

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2017

課題番号：26712023

研究課題名(和文) PPAR アゴニスト活性を有する農業系副産物給与による肉質制御技術の創成

研究課題名(英文) Innovation of novel technology in meat quality regulation by agricultural by-products with PPARdelta agonistic activities

研究代表者

水野谷 航 (Mizunoya, Wataru)

九州大学・農学研究院・助教

研究者番号：20404056

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,200,000円

研究成果の概要(和文)：筋線維には速筋タイプと遅筋タイプが存在し、その組成比は肉質にも影響を与える。核内受容体PPAR $\delta$ の活性化は遅筋タイプを増加することが知られていたため、PPAR $\delta$ の活性化を通して遅筋タイプを増加する技術が開発できると着想した。我々はキノコの一つのユキレイタケおよびその菌床に強いPPAR $\delta$ アゴニスト活性を見出した。ユキレイタケ菌床を飼料に添加した結果、マウスで骨格筋PPAR $\delta$ 活性化が誘導され、ブタでも似た傾向が観察された。これらのエタノール抽出物は腹腔内投与では活性が認められたが、経口投与では活性が失われた。従って消化・吸収で活性が低下する成分であるということが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Muscles having abundant slow fiber type exhibit good meat quality and tenderness. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) $\delta$  is thought to induce fast-to-slow fiber type transition. Here, we measured and searched various PPARdelta agonistic activities from various agricultural products and by-products. We found the extracts of both Yukireitake mushroom and the mushroom bed showed potent PPARdelta agonistic activities. The expression level of PPARdelta target genes after the administration of these extracts tended to be up-regulated dose-dependently via interperitoneal injection. Meanwhile, these activities were diminished when orally injected. Thus, to obtain the PPARdelta agonistic activities of Yukireitake mushroom or mushroom bed, it is needed to find a way to avoid the effects of a digestive tract.

研究分野：筋細胞生物学・食肉科学

キーワード：骨格筋 筋線維タイプ 肉質 PPAR $\delta$  遅筋 速筋 食肉生産 ブタ

## 1. 研究開始当初の背景

骨格筋は筋線維と呼ばれる多核細胞が束になった組織である。筋線維は収縮特性および代謝特性の違いから、遅筋タイプ(1型、赤筋)と速筋タイプ(2型、白筋)に分類される。筋線維タイプ組成は、骨格筋の種類や動物個体によって異なり、遺伝要因と環境要因で変化する。筋線維タイプはヒトの運動機能(瞬発性や持久性)や抗肥満性(脂肪代謝能力)に影響すると言われている。また筋線維タイプと家畜の肉質に関し、遅筋タイプが多い食肉は筋線維直径が小さいためか、きめが細かく軟らかいとされる。栄養成分の観点では、遅筋タイプが多い食肉は鉄分やタウリン、カルニチンを多く含むことが分かっている。

筋線維タイプの調節機序についてはいまだ不明な点が多く残されているが、核内受容体とその関連因子に筋線維タイプを調節する役割が次々と発見されている。中でも、ペロオキシソーム増殖活性化受容体 $\delta$ (PPAR $\delta$ )については機能解析が進んでおり、活性型PPAR $\delta$ を骨格筋に過剰発現させると、遅筋タイプの著しい増加が生じ持久運動能力が向上すること、そして骨格筋の脂肪代謝が活性化し、体脂肪が減少することが知られている。従って、骨格筋 PPAR $\delta$ は遅筋タイプ筋線維の比率を調節する鍵因子と考えられる。PPARファミリーの他のアイソフォーム PPAR $\alpha$ ,  $\gamma$ では、食品由来成分から多数のアゴニスト成分が見つかってきている。しかしながら、PPAR $\delta$ では、食品由来のアゴニスト成分はほとんど知られておらず、現在までイワヨモギ、エンジュ、ヤマブシタケに含まれる化合物が PPAR $\delta$  アゴニストとして働くという程度が報告されているに過ぎない。

一方でこのような成分が必ずしも人間の食品の可食部位にのみ含まれるとは限らない。特に多くの植物体において可食部位の含有成分は、廃棄部位とされる茎や葉、その他の部位にも含まれている事が多い。ブタやニワトリ等の家畜であれば、このような廃棄部位であっても、法令に基づき適切な工程を経ることで通常飼料に混ぜて摂取させることが可能である。家畜が PPAR $\delta$  アゴニスト成分を摂取すれば、遅筋タイプが増加し、家畜の肉質も向上すると考えられる。さらに PPAR $\delta$ を活性化させる有効成分は家畜の骨格筋に蓄積されると考えられ、その畜肉をヒトが摂取することで濃縮された有効成分を間接的にヒトが摂取することが可能となる。

## 2. 研究の目的

本研究課題の最終的な目標は、骨格筋の遅筋タイプ筋線維を増加させる飼料素材を発見することである。そのために、本研究では、まずいくつかの農作物から抽出物を調製し、PPAR $\delta$  アゴニスト活性およびそれらの抽出

物が筋細胞の PPAR $\delta$  標的遺伝子発現に及ぼす影響を調べることとした。さらにその素材が家畜(ブタ)へ応用可能かどうかの予備試験も実施した。

## 3. 研究の方法

### 実験1 各種農作物抽出物の PPAR $\delta$ アゴニスト活性測定

ヤマブシタケ、ユキレイタケ、ミカン柱頭、ミカン花弁、クコ、トマト外皮、トマト葉を凍結乾燥させ、乾燥体を作成した。乾燥体にエタノールを加え、エタノール抽出液を得て、エタノール抽出物とした。得られた抽出残渣に超純水を加え、浸透しながら得られた水抽出液は凍結乾燥し水抽出物とした。核内受容体コファクターアッセイ系(EnBio RCAS for PPAR $\delta$ (藤倉化成株式会社))により PPAR $\delta$  アゴニスト活性を測定した。なおポジティブコントロールとして PPAR $\delta$  特異的合成アゴニスト GW501516(Enzo life sciences)を使用した。溶媒は DMSO を用いた。

### 実験2 マウスを用いたユキレイタケおよびその抽出物投与試験

7-8 週齢の雄性 C57BL/6J マウスを動物飼育室にて 7 日間の予備飼育を行い、その後、体重が同程度の群に分け試験に供した。5%の乾燥ユキレイタケ子実体もしくはユキレイタケ菌床粉末を AIN-93G 組成の飼料に添加し 24 時間の自由摂食後に長趾伸筋(EDL)およびヒラメ筋を摘出した。また、ユキレイタケ子実体と菌床抽出物を、40-1000 mg/kg 体重の範囲で腹腔内投与および経口投与を行った。経口投与あるいは腹腔内投与と試験では投与から 6 時間後に筋組織を摘出した。摘出した筋組織から Trizol 試薬を用いて total RNA を抽出し、逆転写後、real-time qPCR に供し、PPAR $\delta$  標的遺伝子のピルビン酸デヒドロゲナーゼキナーゼ 4(PDK4)、脱共役タンパク質 3(UCP3)、アンジオポエチン様タンパク質 4(Angptl4)の発現量を  $\beta$ -actin を内部標準として解析した。

### 実験3 ブタを用いた 24 時間ユキレイタケ配合飼料給餌試験

80-90 kg の大ヨークシャー系の去勢ブタ 6 頭を用いて 24 時間の給餌試験を行った。対照区には標準的な肥育期飼料を、処理区には 1, 10%のユキレイタケ子実体もしくは菌床乾燥粉末を混ぜて給餌後、24 時間後に局所麻酔下のバイオプシーにより胸最長筋から肉片を採取した。試験は wash out 期間を 2 日間以上としたクロスオーバー試験とした(全 5 回)。摘出後の筋組織は、マウスと同様の方法で RNA を抽出し、PDK4 と UCP3 遺伝子発現を調べた。

## 4. 研究成果

### 実験 1 各種農作物抽出物の PPAR $\delta$ アゴニスト活性測定

各種農作物抽出物の中でユキレイタケのエタノール抽出物に高い PPAR $\delta$  アゴニスト活性が見られた。また、そのユキレイタケの菌床のエタノール抽出物にも、同様に高い PPAR $\delta$  アゴニスト活性が見られた。ユキレイタケは中国原産のキノコで、近年日本での生産も拡大してきている。生理作用としては抗酸化作用の報告がある。ユキレイタケ子実体は、1つの生産拠点で1ヶ月当たり約100kgの廃棄部位が整形過程で出ていることから、本来は人間の食用部位である子実体を、家畜飼料へ応用することも可能と考えられる。またユキレイタケの人工栽培では廃棄部位として大量の菌床が出ることから、この廃棄部位の有効利用が期待できる。そこでこのユキレイタケに着目し、以降の解析を進めた。

### 実験 2 マウスを用いたユキレイタケ抽出物投与試験

5%乾燥ユキレイタケ菌床を添加した飼料を与えたマウスの EDL における PPAR $\delta$  標的遺伝子の PDK4 および UCP3 の遺伝子発現量は、対照群と比較して、有意に増加した (Fig. 1)。すなわち、ユキレイタケ菌床を摂取すると骨格筋の PPAR $\delta$  が活性化されることが示唆された。5%乾燥ユキレイタケ子実体を配合した飼料では遺伝子発現に変化はなかった。なお、5%乾燥ユキレイタケ菌床添加食を8週間マウスに与え、骨格筋の筋線維タイプに関わる因子の解析を実施したが、マウスの筋線維タイプに関わる因子に有意な変化は見られなかった。長期的に EDL の PPAR $\delta$  が活性化されることで遅筋タイプ筋線維が増加することを期待していたが、そうならなかった原因について今後検討していかねばなら

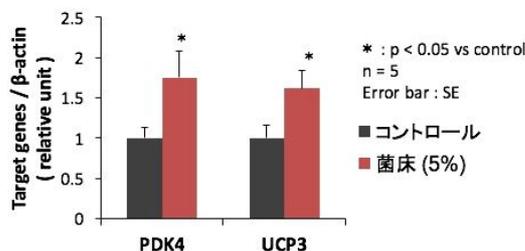


Fig.1 ユキレイタケ菌床添加飼料摂取後の EDL の PPAR $\delta$  標的遺伝子発現 (マウス)

ない。

PPAR $\delta$  の活性化成分についてさらに検証するため、ユキレイタケ子実体と菌床それぞれのエタノール抽出物を様々な濃度で腹腔内投与および経口投与を行った。その結果、腹腔内投与では、ユキレイタケ子実体と菌床共にほぼ同様の結果となり、EDL とヒラメ筋

において 40 mg/kg 以上の投与量で、有意な PPAR $\delta$  標的遺伝子発現の増加が確認でき、そ

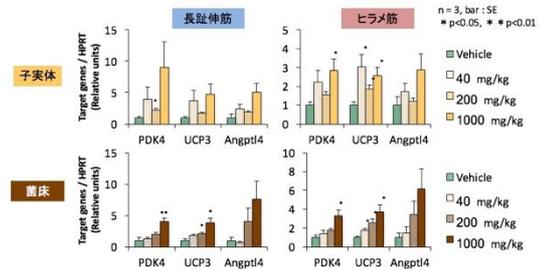


Fig.2 ユキレイタケ菌床抽出物腹腔内投与後の PPAR $\delta$  標的遺伝子発現 (マウス)

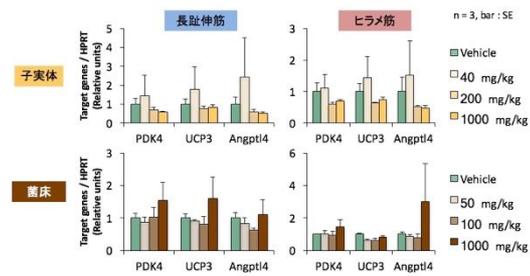


Fig.3 ユキレイタケ菌床抽出物経口投与後の PPAR $\delta$  標的遺伝子発現 (マウス)

の増加は概ね濃度依存的であった (Fig.2)。

しかし一方で、子実体と菌床抽出物を経口投与したところ、腹腔内投与で見られた遺伝子発現の変化は観察されず、どの投与量でもほぼ対照群と差がなかった (Fig.3)。従って、抽出物に含まれる PPAR $\delta$  活性化成分は腹腔内投与では生体内で作用するが、経口投与では作用しないということが明らかとなった。経口投与では、投与成分の大部分は胃や小腸を通り消化管で吸収された後、肝臓へと運ばれ、そこで修飾や分解などを受け、全身へと運ばれる。逆に腹腔内投与により投与された成分は腹膜を浸透していき周囲の血管に取り込まれ、そのまま全身の各臓器へと運ばれると考えられる。そこで我々はユキレイタケに含まれる PPAR $\delta$  活性化成分が、消化管内で微生物による代謝や消化酵素による分解を受けた、もしくは肝臓で修飾や代謝をされたことで、活性が低下した可能性を考えた。薬学分野でも上述のように肝臓によって薬剤の活性が変化するケースがあり、初回通過効果と呼ばれている。ただし脂溶性の成分は、血液系ではなくリンパ系に吸収され、胸管を経て鎖骨下静脈から循環血流に乗るため、脂溶性の成分は、初回通過効果を受けることなく循環血流に乗ると言われている。エタノール抽出物は水溶性画分が除去されており、脂溶性成分であると推測されることから、初回通過効果を受けたかどうかの判断は慎重にせねばならない。ユキレイタケ子実体を添加した飼料摂取で PPAR $\delta$  標的遺伝子の発現が増加しなかったのも同様の理由と考えられる。

以上の検討から、ユキレイタケ子実体の PPAR $\delta$  活性化成分を骨格筋を含む体内の臓器で作用させるためには、消化・吸収の影響

を回避する工夫が必要であることが示唆された。一方、ユキレイタケ菌床を抽出物にせずに、飼料に添加して摂取すると、骨格筋の PPAR $\delta$  活性化が生じる理由は不明である。エタノール抽出画分以外の菌床画分に、PPAR $\delta$  活性化成分の活性低下の影響を軽減する作用があるのかも知れない。しかしこのような 2 成分以上の複合的な生理作用は、現段階の解析技術では検証が非常に困難である。

### 実験3 プタを用いた24時間ユキレイタケ配合飼料摂取試験

最後に実験 2 で行ったマウスの 24 時間ユキレイタケ子実体およびその菌床添加飼料摂取の効果を家畜で検証するために、ブタを用いた予備試験を実施した。統計上有意な差はなかったが、胸最長筋における PPAR $\delta$  標的遺伝子の PDK4 および UCP3 の遺伝子発現量は、対照飼料を摂取した時の値と比較して、特に菌床の摂取で増加するパターンが観察された (Fig.4)。

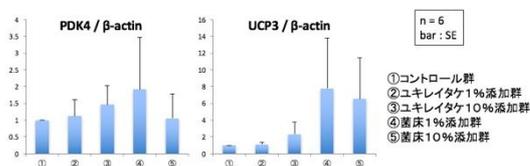


Fig.4 ユキレイタケ子実体あるいは菌床添加飼料摂取後の胸最長筋の PPAR $\delta$  標的遺伝子発現 (ブタ)

### 総括

以上の検討から、骨格筋の PPAR $\delta$  活性化を誘導する新規飼料素材としてユキレイタケ子実体および菌床を見出した。ただし、活性化成分は消化・吸収の過程でその活性が失われる事が分かったので、応用には何らかの工夫で活性を維持する必要がある。

### 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)

[雑誌論文](計 14 件)

Komiya Y., Sawano S., Mashima D., Ichitsubo R., Nakamura M., Tatsumi R., Ikeuchi Y. and Mizunoya W. Mouse soleus (slow) muscle shows greater intramyocellular lipid droplet accumulation than EDL (fast) muscle: fiber type-specific analysis. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*. 2017. 査読有

【総説】水野谷航 骨格筋線維タイプの食品栄養学的制御に関する研究. *日本栄養・食糧学会誌* 69(1): 3-9. 2016. 査読有

Sawano S., Komiya Y., Ichitsubo R., Ohkawa Y., Nakamura M., Tatsumi R., Ikeuchi Y. and Mizunoya W. A one-step immunostaining method

to visualize rodent muscle fiber type within a single specimen. *PLOS ONE* 11(11): e0166080. 2016. 査読有

Mizunoya W., Miyahara H., Okamoto S., Akahoshi M., Suzuki T., Do M.K., Ohtsubo H., Komiya Y., Lan M., Waga T., Iwata A., Nakazato K., Ikeuchi Y., Anderson J.E. and Tatsumi R. Improvement of endurance based on muscle fiber-type composition by treatment with dietary apple polyphenols in rats. *PLOS ONE* 10(7): e0134303. 2015. 査読有

【総説】Mizunoya W. Nuclear receptors and skeletal muscle fiber type. *The Journal of Physical Fitness and Sports Medicine* 4(3): 259-270. 2015. 査読有

[学会発表](計 49 件)

井本大輔, 西條裕美, 清水邦義, 中村真子, 辰巳隆一, 水野谷航, ユキレイタケの子実体および菌床中に含まれる PPAR 活性化成分の探索, 第 122 回日本畜産学会大会, 2017.3.27. 神戸

Wataru Mizunoya, Daisuke Imoto, Mako Nakamura, Ryuichi Tatsumi, Yoshihide Ikeuchi, Yukireitake mushroom (*P. eryngii* var. *tuoliensis* C.J.Mou) has both agonistic and antagonistic activities against peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) delta, The 17th Asian-Australasian Association of Animal Production Societies Animal Science Congress, 2016.8.22. Fukuoka

水野谷航, 天然由来の遅筋増加剤 -食味・栄養価を改善する家畜飼料への展開-, KTC 新技術説明会, 2015.12.3. 熊本

Wataru Mizunoya, Toshiya Nakamura, Daisuke Imoto, Yusuke Komiya, Fuminori Kawabata, Mako Nakamura, Ryuichi Tatsumi, Yoshihide Ikeuchi, Effect of Yamabushitake mushroom (*Hericium erinaceus*) intake on functional and physicochemical properties of skeletal muscle in mice, ACN2015 (12th Asian Congress of Nutrition), 2015.5.14. Yokohama

水野谷航, 石井もも子, 清水邦義, 永田敏郎, 平木絵里, 中村俊哉, 中村真子, 辰巳隆一, 池内義秀, ヤマブシタケは骨格筋の核内受容体 PPAR を活性化する, 第 68 回日本栄養・食糧学会大会, 2014.6.1. 江別

[図書](計 1 件)

水野谷航 他、熊谷秋三, 田中茂穂, 藤井宣晴編集、杏林書院、身体活動・座位行動の科学～疫学・分子生物学から探る健康～、2016、pp 154-162

[産業財産権]

出願状況(計 1 件)  
名称: 天然物由来 P P A R $\delta$  活性化剤とそれを用いた遅筋増加剤  
発明者: 水野谷航、清水邦義  
権利者: 同上

種類：特許  
番号：特開 2014-185154  
出願年月日：2014 年 10 月 2 日  
国内外の別：国内

## **6 . 研究組織**

### (1)研究代表者

水野谷 航 (MIZUNOYA, Wataru )  
九州大学・大学院農学研究院・助教  
研究者番号：20404056