

令和 4 年 10 月 14 日現在

機関番号：14101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K20144

研究課題名(和文) 新たな機能性食品、紅藻*Palmaria mollis*の内臓脂肪抑制成分の探索研究課題名(英文) Exploration study on visceral fat suppressing components in a new functional food, red alga *Palmaria mollis*

研究代表者

中山 寛子 (Nakayama, Hiroko)

三重大学・地域イノベーション学研究所・研究員

研究者番号：20831085

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ゼブラフィッシュおよびマウス脂肪細胞系を用いて、紅藻*Palmaria mollis*(PM)に含まれる抗肥満成分およびその作用メカニズムを明らかにすることを目的とした。PMを様々な溶媒で画分化し、内臓脂肪蓄積をよく抑制する抽出物の同定を行った。その後、さらに10画分の画分調製を行い、その後ゼブラフィッシュを用いて検討、その中で最も効果のあったものに含まれる成分をLC-MSやNMRを用いて同定した。この成分の抗肥満作用メカニズムは、これまで私が報告したPMと同様にppargの発現を調節し脂肪細胞分化に影響を及ぼ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

肥満は生活習慣病の重大なリスク因子であり、その解決に向けては世界的にも大きな関心が寄せられている。肥満治療では食事療法・運動療法が主となるが、これらの効果が期待できない場合、抗肥満薬による治療が行われる。しかし、ほとんどの抗肥満薬には副作用が伴っており、副作用が少ない天然物による肥満治療への期待が大きくなっている。本研究では、天然物である紅藻*Palmaria mollis*に含まれている成分の抗肥満作用メカニズムを明らかにしたことにより、機能性食品として期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we elucidated the anti-obesity components and their mechanisms of action in the red alga *Palmaria mollis* using zebrafish and mouse adipocyte systems. The PM was fractionated in various solvents to identify extracts that inhibit visceral fat accumulation well. After that, 10 more fractions were prepared and then examined using zebrafish, and the components in the most effective ones were identified using LC-MS and NMR. The mechanism of anti-obesity action of this component was found to be the same as that of PM, which I have reported, regulating pparg expression and affecting adipocyte differentiation.

研究分野：天然物、実験動物学/ゼブラフィッシュ

キーワード：抗肥満作用 天然物 ゼブラフィッシュ マウス 機能性食品

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肥満は、先進国における最も困難な公衆衛生上の問題の1つであり、途上国でも関心が高まっている。肥満の有病率は急速に上昇し、1980年以來ほぼ倍増しており、世界的流行(WHO2017)と考えられている。内臓脂肪型肥満及び脂肪肝は、心血管疾患や2型真性糖尿病、脂質異常症、非アルコール性脂肪肝、およびある種の癌を増加させる。心筋梗塞や脳卒中に代表される致死性の血管イベントの発症基盤として、肥満を中心に種々の代謝病が重積するメタボリックシンドロームの重要性が注目されている。脂肪を減らす手段として運動や食事制限による効果が期待できない場合、食欲抑制や脂肪の吸収阻害を目的とする抗肥満薬の服用が選択肢となるが、多くの抗肥満薬は、高血圧や不眠症、焦燥感などの副作用を起こす可能性が高い。そこで、副作用が少なく、また抗肥満作用がある天然物由来の機能性食品の開発が活発化している。特に海藻類は、ミネラルや特定のビタミン、多糖類、タンパク質、脂質、ポリフェノールなどの生物活性分子が多く、機能性食品や医薬品原料として期待されている。例えば、褐藻類由来の海洋カロチノイドであるフコキサンチンは、高脂肪食を与えたマウスの体重増加および血糖およびインスリンレベルの調節を抑制する。また、フコキサンチンの代謝産物であるフコキサンチノールは、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 (*Pparg*) の発現低下作用を介して、脂肪細胞の成熟化を抑制する。藻類の主要な食物繊維の1つであるアルギン酸塩は、満腹感を高め、エネルギー摂取量を減らし、体重減少をサポートすることによって抗肥満効果がある。

私はこれまでの研究で、紅藻類 *Palmaria mollis* の抗肥満作用を、肥満ゼブラフィッシュ・マウスを用いて世界で初めて発見し報告した[1]。*Palmaria mollis* は別名 Pacific dulse とも呼ばれ、「ベーコンのような風味」から北米を中止に食品として一般的になってきている。*Palmaria mollis* の近縁種である *Palmaria palmata* (別名 Atlanta dulse) も古来より北欧で食されてきた。これらは他の野菜と比較してミネラルやビタミン、抗酸化物質などが豊富、かつ高タンパク質(乾燥重量の約20%)であるため、機能性食品としての可能性が期待されている。

2. 研究の目的

これまでの自身の研究により、*Palmaria mollis* には強力な抗肥満作用を有することが明らかになった[1]。しかし *Palmaria mollis* に含まれるどの成分が肥満症状を改善するのかは依然不明である。本研究では *Palmaria mollis* に含まれる抗肥満成分を同定し、そのメカニズムを明らかにした。

3. 研究の方法

(1) *Palmaria mollis* 画分を用いたゼブラフィッシュスクリーニング試験

ヘキサン、アセトン、酢酸エチル、メタノール、エタノール、ブタノール、水など様々な溶媒で *Palmaria mollis* 抽出物を調製した。まず、マウス前脂肪細胞(3T3-L1細胞)の分化アッセイを行い、脂肪細胞を減少させる抽出物を選定した。その後、同様に肥満ゼブラフィッシュに投与し[2]、主に内臓脂肪蓄積への影響を解析し、もっとも内臓脂肪蓄積を抑制する抽出物を同定した。脂肪蓄積評価には中性脂肪特異的蛍光色素ニルレッド[3]を用いた。効果を認めた抽出物の画分をさらに10画分を目標とし、HPLCを用いて調製した。調製した画分を再度肥満ゼブラフィッシュに投与し、内臓脂肪蓄積・血液生化学データへの影響を解析した。

(2) *Palmaria mollis* の抗肥満成分の同定および作用メカニズムの解明

(1)で決定した画分に含まれる成分を、NMR(核磁気共鳴装置)を用いて同定した。同定した成

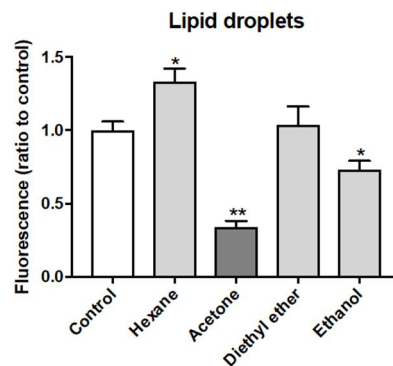
分を、まずはゼブラフィッシュに投与し、内臓脂肪において網羅的遺伝子発現解析を中心に、*Palmaria mollis*に含まれる有効成分が、脂肪細胞分化・成熟や脂質代謝（合成・分解）・ミトコンドリア代謝などのパスウェイに与える影響を明らかにした。ゼブラフィッシュ試験で明らかにした抗肥満作用メカニズムがヒトを含む哺乳類動物でも存在するか確認するため、マウス前脂肪細胞を用い脂肪細胞の成熟に関する遺伝子の発現を調べた。抗肥満作用を確認したのち total RNA を抽出し、ゼブラフィッシュ試験と同様に遺伝子発現解析を行った。

4. 研究成果

(1) *Palmaria mollis* 抽出物のマウス脂肪細胞試験およびゼブラフィッシュスクリーニング試験

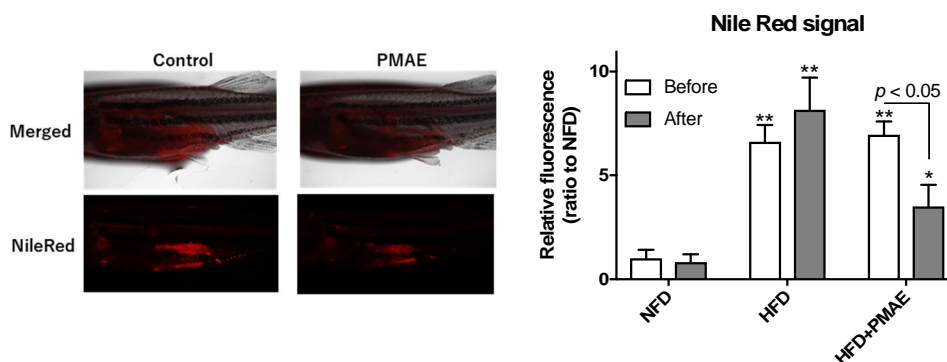
Palmaria mollis を、ヘキサン、アセトン、酢酸エチル、メタノール、エタノール、ブタノール、水など様々な溶媒で *Palmaria mollis* 抽出物を調製し、マウス前脂肪細胞（3T3-L1 細胞）の分化アッセイを行い、脂肪細胞を減少させる抽出物を選定した（図 1）。

図 1 *Palmaria mollis* の有機溶剤抽出物のマウス脂肪細胞試験



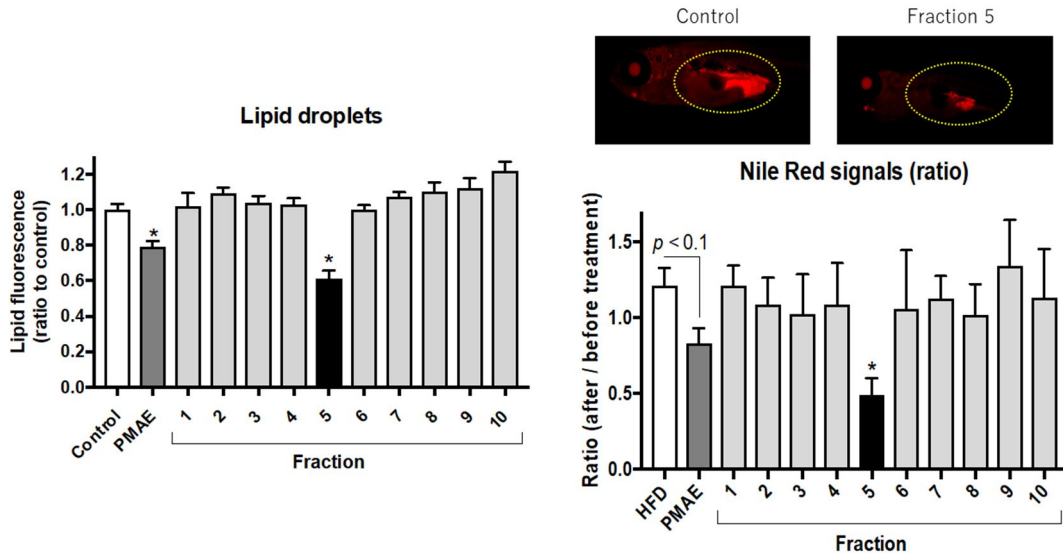
その後、肥満ゼブラフィッシュにも抽出物を投与し、主に内臓脂肪蓄積への影響を解析し、内臓脂肪蓄積をよく抑制する抽出物の同定を行ったところ、同じ抽出物が最も効果がみられた。最も効果を認めた抽出物はアセトン抽出したもの(PMAE)であった（図 2）。

図 2 ゼブラフィッシュにおける *Palmaria mollis* アセトン抽出物（PMAE）の脂肪蓄積抑制



その後、HPLC を用いて PMAE をさらに 10 画分の画分調製を行い、再度肥満ゼブラフィッシュに投与し、内臓脂肪蓄積抑制の影響を解析したところ、ある 1 つの画分が最も効果を認めた（図 3）。

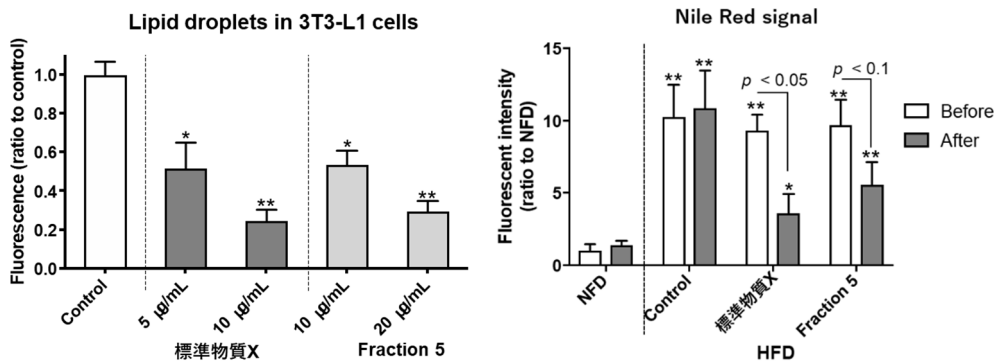
図3 PMAE 再画分のマウス脂肪細胞およびゼブラフィッシュ試験



(2) 内臓脂肪蓄積を最も抑制する成分の同定および作用メカニズムの解明

(1) で決定した画分で ESI-MS 分析を行ったところある成分の過去の報告とよく一致しており、画分に含まれる成分と該当する標準物質 X をそれぞれ HPLC 測定したところ保持時間が一致した。さらに、NMR (核磁気共鳴装置) を用いて解析したところ、同定した画分には該当成分が約 50% 含まれていることが分かった。そして、マウス脂肪細胞とゼブラフィッシュの両方を標準物質 X で検討したところ、画分と同程度の脂肪量低下を現すことを確認した (図 4)。

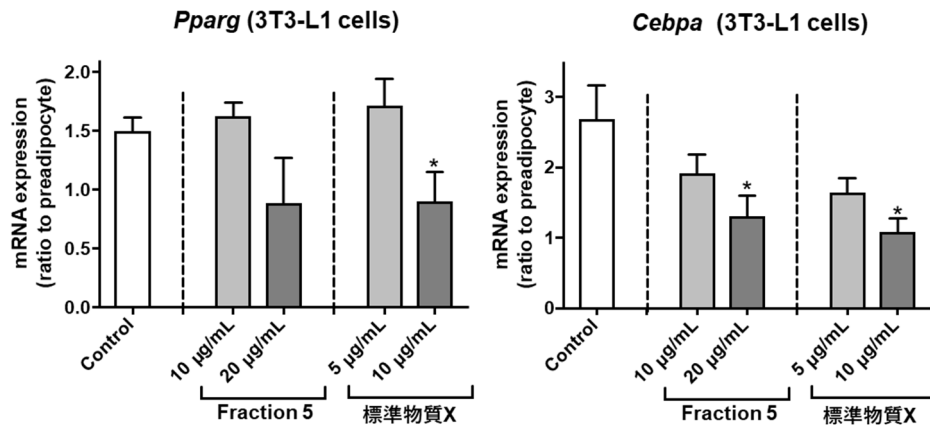
図4 Palmaria mollis 抽出物の機能性分子としての同定



(3) PMAE fraction5 の抗肥満作用メカニズム

この成分の抗肥満作用メカニズムを明らかにするため、マウス脂肪細胞とゼブラフィッシュ内臓脂肪における脂肪細胞の成熟に関する遺伝子の発現を調べた。その結果、後期脂肪細胞形成マーカーであるペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 (*Pparg*) の発現をわずかに低下させ、また *pparg* の下流にある活性化因子 *Cebpa* の発現が低下した (図 5)。

図5 マウス脂肪細胞における PMAE fraction5 の脂肪細胞分化抑制



以上の結果より、これまで私が報告した *Palmaria mollis* 同様に *pparg* の発現を調節し脂肪細胞分化に影響を及ぼしていることが明らかとなった。天然物である紅藻 *Palmaria mollis* に含まれている成分の抗肥満作用メカニズムを明らかにしたことにより、機能性食品として期待できる。

<引用文献>

1. Nakayama, H.; Shimada, Y.; Zang, L.; Terasawa, M.; Nishiura, K.; Matsuda, K.; Toombs, C.; Langdon, C.; Nishimura, N. Novel Anti-Obesity Properties of *Palmaria mollis* in Zebrafish and Mouse Models. *Nutrients* **2018**, *10*, doi:10.3390/nu10101401.
2. Zang, L.; Morikane, D.; Shimada, Y.; Tanaka, T.; Nishimura, N. A novel protocol for the oral administration of test chemicals to adult zebrafish. *Zebrafish* **2011**, *8*, 203-210, doi:10.1089/zeb.2011.0726.
3. Nishimura, Y.; Sasagawa, S.; Ariyoshi, M.; Ichikawa, S.; Shimada, Y.; Kawaguchi, K.; Kawase, R.; Yamamoto, R.; Uehara, T.; Yanai, T.; et al. Systems pharmacology of adiposity reveals inhibition of EP300 as a common therapeutic mechanism of caloric restriction and resveratrol for obesity. *Front Pharmacol* **2015**, *6*, 199, doi:10.3389/fphar.2015.00199.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Nakayama Hiroko, Hata Kanae, Matsuoka Izumi, Zang Liqing, Kim Youngil, Chu Djongchi, Juneja Lekh Raj, Nishimura Norihiro, Shimada Yasuhito	4. 巻 25
2. 論文標題 Anti-Obesity Natural Products Tested in Juvenile Zebrafish Obesogenic Tests and Mouse 3T3-L1 Adipogenesis Assays	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 5840 ~ 5840
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules25245840	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 Kagotani Kazuhiro, Nakayama Hiroko, Zang Liqing, Fujimoto Yuki, Hayashi Akihito, Sono Ryoji, Nishimura Norihiro, Shimada Yasuhito	4. 巻 25
2. 論文標題 Lecithin-Based Dermal Drug Delivery for Anti-Pigmentation Maize Ceramide	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 1595 ~ 1595
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules25071595	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 Chensom Sasicha, Shimada Yasuhito, Nakayama Hiroko, Yoshida Kumi, Kondo Tadao, Katsuzaki Hirota, Hasegawa Sachiko, Mishima Takashi	4. 巻 75
2. 論文標題 Determination of Anthocyanins and Antioxidants in 'Titanbicus' Edible Flowers In Vitro and In Vivo	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Foods for Human Nutrition	6. 最初と最後の頁 265 ~ 271
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11130-020-00813-3	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 Liqing Zang, Yasuhito Shimada, Hiroko Nakayama, Youngil Kim, Djong-Chi Chu, Lekh Raj Juneja, Junya Kuroyanagi, Norihiro Nishimura	4. 巻 24
2. 論文標題 RNA-seq Based Transcriptome Analysis of the Anti-Obesity Effect of Green Tea Extract Using Zebrafish Obesity Models	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 3256 ~ 3256
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules24183256	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 Yamada Yuka, Chensom Sasicha, Yonemoto Hisataka, Nakayama Hiroko, Zang Liqing, Nishimura Norihiro, Mishima Takashi, Shimada Yasuhito	4. 巻 23
2. 論文標題 Water Extract of Yamato Tachibana (Citrus tachibana) Induces Food Intake in Adult and Larval Zebrafish	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Medicinal Food	6. 最初と最後の頁 65 ~ 71
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/jmf.2019.4484	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 -

[学会発表] 計8件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 臧 黎清、島田 康人、中山 寛子、西村 訓弘
2. 発表標題 食餌性肥満モデルゼブラフィッシュを用いた緑茶抽出物の抗肥満作用メカニズムの解明
3. 学会等名 第84回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 島田 康人、籠谷 和弘、中山 寛子、臧 黎清、藤本 祐希、林 彰人、園 良治、西村 訓弘
2. 発表標題 ゼブラフィッシュを用いた研究開発：レシチンを利用したセラミドの経皮移行性向上による色素沈着阻害
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 臧 黎清、島田 康人、中山 寛子、西村 訓弘
2. 発表標題 CENPX発現抑制による2型糖尿病ゼブラフィッシュ・マウスにおける高血糖改善作用
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 島田 康人、臧 黎清、籠谷 和弘、中山 寛子、Bhagat Jacky、藤本 祐希、林 彰人、園 良治、勝崎 裕隆、西村 訓弘
2. 発表標題 ゼブラフィッシュ再生鱗における10-gingerolの破骨細胞分化阻害作用
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 臧 黎清、島田 康人、中山 寛子、松岡 いづみ、金 英一、朱 政治、ジュネジャ レカ、霍田 りか、笹川 由香、黒柳 淳哉、西村 訓弘
2. 発表標題 赤血球由来グロビンペプチドはUCP1の増加を介して内臓脂肪の蓄積を改善する
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 島田 康人、中山 寛子、岡崎 文美、臧 黎清、寺澤 匡博、松田 孝一、西浦 薫、内田 亮太、西村 訓弘
2. 発表標題 ゼブラフィッシュからヒト臨床試験へ：ラムナン硫酸による便秘改善作用について
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松岡 いづみ、中山 寛子、幡 佳苗、臧 黎清、金 英一、朱 政治、ジュネジャ レカ 西村訓弘、島田康人
2. 発表標題 ゼブラフィッシュ稚魚を用いた抗肥満スクリーニング技術の開発
3. 学会等名 第26回日本未病学
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mayuko Yamakawa, Yuichi Masuda, Hiroko Nakayama, Liqing Zang, Masayuki Terasawa, Kaoru Nishimura, Norihiro Nishimura, Yasuhito Shimada
2. 発表標題 Discovery of anti-obese fucoxanthin in Palmaria mollis using zebrafish obesogenic test
3. 学会等名 3rd World Conference on Food science, Nutrition and Obesity Prevention Source
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 中山 寛子	4. 発行年 2020年
2. 出版社 北隆館	5. 総ページ数 102
3. 書名 アグリバイオ vol.4、No.7	

1. 著者名 臧 黎清、中山 寛子	4. 発行年 2020年
2. 出版社 北隆館	5. 総ページ数 104
3. 書名 アグリバイオ vol.4、No.13	

〔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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------