

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月18日現在

機関番号：54701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K00866

研究課題名(和文) 香酸柑橘ジャバラ由来抗肥満成分の探索と作用機構の解明

研究課題名(英文) Antiobesity compounds from Citrus jabara and there mode of action

研究代表者

奥野 祥治 (Okuno, Yoshiharu)

和歌山工業高等専門学校・生物応用化学科・准教授

研究者番号：60458073

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：和歌山県北山村原産の香酸柑橘であるジャバラ(Citrus jabara)果皮水抽出物の抗肥満物質について検討した。その結果、ジャバラ果皮水抽出物から3T3-L1脂肪細胞に対する脂肪蓄積抑制物質として、3種のポリメトキシフラボノイドを見いだした。これらの化合物は、3T3-L1脂肪細胞に対して強い脂肪蓄積抑制効果、GPDH誘導抑制効果および脂肪分解効果を示した。さらに、最も強い効果を示した化合物について、リアルタイムRT-PCRを用いて脂肪蓄積に関与する遺伝子の発現解析を行った結果、活性物質は脂肪蓄積に関与する遺伝子の発現を抑制することにより、脂肪の蓄積を抑制していることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、これまでに機能性研究が行われていなかった香酸柑橘ジャバラより3種の抗肥満効果を有する化合物を見だし、それらの作用機構についても明らかにした。肥満の予防・改善は世界的な課題となっており、本研究成果は肥満の新たな予防・改善法として期待できるものである。また、作用機構の一部を解明できたことは学術的にも高い意義があり、今後の研究の発展が期待できるものであるといえる。

研究成果の概要(英文)：In this study, inhibitory effects of water extract from C. jabara peel (JWE) on lipid accumulation of 3T3-L1 adipocytes were investigated. Three active polymethoxyflavonoids, 3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxyflavone (1), 3-hydroxy-5,6,7,8,3',4'-hexamethoxyflavone (2) and 3,5,6,7,3',4'-hexamethoxyflavone (3) were isolated from JWE. These compounds were significantly decreased lipid accumulation on 3T3-L1 cells. These compounds suppressed the GPDH induced-activity in a dose-dependent manner. Moreover, lipolytic activity of compounds on 3T3-L1 adipocytes was determined by measuring glycerol levels. These compounds enhanced the lipolytic effect.

The effects of compound 1 on mRNA expression of adipogenesis-related gene in 3T3-L1 adipocytes were investigated. The mRNA expression of PPARgamma and GLUT4 were markedly down-regulated by 1. On this results, compound 1 suppressed lipid accumulation through down-regulating the expression of PPARgamma and GLUT4 in 3T3-L1 adipocytes.

研究分野：天然物化学

キーワード：ジャバラ 抗肥満効果 ポリメトキシフラボノイド 3T3-L1細胞 脂肪分解活性 香酸柑橘

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、生活習慣の欧米化に伴い日本人の肥満の有病者数は予備軍を含めると 2000 万人を突破したともいわれ、国内での肥満の予防・改善が大きな課題となっている。肥満は、生体が余剰なエネルギーを蓄積することによって脂肪細胞のサイズが増大し、さらに新たな脂肪細胞が増加することによって引き起こされ、高血圧、糖尿病、動脈硬化といったメタボリックシンドロームを引き起こす最大の要因であるといわれている。近年、肥満予防法として、前駆脂肪細胞から脂肪細胞への分化を促進することで脂肪細胞の数を増加させる、脂肪の蓄積を抑制し、脂肪細胞が肥大化するのを防ぐ、肥大化した脂肪細胞に蓄積されている脂肪を分解することにより、脂肪細胞を小型化する、3 つの方法が提案されており、これらの機能性を持つ食品成分の研究が近年盛んに行われており、多くの報告がなされている。申請者はこれまでの予備研究において、数種の植物抽出物の前駆脂肪細胞 3T3-L1 株に対する分化促進効果について検討したところ、ジャバラ (*Citrus jabara*) 果皮水抽出物に強い脂肪滴蓄積抑制効果があることを見出し、今回の研究対象とした。

2. 研究の目的

ジャバラは和歌山県北山村原産の香酸柑橘類であり、果汁に抗アレルギー作用があることが報告されているが、その他に機能性についての研究は全くされていない。本研究では、ジャバラ果皮水抽出物が 3T3-L1 脂肪細胞に対して脂肪滴蓄積抑制効果を示したことから、ジャバラ果皮に含まれる抗肥満活性物質に着目し、ジャバラ果皮に含まれる抗肥満活性物質の探索およびそれらの作用機構の解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 脂肪蓄積抑制試験

10% 仔牛血清含有 DMEM 培地で 80% コンフルエントまで培養した 3T3-L1 脂肪前駆細胞を 1×10^4 cell/well となるように 96 ウェルマイクロプレートに分注し、5% CO₂、37 °C の条件下で 3 日間培養した。培養後、DMSO に溶解し、各濃度に調整したサンプルを 2:1000 となるように添加した維持培地 (10% FBS 含有 DMEM 培地 + 5 µg/mL insulin) 100 µL に入れ替え、同条件で 48 時間培養した。その後、insulin (最終濃度 10 µg/mL) のみを加えた培地を 2 日おきに交換し、4 日間培養後、蓄積された脂肪を Oil red O 染色により赤く染色した。染色した細胞を顕微鏡観察した後、染色色素を抽出し、マイクロプレートリーダーで 540 nm の吸光度を測定した。分化処理した脂肪細胞に DMSO のみを加えた培地で同期間培養した細胞をコントロールとした。

(2) GPDH 誘導活性試験

脂肪細胞のグリセロール-3-リン酸脱水素酵素 (GPDH) 誘導活性に対する効果は、脂肪蓄積抑制試験と同じ方法で培養した細胞を用いて、GPDH activity assay Kit (Takara) により測定した。

(3) 脂肪分解試験

10% 仔牛血清含有 DMEM 培地で 80% コンフルエントまで培養した 3T3-L1 脂肪前駆細胞を 1×10^4 cell/well となるように 96 ウェルマイクロプレートに分注し、5% CO₂、37 °C の条件下で 3 日間培養した。培養後、分化培地で 2 日間培養した後、維持培地を 2 日おきに交換し、8 日間培養後、肥大化した脂肪細胞に各濃度に調整した活性物質を 2:1000 となるように添加し、48 時間培養した。その後、培地上清に溶出したグリセロール量を Adipolysis assay kit (Funakoshi) により測定した。

(4) 脂肪細胞に対する活性物質の細胞膜透過性検討

活性物質の水溶性と活性の関係について検討するため、活性物質の細胞内への透過性について評価した。サンプルを添加し、24 時間培養後、培地上清を回収し、Sep-Pack C18 Cartridge (Waters) にアプライし、メタノール 2 mL で溶出した。培地上清を回収後の細胞は Passive Solution を用いて破碎し、培地上清と同様の処理を行い、分析サンプルを調製した。上清および細胞破碎液から調整した分析サンプルを HPLC により分析することで、細胞内外に存在するサンプル量を定量した。

(5) リアルタイム RT-PCR

脂肪蓄積抑制試験の 6 日目に RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて脂肪細胞より、RNA の抽出を行った。抽出した RNA 1 µg を用いて、QuantiTect Reverse Transcription (QIAGEN) で逆転写反応を行い、cDNA 化した。cDNA は Rotor-Gene SYBR Green (QIAGEN) を用いて、リアルタイム PCR により PPAR γ および GLUT4 の発現を分析した。

(6) 活性物質の単離

ジャバラ果皮からの活性物質の単離は、脂肪蓄積抑制効果を指標とした。ジャバラ果皮水抽出液を水-メタノール系で DIAION HP20 を充填剤としたカラムクロマトグラフィーにより分画した。得られた fraction の内、脂肪滴蓄積抑制効果が見られた EtOAc fraction (500 mg) を Hexane

と EtOAc を溶出溶媒とした SiO₂ カラムクロマトグラフィーにより分画し、活性物質を精製した。得られた化合物の構造は ¹H および ¹³C NMR により決定した。

4. 研究成果

(1) 活性物質の単離

ジャバラ果皮水抽出物からの活性物質の単離は、3T3-L1 脂肪細胞に対する脂肪蓄積抑制効果を指標とした。ジャバラ果皮水抽出物を DIAION HP20 を充填剤としたカラムクロマトグラフィーにより水-メタノール系で 6 つの fraction に分画した。得られた fraction について、抗肥満活性試験を行ったところ、EtOAc Fr.に強い活性が見られたことから、EtOAc Fr.を SiO₂ カラムクロマトグラフィーにより分画し、3 種類の活性物質 1 (83 mg)、2 (28 mg)、3 (19 mg) を得た。

得られた活性物質 1-3 の構造は、GC-MS、NMR スペクトルによりポリメトキシフラボノイドである 3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxyflavone (1)、3-hydroxy-5,6,7,8,3',4'-hexamethoxyflavone (2:natsudaidain) および 3,5,6,7,3',4'-hexamethoxyflavone (3) と決定した (図 1)。

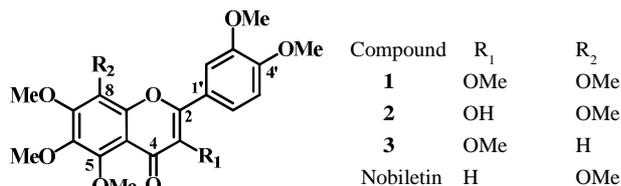


図 1. 活性物質の構造

(2) 脂肪蓄積抑制効果

化合物 1-3 の抗肥満効果を検討するため、3T3-L1 脂肪細胞に対する脂肪蓄積抑制試験を行った。脂肪蓄積抑制試験では、サンプル添加後 6 日目に脂肪滴を Oil red O 染色により赤く染色し、顕微鏡観察し、さらに吸光度計により脂肪の蓄積量を測定した。脂肪の蓄積量を測定した結果、化合物 1-3 は 200 μM で脂肪の蓄積をそれぞれ 1/2、1/2、1/7 に抑制した (図 2)。また、化合物 1-3 は肥満改善のサプリメントとして利用されているポリメトキシフラボノイドである nobiletin をはるかに上回る脂肪蓄積抑制効果を示すことが明らかとなった。

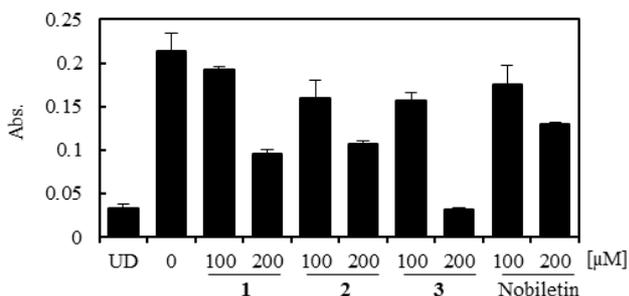


図 2. 化合物 1-3 の脂肪滴蓄積抑制効果

(3) GPDH 誘導に対する効果

グリセロール-3-リン酸脱水素酵素 (GPDH) 誘導活性は、細胞内でトリグリセリドが脂肪として蓄積される際に誘導される酵素である。そこで、脂肪蓄積抑制効果の作用機構を解明するため、脂肪蓄積と相関がある GPDH 誘導活性に対する 1-3 の効果についても検討した。その結果、1-3 はサンプルを加えていない脂肪細胞と比較して、200 μM で GPDH の誘導活性をそれぞれ 1/7、1/4、1/8 に抑制した (図 3)。

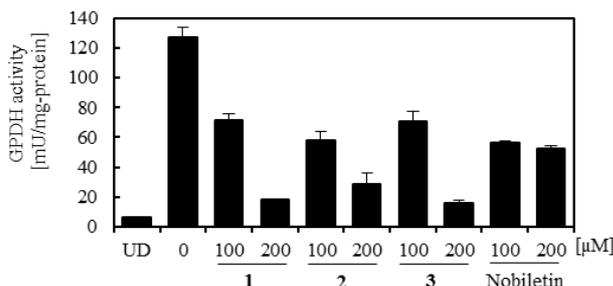


図 3. 化合物 1-3 の GPDH 誘導抑制効果

(4) 脂肪分解効果

化合物 1-3 の肥大化した脂肪細胞に対する効果を検討するため、脂肪分解試験を行った。脂肪細胞内に蓄積された脂肪は分解されると脂肪酸とグリセロールとなり細胞外へ溶出される。脂肪分解試験では、脂肪細胞にサンプルを添加し、2 日間培養した後に細胞外に溶出されたグリセロール量を測定することで脂肪分解効果として評価した。その結果、1-3 は、サンプルを加えていない脂肪細胞と比較し、200 μM でそれぞれ 7 倍、2 倍、

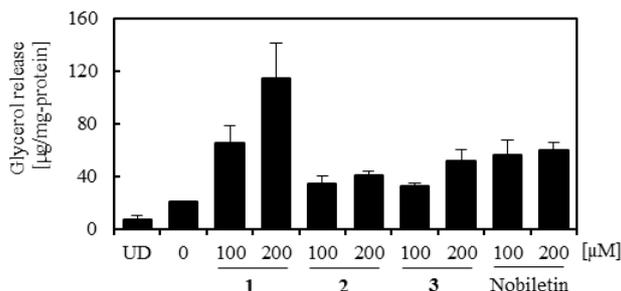


図 4. 化合物 1-3 の脂肪分解効果

3 倍の脂肪分解効果を示した (図 4)。特に **1** は強い脂肪分解効果を示し、nobiletin をはるかに上回る脂肪分解効果を示した。

(5) 活性物質の脂肪細胞に対する細胞膜透過性

構造活性相関として、各化合物の水溶性と活性の関係について検討した。化合物 **1-3** の ClogP はそれぞれ 1.51、1.15、1.64 であった。脂肪滴蓄積抑制効果の強いものほど ClogP の値が大きくなっており、脂肪蓄積抑制効果と化合物の水溶性には強い相関があることが明らかとなった。このことより、各化合物の脂肪細胞に対する膜透過性について検討した。その結果、化合物 **1-3** はそれぞれ細胞内に浸透していた (図 5) が、定量的な結果は得られなかった。また、化合物 **2** については、HPLC により原料以外の化合物のピークが検出されたため、HRESI-MS による質量分析を行った結果、化合物 **2** はグルクロン酸抱合していることが明らかとなった。

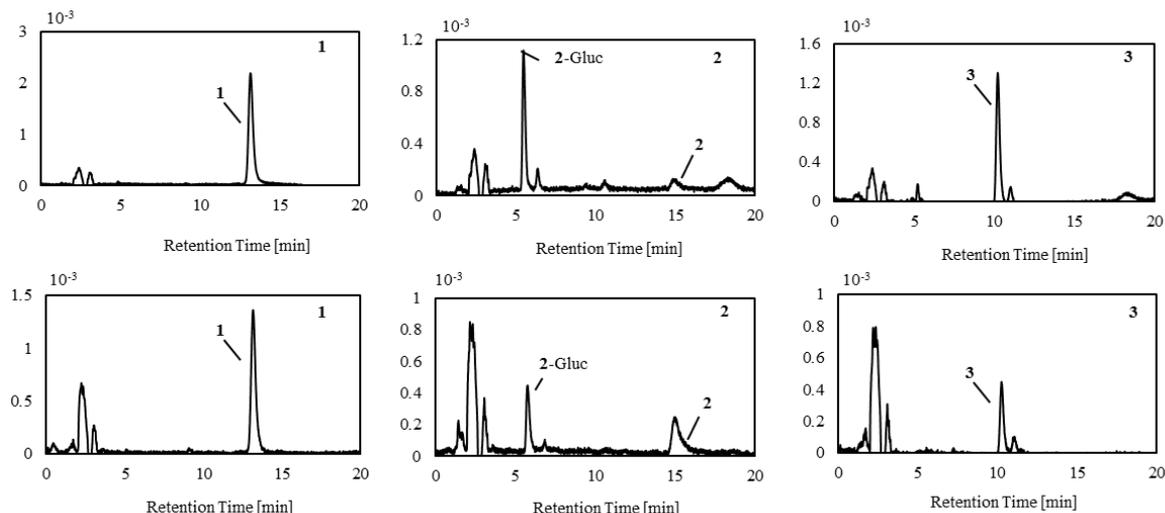


図 5 . 化合物 **1-3** の細胞上清および細胞破碎液中の存在分析

(6) リアルタイム RT-PCR による遺伝子発現解析

脂肪の蓄積は様々な段階を経て進行し、各段階において特定の遺伝子やタンパク質の発現が起こっている。例えばペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 (PPAR γ) や CCAAT/エンハンサー結合タンパク質 (C/EBP α) は脂質生成における転写因子として重要な役割を持つ。分化後の脂肪細胞の脂肪の代謝は、脂肪酸合成タンパク質 (FAS) やグルコース輸送タンパク質 4 (GLUT4) によって調整される。そこで、抗肥満効果の作用機構の解明として、リアルタイム RT-PCR を用い、化合物 **1** の脂肪蓄積における遺伝子の発現解析を行った。その結果、化合物 **1** は脂肪蓄積に関与する遺伝子である PPAR γ および GLUT4 の発現を抑制していた (図 6)。

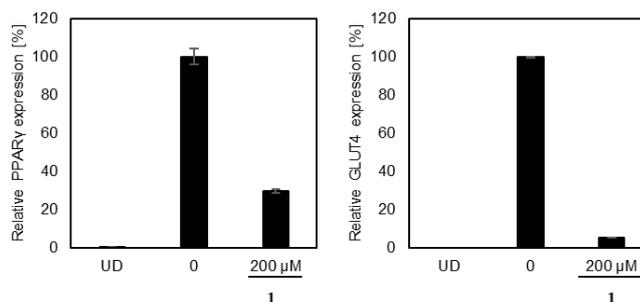


図 6 . 化合物 **1-3** の脂肪分解効果

(7) まとめ

本研究において、ジャバラ果皮から抗肥満活性物質として 3 種類のポリメトキシフラボノイドを単離し、その構造は 3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxyflavone (**1**)、3-hydroxy-5,6,7,8,3',4'-hexamethoxyflavone (**2**)、3,5,6,7,3',4'-hexamethoxyflavone (**3**) と決定した。化合物 **1-3** は脂肪細胞に対して強い脂肪蓄積抑制効果を示し、特に化合物 **3** が最も強い脂肪蓄積抑制効果を示した。また、化合物 **1-3** は細胞内の脂肪の蓄積に関与する GPDH 酵素の誘導活性を抑制した。GPDH は前駆脂肪細胞が脂肪細胞に分化する際に、急増することが知られており、脂肪細胞の分化機構を解明する主な分化指標として利用されている。すなわち、脂肪蓄積の抑制は、化合物 **1-3** による GPDH の誘導抑制が要因ではないかと考えられた。さらに、脂肪細胞に蓄積された脂肪の分解試験においても化合物 **1-3** は脂肪分解効果を示したことから、化合物 **1-3** は肥大化した脂肪細胞に対しても作用し、脂肪を分解することが明らかとなった。

抗肥満効果の作用機構の解明として、リアルタイム RT-PCR を用い、化合物 **1** の脂肪蓄積における遺伝子の発現解析を行った。化合物 **1** は脂肪蓄積に関与する遺伝子である PPAR γ および GLUT4 の発現を抑制していた。このことから **1** を脂肪細胞に添加することにより、PPAR γ およ

び GLUT4 の発現が抑制され、その結果、脂肪の蓄積が抑制されたのではないかと考えられた。また、Choi らは nobiletin は PPAR γ のシグナル伝達経路を通じて 3T3-L1 脂肪細胞の脂質の生成を抑制すると報告している¹⁾。さらに、Pinent らは 3T3-L1 脂肪細胞に対して脂肪分解効果を示したグレープフルーツ由来 procyanidins が PPAR γ の発現を抑制していたことを明らかにしている²⁾。ポリメトキシフラボノイドは PPAR γ の発現を抑制することにより、脂肪の蓄積を抑制していることから、化合物 2 および 3 についても b と同様の機構で脂肪の蓄積を抑制していると考えられたが、これらの検討は今後の課題である。

以上の結果より、ジャバラ果皮エキスおよびジャバラ果皮は肥満の予防・改善に対して大変有効であり、今後、動物実験やヒト臨床試験を行うことにより、機能性食品と指定の展開も大いに期待できるものと考えられた。

<引用文献>

- 1) Choi Y., Kim Y., Hyeonmi H. Yooheon P., Jeong HS, Lee J., Nobiletin suppresses adipogenesis by regulating the expression of adipogenic transcription factors and the activation of AMP-activated protein kinase (AMPK)., *J. Agric. Food Chem.*, **59**, 12843-12849. (2011).
- 2) Pinent M., Blade C. M., Salvado M. J., Arola L., Ardevol A., Intracellular mediators of procyanidin-induced lipolysis in 3T3-L1 adipocytes., *J. Agric. Food Chem.* **53**, 262-266. (2005).

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

奥野祥治、香酸柑橘ジャバラの抗肥満効果、アグリバイオ、査読なし、Vol. 3, No. 1, 2019、56-57.

[学会発表](計 8 件)

奥野祥治、県産農産物の機能性解明と有用物質の生産、イオン液体の革新的応用展開ネットワーク講演会、2019年2月8日、三重

奥野祥治、和歌山県産農産物の機能性探索とそれらを活用した食品開発、アグリビジネスフェア in 東海、2019年1月25日、愛知

奥野祥治、大田時帆、宇都宮洋才、河野良平、野村幸子、ジャバラ果皮由来ポリメトキシフラボノイドの抗肥満活性、日本農芸化学会関西支部講演会、2018年9月14日、京都

Shiho Ohta, Yoshiharu Okuno, Antiobesity compounds from Citrus jabara, International conference of Food Chemistry and Technology, 2016年11月14日、America

Yoshiharu Okuno, Saki Nomura, Shohei Yamato, Ryohei Kono, Sachiko Nomura, Akihiro Maeno, Hiroto Utsunomiya, Yoshiharu Okuno, Differential effects of Vanillin and Syringaldehyde from seed of Japanese apricot on 3T3-L1 adipogenesis, International conference of Food Chemistry and Technology, 2016年11月14日、America

大田時帆、奥野祥治、ジャバラ果皮に含まれる抗肥満成分、日本農芸化学会 2016 年度大会、2016年3月5日、北海道

奥野祥治、和歌山県産農産物の機能性食品への利用、メディカルジャパン 2016、2016年2月25日、大阪

奥野祥治、県産農産物を利用した肥満予防・改善効果、第 24 回わかやまテクノ・ビジネスフェア、2015年10月15日、和歌山

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：宇都宮 洋才

ローマ字氏名：UTSUNOMIYA hirotoshi

所属研究機関名：和歌山県立医科大学

部局名：共同利用施設

職名：准教授

研究者番号（8桁）：60264876

研究分担者氏名：河野 良平

ローマ字氏名：Kono ryohei

所属研究機関名：和歌山県立医科大学

部局名：機能性医薬食品探索講座

職名：助教

研究者番号（8桁）：70569110

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。