

発酵大麦エキスの新規機能性探索

仙波和代*・呉向琳*・丸岡生行**
外蘭英樹**・池辺詠美***・米元俊一*

【要 旨】

焼酎製造に伴って排出される「焼酎蒸留粕」は、業界年間で推定80万トンに達しており、現在その有効利用が求められている。そこで今回私達は発酵大麦エキス（麦焼酎蒸留粕）の新規有効利用開発の一環として、メタボローム解析を用いて免疫細胞（樹状細胞：JAWSII細胞）における新規機能性探索を行ったところ、抗酸化作用を有するペントースリン酸経路の亢進を認めた。これまでも抗酸化作用があるとの報告はあったが、現象論にとどまっており、そのメカニズムは解明されていなかった。よって今回の研究結果は、これまでの現象を裏付けるものでもあり、発酵大麦エキスの抗酸化作用における、今後の詳細なメカニズム解明への足掛かりにもなると考えている。

【キーワード】

発酵大麦エキス メタボローム解析 抗酸化作用 ペントースリン酸経路
* 別府大学食物栄養科学部 ** 三和酒類株式会社研究所
*** 大分大学医学部微生物学講座

【はじめに】

焼酎の製造に伴って、蒸留工程後に焼酎蒸留粕が排出される。この焼酎蒸留粕には高濃度の有機物が含まれているため、長年処理は困難とされ海洋投入が行われてきた。しかし1977年、ロンドン条約を背景とする改正海洋汚染防止法の制定により、焼酎粕の海洋投棄が全面禁止となった結果、海洋投入から焼却やメタン発酵への処理へと移行してきた^{1, 2)}。一方、焼酎蒸留粕には豊富な糖類、ミネラル、タンパク質などが含まれているため、その有効利用を目的とした研究開発が盛んに行われている現況がある³⁻⁶⁾。これまでも別府大学と三和酒類株式会社は共同研究を行い、「発酵大麦エキス・アルコケアのマウス腸管免疫活性化作用」⁷⁾の報告などを行ってきている。発酵大麦エキス・アルコケア（以下アルコケア）とは、二条大麦を焼酎麹菌酵素で分解後、酵母で発酵させ抽出したものである。本稿では、今回行ったメタボローム解析の結果について、現在までに報告されている発酵大麦エキスの機能をふまえながら検討を行った。

【実験方法】

株化樹状細胞（JAWS II細胞：ATCCより購入）を 5×10^5 個/wellにて6ウェルプレートに播種し、10%牛胎児血清（Gibco）添加RPMI培地（Gibco）で、37°C、5% CO₂インキュベーター（サーモバイオ）の条件下にて培養を行い、24時間後にアルコケア（三和酒類株式会社研究所より供与）を5%濃度になるように添加した。5%～25%の濃度で予備実験を先に行った結果、25%においても細胞死などの細胞障害は顕微鏡下にて観察されず、また細胞増殖に顕著な差が認められなかったことより（データでは示していない）、本研究では5%濃度に定めて実験を行った。アルコケア添加48時間後に細胞培養上清を回収し、メタボローム解析を行った（HMT；Humna Metabolome Technologies 山形県に委託）。メタボローム解析とは「代謝物質の種類と濃度を網羅的に分析・解析する手法」のことであるが、疾病や環境要因の変化に伴い、どの代謝系が動き変化をするのか分析する手法のことである。

【結果・考察】

今回のメタボローム解析の結果、2つの産物において差が認められた（図1）。アルコケア添加培地ではグルコース-6-リン酸（G6P）量が増加していた。これはアルコケア中にグルコース

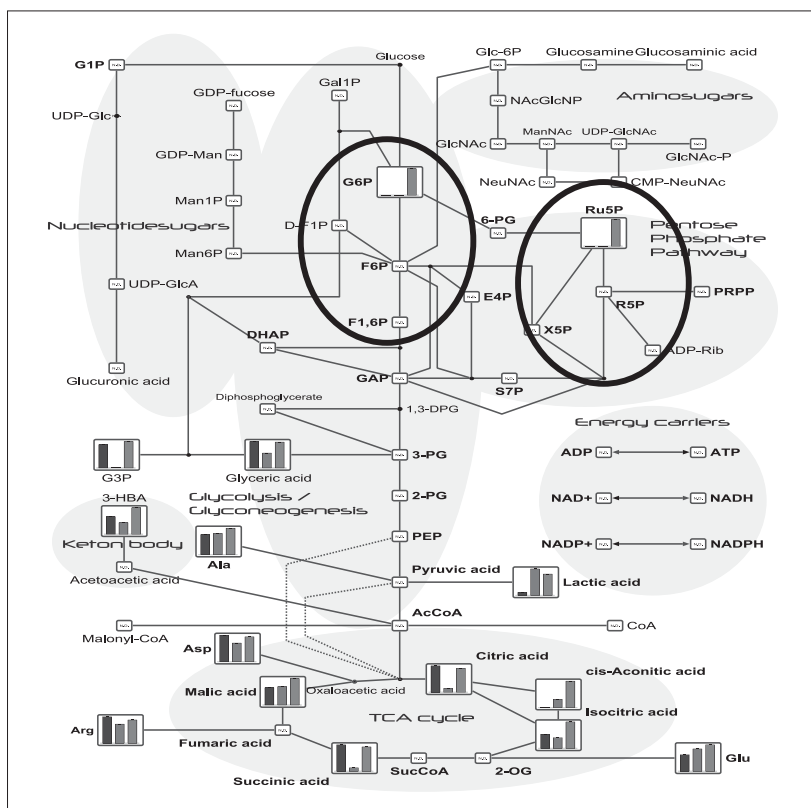


図1：メタボローム解析の結果、差が認められたグラフ（○）とその代謝経路棒グラフ左；アルコケア添加培養液 棒グラフ中央；未添加細胞培養液棒グラフ右；アルコケア添加細胞培養液

(Glu) 量が多く存在していたからであるが、アルコケア由来の G6P の多くがペントースリン酸系に利用されていることが、リブロース5リン酸 (Ru5P) の増加より推定できる。ペントースリン酸経路は最終的には核酸や脂肪酸の合成と関わっているが、1分子の G6P から1分子の CO_2 と2分子の NADPH が生成される。生成された NADPH の機能は多くの報告が既に教科書にも記載されており、核酸・脂肪酸合成、過酸化物の無害化 (抗酸化作用)、過酸化水素生成と処理 (殺菌)、P450 酵素による解毒、NADPH オキシダーゼでスーパーオキシドをつくり細菌を破壊する、NO 産生などがあげられる。アルコケア添加ではこれら全ての作用が亢進していると推定できる。本稿では、本研究結果について、NADPH の抗酸化作用、NO 産生機能、そしてこれまでの三和酒類株式会社の研究報告を交えながら考察を加える。

現在までに報告されている^{4, 5)} アルコケアの肝障害抑制メカニズムは、①アルコール摂取によって亢進した細胞内 NF- κ B を抑制することで、炎症性サイトカインの産生を低下させる、②アルコール摂取により発生した活性酸素を消去する、の2つであるが (図2 参考)、どのようなメカニズムで活性酸素を除去しているのか詳細が不明のままであった。今回のメタボローム解析の結果、アルコケアはペントースリン酸経路を活性化させることにより、NADPH を産生させ、活性酸素を消去することが解明された。NADPH は酸化グルタチオンを還元型に変換するが (図3 参考)、この還元型グルタチオンは、自らが酸化型グルタチオンになることにより、強力に活性酸素種を還元し消去する。

また本研究チームでは、アルコケアをマウス脾臓細胞に添加すると IL-6 が低下することを既に報告している⁷⁾。IL-6 は Th2 細胞から産生されるサイトカインの1つである。免疫系には古典的なヘルパー T 細胞 (Th) の概念として Th1/Th2 バランスが存在しているが、Th1 は IL-12 によって誘導され細胞性免疫を活性化し、Th2 は IL-4 によって誘導され液性免疫を活性化させる。この

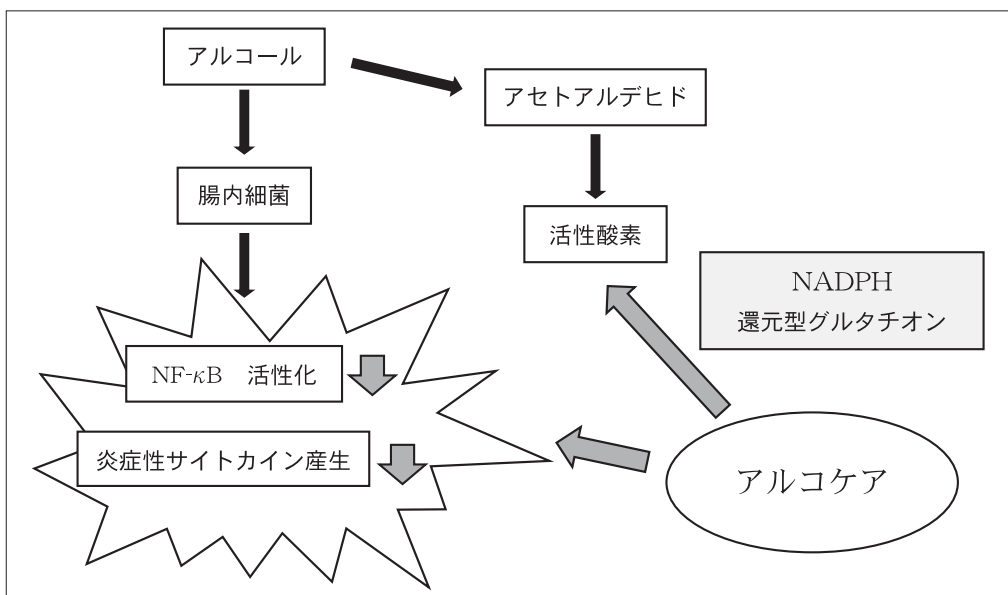


図 2. アルコケアの肝障害抑制作用 (三和酒類株式会社 提供)

アルコール摂取により、腸内細菌はマクロファージの TLR4 を介し NF- κ B を活性化し、炎症性サイトカインの産生を促す。アルコケアはマクロファージ内の NF- κ B 活性化を抑制することにより、炎症性サイトカインの産生を制御している。またアルコールは活性酸素を作り肝細胞にダメージを与えるが、アルコケアは NADPH 産生により、産生された活性酸素を消去する。

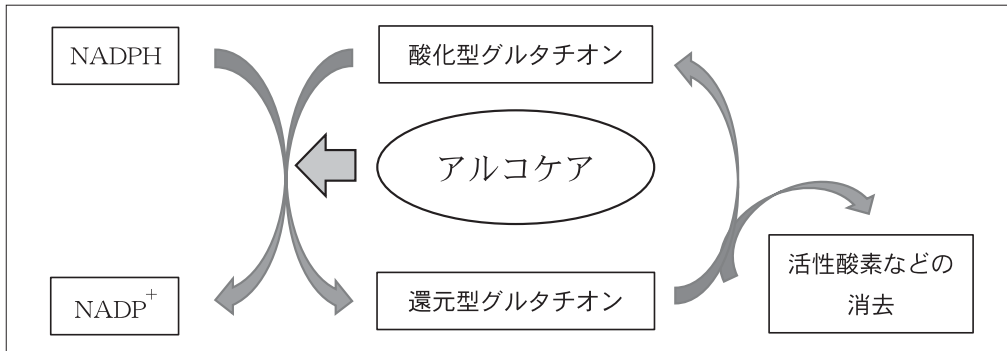


図 3. グルタチオンと NADPH の関係 (参考¹⁰⁾: レーニンジャーの新生化学)
 アルコケアによって産生される NADPH は酸化型グルタチオンを還元型グルタチオンに還元する

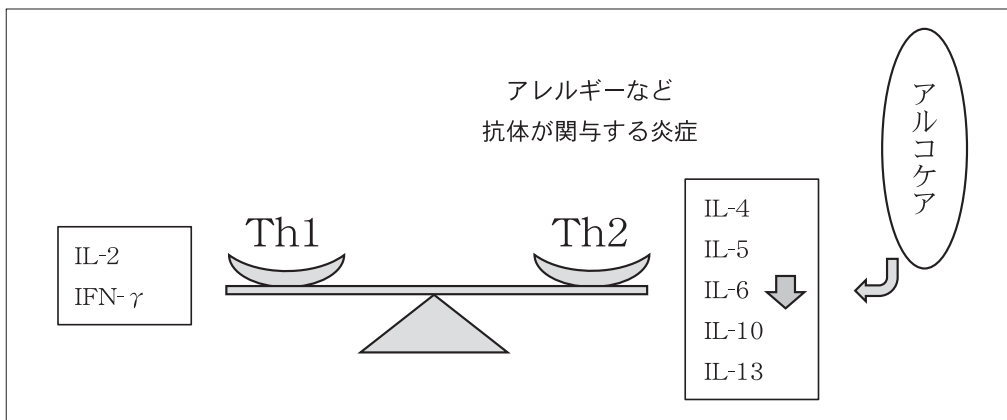


図 4. Th1 Th2 バランス (第 66 回日本栄養・食糧学会にて発表)
 アルコケアは Th2 応答を低下させ、その結果 Th1 応答を高める。

バランスは免疫系の制御に深く関与している (図 4 参考)。アルコールは IL-6 を低下させることから Th2 応答を低下させ Th1 応答優位の免疫状態にしている。本研究に使用した細胞は免疫系の中核である樹状細胞であるが、アルコール添加によりペントースリン酸経路が活性化し、NADPH が産生され、産生された NADPH がアルギニンに作用することで、さらに NO 産生も亢進すると推測できる。NO はガス性セカンドメッセンジャーであり、微生物の感染において強力な防御物質として機能している。これまでも発酵系食品には Th2 を抑制しアレルギー症状を改善するという報告があったが^{8, 9)}、本研究結果からも同様の Th1 応答優位 (Th2 応答低下) を示唆する結果を得ることができた。

【謝辞】

本研究は、三和酒類株式会社研究助成金により遂行することができました。心より感謝を申し上げます。

【文献・資料】

- 1) 下田雅彦、長野壮一、和田久継：醸協、90、879-901 (1995)

- 2) 飯島吉広：醸協、98、481-490 (2003)
- 3) 古田吉史、外蘭理佐、高下秀春、大森俊郎、石崎文彬、園元謙二：生物工学会誌、第85巻、第4号、161-166 (2007)
- 4) Hokazono H et al. Food Science and Technology Research 16、295-304 (2010)
- 5) Giriwono PE et al. Food Research International 43、118-124 (2010)
- 6) 米元俊一：醸協、107、638-647 (2012)
- 7) 第66回日本栄養・食糧学会大会（仙台）発表（2012）、発表者代表者；小口一起
- 8) 小林万木夫：アレルギー臨床31（1）、58-61 (2011)
- 9) 熊沢義男：アレルギー臨床31（7）、60-61 (2011)
- 10) David L. Nelson、Michael M. Cox
監修：山梨郁男、川寄敏祐、編集：中山和久レーニンジャーの新生化学（第5版）、廣川書店