

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：27301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K00834

研究課題名(和文) -コングリシニンのメタボリックシンドローム改善作用とその機序解明に関する研究

研究課題名(英文) Ameliorative effects of dietary beta-conglycinin in metabolic syndrome

研究代表者

古場 一哲 (Koba, Kazunori)

長崎県立大学・看護栄養学部・教授

研究者番号：30290638

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：大豆タンパク質の主なタンパク質画分の一つである -コングリシニンのメタボリックシンドローム改善作用について、種々の病態モデル動物で検討を行った。その結果、-コングリシニンは体脂肪低減作用および肝臓トリグリセリド濃度低下作用(肥満モデル動物：OLETFラット)、血圧上昇抑制作用(高血圧自然発症モデルラット：SHR/lzm)、インスリン感受性改善作用(2型糖尿病モデル動物：KK-Ayマウス)を示した。さらに、これらの種々の作用はメタボリックシンドロームモデルラット(SHR/NDmcr-cp)においても概ね認められ、メタボリックシンドローム改善因子としての -コングリシニンの有用性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We examined how dietary -conglycinin, one of the major components of soy protein affected metabolic syndrome factors in disease animal models. As a result, dietary -conglycinin lowered visceral adipose tissue weights and liver triglyceride concentration in Otsuka Long Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats (an animal model of obesity). Dietary -conglycinin suppressed both systolic and diastolic blood pressures in spontaneously hypertensive rats (SHR/lzm). Also, Dietary -conglycinin ameliorated insulin sensitivity in KK-Ay mice (a mouse model of type II diabetes mellitus). These effects were also observed in SHR/NDmcr-cp, which was a metabolic syndrome rat model. The results suggested that -conglycinin could modulate not only lipid metabolism, but also glucose metabolism and blood pressure in rodents, and then -conglycinin has potential to prevent metabolic syndrome.

研究分野：食品栄養学

キーワード：-コングリシニン 脂肪組織重量 肝臓トリグリセリド濃度 血圧 血糖値 ラット マウス メタボリックシンドローム

1. 研究開始当初の背景

大豆タンパク質の 20~25%を占める β -コングリシニンには大豆タンパク質全体よりも強い体脂肪低減作用や血清トリグリセリド濃度低下作用があることが報告され¹⁾、2007 年には特定保健用食品の機能性成分にも認可されている。 β -コングリシニンの脂質濃度低下作用には、少なくとも肝臓における脂肪酸合成の抑制と脂肪酸酸化の亢進が関与していることが動物実験の結果から明らかとなっている²⁾。これまでの研究で、 β -コングリシニンを摂取したラットの血清アディポネクチン濃度は、カゼインや大豆タンパク質を摂取した場合に比べ、有意に高くなることを申請者らも確認している³⁾。脂肪細胞から分泌されるアディポネクチンはいわゆる善玉のアディポサイトカインで、肝臓や筋肉での脂肪酸酸化能の亢進を通して脂質代謝に影響するばかりでなく、筋肉や脂肪組織へのグルコースの取り込みを亢進して血糖値を改善し、さらに血圧の上昇を抑える作用も示唆されている⁴⁾。このため、アディポネクチンの血清濃度を上昇させる β -コングリシニンの摂取は、脂質代謝に限らず、インスリン感受性や血圧調節を含めたメタボリックシンドローム改善に作用することが期待された。

2. 研究の目的

本研究は、動物実験で β -コングリシニンの摂取が血清アディポネクチン濃度を上昇させることに注目し、脂質代謝改善作用を含む広範な生理機能(抗肥満作用、糖代謝改善作用、血圧上昇抑制作用など)を β -コングリシニンが有するのか明らかにするために、種々の病態モデル動物(肥満モデル動物、2 型糖尿病モデル動物、本態性高血圧モデル動物およびメタボリックシンドロームモデル動物)を用いた摂食実験を行った。

肥満モデル動物として Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF)ラットを用い、 β -コングリシニンの体脂肪低減作用を調べた。この動物種は過食による肥満から糖尿病を発症するため、糖尿病発症前の肥満期で摂食試験を行い、糖尿病の発症に密接に関わるインスリン感受性に対する β -コングリシニンの影響についても検討した。

2 型糖尿病モデル動物としては、早期かつ重度に肥満・高血糖を発現する KK-Ay マウスを用いて、糖尿病が進行中の血糖値が上昇している途上の状態と上昇した状態の 2 種類の摂食期間でインスリン耐性試験を行い、 β -コングリシニン摂取がインスリン感受性を改善して糖尿病の進行に改善効果を示すのか検討した。

本態性高血圧モデル動物としては、高血圧自然発症ラット (SHR/Izm) を用い、 β -コングリシニン摂取がアディポネクチン濃度の上昇を介して血圧に関与するか、それ以外の血圧調節因子についてはどうか検討した。

最後にメタボリックシンドロームモデルラットとして、SHR/NDmcr-cp を用い、種々の効果がメタボリックシンドローム状態でも作用するのかについて調べた。

3. 研究の方法

本研究では、いずれの摂食実験においても AIN-93G 組成を基準にした 20%カゼイン(CAS)食を対照食とし、そのタンパク質の半量(10%)を分離大豆タンパク質(SOY)または β -コングリシニン(β -CON)で置き換えた食餌(SOY 食および β -CON 食)を実験食として用い、CAS 群、SOY 群および β -CON 群の 3 群構成で実験を行なった。結果は全て平均 \pm SE で表示し、一元配置分散分析後、Tukey-Kramer 法により統計計算を行った。

(1) 肥満モデル動物実験

5 週齢の雄性 OLETF ラット(日本 SLC, 静岡)を 1 週間予備飼育後、3 群に分け、CAS 食、SOY 食および β -CON 食をそれぞれ 13 週間自由摂食させた。飼育期間中、3 週間毎に 6 時間絶食させ、尾部より採血し、血糖値測定器(ACCU-CHEK Aviva, ロッシュ DC ジャパン(株), 東京)にて血糖値を測定した。飼育 12 週目にはインスリン耐性試験(ITT; インスリン腹腔内投与量, 0.75 IU/kg 体重)を行った。飼育期間終了後、6 時間絶食させ、イソフルラン麻酔下で腹部大動脈より採血した。血清を調製し、各成分濃度を測定した。肝臓および各脂肪組織は摘出して重量を測定し、液体窒素で凍結した後、-80 で保存した。肝臓の脂質濃度および各画分の脂質代謝関連酵素活性を測定した。また、各組織の脂質代謝関連遺伝子の発現を RT-PCR 法にて測定した。

(2) 2 型糖尿病モデル動物実験

4 週齢の雄性 KK-Ay マウス(日本クレア, 東京)を 1 週間予備飼育後、3 群に分け、CAS 食、SOY 食および β -CON 食を 2 種類の摂食期間(2 週間/5 週間)で自由節食させた。2 週間摂食実験の場合は飼育開始 1 週目に、5 週間摂食実験の場合は飼育開始 4 週目に、それぞれ 6 時間絶食させ、ITT(インスリン腹腔内投与量, 1U/kg 体重)を行なった。飼育期間終了後、6 時間絶食させ、イソフルラン麻酔下で腹部大静脈より採血して血清を調製し、3-(1)と同様、分析を行った。肝臓および各脂肪組織についても 3-(1)と同様に摘出後、分析を行った。

(3) 本態性高血圧モデル動物実験

5 週齢の雄性高血圧自然発症ラット(SHR/Izm, 日本 SLC)を 1 週間予備飼育後、3 群に分け、CAS 食、SOY 食および β -CON 食をそれぞれ 7 週間自由摂食させた。飼育期間中、2 週間毎にラット尾部の血圧を測定した(MK-2000ST, 室町機械(株), 東京)。飼育期間終了後、6 時間絶食させ、イソフルラン麻

酔下、クエン酸三ナトリウム水溶液を入れたシリンジを用いて腹部大動脈より採血した。血漿を調製し、各成分を分析した。肝臓、腎臓および各脂肪組織を摘出し、3-(1)と同様に分析を行った。また各組織の血圧調節関連遺伝子の発現を RT-PCR 法にて測定した。

(4) メタボリックシンドロームモデル動物実験

5 週齢の雄性 SHR/NDmcr-cp (日本 SLC) を 1 週間予備飼育後、3 群に分け、CAS 食、SOY 食および -CON 食をそれぞれ 12 週間自由摂食させた。飼育期間中、4 週目、8 週目および 12 週目に尾部より採血し、3-(1)と同様に血糖値を測定した。12 週目には血糖値測定に続き糖負荷試験 (グルコース経口投与量、2g/kg 体重) を実施した。また、飼育 2 週目、6 週目および 10 週目には、3-(2)と同様にラット尾部の血圧を測定した。飼育期間終了後、6 時間絶食させ、3-(3)と同様に大動脈採血して血漿を調製し、肝臓および各組織を摘出し、分析を行った。

4. 研究成果

(1) 肥満モデル動物実験

飼育期間中の摂食量、体重増加量および食餌効率に、3 群間で違いはなかった。

飼育期間終了後の白色脂肪組織重量 (腸間膜) は、CAS 群に比べ、SOY 群で有意に軽く、-CON 群でさらに軽かった (Fig. 1-1)。血清アディポネクチン濃度は、-CON 摂取で上昇する傾向が認められ、脂肪組織量とアディポネクチンの血中濃度は逆相関するというこれまでの報告と矛盾しなかった⁵⁾。血清トリグリセリド濃度への食餌の影響は明確でなかったものの、肝臓トリグリセリド濃度は、CAS 群、SOY 群、-CON 群の順に低くなる傾向が認められ、OLETF ラットにおいて -CON は体脂肪低減作用および肝臓脂質濃度低下作用を示すことが示唆された。

腸間膜脂肪組織において、脂肪酸の切り出しに関わるホルモン感受性リパーゼ (HSL) および脂肪組織トリグリセリドリパーゼ (ATGL) の発現は、ともに CAS 群に比べ、SOY 群、さらには -CON 群で高かった (Fig. 1-2)。一方、脂肪組織への脂肪酸の取り込みに関わるリポタンパク質リパーゼ (LPL) の発現は 3 群間で大きな違いはなかった。したがって、

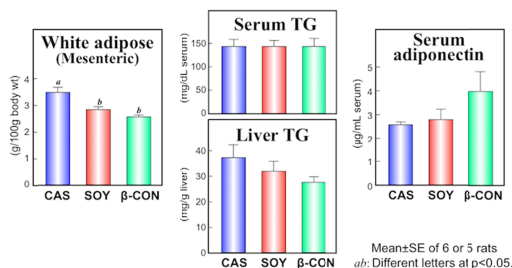


Fig. 1-1. OLETF ラットにおける白色脂肪組織重量、血清成分濃度および肝臓脂質濃度

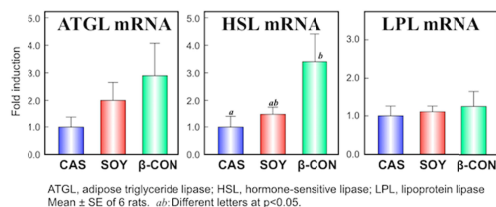


Fig. 1-2. OLETF ラットにおける腸間膜脂肪組織での遺伝子発現

-CON の脂肪組織重量低減作用には、少なくとも脂肪組織からの脂肪酸の切り出しが関与していることが示唆された。

肝臓の脂質代謝関連因子を調べたところ、SREBP1c の発現は、CAS 群に比べ、SOY 群さらには -CON で低くなる傾向にあり、脂肪酸合成酵素の発現および酵素活性は有意に抑えられた (Fig. 1-3)。一方、PPAR の発現は、CAS 群に比べ、SOY 群で高い傾向、-CON 群で有意に高い値を示したものの、ミトコンドリアにおける脂肪酸酸化の指標である酵素カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ (CPT) の発現および酵素活性への影響は明確でなかった。したがって、-CON 摂取による肝臓トリグリセリド濃度低下作用の一因としては肝臓における脂肪酸合成能の低下が考えられた。

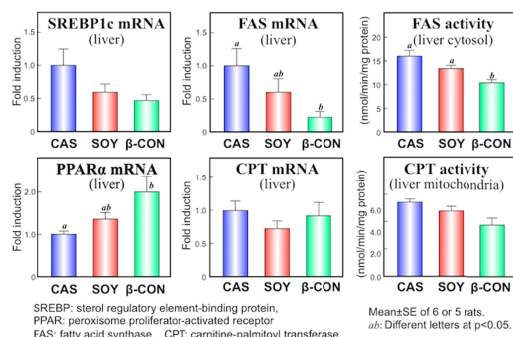


Fig. 1-3. OLETF ラットにおける肝臓の脂肪酸合成系および酸化系関連遺伝子および酵素活性

飼育期間を通して、血糖値は各群間で違いは認められなかった (Fig. 1-4)。飼育 12 週目に血糖値測定に続いて ITT を行なった結果、インスリンを腹腔内投与して 30 分後の血糖値が CAS 群に比べ、SOY 群で低い傾向、-CON 群で有意に低い値を示し、インスリン感受性が -CON 群で高いことが示唆された。

飼育期間終了後の血清グルコース濃度も 3 群間で違いはなかった (データ未掲載)。血清インスリン濃度は、有意差はなかったものの、CAS 群、SOY 群、-CON 群の順に低い傾向にあり、血中のヘモグロビン A1c のレベルも同様の傾向を示した (データ未掲載)。-CON 摂取がインスリン感受性を高めることに加え、血清インスリン濃度が低い傾向にあ

ることも、内臓脂肪重量および肝臓トリグリセリド濃度が -CON 摂取で低下した一因と考えられた⁶⁾。そして、-CON は OLETF ラットの糖尿病の進行の遅延にも影響する可能性が示唆された。

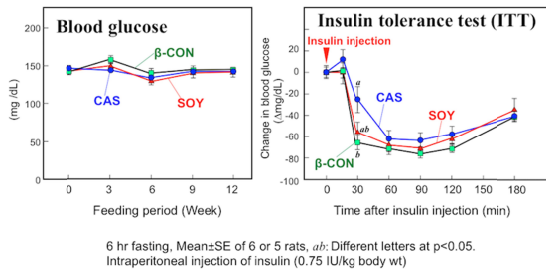


Fig. 1-4. OLETF ラットにおける血糖値の経時的変化およびインスリン耐性試験

(2) 2型糖尿病モデル動物実験

摂食期間の違いに関わらず、飼育期間中の摂食量、体重増加量および食餌効率に3群間で違いは認められなかった。

血清グルコース濃度は、摂食期間2週間(7週齢時)では250~300 mg/dL程度、摂食期間5週間(10週齢時)では400~500 mg/dLであり、摂食期間2週間では、2型糖尿病発症の途上にあると考えられた(Fig. 2-1)。しかし、食餌タンパク質の違いによる血清グルコース濃度への明確な影響は認められなかった。血清インスリン濃度は、摂食期間2週間ではCAS群で5 ng/mL未満で、-CON群ではさらに低い傾向であった。摂食期間5週間では、CAS群で同濃度は約30 ng/mLと2週間の場合の6倍以上の高値で、この傾向は-CON群でも認められたものの、15 ng/mL未満の低い値であり、-CON摂取は血清インスリン濃度を低く保つことが示唆された。

飼育期間中、2週間飼育実験では飼育開始1週目に、5週間飼育実験では飼育開始4週目にそれぞれITTを行なった。その結果、2週間実験の方は、インスリンを腹腔内投与して60分以降の血清グルコース濃度の低下量がCAS群に比べ、SOY群、さらには-CON群の順で大きく、-CON摂取下ではインスリンに対する応答が比較的保たれると推察された(Fig. 2-2)。しかしこの傾向は、糖尿病が発症した5週間実験では認められなかった。

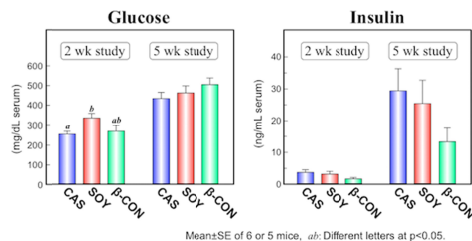


Fig. 2-1. KK-Ay マウスにおける血清グルコースおよび血清インスリン濃度

白色脂肪組織重量(腸間膜)については、OLETF ラットで認められた結果と同様の傾向が認められ、摂食期間2週間ですでに-CON摂取による有意な低下作用が認められた(Fig. 2-3)。血清アディポネクチン濃度についてもOLETF ラットで認められた結果と同様の傾向が認められたが、-CON摂取による血清アディポネクチン濃度上昇は2週間摂取よりも5週間摂取でより明確であった。

このように、-CONはKK-Ayマウスの糖尿病進行時においても、発症時においても血清アディポネクチン濃度を高め、内臓脂肪重量を抑えることが示唆された。そして特に糖尿病進行時においては、-CONはインスリンに対する応答を維持させ、糖尿病の進行を遅延するように作用する可能性が示唆された。

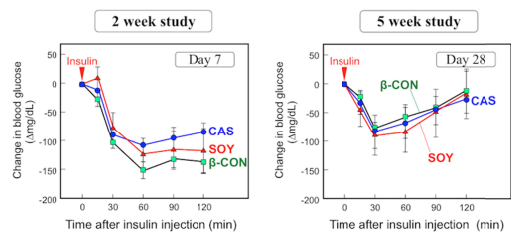


Fig. 2-2. 摂食期間が異なるKK-Ayマウスのインスリン耐性試験

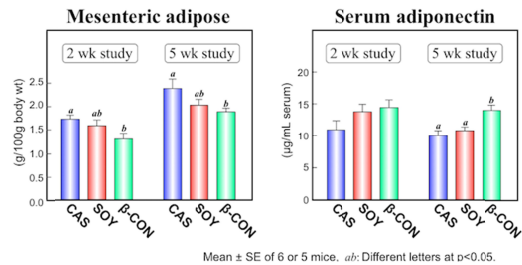


Fig. 2-3. KK-Ayマウスにおける脂肪組織重量および血清アディポネクチン濃度

(3) 本態性高血圧モデル動物実験

飼育期間中の摂食量、体重増加量および食餌効率に3群間で違いは認められなかった。

収縮期血圧は実験食を摂取して4週目以降、CAS群に比べ、SOY群で有意に低く、-CON群でさらに低かった(Fig. 3-1)。拡張期血圧も収縮期血圧と似た傾向を示した。したがって、-CON摂取は、ラットの血圧上昇を抑える作用があることが示唆された。

血漿アディポネクチン濃度は、これまでの結果と同様に、CAS群に比べ、-CON群で有意に高かった(Fig. 3-2)。また、血管拡張に関わる血漿一酸化窒素(NO)濃度も、CAS群に比べ、-CONで高い傾向にあり、-CONの血圧上昇抑制作用の一因として、血清アディポネクチン濃度上昇を介した血漿NO濃度の変化が考えられた⁷⁾。

OLETFラットおよびKK-Ayマウスでの結果と異なり、SHRにおいては脂肪組織重量に対する食餌タンパク質の違いの影響は認められなかつ

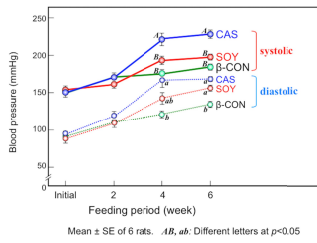


Fig. 3-1. SHR/Izmにおける収縮期および拡張期血圧の経時的変化

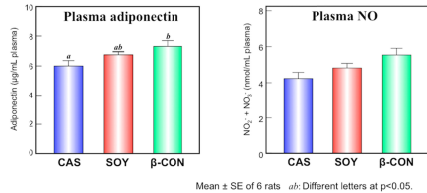


Fig. 3-2. SHR/Izmにおける血漿アディポネクチンおよび一酸化窒素(NO)濃度

た (Fig. 3-3)。睾丸周辺脂肪組織において、PPAR およびアディポネクチンのmRNA発現は、CAS 群に比べ -CON 群で有意に高いまたは高い傾向を示した。したがって、-CON 摂取による血清アディポネクチン濃度の上昇は、脂肪細胞の小型化に伴う応答ではなく、PPAR の発現亢進を介した影響と考えられた。

アディポネクチン以外の血圧調節機構として、レニン-アンジオテンシン系の関与についても検討した。血中のアンジオテンシン変換酵素 (ACE) 活性に及ぼす食餌タンパク質の影響は明確でなかったものの、肝臓におけるアンジオテンシノーゲンの発現および腎臓におけるレニンの発現はいずれも CAS 群に比べ -CON 群で低い傾向にあった (Fig. 3-4)。したがって、-CON の血圧上昇抑制作用には、レニン-アンジオテンシン系も関与することが示唆された。

(4) メタボリックシンドロームモデル動物実験
飼育期間中の摂食量、体重増加量および食餌効率に、3群間で違いはなかった。

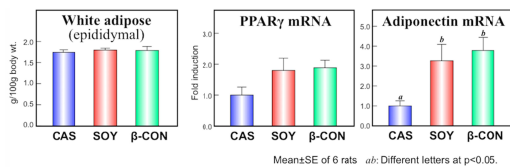


Fig. 3-3. SHR/Izmにおける睾丸周辺脂肪組織重量と遺伝子発現

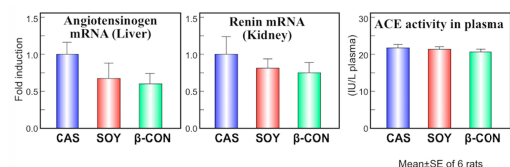


Fig. 3-4. レニン-アンジオテンシン系への影響

飼育期間終了後、白色脂肪組織重量 (腸間膜、腎臓周辺) は3群間で違いは認められず、メタボリックシンドロームモデル動物においては、-CON の抗肥満作用は認められなかった。血漿アディポネクチン濃度は、これまでの摂食実験結果と同様に、CAS 群に比べ、-CON 群で有意に高かった (Fig. 4-1)。血漿トリグリセリド濃度への食餌の影響は明確でなかったものの、肝臓トリグリセリド濃度は、CAS 群、SOY 群、-CON 群の順に低くなり、CAS 群と -CON 群の差は有意であった。肝臓では SREBP1c の発現低下、脂肪酸合成酵素の発現および酵素活性の低下が認められ (データ未掲載)、それに加え PPAR の発現亢進、CPT の発現および活性の上昇が認められたため (データ未掲載)、-CON の肝臓トリグリセリド濃度低下作用には、肝臓における脂肪酸合成抑制および脂肪酸酸化亢進が関与していると考えられた。

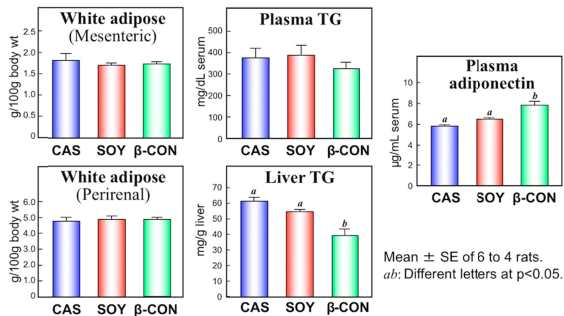


Fig. 4-1. SHR/NDmcr-cpにおける脂肪組織重量、血漿成分濃度および肝臓脂質濃度

飼育期間終了後6時間絶食させた血漿グルコース濃度は3群間で大きな違いはなかったものの、血漿インスリン濃度はCAS 群、SOY 群、-CON 群の順で低く、CAS 群と -CON 群の違いは有意であった (Fig. 4-2)。ヘモグロビン A1c のレベルは、CAS 群に比べ、-CON 群で有意に低く、飼育期間を通した平均的な血糖値は -CON 摂取で低く抑えられた可能性が考えられた。

飼育12週目に行った糖負荷試験では、統計的に有意ではなかったものの、グルコース経口投与後、30分以降の血糖値は、CAS 群に比べ、SOY 群および -CON 群で低い傾向で推移した (Fig. 4-3)。このことから、-CON が食後血糖値の上昇を抑える傾向にあることが、ヘモグロビン A1c のレベル低下の一因と考えられた。また、筋肉 (腓腹筋) における

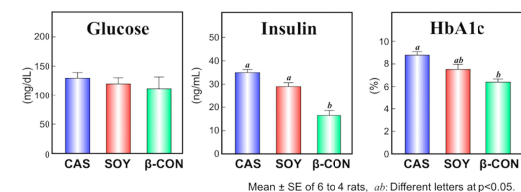


Fig. 4-2. SHR/NDmcr-cpにおける血漿グルコース、インスリン濃度および血中ヘモグロビン A1c レベル

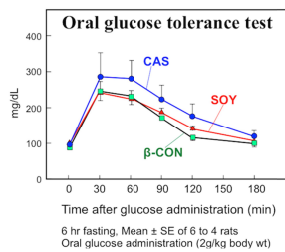


Fig. 4-3. SHR/NDmcr-cp における糖負荷試験

遺伝子発現を調べた結果、インスリン受容体基質 (IRS1) およびアディポネクチン受容体 (AdipoR1) の発現が共に β -CON 摂取により亢進しており (データ未掲載)、インスリンおよびアディポネクチンに対する応答の違いが食後血糖値の上昇、さらには期間平均的な血糖値を反映するヘモグロビン A1c レベルに影響した可能性が考えられた。

飼育期間中の収縮期血圧は、実験食の摂取 2 週目で CAS 群に比べ、SOY 群および β -CON 群でやや低く、6 週目では CAS 群、SOY 群、 β -CON 群の順に低い傾向が生じ、10 週目にはその差が有意になった (Fig. 4-4)。拡張期血圧についても収縮期血圧と同様に β -CON の効果が認められた。したがって、 β -CON は、メタリックシンドロームモデル動物においても血圧上昇抑制作用を示すことが明らかとなり、 β -CON 摂取による血漿アディポネクチン濃度の上昇 (Fig. 4-1) は少なくともその一因と考えられた。レニン-アンジオテンシン系を介した血圧制御についても検討した結果、肺における ACE 活性は、CAS 群に比べ、 β -CON 群で有意に低く、肝臓におけるアンジオテンシノーゲンの発現および腎臓におけるレニンの発現も CAS 群に比べ β -CON 群で低い傾向を示した (データ未掲載)。したがって、 β -CON の血圧上昇抑制作用には、少なくともレニン-アンジオテンシン系による制御および脂肪組織でのアディポネクチン産生増加に起因する複数の血圧上昇抑制機構が関与していることが示唆された。

以上のことから、各病態モデル動物で観察された体脂肪低減作用、肝臓脂質濃度低下作用、インスリン感受性改善作用、血圧上昇抑制作用は、メタリックシンドロームモデル動物においても体脂肪低減作用以外はかなり明確に認められ、メタリックシンドローム改善因子としての β -コングリシニンの有用性が示された。

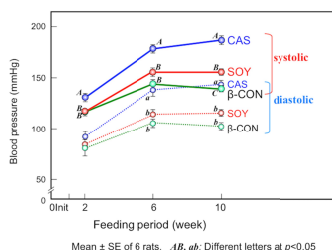


Fig. 4-4. SHR/NDmcr-cp における収縮期および拡張期血圧の経時的変化

[参考文献]

- 1) Aoyama, *et al.* (2001) *Biosci Biotech Biochem*, **65**, 1071-1075.
- 2) Moriyama, *et al.* (2004) *Biosci Biotech Biochem*, **68**, 352-359.
- 3) 古場一哲ら (2009) *大豆たん白質研究*, **12**, 109-114.
- 4) Ohashi, *et al.* (2006) *Hypertension*, **47**, 1108-1116.
- 5) Arita, *et al.* (1999) *Biochem Biophys Res Commun*, **257**, 79-83.
- 6) Dimitriadis, *et al.* (2011) *Diabetes Res Clin Pract*, **93**, S52-S59.
- 7) Wang and Scherer (2008) *Hypertension*, **51**, 8-14.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 4 件)

- 1) Kawabeta K, Hase-Tamaru S, Suruga K, Koba K (2017) Effects of dietary β -conglycinin on insulin sensitivity and liver lipid concentration in OLETF rats, 2017 AOCs Annual Meeting & Expo, Rosen Shingle Creek, Orlando FL, USA.
- 2) 川邊田晃司, 岩永ひかり, 岡田愛子, 湯浅正洋, 古場一哲 (2017) β -コングリシニンの摂取が高血圧自然発症ラットの血圧および脂質濃度に及ぼす影響, 日本農芸化学会 2017 年度大会 (京都市)
- 3) Koba K, Kawabeta K, Sugano M (2016) Physiological effects of dietary β -conglycinin in rats, 2016 ISNFF Annual Conference and Exhibition, Rosen Shingle Creek, Orlando FL, USA.
- 4) Koba K, Kawabeta K, Noda T, Tateiwa N, Tamaru S, Sugano M (2016) Effects of beta-conglycinin on blood pressure and lipid metabolism in the spontaneously hypertensive rat (SHR), 107th AOCs Annual Meeting & Expo, Salt Palace Convention Center, Salt Lake City UT, USA.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

[その他] ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古場 一哲 (Koba, Kazunori)

長崎県立大学・看護栄養学部・教授

研究者番号: 3 0 2 9 0 6 3 8