

機関番号：34204

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20580295

研究課題名(和文) 高品質な牛肉生産を目指した新たな飼料用天然成分の探索

研究課題名(英文) Investigation for Activators of Adipocyte Differentiation in Feed for Beef Marbling.

研究代表者

河内浩行(KAWACHI HIROYUKI)

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・准教授

研究者番号：00324666

研究成果の概要(和文)：牛の飼料として利用可能な食品製造副産物の脂溶性成分について PPAR γ リガンドアッセイを行うことで、天然物から PPAR γ 活性化因子を探索した。その結果、マメ科牧草、および発酵食品製造副産物中に PPAR γ 活性化能を見出した。更なる溶媒分画やカラムクロマトグラフィーでの分画の結果、ノダフジの種子中のイソフラボン配糖体やイソフラバンがアゴニスト活性を有することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)： Through screening for natural PPAR γ activator in feed using the PPAR γ luciferase reporter assay, the ethanol extracts of sake lees, soy sauce lees, vinegar lees, beer lees, soy sauce oil, legume grasses and *Wisteria floribunda* seeds activated PPAR γ . Moreover, according to the results of the sequential fractionation assay, we confirmed that PPAR γ -activate factors in *Wisteria floribunda* seeds were wistin and isomucronulatol.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 ・ 畜産学・草地学

キーワード：飼料

1. 研究開始当初の背景

大規模な畜産に不向きな風土の我が国において、大規模畜産により低価格が実現できる輸入牛肉と市場で共存・競争していくためには、海外では生産が困難である脂肪交雑度の高い牛肉を効率よく生産することが不可欠となる。そのためには脂肪交雑が形成されるメカニズムを解明することが非常に重要となる。脂肪交雑すなわち霜降りの実体は、筋肉内に形成される脂肪細胞である。脂肪交雑の程度

は筋肉内の脂肪細胞数と非常に高い相関があることから、脂肪交雑の優れた個体では肥育時に脂肪前駆細胞の増殖および脂肪細胞の分化が筋肉内で活発に行われていたと言える。

脂肪細胞分化はリガンド依存性の核内受容体であるペルオキシゾーム増殖剤応答性受容体(PPAR γ)がマスターレギュレーターとして働いていることは周知の事実である。この核内受容体とは一般にビタミンA,Dや性ホルモンといった脂溶性分子をリガンドとする

遺伝子の発現調節を行う転写因子である。これまでの研究で食品由来の脂溶性ビタミン類が脂肪細胞分化を抑制することを示し、それらの作用が核内受容体であるレチノイン酸受容体(RAR)、ビタミンD受容体(VDR)などを介することが明らかにされた。また、申請者のグループはビタミンAがウシ脂肪細胞分化を抑制することを明らかにし、民間技術として広く普及しているビタミンA欠乏飼料給与による脂肪交雑向上を科学的に裏付けた。それらの研究を経て、米国のグループにより脂肪形成にはPPAR γ が重要であることが明らかとなった。

2. 研究の目的

そこで本研究では、食品製造副産物や各種草類を収集し脂質成分の抽出後、PPAR γ のレポーターアッセイの系を用いて網羅的にリガンドスクリーニングを行う。草種として、牧草類、野草類、ハーブ(残渣)、また食品製造副産物としてビール粕、豆腐粕、ジュース粕、発酵食品残渣、油かす、ぬか類等に対しスクリーニングを行う。活性のあったものについては、さらに溶媒分画やカラムクロマトグラフィーでの分画を繰り返すことにより活性成分を単離し、その活性成分の化学構造をMSやNMR等により同定する。

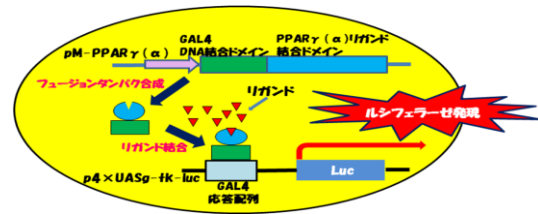
さらに最近泌乳牛や産卵鶏などで問題となっている脂肪肝の予防や治療にも関わると考えられるPPAR γ と同じファミリー分子の一つであるPPAR α のリガンドアッセイについても系の立ち上げを行う。

3. 研究の方法

(1) PPAR γ のリガンドアッセイ

PPAR γ のリガンド結合ドメインとGAL4のDNA結合ドメインからなるキメラタンパク質を合成するプラスミドを作成する。ウミホタルおよびウミシイタケ由来のルシフェラーゼ発現プラスミドと共にアフリカミドリザル腎臓由来培養細胞CV-1にトランスフェクトするDual-Luciferase Reporter Assay Systemを用い、飼料用食品製造副産物や各種草種より抽出した脂溶性成分に対しリガンドアッセイを行う。なおスクリーニングは、草種としては、牧草類、野草類、ハーブ(残渣)、また食品製造副産物としてはビール粕、豆腐粕、ジュース粕、発酵食品残渣、油かす、ぬか類

等を網羅的に検索する。



(2) PPAR γ リガンドの脂肪細胞に及ぼす影響

上記のリガンドアッセイでリガンドと認められた脂溶性成分をウシ脂肪前駆細胞あるいは脂肪細胞の培地に添加して、それぞれ分化や機能維持に対する影響について検討する。

(3) PPAR γ リガンドの同定

リガンドスクリーニングでの活性を指標として、溶媒分画やカラムクロマトグラフィーでの分画を繰り返すことにより活性成分を単離し、その活性成分の化学構造をMSやNMR等により同定する。

(4) PPAR α のリガンドアッセイ

PPAR α のリガンドアッセイについてもPPAR γ と同様に行う。PPAR α のリガンド結合ドメインとGAL4のDNA結合ドメインからなるキメラタンパク質を合成するプラスミドを作成した。そのプラスミドをウミホタル由来ルシフェラーゼおよび β ガラクトシダーゼ発現プラスミドと共に培養細胞COS-7にトランスフェクトするLuciferase Reporter Assay Systemに用いる。

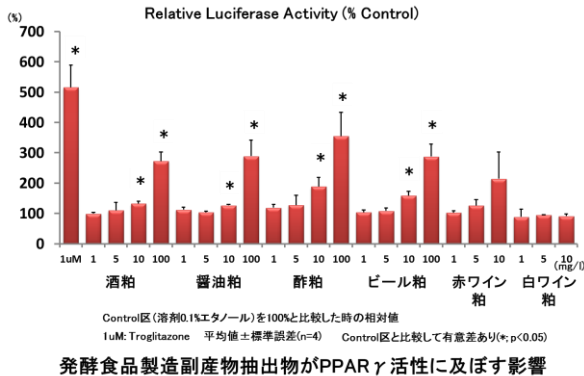
4. 研究成果

(1) PPAR γ のリガンドアッセイ

本試験では、飼料として利用可能な様々な草類や食品製造副産物に含まれるPPAR γ 活性化因子の探索を行った。PPAR γ のリガンド結合ドメインとGAL4のDNA結合ドメインからなるキメラタンパク質を合成するプラスミドを作成した。ウミホタルおよびウミシイタケ由来のルシフェラーゼ発現プラスミドと共にアフリカミドリザル腎臓由来培養細胞CV-1にトランスフェクトするDual-Luciferase Reporter Assay Systemを用い、飼料用食品製造副産物や各種草種より抽出したエタノール抽出物を1mg/lから100mg/lで添加し、リガ

ンドアッセイを行った。

すると、マメ科牧草抽出物は5 mg/lから、酒粕、醤油粕、発泡酒粕およびビール粕抽出物は10mg/lからPPAR γ の転写活性を用量依存的に上昇させた。これに対し、イネ科牧草抽出物の活性上昇作用は弱かった。また、大豆粕、フスマ、コーングルテンミール、ホミニーフード、ヒマワリ粕、オキアミ、乳分解ペプチド抽出物には活性上昇作用は認められなかった。



(2) PPAR γ リガンドの脂肪細胞に及ぼす影響

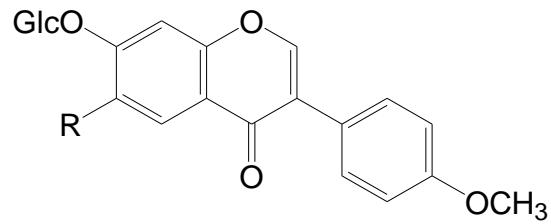
さらに、転写活性化能を示したものについては、3T3-L1脂肪前駆細胞を用い分化に及ぼす影響を検討した。3T3-L1脂肪前駆細胞をコンフルエント後(day0)、2日間分化誘導処理を行い(day2)、その後8日間培養を行った。day0-10にPPAR γ 転写活性化能を有する抽出物を様々な濃度で培地に添加すると、分化の指標であるグリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GPDH)比活性とトリグリグリセリド量が用量依存的に上昇した。以上の結果から、これら副産物の抽出物にはPPAR γ の転写活性を促進するリガンドが含まれている事が示唆され、脂肪細胞分化を促進する事がわかった。

(3) PPAR γ リガンドの同定

特に活性の高かった発酵食品製造副産物のうち、醤油粕について酢酸エチル可溶性画分に分配し活性試験を行ったところ、添加濃度依存的に活性の上昇が見られた。これについては、スクリーニングでの活性を指標として、更なる分画を繰り返すことにより活性成分を単離しその活性成分の同定を目指す。

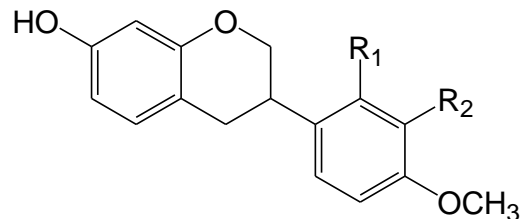
また、各種草種より抽出した脂溶性成分に対してもリガンドアッセイを行った。その結果、マメ科フジ属のノダフジ(*Wisteria floribunda*)種子のMeOH抽出物がPPAR γ のアゴニスト活性を示すことがわかった。この

MeOH抽出物を、ヘキサン、酢酸エチル各可溶性画分に分配し活性試験を行ったところ酢酸エチル可溶性画分に強い活性が見られた。この画分についてシリカゲルおよびODSカラムクロマトにより分画精製を行った。その結果、イソフラボン配糖体 Ononin (1), Wistin (2) やイソフラボン Sativan (3), Isomucronulatol (4), Vestitol (5) が得られた。このうち、Wistin (2) と Isomucronulatol (4) は、それぞれ最小有効濃度 2 mg/l および 6 mg/l で PPAR γ アゴニスト活性を示した。



1 : R = H

2 : R = OCH₃



3 : R₁ = OCH₃, R₂ = H

4 : R₁ = OH, R₂ = OCH₃

5 : R₁ = OH, R₂ = H

(4) PPAR α のリガンドアッセイ

さらに、最近泌乳牛や産卵鶏などで問題となっている脂肪肝の予防や治療にも関わると考えられるPPAR α のリガンドアッセイについても行う。PPAR α は主に肝臓で発現し、脂質代謝関連遺伝子の発現調節を行う転写因子である。これまでもその天然のリガンドが様々な植物成分中から発見されている。PPAR α のリガンド結合ドメインとGAL4のDNA結合ドメインからなるキメラタンパク質を合成するプラスミドを作成した。ウミホタル由来ルシフェラーゼおよび β ガラクトシダーゼ発現プラスミドと共に培養細胞COS-7にトランスフェクトするLuciferase Reporter Assay Systemを用い、PPAR α の既知リガンドであるWY14643を様々な濃度で添加したところ、添加濃度が

10 μ M以上において添加濃度依存的に有意な活性の上昇が見られ、PPAR α のスクリーニングの系の立ち上げに成功した。この系を用いて、PPAR γ のスクリーニングの系で活性の見られた醤油粕および醤油油について活性試験を行ったところ、醤油粕、醤油油ともに有意な活性上昇が見られた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

- ① 河内浩行, 丸山静香, 亀井康富, 河田照雄, 松井徹, 飼料に含まれる脂肪細胞分化促進因子の探索、微量栄養素研究、査読有、26巻、2009、65-69

[学会発表] (計4件)

- ① 井上朋世, 山田敬博, 河内浩行, 太田伸二, ノダフジ (*Wisteria floribunda*) 種子に含まれる抗糖尿病活性物質、日本化学会第92春季年会、2011年3月26日、慶應義塾大学(神奈川)
- ② 河内浩行, 丸山静香, 松井徹, 飼料原料に含まれる PPAR γ 活性化因子の探索、第11回 日本ペット栄養学会、2009年7月26日、山脇学園短期大学(東京)
- ③ 河内浩行, 丸山静香, 松井徹, 飼料に含まれる脂肪細胞分化促進因子の探索、第26回日本微量栄養素学会学術集会、2009年6月5日、京都リサーチパーク(京都)
- ④ 丸山静香, 河内浩行, 松井徹, PPAR γ 活性化因子の探索および 3T3-L1 脂肪前駆細胞の分化に及ぼす影響、関西畜産学会 2008年9月2日、神戸大学(兵庫)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計0件)
○取得状況 (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河内 浩行 (KAWACHI HIROYUKI)
長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・
准教授
研究者番号：00324666