

機関番号：10103

研究種目：基盤C一般

研究期間：2008~2010

課題番号：20580218

研究課題名（和文） ホタテガイ貝殻に含まれる脂肪分解促進因子の構造、機能解明

研究課題名（英文） Structure and function of lipolysis-promoting substance from scallop shell

研究代表者 長谷川 靖 (YASUSHI HASEGAWA)

室蘭工業大学大学院 工学研究科 教授

研究者番号：80261387

研究成果の概要（和文）：①ホタテガイ貝殻有機成分のみをラットに食餌させても脂肪組織重量の減少がおこることを見出した。②貝殻有機成分中に血中コレステロール濃度を減少させる因子が存在していることを見出した。③貝殻有機成分中に存在する脂肪細胞分化抑制因子はPPAR γ の発現を抑制することによって、脂肪前駆細胞の増殖を抑制することによって分化を阻害していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）： We found that feeding rats the organic components from scallop shell causes the reduction of the weight of adipose tissues and the reduction in serum cholesterol concentration. We found that the scallop shell extract inhibited adipogenesis through the suppression of preadipocyte proliferation and the suppression of the expression of PPAR γ .

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
20年度	2,200,000	660,000	2,860,000
21年度	900,000	270,000	1,170,000
22年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産化学

キーワード：ホタテガイ貝殻、有効利用、水産系廃棄物

1. 研究開始当初の背景

ホタテガイ貝殻は年間約30万トンにも及ぶ量が水産系廃棄物として産出されており、さらなる有効利用が望まれている。貝殻の98%が炭酸カルシウムから構成されていることから、壁の塗料やカルシウムの原料、脱硫剤などとして利用されているものの、安価な炭酸カルシウムとの差別化が難しくその大きな利用へとつながっていないのが現状である。我々は、新たな、高度利用の可能性を考え、残り2%に含まれる蛋白質、糖などの有機成分（以下**貝殻有機成分**）がもつ生理活性作用について探索を行ってきた。

2. 研究の目的

貝殻に含まれる有機成分中には、皮膚線維芽細胞の増殖促進活性、活性酸素消去活性などのいくつかの有用な生理活性物質が含まれていることを明らかにしてきた。特に、貝殻粉末を3%含む餌を食餌させたラットにおいて脂肪組織重量の減少が見出した。本研究では、この脂質代謝促進作用に着目し、この作用機構を明らかにするため、in vitro, in vivoの両面から検討を行った。

3. 研究の方法

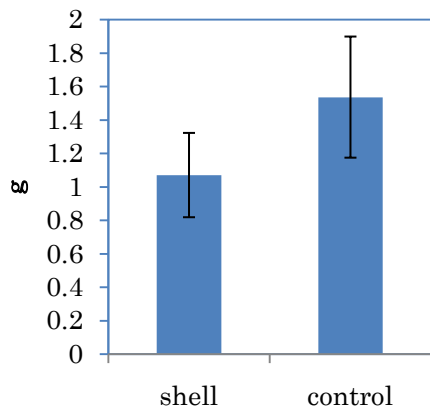
(1) 貝殻粉末には 99%近い炭酸カルシウムが含まれるうえ、炭酸カルシウム自体にも脂肪組織重量を減少させる作用があるとの報告があることから、炭酸カルシウムを除去した貝殻有機成分を 2%含む餌をラットに食餌させ、脂肪組織重量の変化、脂質代謝に関わる変化について検討を行った。

(2) 培養脂肪前駆細胞 3T3-L1 を用いた研究から、貝殻有機成分が脂肪細胞の分化を抑制することを見出した。また、すでに脂肪分解促進因子として貝殻から単離した糖たんぱく質成分に脂肪細胞分化抑制作用があることを明らかにした。本研究ではまず、この作用機構を明らかにすることを目的に研究を進めた。

4. 研究成果

(1) 水産系廃棄物ホタテガイ貝殻をラットに食餌させることによって脂肪組織重量の減少がおこることを報告してきた。しかしながら、貝殻に含まれる炭酸カルシウムにも脂肪組織重量を減少させる効果が報告されていることから、炭酸カルシウムを除く貝殻有機成分を 2%含む餌をラットに食餌させその効果を検討した。その結果、後腹膜の脂肪組織重量において有意な減少が、そ頸部の脂肪組織重量においても減少傾向が認められた (図 1、図 2)。

図 1 ホタテガイ貝殻抽出成分を食餌させた



ラットにおける後腹膜脂肪組織重量

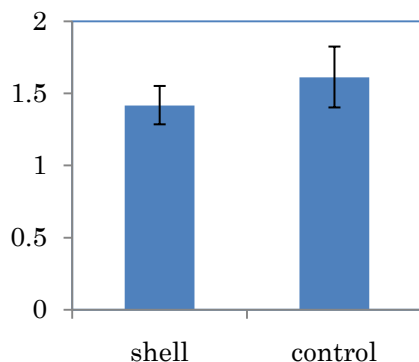


図 2 ホタテガイ貝殻抽出成分を食餌させたラットにおけるそ頸部脂肪組織重量

(2) 次に、血中コレステロール濃度について検討を行った。貝殻抽出物を食餌したラットにおいて血中のコレステロール濃度は有意な減少作用が見出された (図 3)。

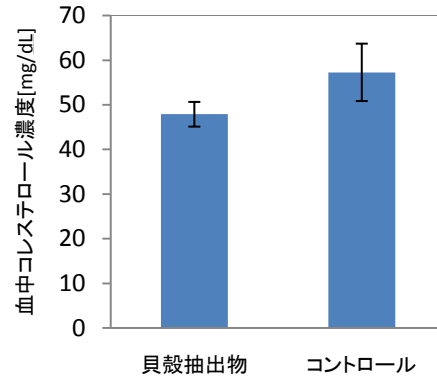


図 3 貝殻抽出物を食餌したラットの血中コレステロール濃度

この血中コレステロール濃度の減少作用の機構を明らかにするためラットの糞中の脂質量、胆汁酸量を測定した (図 4、図 5)。

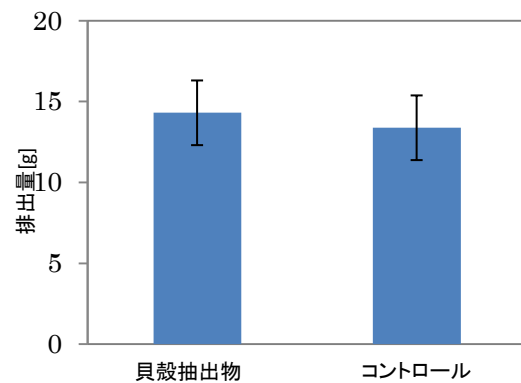


図 4 糞中に含まれる脂質量を Folch 法を用いて測定した。

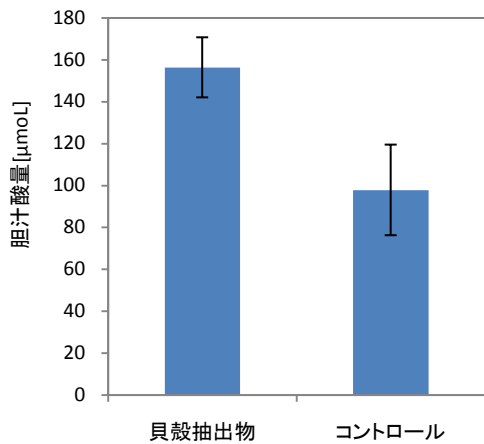


図5 糞中に含まれる胆汁酸濃度

ラットの糞中に含まれる胆汁酸濃度が増加していたことから（図5）、貝殻中の有機成分が胆汁酸を結合することによって排出したものと推定された。体外に排出された胆汁酸量を補うため、生体内においてコレステロールから胆汁酸が合成され、その結果として血中のコレステロール濃度が減少したものと考えられた。

(3) 貝殻抽出成分中に胆汁酸を結合する食物繊維様物質が存在しているかどうかを明らかにするため、貝殻抽出成分を糖分解酵素、タンパク質分解酵素で処理して食物繊維様物質を単離した。単離した食物繊維様物質は、糖とタンパク質成分からなり、可溶性成分では約80%がタンパク質成分であることが分かった。可溶性成分については平衡透析法を用い、不溶性成分については遠心法を用いて胆汁酸結合を測定した。その結果、可溶性、不溶性成分ともに胆汁酸への結合能を持つことを見出した（図6、図7）。

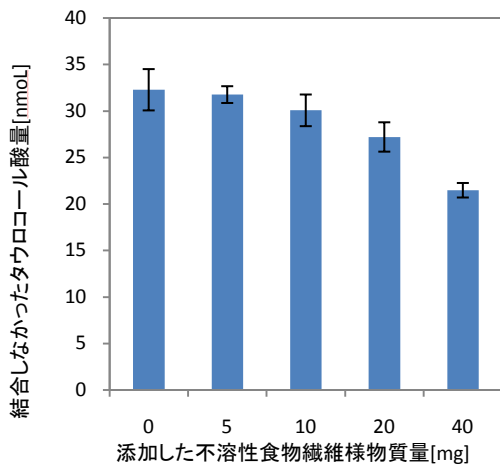


図6 食物繊維様不溶性成分への胆汁酸結合能

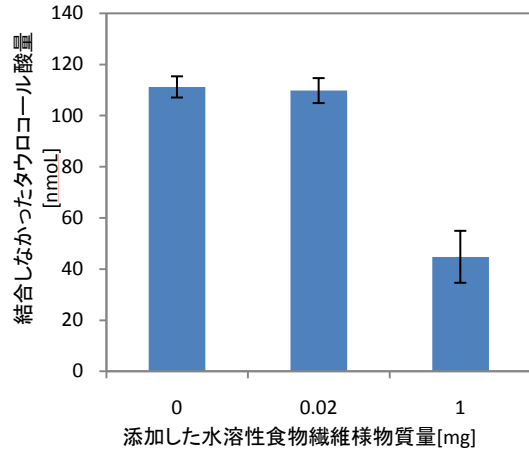


図7 食物繊維様可溶性成分への胆汁酸結合能

現在このタンパク質、糖の構造についてさらに検討を加えている。

(4) 一方、貝殻有機成分に見出した、脂肪細胞の分化抑制因子の作用機構について3T3-L1細胞を用いて検討を行った。貝殻有機成分を添加した細胞では、脂肪細胞への分化マーカーであるPPAR γ の発現量を減少させることがわかった（図8）。

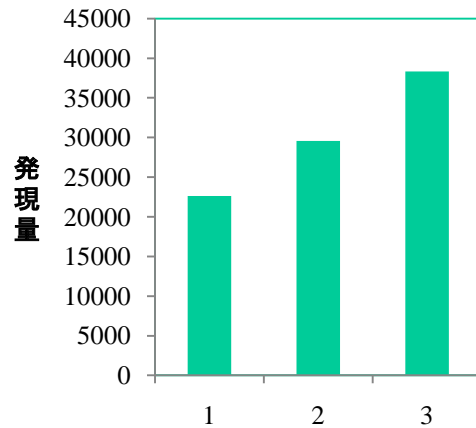


図8 3T3-L1細胞中のPPAR γ の発現量の変化。3、コントロール、2、貝殻有機成分0.05mg/ml存在下、1、貝殻有機成分0.5mg/ml存在下

また貝殻有機成分は前駆脂肪細胞の増殖を細胞毒性を示すことなく抑制することを見出した（図9、図10）。

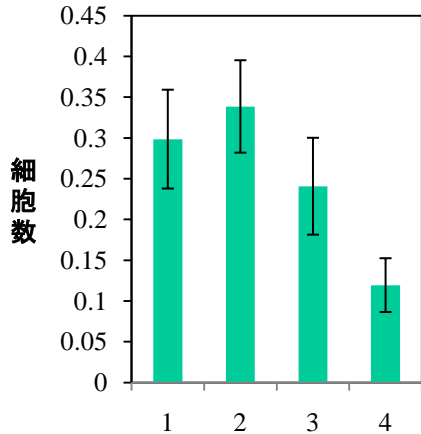


図9 貝殻有機成分による 3T3-L1 細胞増殖の抑制活性

1、コントロール、2 0.005mg/ml、3 0.05mg/ml、4、0.5mg/ml 貝殻有機成分存在下において 48 時間培養を行い、MTT アッセイによって細胞数の定量を行った。

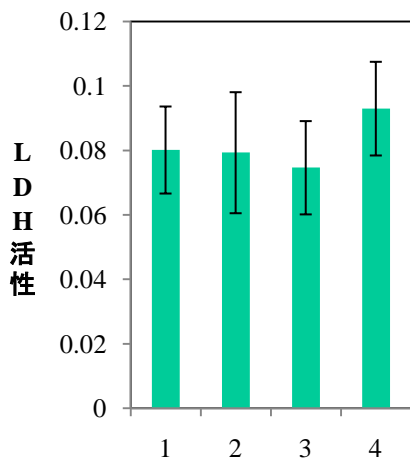


図10 貝殻有機成分が 3T3-L1 細胞におよぼす細胞毒性試験

図9と同じ条件のもと、貝殻有機成分の存在下において培養を行ったのち、LDH 活性を測定することによって細胞毒性を評価した。

これらの結果から、貝殻有機成分は前駆脂肪細胞の増殖を抑制することによって、PPAR γ の発現を抑制することによって脂肪細胞への分化を抑制しているものと考えられた。現在、単離した脂肪分化抑制因子についてその構造と作用機構について検討を加えている。すでにアミノ酸組成分析、単糖組成分析を行い、さらに質量分析を用いて部分アミノ酸配列の決定を行った。しかしながら PCR 法によって遺伝子クローニングを試みたもののそ

の単離にはいたっていない。今後、部分アミノ酸配列をさらに決定し、その全長構造を明らかにしたい。

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)

①Akane Torita, Akimi Miyamoto, Kohsuke Ishiguro, Sachie Yamamoto, Yasushi Hasegawa Organic components from scallop shell increase expression of keratinocyte growth factor in human skin fibroblast *Fisheries Science* 77, 263-269 (2011) (査読あり)

②Yasushi Hasegawa and Hiroko Ikeda Cloning of a cDNA encoding the tail region of nonmuscle myosin II from the mantle tissue of scallop *Patinopecten yessoensis* *Fisheries Science*, 74, 1201-1203 (2008) (査読あり)

③Kanae Kobayashi, Yun Chun Liu, Yasushi Hasegawa Organic components from scallop shell increase mRNA expressions of uncoupling protein-1 (UCP-1) in differentiated C3H10T1/2 adipocyte cells *Fisheries Science*, 944-946 (2008) (査読あり)

[学会発表] (計 11 件)

①李麗華、長谷川靖 ホタテガイ貝殻ちょうつがいに含まれる成分の同定 日本水産学会 2010/9 /23 京都大学

②福田学、長谷川靖 ホタテガイ貝殻抽出液に見出したプロテアーゼ活性 日本水産学会 2010/9./23 京都大学

③小野裕基、高橋浩司、三津橋拓也、堀智彦、長谷川靖 ホタテガイ貝殻抽出液中に含まれる 90kDa タンパク質の精製とその構造・機能 日本水産学会 北海道支部会 2010/12/11 室蘭

④長谷川靖 貝殻を有効利用する新技術について (招待講

演)

日本水産学会 北海道支部会 2010/12/11
室蘭

⑤部田茜、寄谷直美、長谷川靖

ホタテガイ貝殻に含まれる皮膚真皮線維芽
細胞増殖因子の単離・精製

マリンバイオテクノロジー学会 2009/5 東
京

⑥部田茜、寄谷直美、長谷川靖

ホタテガイ貝殻に含まれる皮膚真皮線維芽
細胞増殖因子の単離

マリンバイオテクノロジー学会 2008/5 京
都

⑦Akane torita, Naomi Yosetani, Yasushi
Hasegawa

Isolation and identification of human skin
fibroblast cells growth factor from
scallop shells. Joint Seminar on
Environmental Science and Disaster
Mitigation Research 2010

2010/3 Muroran

⑧Akane Torita, Yun Chun Liu, Yasushi
Hasegawa

Reducing effect of feeding powdered
scallop shell on the body fat mass of rats
World Fisheries Congress 2009, 2008/9
Yokohama

⑨Akane torita, Naomi Yosetani, and
Yasushi Hasegawa

Isolation and identification of human skin
fibroblast cells growth factor from
organic components in the scallop shells.
International Seminar on Resources, New
Energy, Environment and Disaster
Mitigation 2009/9, Kanan, China

⑩A. Torita, K. Hara, C. Okawa, and Y.
Hasegawa

Effective utilization of fishery waste
materials produced from Hokkaido Joint
Seminar on Environmental Science and
Disaster Mitigation Research 2011 2011
/3/9 Muroran

⑪T. Hori, A. Torita, and Y. Hasegawa

Identification of human skin fibroblast
cell growth factor from the scallop shells

Joint Seminar on Environmental Science
and Disaster Mitigation Research 2011
2011/3/9 Muroran

6. 研究組織

(1) 研究代表者 長谷川 靖 (YASUSHI
HASEGAWA) 室蘭工業大学 大学院工学研究科
教授

研究者番号 : 80261387