

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K14406

研究課題名（和文）新規食品機能成分シフォナキサンチンの生体内代謝の全容の解明

研究課題名（英文）Investigation of Outline of Metabolic Conversion of Siphonaxanthin

研究代表者

真鍋 祐樹（Manabe, Yuki）

京都大学・農学研究科・助教

研究者番号：20730104

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：シフォナキサンチンは、海ぶどうなどの食用緑藻に含まれるカロテノイドであり、強い抗炎症作用を示すことから、新規食品機能性成分としての有効利用が望まれている。本研究では、ヒトにおけるシフォナキサンチンの代謝変換とその生理的意義を明らかにすることを目的とした。主要な代謝産物である酵素的酸化物の化学構造を決定し、それらがヒトにおいても生成され得ることを示した。また、シフォナキサンチンよりも酵素的酸化物の方が強い抗炎症作用を有することを見出した。さらに、シフォナキサンチンの抱合体の存在を初めて発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

代謝変換によって生物活性を失う食品成分も存在するため、食品機能性成分としてシフォナキサンチンを有効利用するためには、その生体内代謝と代謝産物の生物活性を調べる必要があった。本研究によって、シフォナキサンチンの主要な代謝産物として酵素的酸化物が同定され、さらに、酵素的酸化物の方が強い抗炎症作用を示すことが明らかになった。これはすなわち、生体内でシフォナキサンチンの酵素的酸化を促進するような食品成分を探索すれば、シフォナキサンチンの抗炎症作用を増強するような食べ合わせの発見に繋がることを示している。また、フルサイズのカロテノイドの抱合体の報告はこれまでになく、学術的に意義がある発見といえる。

研究成果の概要（英文）：Siphonaxanthin is a carotenoid found in some edible green algae such as sea grapes, *Caulerpa lentillifera*. Because of its potent anti-inflammatory activity, it is desired to use siphonaxanthin as a novel food functional ingredient. In this study, we aimed to reveal metabolic conversion of siphonaxanthin in human and its physiological significance. The chemical structures of the major metabolites, enzymatic oxidants, were determined and it was shown that they can be produced in humans. We also found that the enzymatic oxidants have stronger anti-inflammatory activity than siphonaxanthin. In addition, we found that siphonaxanthin can undergo a conjugation reaction in the liver. To our best knowledge, this is a first report of the presence of conjugates of full-length carotenoids.

研究分野：食品科学

キーワード：シフォナキサンチン カロテノイド 生体内代謝

1. 研究開始当初の背景

天然脂溶性色素であるカロテノイドは、プロビタミン A 活性のみならず、ヒトの眼疾患や生活習慣病に改善効果があるとされ、近年、食品として、その機能性に注目が集まっている。実際、カロテノイドの食品機能性については *in vitro* 試験からヒト介入試験、疫学調査に至るまで、実に広く盛んに研究されている。一方、カロテノイドの生体内代謝については、プロビタミン A カロテノイドがレチナールへと変換される反応が有名であるが、それ以外については、未だ明らかにされていない部分が多く残されている。

研究代表者らは海ぶどう (クビレズタ *Caulerpa lentillifera*) などの食用緑藻のカロテノイドであるシフォナキサンチンに注目し、その生物活性の探索と作用メカニズムの解析(1-3)、消化管吸収メカニズム(4)、さらには生体内代謝についての研究を進めている。その成果として、他のカロテノイドと比較して、シフォナキサンチンがユニークかつ強い抗炎症作用を有すること、また、シフォナキサンチンを経口摂取させたマウスの体内では、元の化学構造を維持したものよりも酵素的酸化物の方が多く蓄積することを見出している (図 1)。

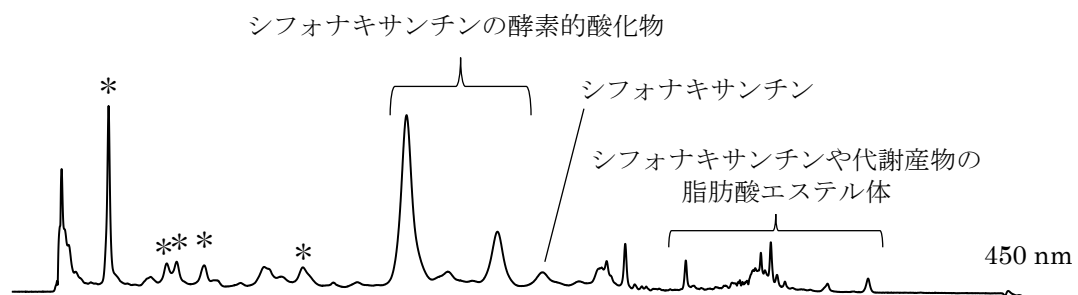


図1. シフォナキサンチン摂取マウスの肝臓抽出物のHPLC分析結果

シフォナキサンチンとよく似た化学構造を有するルテインは、酵素的酸化の他に β -カロテン 9',10'-オキシゲナーゼ (BCO2) による開裂反応を受けることが報告されている(5)。また、BCO2 欠損マウスでは、野生型マウスと比べてルテインの酵素的酸化物が蓄積しやすいと報告されており(5)、酵素的酸化が開裂反応に先じる可能性がある。さらに β -カロテンの開裂産物(6)やクロロセチン(7)など、炭素数の少ないカロテノイド関連化合物は抱合反応を受けることが知られている。研究代表者らは、シフォナキサンチンが酵素的酸化や脂肪酸エステル化を受けることを見出しており、さらに図 1 で*を付したピークは、吸収スペクトルや HPLC 分析の保持時間からシフォナキサンチンの代謝産物と考えられたが、それぞれの代謝反応の関係性も含めたシフォナキサンチンの生体内代謝の全体像は明らかになっていなかった (図 2)。

また、少なくともマウスにおいては、酵素的酸化物がシフォナキサンチンの主要な代謝産物と考えられたが、その生物活性は明らかになっていなかった。すなわち、酵素的酸化反応が、シフォナキサンチンの生物活性に与える影響は明らかになっていなかった。

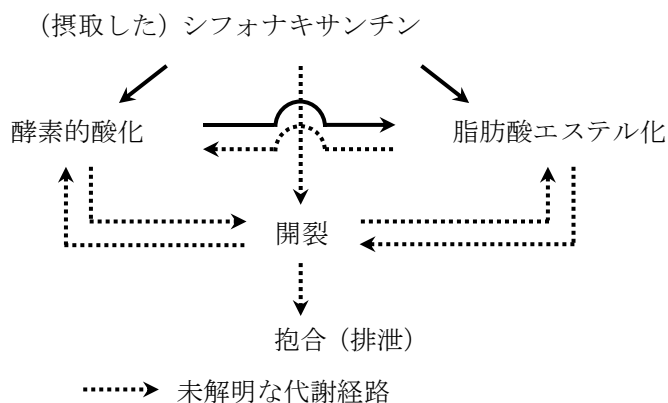


図2. 研究開始当初に推定していたシフォナキサンチンの生体内代謝

2. 研究の目的

上述の背景を踏まえ、本研究では以下の 2 点に取り組み、シフォナキサンチンについてはカロテノイドの生体内代謝の全体像の把握 (どのような代謝反応が存在し、そのそれぞれの代謝反応が起こる順番を明らかにすること) や生理的意義 (特に抗炎症作用に与える影響) を解明することを目的とした。

- (1) 細胞モデルにおけるシフォナキサンチンの代謝変換の全体像の把握
- (2) シフォナキサンチン代謝産物の抗炎症作用の評価

3. 研究の方法

(1) 細胞モデルにおけるシフォナキサンチンの代謝反応の全体像の把握

研究代表者らは、肝実質細胞のモデルとして利用される HepG2 細胞や小腸上皮様に分化させた Caco-2 細胞において、シフォナキサンチンが酵素的酸化や脂肪酸エステル化を受けることを見出している(8, 9)。そこで本研究では、これらの細胞に加え、BCO2 のタンパク質発現が報告されているラット肝がん由来細胞株 McA-RH7777(10)、さらには、ヒト初代肝細胞の代替として薬物動態や薬理試験に用いられる HepaRG 細胞を用いてシフォナキサンチンの代謝反応の全体像の把握を試みた。具体的には、上述の培養細胞をシフォナキサンチン含有培地中で培養し、一定時間後に HPLC-PDA や LC-MS を用いてシフォナキサンチンとその代謝産物の蓄積量を分析した。

(2) シフォナキサンチン代謝産物の抗炎症作用の評価

研究代表者らは、ラット好塩基性白血球細胞株 RBL-2H3 を用いた検討によって、シフォナキサンチンが他のカロテノイドよりも強い抗炎症作用(脱顆粒抑制作用)を示すことを見出している。また、アトピー性皮膚炎モデルである NC/Nga マウスにおいて、経口摂取したシフォナキサンチンがアレルギー性の炎症応答(耳介浮腫)を抑制することも見出している。そこで本研究では、RBL-2H3 細胞の脱顆粒反応に対するシフォナキサンチン代謝産物の抑制作用を調べた。具体的には、抗ジニトロフェノール(DNP) IgE 抗体で感作した RBL-2H3 細胞をシフォナキサンチン代謝産物含有培地中で 24 時間培養し、DNP 標識ウシ血清アルブミン(DNP-BSA)を用いて脱顆粒反応を誘導した。一定時間培養した後、培養上清の β -ヘキソサミニダーゼ活性を測定することによって脱顆粒率を評価した。

4. 研究成果

(1) 細胞モデルにおけるシフォナキサンチンの代謝反応の全体像の把握

本研究で使用した 4 種類の培養細胞におけるシフォナキサンチンの酵素的酸化物の生成を表 1 にまとめた。また、肝臓ホモジネートを用いた *in vitro* 酵素反応系によって、これらの酵素的酸化物をそれぞれ調製し、NMR 解析によって化学構造を同定した(図 3)。

表 1. 培養細胞におけるシフォナキサンチンの酵素的酸化

細胞名	由来	酵素的酸化物		
		DDM	DDS	TDM
HepaRG	ヒト肝臓	+	trace	-
HepG2	ヒト肝がん	+	trace	-
Caco-2	ヒト小腸上皮様	+	+	+
McA-RH7777	ラット肝がん	-	+	-

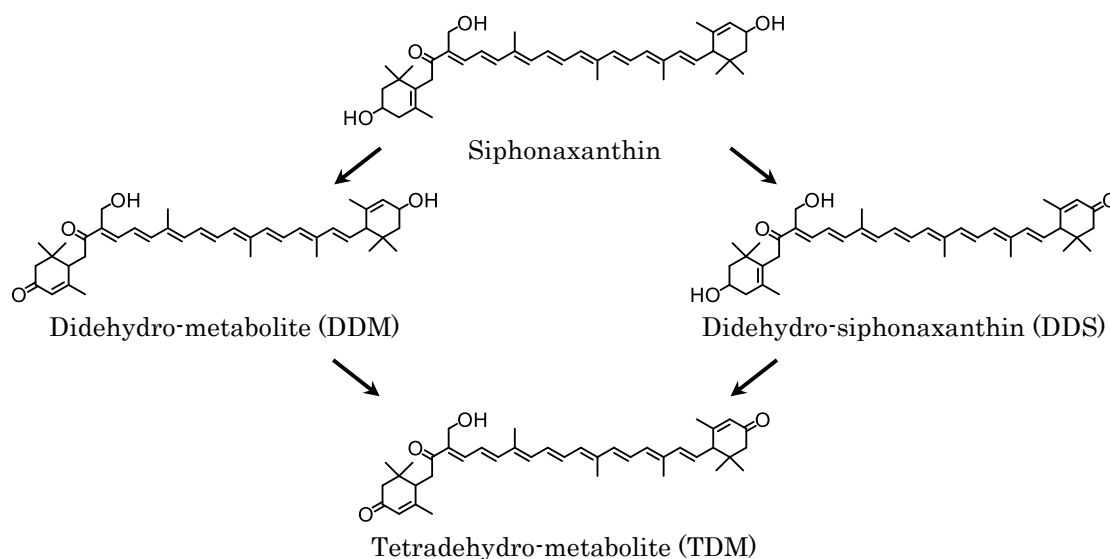


図 3. シフォナキサンチン酵素的酸化物の化学構造と推定される代謝経路

化学構造の特徴からシフォナキサンチンは DDM や DDS を介して TDM へと代謝されると考えられた。また、生成する酵素的酸化物の種類は、種や臓器によって異なることが明らかになった。さらに、これら 4 種類の培養細胞では、酵素的酸化物以外の代謝産物も生成された(表 2)。

表2. 培養細胞におけるシフォナキサンチンの代謝変換

細胞名	由来	代謝反応		
		脂肪酸エステル	開裂	抱合
HepaRG	ヒト肝臓	trace	—	+
HepG2	ヒト肝がん	+	—	—
Caco-2	ヒト小腸上皮様	+	—	—
McA-RH7777	ラット肝がん	trace	—	+

シフォナキサンチンの抱合体は、これまでに全く報告がなく、本研究で初めて見出された代謝産物である。想定していた経路(図2)とは異なり、シフォナキサンチンは開裂反応を受けずに、直接、抱合反応を受ける可能性が示唆された。また興味深いことに、共にヒトの肝臓に由来するHepaRG細胞とHepG2細胞では、抱合反応と脂肪酸エステル化反応の程度が異なっていた。薬物代謝に関する研究では、HepaRG細胞の方がヒトの肝臓に近いモデルとして用いられるため、シフォナキサンチンの抱合反応は、ヒトの肝臓においても起こり得ると考えられる。逆に開裂反応については、HepaRG細胞において確認できなかったため、シフォナキサンチンはヒトの肝臓において開裂反応を受けにくい可能性が考えられる。いずれの代謝反応についても、薬物代謝研究用として市販されているヒト肝臓ホモジネートなどを用いた更なる検討が必要といえる。

検討した4種類の培養細胞の中では、Caco-2細胞が最も多くの種類の代謝産物を生成した。そこでCaco-2細胞を用い、それぞれの代謝産物の生成における経時変化を検討した。図4に示す通り、TDMは培養開始24時間後に検出され、DDMやDDSは培養開始6時間後から検出された。TDMがDDMやDDSに遅れて生成したことから、TDMはDDMやDDSを介して生成されるものと考えられた。これは化学構造から推定した代謝経路と矛盾しない。脂肪酸エステルは2種類検出され、いずれも培養開始3時間後から検出された。酵素的酸化物よりも早い時間から検出されたことから、酵素的酸化物ではなくシフォナキサンチンが脂肪酸エステル化反応を受けたと考えられた。

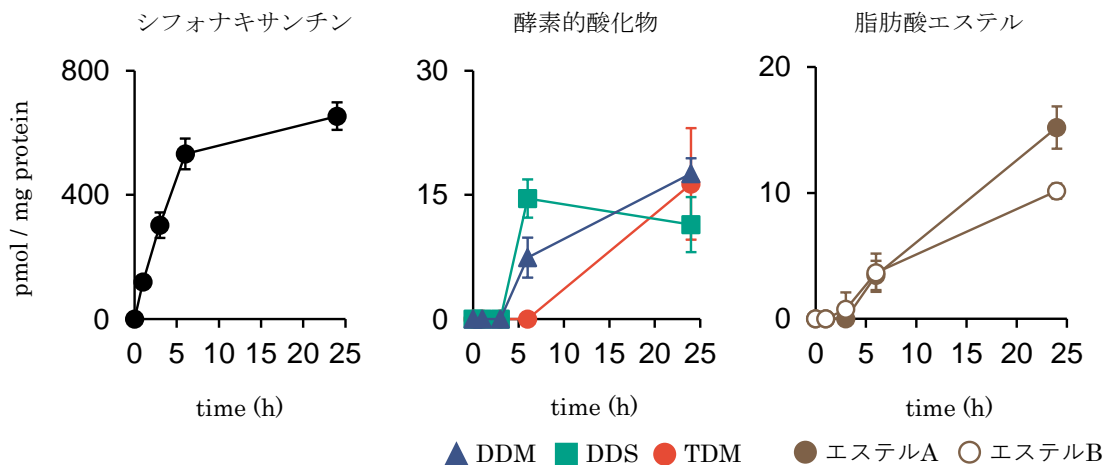


図4. Caco-2細胞におけるシフォナキサンチン代謝産物生成の経時変化

Caco-2細胞では抱合反応が確認できなかったため、抱合反応と酵素的酸化や脂肪酸エステル化の関係については、McA-RH7777細胞を用いた検討を進めた。McA-RH7777細胞をシフォナキサンチン含有培地中で培養した場合、DDS、抱合体、脂肪酸エステル体の3種類の代謝産物が検出されたが(表1、2)、DDS含有培地中で培養した場合は抱合体も脂肪酸エステル体も検出されなかった。すなわち、酵素的酸化と抱合反応および脂肪酸エステル反応は並列関係にあると考えられた。

(2) シフォナキサンチン代謝産物の抗炎症作用の評価

上述の細胞モデルを用いた検討やマウスにおけるシフォナキサンチン代謝産物の組織分布の解析結果(9)より図3に示した酵素的酸化物3種類がシフォナキサンチンの主要な代謝産物と考えられた。そこでこれらの脱顆粒抑制作用を評価したところ、いずれの酵素的酸化物もシフォナキサンチンそのものよりも強い活性を示した(図5A)。最も強い活性を示したTDMについては、シフォナキサンチン摂食マウスの血漿濃度より低い濃度においても活性を示したことから、生体レベルでの抗炎症作用に特に重要な代謝産物と考えられた(図5B)。さらに、RBL-2H3細胞だけではなく、ヒト単球様細胞株THP-1やマウスマクロファージ様細胞株RAW264を用いた抗炎症作用の評価も進めたが、いずれの評価系においても、シフォナキサンチンそのものより

も酵素的酸化物の方が強い抗炎症作用を示した。すなわち、酵素的酸化反応を受けることによってシフォナキサンチンの抗炎症作用が高まることが明らかとなった。

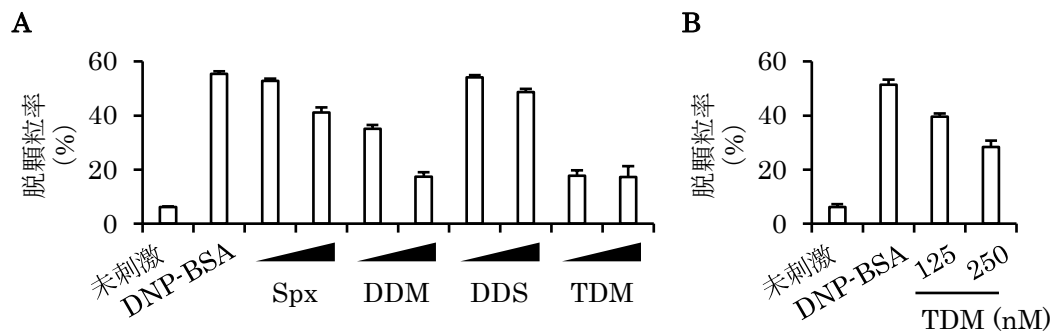


図5. シフォナキサンチン酵素的酸化物の脱顆粒抑制作用 (抗炎症作用)

1. Manabe, Y., Hirata, T., and Sugawara, T. Suppressive Effects of Carotenoids on the Antigen-induced Degranulation in RBL-2H3 Rat Basophilic Leukemia Cells. *J. Oleo Sci.* **63**, 2014, 291–294
2. Manabe, Y., Hirata, T., and Sugawara, T. Inhibitory Effect of Carotenoids on Ligand-induced Lipid Raft Translocation of Immunoreceptors. *J. Oleo Sci.* **68**, 2019, 149–158
3. Manabe, Y., Takii, Y., and Sugawara, T. Siphonaxanthin, a carotenoid from green algae, suppresses advanced glycation end product-induced inflammatory responses. *J. Nat. Med.* **74**, 2020, 127–134
4. Manabe, Y., Ichihara, M., Fukuda, K., Tomonaga, N., Li, Z.-S., Yamanashi, Y., Suzuki, H., Takada, T., Matsuo, M., and Sugawara, T. Niemann-Pick C1-like 1 Promotes Intestinal Absorption of Siphonaxanthin. *Lipids.* **54**, 2019, 707–714
5. Amengual, J., Lobo, G. P., Golczak, M., Li, H. N. M., Klimova, T., Hoppel, C. L., Wyss, A., Palczewski, K., and von Lintig, J. A mitochondrial enzyme degrades carotenoids and protects against oxidative stress. *FASEB J.* **25**, 2011, 948–959
6. Barua, A. B. Retinoyl β -Glucuronide: a Biologically Active Form of Vitamin a. *Nutr. Rev.* **55**, 1997, 259–267
7. Asai, A., Nakano, T., Takahashi, M., and Nagao, A. Orally Administered Crocetin and Crocins Are Absorbed into Blood Plasma as Crocetin and Its Glucuronide Conjugates in Mice. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 2005, 7302–7306
8. Zheng, J., Li, Z., Manabe, Y., Kim, M., Goto, T., Kawada, T., and Sugawara, T. Siphonaxanthin, a carotenoid from green algae, inhibits lipogenesis in hepatocytes via the suppression of liver X receptor α activity. *Lipids.* **53**, 2018, 41–52
9. Li, Z., Zheng, J., Luo, X., Manabe, Y., Hirata, T., and Sugawara, T. Absorption and Tissue Distribution of Siphonaxanthin from Green Algae. *Mar. Drugs.* **18**, 2020, 291
10. Raghuvanshi, S., Reed, V., Blaner, W. S., and Harrison, E. H. Cellular localization of β -carotene 15,15' oxygenase-1 (BCO1) and β -carotene 9',10' oxygenase-2 (BCO2) in rat liver and intestine. *Arch. Biochem. Biophys.* **572**, 2015, 19–27

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yuki Manabe, Nami Tomonaga, Takashi Maoka, Tatsuya Sugawara	4. 巻 13
2. 論文標題 Multivariate Analysis Reveals That Unsubstituted β -Ring and C8-Keto Structures Are Important Factors for Anti-Inflammatory Activity of Carotenoids	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 3699 ~ 3699
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu13113699	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Zhuosi Li, Jiawen Zheng, Xiaolin Luo, Yuki Manabe, Takashi Hirata, Tatsuya Sugawara	4. 巻 18
2. 論文標題 Absorption and Tissue Distribution of Siphonaxanthin from Green Algae	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Marine Drugs	6. 最初と最後の頁 291 ~ 291
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/md18060291	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Chiaki Ikeda, Yuki Manabe, Nami Tomonaga, Tatsuya Wada, Takashi Maoka, Tatsuya Sugawara	4. 巻 18
2. 論文標題 Evaluation of Intestinal Absorption of Dietary Halocynthiaxanthin, a Carotenoid from the Sea Squirt <i>Halocynthia roretzi</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Marine Drugs	6. 最初と最後の頁 588 ~ 588
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/md18120588	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yuki Manabe, Takashi Hirata, Tatsuya Sugawara	4. 巻 68
2. 論文標題 Inhibitory Effect of Carotenoids on Ligand-induced Lipid Raft Translocation of Immunoreceptors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Oleo Science	6. 最初と最後の頁 149-158
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5650/jos.ess18204	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yuki Manabe, Misato Ichihara, Kyoko Fukuda, Nami Tomonaga, Zhuo Si Li, Yoshihide Yamanashi, Hiroshi Suzuki, Tappei Takada, Michinori Matsuo, Tatsuya Sugawara	4. 巻 82
2. 論文標題 Niemann Pick C1 like 1 Promotes Intestinal Absorption of Siphonaxanthin	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Lipids	6. 最初と最後の頁 707-714
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/lipd.12194	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yuki Manabe, Yasuho Takii, Tatsuya Sugawara	4. 巻 74
2. 論文標題 Siphonaxanthin, a Carotenoid from Green Algae, Suppresses Advanced Glycation End Product-Induced Inflammatory Responses	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Natural Medicines	6. 最初と最後の頁 127-134
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11418-019-01354-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 真鍋祐樹、菅原達也
2. 発表標題 シフォナキサンチンの消化管吸収におけるNPC1L1の寄与
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 清水亮佑、真鍋祐樹、菅原達也
2. 発表標題 緑藻シフォナキサンチンの酸化的な代謝機構の解明
3. 学会等名 日本食品科学工学会 第4回関西支部大会 (オンライン)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 清水亮佑、真鍋祐樹、菅原達也
2. 発表標題 シフォナキサンチンの代謝を担う酵素の探索
3. 学会等名 第74回日本栄養・食糧学会大会 オンライン大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 真鍋祐樹、新多智明、菅原達也
2. 発表標題 代謝変換がシフォナキサンチンの抗炎症作用に与える影響
3. 学会等名 第36回日本微量栄養素学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuki Manabe, Tomoaki Nitta, Zhou-Si Li, Jia-Wen Zheng, Misato Ichihara, Xiao-Lin Luo, Takashi Hirata, Takashi Maoka, Tatsuya Sugawara
2. 発表標題 Metabolic Conversion of Siphonaxanthin, a Carotenoid from Green Algae, Increases Its Anti-Inflammatory Activity
3. 学会等名 Asian Congress on Nutrition (ACN) 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuki Manabe, Natsuki Hashimoto, Toshiro Okazaki, Takashi Hirata, Tatsuya Sugawara
2. 発表標題 Anti-Allergic Effect of Siphonaxanthin and Its Molecular Mechanism
3. 学会等名 Marine Biotechnology Conference 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuki Manabe, Natsuki Hashimoto, Toshiro Okazaki, Takashi Hirata, Tatsuya Sugawara
2. 発表標題 Anti-Inflammatory Effect of Siphonaxanthin and Its Underlying Molecular Mechanisms
3. 学会等名 ICoFF2019/ ISNFF2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 真鍋 祐樹, 新多 智明, 菅原 達也
2. 発表標題 シフォナキサンチン代謝産物の抗炎症作用の評価と作用メカニズムの解明
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 真鍋 祐樹, 瀧井 靖歩, 友永 奈美, 菅原 達也
2. 発表標題 シフォナキサンチンの抗炎症作用メカニズムの解明
3. 学会等名 第57回日本栄養・食糧学会近畿支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 真鍋 祐樹, 友永 奈美, 菅原 達也
2. 発表標題 シフォナキサンチンの抗炎症プロファイルの解析
3. 学会等名 第32回カロテノイド研究談話会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 真鍋 祐樹, 菅原 達也
2. 発表標題 シフォナキサンチンの抗炎症作用の特性解析
3. 学会等名 日本油化学会第57回年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	菅原 達也 (Sugawara Tatsuya) (70378818)	京都大学・農学研究科・教授 (14301)	
研究協力者	眞岡 孝至 (Maoka Takashi) (10157159)	一般財団法人生産開発科学研究所・食物機能研究室・室長 (74302)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------