

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：17501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500931

研究課題名(和文) 脂質代謝を中心とした二枚貝の生理作用に関する研究

研究課題名(英文) Study on physiological function of the bivalve mainly on lipid metabolism

研究代表者

望月 聡 (Mochizuki, Satoshi)

大分大学・教育福祉科学部・教授

研究者番号：80210087

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：台湾シジミのコレステロール代謝に対する影響を検討した。台湾シジミの熱水抽出物の脂質画分に存在する活性成分の構造はceramide phosphoramidate分子種であることを明らかにすることができた。

脂質画分とタンパク質画分を与えたラットの肝臓からRNAを抽出し、全RNAを用いてマイクロアレイ解析を行い、バイオインフォマティクス解析を行った。脂質画分には、コレステロール異化代謝の促進作用がみられ、顕著な脂肪酸合成酵素系の抑制もみられた。また、SREBPのタンパク質のプロセッシングに作用することが示唆された。タンパク質画分にも、コレステロール異化代謝の促進作用がみられた。

研究成果の概要(英文)：We examined effects of the Freshwater Clam (*Corbicula fluminea*) on cholesterol metabolism. The structure of the active ingredient in the lipid fraction of the heated water extract of the Freshwater Clam (*Corbicula fluminea*) was a ceramide phosphoramidate molecular species.

We extracted RNA from the liver of rat given the lipid fraction or the protein fraction. We performed microarray analysis using all RNA and analyzed bioinformatics. Promotion of the cholesterol catabolism and remarkable depression of activities of enzymes of fatty acid synthesis were seen in the rat given the lipid fraction. In addition, it was suggested that the lipid fraction acted on processing of the protein of SREBP. Promotion of the cholesterol catabolism was also seen in the rat given the protein fraction.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：台湾シジミ コレステロール代謝 脂質画分 タンパク質画分 マイクロアレイ 遺伝子発現 構造決定 セラミド

1. 研究開始当初の背景

古くから言い伝えによって、「シジミは肝臓によい」など、貝類の生体におよぼす機能性について関心がもたれてきた。しかしながら、貝類の機能性を科学的に明らかにした例は少なく、ヤマトシジミの機能性に関する研究が報告されている程度である。シジミにはいろいろな種類があり、日本では「ヤマトシジミ」「セタシジミ」が食されているが、最近健康食品素材として「タイワンシジミ」が注目されるようになった。「タイワンシジミ」は淡水で養殖することが可能であり、文字通り台湾において養殖が盛んに行われている。

私たちの研究グループは以前からタイワンシジミの機能性に興味を抱き、肝機能に対する影響や脂質代謝に及ぼす影響について検討を行ってきた。研究を進めて行く中で、タイワンシジミの熱水抽出物には強いコレステロール代謝改善作用が存在することを見出し、その作用物質がいかなる物質であるかを明らかにすることを最終目標としてさらに研究を進めてきた。

まずタイワンシジミ熱水抽出物を脂質画分とタンパク質画分に分けて、それぞれをラットに与えてコレステロール代謝に及ぼす影響を観察したところ、脂質画分、タンパク質画分のいずれにも強い血清コレステロール低下作用が存在することを明らかにした。そこで、タイワンシジミに含まれるいかなる物質がコレステロール代謝改善に寄与しているかを明らかにすることを目的として、研究を進めることにした。

2. 研究の目的

タイワンシジミの熱水抽出物中の脂質画分に含まれるコレステロール代謝改善作用をもたらす活性成分の構造解明を行うとともに、活性成分を大量に合成することによって、健康食品素材としてあるいは薬品のリード化合物としての応用利用を最終目標として検討を行った。

また、タイワンシジミ熱水抽出物の脂質画分およびタンパク質画分がどのような作用機構によってコレステロール代謝改善作用を有しているかを明らかにすることを目的として、両画分の肝臓遺伝子発現に与える影響を明らかにしようとした。

3. 研究の方法

タイワンシジミの熱水抽出物 2.5kg の脂質画分について、 CHCl_3 / MeOH (2:1) 混液で抽出し、 CHCl_3 / MeOH 混液可溶部を得た。得られた可溶部について、シリカゲルカラムクロマトグラフィーを行い、粗分画を得た。各分画について活性試験を行い、活性が認めら

れた画分から活性成分の単離と構造決定を行うために、活性画分について各種カラムクロマトグラフィーによる分離と HPLC を用いた精密精製を行った。分離した活性成分については、各種機器スペクトルデータの解析によってその構造の解明を行った。

一方、タイワンシジミ抽出物をクロロホルム・メタノール混液で抽出した脂質画分とその残渣であるタンパク質画分に血清コレステロールを低下させる作用がわかったが、脂質画分のどの脂質成分に効果があるのかを調べるためにシリカゲルカラムにて分画した脂質画分をラットに与えた。また、タンパク質画分もラットに与え、タイワンシジミ抽出物中のタンパク質の貢献度を検討した。

脂質画分とタンパク質画分をラットの肝臓から RNA を抽出して与えた動物の肝臓から RNA を抽出した。全 RNA を用いてマイクロアレー解析を行い、バイオインフォマティクス解析を行った。それぞれの画分の効果を抽出する目的でベン図解析を行い、リアルタイム PCR 解析により定量解析を行った。

4. 研究成果

タイワンシジミ由来の脂質画分について、各種溶媒分配、各種カラムクロマトグラフィーを繰り返し行うことによって、活性フラクションから、順相 TLC において単一スポットを示す成分を主成分として分離することができた。このものについて各種スペクトルデータ ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, HR-FABMS) を解析することによって、その構造は ceramide phosphoramidate 分子種であることを明らかにすることができた。更に、ceramide 分子種 (220.7 mg) の一部 (31.4 mg) を HPLC で繰り返し精製することによって、主成分を 21.0 mg 単離することができた。更に詳細に、FAB-MS スペクトルデータを解析することによって、ceramide 部を構成する、脂肪酸部分並びに長鎖塩基部分のアルキル鎖長を明らかにすることができた。更に、主成分の活性の有無を検討するため、分取 HPLC を用いて、主成分の単離を行い、細胞を用いた活性試験を行った。

一方、主成分の全合成を行うために、合成ルートを検討し、大量合成に着手した。現在、長鎖塩基の構築後、脱保護基の反応等の際、異性化を含め、生成物が変化していることが判明し、より高効率に目的物を得るために、反応条件等を検討中である。大量合成における、脱保護等が効率的に進行する条件が解れば、その後脂肪酸の付加とリン酸化反応を行う予定である。

肝臓遺伝子発現の見地から、タイワンシジミ熱水抽出物をクロロホルム・メタノール混液で抽出した脂質画分をさらにシリカゲルカラムにて分画した画分をラットに与え、血

清コレステロール低下作用を確認した後、これを与えた動物の肝臓からRNAを抽出した。その画分の摂取による遺伝子発現変動に与える影響を解析する前に、脂質画分で何が起きたかについて、マイクロアレー解析を行い、そのバイオインフォマティクス解析を行った。脂質画分では、コレステロール異化の促進だけでなく、顕著な脂肪酸合成酵素系の抑制が見られた。これらの遺伝子を制御するSREBPの関与が示唆されたが、SREBPの遺伝子発現に顕著な影響がなかったことから、台湾シジミ熱水抽出物の脂質画分はSREBPのタンパク質のプロセッシングに作用することが示唆された。脂質画分のサブ画分においては、血清コレステロール濃度の低下とコレステロール異化代謝の律速酵素であるCYP7A1の遺伝子発現の誘導と関係が深いことがわかった。

台湾シジミ抽出物のタンパク質画分にも、コレステロール異化代謝の促進作用がみられた。体重増加量からタンパク質画分に含まれるタンパク質量が十分であることがわかるが、タンパク質量が少ないときに応答するセリン代謝酵素系に変動が見られた。タンパク質画分のアミノ酸組成に特殊性は見られていないが、その原因は現在のところ不明である。これらのことから、台湾シジミ熱水抽出物の主要構成成分であるタンパク質、脂質の両者にコレステロール代謝改善作用はあるが、それ以外に脂質画分は中性脂肪代謝を、タンパク質画分はアミノ酸代謝を変動させることで、台湾シジミ熱水抽出物に現れる作用を発揮していることが明らかになった。

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)

1. T.Chijimatsu, M.Umeki, Y.Kataoka, S.Kobayashi, K.Yamada, H.Oda, and S.Mochizuki : Lipid components prepared from a freshwater Clam (*Corbicula fluminea*) extract ameliorate in hypercholesterolaemia in rats fed high-cholesterol diet. *Food Chem.*, 136, 328-334 (2013)

2. T.Laurent, Y.Okuda, T.Chijimatsu, M.Umeki, S.Kobayashi, Y.Kataoka, I.Tatsuguchi, S.Mochizuki, and H.Oda : Freshwater Clam Extract Ameliorates Triglyceride and Cholesterol Metabolism through the Expression of Genes Involved in Hepatic Lipogenesis and Cholesterol Degradation in Rats. *Evidence-Based Complementary and*

Alternative Medicine, 2013, Article ID 830684 10 pages (2013)

3. 千々松武司, 山田耕史, 小田裕昭, 望月 聡 : 二枚貝, 特にシジミの機能性因子に関する研究 : *New Food Industry* 55, (8) 23-31 (2013)

〔学会発表〕(計3件)

1. 梅木美樹, 千々松武司, 安 美珠, 片岡裕太郎, 小林 悟, 山田耕史, 小田裕昭, 望月 聡 : シジミ抽出物中脂質およびタンパク質はクロレトン誘導脂肪性肝炎を抑制する 第 68 回日本栄養・食糧学会大会 2014.5

2. 千々松武司, 梅木美樹, 望月 聡 : タイワンシジミ抽出物は脂肪、コレステロールおよび鉄負荷食により誘導される脂肪肝および肝障害を抑制する 第 67 回日本栄養・食糧学会大会 2013.5

3. 小林 悟, トマローラン, 片岡裕太郎, 梅木美樹, 千々松武司, 山田耕史, 望月 聡, 小田裕昭 : タイワンシジミ抽出物による脂質代謝改善機構と機能性成分に関するトランスクリプトミクス解析 第 65 回日本栄養・食糧学会大会 2011.5

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況(計0件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕
ホームページ等
研究業績を公表
<http://kitchom.ed.oita-u.ac.jp/diet/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

望月 聡 (MOCHIZUKI, Satoshi)
大分大学・教育福祉科学部・教授
研究者番号 : 80210087

(2)研究分担者

小田 裕昭 (ODA, Hiroaki)
名古屋大学・生命農学研究科・准教授
研究者番号 : 20204208

山田 耕史 (YAMADA, Koji)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・准
教授
研究者番号 : 00253469