

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K00824

研究課題名(和文) 二枚貝由来新規機能性成分の探索と作用機序の解明

研究課題名(英文) Search of bivalve-originated new functional ingredients and elucidation of action mechanism

研究代表者

望月 聡 (Mochizuki, Satoshi)

大分大学・教育学部・教授

研究者番号：80210087

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：タイワンシジミ由来の脂質画分より活性成分として得られた、ceramide phosphoramidate分子種のアナログ体の合成を試みた。セラミド部分の合成には成功したが、そのリン酸化反応が困難であり、引き続き反応条件の検討を行っている。シジミタンパク質は大豆タンパク質と似たような作用機序で血清コレステロールを低下させることが明らかとなった。シジミタンパク質は、大豆タンパク質と同様に、コレステロール異化代謝関連遺伝子の発現を亢進することが明らかとなった。シジミ以外の二枚貝として牡蛎に着目した。生体異物誘導性の脂質代謝異常に対しては、牡蛎は改善作用を有していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：An attempt was made to synthesize an analogue of ceramide phosphoramidate molecular species obtained as an active constituent from a lipid fraction derived from freshwater clam (*Corbicula fluminea*). Although the synthesis of the ceramide moiety was successful, its phosphorylation reaction was difficult. Therefore, the reaction condition is continuously examined at present. We found that protein fraction of freshwater clam extract (FCE) reduced serum level of cholesterol in rats fed a high cholesterol diet. Since the protein fraction of FCE enhanced catabolism of cholesterol as soy protein isolate did, both protein fraction of FCE and soy protein isolate changed cholesterol metabolism by a similar mechanism. In order to investigate the effect of other bivalves on lipid metabolism, we next focused on oyster.

研究分野：食品栄養学

キーワード：脂質代謝 シジミ 二枚貝 セラミドリン脂質 コレステロール

1. 研究開始当初の背景

人類は先史時代から貝類を重要なタンパク質源として多く食してきた。海で囲まれた日本では貝類は常食されているにもかかわらずその機能性の研究は限られている。古代中国の薬品事典には貝類が健康によいことが記され、日本では古くからシジミは肝臓機能の改善に有用であると言われてきている。しかしながら、これを科学的に証明した研究はきわめて少ない。一方、貝類は食物連鎖の上位に位置するため多くの海洋微生物の未同定の希少化合物を濃縮する工場として働いている。さらに、植物性プランクトンや藻なども餌とする場合には、動物でありながら植物性機能性成分の濃縮工場としても働いている。かつてマリンバイオロジーといわれ、海洋には未同定の機能性化合物があると期待され、創薬のリード化合物の探索が盛んに行われてきたが、身近な魚介類の機能性はむしろ後回しになった感がある。すでに私たちはこの新規化合物をシジミから見いだしており、動脈硬化症や脂肪肝を予防する新規脂溶性化合物を同定して、その作用機序を解明して、その誘導体の合成を行うことができると考えている。

シジミ以外の二枚貝についてもその生理作用はほとんどわかっていないが、シジミに新規化合物が発見されれば、その化合物を指標に他の二枚貝もスクリーニングできる。それにより幅広く多くの二枚貝の機能性探索につながるものと考えられる。

2. 研究の目的

貝類に関する研究が限られているため、食品化学的、栄養化学的にアプローチした貝類研究はわずかしかない。これまでの研究では、ある種の脂肪酸が関与しているという報告や、コレステロール代謝を改善させる作用が存在する研究成果が報告されている程度である。私たちは、シジミに古くから肝臓保護作用があるという伝承に注目して、肝臓における脂質代謝に注目して研究を行ってきた。

その結果、シジミ抽出物には、肝臓機能を保護または改善する作用があることを見だし、また血中コレステロール低下作用があることも明らかにした。そのコレステロール低下作用はこれまで知られている大豆、植物ステロールより強力であることも示した。さらに、肝脂質蓄積阻害作用もあることがわかった。これまでいわれてきたようにシジミには肝臓へ作用して、脂質代謝を変動させる作用があることを遺伝子レベルで明らかにすることができた。

シジミに含まれるいかなる成分が関与しているかを検討したところ、シジミ抽出物の脂質画分およびタンパク質画分に活性が存在することを明らかにした。そこで、まず

脂質画分に含まれる活性成分を明らかにしようとして、活性画分を明らかにした。そしてその作用機構の一部を明らかにした。その活性画分には、陸上生物には見られない新規な化合物(新規スフィンゴ脂質)が豊富に含まれていることを発見した。また、これらの新規化合物の作用点をDNAマイクロアレイなどバイオインフォマティクス解析により、絞り込むことに成功した。つまり、コレステロール代謝では異化代謝、肝臓脂質では合成酵素系が作用点であることがわかった。本研究では、その新規化合物の単離精製を行い、構造解析による創薬のリード化合物を同定することを目的としている。この新規活性成分を大量に合成し、その化合物がどのように作用するか、例えば酵素タンパク質に結合してアロステリックに作用するなどのメカニズムを明らかにする。

一方、タンパク質画分の血中コレステロール低下作用については、大豆タンパク質に匹敵する強い効果を示すが、アミノ酸組成に特徴的なものはなく、機能性ペプチドの存在が強く示唆されている。これまでに大豆タンパクをはじめとして、種々のタンパク質についてコレステロール代謝改善作用が報告されているが、貝類のタンパク質に関する知見は全く知られていない。これを明らかにすることがもう一つの主要な目的である。

さらには、シジミ以外の二枚貝においても血中コレステロール低下作用などの脂質代謝改善作用が観察されるか否かを明らかにすると共に、改善作用が認められた場合には、その関与物質が何であるか、作用機構はどのようなものであるかを明らかにしようとした。

3. 研究の方法

1) タイワンシジミに含まれる新規な化合物の単離、構造決定、合成

タイワンシジミの熱水抽出物 2.5kg の脂質画分より、 CHCl_3 / MeOH (2:1) 混液での抽出、シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる粗分画への分離、各粗分画について活性試験の実施、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、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うことによって得られた、ceramide phosphoramidate 分子種の機能解明を行うために、そのアナログ体の合成研究を行った。

2) タイワンシジミ由来の脂質画分およびタンパク質画分をラットに与えたときの作用機序

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イ解析を行い、バイオインフォマティクス解析を行った。リアルタイム PCR 解析により

定量解析を行った。

3) シジミ以外の二枚貝の脂質代謝改善作用
シジミと同様、古来より健康によいと言い
伝えられている牡蛎に着目した。牡蛎温水抽
出物を得て乾燥粉末とし、これを飼料に添加
したラットに投与した。肝臓及び血清を採取
し、コレステロールを中心に脂質成分を定量
した。

4. 研究成果

1) タイワンシジミに含まれる新規な化合物
の単離、構造決定、合成

タイワンシジミ由来の脂質画分より活性
成分として得られた、ceramide
phosphoramidate 分子種のアナログ体の合成
を試みた。具体的には、次のような順で、目
的アナログ体を合成することを立案し、実施
した。1) セラミドの長鎖塩基部分の構築す
る。2) 合成した長鎖塩基と脂肪酸によるア
ミド反応を行いセラミド部分を合成する。3)
セラミドの1位の水酸基のリン酸エステル
化反応を行う。4) リン酸基のアミド化反
応を行う。現在、合成の際、特に、長鎖塩
基のアルキル鎖長延長反応で行う、脱保護
反応時に、異性化もしくは分解反応が起
こり、低収率であることが判明した。現在、
セラミド部分の合成には成功しているが、
そのリン酸化反応が困難であり、反応条件
の検討を行っている。特に、セラミド1位
の1級水酸基のみをリン酸化するルートで、
主に、反応温度と反応溶媒の検討を行っ
たが、最適な条件を得ることができなかつ
た。従って、種々の反応条件を検討すると
ともに、一方で、天然由来(軟サンゴ由来)
のセラミド分子種を用いて、目的アナログ
体を半合成することも試みた。現在、1位
の水酸基をリン酸化するために、他の水
酸基の保護反応並びに脱保護反応の反応
条件の検討を行っているが、収率の向上
には至っていない。更に、タイワンシジ
ミ由来の脂質画分より新たに活性成分の
ceramide phosphoramidate 分子種を大量
に分離することも計画し、現在その準備
に入っている。

2) タイワンシジミ由来の脂質画分および
タンパク質画分をラットに与えたときの
作用機序

シジミタンパク質画分は、血清コレステ
ロール低下作用を示すが、その作用機序
を検討するため、血清コレステロール低
下作用を有する大豆タンパク質と小麦
グルテンとを比較した。一般に動物性
タンパク質は、血清コレステロールを
低下させないことが知られているが、
シジミタンパク質は大豆タンパク質
と似たような作用機序で血清コレステ
ロールを低下させることが明らかとな
った。シジミタンパク質は、大豆タン
パク質と同様に、コレステロール異
化代謝関連遺伝子の発現を亢進する
ことが明らかとなった。

シジミタンパク質画分は、高コレステ
ロール食を与えたラットにおいて血清
コレステロール低下作用を示すが、
生体異物誘導性の高コレステロール
血症も改善する。その作用機序を
検討する目的でマイクロアレイ解
析を行った。その結果、シジミタン
パク質画分には、コレステロール異
化代謝の亢進と、脂肪酸合成能の
低下が見られた。シジミタンパク
質画分は、脂質画分と異なる作用
機序によってコレステロール代謝
を改善することが明らかとなった。

3) シジミ以外の二枚貝の脂質代謝改善
作用
シジミ以外の二枚貝として牡蛎に
着目した。高コレステロール食に牡
蛎エキスを添加してラットに与え
たときは、脂質代謝改善作用は認
められなかった。しかしながら、
生体異物誘導性の脂質代謝異常
に対しては、牡蛎は改善作用を有
していることを明らかにした。す
なわち、生体異物によって誘導
された肝臓脂質の蓄積に対して、
牡蛎温水抽出物を飼料に添加し
てラットに与えたところ、投与
量に依存して肝臓脂質の減少が
認められた。その作用機序とし
て、生体異物による脂質合成の
促進に対して、牡蛎が抑制作用
を有しているのではないかと推
察した。血清脂質に対しては大
きな影響は認められなかった。

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)

Amgad I.M. Khedra, Sabrin R.M. Ibrahim, c, Gamal A. Mohamed, e, Samir A. Rossf, Koji Yamada, : Panduramides A-D, new ceramides from Ficus pandurata fruits. *Phytochemistry Letters*, 査読有 オープンアクセス 2018 DOI:10.1016/j.phytol.2017.11.023

Reda F. A, Amany K. I, Tarek A. T, Koji Y, Safwat A. A, : Chemical and Biological Investigation of the Red Sea Sponge Echinoclathria species. *J Pharm Sci & Res.*, 査読有 2017, 1324-1328

Amgad I. M. Khedr, Sabrin R. M. Ibrahim, Gamal A. Mohamed, Hany E. A. Ahmed, Amany S. Ahmad, Mahmoud A. Ramadan, Atef E. Abd El-Baky, Koji Yamada, Samir A. Ross, : New ursane triterpenoids from Ficus pandurata and their binding affinity for human cannabinoid and opioid receptors. *Arch. Pharm. Res.*, 査読有 2016, 897-911 DOI:10.1007/s12272-016-0784-y

[学会発表](計3件)

山田耕史、千々松武司、梅木美樹、小田

裕昭、望月聡：台湾シジミ抽出物に含まれる新規セラミドの探索 日本農芸化学会 2018年度大会 2018.3

Reda F. A. Abdelhameed, Safwat A. Ahmed, Koji Yamada : Chemical Studies on the Ghanaian Plant Thonningia sanguinea Vahl (Part 1) 日本薬学会第137年会 2017.3

Reda F. A. Abdelhameed, Safwat A. Ahmed, Koji Yamada : 紅海産海草 *Stylissa carteri* の生物活性成分に関する化学的研究(第1報) 第33回日本薬学会九州支部大会 2016.12

〔産業財産権〕

取得状況(計1件)

名称：新規化合物、脂肪肝の予防又は治療剤、血中コレステロール低下剤及び血中コレステロール低下用食品組成物

発明者：千々松武司、望月聡、山田耕史

権利者：佐々木食品工業株式会社

種類：特許

番号：特許第6242532号

取得年月日：平成29年11月17日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

望月 聡 (MOCHIZUKI, Satoshi)

大分大学・教育学部・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

(3)研究分担者

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