

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 27 日現在

機関番号：34444

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23380124

研究課題名(和文) 緑藻由来特異カロテノイド、シフォナキサンチンの抗肥満作用とその機構解明

研究課題名(英文) Anti-obesity activity of siphonaxanthin, a unique carotenoid in green algae, and its mechanism.

研究代表者

平田 孝 (TAKASHI, HIRATA)

四條畷学園大学・リハビリテーション学部・教授

研究者番号：40273495

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,600,000円、(間接経費) 4,380,000円

研究成果の概要(和文)：緑藻由来特異カロテノイドであるシフォナキサンチンの抗肥満作用について評価した。シフォナキサンチンは前駆脂肪細胞である3T3-L1細胞の分化を強力に抑制した。このとき、脂肪細胞分化に関わる遺伝子の発現が有意に抑制された。また、肥満モデルマウスKK-Ayを用いた検討で、シフォナキサンチンの経口投与により、内臓脂肪が有意に低下した。さらに脂肪組織において、脂質合成に関わる遺伝子の発現が上昇し、脂質分解に関わる遺伝子の発現が低下することが見出された。

以上の結果から、シフォナキサンチンは抗肥満作用を有する食品機能性成分として有用であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Siphonaxanthin is a specific carotenoid found in siphonaceous green algae and its bio-functional properties are yet to be studied. In this regard, we focused on elucidating the anti-obesity effect of siphonaxanthin. Siphonaxanthin potently inhibited the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. In addition, mRNA expression of adipogenic genes was decreased by the treatment with siphonaxanthin. In the animal study using KK-Ay mice as obesity model, abdominal white adipose tissue was decreased by oral administration of siphonaxanthin. In this case, mRNA expression of lipogenic genes was suppressed and lipolytic genes were increased in siphonaxanthin-treated mice.

These findings suggest that siphonaxanthin could be potentially useful as a nutraceutical.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産化学

キーワード：カロテノイド 緑藻 肥満 脂肪細胞 シフォナキサンチン

## 1. 研究開始当初の背景

近年、生活習慣病の増加が社会問題となっている。なかでも内臓肥満は、糖尿病、高脂血症、高血圧症などに対して改悪因子として働くことが明らかとなっており、肥満を併発した生活習慣病はメタボリックシンドロームと呼ばれる。したがって、肥満を予防または改善することが強く望まれている。一方、申請者は膨大かつ多彩で無限の可能性を秘めている海洋の生物資源に注目し、新たな機能性を見出すことで海洋生物資源の有効活用と機能性研究のイノベーションをめざした研究を推進している。そのなかで、海洋生物に特有のカロテノイドを網羅的に収集し、単離精製することでライブラリー化し、その機能を網羅的に解析することにも挑戦している。ミルなどの比較的未利用な食用緑藻類に特有のカロテノイドであるシフォナキサンチン(図1)が、抗アレルギー作用、細胞致死活性、アポトーシス誘導作用、抗シワ作用、血管新生抑制作用等、様々な生理活性を示すことを見いだした。しかしながら、それ以外の機能性は不明であり、未利用緑藻を有効に活用するためには、更なる食品機能性の解明が必要と考えられた。

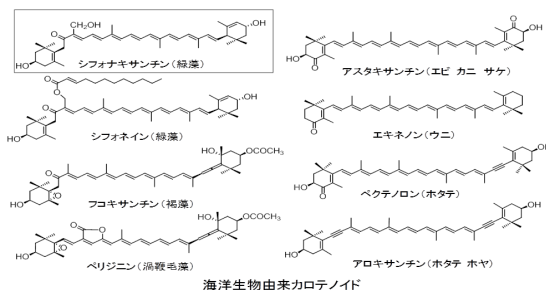


図1 海洋生物由来カロテノイド

## 2. 研究の目的

そこで本申請課題では、シフォナキサンチンを新規な抗肥満機能性成分として利用するための科学的基盤を構築することを目的とした。そのために、

(1) 前駆脂肪細胞 3T3-L1 を用いて、脂肪分化に与えるシフォナキサンチンの作用機構の詳細に明らかにすること、

(2) 継続的なシフォナキサンチンの経口投与により、生体レベルでの脂肪蓄積に対する抑制作用を評価する。また、組織や細胞における脂質代謝に関わる因子の発現変動を調べることで、シフォナキサンチンの作用機構を分子レベルで明らかにすること、の2点に特に注力した。

## 3. 研究の方法

### (1) シフォナキサンチンの調製

凍結乾燥した食用緑藻であるミル (*Codium fragile*) の葉体にアセトンを加えて一晩放

置した。アセトン抽出を2回繰り返し、アセトンを除去した。ついで、調製用クロマトグラフにより粗シフォナキサンチンを分離した。次いで、逆相クロマトグラフィーにより精製した。精製画分は UV-VIS スペクトルフォトメトリーおよび質量分析法により、同定した。

### (2) 血管新生抑制作用の機構解明

血管新生を促進する代表的因子として血管内皮細胞増殖因子 (VEGF, Vascular endothelial growth factor) および繊維芽細胞成長因子 (Fibroblast growth factor-2, FGF-2) が、また抑制因子として thrombospondin-1 (TSP1) が知られている。そこで、血管内皮細胞 (ヒト臍帯静脈内皮細胞、HUVEC) を用い、これらの因子および血管内皮細胞におけるそのレセプターの発現に及ぼすシフォナキサンチンの影響について調べた。血管内皮細胞 (HUVEC) を HuMedia-EG2 で培養し、VEGF や FGF による細胞内シグナル伝達に与えるシフォナキサンチンの影響を調べ、各因子の mRNA 発現はリアルタイム RT-PCR 法で、リン酸化シグナルはリン酸化特異抗体を用いたウエスタンブロット法で評価した。

### (3) 脂肪前駆細胞の分化抑制機構の解明

マウス由来 3T3-L1 細胞を脂肪細胞に分化誘導した時のシフォナキサンチンの影響を調べた。細胞内脂肪滴は Oil-red O 染色を用いて定量した。また、脂肪細胞分化に関連する遺伝子発現の経時的な変化は、リアルタイム RT-PCR 法によって評価した。分化した脂肪細胞の脂質代謝に与えるシフォナキサンチンの影響についても検討し、同様に遺伝子発現の変動についても評価した。

### (4) 動物実験による抗肥満作用の解明

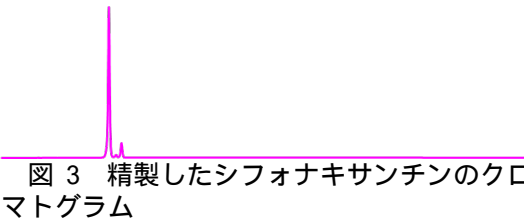
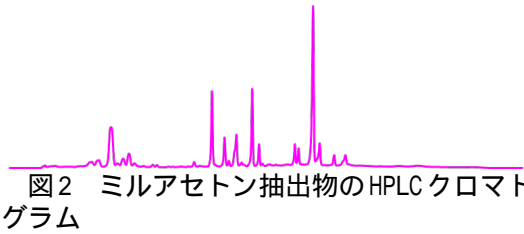
肥満モデル動物を用いた実験により、生体レベルでの抗肥満作用の評価を行った。肥満併発型糖尿病モデルマウス KK-Ay に、シフォナキサンチン 70% を含むミル抽出物 (シフォナキサンチン濃縮画分) を毎日経口投与し、6 週間飼育した (シフォナキサンチン投与量として 1.5 mg/マウス/日)。飼育期間終了後、各種組織重量の測定と血液の分析、肝臓の分析を行い、その変化を調べた。また、脂肪組織について、脂質や糖質などエネルギーの代謝や蓄積に関わる因子 (脱共役、SREBP、FAS、PPAR、アディポネクチン、レプチンなど) について mRNA 発現量の変動を調べることで、シフォナキサンチンの摂取が生体に与える作用機構の解明を試みた。

## 4. 研究成果

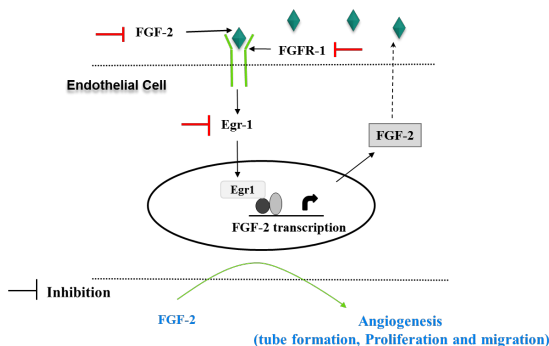
### (1) シフォナキサンチンの調製

ミルのアセトン抽出物は多くのクロロフィル分解物や他の色素成分が含まれていた

(図2) 本研究の精製工程により、シフォナキサンチンを精製することが可能であった(図3)。

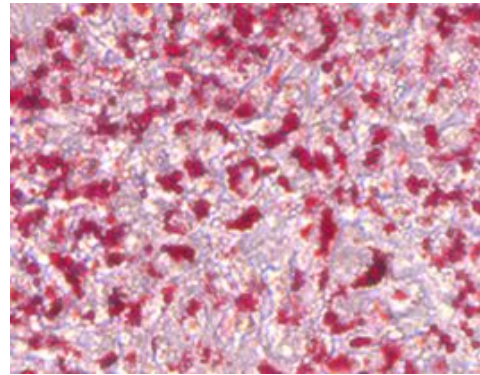


(2) シフォナキサンチンは、HUVECのFGF-2およびその受容体の発現を有意に抑制した。さらにFGF-2によって誘導されるHUVECの管腔形成をシフォナキサンチンは効率的に抑制した。また、FGF-2によるAktやERK1/2といった核内転写因子の活性化をシフォナキサンチンは有意に抑制した。これらの結果から、シフォナキサンチンの血管新生抑制作用はFGF-2経路活性化の抑制であることが示された(図4)。



(3) 精製したシフォナキサンチンを試料として、マウス由来3T3-L1細胞の脂肪細胞への分化抑制作用について、フコキサンチンと比較して検討した。その結果、シフォナキサンチンはフコキサンチンよりも低濃度で脂肪細胞への分化を抑制することを見出した(図5)。

## A コントロール



## B シフォナキサンチン処理

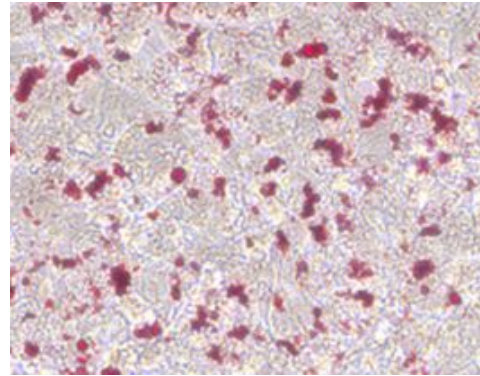


図5 脂肪細胞の分化に与えるシフォナキサンチンの影響

さらに作用機構について明らかにするために、遺伝子発現変動を調べたところ、脂肪細胞分化マーカーであるC/EBP $\alpha$ 、PPAR-2、SCD-1及びaP2のmRNA発現レベルは脂肪細胞分化の進展とともに増加し、シフォナキサンチン添加により有意に低下した。さらに、分化した脂肪細胞でもシフォナキサンチンの添加により細胞内脂質蓄積量が減少し、脂質代謝に関する遺伝子LPL、FAS、ACCのmRNA発現も有意に低下したことから、シフォナキサンチンは成熟脂肪細胞の脂質代謝を促進する可能性も示された。

(4) 生体レベルでの抗肥満作用について、シフォナキサンチン濃縮画分をKK-Ayマウスに継続的に経口投与したところ、投与6週間後の内臓脂肪重量は、未投与のものに比べて有意に低値を示した。さらに脂肪組織における脂質合成関連遺伝子の発現(SCD-1とG6PD)がシフォナキサンチンの経口投与で有意に低下し、それ以外のもの(FAS、SREBP-1c、MEなど)でも低下傾向を示した。一方、脂質分解に関わる遺伝子の発現(CPT1とPGC-1)は有意に増加し、それ以外のもの(PPARやUCP-1など)でも増加する傾向を示した。

以上の結果から、シフォナキサンチンは脂肪分化を抑制し、脂質分解を高めることで抗肥満作用を示す機能性食品成分として有望であることが示された。

#### 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 3件)

・ Ganesan, P., K. Matsubara, T. Sugawara, T. Hirata: Marine algal carotenoids inhibit angiogenesis by down-regulating FGF-2-mediated intracellular signals in vascular endothelial cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 380, 1-9, 2013.

・ Sugawara, T., P. Ganesan, Z. Li, Y. Manabe, T. Hirata: Siphonaxanthin, a green algal carotenoid, as a novel functional compound. *Marine Drugs* in press

・ 菅原達也: 海洋性カロテノイドの機能性について ~アンチエイジングを中心に~  
*食品加工技術*, 33(4), 1-9, 2013

[学会発表](計 4件)

・ 李卓思、藤田絵里子、菅原達也、平田 孝 緑藻由来シフォナキサンチンの抗肥満作用の評価 日本食品科学工学会 2012年8月30日 藤女子大学北16条キャンパス(札幌)

・ 李卓思、藤田絵里子、大久保剛、橋爪 論、菅原達也、平田 孝 緑藻由来シフォナキサンチンの脂肪細胞分化抑制作用 日本農芸化学会 2013年3月25日 東北大学川内キャンパス(仙台)

・ 菅原達也 海洋性カロテノイドの抗肥満効果などの機能性について 第12回美容・アンチエイジング食品研究会 2013年6月26日 大阪国際会議場(大阪)

・ Tatsuya Sugawara, Yuki Manabe, Novel biological functions of siphonaxanthin from green algae, 2013 The International Society for Nutraceuticals and Functional Foods (ISNFF) Conference and Exhibition, November 5-9, 2013, Howard Civil Service International House, Taipei, Taiwan

[その他]

ホームページ等

<http://www.bioproducts.marine.kais.kyoto-u.ac.jp/>

#### 6. 研究組織

#### (1)研究代表者

平田 孝 (HIRATA, Takashi)

四條畷学園大学・リハビリテーション学部・教授

研究者番号: 40273495

#### (2)研究分担者

菅原 達也 (SUGAWARA, Tatsuya)

京都大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号: 70378818