

アロニア果汁含有成分による脂肪蓄積抑制効果

山根拓也^{1,2,3}、小塚美由記⁴、今井ももこ^{1,5,6}、石田哲夫⁷、竹中重雄⁵、
阪本龍司^{1,2}、乾博^{1,5}、山本好男⁸、大久保岩男⁹、中垣剛典⁵、中野長久^{1,2}

¹大阪府大・生資セ、²生命環境、⁵地域保健、³中垣技術士事務所・食科研、

⁴北海道文教大・健康栄養、⁶相愛大・発達栄養、⁷琉球大・理、

⁸三重大・地域拠点、⁹市立三笠総合病院

日本栄養・食糧学会 COI 開示

山根拓也

演題発表に関連し、開示すべきCOI関係にある
企業などはありません。

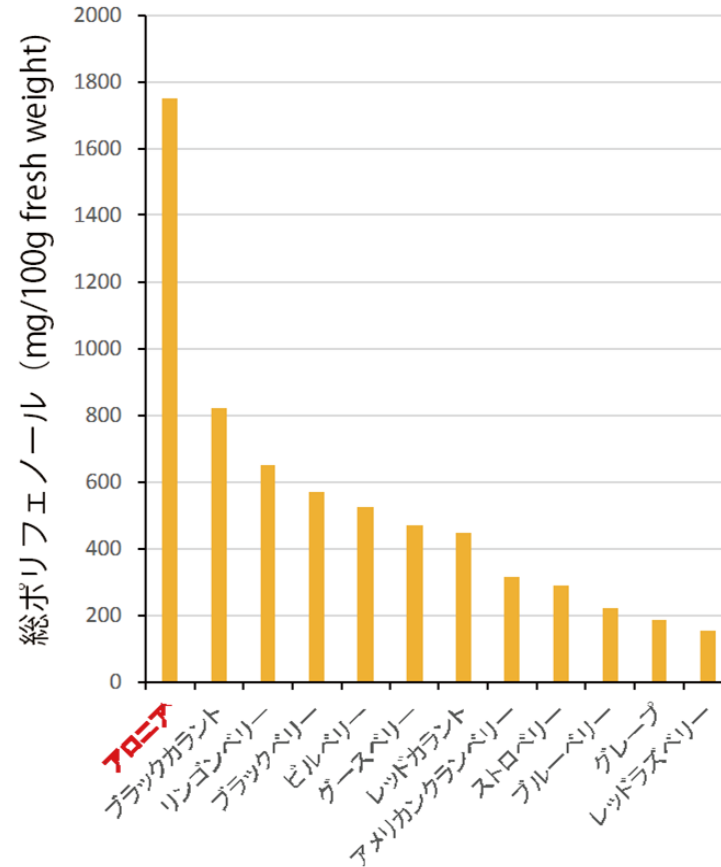
アロニア

Aronia (アロニア)

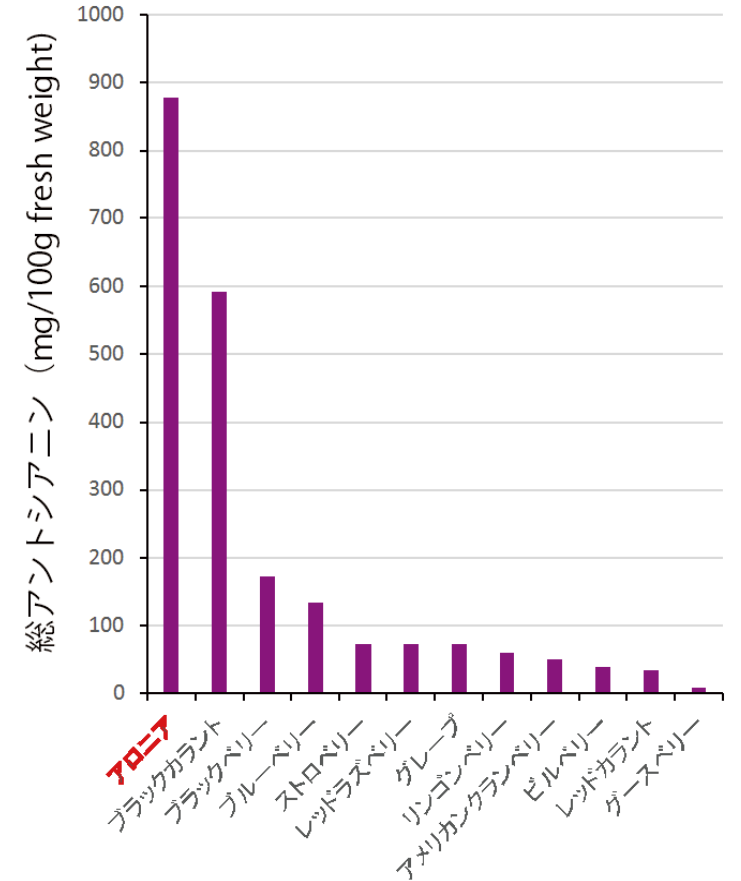


- ・アロニアは北米原産のバラ科に属する黒紫色の果実
- ・ロシア、ポーランド、ブルガリアで広く生産
- ・日本では北海道や東北で栽培

総ポリフェノール量



総アントシアニン量



アロニアによる健康効果

2型糖尿病改善効果

*血糖値上昇抑制

高脂血症改善効果

*TG上昇抑制
*LDLコレステロール
上昇抑制

高血圧改善効果

*血圧上昇抑制



肥満改善効果
肝臓保護効果

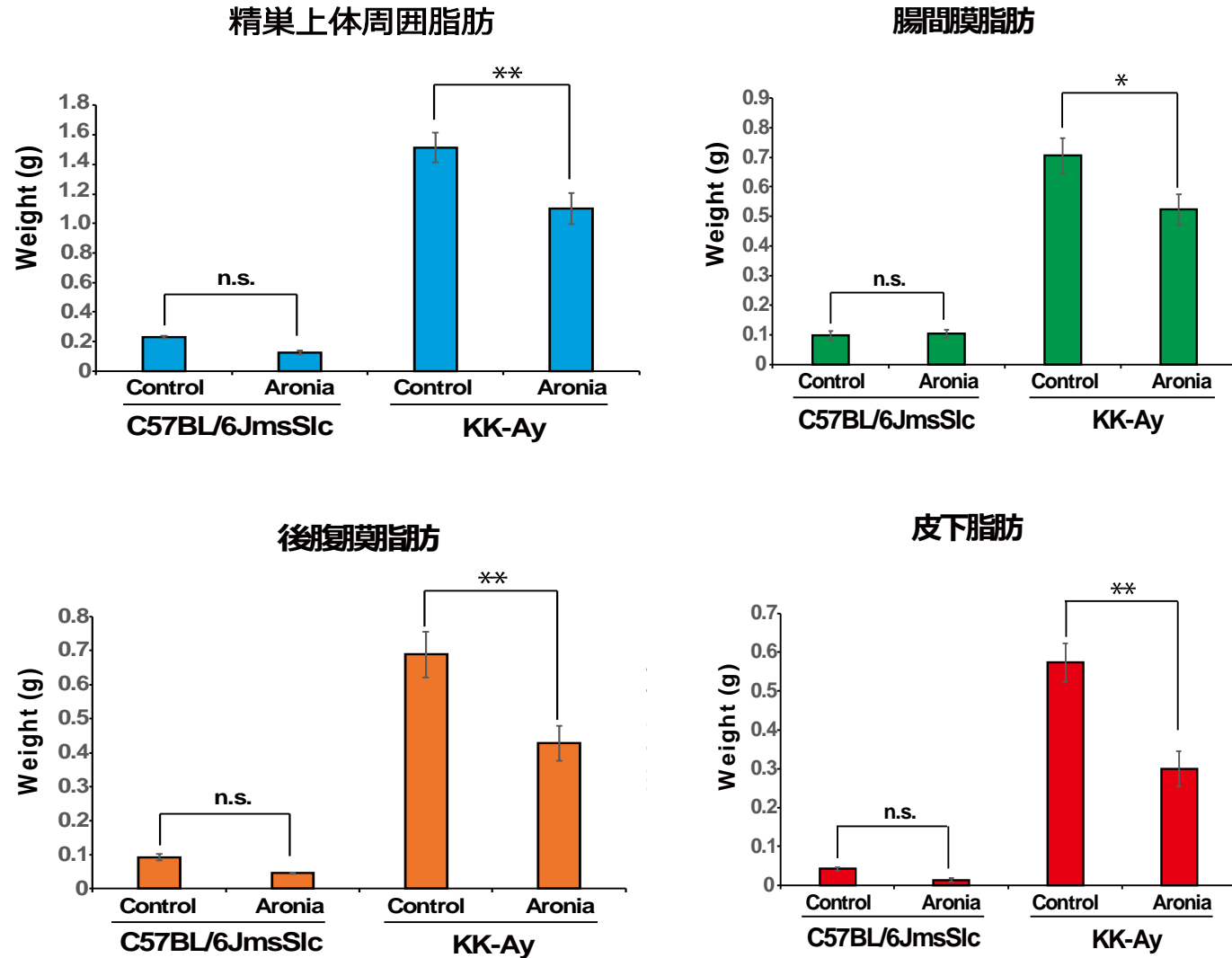
*脂肪蓄積抑制
*脂肪肝改善
*肝線維化抑制

腸内細菌叢改善

アロニアによる肥満改善効果

- 高フルクトース食とアロニア抽出物をオスのラットに同時に6週間摂取させると高フルクトース食のみを摂取させたラットと比較して、精巣上体周囲白色脂肪組織重量が減少する(Qin et al., British J. Nutr. 2012)。
- 高脂肪食とアロニアを4週間摂取したラットでは高脂肪食のみを摂取したラットと比較して、内臓脂肪重量が減少する(Takahashi et al., J. Oleo Sci. 2015)。
- アロニア果汁(100%)を4週間摂取した2型糖尿病・肥満モデルKKAYマウスでは、内臓脂肪および皮下脂肪重量が減少する(Yamane et al., JNB 2016)。

アロニア果汁を摂取したKKAyマウスでは脂肪組織重量が減少する



* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$
n.s. not significant. n=5.

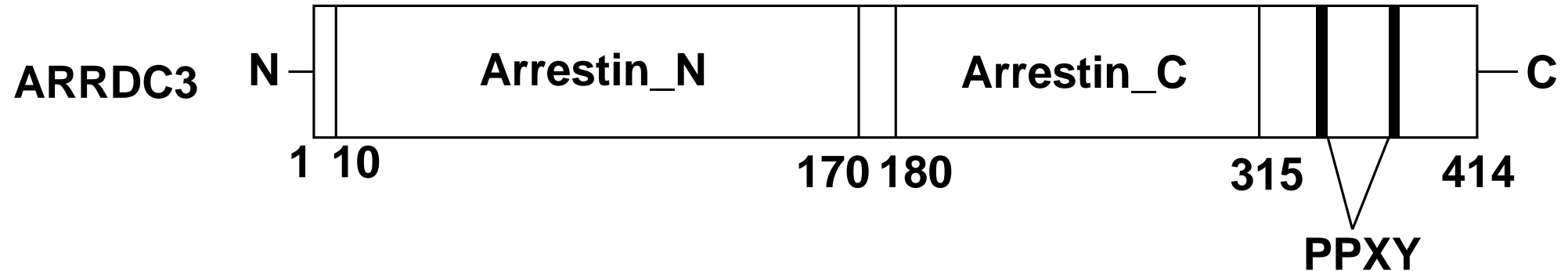
高脂肪食摂取時にアロニアを摂取したマウス肝臓において発現が変化する遺伝子

Gene symbol	Gene name	Accession number	Ratio
Saa2	Serum amyloid A2	NM_011314	3.942
Gadd45g	Growth arrest and DNA-damage-inducible 45 gamma	NM_011817	3.351
Igfbp1	Insulin-like growth factor binding protein 1	NM_008341	3.042
Arl4d	ADP-ribosylation factor-like 4D	NM_025404	3.028
Cyp3a11	Cytochrome P450, family 3, subfamily a, polypeptide 11	NM_007818	2.889
Mt2	Metallothionein 2	NM_008630	2.702
Agxt2l1	Alanine-glyoxylate aminotransferase 2-like 1	NM_027907	2.645
Cyp4a12b	Cytochrome P450, family 4, subfamily a, polypeptide 12B	NM_172306	2.171
Slc25a25	Solute carrier family 25 member 25	NM_146118	2.130
2310076L09Rik	None	None	2.125
Slc39a4	Solute carrier family 39 member 4	NM_028064	2.082
Eaf2	ELL associated factor 2	NM_001113401	2.048
Spata2L	RIKEN full-length enriched library, clone:A830015E22	AK139339	2.000

Gene symbol	Gene name	Accession number	Ratio
Serpina4-ps1	Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 4, pseudogene 1	BC031891	0.149
Arrdc3	arrestin domain containing 3	NM_001042591	0.260
Phlda1	Pleckstrin homology-like domain, family A, member 1	NM_009344	0.360
Me1	Malic enzyme 1, NADP(+)-dependent, cytosolic	NM_001198933	0.421
Foxa2	Forkhead box A2	NM_010446	0.432
Idi1	Isopentenyl-diphosphate delta isomerase	NM_145360	0.451
Csad	Cysteine sulfinic acid decarboxylase	NM_144942	0.460

Yamane T et al. FFHD 2016

Arrestin domain containing 3 (Arrdc3)



- ARRDC3はPPXYドメインを有し、WWドメインを持つNedd4 ubiquitin ligaseと結合する(Qi et al., JBC 2014)。
- ARRDC3は初期エンドソームにおいて β 2-adrenergic receptorと相互作用し、レセプターのリサイクリングを阻害する(Tian et al., JBC 2016)。
- ノックアウトマウスの白色脂肪組織では脂肪分解が増加する(Patwari et al., Cell Metab 2011)。
- 脂肪組織特異的にArrdc3をノックアウトしたマウスの白色脂肪組織ではPparsとそのターゲット遺伝子の発現が増加する(Carroll et al., PLOS ONE 2017)。

本研究に用いたアロニア果汁

組成	アロニア果汁 (g/100 g)
タンパク質	0.2
炭水化物	17.9
脂質	<0.1
ミネラル	0.5
食物繊維	0.3
エネルギー (kcal/100 g)	73

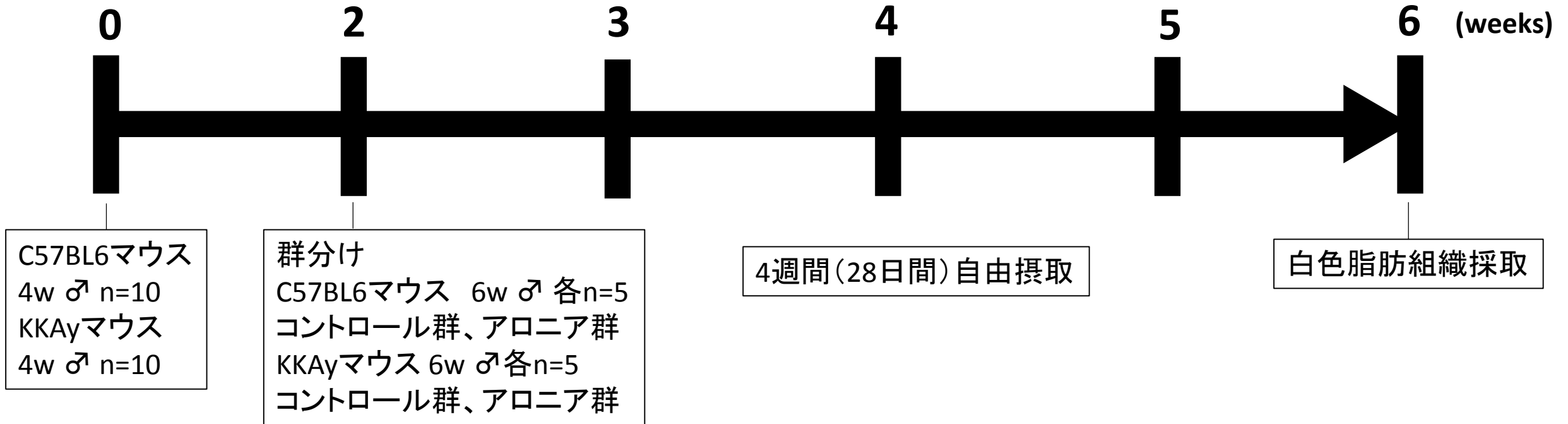
組成	アロニア果汁 (g/100 g)
グルコース	4.25
フルクトース	3.87
ソルビトール	7.39



組成	アロニア果汁 (g/100 g)
ORAC	100 μ mol TE / g
総アントシアニン	0.014
ポリフェノール	0.99

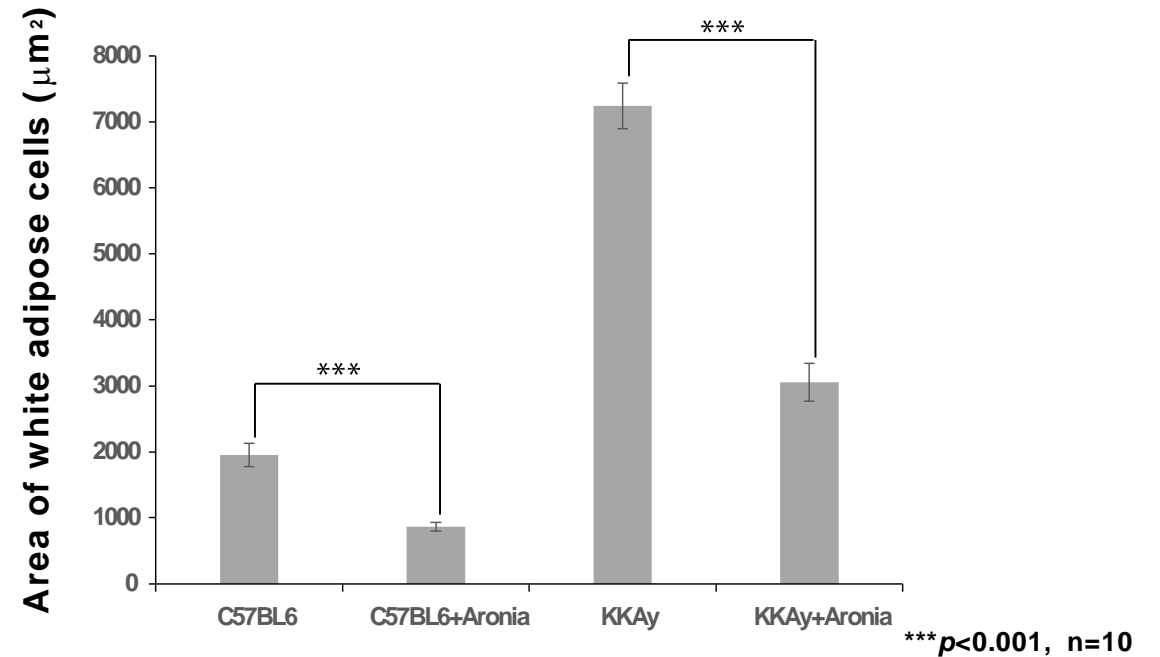
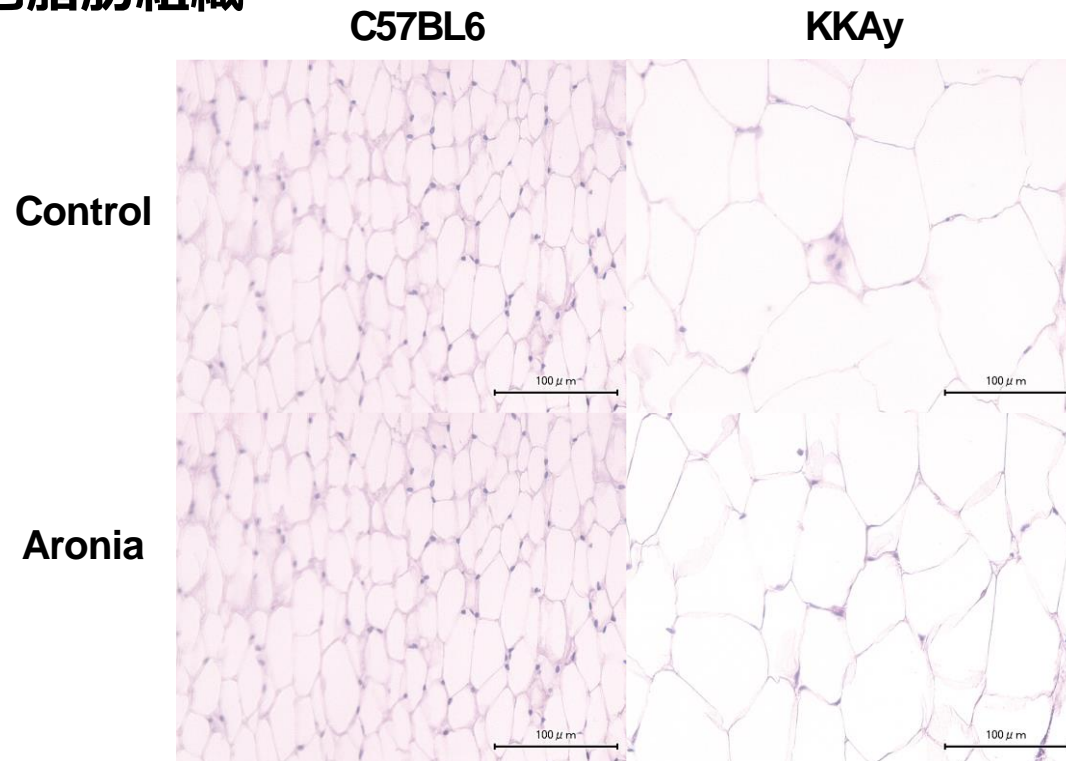
本研究では、アロニア果汁による白色脂肪組織あるいは3T3-L1細胞における脂肪蓄積抑制効果と遺伝子発現変化について検討した。

マウスへのアロニア果汁摂取



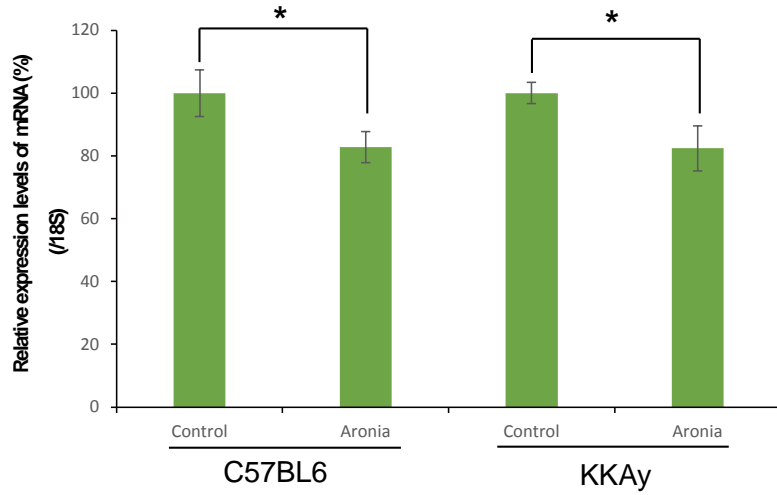
アロニア果汁摂取による脂肪蓄積減少効果

白色脂肪組織

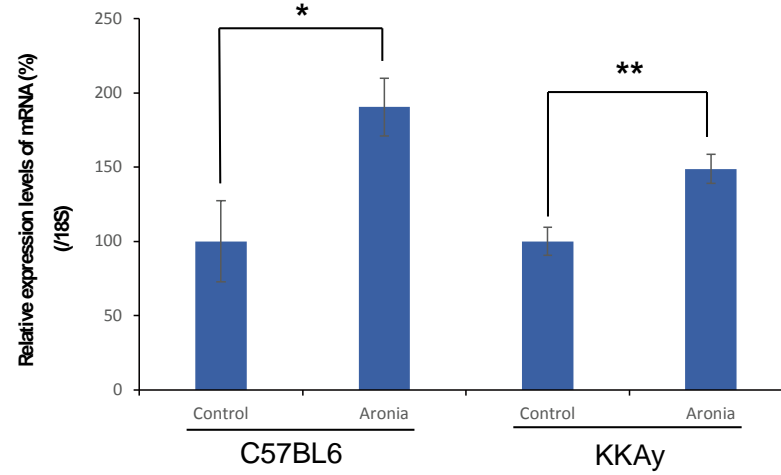


白色脂肪組織における遺伝子発現変化

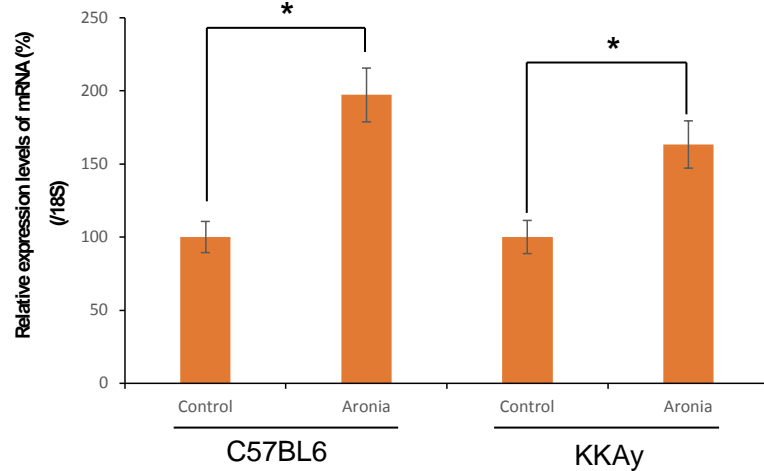
A. Arrdc3



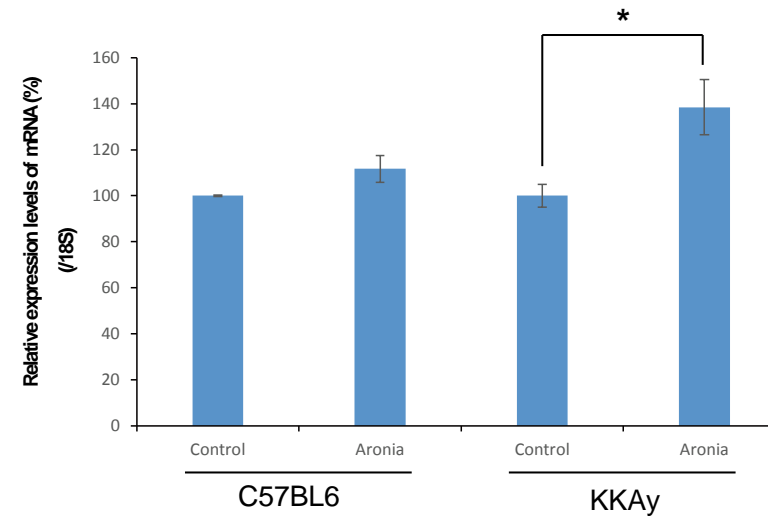
C. Pparg



B. Sirt2

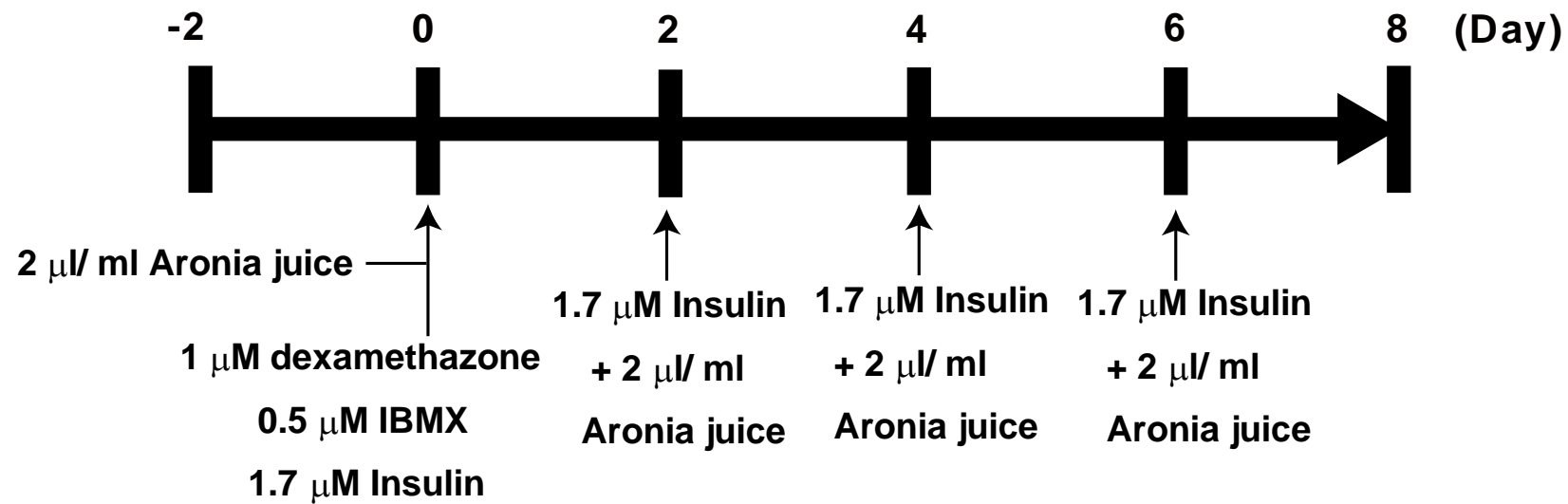
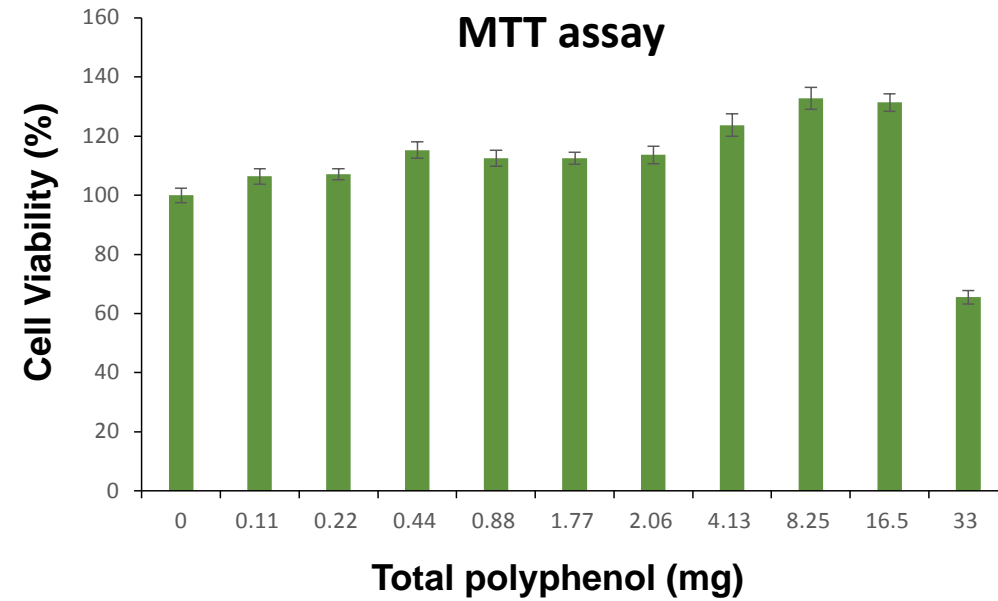


D. Lpl



* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

3T3-L1細胞へのアロニア果汁添加



3T3-L1細胞への脂肪蓄積抑制効果

Oil Red O 染色

Day0

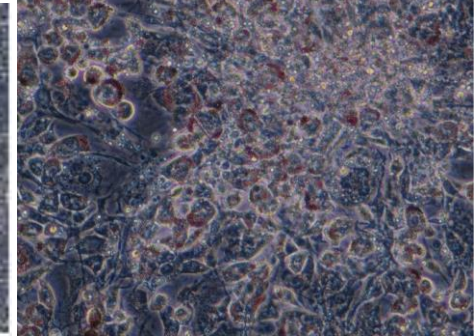
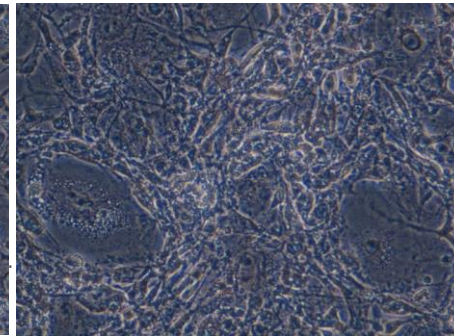
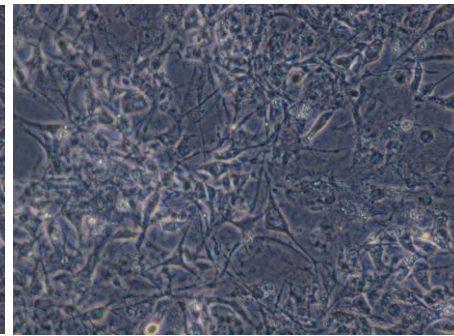
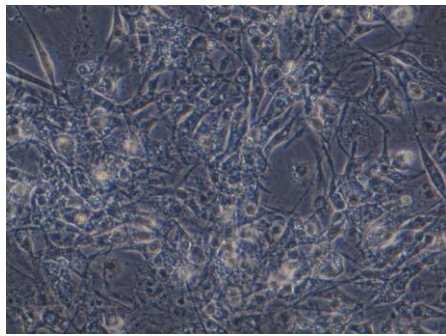
Day2

Day4

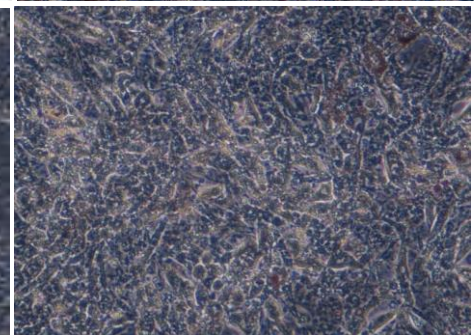
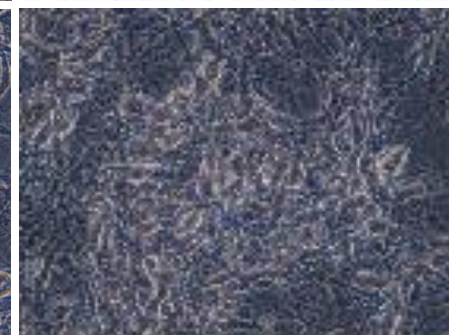
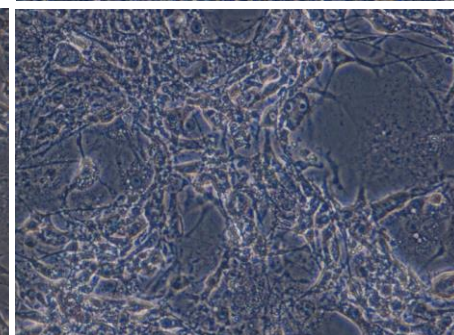
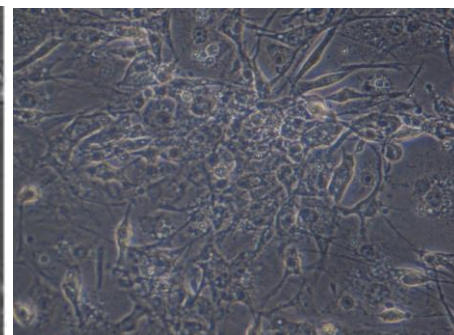
Day6

Day8

Control

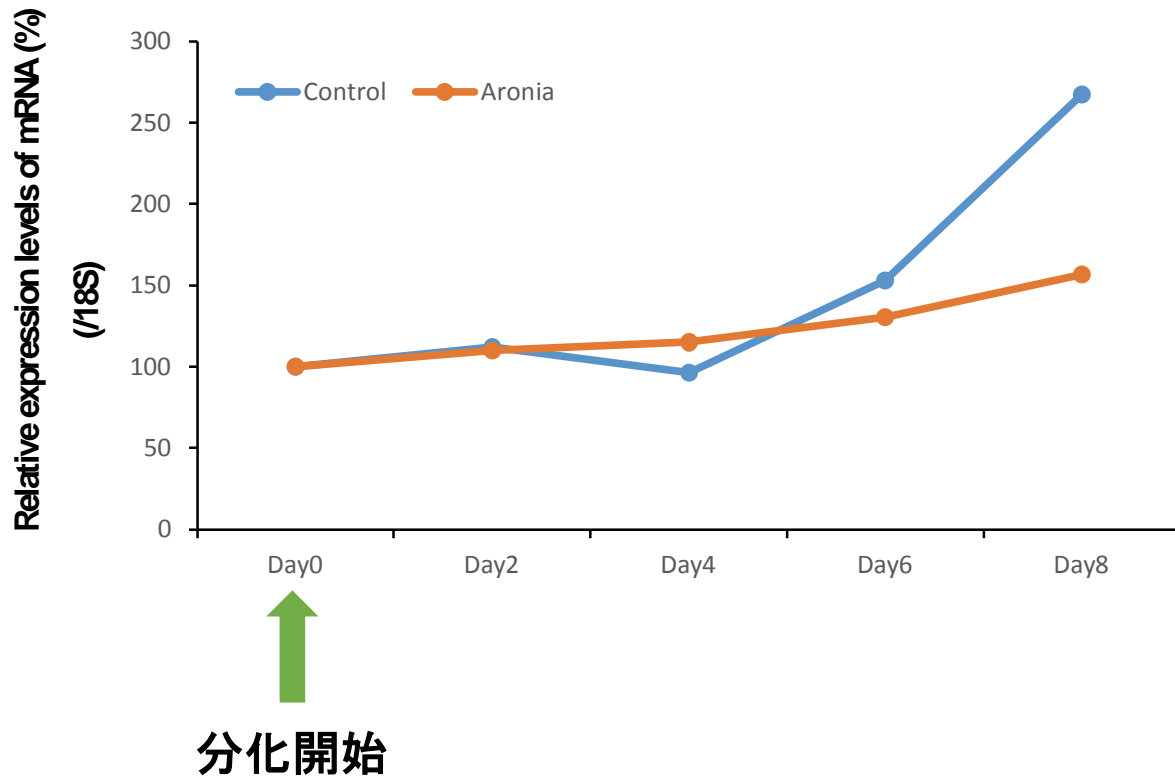


Aronia

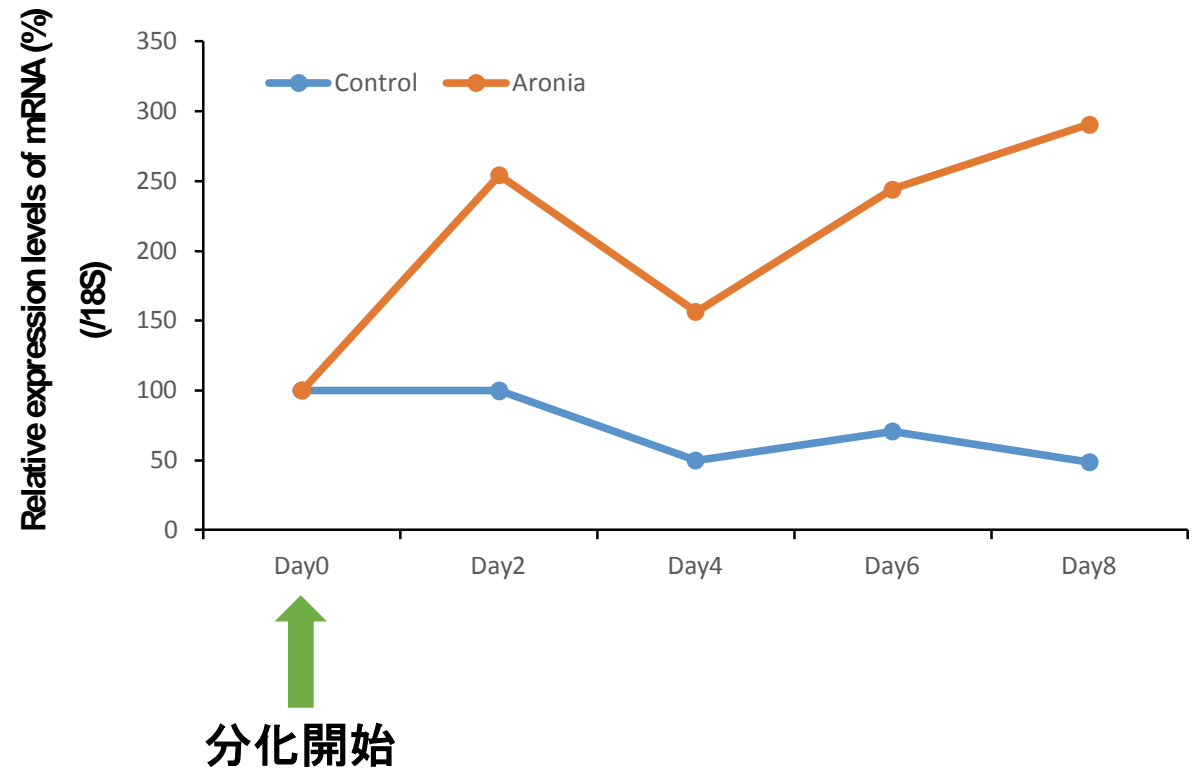


3T3-L1細胞における遺伝子発現変化

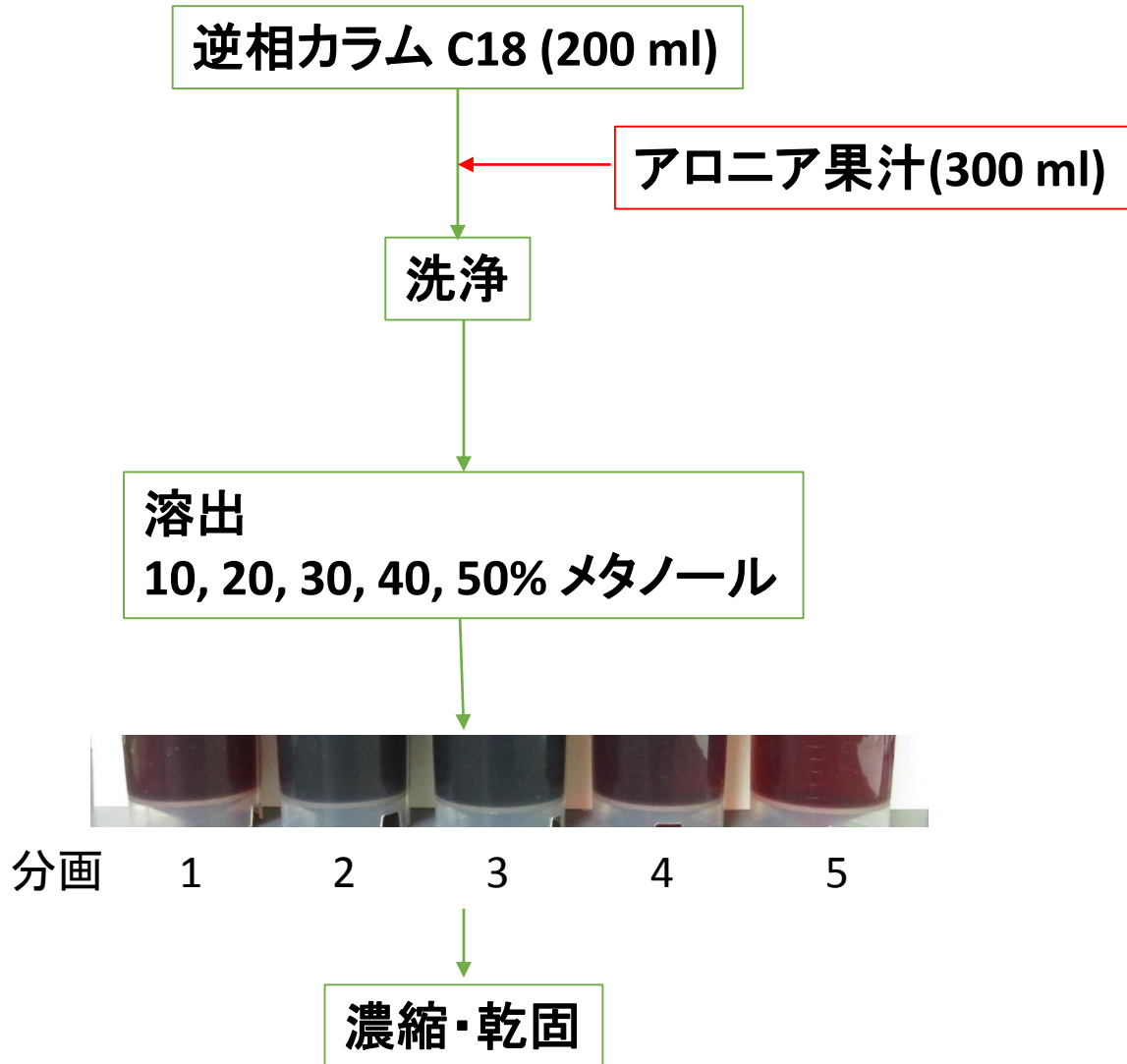
Arrdc3 mRNA



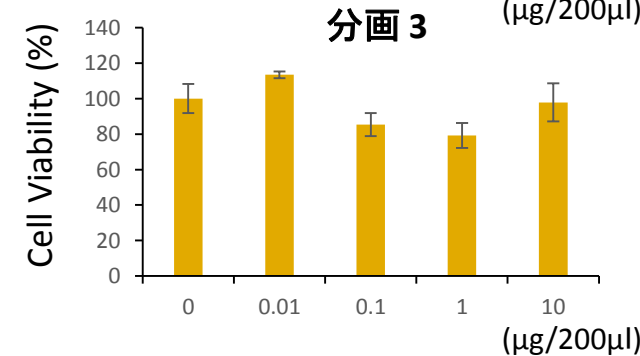
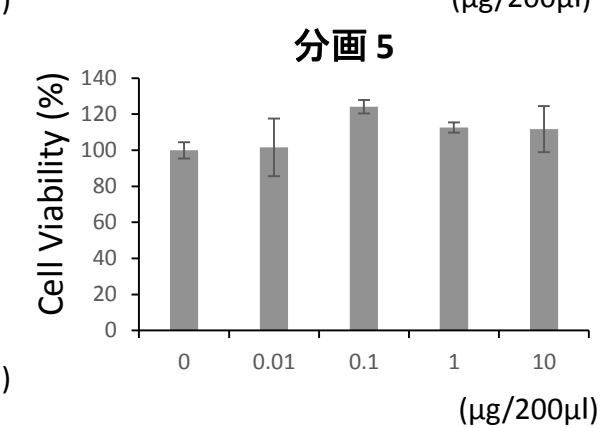
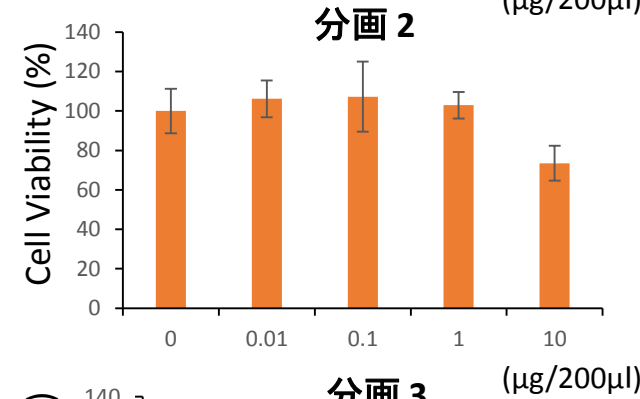
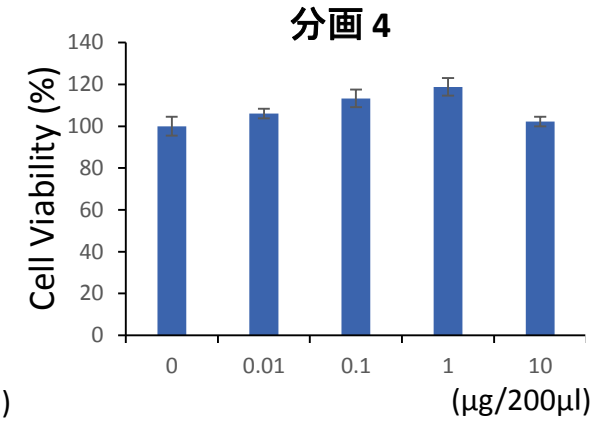
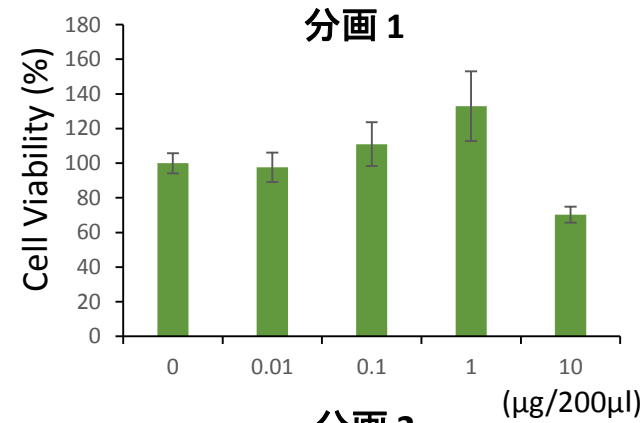
Lpl mRNA



アロニア果汁の分離とメタノール分画調製

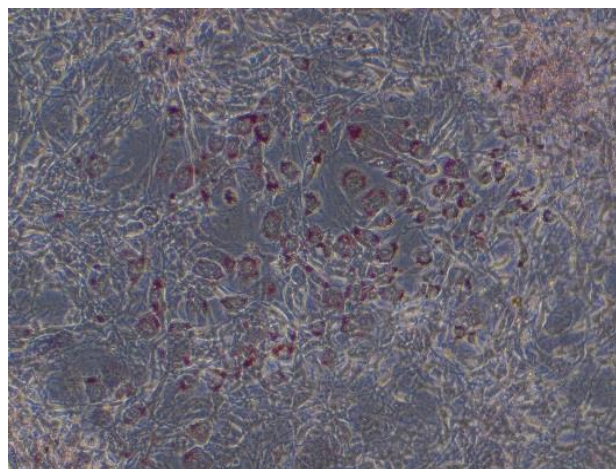


MTTアッセイ

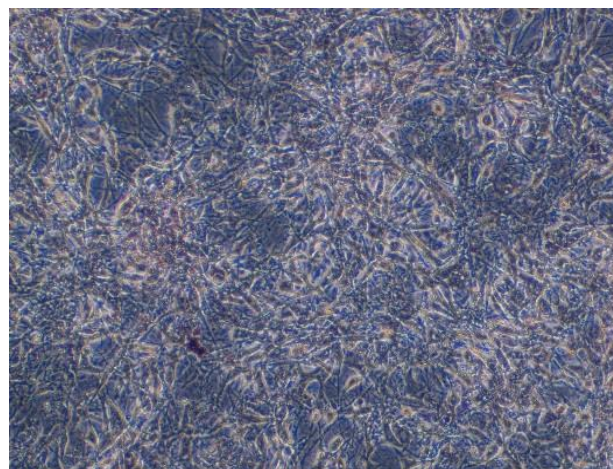


アロニア果汁画分による脂肪蓄積抑制効果

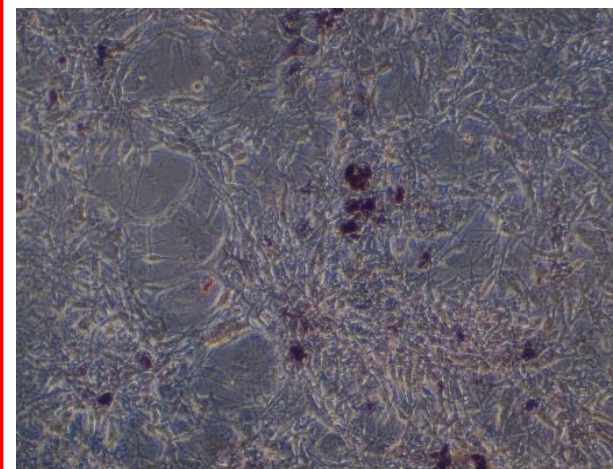
Control



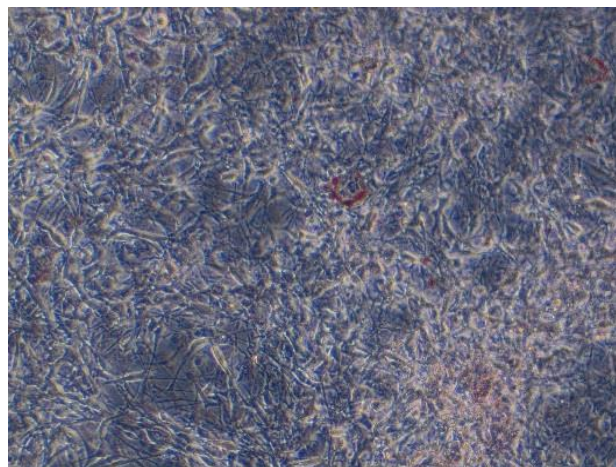
Frc.1
10% メタノール溶出画分



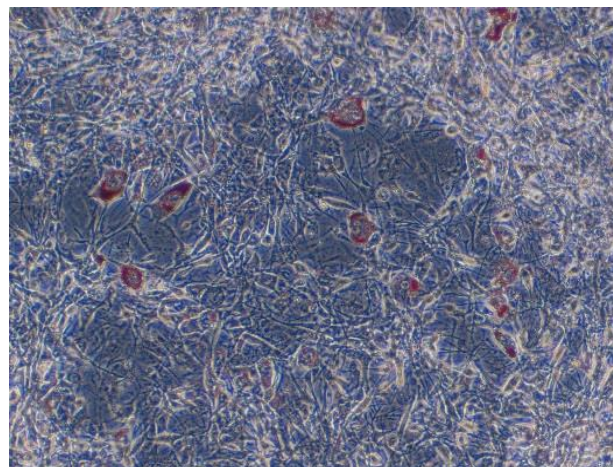
Frc.2



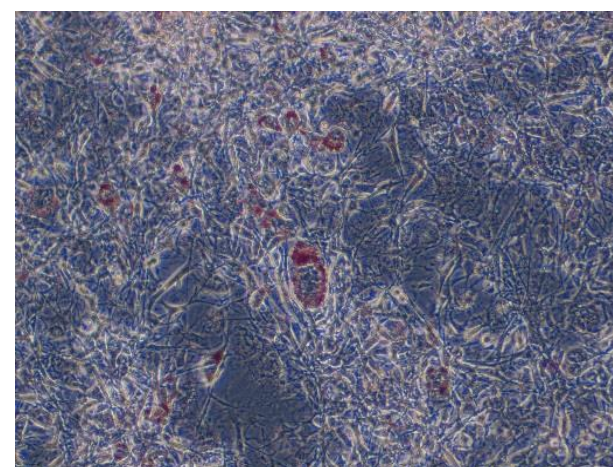
Frc.3
30% メタノール溶出画分



Frc.4



Frc.5



Cell: 3T3-L1
Oil Red O染色

結果

●アロニア果汁摂取群の白色脂肪組織では脂肪細胞の縮小、Sirt2 mRNA発現の増加、Arrdc3 mRNA発現の減少、Ppar γ およびLpl mRNAの発現増加が認められた。

●アロニア果汁を培地に添加した3T3-L1細胞では脂肪蓄積が抑制され、Arrdc3発現の減少およびLpl発現の増加が見られた。

●アロニア果汁のメタノール溶出液を3T3-L1細胞に添加すると、10%および30%メタノール溶出画分で、細胞への脂肪蓄積が抑制されることが明らかとなった。

考察

- Ppar γ とLpl発現がアロニア摂取で増加するにもかかわらず、白色脂肪組織の縮小が見られたため、この現象はSirt2発現増加によるArrdc3の発現減少によるものではないかと考えられた。
- アロニア果汁およびそのメタノール画分において脂肪蓄積抑制を示すことが判明したことから、アロニア果汁には2成分以上の物質が脂肪蓄積抑制に関与すると考えられた。
- 今後、得られた5画分による各遺伝子発現調節を検討し、関与成分の同定を行なう。

アロニア果汁含有 HMG-CoAレダクターゼ阻害物質の探索

○小塚美由記¹、山根拓也^{2,3,5}、今井ももこ^{2,4,6}、石田哲夫⁷、竹中重雄⁴、
阪本龍司^{2,3}、乾博^{2,4}、山本好男⁸、大久保岩男⁹、中垣剛典⁵、中野長久^{2,3}

¹北海道文教大・健康栄養、大阪府大・²生資セ、³生命環境、⁴地域保健、⁵中垣技術士事務所・食科研、
⁶相愛大・発達栄養、⁷琉球大・理、⁸三重大・地域拠点、⁹市立三笠総合病院

日本栄養・食糧学会

COI開示

小塚美由記

演題発表内容に関連し、開示すべき
COI関係にある企業などはありません。

アロニア

- ◆分類：バラ目 バラ科 ナシ亜科 アロニア属
- ◆学名：Aronia
- ◆和名：アロニア、アローニヤ、セイヨウカマツカ
- ◆英名：Chokeberry、Aronia

特徴的なAronia果汁の栄養成分

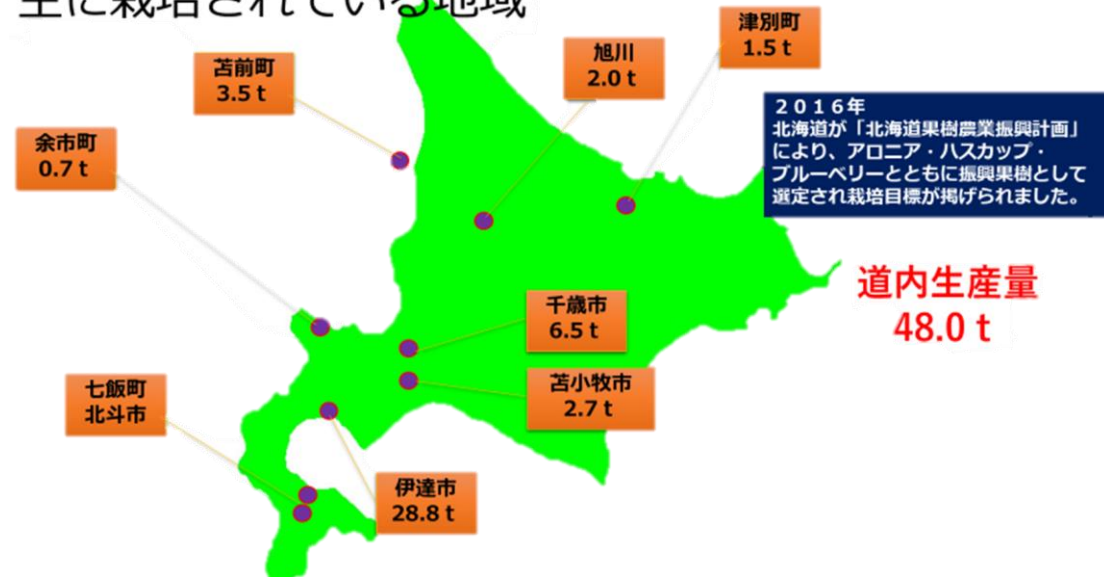
1) Data from Takenori Nakagaki(Nakagaki Consulting engineer & Co,Ltd)

成分 (100g中)	アロニア	ブルーベリー
アントシアニン	1480mg	487mg
β-クリプトキサンチン	463μg	0
αカロテン	7.5μg	0
βカロテン	771μg	55μg

豊富な栄養素により様々な健康効果がうたわれるようになったアロニアです。近年、健康果実として広まってきている。

参考 基礎栄養学 改訂第2版 奥恒行 南江堂

主に栽培されている地域



寒さに強い果実のため北海道のような寒冷地での栽培が適している。
渋みが強いいため、加工用として使用されている割合が高い。

健康効果

- ◎抗酸化作用
- ◎脂質低下作用
- ◎血圧の正常化
- ◎抗ガン活性
- ◎抗糖尿病活性
- ◎神経系への効果
- ◎心臓血管系への効果
- ◎抗炎症活性・抗菌作用
- ◎胃保護作用



Sample: aronia juice
提供: 中垣技術士事務所

Kokotkiewicz A et al., J Med Food 2010より抜粋

アロニア摂取によるLDLコレステロール上昇抑制作用

<動物試験>

- 高コレステロール食をアロニアフルーツジュース（75 %）と同時にオスのラットに摂取させると、高コレステロール食のみの摂取で起こる血中LDLコレステロールの上昇が抑制される
(Valcheva-Kuzmanova et al., Plant Foods for Human Nutr. 2007)。
- 高フルクトース食とアロニア抽出物をオスのラットに同時に6週間摂取させると高フルクトース食のみの摂取でおこる血中LDLコレステロールの上昇が抑制される (Qin et al., British J. Nutr. 2012)。
- 高脂肪食とアロニア果汁(100 %)を摂取させオスのマウスに同時に4週間摂取させると脂肪食のみの摂取でおこる血中LDLコレステロールの上昇が抑制される (Yamane et al., FFHD 2016)。

<ヒト臨床試験>

- メタボリックシンドロームの男女38名にアロニア抽出物を摂取させると、2ヶ月間の摂取で上昇していた血中LDLコレステロールが有意に低下する (Sikora et al., Eur. J. Nutr. 2012)。
- 成人の喫煙経験者24名にアロニア抽出物を12週間摂取させると、血中LDLコレステロールが有意に低下する (Xie et al., Nutr. Res. 2017)。

アロニア果汁によるHMG-CoA還元酵素の阻害

<HMG-CoA Reductaseアッセイ>

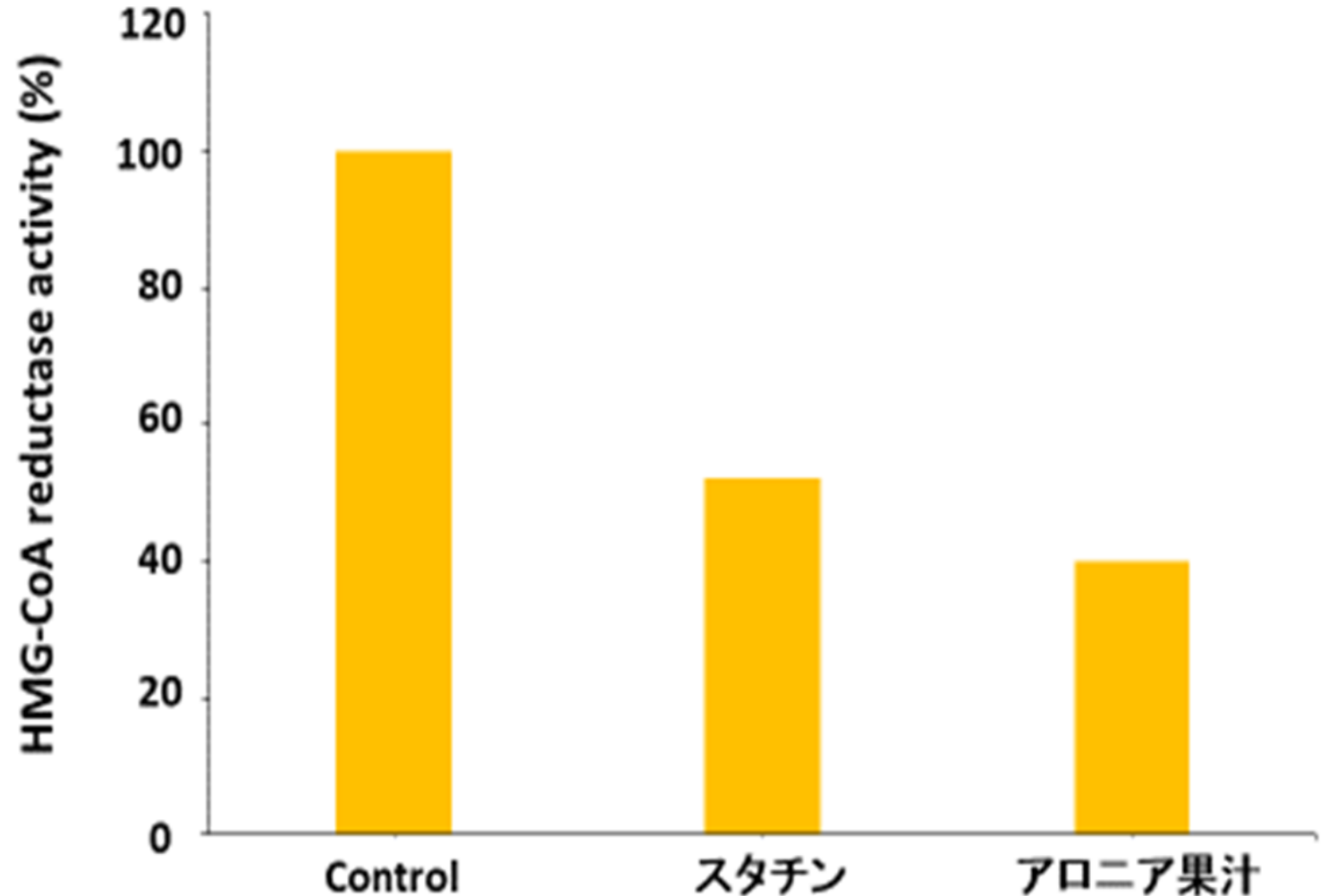
①陽性対照としてHMG-CoA還元酵素の阻害剤として知られるスタチンを用いた。



②Sigma社製のHMG-CoA reductase assay kitを用いて反応を行った。



③340nmの吸収を測定



アロニア果汁添加によるLDL受容体遺伝子転写調節

<ChIP アッセイ>

アロニア果汁を HepG2細胞に添加し、
24時間培養後、ホルマリンで固定

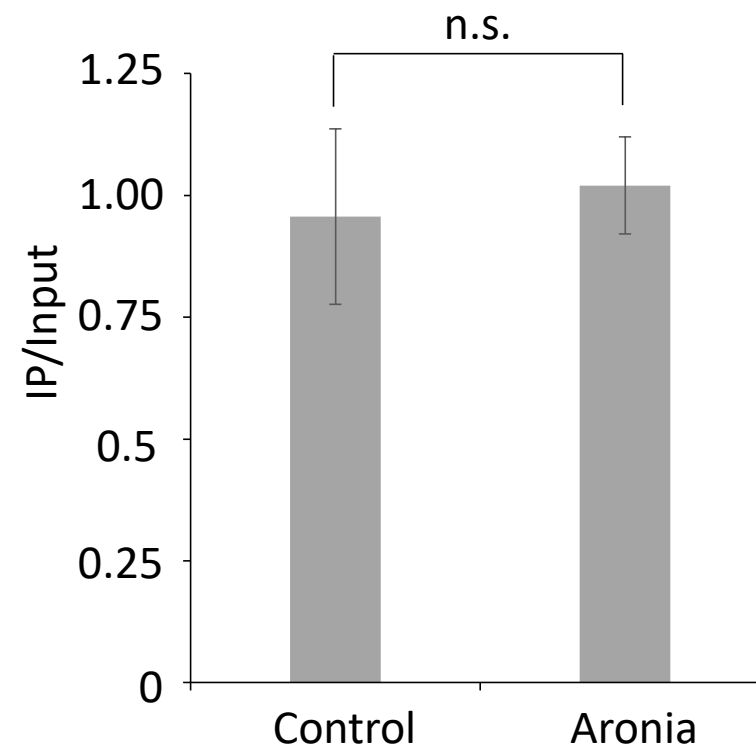
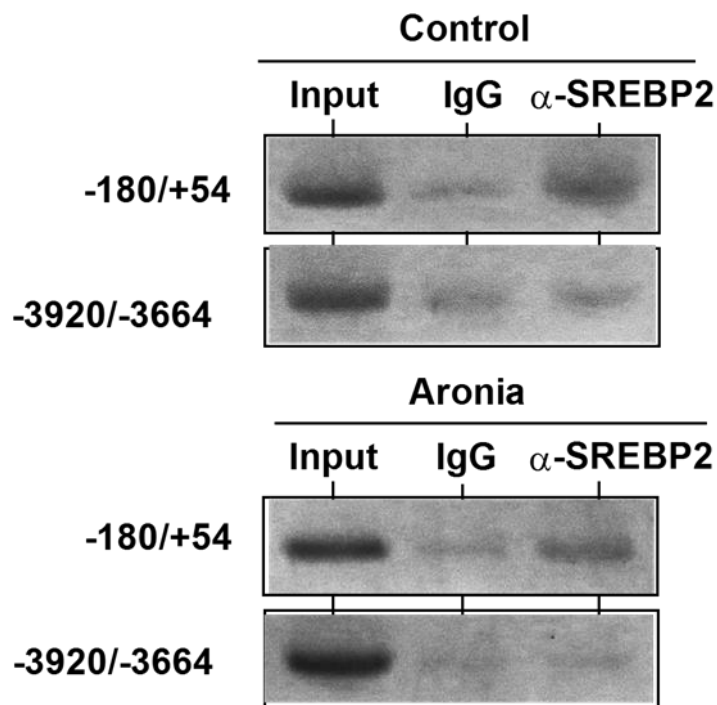
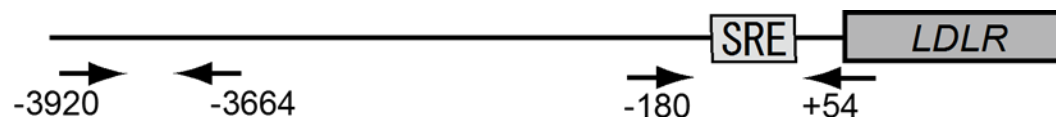


クロマチンを抽出後、1 μ gの抗SREBP-2
抗体を加え、ビーズで沈降



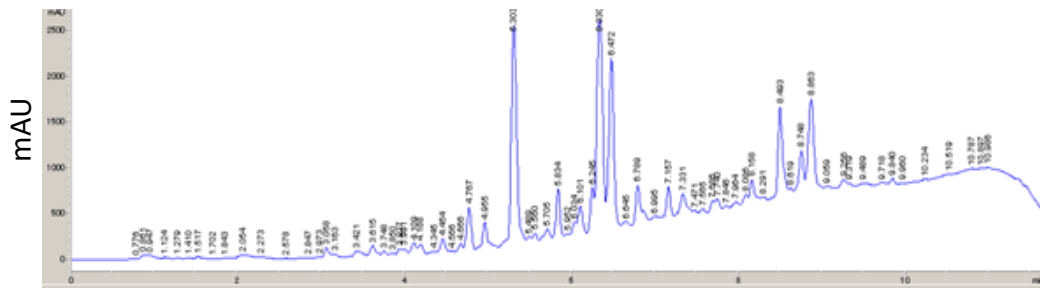
PCRにて増幅後、アガロースゲル
電気泳動にてバンドを検出

Cell: HepG2

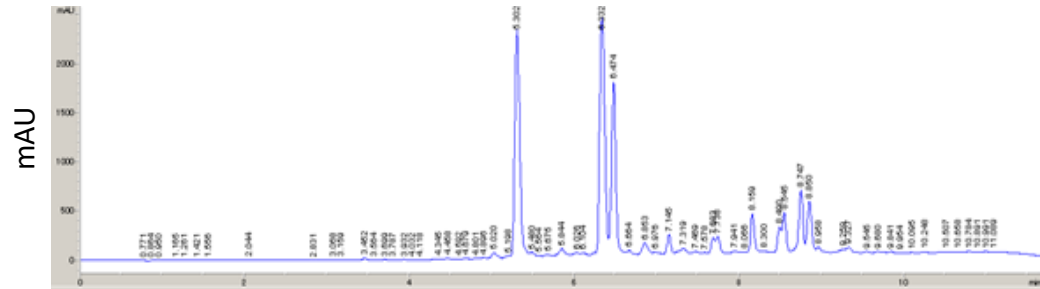


アロニア果汁中のLDLR mRNA 発現抑制物質のスクリーニング

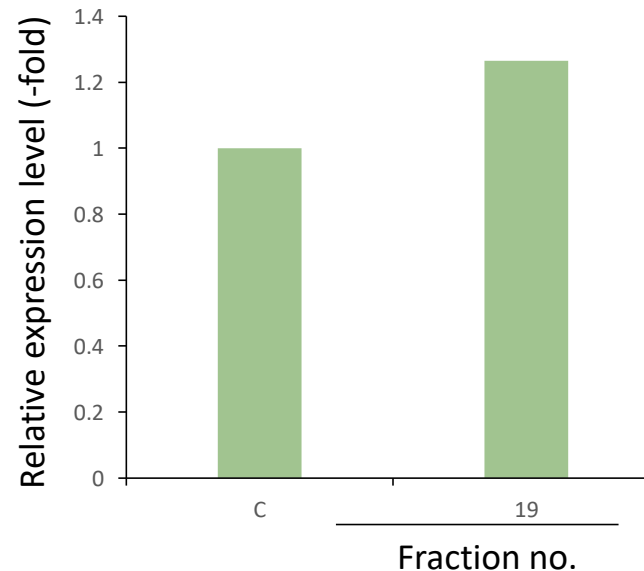
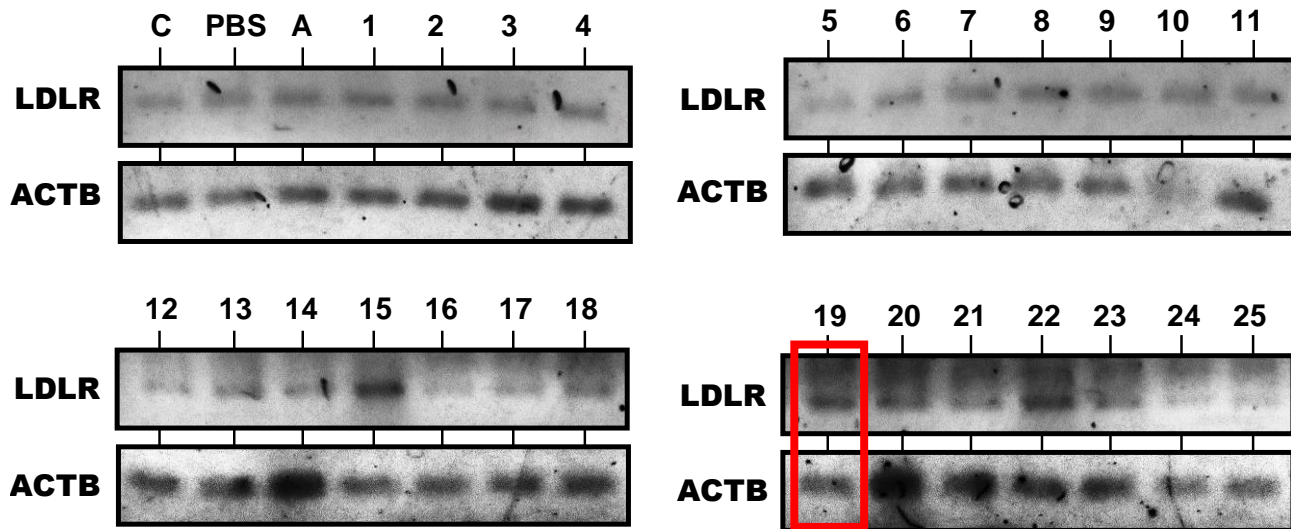
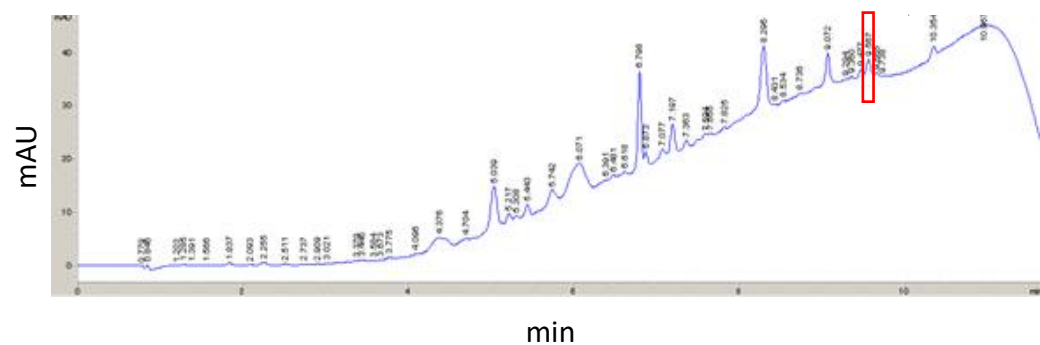
A. 280 nm



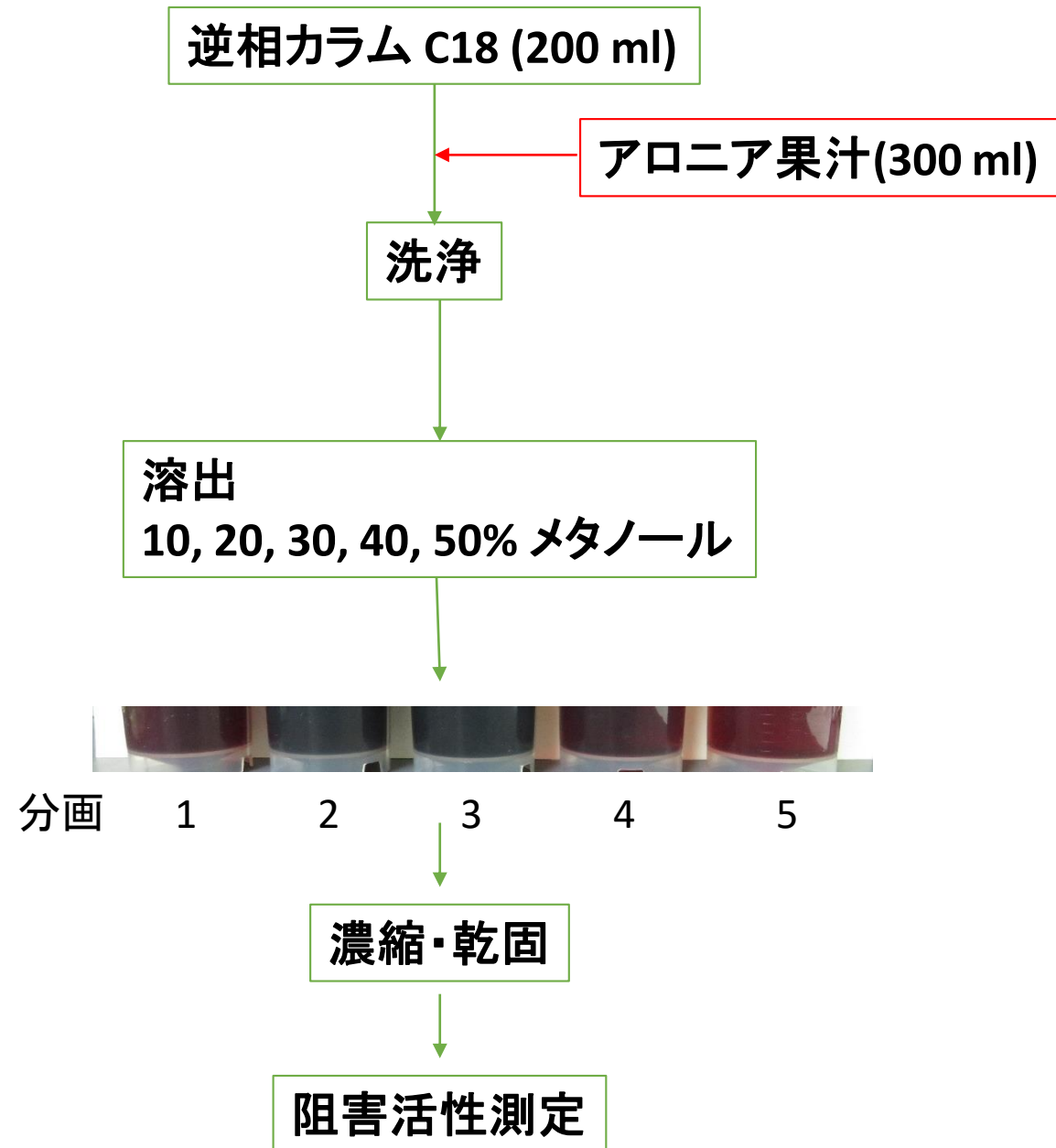
B. 350 nm



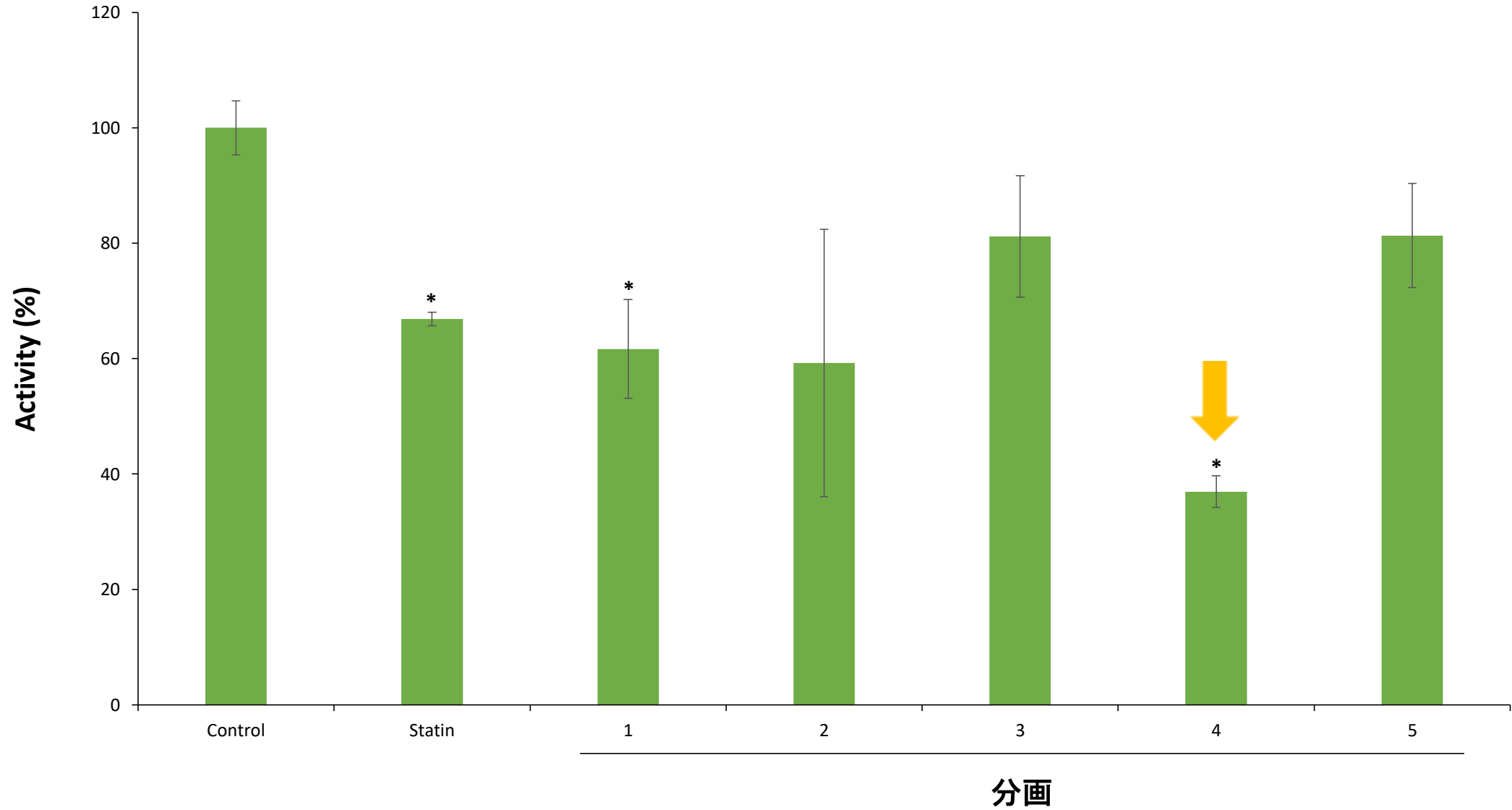
C. 525 nm



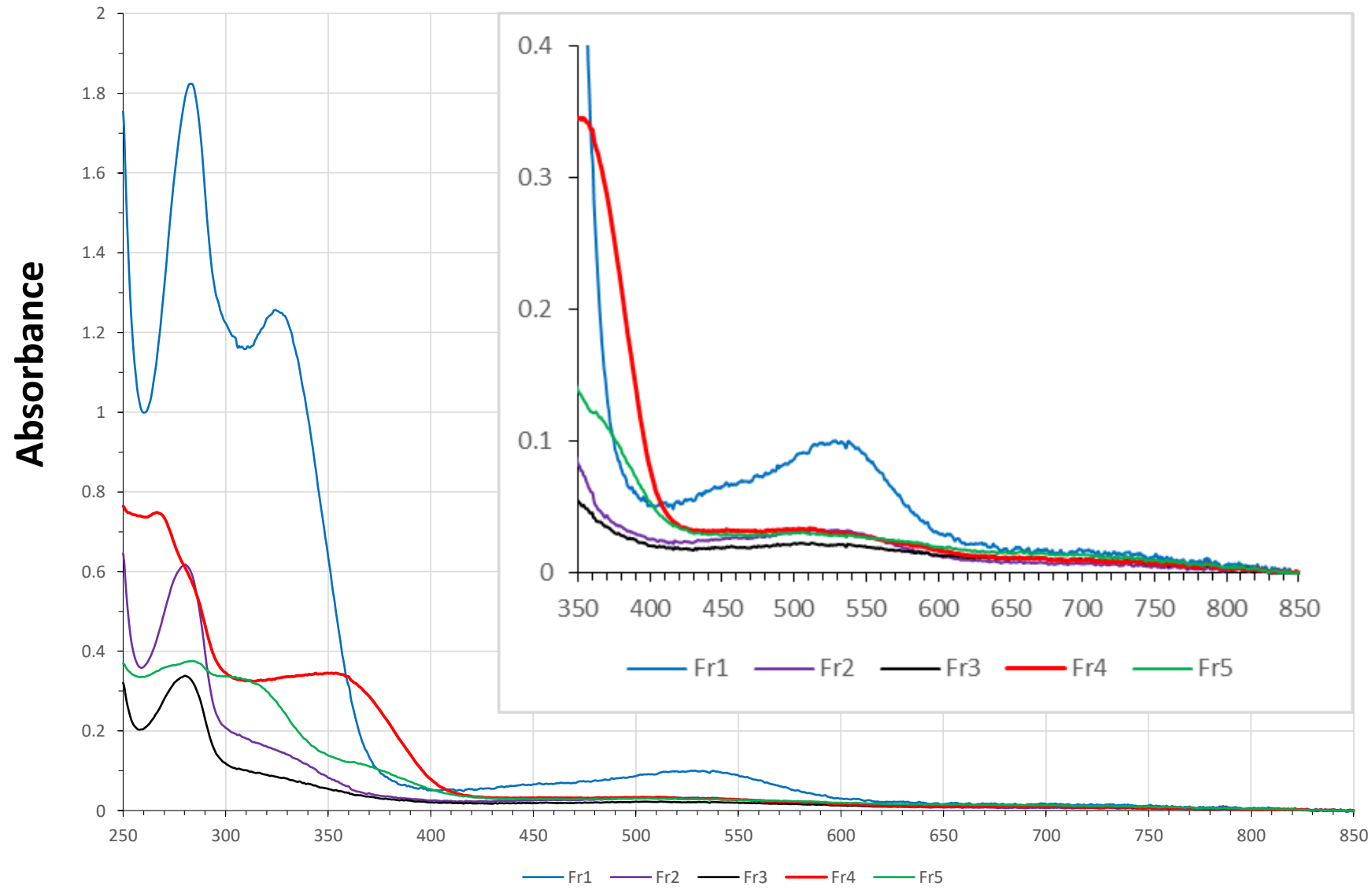
アロニア果汁のC18カラムによる分離



各分画によるHMG-CoA reductase阻害



各分画の吸収スペクトル



分画4のクロマトグラム

215 nm



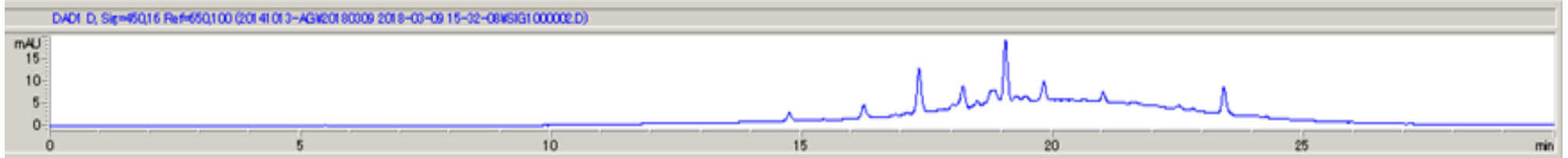
280 nm



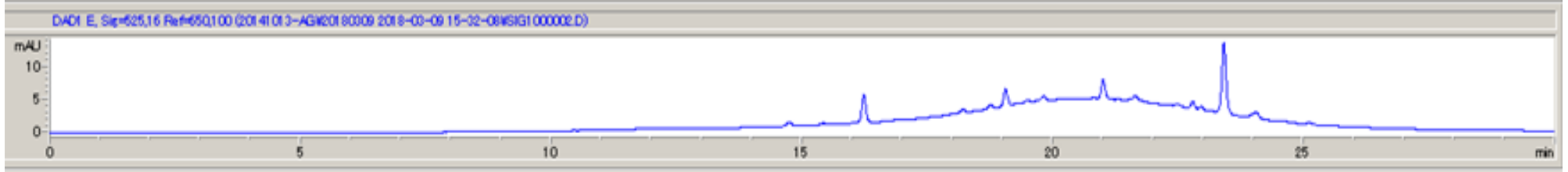
350 nm



450 nm



525 nm



＜HPLC条件＞

溶出溶媒A:0.1%ギ酸水溶液 溶出溶媒B:メタノール

流速:1ml/min

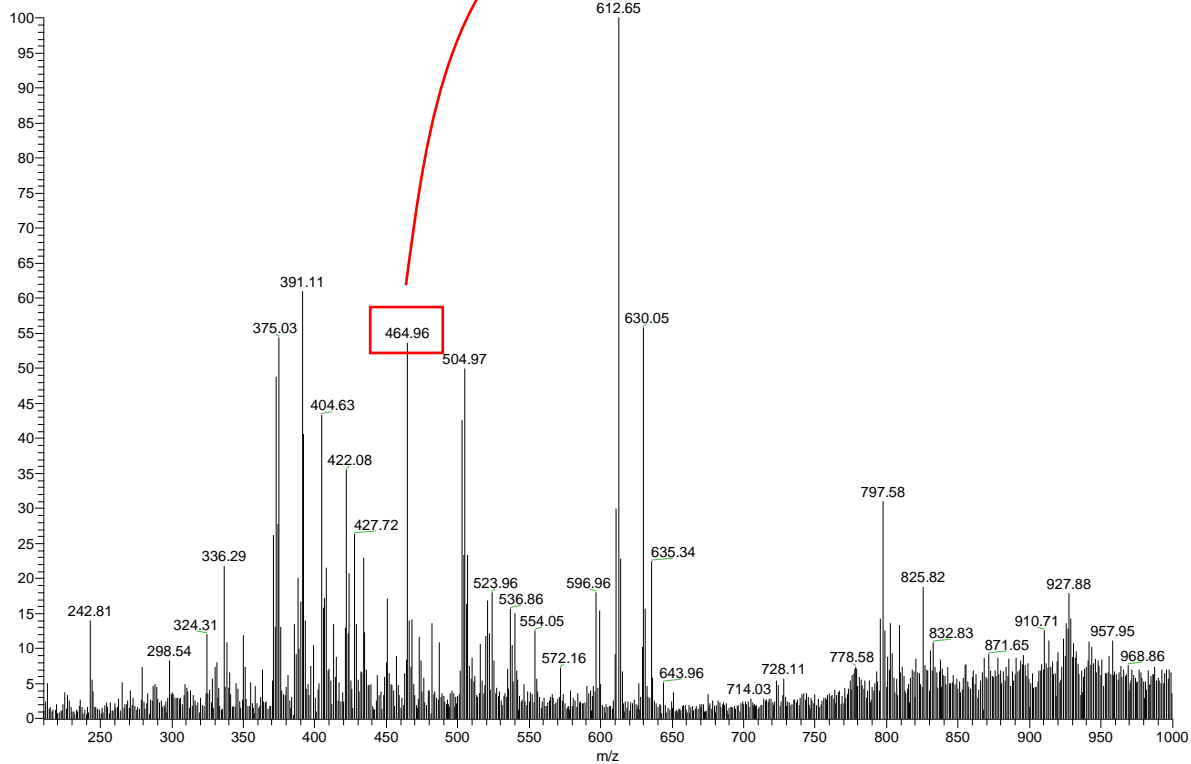
サンプルinject:アロニア果汁分画 40 μ l

Column : Poroshell120 SB-C18 (Agilent社製)

分画4の質量分析

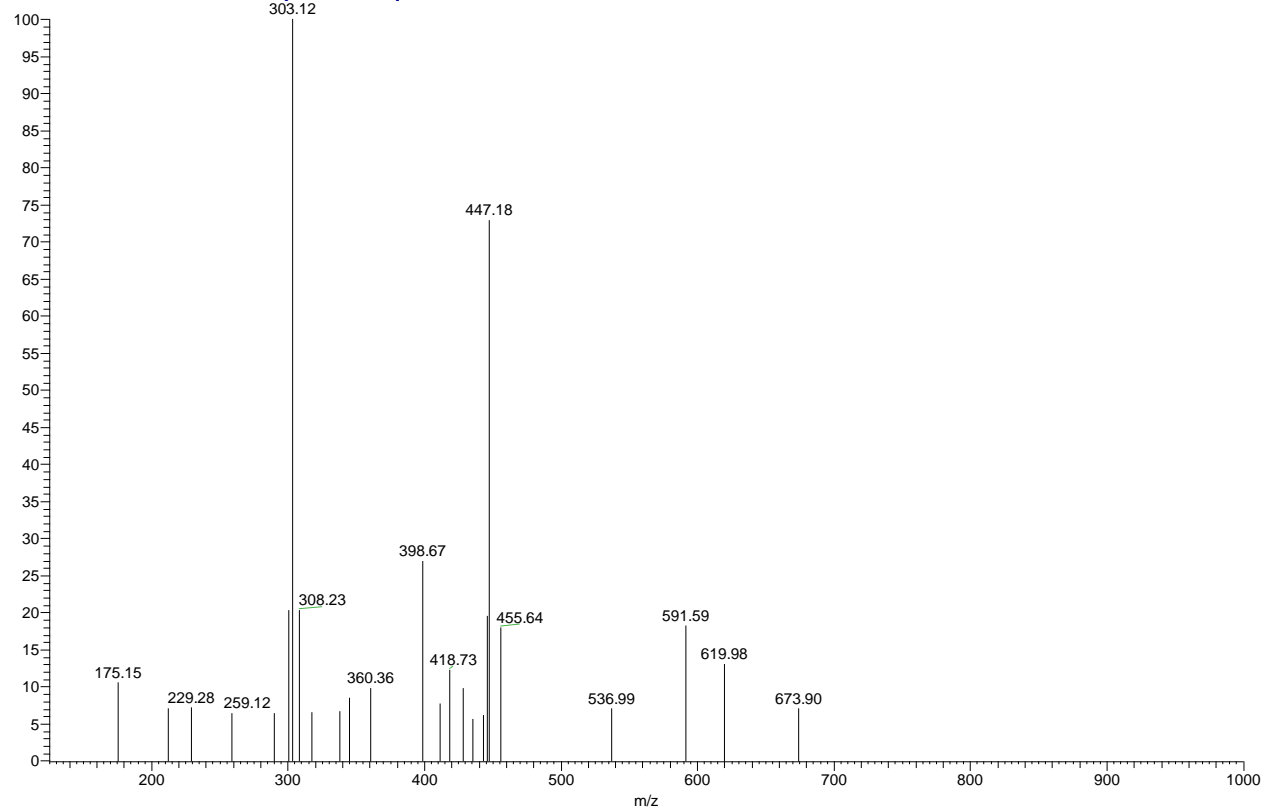
MS

Fr4_fs_20180421_180409135319 #78 RT: 0.56 AV: 1 NL: 1.97E4
T: ITMS + c NSI Full ms [210.00-1000.00]



MS/MS

Fr4_465ms2_20180421_180409135319 #30 RT: 0.48 AV: 1 NL: 1.84E1
T: ITMS + c NSI Full ms2 465.00@cid35.00 [125.00-1000.00]



まとめ

- HMG-CoAレダクターゼの阻害活性がアロニア果汁に存在するが、SREへのSREBPの結合には変化が見られなかったため、アロニア果汁摂取による血中LDL-コレステロールの低下は別の経路で起こると考えられた。
- 阻害物質の同定のためスケールアップして分離した分画4に阻害活性があり、その吸収スペクトルには280 nm付近、350 nm付近そして550 nm付近にピークが見られた。
- 分画4の質量分析により得られたマススペクトルおよびプロダクトイオンスペクトルからケルセチンの配糖体と同様の物質が存在することが推定された。