

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19H00947

研究課題名(和文) 抗肥満作用を有する褐藻由来デオキシガラクトースの作用機序解明

研究課題名(英文) Research on anti-obese effects of deoxygalactose

研究代表者

潮 秀樹 (Ushio, Hideki)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・教授

研究者番号：50251682

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,100,000円

研究成果の概要(和文)：褐藻類に含まれるフコイダンを構成する単糖DeOGalは前駆脂肪細胞から脂肪細胞への分化を用量依存的に抑制し、解糖系の律速酵素であるHkやPfk、脂肪酸合成酵素であるFasnやAcacaの発現を抑制した。また、脂肪酸酸化およびミトコンドリア生成を促進する遺伝子発現を増大させた。これらのことから、DeOGalは脂肪細胞において脂肪酸異化を促進することによって、脂肪蓄積を抑制することが推察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

世界的な褐藻類の総生産は増加傾向にあるものの、その多くが加工残渣として廃棄されるため、新たな活用法が求められる。また、肥満は2型糖尿病や心血管疾患などの様々な代謝性疾患を引き起こすリスク要因とされ、深刻な公衆衛生問題である。さらに近年、世界的な肥満人口の増加が温室効果ガスの排出増加に関連する。褐藻由来DeOGalが肥満を効果的に抑制することは、褐藻類の新たな有効活用法に繋がるだけでなく、肥満人口低減にも繋がる。

研究成果の概要(英文)：Fucoidan, a sulfated polysaccharide contained in brown algae, has been reported to exhibit various physiological activities such as anti-obesity and anti-tumor effects. DeOGal, a monosaccharide that constitutes fucoidan, inhibited the differentiation of preadipocytes into adipocytes in a dose-dependent manner, and decreased the expression of glycolytic rate-limiting enzymes Hk and Pfk and fatty acid synthase. Also, gene expressions that promote fatty acid oxidation and mitochondrial biogenesis were elevated. Phosphorylations of AMPK and its substrate ACC were enhanced, suggesting that DeOGal inhibits fat accumulation by activating the AMPK pathway, a master regulator of glucose and lipid metabolism, in adipocytes.

研究分野：水産化学

キーワード：肥満 褐藻 ミトコンドリア 脂質代謝 酸化 マウス

1. 研究開始当初の背景

世界的な褐藻類の総生産量は少なく見積もっても1億5,000万トンであり、年間1,500万トンの加工残渣が生じているものと推察される (White and Wilson Chapter 2. World seaweed utilization. In *Seaweed Sustainability: Food and Non-Food Applications*. Eds, 7-25, 2015). また、ホンダワラやジャイアントケルプなど、未利用・低利用の資源も非常に多い。そのため、未利用・低利用資源の有効利用の一環として、褐藻類の生理活性に関する研究が盛んに行われてきた。褐藻類はアルギン酸、フコイダンやアスコフィラン等多糖類を多く含有し、これらの多糖類の部分的加水分解物が種々の健康機能性を示すことが示されている。特に、褐藻類の粘性多糖フコイダンは、コレステロール低下作用や血圧低下作用など生活習慣病にかかわる症状を緩和する効果が動物実験で確認されている。一方、これらの多糖類の構造(構成単糖の量比や配列)は同じグループの多糖でもその原料種やその生育環境などによって異なることが知られ、その生理活性発現にも少なからず差が見られることから (Jiang et al. *J. Biochem.*, 151, 65, 2012; Gonzalez et al. *J. Plant Growth Regul.*, 32, 443, 2013; Tusi et al. *Biomaterials*, 32, 5438, 2011), 定量的な健康機能性の付与という観点から利用上問題がある。

また、多糖であるがゆえ有効所要量が多い点も、投与の際に大きな問題となる。そこで申請者らは、褐藻類の多糖を加水分解した単糖について注目し、実験動物の肥満抑制効果等の生理作用についてスクリーニングを行ってきた。その結果、フコイダンなどの構成単糖である DeOGal が、マウスにおいて低用量で脂質異化促進作用や内臓脂肪蓄積抑制作用を示すことが明らかとなった (伊藤ら, 2017; 苑ら, 2017, 日本農芸化学会 2017 年度大会)。効果の見られた用量のヒト換算値は 100mg/日・60kg 体重程度と多糖類の一般的なレベル(数十 g/日)に比べて著しく低い点は大きな利点である。

また、過剰投与として1日あたり 200mg の DeOGal (ヒトに換算すると、体重 60kg 成人で1日当たり 600g)を3ヶ月間経口投与してもマウスに顕在的な異常をもたらさなかった。さらに、マウスに DeOGal を経口投与すると、48 時間後に血中アディポネクチン多量体が2倍程度に増大した(アディポネクチン分泌調節剤。特願 2016-538463)。

アディポネクチンは脂肪細胞が産生分泌する抗2型糖尿病ホルモンであり、その血中レベルはさまざまな生活習慣病リスクと反比例的に相関することが明らかにされている。アディポネクチンは筋肉や肝臓などでの脂質異化促進などの生理作用を発揮して肥満など生活習慣病リスクを低減し、さらに多量体アディポネクチンはその効果が高いことが明らかにされている。アディポネクチンの多量体化にはリシン水酸化および α -糖鎖付加が関与することが報告されており DeOGal による糖鎖付加ステップへの影響も推察される。以上より、本研究で注目した DeOGal の内臓脂肪蓄積抑制の作用機序にこの多量体化が関与することが強く示唆されるが、DeOGal の受容分子を含めて上位および下位の情報伝達経路については全く不明であり、これを解明することは基礎生物学的に重要な知見となる。また、DeOGal がヒトの母乳にも含まれることから乳児における生理作用を理解するうえでも重要な知見を与えるものと考えられる。

現在、世界の肥満人口は6億4,000万人に到達し、深刻な問題となっている。厚生労働省による健康増進に関わる目標「健康日本 21」では「主要な生活習慣病の発症予防と重症化予防の徹底に関する目標」が掲げられているが、肥満および内臓脂肪の蓄積が主要な原因とされる生活習慣病関連の医療費の占める割合は4兆円を超過し、さらに増加しつつある(厚生労働省平成28年度医療費の動向)。したがって、わが国における医療費削減の意味からも内臓脂肪蓄積を抑制する成分の探索は重要である。

上述したように DeOGal はヒトの母乳にも含まれ、マウスへの大量投与でも顕著な副作用が認められなかったことから、ヒトへの経口投与における安全性は高いものと考えられる。一方、薬剤の副作用の検討については実際に投与した際の表現型を分析する手法が一般的であったが、顕在化しにくい副作用の発見は不可能である。昨今は、KEGG MEDICUS など、ゲノム解析、トランスクリプトーム解析、プロテオーム解析、メタボローム解析、リアクトーム解析など多くのオミクスデータを有機的に統合し、科学的に副作用を推定する手法が併用されるようになってきた。しかしながら、そのためには少なくとも DeOGal の情報伝達経路の詳細について解明する必要がある。そこで本研究では、DeOGal がマウス脂肪細胞の細胞内・間情報伝達機構に及ぼす影響を詳細に明らかにし、作用機序を解明することとした。

2. 研究の目的

DeOGal がマウス脂肪細胞の細胞内・間情報伝達機構に及ぼす影響を詳細に明らかにし、作用機序を解明することによって、1)未利用・低利用の褐藻資源の有効利用に資する、2)ヒトの生活習慣病の低減に資する、3)乳児における DeOGal の生理的機能について知見を提出する、3)DeOGal を初めとする単糖代謝に関する新たな基礎生物学的知見を提供するものである。

これまでの褐藻を含む海藻由来糖質の研究では、多糖そのもの、一部加水分解したオリゴ糖、硫酸糖やアミノ糖などの特殊な官能基を有する単糖などを研究対象としたものが多く、特殊な官

能基を持たない単純単糖の健康機能性について注目した例は国内外を問わず非常に少なく、学術的独自性が高い。また、既にこれまでの共同研究先によってパイロットプラントレベルの分解・精製法が確立され、DeOGalの供給も担保されている。本研究によって得られる知見から科学的エビデンスに基づいたトランスレーショナルな生活習慣病対策が可能となり、潤沢な未利用・低利用資源の有効利用にもつながる。

3. 研究の方法

1) DeOGalによるトランスクリプトームおよびプロテオーム変動解析（研究代表者 潮および研究協力者）

まずH31年度に、マウス3T3L1線維芽細胞（前駆脂肪細胞）および本株を常法で分化誘導した脂肪細胞にDeOGalを投与し、12, 24, 48時間後に全RNAを抽出して次世代シーケンサーNovaseq6000によるトランスクリプトーム解析を行った（外注）。得られた全リードからクオリティの高いものを抽出し、Genomic Workbench（現有）を用いてリファレンスマウストランスクリプトームにマッピングし、有意な変動を示すmRNA群を同定した。得られたmRNA群について、DAVIDなどを用いてgene ontology解析および機能解析を行い、DeOGalが遺伝子発現に及ぼす影響を明らかにした。

H32年度では、マウス3T3L1脂肪細胞にDeOGalを投与し、12, 24, 48時間後にタンパク質脱リン酸化阻害剤を含むRipaバッファーにてタンパク質を回収する。タンパク質をトリプシン消化後、同重体タグのiTRAQにてラベルし、初期試料とともに混和後NanoLC-MS/MS（現有）によるマルチプレックス分析を行って変動するペプチド群を特定し、リファレンスマウスプロテオームデータベースを参照したProtein Pilot（現有）にて変動タンパク質群を同定した。

H33年度以降では、プロテオーム解析によってDeOGalによって作動する細胞内情報伝達経路を推定し、候補経路について、SDS-PAGEおよび特異的抗体によるウェスタンブロットティング解析によってその経路を確認した。

2)細胞内・間情報伝達機構の解明（研究代表者 潮および研究協力者）

H31年度にDeOGalがマウス脂肪細胞のエネルギー代謝に及ぼす影響を網羅的に解析した。本研究では特に脂質代謝に注目するため、その代謝産物の解析に有利なGC-MS/MSを用いたメタボローム解析法を採用することとした。DeOGal投与後2時間おきに細胞を回収し、クロロホルム/メタノール混液にて抽出した後、水を加えて2層分配して水層とクロロホルム層を回収した。回収試料を乾固して自動誘導体化装置を装着したGC-MS/MS（現有）分析に付し、水層についてはメトキシム化後トリメチルシリル化を、クロロホルム層についてはけん化後メチルエステル化を行った。得られたメタボロームデータを元に、DeOGalがエネルギー代謝、特に脂質代謝に及ぼす影響を把握するとともに、その代謝経路と関与し得る酵素群を明らかにした。

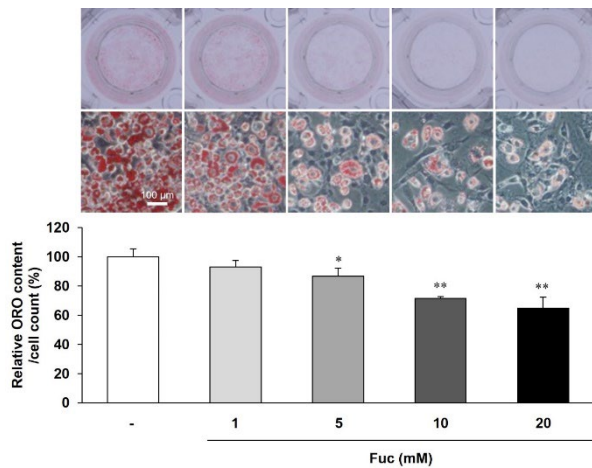
さらに、1)および2)の検討から候補として導き出された情報伝達経路において、細胞間による情報伝達の可能性についても検討を開始する。情報伝達経路によって分泌されるサイトカインやエイコサノイド類などを、既報の知見やメタボローム解析から推定し、その評価を行った。すなわち、脂肪細胞について特異的ELISAキットおよびGC-MS/MSにて細胞間での情報の伝達や増幅が起こる可能性について検討をくわえた。

一方、H32年度以降では、これまでの検討で得られたアディポネクチンの多量体化についても詳細な検討を行った。すなわち、既報によってアディポネクチン分子内のLysおよびProの水酸化とo-グリコシル化が多量体形成に重要であることが明らかにされている。DeOGalによる糖鎖付加や配列への影響がアディポネクチンの多量体化を誘導する可能性について推察した。最終年度には、以上の解析結果を包括的に考察することによってDeOGalの内臓脂肪蓄積抑制効果の作用機序の全容解明を目指した。

4. 研究成果

1. 脂肪細胞におけるフコースがエネルギー代謝に及ぼす影響

脂肪細胞においてフコースがエネルギー代謝に及ぼす影響を検討するために、マウス前駆脂肪細胞株3T3-L1におけるフコース投与試験を行った。フコースは前駆脂肪細胞から脂肪細胞への分化を用量依存的に抑制し、細胞内脂質含量を有意に減少させた。

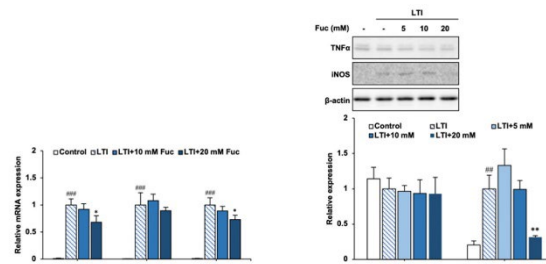
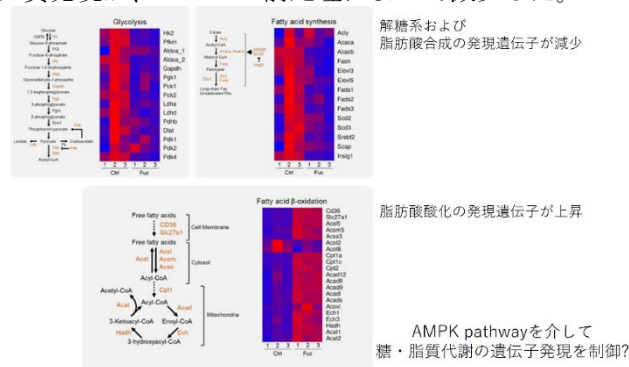


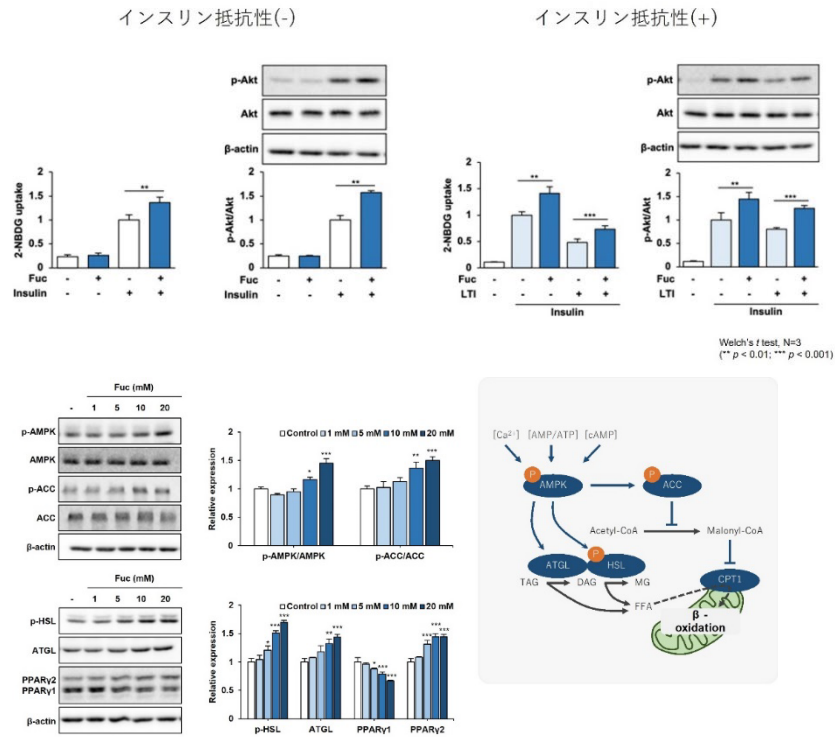
次に、フコース処理した脂肪細胞についてトランスクリプトーム解析を行い、発現変動した遺伝子について GO enrichment 解析を行った。Biological Process において carbohydrate metabolic process、glucose homeostasis、cellular lipid catabolic process、sterol metabolic process など糖代謝および脂質代謝に関与する GO term が多数確認された。

AMP-activated kinase (AMPK) およびその基質である acetyl-CoA carboxylase (ACC) のリン酸化が亢進したことから、脂肪酸酸化の促進、および脂肪酸合成の抑制が示唆された。さらに、脂肪分解の律速酵素である hormone-sensitive lipase (HSL) および adipose triglyceride lipase (ATGL) のタンパク質発現が上昇したことから、脂肪分解の促進が示唆された。これらの影響は、AMPK 阻害剤である Compound C によってキャンセルされたことから、フコースは AMPK pathway を介して脂肪酸酸化および脂肪分解を促進することが示唆された。脂肪細胞が有するインスリン依存性糖取り込みは、生体における血糖制御において重要である。2-NBDG を用いた糖取り込み試験において、フコースはインスリン依存性糖取り込みを促進した。さらに、Akt のリン酸化を促進したことから、フコースは insulin signaling pathway を介してインスリン感受性を増加することが示唆された。

2. 脂肪細胞におけるフコースが炎症誘導に及ぼす影響

肥満による過度の脂肪蓄積は、慢性的な炎症状態を誘導し、脂肪組織はアディポカインの産生異常やインスリン抵抗性を示す。本章では、lipopolysaccharide、TNF α 、IFN γ (LTI) の同時暴露によって慢性炎症を示す脂肪細胞を用いて、フコースが炎症誘導に及ぼす影響について検討した。炎症誘導によって発現上昇が認められる inducible nitric oxide synthase (iNOS) の mRNA およびタンパク質発現が、フコース前処理によって減少した。





さらに、フコースは活性酸素種 (reactive oxygen species; ROS) の産生を有意に抑制したことから、炎症誘導に伴う酸化ストレスを抑制することが示唆された。炎症誘導にはさまざまな転写因子がモジュレーターとして機能し、炎症メディエーターであるサイトカインの発現を制御する。そこで、核内抽出物の転写因子の DNA 結合活性を測定することで、フコースが影響を及ぼす転写因子についてスクリーニングを行った。その結果、フコースは activated protein 1 (AP-1) の転写活性を抑制することが明らかとなった。次に、AP-1 の活性化には、その上流に位置する mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway が関与するため、代表的な MAPK カスケードである extracellular signal-regulated kinase (Erk) および p38 MAPK のリン酸化を定量した。LTI 処理によって増加した Erk および p38 MAPK のリン酸化は、フコースによって有意に抑制されたことから、フコースは MAPK pathway の制御を介して炎症誘導を抑制することが示唆された。また、炎症誘導経路として中心的な役割を担う nuclear factor-kappa B (NF- κ B) pathway についても、フコースが及ぼす影響を検討した。細胞質において NF- κ B は inhibitory kappa B ($I\kappa$ B) と結合し、複合体として存在するが、 $I\kappa$ B がリン酸化され、速やかに分解されると NF- κ B は核内移行し、転写因子として機能する。フコースは LTI 処理によって増加した NF- κ B および $I\kappa$ B のリン酸化を有意に減少させた。また、細胞質における $I\kappa$ B の分解がフコースによって阻害され、核内における NF- κ B は減少した。このことから、フコースは MAPK pathway の制御に加え、NF- κ B の核内移行を制御することで炎症誘導を抑制することが示唆された。

アディポネクチンは脂質異化作用を示す善玉のアディポカインであり、高分子多量体 (HMW) を形成することで最も高い生理活性を示す。全アディポネクチンに対する HMW の割合 (HMW/Total) は、BMI やインスリン抵抗性と負の相関を示す。本章では、炎症誘導時におけるフコースがアディポネクチンの多量体化に及ぼす影響についても検討を加えた。LTI 処理によって減少した HMW/Total は、フコースによって回復した。さらに、プロテオーム解析によって多量体化に関与する endoplasmic reticulum protein 44 (ERp44)、lysyl hydroxylase 1 および 3 (LH1 および 3) のタンパク質発現の上昇が認められた。このことから、フコースは小胞体シャペロン分子や、翻訳後修飾酵素を制御することにより、炎症誘導下におけるアディポネクチンの多量体化を促進することが示唆された。

本研究により、フコースは脂肪細胞において糖・脂質代謝のマスターレギュレーターである AMPK pathway を活性化することにより、脂肪蓄積を抑制することが推察された。さらに、フコースはインスリン抵抗性の惹起に関与する炎症誘導経路である MAPK pathway および NF- κ B pathway を抑制することによって炎症誘導を抑制するとともに、炎症状態により機能不全に陥った多量体化アディポネクチンの分泌低下を改善することを示した。これらフコースが示す抗肥満作用および抗炎症作用の有効性は、機能性表示食品として利用が進むエラグ酸およびポリメトキシフラボンと同等であることが示された。本結果は、フコースの抗肥満作用の詳細な作用機序を明らかにするとともに、褐藻の有効利用促進やフコースを初めとした単糖代謝に関する新たな知見を提供するものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Kominami Yuri、Hayashi Tatsuya、Tokihiro Tetsuji、Ushio Hideki	4. 巻 3
2. 論文標題 Peptidomic analysis characterising proteolysis in thaw-aging of beef short plate	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Food Chemistry: Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 100051 ~ 100051
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.fochms.2021.100051	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Lee Cheng-Linn、Kominami Yuri、Ushio Hideki	4. 巻 6
2. 論文標題 Mechanism of Delayed Convulsion in Fish: The Actions of Norepinephrine in Spinal Cord	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Fishes	6. 最初と最後の頁 12 ~ 12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/fishes6020012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Xiao Yuan、Tomohiko Nakao、Hina Satone、Kazuyuki Ohara、Yuri Kominami、Miho Ito、Teruki Aizawa、Tomoya Ueno and Hideki Ushio	4. 巻 12
2. 論文標題 The Effects of Brown Algae-Derived Monosaccharide L-Fucose on Lipid Metabolism in C57BL/6J Obese Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 3798
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu12123798	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Mark Joseph Desamero、Shigeru Kakuta、Yulan tang、James Kenn chambers、Kazuyuki Uchida、Maria Amelita estacio、Cleofas cervancia、Yuri Kominami、Hideki Ushio、Jun nakayama、Hiroyuki nakayama & Shigeru Kyuwa	4. 巻 9
2. 論文標題 tumor-suppressing potential of stingless bee propolis in in vitro and in vivo models of differentiated-type gastric adenocarcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 19635
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-55465-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kominami Yuri, Hayashi Tatsuya, Tokihiro Tetsuji, Ushio Hideki	4. 巻 7
2. 論文標題 A Novel Analysis of the Peptide Terminome Characterizes Dynamics of Proteolytic Regulation in Vertebrate Skeletal Muscle Under Severe Stress	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proteomes	6. 最初と最後の頁 6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/proteomes7010006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kaneko, Ushio, Ji	4. 巻 85
2. 論文標題 Application of magnetic resonance technologies in aquatic biology and seafood science	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Fisheries Science	6. 最初と最後の頁 1-17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12562-018-1266-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 中尾 友彦、小南 友里、苑 暁、潮 秀樹、伊東 美保、相澤 光輝、久保村 大樹、赤堀 雄介
2. 発表標題 6-deoxy ^Λ -galactose suppresses lipid accumulation in mouse adipocyte
3. 学会等名 日本分子生物学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中尾 友彦、小南 友里、苑 暁、潮 秀樹、伊東 美保、相澤 光輝、久保村 大樹、赤堀 雄介
2. 発表標題 フコースがマウス脂肪細胞のトランスクリプトームに及ぼす影響
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 中尾 友彦、小南 友里、渡邊 壮一、細谷 孝充、潮 秀樹
2. 発表標題 光親和性標識法によるマウス脂肪細胞におけるフコース相互作用分子の探索
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	細谷 孝充 (Hosoya Takamitsu) (60273124)	東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・教授 (12602)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------