カカオ苦味成分であるテオブロミンの脂肪細胞の褐色化誘導効果

三谷　塁一
（信州大学農学部生命機能科学コース 助教）

【はじめに】

カカオマスには複数のヘルスベネフィット効果を持つことが報告されている。中でもポリフェノールに分類されるカテキン類やプロシアニジン類といったフラバン-3-オールが健康増進に資する主要な活性成分であるとされている[1,2]。一方で、カカオマスには苦味成分であるテオブロミン（TB）も多く含まれている。カカオマス100 g中の総ポリフェフェノール含量は約3.6 gなのに対して、TBは単独で1.3 gも含まれおり、カカオマスの主要成分であるとも言える[3]。さらに、メチルキサンチン化合物であるTBは、フラバン-3-オールを含むポリフェノール類と異なり肝臓での抱合化反応を受けないことから、生理活性を維持した状態で血中に存在すると考えられる。しかしながら、TBの生理機能については、未だ充分に解明できていない部分も多い。私達は肥満予防を対照した以前の研究において、TB摂取が内臓脂肪組織重量の増加を抑制することを見出している[4]。本研究では肥満予防について、これまでとは違った切り口から解析することでTBの新たな効能を開発することを目的とした。

【脂肪細胞の褐色化】

肥満は、脂肪細胞数の増加と過度な脂質蓄積によって引き起こされることから、これまで肥満の予防策として脂肪細胞数を減らすことに焦点が当てられてきた。しかし、脂肪細胞には性ホルモンや摂食ホルモンなど生命活動に必要な物質を生成する機能を持つことから、脂肪細胞数を減らすこ

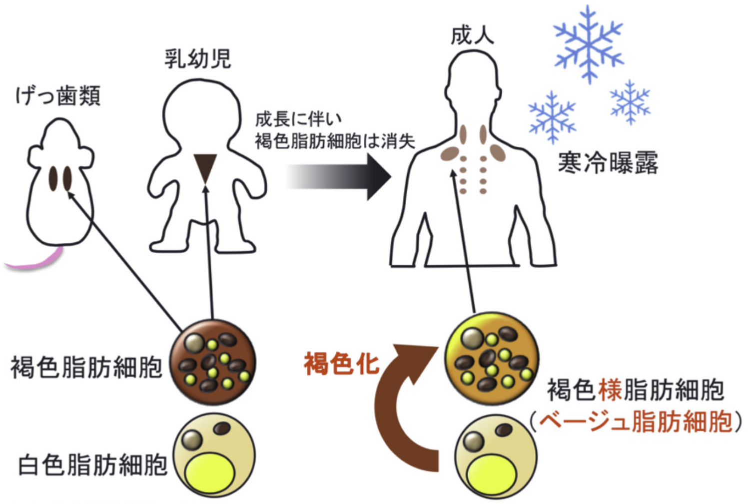

図1. 白色脂肪細胞の褐色化
褐色脂肪細胞は小型のげっ歯類や乳幼児で多く存在するものの、成長に伴い減少する。しかし、成人でも寒冷曝露により肩甲骨付近で褐色脂肪細胞と類似の機能を持つベージュ脂肪細胞が誘導される。

とはホルモンバランスの不調をきたすリスクがある。そこで､脂肪細胞の「量的変化」ではなく「質的変化」による肥満予防が注目されている。脂肪細胞には、エネルギーを中性脂肪として蓄積する「白色脂肪細胞」と中性脂肪を熱エネルギーとして散逸する「褐色脂肪細胞」が存在する[5]。褐色脂肪細胞は乳幼児の肩甲骨付近に存在することで、体温の維持に寄与している。しかしながら、成長に伴い筋肉が発達する、筋肉での熱産生が可能となり褐色脂肪細胞数は著しく減少する。従って、成人では褐色脂肪細胞数を増やすことは難しいと考えられる。しかし近年、寒冷暴露や一部の食品成分の摂取によって白色脂肪細胞が褐色様脂肪細胞（ベージュ脂肪細胞）に変化する現象（褐色化）が発見された（図1）。ベージュ脂肪細胞は褐色脂肪細胞と類似した機能を持ち、細胞内の中性脂肪を消費して熱エネルギーとして散逸する。従って、白色脂肪細胞の褐色化とは、中性脂肪を貯蔵する性質から消費する性質への「質的変化」であるといえる。これらを踏まえて、現在では食品成分による白色脂肪細胞の褐色化の誘導が肥満対策の一つと考えられるようになってきている。

【褐色化誘導経路】

褐色脂肪細胞と同様にベージュ脂肪細胞のミトコンドリアでは、uncoupling protein 1（UCP1）と呼ばれる脱共役タンパク質が高発現している。通常の細胞のミトコンドリアでは、脂肪酸の酸化で得られたプロトンからATPが産生されるが、褐色とベージュ脂肪細胞ではプロトンがUCP1を介することで熱エネルギーへと変換される。従って、褐色化の誘導は熱産生の増加とUCP1の発現量の増加を指標とすることで判断できる。白色脂肪細胞の褐色化には主に二つの経路が存在する（図2）[6]。細胞膜に局在するβ3-アドレナリン受容体（β3-adrenergic receptor; β3-AR）にリガンドとしてノルアドレナリンが結合すると、細胞内でcAMPの合成量が増加する。cAMPはCREBと呼ばれる転写因子を活性化し、活性化CREBはUCP1遺伝子の発現量を増加することで褐色化を促す。もう一方は、核内受容体であるPPARγが関与する経路である。PPARγは細胞内の脂肪酸をリガンドとして結合することで標的遺伝子の発現を誘導する。PPARγの標的遺伝子には中性脂肪の合成や脂肪滴の安定化に寄与する遺伝子だけでなくUCP1も含まれていることから、PPARγシグナルを活性化することで褐色化が誘導される。

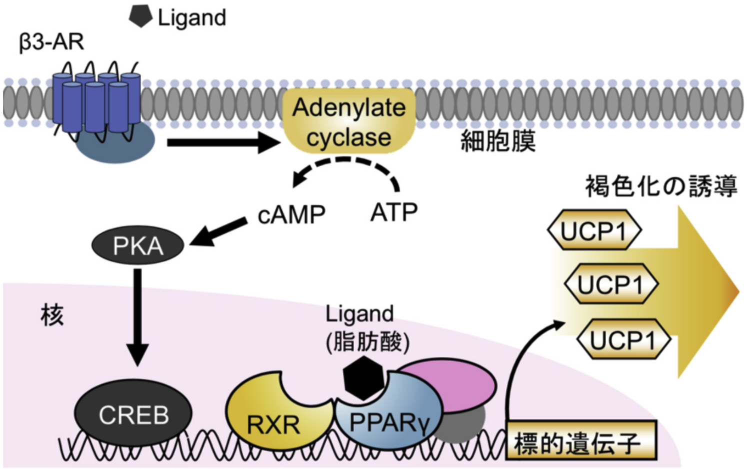

図2. 褐色化を誘導する主要経路
β_3-Adrenergic receptor; β_3-AR, cAMP response element binding protein; CREB, Peroxisome proliferator-activated receptor γ ; PPARγ, Retinoid X receptor; RXR

【個体レベルでのTBの褐色化誘導効果】

雄性7週齢のC57BL/6Jマウスに飼料に対して0.05%、0.1% TBを混餌した餌を約2ヶ月間自由摂取させた（n=6）。経時的に体重を測定したところ、0.1% TB摂取群で体重増加の抑制傾向が観察されたが、統計的有為差は示されなかった。褐色化の指標である熱産生をマウスの体表温度を測定することで解析した。各群の鼠径部周辺の体表温度を測定しました結果、0.1% TB摂取群で表面温度の上昇が示された。飼育終了時に皮下脂肪組織として鼠径部周辺脂肪、内臓脂肪組織として生殖器周辺脂肪と後腹膜脂肪を採取し重量を測定したところ、0.1% TB摂取群で皮下脂肪組織と後腹膜脂肪組織の重量低下が認められた。採取した脂肪組織を用いて、褐色化への影響を分子レベルで解析した。内臓脂肪組織ではTBを摂取してもUCP1の発現誘導は示されなかったが、皮下脂肪組織では、0.1%のTB摂取でUCP1タンパク質が顕著に増加した（**図3**）。

これらのことから、TBの摂取は皮下脂肪組織においてUCP1の発現を誘導し、脂肪細胞の褐色化を促すことで、熱産生を増加することが示された。

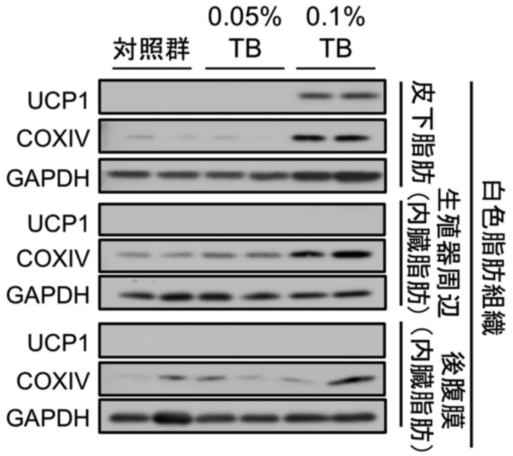

図3. TB摂取が褐色化の指標であるUCP1の発現量に及ぼす影響
TB摂取マウスの各脂肪組織におけるUCP1タンパク質の発現量を比較。
Cytochrome c oxidase subunit IV (COXIV, ミトコンドリアの指標タンパク質)

【遺伝子発現パターンの網羅的解析】

TBがどのような経路を介して褐色化を誘導するのかを検討するために、TB摂取による遺伝子発現パターンの変化をマイクロアレイ法で網羅的に解析した。0.1% TB摂取群で発現量が2倍以上増加した遺伝子数は350、発現量が半分以下に低下した遺伝子数は286だった。発現量の増加が高かった遺伝子をリスト化すると、一番増加率が高かったのはUCP1遺伝子で183倍、次いでElovl3遺伝子で30倍であった。Elovl3は脂肪酸伸長酵素であるが、ベージュ脂肪細胞で高発現していることから褐色化関連遺伝子としても知られている。また、リストの上位には他の褐色化関連遺伝子も複数含まれていた。さらに、増加した遺伝子同士がどのような経路に関連するのかを京都大学が作製したKEGGデータベースを基にして解析した。すると、TB摂取群で増加した遺伝子群は、PPARγシグナル経路に関連することが示された。白色脂肪細胞の褐色化には、主にβ3-ARを介した経路とPPARγを介した経路が存在するが、TBはPPARγ経路を介して褐色化に寄与することが示唆された。

【初代培養細胞を用いたTBの効果の解析】

実験動物を使用した個体レベルでの解析は、摂取した成分の効果を検証できるものの、そこには消化、吸収、代謝といった複数の要因が重なり、実際に摂取した成分が目的の組織に直接作用しているのかが不明瞭な場合がある。そこで培養細胞の培地にTBを添加することで、TBが直接脂肪細胞を刺激し、褐色化を誘導しているのかを検討した。マウスの皮下脂肪組織から単離精製した初代脂肪前駆細胞をTBの存在下で脂肪細胞へと分化誘導した。TBを単独で添加してもUCP1タンパク質の発現量に変化はなかった。しかし、PPARγのリガンドであるロシグリタゾンとTBを同時に添加することでロシグリタゾンによるUCP1の発現誘導をTBはさらに増強した。さらに、TBの添加濃度を変えて検討したところ、1μM以上のTBでUCP1の発現が誘導された。つまり、TBは直接脂肪細胞を刺激することでPPARγシグナル経路を活性化しUCP1の発現を誘導していることが判明した。

転写因子であるPPARγは結合するコアクチベーターによって標的遺伝子の発現誘導パターンが異なる。PPARγによるUCP1の発現誘導はPRDM16やPGC-1αといったコアクチベーターの結合が重要となる[7, 8]。そこで、TBがPPARγとPGC1αの結合に及ぼす影響を免疫沈降法で解析した。その結果、TB添加によってPPARγに結合するPGC-1α量が増加した。PGC-1αはリン酸化修飾を受けることでPPARγとの結合が促進される[8]。リン酸化PGC-1α量を検出した結果、TBはPGC-1αの総量には影響を示さないものの、リン酸化PGC-1α量を増加した。

これらのことから、TBはPGC-1αのリン酸化を誘導することでPPARγとの結合を促進し、その結果、PPARγによるUCP1遺伝子の発現誘導が亢進することが明らかとなった。

【まとめ】

以上のことから、TBをマウスに摂取させると皮下脂肪組織の褐色化を誘導することが判った。さらに培養細胞を用いた作用機構の解析では、TBが直接脂肪細胞に作用することでPGC1αタンパク質のリン酸化を促すことでPGC-1αとPPARγとの結合量を増加し、その結果、UCP1の発現が誘導されることが判明した（図4）[9]。以前の研究結果と今回の研究結果を踏まえると、テオブロミン

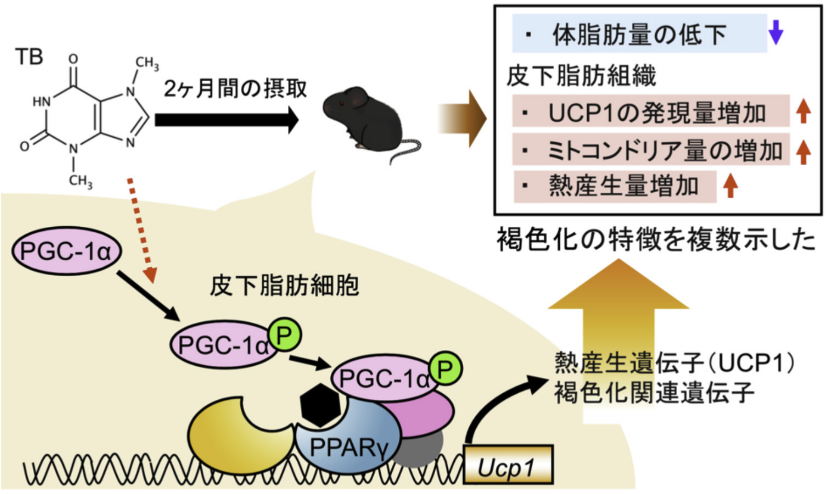

図4. TB摂取を誘導する分子メカニズム

摂取は、内臓脂肪組織においては脂質形成の抑制といった量的変化を、皮下脂肪組織では褐色化を促すといった質的変化をもたらすことで、異なる二つの作用から肥満予防に寄与する食品成分であると言える。

【参考文献】

（1）Golomb, BA. et al. Association between more frequent chocolate consumption and lower body mass index. *Arch Intern Med.* 172, 519–21 (2012).

（2）Cuenca-García M. et al. Association between chocolate consumption and fatness in European adolescents. Nutrition. 30, 236–9 (2014).

（3）第25回チョコレート・ココア国際栄養シンポジウム講演要旨集

（4）Mitani, T. et al. Theobromine suppresses adipogenesis through enhancement of CCAAT-enhancer-binding protein β degradation by adenosine receptor A1. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 1864, 2438–48 (2017).

（5）Kajimura, S. et al. Brown and beige fat: physiological roles beyond heat generation. *Cell Metab.* 22, 546–59 (2015).

（6）Bartesaghi, S. Thermogenic activity of UCP1 in human white fat-derived beige adipocytes. *Mol Endocrinol.* 29, 130–9 (2015)

（7）Ohno, H. et al. PPARγ agonists induce a white-to-brown fat conversion through stabilization of PRDM16 protein. *Cell Metab.* 15,395–404 (2012).

（8）Cao, W. et al. p38 mitogen-activated protein kinase is the central regulator of cyclic AMP-dependent transcription of the brown fat uncoupling protein 1 gene. *Mol Cell Biol.* 24, 3057-67 (2004).

（9）Tanaka, E. et al. Theobromine enhances the conversion of white adipocytes into beige adipocytes in a PPARγ activation-dependent manner. *J Nutr Biochem.* 108898 (2021).