

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23380068

研究課題名(和文)アレンカロテノイドの生体内局在と機能解析

研究課題名(英文)Biological Localization and Functionality of Allenic Carotenoids

研究代表者

宮下 和夫 (MIYASHITA, Kazuo)

北海道大学・大学院水産科学研究院・教授

研究者番号：10182015

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円、(間接経費) 4,320,000円

研究成果の概要(和文)：内臓WATでのUCP1の発現に基づくフコキサンチンの抗肥満作用の分子機構を解明した。フコキサンチンによるUCP1の発現誘導は、フコキサンチンの特異な構造、すなわち、アレン結合と、カロテノイド鎖の両側に結合した官能基を多数有する2個の6員環の存在に起因していることも明らかにした。したがって、その他のアレンカロテノイドやフコキサンチンの分解産物ではこうした作用は見られなかった。フコキサンチンはインスリン抵抗性を改善し、抗糖尿病作用も示した。また、筋肉でのGLUT4の発現増大とその細胞膜の促進がフコキサンチンの抗糖尿病作用の重要な分子機構であることを見出した。

研究成果の概要(英文)：In the present study, molecular mechanisms were made clear for the anti-obesity effect of fucoxanthin by the induction of UCP1 in abdominal WAT. The anti-obesity effect of fucoxanthin was suggested to be due to its specific structure that contains two carotenoid end rings of the polyene chromophore containing allenic bond and OH and epoxy groups. Therefore, other allenic carotenoids or scission products from fucoxanthin could not show such activities as found in fucoxanthin. Fucoxanthin also improves insulin resistance and decreases blood glucose level through the regulation of adipocytokine secretions from the abdominal WAT. Another important molecular mechanism for the improvement of glucose utilization by fucoxanthin will be glucose transporter 4 (GLUT4) up-regulation and promotion of its translocation to cell membrane from cytosol.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学、食品科学

キーワード：アレンカロテノイド 抗肥満 抗糖尿病 フコキサンチン エネルギー代謝

1. 研究開始当初の背景

(1)申請者は、褐藻カロテノイド、フコキサンチンを肥満動物に投与すると、脂肪を熱に代謝変換するタンパク質（脱共役タンパク質：UCP1）が内臓白色脂肪組織(WAT)中に誘導され、内臓脂肪中の脂肪が減少することを発見した。従来 UCP1 は褐色脂肪組織(BAT)のミトコンドリア内膜のみに特異的に存在し、WAT 中には発現しないとされてきたため、フコキサンチンによる内臓 WAT 中での UCP1 の発現誘導は、国内外で高い関心を持たれている。

(2)フコキサンチンは WAT 中で UCP1 の発現を誘導することで抗肥満作用を示すが、この作用は、アレン結合を有するフコキサンチンの特異な化学構造に起因すると推測できる。しかし、その詳細は不明である。また、自然界にはフコキサンチンと同様にアレン構造を有するカロテノイドが見出されているが、これらのアレンカロテノイドの脂肪蓄積抑制効果についても興味を持たれる。

(3)キサントフィルの生理作用についての知見は、 β -カロテンやリコピンなどのカロテン類に比べると少ない。しかし、日本食にはキサントフィルに富んだ野菜や海産物が多用されている。特に褐藻類や緑色野菜には、光合成補助色素として知られるフコキサンチンやネオキサンチンなどのアレンカロテノイドがそれぞれ主要カロテノイドとして含まれており、これらのアレンカロテノイドの機能性の検討は、日本食の有効性を知る上でも重要と考えられる。

2. 研究の目的

(1)各種アレンカロテノイドの活性の比較：内

臓 WAT での UCP1 発現に関わるターゲット分子や、関連するシグナル伝達系に対する各種アレンカロテノイドの制御活性を比較解析する。

(2)フコキサンチンの抗肥満作用の分子機構の詳細を解明する。

(3)フコキサンチンの抗糖尿病作用の分子機構について、内臓 WAT からのサイトカインの分泌制御と筋肉でのグルコーストランスポーター 4 (GLUT4)の働きに着目して検討する。

3. 研究の方法

(1)動物実験では、WAT 中での UCP1 発現誘導に関連する各種生体因子に着目して検討を行う。また、内臓 WAT 中の脂質過酸化の測定、各種サイトカイン (TNF α , IL-6, PAI-1, IL-10 など)、iNOS、COX-2 などの発現測定、マクロファージの脂肪細胞への浸潤の度合いや TLR4 の発現測定を行うと共に、炎症発現制御に深く関わる Nf- κ B や関連生体因子の測定も行う。

(2)培養細胞実験では、前駆脂肪細胞から脂肪細胞への分化抑制能の評価と関連遺伝子の発現、脂肪細胞における脂質代謝遺伝子及び脂肪分解量、細胞分化に関わる諸因子(C/EBP α や PPAR γ など)の発現に及ぼす各種アレンカロテノイド代謝物と関連化合物の影響を解析する。

4. 研究成果

(1)各種アレンカロテノイドの活性の比較：
フコキサンチンの他、イソフコキサンチン、フコキサンチノール、イソフコキサンチノール、アマロウシアキサンチン A、ネオキサン

チンを天然物から分取、または、酵素的に調製し、それぞれの機能性を比較した。その結果、脂肪組織（細胞）への過度の脂肪蓄積抑制や高血糖の改善効果は、すべてのアレンカロテノイドで認められるが、その活性はフコキサンチンとその代謝物が最も強いこと、特に、フコキサンチン代謝物であるアマロウシアキサンチンAの活性が最も高いことを明らかにした。以上より、アレン構造は抗肥満作用や抗糖尿病作用を発揮する上で必須の構造であるが、その活性の強弱には、その他の部位の構造も大きく関わることを明らかにした。

アポカロテノイドなどのアレン構造を有するフコキサンチンの分解物の活性を検討した。その結果、WATにおける脂肪蓄積抑制効果はアレン構造を有する場合でも、パラセントロンといったアポカロテノドなどの分解物の活性は弱いことが分かった（図1）。このことから、フコキサンチンとその代謝物が示した強い抗肥満活性には、OH基を有する6員環

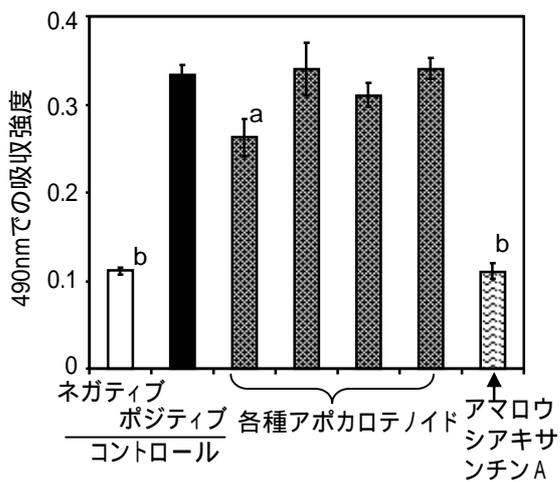


図1 フコキサンチンの分解物(アポカロテノイド)とアマロウシアキサンチンAの脂肪細胞における脂肪蓄積抑制効果
a,b ポジティブコントロールに対して有意差あり。
(^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$)

がアレン結合によりイソプレノイド鎖に結合した構造だけでなく、反対側にもエポキシ基やOH基を有する6員環が結合している必要のあることが明らかになった。

ネオキサンチンの作用：ネオキサンチンには抗肥満効果及び抗糖尿病作用が見られたものの、その作用はフコキサンチンよりも弱かった（図2）。ところで、KK-*A^y*のような肥満マウスでは、内臓WATから過剰な遊離脂肪酸が血中に分泌され、様々な悪影響を生体に及ぼす。しかし、ネオキサンチン投与により、

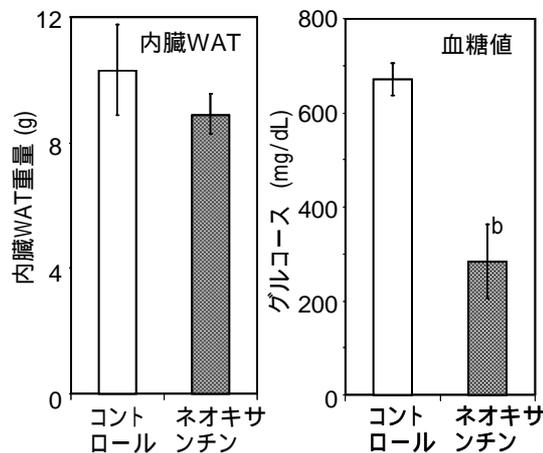


図2 肥満・病態マウスに対するネオキサンチン投与の内臓WAT重量と血糖値に及ぼす影響

^b ポジティブコントロールに対して有意差あり。
($P < 0.01$)

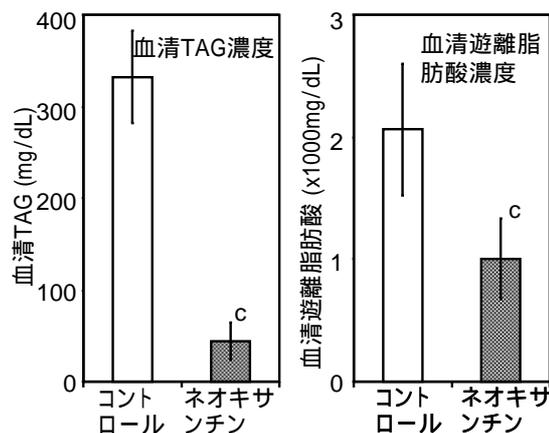


図3 ネオキサンチン投与の血清TAG濃度と血清遊離脂肪酸濃度に及ぼす影響

^c ポジティブコントロールに対して有意差あり。
($P < 0.001$)

血中の遊離脂肪酸とトリアシルグリセロール (TAG)の顕著な減少が見られた(図3)。こうした効果はフコキシサンチンにはなく、ネオキシサンチン独特の作用といえた。

(2)フコキシサンチンの抗肥満作用の分子機構の解明:

様々な条件で飼育した肥満マウスにおいて、WATにおけるUCP1発現がフコキシサンチン投与により誘導されることを確認した。また、そのレベルはBAT中のそれに匹敵するものであった(図4)。

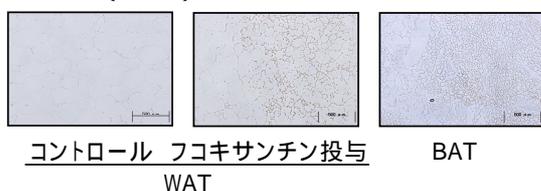


図4 免疫組織学的染色によるUCP1の検出

フコキシサンチンによるWATでのUCP1の発現誘導機構について検討し、1)WAT内の3アドレナリンレセプター(3AR)の発現上昇と細胞内のcAMPをメディエーターとするシグナル伝達の活性化、これによるPGC-1発現量の

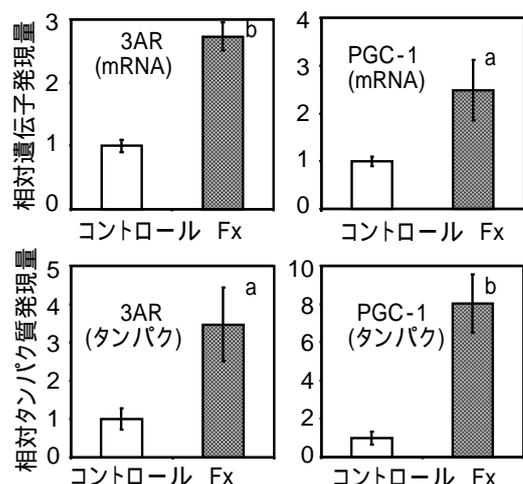


図5 肥満病態マウスでの3ARとPGC-1の発現に対するフコキシサンチン(Fx)投与の影響

^{a,b}コントロールに対して有意差あり。(^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$)

増加(図5); 2)転写制御因子であるPPARおよびの発現上昇; 3)C/EBPの発現上昇によるUCP1の直接的な転写促進; 4)心臓から分泌されるANPおよびBNPの血中濃度の上昇とNPRA-p38MAPKを介した経路の活性化の4経路を明らかにした。

さらに本研究において、フコキシサンチンの投与によってBATにおいてもUCP1の発現が上昇することを見出した。フコキシサンチンのようにWATにおいてUCP1のタンパク質発現が誘導される食品成分はほとんど報告がないが、BATにおけるUCP1発現誘導因子はいくつか報告されており、トウガラシの辛味成分であるカプサイシンを含むカプシノイドがその代表例である。その他にも交感神経の活性化を通じてBATを活性化する食品成分としてカフェインやリモネン、オリーブ由来ポリフェノールのオリウロペインなどが報告されている。さらに最近、ヒト褐色脂肪組織の寒冷刺激による活性化がカプシノイドによって増強されることも報告された。フコキシサンチンはWATおよびBATの両方に効果を示すことに加え、寒冷刺激など、他の刺激を必要とせずにUCP1の発現を誘導する点が特徴であることから、ヒトに対する機能の検証と、その利用が期待される。

(3)フコキシサンチンの抗糖尿病作用の分子機構の解明:

フコキシサンチンを投与した肥満マウスや糖尿病病態マウスでは、内臓WATからの過度のMCP-1分泌が抑制され、その結果内臓WAT中のマクロファージの浸潤もほとんど見られず、TNF-、IL-6、MCP-1、PAI-1などのサイトカインの他、炎症誘導に関わるiNOSとCOX-2の発現も正常マウスと同様のレベルま

で抑制されることが明らかになった。ただし、正常マウスにフコキサンチンを投与しても各種サイトカインの発現レベルに変化はなく、フコキサンチンによる内臓 WAT でのサイトカイン制御は、病態の場合のみに特異的であると考えられた。

フコキサンチンによる GLUT4 の発現亢進作用を見出した (図 6)。フコキサンチンによる GLUT4 の発現亢進は、骨格筋を形成している 2 種類の筋肉のうち、長趾伸筋では顕著であったが、ヒラメ筋では有意差は見られなかった。一方、ヒラメ筋では、GLUT4 の細胞膜移行量がフコキサンチン投与により有意に増大した。長趾伸筋 (速筋) はヒラメ筋よりも骨格筋全体に占める割合は高く、瞬発的な

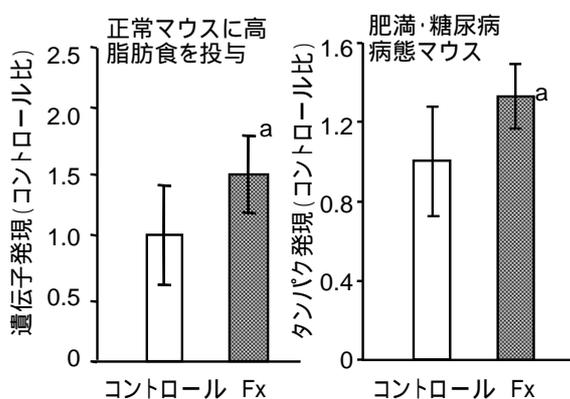


図6 高脂肪食投与の正常マウスと糖尿病病態マウスでの筋肉組織中でのGLUT4発現に対するフコキサンチン(Fx)の影響

^a糖尿病病態マウスのコントロールと比較して有意差あり。(P<0.05)

運動を担い、嫌気的な代謝が活発で、GLUT4 の発現量が低い。これに対して、ヒラメ筋 (遅筋) は持久的な運動を担い、好気的代謝が活発で、GLUT4 の発現量が高い。また、インスリン応答性も高い。フコキサンチンは、GLUT4 が豊富な遅筋では、その細胞膜移行を活性化させ、GLUT4 の発現量が低い長趾伸筋においては主としてその発現量を増大させたが、こ

のような作用は、II 型糖尿病の改善に有効であると考えられる。なお、フコキサンチンを投与した動物では、インスリンレセプター、Akt、PGC-1 の発現が増大しており、こうした分子レベルでの制御により、GLUT4 の発現や膜移行が亢進していると考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 16 件)

Beppu F., Hosokawa M., Yim M.-J., Shinoda T., Miyashita K.

Down-regulation of hepatic stearoyl-CoA desaturase-1 expression by fucoxanthin via leptin signaling in diabetes/obese KK-*A^y* mice. *Lipids*, 査読有、48 巻、2013、449-455

DOI:10.1007/s11745-013-3784-4

Iwasaki S., Airanthi M.K.W.A., Koide A., Kaga T., Nakano S., Beppu F., Hosokawa M., Miyashita K. *In vivo* antioxidant activity of fucoxanthin on obese/diabetes KK-*A^y* mice. *Food Nutr. Sci.*, 査読有、3 巻、2012、1491-1499

DOI:10.4236/fns.2012.311194

Okumura T., Tsukui T., Hosokawa M., Miyashita K. Effect of caffeine and capsaicin on the blood glucose levels of obese/diabetic KK-*A^y* mice. *J. Oleo Sci.*, 査読有、61 巻、2012、515-523

DOI:10.5650/jos.61.515

Jaswir I., Noviendri D., Salleh H.M., Miyashita K. Fucoxanthin extractions of brown seaweeds and analysis of their lipid fraction in methanol. *Food Sci. Technol. Res.*, 査読有、18 巻、2012、

251-257

DOI:10.3136/fstr.18.251

Beppu F., Hosokawa M., Niwano Y.,
Miyashita K. Effects of dietary
fucoxanthin on cholesterol metabolism
in diabetic/obese KK-A(y) mice. Lipids
Health Dis., 査読有、11 巻、2012、112
DOI:10.1186/1476-511X-11-112

[学会発表] (計 3 0 件)

Miyashita K. Application of Brown
Seaweed Lipids to Functional Foods.
台湾保健食品学会2014年会員大会, 2014
年3月7日, 国立台湾海洋大学, 台湾。(招
待講演)

Hosokawa M., Miyashita K. Marine
Chimeical “Fucoxanthin” - High
Potential for the Prevention of Obesity
and Type 2 Diabetes. 2013 The 80th Annual
Meeting of KoSFoST, August 28-30, 2013,
Cheonan Convention Center, Korea. (招
待講演)

宮下和夫. 褐藻脂質の機能性と有効活用.
第67回日本栄養・食糧学会大会, 2013年5
月24日～5月26日, 名古屋大学(名古屋
市). (招待講演)

Miyashita K. Novel functionality and
molecular mechanism of brown seaweed
carotenoid, fucoxanthin. The 9th
Asia-Pacific Marine Biotechnology
Conference, July 13-16, 2012, 高知文
化プラザかるぼーと(高知市).(招待講
演)

Miyashita K. Research and development
in the area of functional food
originating from marine products.

Indonesian Aquaculture 2012

(Indoaqua-FITA 2012), June 8-11, 2012,
Hotel Imperial Arya, Indonesia.(招待
講演)

[図書] (計 4 件)

Miyashita K.他、Carotenoids as
nutraceutical therapy for visceral
obesity、Elsevier、2014 329-340
Miyashita K.他、Academic Press、
Therapeutic effect of fucoxanthin on
metabolic syndrome and type 2 diabetes、
2012 360-379

6 . 研究組織

(1)研究代表者

宮下 和夫 (MIYASHITA, Kazuo)
北海道大学・大学院水産科学研究院・教授
研究者番号：1 0 1 8 2 0 1 5

(2)連携研究者

細川 雅史 (HOSOKAWA, Masashi)
北海道大学・大学院水産科学研究院・准教
授
研究者番号：1 0 2 4 1 3 7 4