

生理活性脂質合成系をターゲットとした自然薯粉含有食の食品機能性の解析

山本登志子* 田中小百合** 津嘉山泉** 大本安梨紗* 吉尾壯兒*** 川上祐生*
木本眞順美* 高橋吉孝*

要旨 ヤマノイモ科に属する自然薯 (*Dioscorea japonica*) は、含有するムチンによる胃粘膜保護やアミラーゼによる消化促進作用を有することが知られている。また、滋養強壮、老化防止、更年期障害の予防や神経保護作用などを有することが期待されてきたが、これらの機能性については科学的な根拠が十分ではない。本研究では、自然薯の生理活性脂質合成系をターゲットとした食品機能性を探索するために、マウスの自然薯粉含有食経口摂取による血清中ステロイドホルモン濃度の変化と脳内のステロイド合成系酵素ならびにプロスタグランジン (PG) E₂ 合成系酵素の発現動態について解析した。その結果、デヒドロエピアンドロステロン (DHEA) とコルチゾールの血清濃度上昇が認められた。さらに、ステロイド合成系酵素の 17 β -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ (17 β -HSD)、アロマトラーゼ (P450arom)、17 α -ヒドロキシラーゼ (P450c17) と、PGE₂ 合成系酵素のシクロオキシゲナーゼ (COX-1, COX-2) と PGE₂ 合成酵素 (mPGES-1, cPGES) の発現が抑制された。本研究結果より、マウス経口摂取において、自然薯は、DHEA やコルチゾールの上昇、PGE₂ 合成抑制作用を有することが示唆された。これにより、自然薯による神経保護や抗炎症効果が期待される。

キーワード: 自然薯、ステロイド合成系酵素、プロスタグランジン E₂ 合成系酵素

I. 緒言

自然薯は、古くから我が国においても、滋養強壮や老化予防などの効果が期待されている。これまでも、ヤマノイモ科の植物は、喘息、リウマチ性関節炎、気管支炎、腸の攣縮、閉経後障害、月経障害を緩和する民間療法に用いられてきた¹⁻⁷⁾。また、血清中脂質に対する抗酸化作用やアンチエイジングの効果も期待されている⁸⁾。世界各地において、ヤマノイモに属する種は600種類以上あるが、それらのうち少なくとも12種類は食用であり¹⁾、主食あるいは強壯食として広く食されている。ヤマノイモに含まれる植物ステロールの一種であるジオスゲニンは、1950年代には副腎皮質ステロイドと性ステロイドの医薬品製造における主な供給源として使われており⁹⁾、1970年代にはメキシコ政府によるヤマノイモ産業の国営化も施行された³⁾。ヤマノイモあるいはその成分のジオスゲニンには、加齢に伴う性ホル

モン量の変化による更年期症状の緩和効果が期待され、ヤマノイモ中の成分とステロイドホルモン作用との関連が考えられる。

生理活性脂質であるステロイドホルモンは、生体内において、コレステロールの代謝に始まり、様々な酵素の触媒によって生合成される (図1)。産生された種々のステロイドホルモンは、標的細胞あるいは臓器に存在する特異的な受容体に作用して、それぞれ異なる強力な生理作用を示す。性ステロイド合成系の合成産物であるテストステロンやエストロゲンは、雌雄の性徴をはじめとする恒常性の維持に重要であるが、加齢とともに減少し、それに伴い更年期障害が現れる。テストステロンやエストロゲン合成系の中間代謝産物の一つであるDHEAとその硫酸エステル (DHEAS) は生体内で豊富に存在するステロイドホルモンであるが、それらの分泌量は思春期にピークに達した後、加齢とともに減少する。

* 岡山県立大学保健福祉学部栄養学科

** 岡山県立大学保健福祉学研究科

*** (有)オート来夢ヨシオ

〒719-1197 岡山県総社市窪木111

〒719-1197 岡山県総社市窪木111

〒718-0306 岡山県阿哲郡哲多町矢戸2868-1

表 1. 定量 RT-PCR 用プローブ

酵素 (遺伝子名)	プライマーシーケンス
COX-1 (<i>Ptgs1</i>)	
sense	5'-CTTTGCACAACACTTCAACCCACC-3'
antisense	5'-AGCAACCCAAACACCTCCTGG-3'
COX-2 (<i>Ptgs2</i>)	
sense	5'-GCATTCTTTGCCAGCACTT-3'
antisense	5'-AGACCAGGCACCAGACCAAAGA-3'
mPGES-1 (<i>Ptgs1</i>)	
sense	5'-CTGCTGGTCATCAAGATGTACG-3'
antisense	5'-CCCAGGTAGGCCACGTGTGT-3'
mPGES-2 (<i>Ptgs2</i>)	
sense	5'-AAGACATGTCCCTTCTGC-3'
antisense	5'-CCAAGATGGGCACCTTCC-3'
cPGES (<i>Ptgs3</i>)	
sense	5'-AGTCATGGCCTAGGTTAAC-3'
antisense	5'-TGTGAATCATCATCTGTCC-3'
17βHSD-2 (<i>Hsd17b2</i>)	
sense	5'-ACGTCCATACACAGAAGCTC-3'
antisense	5'-TAGTCAAGTAAGCTGGTGGG-3'
P450c17 (<i>Cyp17a1</i>)	
sense	5'-GGCTTTCCTGGTGACAATC-3'
antisense	5'-GGAGGTGAGTCCGGTCATTGAA-3'
P450arom (<i>Cyp19a1</i>)	
sense	5'-CTGCAGACACTACTACTACA-3'
antisense	5'-ATCCGAGTCACTGCTCTCAG-3'
GAPDH (<i>Gapdh</i>)	
sense	5'-TGAACGGGAAGCTCACTGG-3'
antisense	5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'

4. 血清中ステロイド測定

マウスの尾静脈あるいは心臓採血より血液を採取し、2000×rpm上清を用いて血清中のステロイド濃度を酵素免疫法 (EIA) によって測定した。酵素免疫法では、Cortisol EIA Kit、Teststerone EIA Kit、Estradiol EIA Kit (Cayman Chemical Co. MI)、DHEA EIA Kit (ENZO Life Sciences Inc., NY) の各キットを用いて測定した。

Ⅲ. 結果

1. 摂食量および体重の変化

マウスの自然薯粉含有餌摂食による摂食量および体重の経時変化を測定した (図3)。普通食 (コントロール食群) と10%自然薯粉含有食 (自然薯粉含有食群) を自由摂食させたマウスにおいて、各群ともに1日の摂取量は約3-4gであり、実験期間を通じて両群間に有意な差は認められなかった。経時的な体重測定を行ったところ、実験開始 (6週齢) より70日後の平均体重増加は、コントロール食群で6.5g、自然薯粉含有食群で4.8gであった。体重増加において、自然薯粉含有食群でやや増加抑制傾向がみられたものの有意差はなく、摂食量と体重の経時変化については、両群間に差は認められなかった。

2. ステロイド合成系酵素遺伝子の発現動態

マウス脳内では、神経ステロイドとして、少なく

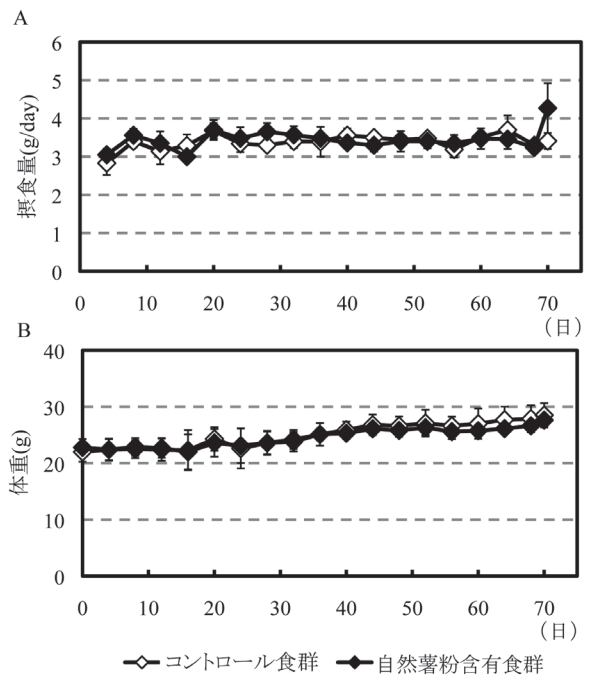


図 3. 摂食量 (A) および体重 (B) の経時変化

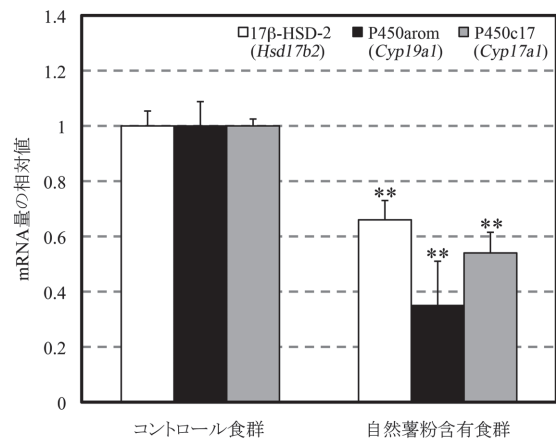


図 4. ステロイド合成系酵素遺伝子発現動態

コントロール食群を1とした場合の各遺伝子発現量を相対値でグラフに示す。コントロールと比較した有意差 ** $P < 0.01$ 。

とも図1に示す一連の酵素が存在し、末梢組織のステロイド合成系とは非依存的な合成系を有することがわかっている。本研究では、自然薯の図1に示すようなステロイド合成系におよぼす影響と、自然薯の経口摂取による脳内への作用を有するか否かを検討するために、マウス脳のRNAを単離し遺伝子発現動態を解析した。マウス脳におけるステロイド合成系酵素のうち、17β-HSD-2、P450arom、P450c17のmRNA発現量は、自然薯粉含有食群でそれぞれ66%、35%、54%まで有意に抑制された (図4)。

表 2. 血清中各種ステロイドホルモン濃度

steroid hormones	0日	70日後	
		コントロール食群	自然薯粉含有食群
Estradiol	13.53 ± 8.21	16.91 ± 2.58	16.48 ± 6.28
Testosterone	5965.00 ± 264.84	147.95 ± 17.20 ^{a)}	107.49 ± 36.48 ^{b)}
DHEA	73.58 ± 46.87	275.00 ± 152.07	1948.62 ± 1773.42
Cortisol	480.10 ± 166.69	777.45 ± 18.45 ^{a)}	1278.80 ± 265.71 ^{a),b)}

^{a)}0日と比較した有意差 $P<0.05$ 、^{b)}70日後のコントロール食群と比較した有意差 $P<0.05$ 。

3. 血清中ステロイド濃度の変化

実験開始を0日として、開始日と70日後のマウス血清を採取し、血清中のエストラジオール、テストステロン、DHEAとコルチゾールの濃度を酵素免疫法で測定した(表2)。血清中のエストラジオール濃度は、コントロール食群と自然薯粉含有食群との間に有意な差は認められなかったが、テストステロン濃度は、自然薯粉含有食群で有意に低下した。テストステロン合成の上流にある中間代謝産物のDHEAは標準偏差のばらつきが大きく、有意差は認められないものの、自然薯粉含有食群で平均約7倍の上昇傾向を示した。さらに、コルチゾールは、自然薯粉含有食群で1.6倍有意に上昇した。なお、テストステロンの分泌量は70日後(16週齢)で実験開始0日(6週齢)より著しい減少を見せたが、これは、実験開始の週齢における雄マウスの第二次性徴期のテストステロン分泌上昇によるもので、正常な成熟過程における変化である。

4. PGE₂合成系遺伝子の発現動態

PGE₂は、炎症の惹起に関わる生理活性脂質である。図2に示すPGE₂合成系に属する一連の関連酵素のうち、COX-2と膜結合型PGE₂合成酵素(mPGES)-1は、腎臓以外の末梢組織においては恒常的には発現せず、炎症などの病態時に誘導される酵素である。しかしながら、脳内においてはこれら誘導型酵素を含めたPGE₂合成に関わる酵素が恒常的に発現している。よって、PGE₂合成系酵素遺伝子の発現に対する自然薯の影響を検討するためにマウス脳を用いて解析した。自然薯粉含有食群のマウスの脳では、mPGES-2を除く全てのPGE₂合成系酵素遺伝子の発現が60%以下に抑制された(図5)。

IV. 考察

生体内で合成される各種ステロイドホルモンは、恒常性の維持のみならず、炎症反応の抑制や様々な疾病予防、神経保護、アンチエイジングなどに寄与すると考えられている。しかしながら、加齢に伴うステロイドホルモンの分泌量の低下が種々の障害を導くことが知られている。ステロイドホルモンの分泌を適正に制御し維持することは、遺伝子疾患以外の、更年期にみられる各種障害や慢性疾患を含めた様々な病態の予防に有効であると考えられる。そこで、本研究では、滋養強壮や更年期障害、ある種のステロイドホルモン分泌に関与すると考えられる自然薯のステロイドホルモン分泌や合成系への関与について明らかにするために、マウスへの自然薯粉含有餌の投与による影響を解析した。

図4に示すように、自然薯粉含有食群でステロイド合成系酵素のいくつかの酵素遺伝子の発現抑制が認められた。これにより、自然薯摂取はステロイドホルモン合成に影響をおよぼすことが示唆され

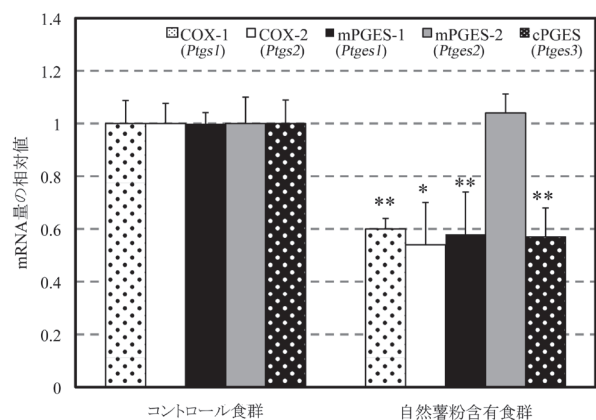


図 5. PGE₂合成系酵素遺伝子の発現動態

コントロール食群を1とした場合の各遺伝子発現量を相対値でグラフに示す。コントロールと比較した有意差 $*P<0.05$ 、 $**P<0.01$ 。

た。表2に示すように、血清中のテストステロン濃度が有意に減少した一方で、その代謝系の上流にある中間代謝産物のDHEAの血清濃度は上昇傾向を示した。これらの結果より、自然薯摂取は、ステロイド合成系の発現を調節することでDHEA量を上昇させ、抗酸化作用や神経保護作用を含めた様々な病態の予防効果をもたらすことが示唆される。また、糖質コルチコイド合成系の合成産物であるコルチゾールの血清濃度は、自然薯粉含有食群で有意な上昇を示し（表2）、自然薯が抗炎症効果を有する可能性が示唆された。

自然薯の抗炎症効果については、別の因子として、炎症惹起に関わるPGE₂合成系酵素の発現動態におよぼす影響を解析した。その結果、自然薯の経口摂取によってmPGES-2以外のPGE₂合成系酵素の発現を抑制し、PGE₂産生抑制に働くことが示唆された（図5）。これまでに、自然薯抽出物による癌モデル細胞のヒト非小細胞肺癌A549細胞や大腸癌Caco-2細胞における誘導型のCOX-2とmPGES-1の発現抑制とそれによる抗腫瘍効果を見いだしている¹²⁾。また、炎症モデル細胞のRAW264細胞においても、自然薯のこれら酵素の発現抑制と抗炎症効果を示した¹³⁾。食品成分によるCOX-2発現抑制については、レスベラトロール¹⁴⁾、フムロン¹⁵⁾、クリシン¹⁶⁾の効果が報告されている。しかしながら、PGESへの効果についての報告はほとんどない。また、これまでに報告されているいずれの実験も、培養細胞を用いた結果であり、本研究のように動物への経口摂取によるPGE₂合成系をターゲットとした食品機能性を示す結果は全く新規なものである。

今回報告した動物実験の結果は、自然薯の経口摂取が、いくつかのステロイド合成系酵素と、少なくともmPGES-2を除くPGE₂合成系酵素の発現を調節することを示した。また、経口摂取による中枢神経系への効果も認められ、DHEAやDHEASの神経保護作用^{8) 10) 11)}の増強と、PGE₂が関与する神経変性疾患^{17) 18) 19)}に対する自然薯の予防効果が期待される。

PGE₂は、アルツハイマー病やパーキンソン病などの多くの神経疾患に関与することが報告されている。様々な病態に広く臨床応用されているCOX阻害合成薬の非ステロイド性抗炎症薬(NSAIDs)のうち、COX-2の選択的阻害剤が抗腫瘍薬あるいはアルツハイマー予防薬として期待されてきた。しかしながら、心血管系障害などの重篤な副作用²⁰⁾が報告されてお

り、現在では、副作用のない天然物由来のPGE₂合成抑制を有する機能性成分が注目されている。特に、終末PGE₂合成酵素を標的とした治療薬や食品機能性についてはほとんど報告がなく、今回の研究結果は非常に興味深いものである。

本研究結果によって、*in vivo*経口摂取の実験系において、自然薯のステロイド産生調節ならびにPGE₂合成抑制が示されたことによって、末梢組織および中枢神経系での抗炎症や神経保護作用による慢性疾患や更年期障害の予防効果を有する自然薯の食品機能性が期待される。

謝辞

本研究の遂行にあたり、コーディネイトならびにご助言いただきました岡山県立大学地域共同研究機構の小林東夫氏に心より感謝いたします。

文献

- 1) Chong-Suk KWON, Ho Yong SOHN, Sung Hee KIM, Ji Hyun, Kun Ho SON, Jeong Soon LEE, Jin Kyu LIM, Jong-Sang KIM (2003) Anti-obesity Effect of *Dioscorea nipponica* Makino with Lipase inhibitory Activity in Rodents. *Biosci Biotechnol. Biochem.*, 67 (7) : 1451-1456.
- 2) Briggs CJ (1990) Herbal medicine : *Dioscorea* : The yams - A traditional source of food and drugs. *Can. Pharm. J.*, 123 : 413-415.
- 3) Rosser A (1985) The day of the yam. *Nurs. Times*. 81 : 47.
- 4) Mirkin G (1991) Estrogen in yams. *J. Am. Med. Assoc.* 265 : 912.
- 5) Dentali S (1996) Clearing up confusion over yams and progesterone. *Altern. Ther. Health. Med.* 2 : 19-20.
- 6) Taffe AM, Cauffield J (1998) "Natural" hormone replacement therapy and dietary supplements used in the treatment of menopausal symptoms. *Lippincott's Prim Care Pract.* 2 : 292-302.
- 7) Moyad MA (2002) Complementary/alternative therapies for reducing hot flashes in prostate cancer patients : reevaluating the existing indirect data from studies of breast cancer and postmenopausal women. *Urology* 59 : 20-33.

- 8) Araghiniknam M, Chung S, Nelson-White T, Eskelson C, Watson RR. (1996) Antioxidant activity of dioscorea and dehydroepiandrosterone (DHEA) in older humans. *Life Sci.* 59 (11) : PL147-157.
- 9) Wu WH, Liu LY, Chung CJ, Jou HJ, Wang TA (2005) Estrogenic effect of yam ingestion in healthy postmenopausal women. *J. Am. Coll. Nutr.* 24 (4) : 235-243.
- 10) Lapchak PA, Araujo DM (2001) Preclinical development of neurosteroids as neuroprotective agents for the treatment of neurodegenerative diseases. *Int. Rev. Neurobiol.* 46 : 379-397.
- 11) Wolf OT, Kirschbaum C (1999) Actions of dehydroepiandrosterone and its sulfate in the central nervous system : effects on cognition and emotion in animals and humans. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 30 (3) : 264-288.
- 12) Suzuki-Yamamoto T, Tanaka S, Tsukayama I, Takafuji M, Hanada T, Arakawa T, Kawakami Y, Takahashi Y Dioscorea japonica extract suppresses the expression of cyclooxygenase-2 and microsomal prostaglandin E synthase-1 and induces apoptosis in lung cancer cells. submitted.
- 13) Tsukayama I, Takafuji M, Tanaka S, Kawakami Y, Takahashi Y, Suzuki-Yamamoto T (2013) Dioscorea japonica extract suppresses the expression of the related enzymes synthesizing lipid mediator prostaglandin E₂. *Ann. Nutr. Metab.* 63 (suppl1) : 1597.
- 14) Subbaramaiah K, Chung WJ, Michaluart P, Telang N, Tanabe T, Inoue H, Jang M, Pezzuto JM, Dannenberg AJ (1998) Resveratrol Inhibits Cyclooxygenase-2 Transcription and Activity in Phorbol Ester-treated Human Mammary Epithelial Cells. *J. Biol. Chem.* 273 (34) : 21875-21882.
- 15) Yamamoto K, Wang J, Yamamoto S, Tobe H (2000) Suppression of cyclooxygenase-2 gene transcription by humulon of beer hop extract studied with reference to glucocorticoid. *FEBS Lett.* 465 (2-3) : 103-106.
- 16) Ha SK, Moon E, Kim SY (2010) Chrysin suppresses LPS-stimulated proinflammatory responses by blocking NF- κ B and JNK activations in microglia cells. *Neurosci. Lett.* 485 (3) : 143-7.
- 17) Wu T, Wu H, Wang J, Wang J (2011) Expression and cellular localization of cyclooxygenases and prostaglandin E synthases in the hemorrhagic brain. *J. Neuroinflammation.* 8 : 22.
- 18) Weggen S, Eriksen JL, Das P, Sagi SA, Wang R, Pietrzik CU, Findlay KA, Smith TE, Murphy MP, Bulter T, Kang DE, Marquez-Sterling N, Golde TE, Koo EH (2001) A subset of NSAIDs lower amyloidogenic A β independently of cyclooxygenase activity. *Nature.* 414 (6860) : 212-216.
- 19) Cimino PJ, Keene CD, Breyer RM, Montine KS, Montine TJ (2008) Therapeutic targets in prostaglandin E₂ signaling for neurologic disease. *Curr. Med. Chem.* 15 (19) : 1863-1869.
- 20) Ng SC, Chan FK. (2010) NSAID-induced gastrointestinal and cardiovascular injury. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 26, 611-617.

Food functionality of the diet containing *Dioscorea japonica* powder targeting bioactive lipid synthesis pathway

TOSHIKO SUZUKI-YAMAMOTO*, SAYURI TANAKA**,
IZUMI TSUKAYAMA**, ARISA OHMOTO*, SOJI YOSHIO***,
YUKI KAWAKAMI*, MASUMI KIMOTO*, YOSHITAKA TAKAHASHI*

*Department of Nutritional Science, Okayama Prefectural University, Soja, 719-1197, Japan.

**Graduate School of Health and Welfare Science, Okayama Prefectural University, Soja, 719-1197, Japan.

***Aitoraimu Yoshio Co. Ltd., Niimi, 718-0306, Japan.

Abstract

Dioscorea japonica is one of wild yams and is a relative of the Dioscoreaceae family. For many years, it is believed that *Dioscorea japonica* is good for a nutritional fortification and has some effects of gastric mucosal protection, digestive enhancement and so on. In some areas, the wild yam has been used as folk medicine against asthma, rheumatoid arthritis, bronchitis, and other diseases. However, the detailed physiological effects of the yam have not been clear. In the present study, we focus on the functional effects of *Dioscorea japonica* on bioactive lipid synthesizing enzymes. The diet containing 10%(W/W) *Dioscorea japonica* powder was orally ingested to the mouse. *Dioscorea japonica* increased the concentration of dehydroepiandrosterone and cortisol in the mouse serum. *Dioscorea japonica* suppressed mRNA expression of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase, aromatase and 17 α -hydroxylase/17,20-lyase in steroid synthesis pathway, and that of COX-1, COX-2, mPGES-1 and cPGES in prostaglandin E₂ synthesis pathway in the mouse brain. Thus *Dioscorea japonica* may have a role in neuroprotection and anti-inflammation via the regulation of bioactive lipid synthesis in the mouse.

Keywords : *Dioscorea japonica*, steroid synthesizing enzymes, prostaglandin E₂ synthesizing enzymes