

ATP 産生に対するかき肉エキスの影響

石田 達也, 松田 芳和, 松田 桂, 松井 博之

(日本クリニック株式会社中央研究所)

(受付 2023 年 8 月 31 日, 受理 2023 年 9 月 28 日)

Effect of oyster extract on ATP production

Tatsuya ISHIDA, Yoshikazu MATSUDA, Katsura MATSUDA, Hiroyuki MATSUI

Central Research Institute, Japan Clinic Co., Ltd.

Summary

To examine the effects of oyster extract (OE) on ATP production in a human hepatocytes, Hep-G2 cell was cultured in Dulbecco's modified Eagle's basal medium or the basal medium containing OE. The added OE enhanced ATP production in the human hepatocytes. To examine the effect of OE on ATP production in mouse skeletal muscle and activity of mitochondria, female 9-week-old C57BL/6N mice were divided into two groups and fed AIN-93G basal diet or the basal diet containing 2% (w/w) OE for 7 days. Muscle of the OE-fed mice had significantly higher ATP production and citrate synthase activity than non-OE-fed mice. These results indicate that the OE enhanced the mitochondria activity and production of ATP in the muscle and led a possibility that OE has fatigue-relieving properties.

最近の疫学調査によると、日本人の約 6 割が日常生活の中で疲労を自覚しており、1/3 以上の人が半年以上持続する慢性的な疲労状況に陥っていることが報告されている¹⁾。疲労には肉体的疲労と精神的疲労があり、それらの発生にはエネルギー源である ATP 産生不足が大きく関係している²⁾。ATP は生体における高エネルギー化合物であり、筋肉の収縮やタンパク質などの高分子物質の生合成などにエネルギーを供給している³⁾。ATP は細胞内小器官であるミトコンドリアで産生されている。しかしながら、加齢または運動不足が続くことなどでミトコンドリアの減少や活性が低下すると、ATP 産生能力が不足する。その結果、疲れやすくなり、運動機能や各臓器の機能が衰える。その為、疲労防止にはミトコンドリアの増殖および活性化による ATP の産生亢進が重要である。

海のミルクと呼ばれる牡蠣は、亜鉛、タウリン、グリコーゲンなど豊富な栄養素を含んでおり、昔から健康維持に寄与してきた食物である。この牡蠣から抽出したかき肉エキスには、肝臓保護作用⁴⁾、抗不安作用⁵⁾など多くの健康機能が報告がされている。また、かき肉エキスの飲用者からは、「疲労回復が早くなった」、「疲れを感じにくく、朝の目覚めが良くなった」などといった疲労回復効果が報告されている。しかしながら、かき肉エキスが及ぼす疲労回復のメカニズムについては依然として不明な点が多い。

そこで、本研究ではエネルギー源である ATP の産生および ATP 産生細胞小器官であるミトコンドリア活性に対するかき肉エキスの影響について細胞およびマウスを用いて検証することとした。

実験方法

1. かき肉エキス

かき肉エキスは、日本クリニック株式会社製を用いた。かき肉エキスの一般成分組成を Table 1 に示した。

2. 細胞実験

実験セルバンクから購入した凍結ヒト肝癌由来細胞株

Table 1 Composition of the oyster extract.

Carbohydrate	50.0
Glycogen	34.1
Crude protein	28.3
Taurine	5.4
Lipid	2.0
Ash	15.8
Water	3.9

Oyster-extract was provided by Japan Clinic Co., Ltd (Kyoto, Japan).

Composition per 100 g of oyster extract.

(Hep-G2 細胞) を解凍後, 10% ウシ胎児血清および抗生物質 1% を含む DMEM 培地 (Dulbecco's modified Eagle's medium) を用いて 37°C, 5% CO₂ インキュベーターで培養し増殖させた。その後, 各 well に 2.0 × 10⁴ cells の細胞数となるように, 100 μL ずつ 96 ウェルプレートに播種して一晩培養した。その後, 上清培地を取り除き, 0, 100, 200, 300, 400, 500 μg/mL のかき肉エキスを 100 μL ずつ添加し, well 内の最終濃度を 0, 50, 100, 150, 200, 250 μg/mL となるよう調整した。3 時間のインキュベート後, 「細胞の」ATP 測定試薬 (東洋ビーネット・東京) を 100 μL 加えた後, 発光光度計 (Bio Tek・USA) にて ATP 産生量を測定した (各群の n 数は 6)。ATP 産生率は, かき肉エキスを加えない場合の値を 100% とした場合の相対値として算出した。

3. 動物実験

本実験は日本クリニック株式会社の動物実験委員会の承認を受けて実施した (承認番号: 47002)。

8 週齢雌性 C57BL/6N マウス (清水実験材料株式会社) 14 頭を 7 日間の馴化後, 平均体重が同等になるように 2 群に分けた。1 群 (対照群) には AIN-93G 餌料, もう 1 群 (OE 群) には AIN-93G 餌料にかき肉エキスを 2% (w/w) 添加したものを 7 日間投与した。マウスは室温 24°C ± 2°C, 明暗 12 時間サイクル (6:00 ~ 18:00) の条件下で飼育した。実験餌料および水は自由摂取とした。直前までの食餌の影響をなくするため, 24 時間の絶食を経たのち, メドトミジン, ミダゾラム, プトルファノールを混合した三種混合麻酔薬による深麻酔下で放血致死後に, 大腿四頭筋, 腓腹筋, 肝臓を採取した。採取した組織は液体窒素にて急速凍結し, -80°C で保管した。

採取した腓腹筋 10 mg および肝臓 50 mg を取り, 20 倍量の滅菌水を入れ, バイオマッシャー I (ニッピ・東京) を使用してホモジナイズした。遠心 (10,000 × g, 30 sec) 後, 上清 100 μL を採取し, 等量の「組織の」ATP 測定試薬 (東洋ビーネット・東京) を加えた後, 発光光度計にて ATP を測定した。ATP 量は対照群の値の平均値を 100% とした相対値として算出した。

採取した大腿四頭筋, 腓腹筋, 肝臓のそれぞれ 50 mg に, 20 倍量の homogenate buffer を入れ, 氷上にてホモジナイズした (IKA, T10 basic ULTRA-TURRAX[®])。上記緩衝液を加えてホモジネートのタンパク質濃度を 3 μg/100 μL に統一し, クエン酸合成酵素活性を Sreer の方法⁶⁾を参考にして以下の方法で測定した: ホモジネート 100 μL に 0.2% Triton X を含むトリス塩酸緩衝液 (200 mM, pH8.0) を 500 μL, 1 mM の 5,5'-ジチオビス (2-ニトロ安息香酸) を 100 μL, 10 mM の acetyl CoA を 30 μL, 蒸留水を 220 μL を加え, この混合液に 10 mM のオキサロ酢酸を 50 μL 添加し, 412 nm の吸光度変化を測定した。クエン酸合成酵素活性は対照群の値の平均値を 100% とした相対値として算出した。

4. 統計処理

細胞実験では一元配置分散分析と Dunnett の多重比較を用いて, かき肉エキス未添加を対照とし, かき肉エキス添加の場合との差を比較した。動物実験では Student's t-test 検定を用いて群間の差を比較した。有意水準は $p < 0.05$ とした。統計解析は GraphPad Prism ver. 7.0d (GraphPad Software, California, USA) を用いて行った。

結果と考察

Fig. 1 に肝細胞におけるかき肉エキス投与後の ATP 量の変化を示した。かき肉エキスの終濃度 250 μg/mL において, 対照群と比較して, 有意な ATP 量の増加が確認された。

動物実験において, 初体重と終体重および解剖時の組織重量は, 群間で有意差は見られなかった。Fig. 2 に, 対照群と OE 群のマウスの腓腹筋 (Fig. 2 A), および肝臓 (Fig. 2 B) の ATP 量を示した。腓腹筋において, かき肉エキス群は対照群と比較して有意な ATP 量の増加が確認された。

Fig. 3 に, 対照群と OE 群のマウス大腿四頭筋 (Fig. 3 A), 腓腹筋 (Fig. 3 B), および肝臓 (Fig. 3 C) のクエン酸合成酵素活性を示した。かき肉エキスの投与によって, マウス大腿四頭筋のクエン酸合成酵素活性は有意に増加していた。また, 腓腹筋においても有意ではないが活性上昇の傾向が確認された。

肝細胞の培養液にかき肉エキスを添加したことによる ATP 増加の原因としては, ①エキス成分がエネルギー代謝を活発化したこと, ②エキス中のグリコーゲンがエネルギー源として利用された分だけ ATP 産生が増加したこと のいずれかであると考えられた。しかし, 動物実験におけるかき肉エキス投与群の筋肉において, 筋肉細胞のミトコンドリア活性の指標であるクエン酸合成酵素活性と ATP 量が増加していたことから, ①の可能性, すなわち, かき肉エキスの成分にエネルギー代謝を亢進する成分が含まれ

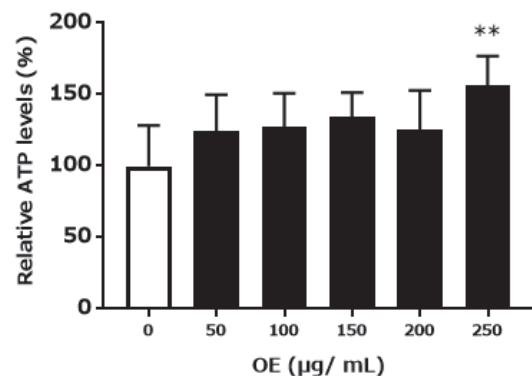


Fig. 1 Effect of OE on ATP levels in hepatocytes
Box height and vertical bars represent mean and SD (n=6), respectively.
**, Significant difference ($p < 0.01$) was observed when compared to no OE added.

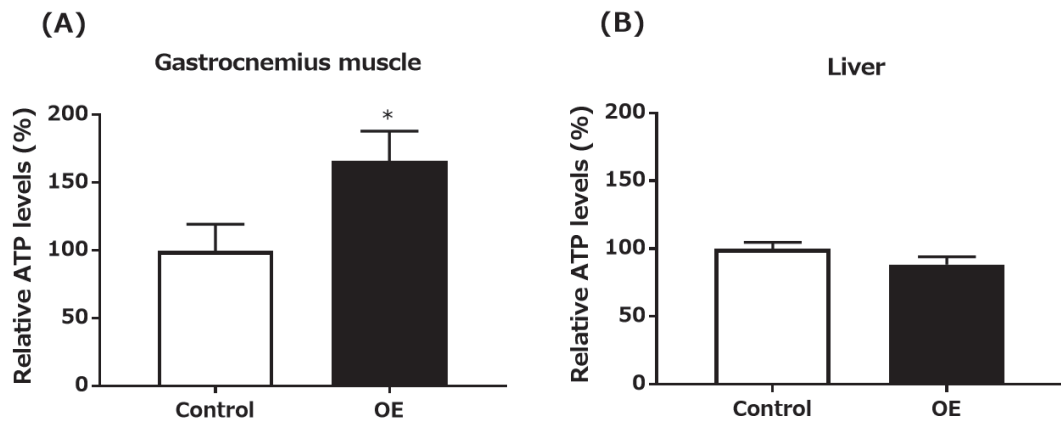


Fig. 2 ATP level in gastrocnemius muscle (A) and liver (B) of mouse
 Box height and vertical bars represent mean and SEM (n=7), respectively.
 *, Significant differences ($p < 0.05$) are observed between the control and OE groups.

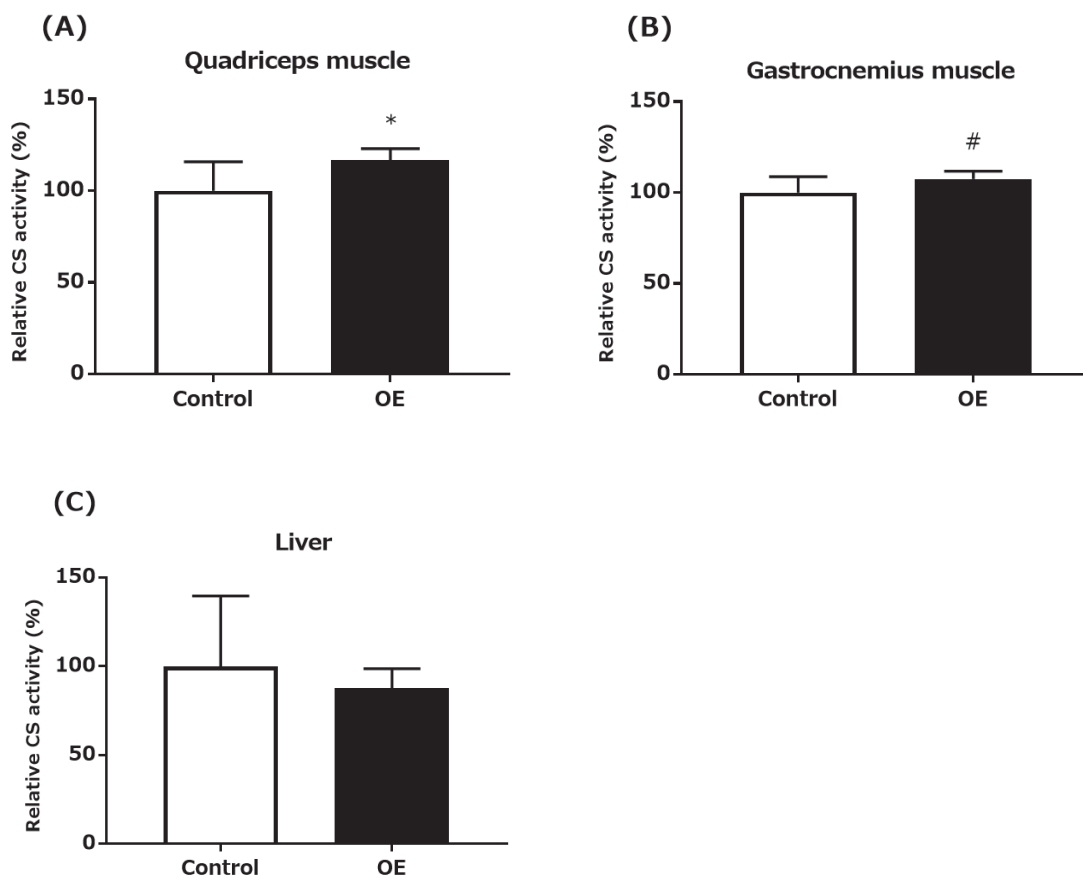


Fig. 3 Citrate synthase activity in quadriceps muscle (A), gastrocnemius muscle (B) and liver (C) of mouse
 Box height and vertical bars represent mean and SEM (n=7), respectively.
 *, Significant differences ($p < 0.05$) are observed between the control and OE groups.

ている可能性が高いと考えられる。エネルギー代謝を亢進するかき肉エキス中の成分は不明であるが、かき肉エキスにはタウリンが含まれており、タウリンは疲労との関係がいくつか報告されている。タウリン枯渇食供与ネコにおいては、肝臓におけるタウリン修飾ミトコンドリア-tRNA量が顕著に減少し、ミトコンドリア活性 (Cytochrome c) の低下、ミトコンドリア内膜上やマトリックス内のタンパク質発現 (COX IV, MTO1, OPA1 など) も有意に減少し、

ミトコンドリア機能が低下することが報告されている⁷⁾。一方、タウリントランスポーターノックアウト (TauTKO) マウスにおいては、心筋および骨格筋のタウリン含有量が減少しており、筋細胞サイズの縮小および骨格筋重量の減少などの筋萎縮の症状が見られ、さらには、トレッドミル耐久走行時間の低下も報告されている⁸⁾。このことからタウリンはエネルギー代謝の調節における重要な役割を担っていることが示唆される。

以上, 本研究をまとめると, かき肉エキスにはミトコンドリア活性の向上および ATP 産生を促進する機能があることから, 肉体・精神ストレスによる疲労予防および疲労回復に寄与している可能性が示唆される。

文 献

- 1) 倉垣弘彦, 渡辺恭良 (2018) 国民的課題として取り組む疲労研究 - 客観的疲労の評価法 -, 臨床検査学教育 10 : 1-8.
- 2) 南谷晴之 (1997) 疲労とストレス, バイオメカニズム会誌 21: 58-64.
- 3) Huang J, Tagawa T, Ma S, Suzuki K (2022) Black ginger (*Kaempferia parviflora*) extract enhances endurance capacity by improving energy metabolism and substrate utilization in mice. *Nutrients* 14 : 3845.
- 4) 福田 卓, 春松 禎, 松井博之, 松田芳和 (2015) かき肉エキスは非アルコール性脂肪性肝疾患モデルマウスにおける脂肪蓄積を低減する. *微量栄養素研究* 32 : 4-10.
- 5) 増澤 徹, 松井博之, 松田芳和, 朝戸めぐみ, 池田弘子, 亀井淳三 (2012) マウスを用いたかき抽出物含有食品の抗不安作用に関する評価. *微量栄養素研究* 29 : 7-12.
- 6) Srere PA (1969) Citrate synthase. *Methods Enzymol* 13 : 3-5.
- 7) 宮崎照雄 (2020) タウリン欠乏によるミトコンドリア tRNA 修飾不全が肝コレステロール代謝に及ぼす影響. *タウリンリサーチ* 6 : 54-56.
- 8) Ito T, Yoshikawa N, Ito H, Schaffer SW (2015) Impact of taurine depletion on glucose control and insulin secretion in mice. *J Pharmacol Sci* 129 : 59-64.