

アロニア果汁による脂肪蓄積抑制機構の解明と関与成分の同定

Beneficial effect of aronia juice on fat accumulation in white adipose tissue

○山根拓也^{1,2,3}、小塚美由記⁴、今井ももこ^{1,5,6}、飯田聡史^{1,2}、原田直樹²、石田哲夫⁷、竹中重雄⁵、山地亮一²、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³、中野長久¹

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・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

Black chokeberry (*Aronia melanocarpa*)



・アロニアは北米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

成分	アロニア果汁 (g/100g)
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/100g)	73

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

成分	アロニア果汁 (g/100g)
DRAC	100 μmol TE / g
ポリフェノール	0.014
ポリフェノール	0.99



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
*脂肪蓄積抑制
*脂肪肝改善
*肝線維化抑制

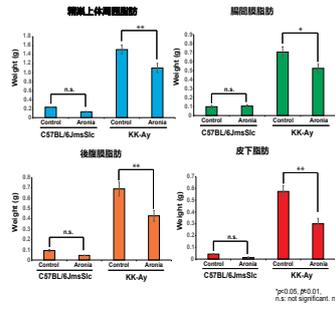
腸内細菌叢改善

<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).
- 高脂肪食とアロニア果汁(100%)を4週間摂取した2型糖尿病・肥満モデルKKAYマウスでは高脂肪食のみ摂取したKKAYマウスと比較して、内臓脂肪および皮下脂肪重量が減少する (Yamane et al., J N B 2016).

これまでの研究成果

1. 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



Yamane T et al. JNB 2016

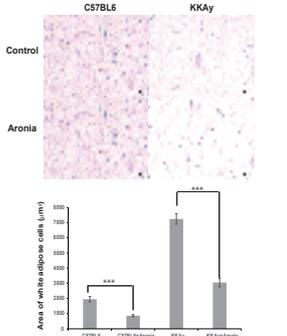
2. 高脂肪食摂取時にアロニアを摂取したマウス肝臓においてArddc3発現が減少する

Gene symbol	Gene name	Accession number	Score
Arddc3	Arrestin domain containing 3	NM_0011017	1.911



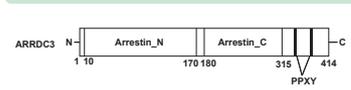
Yamane T et al. FFD 2016

3. アロニア果汁摂取で白色脂肪細胞が縮小する



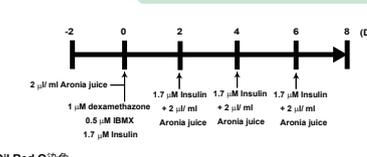
***p<0.001, n=10

Arrestin domain containing 3 (Arddc3)

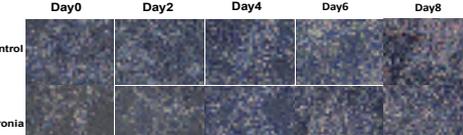


- ARDDC3はPPXYドメインを有し、WWドメインを持つNedd4 ubiquitin ligaseと結合する (Qi et al., JBC 2014).
- ARDDC3は初期エンドソームにおいてβ2-adrenergic receptorと相互作用し、レセプターのリサイクリングを阻害する (Tian et al., JBC 2016).
- ノックアウトマウスの白色脂肪組織ではUcp1発現、cAMP濃度、脂肪分解が増加する (Patwari et al., Cell Metab 2011).
- 脂肪組織特異的にArddc3をノックアウトしたマウスの白色脂肪組織ではPpargとそのターゲット遺伝子の発現が増加する (Carroll et al., PLOS ONE 2017).

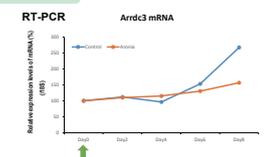
3T3-L1細胞における脂肪蓄積抑制効果



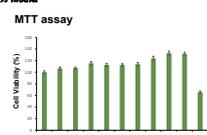
Oil Red O染色



RT-PCR Arddc3 mRNA



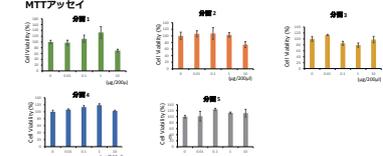
MTT assay



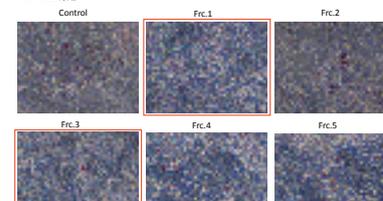
アロニア果汁成分による脂肪蓄積抑制効果

濃縮カラム C18 (200 ml) + アロニア果汁 (300 ml) → 洗浄 → 抽出 (10, 20, 30, 40, 50% メタノール) → 分画 1-5 → 濃縮・乾燥

MTTアッセイ

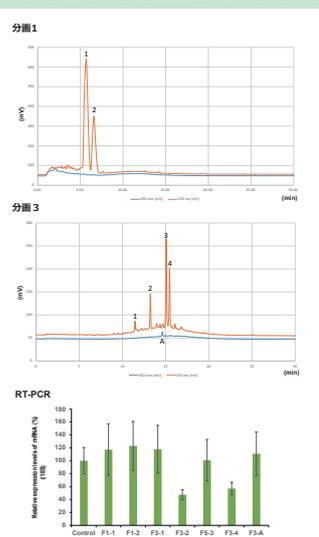


Oil Red 染色

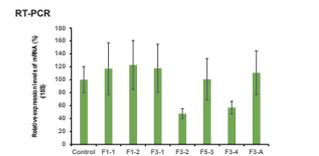


Cell: 3T3-L1

分画ピークによるArddc3の発現変化

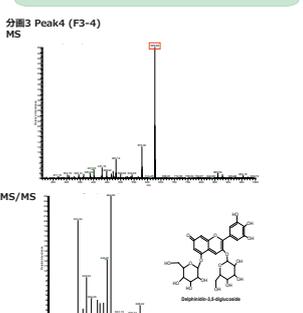


RT-PCR



Arddc3発現抑制物質の同定

分画3 Peak4 (F3-4) MS



まとめ

- 3T3-L1細胞ではアロニア果汁添加によって脂肪蓄積の抑制が見られ、Arddc3 mRNA発現は減少した。
- アロニア果汁の分画1および3によって、3T3-L1細胞における脂肪蓄積が抑制された。
- アロニア果汁の分画1および3にはそれぞれ主なピークが2および4もあり、分画3の2本のピーク成分により、Arddc3発現が減少した。
- Arddc3発現抑制効果を示す分画に存在する成分にはdelphinidin-3,5-diglucosideが含まれていることが判明した。

HMG-CoAレダクターゼ活性を阻害するアロニア果汁含有成分の同定

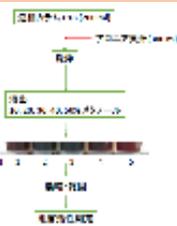
○小塚 美由記¹ 山根 拓也^{2,3,5} 今井ももこ^{2,4,6} 尾瀬いづみ⁷ 石田哲夫⁸ 竹中 重雄⁴
 阪本龍司^{2,3} 乾 博^{2,4} 山本好男⁹ 大久保 岩男⁸ 中垣剛典⁵ 中野長久^{2,3}

1) 北海道文教大・健康栄養 2) 大阪府大・生資セ 3) 大阪府大・生命環境 4) 大阪府大・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) 北大院・薬 8) 琉球大・理
 9) 三重大・地域拠点 10) 市立三笠総合病院

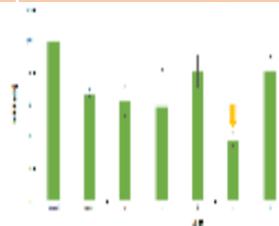
目的

アロニアには様々な健康効果があることが知られており、多くの生理活性物質が含まれることが予想される。アロニアの持つ健康効果の一つとして、LDLコレステロールを減少させる働きがある。これまでの研究では、マウスにアロニア果汁を摂取させると血中LDLコレステロールが減少することを確認し、アロニア果汁にHMG-CoAレダクターゼ阻害があることを明らかにした。本研究ではアロニア果汁に含まれるHMG-CoAレダクターゼの阻害物質の同定を行うことを目的とし実験を行った。

アロニア果汁のC18カラムによる分離



各分画によるHMG-CoAレダクターゼ阻害



アロニアとは

分類:バラ目 バラ科 ナシ亜科 アロニア族

学名: Aronia

和名:アロニア、アローニヤ、セイヨウマツカ

英名: Chokeberry, Aronia



<特徴>

- ・寒冷地に強い
- ・非常に洗みが強く、加工用に使用される割合が高い
- ・2016年に北海道が「北海道果樹農業振興計画」により、振興果樹として選定され栽培目標が掲げられた。
- ・道内生産量は4.8t

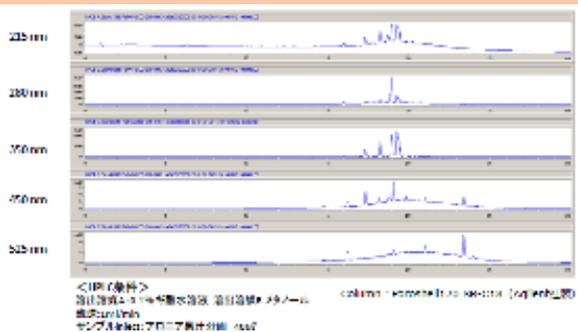
<健康効果>

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

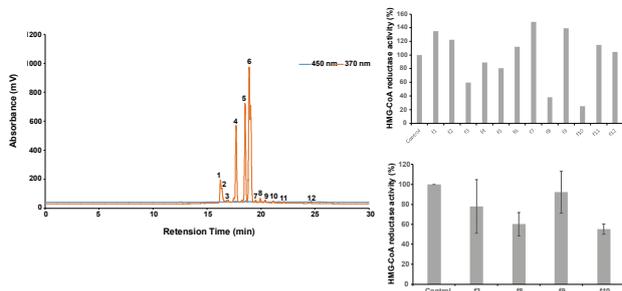


Sample: aronia juice
 提供: 中垣技術士事務所

分画4のクロマトグラフ



分画4の分離と各ピークの阻害活性



アロニア摂取によるLDLコレステロール上昇抑制作用

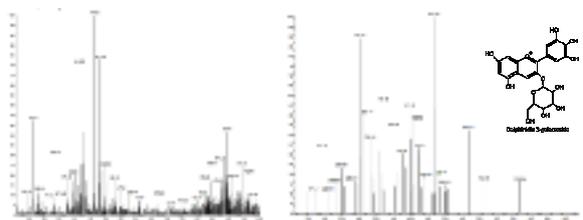
<動物試験>

- 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)。

阻害活性を有するピークの質量分析



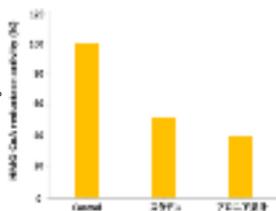
アロニア果汁によるHMG-CoA還元酵素の阻害

<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



まとめ

- アロニア果汁の40%メタノール画分(分画4)にHMG-CoAレダクターゼ阻害活性が確認された。
- 分画4を分離すると12のピークが得られ、ピーク8と10においてHMG-CoAレダクターゼ阻害活性が検出された。
- 質量分析により、delphinidin 3-galactosideが阻害活性成分として含まれていることが明らかとなった。