は，化学変異原処理により突然変異を誘発して得た *waxy* (*wx*) 遺伝子変異体 (EM21) と *amylose-extender* (*ae*) 遺伝子変異体 (EM16) とを交配したものである．この *wx/ae* 二重変異体の澱粉は澱粉生合成に係る酵素群のうち，granule-bound starch synthase I (GBSS I) と starch branching enzyme IIb (SBE IIb) の活性が失われているため，アミロースを含まずアミロペクチンの構造が非変異体 (wild type, WT) と異なっている．これまでの研究から，澱粉を構成するアミロペクチンの側鎖はWTに比べて長鎖の割合が高いこと，澱粉の結晶構造は米に典型的なA型ではなくB型であること，澱粉の糊化温度がWTに比べて高いこと，さらに，この澱粉は食後血糖値の上昇を抑制することが明らかとなっている．また，*wx/ae* 玄米は脂質含量がWTの約2倍と高いことから， $\gamma$ -オリザノールなどの脂溶性機能性物質の含量も高い事が予想される．これらのことから，*wx/ae*米あるいは*wx/ae*米に含有される

機能性成分の摂取による脂質代謝改善効果が期待できる。本研究では、*wx/ae*米および *wx/ae*米に含まれる機能性成分について、2型糖尿病モデルNSY/Hosマウスおよび脂質異常症モデルBALB/c.KOR/Stm Slc-Apoe<sup>shl</sup> (BALB/c.KOR-Apoe<sup>shl</sup>) マウスを用いて脂質代謝改善効果を調べた。

## 第1章 NSY/Hos マウスの血中脂質に対する *wx/ae* 二重変異体玄米の効果

*wx/ae* 玄米摂取により得られる脂質・糖質代謝改善効果を2型糖尿病モデルNSY/Hosマウスを用いて調べた。NSY/Hosマウス(8週齢,雄)に *wx/ae* 玄米粉を25.0%含む高脂肪食を10週間自由摂取させた。対照群にはコシヒカリ玄米粉を25.0%含む高脂肪食を与えた。玄米に含まれるレジスタントスターチ(RS)量はコシヒカリでは2%以下、*wx/ae*では27.8%であった。γ-オリザノール(Ory)量はコシヒカリでは268 μg/g、*wx/ae*では514 μg/gであった。

投与期間を通して全てのマウスに下痢などの症状はなく健康であり、摂食量に有意な差は見られなかった。*wx/ae* 玄米投与群では対照群に比べ、血液中の総コレステロール量、non-HDLコレステロール量、トリアシルグリセロール(TAG)量および遊離脂肪酸量が有意に低下した。さらに空腹時血糖値および尿糖値についても *wx/ae* 投与群ではコシヒカリ投与群に比べ低下した。

以上のように、NSY/Hosマウスにおいて、*wx/ae* 玄米投与群では対照群に比べ血中脂質量が低下し、空腹時血糖値や尿糖値の上昇が抑制されており、脂質・糖質代謝の改善効果が認められた。

## 第2章 BALB/c.KOR-Apoe<sup>shl</sup> マウスの血中脂質および肝臓脂質に対する *wx/ae* 澱粉およびγ-オリザノールの併用効果

第1章で示したように、NSY/Hosマウスを用いた実験において、*wx/ae* 玄米投与群ではコシヒカリ玄米投与群に比べ脂質・糖質代謝の改善効果が認められた。*wx/ae* 玄米はコシヒカリ玄米に比べレジスタントスターチ量やγ-オリザノール量が高いことから、これらの2成分が脂質・糖質代謝の改善効果の主因であると仮説をたて検証を行った。RSおよびOryの脂質代謝改善効果を明らかにするため、脂質異常症モデルBALB/c.KOR-Apoe<sup>shl</sup>マウスを用いてRSおよびOryが血中および肝臓の脂質量に与える影響を調べた。BALB/c.KOR-Apoe<sup>shl</sup>マウス(8週齢,雄)に脱脂した *wx/ae* 澱粉およびγ-オリザノールをそれぞれ含む高シヨ糖・高脂肪食を3週間自由摂取させた。対照群(C群)には *wx/ae* 米の非変異体である粳米(品種:金南風)の澱粉を含む餌を、γ-オリザノール投与群(O群)には粳米澱粉とγ-オリザノールを含む餌を、レジスタントスターチ投与群(RS群)には *wx/ae* 澱粉を含む餌を、レジスタントスターチおよびγ-オリザノール併用投与群(RSO群)には *wx/ae* 澱粉とγ-オリザノールを含む餌をそれぞれ与えた。投与した澱粉およびγ-オリザノールは *wx/ae* 白米を15%含む餌に相当

する量である。なお、澱粉の RS 含量は非変異体では 2%以下、*wx/ae* では 53%であり、 $\gamma$ -オリザノールは *wx/ae* 玄米から抽出精製したものを使用した。

投与期間を通して全てのマウスは健康であり、体重、摂食量に有意な差は認められなかった。RSO 群は C 群と比べ、血中の総コレステロール量、non-HDL コレステロール量および遊離脂肪酸量が低下したが、O 群や RS 群は C 群との差が認められなかった。RS や Ory の単独投与ではなく、その両方を投与した場合には、NSY/Hos マウスに *wx/ae* 玄米粉を投与した実験の結果と同様の傾向がみられたことから、*wx/ae* 玄米の摂取により得られる脂質代謝改善効果はこの 2 成分が共に寄与していると考えられる。

肝臓に含まれる TAG 量について、C 群では  $63.6 \pm 21.5$  mg/g であったのに対し、O 群では  $51.4 \pm 11.5$  mg/g、RS 群では  $37.4 \pm 10.8$  mg/g、RSO 群では  $27.8 \pm 9.4$  mg/g であり、C 群と比較して RS 群および RSO 群で有意に低下した。また、血中 TAG 量について、C 群と比較して RSO 群で有意に低下した。一方、血糖値に有意な差は認められなかった。肝臓の組織切片を観察したところ、RS 群および RSO 群は他群に比べ脂肪滴が少なかった。また、全ての群において組織の線維化や炎症は観察されなかった。これらのことから、*wx/ae* 澱粉は肝臓における TAG の蓄積を強く抑制し、 $\gamma$ -オリザノールと併用して摂取した場合、抑制効果がさらに増すことが分かった。

肝臓における脂質代謝関連遺伝子の発現に対する RS や Ory の摂取による影響を RT-PCR 法により調べたところ、C 群に比べ O 群、RS 群、RSO 群で *sterol regulatory element-binding protein-1* の発現量が有意に低下しており、*sterol regulatory element-binding protein-2*、*3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase* および *low-density lipoprotein receptor* の発現量がわずかに低下した。血中および肝臓における脂質含量の高い C 群に比べ、O 群、RS 群および RSO 群では遺伝子発現レベルにおいても病態の進行が緩やかであると考えられる。

糞量および糞中脂質量を調べたところ、RS 群および RSO 群では一日当りの糞量が約 1.5 倍増加しており、糞中 TAG 量も増加した。一方、コレステロールの排出量に差は認められなかった。また、盲腸内容物量、および、短鎖脂肪酸である酢酸、プロピオン酸、*n*-酪酸の含量を調べたところ、C 群に比べ RS 群および RSO 群で増加していた。糞量や糞中 TAG 量の増加、盲腸内短鎖脂肪酸量の増加といったこれらの効果は RS としてアミロース高含有澱粉を用いた過去の報告と一致する。*wx/ae* 澱粉はアミロースを含まないことから、レジスタントスターチには必ずしもアミロースが必要ではないことが示唆される。

以上のように、BALB/c.KOR-*Apoe*<sup>shl</sup> マウスにおいて、食餌に含まれる *wx/ae* 澱粉は肝臓における TAG の蓄積を抑制し、*wx/ae* 澱粉に少量の  $\gamma$ -オリザノールを併用することにより、その抑制効果がさらに高まることが分かった。

### 第3章 *wx/ae* 澱粉および $\gamma$ -オリザノールの BALB/c.KOR-*Apoe<sup>shl</sup>* マウス肝臓におけるトリアシルグリセロール蓄積低減効果の解析

第2章で示したように、*wx/ae* 澱粉のみ、あるいは *wx/ae* 澱粉および $\gamma$ -オリザノールを摂取した BALB/c.KOR-*Apoe<sup>shl</sup>* マウスでは肝臓における TAG 蓄積量が有意に低下した。そこで、TAG の構成脂肪酸に着目し、RS および Ory の摂取が肝臓における TAG 分子の脂肪酸組成に与える影響を調べた。

まず、肝臓に含まれる TAG 分子種を二次元 HPLC 法により 61 のピークに分離した。各ピークの面積割合を算出し、C 群と比べて O 群、RS 群および RSO 群において変動の大きいピークを抽出した。次いで、抽出したピークについて、分取を行い GC-MS 法により脂肪酸組成を決定した。

全ての群において、最も多く含まれる TAG 分子種の脂肪酸組成はパルミチン酸-オレイン酸-オレイン酸 (POO) であり、次いでパルミチン酸-オレイン酸-リノール酸 (POL) であった。特に POL は C 群に比べて RS 群で増加した。一方、OOO の組成をもつ TAG 分子種は C 群に比べて RS 群で減少した。

以上のように、*wx/ae* 澱粉および $\gamma$ -オリザノールを摂取した BALB/c.KOR-*Apoe<sup>shl</sup>* マウスの肝臓における TAG は量的変化だけでなく、質的变化も同時に起こっていることを見出した。TAG 分子種の脂肪酸組成と生体内における機能の関係は未だ明らかでないが、これらの結果は TAG 分子種の存在比が脂質代謝の改善に重要であることを示唆する。

#### 総括

本研究において、*wx/ae* 米は摂取により脂質代謝の改善効果を示すことが明らかとなった。特に、*wx/ae* 澱粉は血中および肝臓における TAG 蓄積を抑制し、さらに、少量の $\gamma$ -オリザノールと併用することにより、抑制効果が高まることが明らかとなった。また、*wx/ae* 澱粉および $\gamma$ -オリザノールは肝臓における TAG 量を低下させるだけでなく、TAG 分子種の割合をも変化させることを見出した。ヒトにおける効果を検証する必要があるが、*wx/ae* 米は脂質代謝の改善が期待できるため、生活習慣病を予防する食品素材として有用であると考えられる。

## 審査結果の要旨

近年、生活習慣病の罹患率が世界的に上昇しており、生活習慣病を予防する食品素材が求められている。我が国は古来より米を主食とし、高度な栽培技術を有しているため、米を生活習慣病予防のための食品素材としては用いることは理想的である。

イネ *waxy/amylose-extender* (*wx/ae*) 二重変異体は、澱粉合成に係る酵素群のうち、**granule-bound starch synthase I**と**starch branching enzyme IIb**の活性が失われているため、澱粉の構造が元品種（金南風、以下WTと略）と異なっている。これまでの研究から、*wx/ae*澱粉のアミロペクチン側鎖はWTに比べて長鎖の割合が高く、アミラーゼに対して難消化性を示すことが明らかとなっている。また、*wx/ae*米は $\gamma$ -オリザノールやビタミンEなどの脂溶性機能性物質の含量も高いことが示されてきた。学位申請者は、*wx/ae*米および*wx/ae*米に含まれる難消化性澱粉と $\gamma$ -オリザノールに着目して、2型糖尿病モデルNSY/Hosマウスおよび脂質異常症モデルBALB/c.KOR/Stm Slc-Apo<sup>eshl</sup> (BALB/c.KOR-Apo<sup>eshl</sup>) マウスを用いて脂質代謝改善効果に関する研究を行っている。

第1章では *wx/ae* 玄米摂取により得られる脂質・糖質代謝改善効果を 2型糖尿病モデルNSY/Hos マウスを用いて調べた結果を示している。NSY/Hos マウス (8週齢, 雄) に *wx/ae* 玄米粉を 25.0%含む高脂肪食を 10 週間自由摂取させた。対照群にはコシヒカリ玄米粉を 25.0%含む高脂肪食を与えた。玄米に含まれる難消化性澱粉量はコシヒカリでは 2%以下、*wx/ae* では 27.8%であった。 $\gamma$ -オリザノール量はコシヒカリでは 268  $\mu\text{g/g}$ 、*wx/ae* では 514  $\mu\text{g/g}$  であった。

両群間で摂食量に有意な差は見られなかった。一方、血液中の総コレステロール量、non-HDL コレステロール量、トリアシルグリセロール (TAG) 量、遊離脂肪酸量および血糖値が *wx/ae* 玄米投与群では対照群に比べ、有意に低下し、脂質・糖質代謝の改善効果が認められた。

第2章は *wx/ae* 玄米の特徴的な成分である難消化性澱粉と $\gamma$ -オリザノールに着目して、脂質異常症モデル BALB/c.KOR-Apo<sup>eshl</sup>マウスを用いて動物実験を行っている。マウス (8週齢, 雄) に脱脂した *wx/ae* 澱粉および $\gamma$ -オリザノールをそれぞれ含む高ショ糖・高脂肪食を 3 週間自由摂取させた。さらに併用効果をみるために *wx/ae* 澱粉と $\gamma$ -オリザノールを同時に摂取させた実験を行っている。

血中および肝臓に含まれる TAG 量については、いずれの投与群でも抑制効果が認められたが、難消化性澱粉と $\gamma$ -オリザノールの併用群で顕著な効果が認められた。肝臓の組織切片を観察したところ、難消化性澱粉群および併用群は他群に比べ脂肪滴が少なかった。これらのことから、*wx/ae* 澱粉は肝臓における TAG の蓄積を抑制し、 $\gamma$ -オリザノールと併用した場合、その抑制効果がさらに増すことが分かった。

また、難消化澱粉群および併用群では、糞量や糞中 TAG 量が増加し、盲腸内短鎖脂肪酸量が増加することを見出している。難消化性澱粉は食物繊維と同様な効果を有していると言える。*wx/ae* 澱粉に少量の $\gamma$ -オリザノールを併用することにより、その抑制効果がさら

に高まることが分かった。

**wx/ae** 澱粉や $\gamma$ -オリザノール投与による肝臓における脂質蓄積の抑制効果を明らかにするため、**RT-PCR** 法により、**sterol regulatory element-binding protein-1**, **sterol regulatory element-binding protein-2**, **3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase** および **low-density lipoprotein receptor** などの遺伝子発現量の測定を行い、脂質代謝関連遺伝子の発現レベルからの解析も行っている。

第3章では **TAG** の低減効果のメカニズム解析の端緒を得るために、肝臓の **TAG** の詳細な分析の結果を示している。全ての群において、最も多く含まれる **TAG** 分子種の脂肪酸組成はパルミチン酸-オレイン酸-オレイン酸 (**POO**) であり、次いでパルミチン酸-オレイン酸-リノール酸 (**POL**) であった。特に **POL** はコントロール群に比べて難消化性澱粉群、併用群で増加した。一方、**OOO** の組成をもつ **TAG** 分子種はコントロール群に比べて難消化性澱粉群と併用群で減少した。以上のように、**wx/ae** 澱粉および $\gamma$ -オリザノールを同時に摂取した **BALB/c.KOR-Apoeshl** マウスの肝臓における **TAG** は量的変化だけでなく、質的变化も同時に起こっていることを見出した。

本研究において、**wx/ae** 米は摂取により脂質代謝の改善効果を示すことが明らかとなった。特に、**wx/ae** 澱粉は血中および肝臓における **TAG** 蓄積を抑制し、さらに、少量の $\gamma$ -オリザノールと併用することにより、その抑制効果が高まることが明らかとなった。また、肝臓における脂質蓄積抑制効果は **TAG** 量を低下させるだけでなく、**TAG** 分子種の割合をも変化させることを見出し、抑制効果のメカニズムを解析する端緒となる結果を得た。

以上、ヒトにおける効果を検証する必要があるが、**wx/ae** 米は脂質代謝の改善が期待できる食品素材であること、その効果は **wx/ae** 米が難消化澱粉とオリザノールを多量に含むことによること、また、肝臓に蓄積される **TAG** の抑制効果のメカニズム解析のための基礎的結果を示した点で高く評価できる。よって、本論文の審査ならびに最終試験の結果と併せて、博士（応用生命科学）の学位を授与することを適当と認める。