

# アロニア果汁摂取によるArrdc3発現調節を介した脂肪蓄積減少効果 Reduction of fat accumulation by feeding an aronia juice through regulation of Arrdc3

○山根拓也<sup>1,2,3</sup>、小塚美由記<sup>4</sup>、今井ももこ<sup>1,5,6</sup>、山本好男<sup>7</sup>、竹中重雄<sup>5</sup>、  
阪本龍司<sup>1,2</sup>、乾博<sup>1,5</sup>、大久保岩男<sup>8</sup>、中垣剛典<sup>3</sup>、中野長久<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>大阪府大・生資セ、<sup>2</sup>生命環境、<sup>5</sup>地域保健、<sup>3</sup>中垣技術士事務所・食科研、

<sup>4</sup>北海道文教大・栄養、<sup>6</sup>相愛大・発達栄養、<sup>7</sup>三重大・地域拠点、<sup>8</sup>市立三笠総合病院

## アロニアとは

Aronia (アロニア)

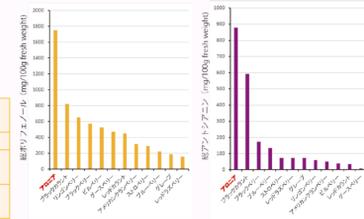


- ・アロニアは北米原産のバラ科に属する黒紫色の果実
- ・ロシア、ポーランド、ブルガリアで広く生産
- ・日本では北海道や東北で栽培

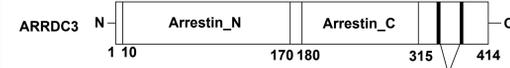
組成	アロニア果汁 (g/100g)
タンパク質	0.2
炭水化物	17.9
脂質	<0.1
ミネラル	0.5
食物繊維	0.3
エネルギー	73

組成	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

組成	アロニア果汁 (g/100g)
ORAC	100 μmol TE / g
総アントシアニン	0.014
ポリフェノール	0.99



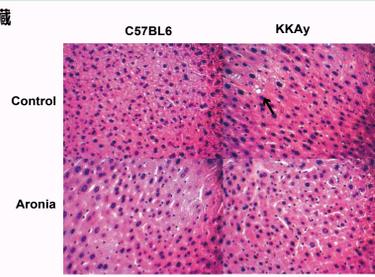
## Arrestin domain containing 3 (Arrdc3)



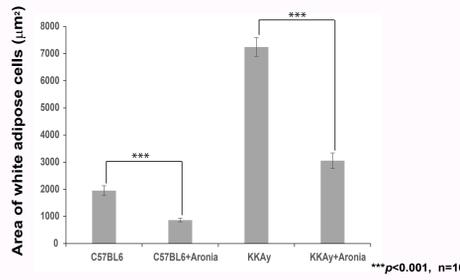
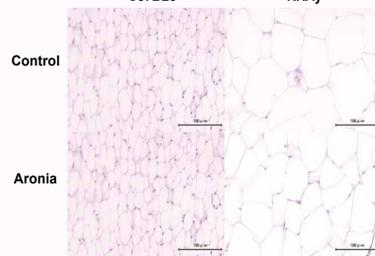
- ARRDC3はPPXYドメインを有し、WWドメインを持つNedd4 ubiquitin ligaseと結合する(Qi et al., JBC 2014)。
- ARRDC3は初期エンドソームにおいてβ2-adrenergic receptorと相互作用し、レセプターのリサイクリングを阻害する (Tian et al., JBC 2016)。
- ノックアウトマウスの白色脂肪組織ではUcp1発現、cAMP濃度、脂肪分解が増加する (Patwari et al., Cell Metab 2011)。
- 脂肪組織特異的にArrdc3をノックアウトしたマウスの白色脂肪組織ではPpargとそのターゲット遺伝子の発現が増加する (Carroll et al., PLOS ONE 2017)。

## アロニア果汁摂取による脂肪蓄積減少効果

A. 肝臓

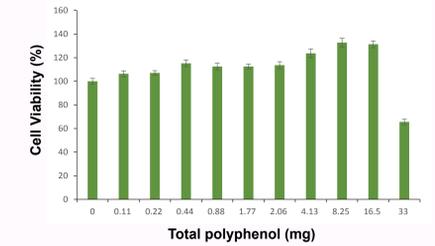


B. 白色脂肪組織

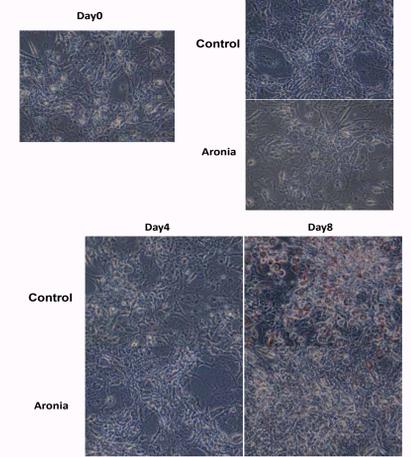


## 3T3-L1細胞への脂肪蓄積抑制効果

A. MTT assay



B. Oil Red O 染色



## アロニアによる健康効果

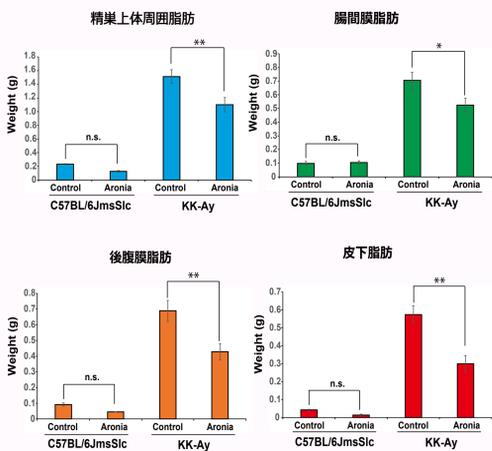


## アロニアによる肥満改善効果

- 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を摂取した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)。

## これまでの研究結果

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



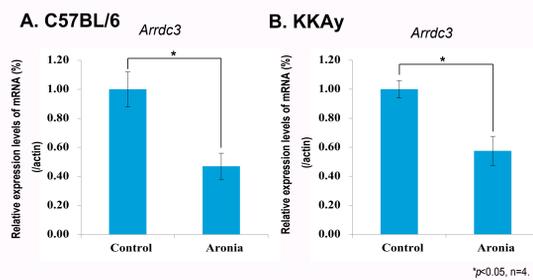
Yamane T et al. JNB 2016

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発現が変化する遺伝子

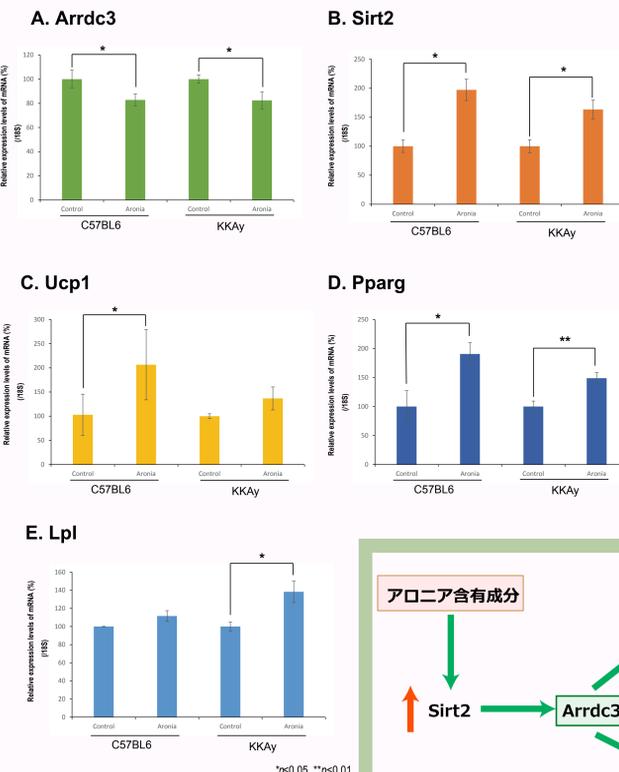
Gene symbol	Gene name	Accession number	Ratio	Gene symbol	Gene name	Accession number	Ratio
Saa2	Serum amyloid A2	NM_011114	3.942	Serpina4-ps1	Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, B1031991	BC031991	0.149
GaM45g	Growth arrest and DNA-damage-inducible 45 gamma	NM_011817	3.351	Artd3	member 4, peonidin 1 arrestin domain containing 3	NM_001042591	0.260
Igf1p1	Insulin-like growth factor binding protein 1	NM_008341	3.042	Phf1a1	Plectatrin homologs-like domain, family A, member 1	NM_009544	0.360
Arl4d	ADP-ribosylation factor-like 4D	NM_025404	3.028	Me1	Malic enzyme 1, NAD(P)+-dependent, cytosolic	NM_001198953	0.421
Cypl11	Cytochrome P450, family 1, subfamily A, member 11	NM_007818	2.889	Foxo2	Forkhead box A2	NM_010446	0.432
M2	Methallothionein 2	NM_008630	2.702	l6l1	leptonychia-like phosphatase delta isomerase	NM_143360	0.451
Agp2l1	Alanine-glyoxylate aminotransferase 2-like 1	NM_027907	2.645	Csdl	Cysteine sulfinate acyl decarboxylase	NM_144942	0.460
Cypl42b	Cytochrome P450, family 4, subfamily A, member 2	NM_172206	2.171				
Sk25a25	Solute carrier family 25 member 25	NM_146118	2.130				
Z110076L09R1K	None	None	2.125				
Sk29a4	Solute carrier family 29 member 4	NM_022064	2.082				
Fa2	Fatty acid associated factor 2	NM_001113401	2.048				
Spm2L1	RIKEN full-length cDNA library, clone AK391339	AK391339	2.000				

Yamane T et al. FFHD 2016

## 肝臓におけるArrdc3発現変化

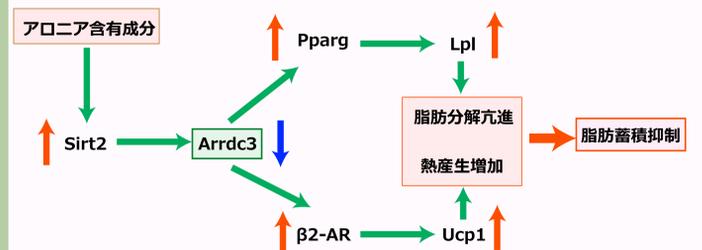


## 白色脂肪組織における遺伝子発現変化



## まとめ

- アロニア果汁を摂取したC57BL/6マウスと糖尿病・肥満モデルであるKKAYの白色脂肪組織において脂肪面積の減少がみられ、肝臓においても脂肪の減少が見られた。
- C57BL/6およびKKAYマウス肝臓におけるArrdc3 mRNA発現はアロニア果汁摂取で減少した。
- アロニア摂取したマウスの白色脂肪組織において、Arrdc3 mRNA発現は減少し、Sirt2およびPparg mRNA発現は増加した。しかし、Ucp1 mRNA発現はC57BL/6マウスのみで、Lpl mRNA発現はKKAYマウスのみで有意に増加した。
- 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、Arrdc3 mRNA発現は減少し、Lpl mRNA発現は増加した。
- 今後、Sirt2発現増加による脱アセチル化の亢進によるArrdc3発現減少およびbARへの結合量減少によるLPL活性の増加について検討する。



# アロニア果汁含有成分によるHMG-CoAレダクダーゼ活性阻害効果

## Inhibition of HMG-CoA reductase activity by component(s) from aronia juice

○小塚美由記<sup>1</sup> 山根拓也<sup>2,3,5</sup> 今井ももこ<sup>2,4,6</sup> 竹中重雄<sup>4</sup> 阪本龍司<sup>2,3</sup> 乾博<sup>2,4</sup> 山本好男<sup>7</sup>  
大久保岩男<sup>8</sup> 中垣剛典<sup>5</sup> 中野長久<sup>2,3</sup>

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)三重大・地域拠点 8)市立三笠総合病院

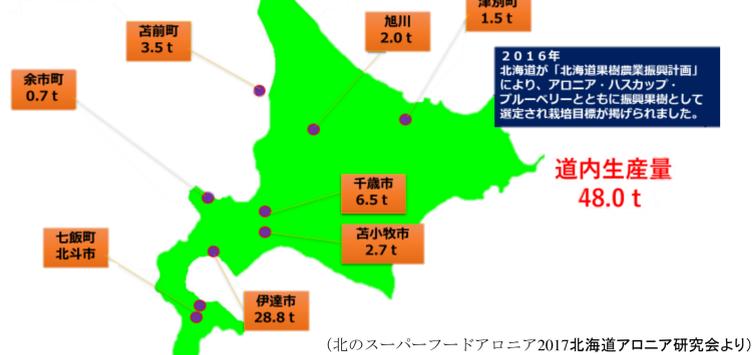
### 目的

アロニアには様々な酵素阻害物質が含まれていることが知られている。アロニア摂取により、血中LDL-コレステロールの減少が報告されているが、そのメカニズムは明らかになっていない。本研究において、アロニア果汁によりHMG-CoAレダクダーゼ活性が阻害されることが明らかとなった。本研究では、HMG-CoAレダクダーゼ活性阻害物質をアロニア果汁中より分画同定することを目的として実験を行った。

### Aronia

分類：バラ目 バラ科 ナシ亜科 アロニア属 学名：Aronia  
和名：アロニア、アローニヤ、セイヨウカマツカ  
英名：Chokeberry, Aronia

主に栽培されている地域



寒さに強い果実のため北海道のような寒冷地での栽培が適している。渋みが強いので、加工用として使用されている割合が高い。

### 特徴的なAronia果汁の栄養成分

成分 (100g中)	アロニア	ブルーベリー
アントシアニン	1480mg	487mg
β-クリプトキサンチン	463μg	0
αカロテン	7.5μg	0
βカロテン	771μg	55μg

アントシアニン：  
ブルーベリーの2~3倍  
β-カロテン：トマトの1.4倍  
食物繊維：バナナの6倍  
豊富な栄養素により様々な健康効果がうたわれるようになったアロニアです。近年、健康果実として広まっています。

参考 基礎栄養学 改訂第2版 奥恒行 南江堂



Sample: aronia juice 提供: 中垣技術士事務所

### 健康効果

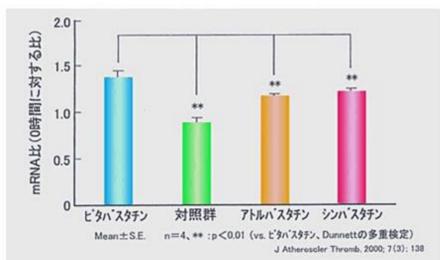
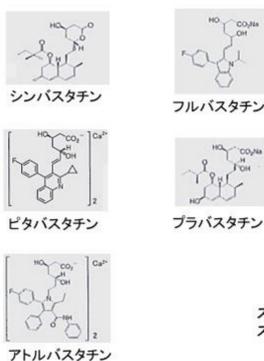
- ◎抗酸化作用
- ◎心臓血管系への効果
- ◎血圧の正常化
- ◎脂質低下作用
- ◎抗糖尿病活性
- ◎抗ガン活性
- ◎神経系への効果
- ◎抗炎症活性・抗菌作用
- ◎胃保護作用

Kokotkiewicz A et al., J Med Food 2010より抜粋  
1) Data from Takenori Nakagaki(Nakagaki Consulting engineer & Co,Ltd)  
\*ND: not detected

### 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>
- 高コレステロール食をアロニアフルーツジュース (75%) と同時にオスのラットに摂取させると、高コレステロール食のみの摂取で起こる血中LDLコレステロールの上昇が抑制される (Valcheva-Kuzmanova et al., Plant Foods for Human Nutr. 2007)。
  - 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)。

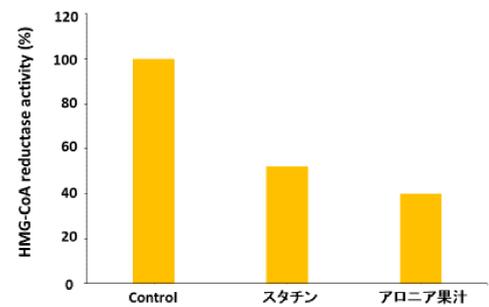
### スタチンの構造とLDL受容体亢進作用



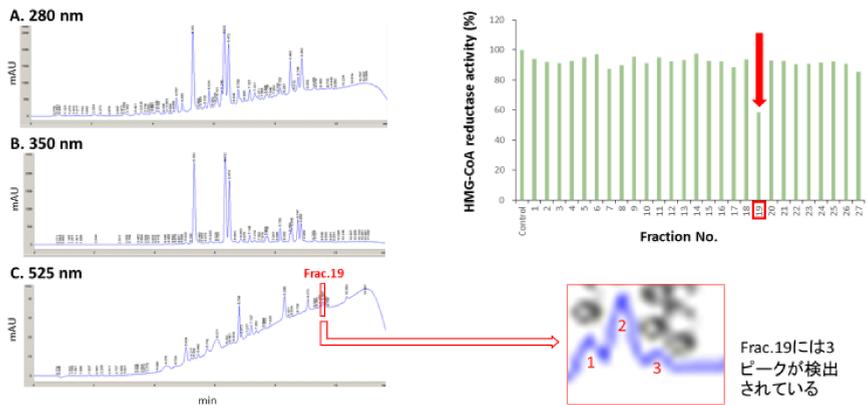
スタチンはHMG-CoA還元酵素を阻害することでコレステロールを減少させる。スタチンの中にはLDL受容体の発現を亢進する作用を持つものがある。

### 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>  
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。  
↓  
Sigma社製HMG-CoA reductase assay kitを用いて反応を行った。  
↓  
340nmの吸収を測定

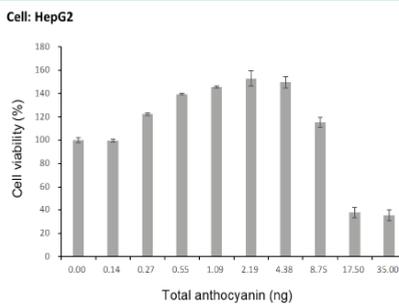


### アロニア果汁中のHMG-CoA還元酵素阻害物質のスクリーニング



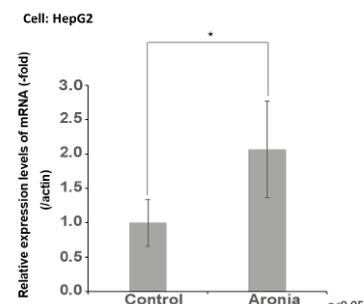
### アロニア果汁添加量の決定

<MTTアッセイ>  
HepG2細胞を96wellプレートに播種し、24時間培養後、アロニア果汁を段階希釈して加え、24時間、37℃、5% CO<sub>2</sub> で反応  
↓  
WST-8を10μlを加え、24時間、37℃、5%CO<sub>2</sub> で反応  
↓  
450nmの吸収を測定

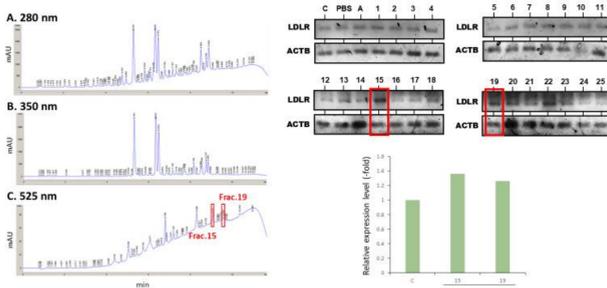


### アロニア果汁添加によるLDL受容体発現の増加

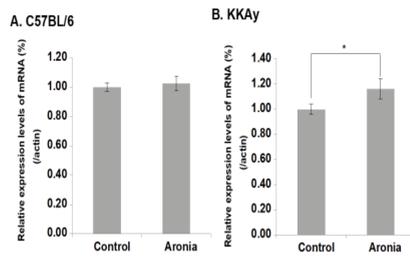
<RT-qPCR>  
HepG2細胞にアロニア果汁を添加し、24時間培養  
↓  
HepG2細胞よりtotal RNAを抽出後、500 ngのtotal RNAを逆転写  
↓  
Real time PCRにて測定



### アロニア果汁中のLDLRmRNA発現抑制物質のスクリーニング

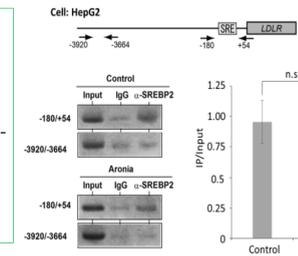


### アロニア摂取によるLDL受容体発現の増加

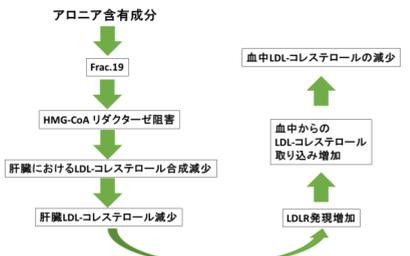


### アロニア果汁添加によるLDL受容体遺伝子発現転写調節

<HMG-CoA Reductaseアッセイ>  
アロニア果汁をHepG2細胞に添加し、24時間培養後、ホルマリンで固定  
↓  
クロマチンを抽出後、1μgの抗SREBP-2抗体を加え、ビーズで沈降  
↓  
PCRにて増幅後、アガロースゲル電気泳動にてバンドを検出



### 分画19によるLDLR発現の増加



### 【結論】

- アロニア果汁中のHMG-CoAレダクダーゼ阻害活性がクロマトグラフィーの分離によって得られた27分画のうち、19番目の分画に含まれる成分により阻害された。
- アロニア果汁摂取による血中LDL-コレステロール上昇抑制作用は、HMG-CoAレダクダーゼ阻害によるLDLR発現増加がメカニズムの一つとして考えられた。