

マグロ内臓・脳由来リン脂質によるヒト脂質代謝改善作用

河村 幸雄 , 横田 幸宏

(利用・安全グループ)

近畿大学農学研究科応用生命化学専攻

ykawamur@nara.kindai.ac.jp

現在クロマグロは、日本人が好んで食べる魚種の一つである、その消費量は世界の中で最も多く、世界の消費量の 8 割を占めるともいわれている。クロマグロは、主に食肉として使用されており脳や内臓等の利用は少ない。そのため、脳・内臓等は未利用資源となっている。

これらの部位には、多種のリン脂質が含まれる。リン脂質は、膜タンパクとともに細胞膜を形成しており細胞膜の二重構造に関わっている。また、リン脂質を含む親水性部位と炭化水素により形成される疎水性部位からなる。リン脂質は、脂質代謝を改善する可能性があるといわれている転写因子 Liver Receptor Homolog-1 (LRH-1) のリガンドとして働くことで、脂質代謝を改善する因子として知られている CYP7A1、Apo-A1、Adiponectin に対応する遺伝子発現を活性化させることにより抗メタボリックシンドローム効果を示す可能性がある^(1,2)。

そこで本研究では、まず LRH-1 の評価系の構築のため、ゲルシフトアッセイ法 (EMSA) による評価系の検討を行った。また、養殖マグロの脳・肝臓から総脂質を抽出し、さらに薄層クロマトグラフ

イー (TLC) によりその構成リン脂質の分離を行った。

材料と方法

ゲルシフトアッセイ (EMSA) 本実験で用いたオリゴヌクレオチドを Table.1 に示す。本実験では、アンチセンス鎖に Cy5.5 をラベル化した。オリゴヌクレオチド (1 μ M) を 95°C で 5 分間加熱し、室温・遮光下で徐々に冷ますことによりアニーリングを行った。アニーリング後、15% の未変性ポリアクリルアミドゲルを用い、遮光下で電気泳動を行った (50V, 200mA)。そして、近赤外蛍光スキャナ ODYSSEY (LI-COR) にて検出した。

培養細胞の核抽出物に対するオリゴヌクレオチドの結合性の検討 Nuclear Extraction Kit (Panomics) を用いてヒト由来肝ガン細胞 (HepG2) から核を抽出した。核抽出物とオリゴヌクレオチドとを Binding Buffer 中で反応させ、用いた配列に特異的に結合するかを検討した。

Table.1 Oligonucleotide sequences

| Oligonucleotides | Sequences (5' - 3') |
|--------------------------|-----------------------------------|
| LRH-RE-biotin-{sense} | [biotin]AATAAGGGTCAAGGCCTGGAAACAC |
| LRH-RE-Cy5.5-{antisense} | [Cy5.5]GTGTTTCCAGGCCTTGACCCTTATT |
| LRH-RE-{sense} | AATAAGGGTCAAGGCCTGGAAACAC |
| LRH-RE-{antisense} | GTGTTTCCAGGCCTTGACCCTTATT |

↑ LRH-RE sequence

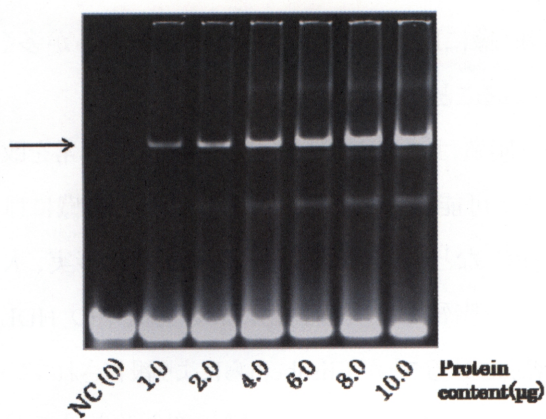
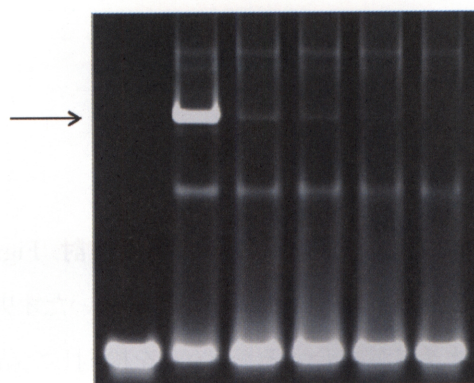


Fig.1 Binding rate of Cy5.5 labeled probe to nuclear extract



| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|------------------|---|---|----|-----|-----|-----|
| Labeled probe | + | + | + | + | + | + |
| Nuclear Extract | - | + | + | + | + | + |
| Competing oligos | - | - | 5× | 10× | 20× | 50× |

Fig.2 The binding of labeled probe to LRH-1 in nuclear extract was inhibited by non-labeled probe

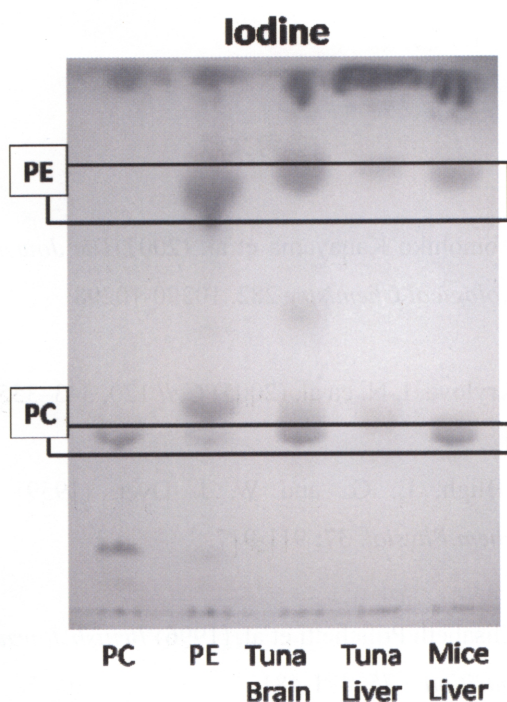
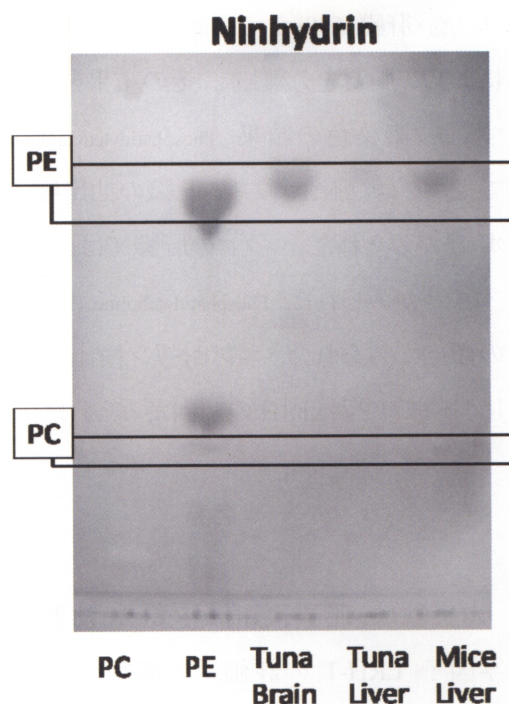


Fig.3 Detention of phospholipids
PC ; phosphatidylcholine PE ; phosphatidylethanolamine



マグロ脳・肝臓からの総脂質の抽出

養殖クロマグロの脳・肝臓を材料とした。マグロの脳と肝臓、それぞれ 600mg から Bligh-Dyer 法により総脂質を抽出した⁽³⁾。

薄層クロマトグラフィーによるリン脂質の分離

抽出した総脂質からリン脂質を TLC により分離した。プレートは、Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck) を用いた。展開溶媒は、クロロホルム-メタノール-ヘキサン-アセトン-酢酸-水 (20 : 15 : 10 : 5 : 1.3 : 1) とし、展開後ヨウ素またはニンヒドリン試薬により検

出した。

結果

EMSA による LRH-1 の評価系の検討 Fig.1 に HepG2 の核抽出物中の LRH-1 と用いたオリゴヌクレオチドが結合するかどうかを検討した結果を示した。用いたオリゴヌクレオチドはタンパク濃度依存的に結合した。

次に、非ラベル化プローブを用い阻害実験を行った結果を Fig.2 に示した。5～50 倍の過剰の非ラベル化プローブの存在により反応バンドは、濃度依存的に消失した。

マグロの脳・肝臓からのリン脂質の抽出 マグロの脳・肝臓 600mg から脂質を抽出した後、TLC によりリン脂質を分離した。その結果を Fig.3 に示す。ヨウ素染色の結果、Phosphatidylethanolamine (PE) ではマグロの脳、マウスの肝臓の抽出物で強いスポットがみられた。マグロの肝臓では、弱いながらスポットがみられた。Phosphatidylcholine (PC)でも同様の傾向がみられた。ニンヒドリン検出の結果、PE においてヨウ素と同様の傾向がみられた。

考察

本実験は、脂質代謝に好ましい効果を示す転写因子 LRH-1 の評価系の構築を目的とした。EMSA により、LRH-1 は特異的かつタンパク質量依存的に LRH-1 のコンセンサス配列に結合し、本分子の活性化レベルを評価することが可能となった。

さらに、マグロの脳・肝臓から LRH-1 のリガンドとして考えられているリン脂質の抽出を行った。マグ

ロの肝臓に比べ、マグロの脳には PE、PC が多く含まれることを確認した。

リン脂質は、LRH-1 と結合し脂質代謝異常を改善する可能性がある^(1,2)。マグロの脳、内臓には PE・PC などのリン脂質が含まれている。事実、大豆のリン脂質では実験動物において血中の HDL を増加させることが Elisabethらにより報告されている⁽⁴⁾。これらのリン脂質に脂質代謝を改善する効果が示されれば、新たな海産物由来機能成分として高機能食品素材として実用化できる可能性がある。

今後、HPLC さらに GLC などを用いリン脂質の分析を進めていく。さらに、これらのリン脂質が効果を有するかどうかを培養細胞、実験動物を用いて検討していく。

参考文献

- 1.) Tomohiko Kanayama et al. (2007) *The Journal of Biological Chemistry* 282, 10290-10298
- 2.) Krylova, I. N. et al. (2005) *Cell* 120, 343-355
- 3.) Bligh, E. G., and W. J. Dyer. (1959) *J. Biochem. Physiol.* **37**: 911-917.
- 4.) Elisabeth Polichetti et al. (1996) *British Journal of Nutrition* 75, 471-481