

<平成24年度助成>

エネルギー代謝変化をもたらす 香辛料成分の探索とそのメカニズム解明

川 端 二 功

九州大学高等研究院(前 安田女子大学家政学部)

緒 言

我々のエネルギー代謝は、生体の恒常性が保持されるように巧妙に調節されている。しかしながら過剰のカロリー摂取や運動不足等によりエネルギー出納のバランスが崩壊すると、生活習慣病のリスクファクターとなる肥満を引き起こすことが問題となっている。このような肥満の予防・改善のために、香辛料成分によるエネルギー代謝調節作用が注目されてきた。トウガラシの辛味成分であるカプサイシンにはエネルギー代謝を亢進させ、体脂肪を減少させる作用がある¹⁾。また、辛味のほとんどないトウガラシであるCH19甘の成分であるカプシエイトはカプサイシンと構造が類似しており、辛くないにも関わらず体脂肪蓄積を抑制する²⁾。辛くないカプシエイトは摂取の容易さ及び安全性から、サプリメントとしての応用が可能となった。

カプサイシン及びカプシエイトのエネルギー代謝調節作用の作用点は、transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) という温度感受性を有するカルシウム透過性の高い非選択的陽イオンチャネルである^{3,4)}。TRPV1はカプサイシンやカプシエイトだけでなく、黒コショウの成分であるピペリン⁵⁾やクローブの成分であるオイゲノール⁶⁾も受容する。また、TRPV1と同様に温度感受性TRPチャネルファミリーの一つであるTRPA1は、17℃以下の冷たい温度だけでなく、わさびの成分であるアリルイソチオシアネート(AITC)やシナモンの成分であるシンナムアル

デヒドを受容する⁷⁾。我々はこれまでにカプシエイトのみならず、AITCやシンナムアルデヒドも体熱産生を亢進することを明らかにしており⁸⁾、TRPV1のみならずTRPA1アゴニストもエネルギー代謝調節作用をもつと推察される。

本研究ではTRPV1及びTRPA1を活性化することが報告されている香辛料成分に着目し、それらがエネルギー代謝に与える影響を呼気ガス分析装置で解析するとともに、マウスとニワトリのTRPV1を比較することでエネルギー代謝調節に関与するTRPV1の分子進化についても考察することを目的とした。

方 法

1. 実験動物

C57BL/6Jマウス、オス、4週齢(日本チャールズリバー、横浜)を1週間の予備飼育後に呼気ガス分析に供した。また、ホワイトレグホン種のニワトリヒナ、オス、1日齢(村田孵化場、福岡)を1週間の予備飼育後に呼気ガス分析に供した。本研究は九州大学動物実験委員会の承認を得て実施した。

2. 試 薬

試薬はAITC (ChromaDex, CA)、ジアリルジスルフィド(DADS) (Sigma-Aldrich, MO)、オイゲノール(和光純薬工業、大阪)、ピペリン(Alfa Aesar, Heysham, UK)を用いた。

3. マウス呼気ガス分析

予備飼育後のマウスを呼気ガス分析用のチャンバー(幅120×高さ150×奥行240mm)に投与

3時間前に個別に入れた。AITC, DADS, オイゲノール、ピペリン、及び vehicle 投与前後の呼気ガスを採取し、酸素消費量 (VO_2) と二酸化炭素排出量 (VCO_2) を分析した。ガス分析は質量分析計に直接接続された代謝ガス分析システムを用いた (Arco2000、アルコシステム、柏)。チャンバー内の気体 (空気) は 0.3L/min の割合で吸い取った。採取した気体は乾燥した薄い綿のカラムを通して乾燥させ、質量分析計で O_2/CO_2 分析を行った。 VO_2 及び VCO_2 より呼吸商を算出した。

4. ニワトリヒナ呼気ガス分析

予備飼育後のニワトリヒナを呼気ガスチャンバーに入れ、マウスと同様の方法で AITC 及び vehicle 投与前後の呼気ガスを採取し VO_2 及び VCO_2 を分析した。解析方法はマウスと同様にした。

5. ホールセルパッチクランプ

ヒト胎児腎臓由来細胞 HEK293T を、10% FBS (Hyclone, Thermo Fisher Scientific Inc., MA), 100 units·mL⁻¹ penicillin (和光純薬工業), 100 mg·mL⁻¹ streptomycin (和光純薬工業) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (高グルコース DMEM, 和光純薬工業) 中で 37°C、5% CO_2 濃度で培養した。ホールセルパッチクランプによる電流応答解析のために、1 μ g のマウス TRPV1 発現ベクター又はニワトリ TRPV1 発現ベクター (いずれも岡崎統合バイオサイエンスセンター富永真琴先生より供与) を 0.1 μ g の蛍光タンパク質 EGFP 発現ベクター (群馬大学柴崎貢志先生より供与) とともに HEK293T 細胞に ScreenFect A (和光純薬工業) を用いてトランスフェクションし、35 mm ディッシュで 24-48 時間培養した。

カバースリップ上の HEK293T 細胞を灌流チャンバーの上にマウントし、140 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM $MgCl_2$, 2 mM $CaCl_2$, 10 mM HEPES, 10 mM glucose, pH7.4 のバス溶液で灌流した。

細胞内液は 140 mM KCl, 5 mM EGTA, 10 mM HEPES, pH7.4 (with KOH) とした。ホールセル電流記録は HEKA 社のアンプ及びソフトウェアを用いて記録した (HEKA PC-10 amplifier with HEKA Patchmaster software, HEKA Elektronik, Lambrecht/Pfalz, Germany)。膜電位は -60 mV に固定した。全ての実験は室温で行った。

結 果

1. ピペリン、オイゲノール、DADS がマウスのエネルギー代謝に与える影響

TRPV1 アゴニストであるピペリンがマウスのエネルギー代謝に与える影響を呼気ガス分析装置にて解析したところ、1, 5, 20 mg/kg のいずれの投与量においても酸素消費量の上昇は見られなかった (Fig. 1a, c, e)。20 mg/kg の投与量ではむしろ酸素消費量の有意な低下が観察された (Fig. 1e)。呼吸商にはいずれの投与量においても変化が見られなかった (Fig. 1b, d, f)。

同様に TRPV1 アゴニストであるオイゲノールにおいて、50 mg/kg の投与量では酸素消費量及び呼吸商の変化は見られなかった (Fig. 2a, b)。一方で、TRPA1 及び TRPV1 の両方のアゴニストである DADS⁹⁾ においては、50 mg/kg の投与量で呼吸商が投与直後から投与後 90 分間で上昇し、投与後 90 分から投与後 240 分においては低下した (Fig. 3b)。DADS は投与後 150 分以降に酸素消費量を低下させる傾向がみられたものの、2 群間で有意な差は観察されなかった (Fig. 3a)。

2. AITC がマウス及びニワトリヒナのエネルギー代謝に与える影響

TRPA1 及び TRPV1 の両方のアゴニストである AITC¹⁰⁾ がマウスのエネルギー代謝に与える影響を呼気ガス分析装置にて解析したところ、50 mg/kg の投与量において呼吸商が投与直後から投与後 90 分間で一過性に有意に上昇した

(Fig. 4b)。一方で酸素消費量には大きな影響を与えなかった (Fig. 4a)。これらの結果は Mori らが既に報告している結果と一致していた¹⁰⁾。

同様の実験をニワトリヒナで実施したところ、5, 25, 50 mg/kg のいずれの投与量においてもマウ

スで観察されたような呼吸商の一過性の上昇は観察されなかった (Fig. 5b, d, f)。一方で酸素消費量は 25, 50 mg/kg の投与量において有意に低下した (Fig. 5c, e)。

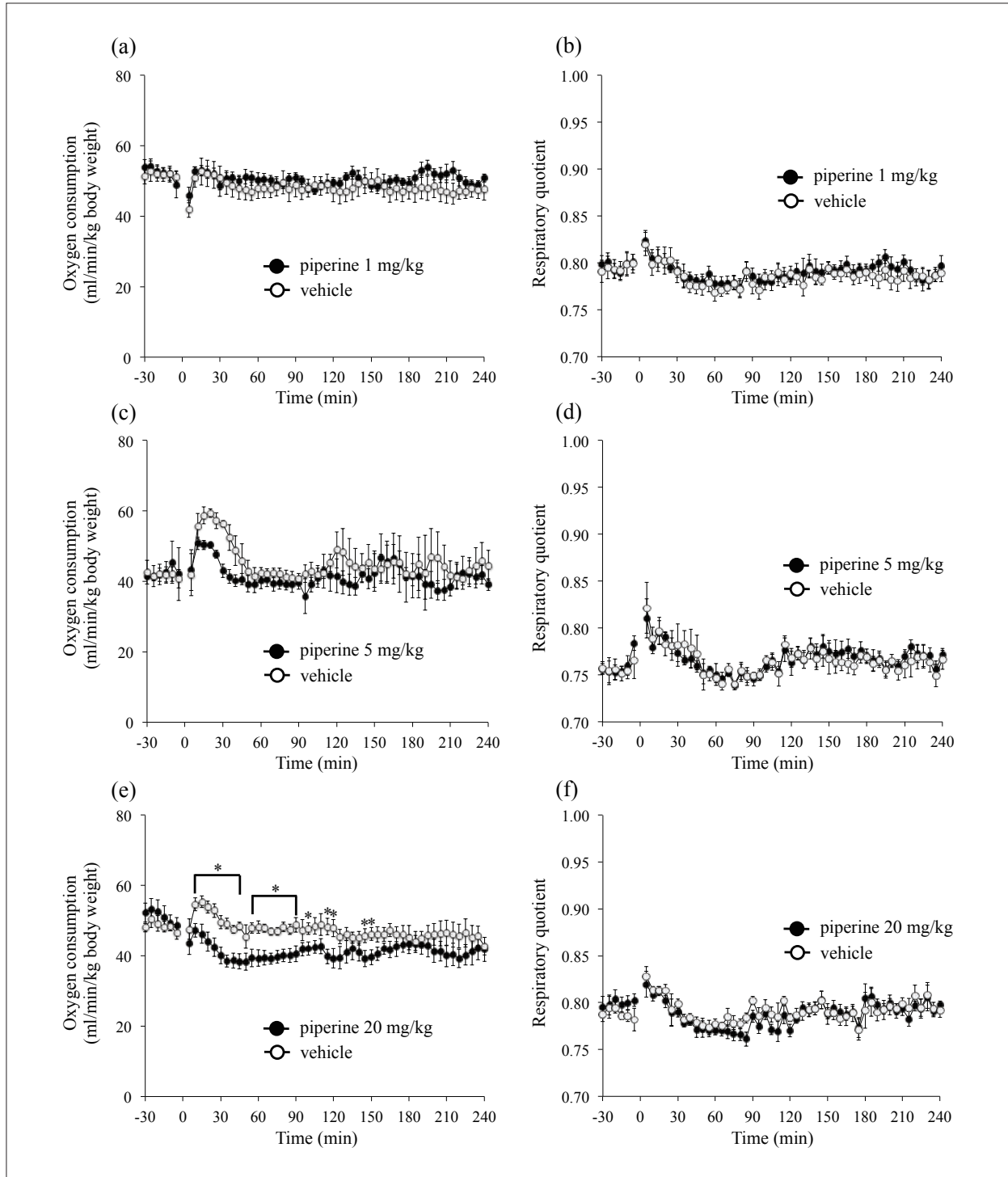


Fig 1. Oxygen consumption and respiratory quotient after intragastric administration of piperine or a vehicle in mice. Each value is the mean \pm SEM. *Significantly different from the vehicle group by two-way ANOVA and unpaired *t*-test, $p < 0.05$ ($n = 4-10$)

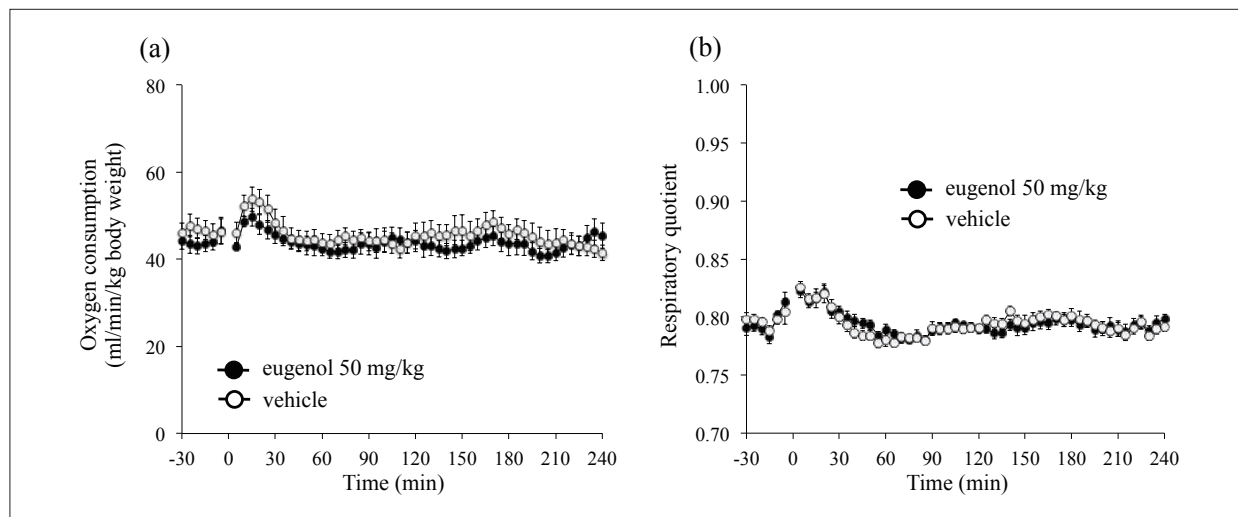


Fig. 2 Oxygen consumption and respiratory quotient after intragastric administration of eugenol or a vehicle in mice. Each value is the mean \pm SEM (n = 12).

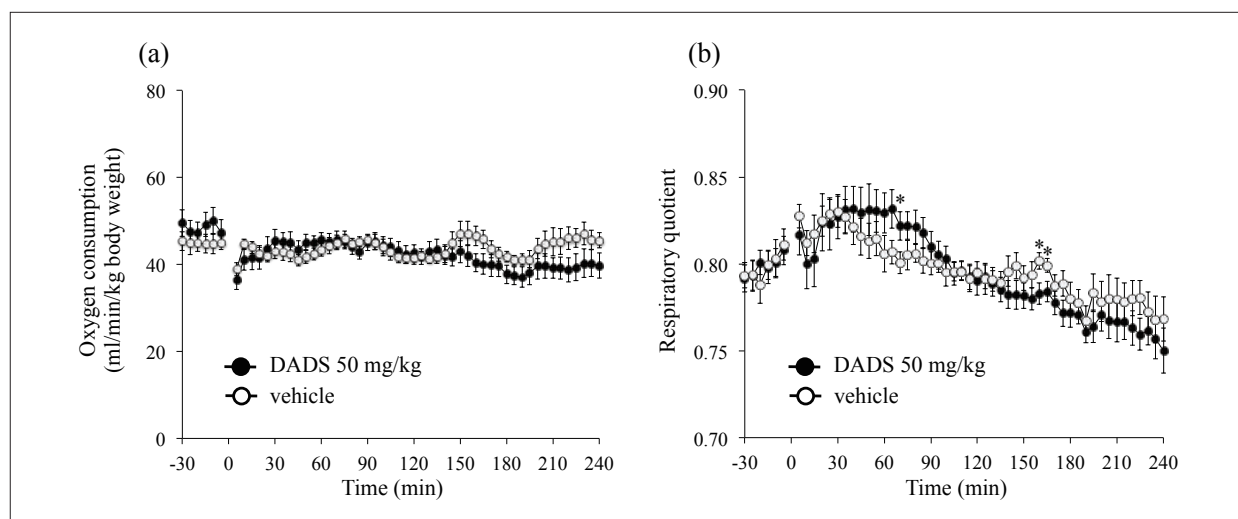


Fig. 3 Oxygen consumption and respiratory quotient after intragastric administration of DADS or a vehicle in mice. Each value is the mean \pm SEM. *Significantly different from the vehicle group by two-way ANOVA and unpaired *t*-test, $p < 0.05$ (n = 12)

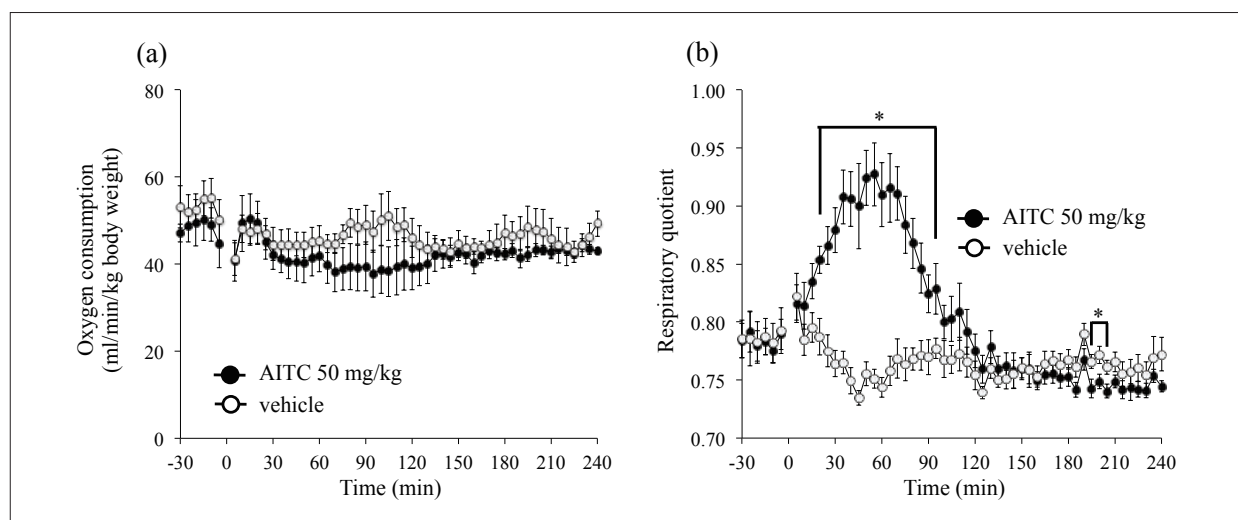


Fig. 4 Oxygen consumption and respiratory quotient after intragastric administration of AITC or a vehicle in mice. Each value is the mean \pm SEM. *Significantly different from the vehicle group by two-way ANOVA and unpaired *t*-test, $p < 0.05$ (n = 6)

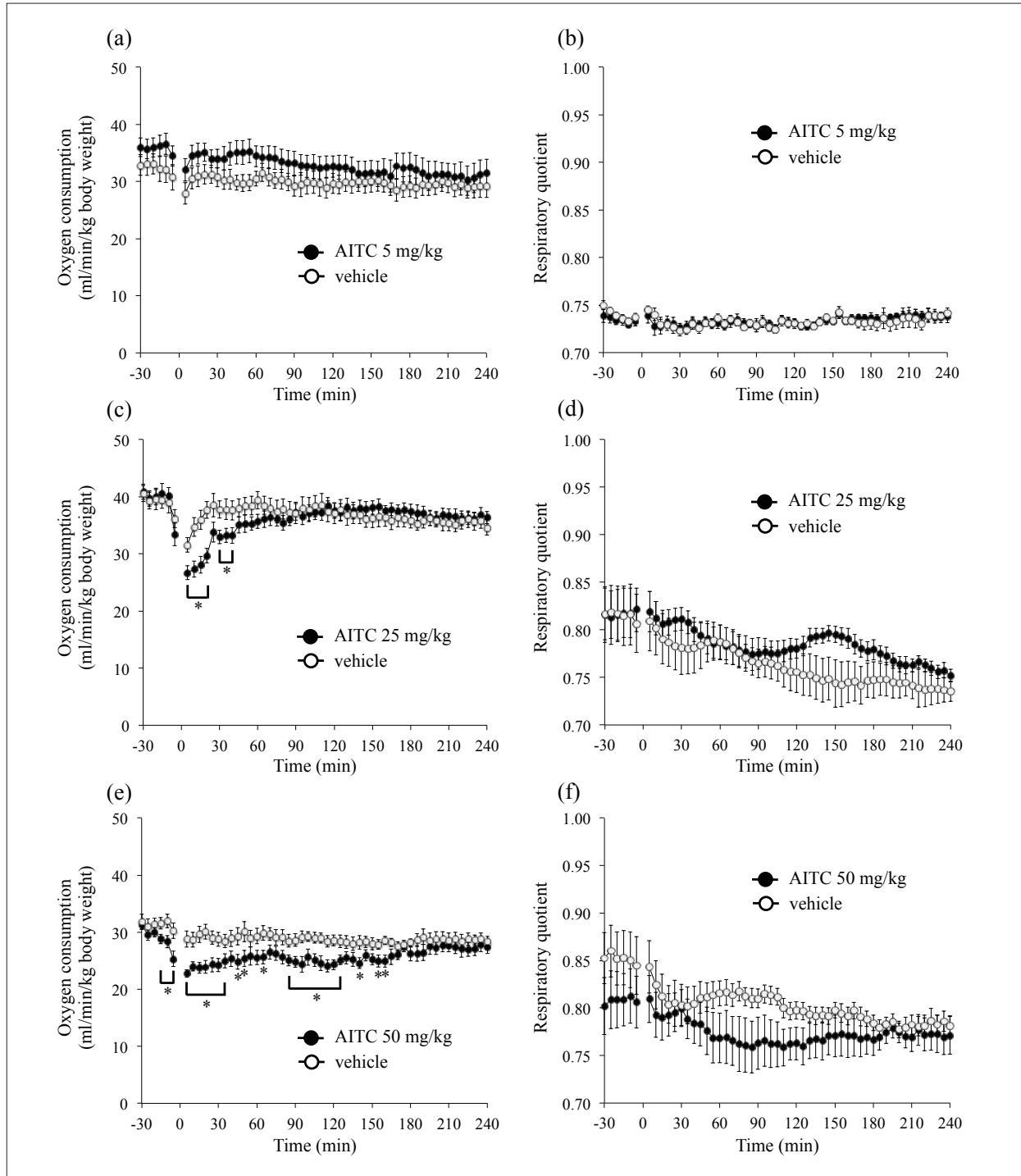


Fig. 5 Oxygen consumption and respiratory quotient after intragastric administration of AITC or a vehicle in chickens. Each value is the mean \pm SEM. *Significantly different from the vehicle group by two-way ANOVA and unpaired *t*-test, $p < 0.05$ ($n = 11-12$)

3. mTRPV1 及び hTRPV1 に対するオイゲノールの反応性

HEK293T細胞に hTRPV1 又は mTRPV1 を一過性に強制発現させ、1mM のオイゲノールを作用させたところ、それぞれ内向きの活性化電流が観察された (Fig. 6a, b)。

4. mTRPV1 及び cTRPV1 に対する AITC の反応性

HEK293T細胞に mTRPV1 を一過性に強制発現させ、1mM の AITC を作用させたところ、内向きの活性化電流が観察された (Fig. 7a)。一方で cTRPV1 に 5mM の AITC を作用させてもその

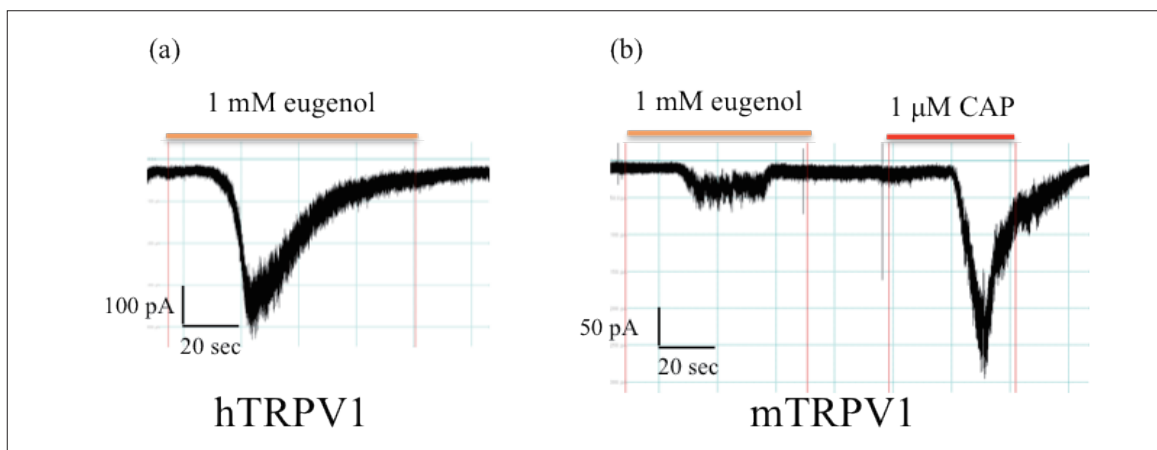


Fig. 6 Eugenol activated human (a) and mouse (b) TRPV1.

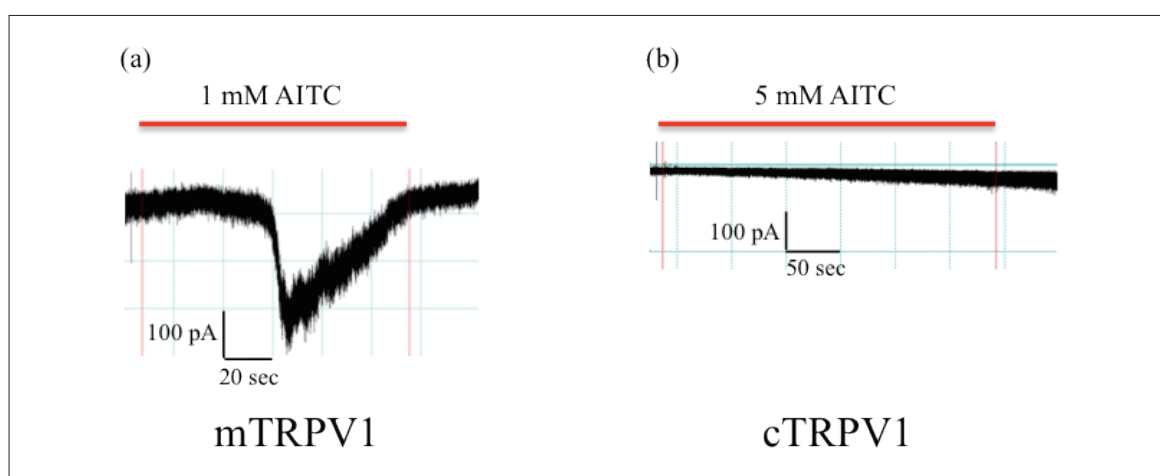


Fig. 7 AITC activated mouse TRPV1 (a). However, chicken TRPV1 was not activated by AITC (b).

ような活性化電流は観察されなかった (Fig. 7b)。

考 察

本研究では温度感受性 TRP チャンネルに作用してエネルギー代謝を調節する可能性のある香辛料成分を探索した。TRPV1を活性化することが知られている香辛料成分であるピペリン及びオイゲノールの単回投与は、マウスの酸素消費量を上昇させることはなかった。これらのことから、ピペリンやオイゲノールといった成分は、TRPV1を活性化して辛味や痛みを感じさせるものの、本実験条件ではエネルギー代謝を亢進させないことが示唆された。Gregersen らは、ピペリンを含む黒コショウの単回摂取はヒトの食事性体熱産生を上昇させないことを報告しており¹¹⁾、本研究の結

果と一致している。本研究ではむしろ、高用量のピペリン投与では酸素消費量の有意な低下が観察されており、これらは辛味や痛みによる行動量の低下によるものと推察している。

オイゲノールに関してはこれまでに報告のあったラットだけではなく⁶⁾、ヒト及びマウスの TRPV1も活性化することが本研究で明らかになった。マウスの TRPV1をオイゲノールは活性化するものの、単回投与ではエネルギー代謝に影響を与えるほどの活性はもっていないと推察された。Fig. 6bで示したように、1mM オイゲノールの活性化電流は1 μ M カプサイシンの活性化電流より小さく、その活性はカプサイシンの1000分の1以下であることから、TRPV1に対する活性が弱いことからエネルギー代謝に影響を与えな

かったと考えられる。

本研究において、ニンニクの成分である DADS が一時的な糖質酸化量亢進作用を有することが明らかとなった。DADS は TRPV1 及び TRPA1 を活性化することが報告されている⁹⁾。また、わさびの成分である AITC も TRPV1 及び TRPA1 を活性化するが、TRPV1 を活性化することで糖質酸化量が増大することがわかっている¹⁰⁾。従って、本研究で観察された DADS による糖質酸化量の増大も TRPV1 を介した作用である可能性が考えられる。AITC と DADS の構造は似通っているため、それらの化学的特徴が糖質酸化量の増大に深く関与している可能性が考えられる。同じく TRPV1 を活性化するカプサイシンやカプシエイトには AITC のような糖質酸化量増大活性はないため、何らかの未知のファクターがこれらの作用に関与していると推察される。

DADS は投与後に糖質酸化量を増大させた後、ベースラインよりも低下させる作用があることが示唆された。一過性に糖質酸化量が増大したことに対する代償作用であると考えられるが、このような糖質酸化量の調節作用は、生活習慣病の一因である食後の高血糖の解消に貢献できる可能性もあるため、今後の詳細な検討が期待される。

本研究において、Mori らが報告しているような¹⁰⁾、AITC 投与によるマウスの糖質酸化量増大作用の再現性が確認できた。AITC においても一過性の糖質酸化量の増大の後、若干の糖質酸化量の有意な低下が見られており、この点は DADS の結果と一致している。しかしながら DADS と比べてその活性は非常に大きなものであることがわかった。

そのような AITC による糖質酸化量増大作用の種特異性を調べるために、ニワトリにおける AITC 活性を検証したところ、ニワトリの TRPV1 は AITC に対して応答性を示さないことが明らかとなった。また、ニワトリヒナに AITC

を投与したところ、マウスで観察されたような糖質酸化量の増大作用は見られなかった。これらのことから、ニワトリにおいては TRPV1 が AITC を受容しないためにマウスで見られたような糖質酸化量の増大が観察されないと推察された。しかしながら、ニワトリにおいては AITC によって酸素消費量が低下していたことから、AITC による辛味や痛みについては TRPV1 以外の受容体で受容されている可能性が考えられた。Saito らは最近、ニワトリの TRPA1 を AITC が活性化することを報告しており¹²⁾、本研究で観察された酸素消費量の低下には TRPA1 を介した痛みによる行動量の低下が関わっているかもしれない。ニワトリは元来高血糖であることが知られているが、その一因に TRPV1 を介した糖質酸化量の調節メカニズムの欠損が関与している可能性が考えられる。哺乳類は進化の過程で TRPV1 を介した糖質制御機構を獲得したと推察されるが、その臨床的意義については今後検討する必要がある。

要約すると、本研究では新たにニンニクの成分である DADS に AITC と同様の糖質酸化量増大作用があることが示唆された。また、AITC による TRPV1 を介した糖質酸化量の増大作用は鳥類では見出されず、哺乳類に特徴的な生理作用であることが示唆された。その原因として鳥類の TRPV1 は AITC によって活性化されないことが関与していると推察された。

謝 辞

本研究の遂行にあたって貴重な研究助成を賜りました公益財団法人 浦上食品・食文化振興財団及びその関係者の皆様に心より御礼申し上げます。

文 献

- 1) Kawada, T., Hagihara, K.-I. & Iwai, K. Effects of capsaicin on lipid metabolism in rats fed a high fat diet. *J. Nutr.* **116**, 1272-1278 (1986).
- 2) Ohnuki, K. *et al.* Administration of capsiate, a non-

- pungent capsaicin analog, promotes energy metabolism and suppresses body fat accumulation in mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **65**, 2735–2740 (2001).
- 3) Caterina, M. J. *et al.* The capsaicin receptor : a heat-activated ion channel in the pain pathway. **389**, (1997).
 - 4) Iida, T. *et al.* TRPV1 activation and induction of nociceptive response by a non-pungent capsaicin-like compound, capsiate. *Neuropharmacology* **44**, 958–967 (2003).
 - 5) McNamara, F. N., Randall, A. & Gunthorpe, M. J. Effects of piperine, the pungent component of black pepper, at the human vanilloid receptor (TRPV1). *Br. J. Pharmacol.* **144**, 781–90 (2005).
 - 6) Yang, B. H. *et al.* Activation of vanilloid receptor 1 (VR1) by eugenol. *J. Dent. Res.* **82**, 781–785 (2003).
 - 7) Bandell, M. *et al.* Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron* **41**, 849–57 (2004).
 - 8) Masamoto, Y., Kawabata, F. & Fushiki, T. Intragastric administration of TRPV1, TRPV3, TRPM8, and TRPA1 agonists modulates autonomic thermoregulation in different manners in mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **73**, 1021–1027 (2009).
 - 9) Koizumi, K. *et al.* Diallyl sulfides in garlic activate both TRPA1 and TRPV1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **382**, 545–8 (2009).
 - 10) Mori, N. *et al.* Intragastric administration of allyl isothiocyanate increases carbohydrate oxidation via TRPV1 but not TRPA1 in mice. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **300**, R1494–R1505 (2011).
 - 11) Gregersen, N. T. *et al.* Acute effects of mustard, horseradish, black pepper and ginger on energy expenditure, appetite, ad libitum energy intake and energy balance in human subjects. *Br. J. Nutr.* **109**, 556–563 (2013).
 - 12) Saito, S. *et al.* Heat and noxious chemical sensor, chicken TRPA1, as a target of bird repellents and identification of its structural determinants by multispecies functional comparison. *Mol. Biol. Evol.* (in press).

Searching of spice ingredients that modulate energy metabolism, and the mechanisms of these modulations

Fuminori Kawabata

Institute for Advanced Study, Kyushu University

Abstract

We searched spice ingredients that modulate energy metabolism such as capsaicin and capsiate. Capsaicin and capsiate are spice ingredients and agonists of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1). It is well known that these compounds accelerate energy expenditure *via* TRPV1. In the present study, we examined whether other spice ingredients such as piperine, eugenol, diallyl disulfide (DADS), and allyl isothiocyanate (AITC), that are TRPV1 agonists, modulate energy metabolisms like capsaicin and capsiate by using respiratory gas analysis system. Piperine, eugenol, DADS, and AITC are found in black pepper, clove, garlic, and wasabi, respectively. Intragastric administration of piperine decreased oxygen consumption and did not affect respiratory quotient in mice. Intragastric administration of eugenol did not affect both of oxygen consumption and respiratory quotient in mice. On the other hand, DADS and AITC transiently accelerate respiratory quotient without changing oxygen consumption in mice. These results suggest that DADS and AITC transiently enhance carbohydrate oxidation in mice. Furthermore, to elucidate the molecular evolution of TRPV1, we compared mouse to chicken TRPV1 by using whole cell patch-clamp technic. We found that chicken TRPV1 is not activated by AITC. Moreover, intragastric administration of AITC did not change respiratory quotient in chickens. However, oxygen consumption was decreased by AITC administration in chickens. These results suggest that AITC-induced carbohydrate oxidation enhancement is specific in mammals. The decrease of oxygen consumption in chickens may be induced by pain sensation *via* TRPA1 because chicken TRPA1 is activated by AITC.

This work was supported by Research Grant from the Urakami Foundation, Tokyo, Japan.