

<平成 29 年度助成>

遊離脂肪酸受容体を活性化する香辛料成分の探索

柴田 貴広

(名古屋大学大学院 生命農学研究科応用生命科学専攻 食品機能化学研究室)

1. 背景と目的

メタボリック症候群といわれる肥満、高血圧、耐糖能障害、脂質異常症などの危険因子が集積することにより、様々な糖尿病性合併症や、虚血性心疾患、脳血管障害が引き起こされる。遺伝的な背景に環境因子が加わり、各危険因子が経時的に連鎖することで様々な重篤な疾患を発症する。このような病態の進展における、各危険因子の経時的な連鎖の上流に位置する肥満や糖尿病の段階で抑制することは、その下流の様々な疾患の予防に極めて有効であると考えられている。平成 28 年の厚生労働省「国民健康・栄養調査」において、糖尿病が強く疑われる者（糖尿病有病者）および糖尿病の可能性を否定できない者（糖尿病予備軍）が、いずれも推計 1,000 万人であることが発表された（図 1）。このことから、我が国において糖尿病対策が急務であることは明白であり、健康長寿の延伸や膨らみ続ける社会保障費の抑制という点からも、極めて重要な課題であると言える。

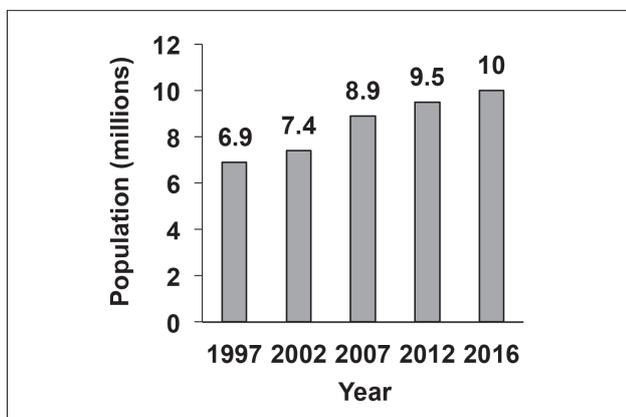


図 1 「糖尿病が強く疑われる者」の推計人数（20 歳以上、男女計）
「平成 28 年 国民健康・栄養調査結果の概要」より

脂肪酸はエネルギー供給を担う重要な栄養素として古くから認識されてきた。生体における脂肪酸シグナルを受容する分子としては、脂肪酸結合タンパク質類、スカベンジャー受容体、ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体などが知られているが、近年、新たな脂肪酸センサーとして、G タンパク質共役受容体 (GPCR) の一種である遊離脂肪酸受容体 (FFAR) 類が同定された^{1,2)}。中でも FFAR1 および FFAR4 は、中・長鎖脂肪酸により活性化される GPCR であり、血中グルコース濃度の制御に関与していることが知られている。すなわち、(i) 膵臓β細胞からのインスリン分泌促進、(ii) 腸管 L 細胞におけるグルカゴン様ペプチド -1 (GLP-1) などのインクレチン産生促進、(iii) 脂肪細胞におけるグルコール取り込み促進、(iv) マクロファージ細胞における炎症性サイトカインの発現抑制、という 4 つの作用点で、FFAR は抗糖尿病活性を示すものと考えられている（図 2）³⁾。

そこで本研究では、食品成分による機能性発現の新たな標的として FFAR に注目し、FFAR を活性化しうる食品成分の探索を行った。特に、これまで様々な生理作用が数多く報告されており、その機能性が注目を集めているハーブ・スパイスに焦点を当てて研究を行った。

2. 方法と結果

2-1. ハーブ・スパイス抽出物の FFAR 活性化能の評価

FFAR 活性化の評価は、トランスフォーミング増殖因子α (TGFα) 切断アッセイにより行った。本法は、FFAR およびアルカリホスファターゼ (AP) 標

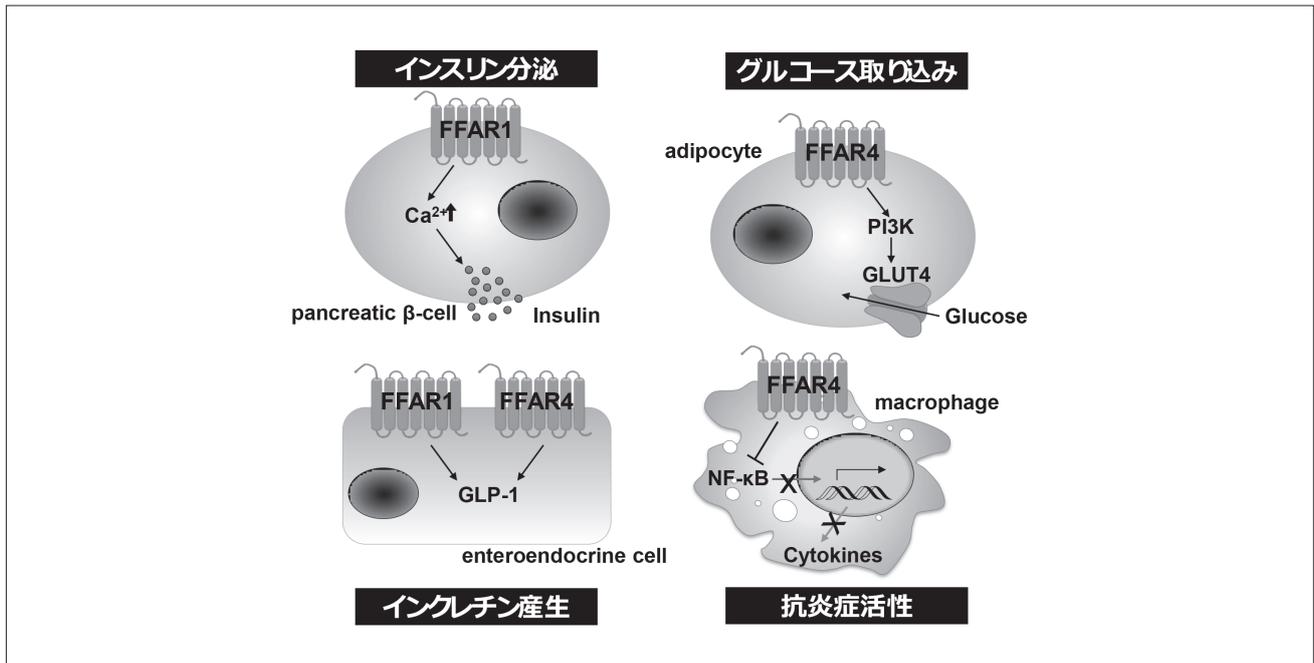


図2 FFARを介した様々な作用

識 TGF α を発現させた HEK293 細胞を利用した評価法である。このアッセイ系では、GPCR の活性化に依存して活性化される内在性の腫瘍壊死因子 α 変換酵素 (TACE) が、AP-TGF α を切断し、培地中に遊離される AP 活性を測定することにより、GPCR 活性化を評価できる⁴⁾。

FFAR を活性化する食品成分の探索を開始するにあたり、一般的に市販されている 19 種類のハーブ・スパイス類について評価を行うこととした (表 1)。ハーブ・スパイスそれぞれ 1g に対し、ヘキサンもしくは酢酸エチルを 10 ml 加え、1 時間室温で攪拌した。1

表 1 本研究で用いたハーブ・スパイス類

シソ科	マジョラム、オレガノ、セージ、タイム、ローズマリー、ペパーミント
ショウガ科	ショウガ、ターメリック、カルダモン
キク科	タラゴン
ニクズク科	ナツメグ
クスノキ科	ローレル、シナモン
ミカン科	花椒
フトモモ科	クローブ
セリ科	コリアンダー、フェンネル
ラン科	バニラビーンズ
イネ科	レモングラス

時間後、遠心し不溶性物質を除去したのち、それぞれの有機溶媒層をエバポレーターで乾固し、抽出物を得た。抽出物 10 mg/ml となるように DMSO に溶解したのち、FFAR1 および FFAR4 に対する TGF α 切断アッセイに供した。その結果、シナモン、フェンネル、ペパーミント、レモングラスのヘキサンおよび酢酸エチル抽出物を終濃度が 100 $\mu\text{g/ml}$ となるように投与することにより、強い FFAR1 活性化能が見られた (図 3)。また、FFAR4 に対しては、シナモン、フェンネル、レモングラスの各ヘキサン抽出物およびフェンネルの酢酸エチル抽出物などで強い活性が認められた。一方で短鎖脂肪酸受容体として知られる FFAR2 および FFAR3 に対しては、活性を示すハーブ・スパイス類はなかった。以上のことから、これらのハーブ・スパイス類には、FFAR1 および FFAR4 を活性化する成分が含まれていることが示唆された。

2-2. フェンネルに含まれる FFAR1 活性化物質の探索

次に、FFAR1 活性化能を示したハーブ・スパイス類のうち、最も活性の強かったフェンネルに注目し、さらなる解析を行うこととした。フェンネル (学名 *Foeniculum vulgare*) は、地中海沿岸を原産とするセリ

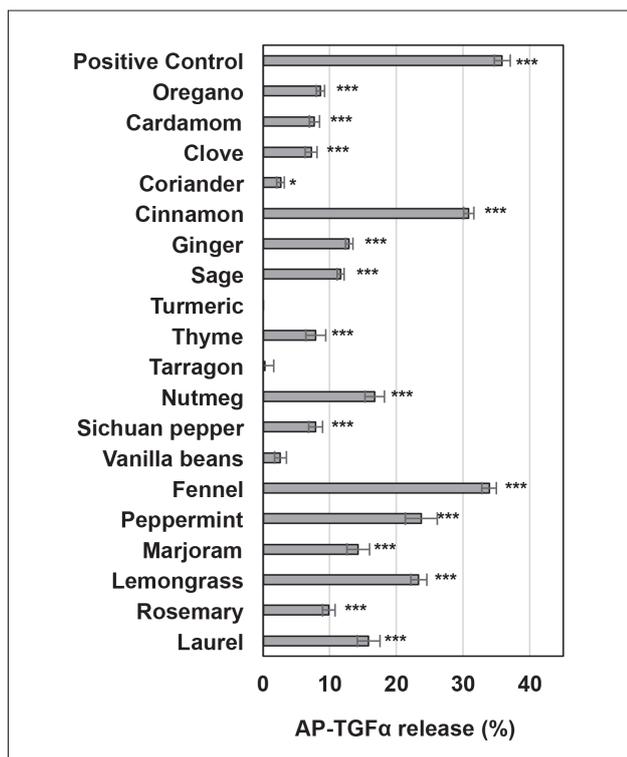


図3 FFAR1 活性化能のスクリーニング

科ウイキョウ属の多年草であり、その果実は生薬「茴香（ういきょう）」として健胃作用を有することが知られている。西洋だけでなく、中国、インドにおいても風味付けとして利用されており、さらに沖縄料理にも利用されているなど、世界各国で古くから使用されている香味野菜の一つである。フェンネルからヘキサン、酢酸エチル、メタノールで段階的に抽出を行い、それぞれ終濃度 100 $\mu\text{g/ml}$ になるように投与したところ、ヘキサンおよび酢酸エチル抽出物では強い活性化が認められたものの、メタノール抽出物では全く活性化が認められなかった（図4）。

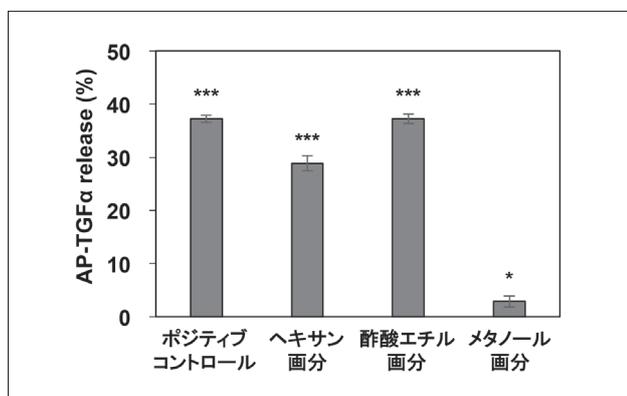


図4 フェンネル抽出物による FFAR1 活性化

次に、ヘキサンおよび酢酸エチル抽出物に含まれている活性物質の単離・精製を試みた。まずヘキサン抽出画分をシリカゲルオープンカラムに供し、①ヘキサン画分、②ヘキサン：酢酸エチル 4：1、③ヘキサン：酢酸エチル 1：1 ④ヘキサン：酢酸エチル 1：4、⑤アセトン画分の計 5 画分を得た。それぞれの画分について、FFAR1 活性化能を評価したところ、②ヘキサン：酢酸エチル 4：1 に強い活性を見いだした。この画分について、逆相 HPLC により分析したところ、5 つの主要なピークを検出したため、それぞれのピークを分取し、活性評価を行った。その結果、13 分付近および 17.5 分付近に検出される 2 つのピークに強い活性が認められた。そこでこれらの 2 つのピークをさらに分取し、NMR による化学構造解析を行った。その結果、リノール酸およびペトロセリン酸であることが明らかとなった。実際に、リノール酸およびペトロセリン酸は濃度依存的に FFAR1 を活性化することが確認された。

3. まとめと今後の展望

本研究では、FFAR を活性化する食品成分として、特にハーブ・スパイスに注目して研究を行った。19 種類のハーブ・スパイスのうち、特にシナモン、フェンネル、ペパーミント、レモングラスに強い FFAR1 活性化能を見いだした。その中でも最も活性の強かったフェンネルについて、溶媒分画および各種クロマトグラフィーを用い、活性を指標とした化合物の単離同定を行った。その結果、フェンネルに含まれる活性物質として、リノール酸とペトロセリン酸を同定した。これらの化合物は脂肪酸類であり、すでに報告もなされている化合物であった。しかしながら、それ以外にも複数の活性物質が存在していることが分かっており、さらなる単離・同定と構造解析を進めることにより、ハーブ・スパイスの持つ機能性について、分子メカニズムを含めて明らかにすることができるものと期待される。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、多大なご支援を賜りました公益財団法人 浦上食品・食文化振興財団に厚く御礼申し上げます。また、TGF α 切断アッセイにつきましてご指導いただきました、東北大学大学院薬学研究科・井上飛鳥先生に深く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Itoh Y, Kawamata Y, Harada M, Kobayashi M, Fujii R, et al. (2003) Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic beta cells through GPR40. *Nature* 422, 173-176.
- 2) Briscoe CP, Tadayyon M, Andrews JL, Benson WG, Chambers JK, et al. (2003) The orphan G protein-coupled receptor GPR40 is activated by medium and long chain fatty acids. *J. Biol. Chem.* 278, 11303-11311.
- 3) Houthuijzen JM. (2016) For Better or Worse: FFAR1 and FFAR4 Signaling in Cancer and Diabetes. *Mol. Pharmacol.* 90, 738-743.
- 4) Inoue A, Ishiguro J, Kitamura H, Arima N, Okutani M, et al. (2012) TGF α shedding assay: an accurate and versatile method for detecting GPCR activation. *Nat. Methods* 9, 1021-1029.

Identification of herb and spice components that activate free fatty acid receptors

Takahiro SHIBATA

Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University

Free fatty acid receptors 1 and 4 (FFAR1 and FFAR4, which are also respectively referred to as GPR40 and GPR120), bind to medium- to long-chain free fatty acids, and are increasingly under investigation due to their roles in chronic diseases such as diabetes and obesity. In particular, an increasing body of evidence indicates that the activation of FFAR1/4 signaling reduces the symptoms of diabetes. In this study, in order to investigate the FFAR activation potential of the phytochemicals contained in herbs and spices, we screened 19 types of herb and spice extracts for FFAR1 activation, using the TGF α -shedding assay, which is an accurate and versatile method for detecting GPCR activation. The screening data indicated that Cinnamon, Fennel, Peppermint, and Lemongrass extracts showed a remarkable activation of FFAR1. Among these extracts, we focused on Fennel extract, as it displayed the highest activity. To identify the active components responsible for the activation of FFAR1, we performed the activity-guided separation of the principal inducers from a hexane extract of Fennel. Eventually, we identified linoleic acid and petroselinic acid as the principal agonists of FFAR1 in Fennel. Our results suggest that herbs and spices exhibit beneficial effects on human health due to the activity of these agonists against FFARs.