

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K12333

研究課題名(和文) 実験動物を用いた糖、脂肪およびエネルギー代謝の統合的解析方法の確立

研究課題名(英文) Establishment of integrated analytical methods of carbohydrate, lipid and energy metabolism in experimental animals

研究代表者

池田 郁男 (Ikeda, Ikuo)

東北大学・農学研究科・教授

研究者番号：40136544

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：生体ガス質量分析装置によるエネルギー代謝変動測定と安定及び放射性同位体でラベルしたパルミチン酸とグルコースを経口投与後の代謝解析により、糖、脂肪及びエネルギー代謝変動を統合的に解析する方法の開発をめざした。その結果、マウスへの魚油摂取により肝臓脂肪酸合成系酵素活性の抑制や酸化系酵素活性の亢進が起こるが、同位体ラベルしたパルミチン酸やグルコースの燃焼やグルコースからの脂肪酸合成の一部には影響するものの、総燃焼量や合成量には影響しないことが明らかとなった。以上より、魚油摂取による肝臓TAG濃度の変動は、脂肪酸生合成や酸化以外の要因が関係することが示された。

研究成果の概要(英文)：I aimed to develop integrated analytical methods of carbohydrate, lipid and energy metabolism in mice by measuring energy expenditure and analyses of metabolism of stable and radioactive isotopes of palmitic acid and glucose. The feeding of fish oil suppressed the activities of enzymes related to fatty acid synthesis and stimulated those of enzymes related to β -oxidation in mice liver. However, total consumption of isotopically labeled palmitic acid and glucose and synthesis of fatty acids from labeled glucose were not altered by the feeding of fish oil. The results suggest that alteration of hepatic triacylglycerol concentration induced by fish oil feeding is related to the other factors than fatty acid synthesis and β -oxidation in the liver.

研究分野：栄養化学

キーワード：エネルギー代謝 ラード 魚油 脂肪酸代謝 グルコース代謝 脂肪酸生合成 酸化 同位体

1. 研究開始当初の背景

実験動物を用いた栄養学および食品機能学的研究、特に、食事によるメタボリックシンドローム予防研究において、糖、脂肪およびエネルギー代謝の変動を各種組織、臓器での mRNA や酵素活性を測定して考察する研究が幅広く行われている。しかし、これらの測定値は代謝変動に直接的に連動している訳ではなく、あくまでもいくつかの指標の一部であり、実際の代謝変動を見誤っている研究が多々存在すると考えられる。正しい代謝変動を知るためには、より直接的に代謝変動を計測する必要がある。そこで本研究では、生体ガス質量分析装置によるエネルギー代謝測定と、安定および放射性同位体でラベルしたパルミチン酸およびグルコースの経口投与後の代謝解析により、糖、脂肪およびエネルギー代謝を統合的に解析する方法の開発を行い、その方法を関連研究に応用することで、より正確な代謝情報を得ることを最終目標とする。

2. 研究の目的

食事成分および特別な機能性成分による肥満予防研究が多く行われており、実験動物を用いた基礎研究の報告も多い。糖および脂肪代謝の主要な部位は肝臓、筋肉および脂肪組織であることから、これらの臓器、組織での脂肪および糖代謝関連酵素やたんぱく質の mRNA 発現や酵素活性、更にはたんぱく量を測定することで代謝変動を推定している研究が極めて多い。しかし、mRNA 発現が高いからといって、そのたんぱく質量が多いとは限らず、たんぱく質が多いからといって、そのたんぱく質が多い分だけ働いているとは限らない。特に、糖および脂肪代謝関連酵素は短期的には基質量に依存して作動しており、リン酸化-脱リン酸化、共有結合修飾、フィードバックあるいはフィードフォワード調節により素早く対応する。一方、mRNA 発現の変動はむしろ長期的調節である。我々は以前に、peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) のリガンドとなり、肝臓の

酸化系酵素の mRNA 発現および酵素活性を大きく亢進するカンペステノンという植物ステロール酸化物がラットの内臓脂肪低減作用および肝臓中性脂肪低下作用を有することを報告し、その原因として脂肪燃焼の亢進を示唆したが (Ikeda ら BBA, 1760(2006)800)、エネルギー代謝測定を行ったところ脂肪燃焼亢進は全く認められず、むしろ糖質燃焼が亢進していた。すなわち、酸化系の酵素活性や mRNA 発現が高くて、実際の酸化が亢進しているとは限らないことを身をもって体験した。また我々は、ラットの長時間の絶食に伴って脂肪燃焼が亢進する条件下で、肝臓の酸化系酵素の活性が全く変動しないことを観察した (Ikeda ら Biosci. Biotech. Biochem, 78(2014)1584)。すなわち、酸化の増減は基質に依存してお

り、酵素は充分量が待機状態にあると考えられ、mRNA や酵素活性の増減では調節されていないと考えられた。このように、酵素活性や mRNA が高いからその反応が亢進しているという議論は空論であることも充分ありうるが、この種の研究報告が極めて多く存在するのも事実である。また我々は、上記の絶食試験の報告で肝臓の脂肪酸合成系酵素の酵素活性および mRNA 発現量が、摂食時に劇的に増加し、摂食が終わると激減することを見いだした。すなわち、これらは摂食に伴って劇的に変動しており、屠殺時の測定値はその時点での活性に過ぎず、実際の脂肪酸合成、例えば 24 時間あたりでどの程度の合成を行っているのかを判断できる情報ではないと考えられた。このように酵素活性や mRNA 発現量は、必ずしも実際の代謝を反映していないことは明白である。従って、糖や脂肪代謝を正しく把握できる試験方法を改めて開発する必要があると考えられる。

そこで、本研究では安定同位体および放射性同位体でラベルしたグルコースおよびパルミチン酸を実験動物に経口投与し、経時的にグルコースおよびパルミチン酸の燃焼、各種組織へのグルコースから脂肪酸への取り込み合成、さらには脂肪酸の各種組織への取り込みを調べることとした。この情報を生体ガス質量分析装置による代謝測定と比較すれば、糖および脂肪代謝さらにはエネルギー代謝を正確に把握するための最適な実験条件を明らかにでき、より精密な代謝情報を得ることが可能となると考えられる。この研究は、栄養素や機能性食品成分の生体への影響に関するより正確な情報を提供してくれることから、この研究分野の発展に大きく貢献し、ひいては国民の健康に寄与する可能性が高い。

3. 研究の方法

雄性 C57BL/6J マウスに AIN93G 組成の食餌を自由摂取で与えた。食餌脂肪は、大豆油を対照群として、大豆油に魚油を添加した魚油添加大豆油群の 2 群、あるいは、ラードを対照群として、ラードに魚油を添加した魚油添加ラード群の 2 群のいずれかで飼育した。

摂食期間は基本的に 4 週間で、3 週目に放射性あるいは安定同位体経口投与試験を行った。同位体は、¹³C あるいは ¹⁴C パルミチン酸および ¹³C あるいは ¹⁴C グルコースである。また、安定同位体投与試験後、24 時間の安定同位体計測を行った。その後、24 時間のエネルギー代謝測定を行った。放射性同位体を投与した場合は、パルミチン酸では、投与 8 時間後に、グルコースでは、6 時間後にソムノペンチル麻酔下屠殺し、断頭採血後、肝臓、脂肪組織を摘出した。なお、放射性同位元素投与試験の場合の投与から屠殺までの時間は、放射性同位元素の経口投与予備試験を行い、経時的に屠殺し取り込み等を調べることで決定した。

安定同位体投与試験の場合は、飼育4週目に絶食せずに、イソフルラン麻酔下大動脈採血により屠殺し、各種臓器を取り出した。

4. 研究成果

実験1：大豆油と魚油添加大豆油でマウスを飼育し、¹³C パルミチン酸経口投与試験を行った。¹³C パルミチン酸の燃焼ピークは、60-75分であり、魚油添加大豆油群で大豆油群よりも有意に高かった。しかし、曲線下面積(AUC)にはほとんど差がなく、総燃焼量に差はないと考えられた。

この時、肝臓トリアシルグリセロール(TAG)濃度は、魚油添加大豆油群で低い傾向があるものの有意差はなかった。

肝臓脂肪酸合成系酵素の活性は、魚油添加大豆油群で低く、一方、酸化系酵素の活性は、有意に高かった。

このように、酵素活性には魚油添加の影響が認められたが、肝臓TAGは低下せず、また、パルミチン酸燃焼に差は認められなかった。

実験2：実験1と同様の食餌、大豆油と魚油添加大豆油でマウスを飼育した。この試験では、28日目に¹³C グルコース経口投与試験を行った。¹³C グルコースの燃焼ピークは40分であったが、大豆油と魚油添加大豆油群間に差はなかった。この時も、肝臓TAG濃度には差がなかった。

肝臓の脂肪酸合成系酵素および酸化系酵素の活性は、実験1と同様の動きを示した。

実験1と2から、肝臓の脂肪酸合成系酵素および酸化系酵素の活性は、脂肪酸を減らす方向に動いているが、実際には肝臓TAG濃度は低下させておらず、酵素活性の動きが必ずしも肝臓TAGを変動させる要因ではないことが示された。また、脂肪酸燃焼量や糖燃焼量には有意な影響がないことも示された。

実験3：実験1と2で肝臓TAGが変動しなかったことから、変動する条件で再度試験することとした。そのために、肝臓TAGを上昇させやすいラードを食餌脂肪とし、ラードに魚油を添加した魚油添加ラードと比較することとした。この試験では、¹³C パルミチン酸経口試験を行った。その結果、燃焼のピークは60分であり、魚油添加ラード群では、ラード群よりも、明らかに高かった。しかし、時間が経過し、150分を過ぎるとラード群の方が高値を示して推移した。結果的に8時間のAUCは、2群間で全く差がなかった。このことから、魚油添加ラード食はパルミチン酸燃焼速度を高めるが、総燃焼量には違いがないことが示された。

エネルギー代謝測定の結果、エネルギー消費量、脂肪消費量、炭水化物消費量には差が認められなかった。

肝臓TAG濃度は、魚油添加ラード群でラード群よりも有意に低下した。また、実験1、2

と同様に、魚油添加により肝臓脂肪酸合成系酵素の活性は低下し、酸化系酵素の活性は増加した。

このように酵素活性は、大豆油を用いた場合と同様の変動であったが、肝臓TAG濃度は魚油添加で低下したことから、肝臓TAGの変動は、酵素活性では予測できないことが再び示された。また、肝臓酸化系酵素活性は、脂肪燃焼の増加を示唆するが、¹³C パルミチン酸の燃焼の結果は、それを示していない。従って、脂肪酸燃焼系酵素が活性化しているからといって、必ずしも脂肪酸燃焼が亢進しているとは言えないと考えられた。

実験4：実験3と同じ食餌で飼育し、¹⁴C パルミチン酸経口投与試験を行った。8時間後に屠殺した。肝臓および腹腔内脂肪組織、褐色脂肪組織への¹⁴Cの取り込みは、2群間で全く差はなかった。

このことから、魚油摂取により体全体の脂肪酸燃焼が亢進しているとは考えられなかった。

実験5：実験3と同じ食餌で飼育し、¹³C グルコースの経口投与試験を行った。¹³C グルコースの燃焼ピークは、40分であり、魚油添加ラード群でラード群よりも有意に高かった。しかし、6時間測定のアUCは全く差がなかった。このことから、グルコースの燃焼には違いがないと考えられた。

実験6：実験3と同じ食餌で飼育し、¹⁴C グルコースの経口投与試験を行った。6時間後に屠殺した。肝臓および腹腔内脂肪組織、褐色脂肪組織への¹⁴Cの取り込みは、脂肪酸画分および水溶性画分において全く差は認められなかった。このことから、グルコースとしての燃焼や脂肪酸への合成にはほとんど差はないことが示唆された。

一般に、魚油を摂取すると肝臓TAG濃度が低下する。この時、肝臓の脂肪酸合成系酵素活性は低下し、酸化系酵素活性は上昇することから、脂肪酸合成の抑制と脂肪酸燃焼の亢進が起こることで、肝臓TAGが低下すると理解されている。しかし、本研究の結果はそのことを支持しない。魚油摂取により、大豆油をベースとして用いた場合、酵素活性の変動は起こっているが、肝臓TAGの変動は見られない。一方、ラードをベースとした場合は、魚油摂取に伴う酵素活性の変動は起こっており、肝臓TAGも減少した。また、同位体を用いた代謝試験から、パルミチン酸、グルコースの燃焼やグルコースからの脂肪酸への合成に差は認められなかった。このことは、酸化や脂肪酸合成には違いがないことを示唆する。にもかかわらず、肝臓TAG濃度は、大豆油の場合は変動せず、ラードの場合は、変動が見られる。なぜこのような違いが起こるのかは明確には証明出来なかった

が、肝臓 TAG 濃度が、単に脂肪酸合成や 酸化でのみ決定されているわけではないことを示唆している。我々は先に、脂肪酸生合成が食餌の摂取時に高く、摂取を停止すると速やかに低下する日内変動することを示唆した。このことは、屠殺時の酵素の活性が必ずしも実際の一日の脂肪酸合成を示す指標になるわけではないことを示唆している。おそらく、脂肪酸合成の変動に伴って肝臓 TAG 濃度も日内変動している可能性がある。

また、脂肪酸生合成や 酸化は酵素活性に依存するのではなく、基質量に依存していることも我々は示唆した。従って、肝臓の酵素活性に捕らわれず、肝臓への脂肪酸流入や流出などのバランスを考慮する必要があると考えられる。

本研究では、脂肪酸の合成や 酸化を直接検出できる研究方法の開発を目的として行った。今回のモデルでは、同位体のパルミチン酸やグルコースの燃焼、臓器への取り込みにはほとんど差がなく、研究方法が妥当かどうかを検証できなかった。より明確な違いが得られる試験条件で行い、さらなる検討を行う必要があると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

佐藤歩実、池田英介、奥野綾夏、中村珠子、井上奈穂、池田郁男、マウスを用いた糖、脂質およびエネルギー代謝評価法の確立、日本食品科学工学会第 63 回大会、2016 年 8 月 25 日-27 日(名古屋、名城大学)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田 郁男 (IKEDA, Ikuo)
東北大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号：40136544

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者