

難吸収食品成分の機能性に関する時空間的制御機構の解明

山下 陽子 (神戸大学大学院農学研究科)

yoko.y@crystal.kobe-u.ac.jp

健康寿命の延伸が求められるとともに、食と健康志向の高まりが相まって、食品の機能性に関する研究が盛んに行われている。本研究では、食品中に含まれる機能性成分の一つであるポリフェノールのうち、生体内への吸収効率が低い化合物類を用いて、その機能性と作用機構の解明を試みた。すなわち、難吸収性化合物の特性に着目して、消化管が起点となり、全身にもたらす影響を明らかにし、臓器間を超えた空間的ネットワーク機構を理解するための知見を見出すことと、日内変動する生体の概日リズム (体内時計) との関わりから、時間的な制御機構を明らかにすることを目的に研究を行ってきた。

はじめに

少子高齢化社会を迎えた我が国において、健康寿命の延伸が強く求められているが、日々の食事は健康の維持・増進に深く関与している。食品はさまざまな機能を有するが、近年は三次機能である生体調節機能が注目され、生活習慣病予防・改善、抗がん、免疫促進、抗酸化、抗アレルギー、血流促進などの多数の機能が報告されている。本研究では、難吸収性のポリフェノールである重合したフラバン-3-オール類の機能性に着目した。プロシアニジン類は、カカオや黒大豆種子、シナモン、アップル、グレープシードなどの食品に多く含まれており、エピカテキンあるいはカテキンが重合した縮合型タンニンで、2 ~15 量体として存在する (図1)。水酸基による抗酸化能に着目すれば、オリゴマーであるプロシアニジンは抗酸化性が高いと期待できる。しかし、重合度の高い高分子化合物は、モノマーに比べると腸管からの吸収率が大変低く、ほとんど体内に吸収されない。

一方、「腸は第二の脳」と称され、脳からの制御とは独立して、あるいは腸からのシグナルが脳を支配することで、全身エネルギー代謝を調節することが明らかになってきた。このことから、難吸収性のポリフェノールは消化管でなんらかの作用を発揮する可能性が推測される。しかしながら、プロシアニジンが腸と脳を介した代謝調節機構に及ぼす効果は十分明らかになっていない。また、生体は地球の自転周期に沿って、全身に組み込まれた時計遺伝子によって生み出される 24 時間周期の概日リズムが備わっており、生体機能を調節している。しかし、これまで報告されている食品の機能性に関して、この概日リズムを考慮した研究はほとんどなされていない。腸脳細胞間ネットワークを主軸とした全身エネルギー代謝調節に概日リズムが関わる可能性について、その詳細な制御機構を分子レベルで明らかにするとともに、分子標的を見出すことは、時空間的な観点から食品の真の生体機能をとらえ、その全貌を明らかにできることが期待でき、生命科学の分野において重要な意義を持つと考えられる。

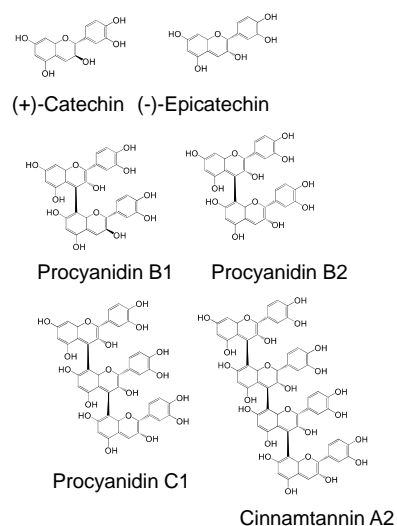


図1 プロシアニジンの構造

難吸収性ポリフェノールが消化管ホルモン分泌に及ぼす効果

プロシアニジン、上述の通り難吸収性であるにも関わらず、マウスにカカオ由来プロシアニジン高含有組成物を投与すると高血糖抑制やコレステロール排泄効果が、単量体のエピカテキンよりも高いことが明らかになった。そこで、これらの機能の初発作用点が消化管にあるのではないかと考え、着目したのが消化管ホルモンである glucagon like peptide-1 (GLP-1) である。GLP-1 は消化管の L 細胞から分泌されるインクレチンホルモンの一種であり、膵臓からのインスリン分泌を促進させるとともに、全身にさまざまな生理機能をもたらす。カカオ由来プロシアニジン高含有組成物(CLP_r)を単量体から 3 量体までの低重合画分と 4 量体以上の高重合画分に分離精製した組成物を用いた際、マウスに経口投与した場合でのみ、いずれの画分も GLP-1 を分泌することが判った^[1]。また、プロシアニジンは重合度依存的に GLP-1 分泌促進効果を発揮し、特に 4 量体の cinnamtannin A2 が強い効果を示した^[2]。プロシアニジンの GLP-1 を介した、高血糖・肥満予防、摂食抑制効果、血管機能向上効果について以下で述べる。

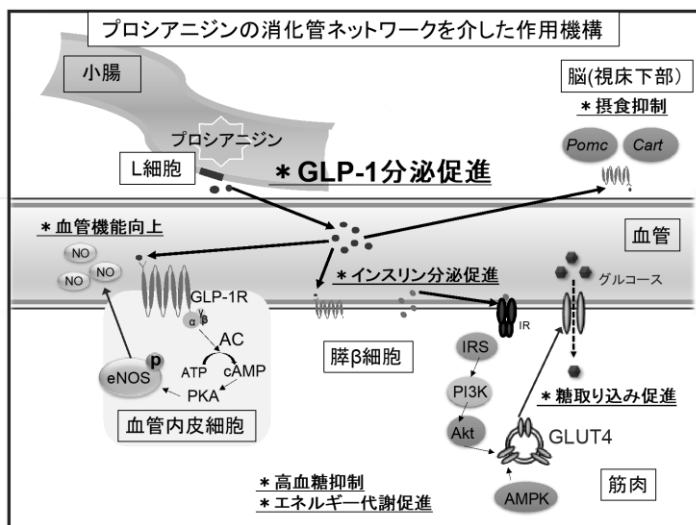
難吸収性ポリフェノールの消化管シグナルを介した高血糖・肥満予防効果

上述のように、プロシアニジンによる GLP-1 分泌促進効果は、膵臓からのインスリン分泌を増加させ、糖負荷時の血糖上昇を抑制することを明らかにしたが、この際、血糖消費に関わる主要組織である骨格筋において、糖輸送担体 4 型(GLUT4)が細胞膜上へと移行し、組織中への糖取り込み量が増加することも確認した^[3]。そのシグナル伝達経路として、インスリン経路だけでなく、インスリン非依存的な経路であり、エネルギー代謝のマスターレギュレーターである AMP 活性化プロテインキナーゼ (AMPK) 経路も関わっていた。この効果は、実験動物に経口投与した際にのみ認められるものであり、筋肉細胞に直接プロシアニジンを作用させた時には、インスリン経路は関与しなかった^[4]。一方、プロシアニジンで認められた AMPK の活性化に関しても、GLP-1 受容体阻害剤を前処理した場合に、その活性がキャンセルされたことから、AMPK を介したエネルギー代謝促進効果に関しても、GLP-1 が関与している可能性がある。以上のことから、プロシアニジンの高血糖や肥満の抑制効果は、消化管からの GLP-1 分泌が初発となり、膵臓、筋肉、肝臓や脂肪へと伝わる組織間シグナル伝達ネットワークによることが考えられた。この効果は、プロシアニジンだけでなく、同じくカテキンの重合体であり難吸収性の紅茶ポリフェノールを経口投与した際にも、インスリン経路と AMPK 経路の活性化を介して、高血糖を抑制することを検証した^[5]。また、GLP-1 は迷走神経求心路を介して脳にシグナルが伝えられることにより、摂食抑制因子の発現を上昇させ、過食の抑制に寄与している。本研究においても、肥満モデルマウスのうち、レプチン欠損により過食が誘導される *ob/ob* マウスに黒大豆種皮由来プロシアニジン高含有組成物(BE)を摂取させると、過食の抑制を介して、体重増加と脂肪の蓄積が抑制されることが判った。この際にも、血中の GLP-1 分泌量が増加していた。このような現象は、健常マウスでは認められず、摂食量の減少による低栄養や低体重などの障害は起こさなかった。以上のことから、難吸収性ポリフェノールは消化管からの GLP-1 分泌が初発となり、多臓器間でのシグナルネットワークを介して、高血糖や肥満を予防することが明らかになった。

難吸収性ポリフェノールの消化管シグナルを介した血管機能向上効果

血管機能の低下は、心血管疾患や動脈硬化発症の基盤となる。一酸化窒素(NO)は、血管拡張に寄与することで、これらの疾病発症のリスク低減に寄与する因子の一つである。GLP-1 は、血管内皮型一酸化窒素合成酵素(eNOS)を活性化し、NO 分泌を増加させることで血管機能や心機能の向上に寄与することが知られている。その作用機構は、GLP-1 が血管内皮細胞上に発現している

GLP-1 受容体に結合することで、セカンドメッセンジャーとして細胞内 cyclicAMP(cAMP)を上昇させて、その下流で eNOS 活性化を介して NO の分泌を促進する。本研究では BE をラットに投与すると、GLP-1 分泌を介して血管内皮細胞内の cAMP の上昇と eNOS の活性化をもたらし、NO 分泌が促進されることを明らかにした^[6]。GLP-1 受容体阻害剤の前処理によって、これらの効果はキャンセルされた。また、血管内皮細胞である HUVEC にプロシアニジンを経口投与させると、あるいは腸管モデルの Caco-2 と HUVEC の共培養システムを用いてプロシアニジンを経口投与させた場合には、ラットの経口投与で認められたような作用機構とは異なり、Akt のリン酸化経路を介して、eNOS の活性化と NO 分泌を上昇させた^[7]。以上のことから、NO 産生効果に関する動物個体では GLP-1 が上流のシグナル分子として重要な役割を果たしていることが示唆された。NO 上昇を介した血管機能向上効果は、ヒト介入試験でも確認できた。すなわち、1日 30 g の炒り黒大豆を 4 あるいは 8 週間摂取した場合に、酸化ストレスマーカーの減少と NO 濃度の上昇に



より、加速度脈波から算出した血管機能が向上し、血管年齢と末梢血管健康度が改善した^[8]。また、1日 20 g の炒り黒大豆きな粉を、クッキーにしたものを試験食とし、小麦粉クッキーを対照食として単盲検クロスオーバー試験を行った場合にも同様の効果が得られた^[9]。ヒト介入試験では、GLP-1 の関与は不明であるが、動物実験の結果から、ヒトでも NO 分泌促進を介した血管機能の改善に、GLP-1 がその作用機構の一端として寄与しているのではないかと

推測している。

難吸収性ポリフェノールと概日リズムリズムとの関係について

次に、概日リズムを考慮し、投与するタイミングを変化させた場合に、機能性発現が変化するか、また、いつ摂取すると最も効果的にその機能の恩恵にあやかれるのかの解明を試みるとともに、それと体内時計との関わりについて検証した。明暗周期が 12 時間ごとの環境でマウスを飼育した。以下、明期の開始時刻を Zeitgeber Time(ZT)0 と表す。ZT1 と ZT13 の異なるタイミングでそれぞれカカオ由来プロシアニジン高含有組成物(CLP_r)を単回経口投与した後に糖負荷試験を実施した。その結果、ZT1 では高血糖抑制効果が認められたが、ZT13 ではその効果が認められなかった^[10]。GLP-1 分泌促進効果も同様の傾向を示した。この時、筋肉における時計遺伝子の発現を解析したところ、ZT13 は、主要な時計遺伝子の 1 つである *Brain and Muscle Arnt-like Protein-1(Bmall)* の発現量が高いタイミングであった。*Bmall* は、ヒトの睡眠期開始ごろから発現量が増加し、夜間でのエネルギー代謝の低下や脂肪蓄積の増加に関わることが知られている因子である。CLP_r は、睡眠期頃に誘導される代謝低下時に急激な血糖値の上昇に対して、強い抑制効果を発揮し、活動期のエネルギー代謝が活発な時間帯には血糖値を下げる効果を発揮せず、低血糖を起すリスクも低いことが判った。また、CLP_r は GLP-1 とインスリンの分泌促進を介して、肝臓や筋肉における時計遺伝子の発現を変化させることが判った。これらの時計遺伝子の発現調節作用は、GLP-1 受容体阻害剤の前処理によってキャンセルされたことから、GLP-1 の分泌能は時計遺

伝子によって制御されている概日リズムの影響を受けながら、逆に、時計遺伝子の発現にも関わることから、GLP-1 と時計遺伝子は相互に制御し合っていることが示唆された^[11]。以上のことから、CLPr の生体調節機能は、概日リズムの影響を受けるとともに、最も効果的な摂取タイミングがあることが判った。

おわりに

近年、食品成分の機能性研究が著しく進展しているが、本研究は、難吸収性という特性に着目して、体内に吸収される前に、消化管への作用が初発となり、全身の組織との緻密なシグナルネットワークによって機能発現に繋がることを見出すとともに、この効果が概日リズムとも深く関わりを持つことを見出した。得られた成果は、生体における食品成分の真の機能を時空間的にとらえようとしている点で新奇性が高く、食品機能性研究分野において重要な知見になると考えている。今後も、生体内で起こる様々な生理現象を網羅的にとらえた研究を展開し、健康長寿の延伸に貢献する食品機能学的基礎研究のさらなる発展に精進していきたい。

謝辞

本研究は、神戸大学大学院農学研究科応用生命化学専攻生物機能開発化学教育研究分野にて行われたものです。本研究の遂行にあたり、多大なるご指導ご支援を賜りました芦田均教授に心より感謝申し上げます。また、本賞の受賞にあたり、ご推薦をいただきました神戸大学大学院農学研究科河端俊典研究科長ならびに専攻の教職員の皆様に厚く御礼申し上げます。最後に、本研究にご協力いただきました共同研究者の皆様ならびに研究室のスタッフ、学生の皆様、日頃より温かく見守り支援してくれた家族にも改めてお礼申し上げます。

引用文献

1. **Yamashita Y**, Okabe M, Natsume M, Ashida H. Cacao liquor procyanidins prevent postprandial hyperglycemia by increasing glucagon-like peptide-1 activity and AMP-activated protein kinase α phosphorylation in ICR mice. *J Nutr Sci*. 8, e2, 1-9 (2019).
2. **Yamashita Y**, Okabe M, Natsume M, Ashida H. Cinnamtannin A2, a tetrameric procyanidin, increases GLP-1 activity and insulin secretion. *Biosci Biotechnol Biochem*. 77, 888-891 (2013).
3. **Yamashita Y**, Wang L, Nanba F, Ito C, Toda T, Ashida H. Procyanidin promotes translocation of glucose transporter 4 in muscle of mice through activation of insulin and AMPK signaling pathways. *PLoS One*. 11, e0161704 (2016).
4. Kurimoto Y, Shibayama Y, Inoue S, Soga M, Takikawa M, Ito C, Nanba F, Yoshida T, **Yamashita Y**, Ashida H, Tsuda T. Black soybean seed coat extract ameliorates hyperglycemia and insulin sensitivity via the activation of AMP-activated protein kinase in diabetic mice. *J Agric Food Chem*. 61, 5558-5564 (2013).
5. **Yamashita Y**, Wang L, Tainshun Z, Nakamura T, Ashida H. Fermented tea improves glucose intolerance in mice by enhancing translocation of glucose transporter 4 in skeletal muscle. *J Agric Food Chem*. 60, 11366-11371 (2012).
6. Domae C, Nanba F, Maruo T, Suzuki T, Ashida H, **Yamashita Y**. Black soybean seed coat polyphenols promote nitric oxide production in the aorta through glucagon-like peptide - 1 secretion from the intestinal cells. *Food Funct*. 10, 7875-7882 (2019).
7. Domae C, Ashida H, **Yamashita Y**. Black soybean seed coat polyphenols promote nitric oxide production in the aorta through the Akt/eNOS pathway. *Functional Foods In Health And Disease*. 10, 330-343 (2020).
8. **Yamashita Y**, Wang L, Nakamura A, Nanba F, Saito S, Toda T, Nakagawa J, Ashida H. Black soybean improves the vascular function through an increase in nitric oxide and a decrease in oxidative stress in healthy women. *Arch Biochem Biophys*. 30, 688, 108408 (2020).
9. **Yamashita Y**, Nakamura A, Nanba F, Saito S, Toda T, Nakagawa J, Ashida H. Black Soybean Improves Vascular Function and Blood Pressure: A Randomized, Placebo Controlled, Crossover Trial in Humans. *Nutrients* 12, 2755 (2020).
10. Hironao KY, Ashida H, **Yamashita Y**. The cacao procyanidin extract-caused anti-hyperglycemic effect was changed by the administration timings. *J Clin Biochem Nutr*. 67, 61-66 (2020).
11. Hironao KY, Mitsuhashi Y, Huang S, Oike H, Ashida H, **Yamashita Y**. Cacao polyphenols regulate the circadian clock gene expression and through glucagon-like peptide-1 secretion. *J Clin Biochem Nutr*. 67, 53-60 (2020).

