

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 22 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22500732

研究課題名（和文） 温度センサー（イオンチャネル）を用いた地域特産食品の機能解析

研究課題名（英文） Effects of the area-specific cultivar extracts on the activation of thermo-sensitive ion channels

研究代表者

守田 昭仁（MORITA AKIHITO）

静岡県立大学・食品栄養科学部・助教

研究者番号：40239653

研究成果の概要（和文）：

地域ごとに異なる食材に存在する温度センサー(イオンチャネル)を賦活する成分を探索した。小麦粉・サンショ・タマネギや、静岡県特産品のイチゴ・ネギギエシヤ(ラッキョウ)を有機溶媒で抽出し、温度センサー(TRPV1 や TRPA1)の活性を測定した。素材の抽出成分は温度センサーを賦活したが、強い生理活性を示す成分は単離できていない。また、マウスにアルコールを単回投与し、急性脂肪肝を形成するモデルを作成し、温度センサー賦活成分の脂肪肝予防効果評価系を確立した

研究成果の概要（英文）：

Effects of cultivars in the Shizuoka area on the thermo-sensitive ion channels were investigated. The activity of thermo-sensitive TRPV1 or TRPA1 was measured after the addition of solvent extracts from wheat flour, Japanese pepper, onion, strawberry, scallion bakers garlic, and welsh onion. Although some extracts activate TRPV1 and/or TRPA1 channels, the components that activate these channels strongly, have not been isolated. In order to investigate the preventive effects of these channel activating components on the fatty liver, acute alcoholic fatty liver model was created by the administration of ethanol into mice.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2010年度 | 1,800,000 | 540,000 | 2,340,000 |
| 2011年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 2012年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活

キーワード：食素材・イオンチャネル・肥満・脂肪肝

1. 研究開始当初の背景

地域特産品の機能性に関する知見は、地域ごとにバラつきがあるが、年々蓄えられてきている。日本食品科学工学会で編纂した地域素材データベースをみると、各地域で特産品の機能性研究が取り進められているが、その地域ごとに異なる機能性で追求されていることが多い。その為、地域ごとに異なる食材で同じような機能成分を比較することが困難である。本研究では、地域ごとに異なる食材でも同じような機能成分が含まれていないかを探索することにした。

ここで、探索する機能を限定する必要がある。本研究では、神経系に作用する食品成分に着目した。すなわち、探求がそれほど進んでいないが、これからメタボリックシンドローム対策として求められる肥満予防に有効な体熱産生促進作用を有する身体の温度センサー（イオンチャンネル）を賦活する食品成分に着目した。

神経系に作用する食品成分で、最も作用が判明しているのはトウガラシである。トウガラシに含まれる capsaicin の作用標的は、感覚神経に存在する capsaicin 受容体 (Transient receptor potential vanilloid subtype 1: TRPV1) である。TRPV1 は 6 回膜貫通型のイオンチャンネルで、capsaicin が TRPV1 に結合すると陽イオン(特に Ca^{2+} イオン)を細胞内に透過させる。興味深いことに、TRPV1 は 43°C 以上の温度を感じる細胞センサーとしても機能する。TRPV1 が属する TRP スーパーファミリーのイオンチャンネルの多くは、温度を感じる細胞センサーとして機能する。TRPV2 は 52°C 以上の高温域で活性化する。TRPV3 と TRPV4 は 35°C の体温域で活性化する。また、低温を感受するイオンチャンネルとして TRPA1 と TRPM8 が報告されている。さらに注目すべきことに、これらの温度感受性イオンチャンネルの多くが、食品成分によっても活性化される。TRPV1 は capsaicin、TRPM8 はペパーミントの menthol、TRPA1 はカラシやワサビの辛味成分アリルイソシアネートによって活性化される。感覚神経に存在する温度感受性イオンチャンネルこそ、様々な食品成分の作用標的である可能性が高く、このようなイオンチャンネルを賦活する食品成分を探索すれば、地域特産品の新しい機能特性を見いだせるはずである。

2. 研究の目的

地球温暖化対策として、地域産業の振興対策として、これからの食品は地産地消を目指す必要がある。ところで、地産地消を目指した場合、地域ごとに、食生活の偏りや栄養バ

ランスの欠如は生じないであろうか？機能性を有する食品素材が地域ごとに偏ってしまわないだろうか？本研究では、地域ごとに異なる食材にも類似した機能成分が存在し、それらを地域ごとにうまく組み合わせることで、地産地消を推進できると考え、新しい食品素材として「温度センサー（イオンチャンネル）を活性化する食品成分」を地域特産品の中から検索することを目的とする。さらに、温度センサー賦活成分が機能すると考えられる脂肪肝形成のモデル系をマウスで構築することも目的とする。

3. 研究の方法

(1) 食品成分の抽出法の検討

① 静岡県産の野菜につき、ヘキサン・酢酸エチル・メタノールの順に溶媒抽出した。

② 静岡県産の野菜のみならず、果実等を含めた農産物を液体窒素存在下でホモゲナイズし、凍結乾燥粉末を取得し、粉末パウダーからメタノールでポリフェノール類を抽出した後、逆相 HPLC に供することで一括分割した。また、メタノール抽出後の残渣はアセトンで抽出し、色素画分と残渣の多糖画分に分画した。

(2) TRPV1 賦活能の測定

各抽出画分を、TRPV1 を異所的に安定的に発現した HEK293 細胞の培地に添加し、細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化を測定することで、TRPV1 賦活能を測定した。また、TRPA1 と TRPV3 を一過的に発現させた HEK293 細胞を用いて細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化を測定することで、TRPA1 及び TRPV3 賦活能を測定した。

(3) 温度感受性の測定

最近の研究成果では、温度センサー TRPV1、TRPV2、TRPV3、TRPV4、TRPM8、TRPA1 などが、感覚神経の末端のみならず、様々な細胞において発現していることが判明した。特に、肝臓・脂肪・血管のそれぞれの細胞でも発現し、温度センサーとして働いている可能性が示されてきている。そこで、肝臓・脂肪・血管や後根神経節から単離した細胞を用い、 Ca^{2+} 感受性の蛍光色素を取り込ませ、還流させる培地の温度を常温から 40°C へあるいは常温から 5°C へと変化させ、あるいは、 15°C で培養した細胞の培地を 15°C から 37°C へと変化させた場合の細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化を測定し、各臓器における温度センサーの役割を解析した。

(4) アルコール単回投与による急性脂肪肝モデルの作成

マウスにアルコールを単回投与するだけで肝臓における脂質代謝が大幅に変動し、急性脂肪肝が形成されることが知られている。この時、脂質代謝のみならず、糖質代謝も変動するはずで、マウスを用いた急性脂肪肝モデルにおける糖質代謝の変動を調べることにした。C57BL/6JJmsSlc にアルコールを単回投与し、その2時間後、6時間後の血液・肝臓を採取し、血液中の生化学的指標を測定すると共に、肝臓中のグリコーゲン量、中性脂肪量、酵素活性を測定し、また、酵素 mRNA 発現量をリアルタイム PCR にて測定した。

4. 研究成果

(1) 静岡県産の野菜の TRPV1 賦活活性

まず、農水産物として、小麦粉・キウイ・リンゴ・ナス・ゴーヤ・トマト・キュウリ・コンブ・チェリー・モモ・ネギ類・シソ・サンショウ・ニンニク・にらなどをヘキサン・酢酸エチル・メタノールで逐次抽出し、各抽出画分の TRPV1 賦活能を測定した結果が、図1である。

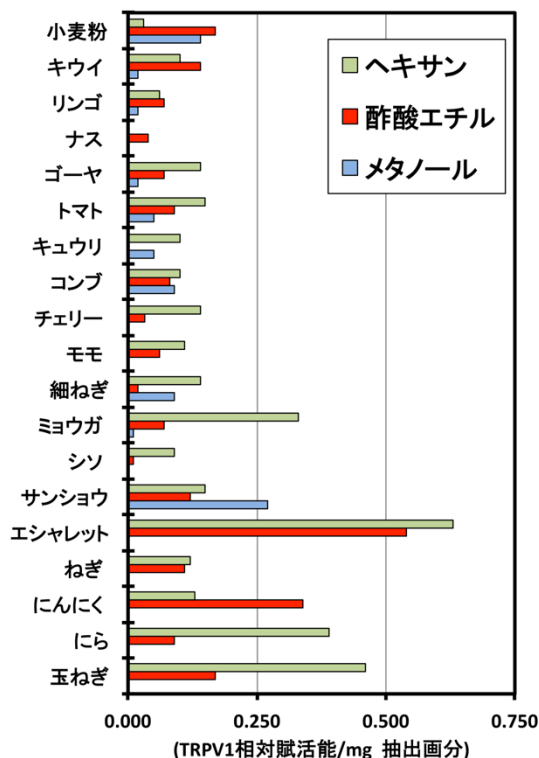


図1 食品素材抽出画分の TRPV1 賦活能

多くの食材のヘキサン画分に TRPV1 賦活能が認められるが、玉ねぎとミョウガのヘキサン画分に含まれるモノアシルグリセロール

が TRPV1 を賦活することが既に判明しており、モノアシルグリセロール含量によって TRPV1 賦活活性が変動している可能性が示された。

他方、ネギ類のなかで静岡県特産の生で食されるラッキョウであるエシャレットの酢酸エチル画分に強い TRPV1 賦活能が認められた。この画分中には多くのポリフェノールが含まれると予想されたので、次にポリフェノールの一斉抽出・一斉分画を試みた。

エシャレットを粉砕後凍結乾燥し、メタノールで抽出し、逆相 HPLC に供して分画した成分の TRPV1 賦活能を測定したところ、弱い活性が存在するものの、成分の単離にまで至っていない。

(2) TRPA1/TRPV2/TRPV3 賦活能の測定

TRPV1 賦活能は TRPV1 を異所的に安定的に発現した HEK293 細胞を用いている。TRPV1 を組込んだプラスミドを HEK293 細胞に一過的に発現させた場合に 10 数%の細胞にしか発現しなかったため、安定的に発現した細胞の取得を試みた。しかし、その後、プラスミドを少量ずつ、丁寧に単離することで、一過性の発現でも TRPV1 が 90%以上発現することを確認できた。そこで、TRPA1/TRPV2/TRPV3 の cDNA を単離し、それらを組込んだ大腸菌のプラスミドを少量ずつ丁寧に単離し、HEK293 細胞に一過的に発現させ、食品素材から抽出した画分の TRPA1/TRPV2/TRPV3 賦活成分の探索が可能となり、現在鋭意探索している。

(3) 温度感受性の測定

TRP ファミリーに属するイオンチャネルの中でも温度センサーとして働くイオンチャネルに着目してきたが、温度センサーとして働くことを実際には確認していなかった。そこで、灌流液の温度を調節しながら、細胞内 Ca^{2+} 濃度を測定する蛍光顕微鏡下で観測するシステムを構築した。

最近になって、温度センサーは感覚神経の末端のみならず、各臓器の細胞にも発現し、機能していることが報告されてきた。特に、脂肪組織・肝臓・血管内皮細胞・血管平滑筋細胞などで発現し、温度を感受して機能している可能性が高まっている。そこで、それらの細胞および感覚神経の細胞に Ca^{2+} 感受性色素を取り込ませ、温度依存的な細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化と、食品素材から抽出した成分に依存した Ca^{2+} 濃度の変化を比較している。

このシステムを活用することで、これまで的人為的に強制発現させた温度センサーの賦活活性ではなく、生体内で機能している細胞における温度センサーの役割を解析しつ

つ、さらに食品成分の作用を解析している。

(4) アルコール単回投与による急性脂肪肝モデルの作成

肝臓に中性脂肪が過剰に蓄積した脂肪肝は大量飲酒や過栄養（糖質や脂肪の大量摂取）により生じる。即ち、大量飲酒や過栄養で生じる肥満と共に生じる生活習慣病のひとつである。TRP を賦活する食品成分はエネルギー代謝を促進することで、脂肪肝の形成を抑制すると考えられる。そこで、マウスにアルコールを投与することで、アルコール性脂肪肝のモデルを作成した。C57BL/6JJmsSlc にアルコールを単回投与したところ、投与 2 時間という短期間に、肝グリコーゲンが減少し、肝臓の中性脂肪が急増し、脂肪肝の形成が確認された。さらに、肝臓の酵素の発現量と活性を測定したところ、糖質代謝と脂質代謝に関わる酵素に大きな変動が認められた。現在、その詳細な変動様式を解析している。今後、TRP を賦活する食品成分の脂肪肝形成に及ぼす効果並びに酵素の発現量に及ぼす影響を解析する予定でいる。

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）

〔学会発表〕（計 2 件）

①佐藤 友紀、長池 祐太、守田 昭仁、三浦 進司：アルコール単回投与による肝臓での糖・脂質代謝変化、第 67 回日本栄養・食糧学会大会(2013. 5. 25～2013. 5. 26)、名古屋大学・愛知

②長池 祐太、只石 幹、佐藤 友紀、守田 昭仁、江崎 治、亀井 康富、三浦 進司：PGC-1 α を介した骨格筋分岐鎖アミノ酸代謝酵素の発現変化、第 67 回日本栄養・食糧学会大会(2013. 5. 25～2013. 5. 26)、名古屋大学・愛知

〔図書〕（計 1 件）

①守田 昭仁、古旗 賢二、【29】辛いものを食べると汗が出るのはなぜ？ スパイスなんでも小事典（日本香辛料研究会編）講談社、東京、pp92-96（2011）

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

守田 昭仁 (MORITA AKIHITO)
静岡県立大学・食品栄養科学部・助教
研究者番号：40239653

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者