

平成 21 年 6 月 12 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006～2008

課題番号：18580128

研究課題名（和文） 酢酸の肥満抑制および 2 型糖尿病予防効果に関する研究

研究課題名（英文） Improvement of obesity and glucose tolerance by acetate

研究代表者

山下 広美 (YAMASHITA HIROMI)

岡山県立大学・保健福祉学部・准教授

研究者番号：70254563

研究成果の概要:肝臓における脂肪合成酵素遺伝子の転写に関わる因子 ChREBP の転写活性を阻害する栄養因子として、食事から摂取可能な酢酸に着目し、酢酸摂取が余剰脂肪の合成と蓄積を抑制し、2型糖尿病を改善するか調べた。その結果、酢酸は肝臓において AMP キナーゼ (AMPK) を活性化し、ChREBP を不活性化することにより脂肪合成抑制、また耐糖能を改善することが示唆された。また骨格筋および脂肪組織へ作用して脂肪代謝を促進することが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 18 年度	1,900,000	0	1,900,000
平成 19 年度	900,000	270,000	1,170,000
平成 20 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	450,000	3,850,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：肥満、酢酸、脂肪代謝、2 型糖尿病、脂肪合成、AMPK、機能性食品、筋管細胞

1. 研究開始当初の背景

増加し続ける生活習慣病やがんの予防を目的として、厚生省（現厚生労働省）は平成 12 年に「健康日本 21」を策定した。その中で「肥満者の減少」を目標の一つとして設定したが、その割合は年々増加を続けている。また肥満者の増加と共に増加しているのが 2 型糖尿病などの生活習慣病であり、2 型糖尿病を予防するには肥満の予防が重要であると考えられている。我々はこれまで、肝臓における絶食時の脂肪酸代謝ならびに高炭水化物食摂食時の肝臓における脂肪合成について基礎的なレベルで研究を行ってきた。

その過程で、グルコースからの脂肪合成に関与する解糖系酵素ピルビン酸キナーゼの転写活性化因子の探索を行ない、肝臓における脂肪合成系酵素の転写因子である ChREBP (Carbohydrate Responsive Element Binding Protein) を見い出した。ChREBP はピルビン酸キナーゼ以外にいくつかの脂肪合成系酵素遺伝子に対しても転写活性化能を有すること、また食品中の成分である酢酸が本転写因子を不活性化することを明らかにした。実際に、健常ラットに酢酸を経口投与した実験から、酢酸による ChREBP の不活性化は in vivo のレベルでも確認され、

酢酸を投与したラットでは脂肪蓄積量の減少が見られることが判った。さらに昨年度には健常人を対象にした酢酸飲料飲用のヒト試験を行ない、酢酸の体重増加抑制効果を確認した。

2. 研究の目的

本研究では、ChREBP の転写活性を阻害する栄養因子として食事から摂取可能な酢酸に着目し、(1)肥満により 2 型糖尿病を併発する病態モデル動物 (OLETF ラットおよび KK-A^y マウス) を用いても、健常モデル動物と同様に酢酸摂取が余剰脂肪の合成と蓄積を抑制するか詳細に検討する。(2)酢酸の脂肪蓄積抑制効果を介して、その摂取が 2 型糖尿病などの生活習慣病を予防・改善できるかを検討する。(3)肝臓以外の組織、即ち脂肪組織や筋肉における酢酸の効果について実験動物を用いて検討すると共に、培養脂肪細胞および培養筋管細胞を用いて酢酸の影響を検討する。以上の研究を遂行し、酢酸の抗肥満効果ならびに 2 型糖尿病予防効果を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1)OLETF ラットに対する酢酸の長期投与による体重および摂食効率の測定

5 週齢 OLETF ラット (大塚製薬より供与) を、水を投与する群および酢酸を投与する群の 2 群に分けて、毎日一定時刻に蒸留水および 1%酢酸溶液をそれぞれ 5ml/kg-体重量、ゾンデを用いて胃腔内に投与した。投与は 30 週齢までの約 6 ヶ月間行なった。

(2)飼育期間中における血液性状測定

OLETF および LETO ラットの頸静脈より採血し、血液中の中性脂肪、コレステロール、遊離脂肪酸、グルコース、レプチンおよびインスリン濃度の測定を市販の試薬を用いて行なった。

(3)酢酸の耐糖能測定

30 週齢時に経口ブドウ糖負荷試験 (OGTT) を行なった。一晚絶食にしたラットに 2g/kg-体重量のグルコース溶液をゾンデにて胃腔内に投与し、投与直後から 120 分までの血糖値の変動を尾静脈血を採取して調べた。

(4)肝臓における脂肪沈着の解析

水群および酢酸投与群における腹腔内脂肪蓄積量を比較するために、解剖時にその重量を測定した。また OLETF ラットの肝臓組織の状態を組織染色法により形態学的に調べた。組織細片を一部はホルマリンで固定、脱水処理を行ない、パラフィンで包埋した。また他の一部は凍結切片作成用に包埋した。それぞれ組織薄片を作成し、ヘマトキシリン、エオジン (HE) 染色またオイルレッド染色を行い、光学顕微鏡にて観察した。

(5)酢酸を投与した動物のエネルギー代謝変

動の測定

酢酸を摂取させたラットにおけるエネルギー代謝量を測定するために、酸素吸収量と二酸化炭素排出量を小動物用代謝計測システムを用いて測定した。

(6)肝臓における脂肪合成酵素遺伝子の転写量ならびに骨格筋および脂肪組織における脂肪代謝関連遺伝子発現の解析

OLETF ラットの水投与群と酢酸投与群の、肝臓における脂肪合成系酵素遺伝子の転写量を比較するために、肝臓組織から総 RNA を抽出しノザンプロットに供した。脂肪合成に関わる主要な酵素の DIG 標識 RNA プローブを作成し mRNA 発現量を解析した。骨格筋および脂肪組織においても同様の操作を行い、脂肪代謝関連遺伝子のプローブを用いて解析した。

(7)骨格筋細胞および脂肪細胞を用いた酢酸の影響の検討

骨格筋や脂肪組織における酢酸の影響を培養細胞を用いて検討した。骨格筋については L6 筋管細胞を用い、脂肪組織については 3T3-L1 細胞を分化誘導させて用いた。

(8)組織内における核酸レベルの測定

組織を採取し、PCA を用いて核酸成分の抽出を行った。試料中の ATP、ADP、AMP の各濃度を ODS 系逆相カラムクロマトグラフィーを用いた HPLC 法により測定した。

4. 研究成果

ChREBP の転写活性を阻害する栄養因子として食事から摂取可能な酢酸に着目し、肥満・2 型糖尿病を自然発症する病態モデル動物 OLETF ラットを用いて、酢酸摂取が余剰脂肪の合成と蓄積を抑制し、2 型糖尿病を改善するか詳細に調べた。その結果、OLETF ラットに 5.2mg/kg 体重の酢酸を経口投与すると、OLETF ラットの体重増加の有意な抑制が見られた (図 1)。各生化学検査値は有意に改善されていた。酢酸摂取による耐糖能改善効果を調べたところ、水投与群と比較して耐糖能が有意に改善されていた (図 2)。さらに脂肪組織における脂肪蓄積量が対象として用いた LETO 郡と同様に有意に低下していた。肝臓の組織化学的解析においても、脂肪滴の蓄積が見られた水投与 OLETF ラットと比較すると脂肪滴蓄積は著しく改善されていた (図 3)。次に酢酸の作用の機序について検討した。まず血中への酢酸の移行速度を測定したところ、胃腔内に投与した酢酸は濃度に依存して数分以内に血中に吸収された後、速やかに消費された (図 4)。組織内での酢酸の代謝産物である AMP 濃度を測定したところ、血中酢酸レベルの増加に伴って AMP レベルが増加し (図 5)、組織内では AMP/ATP が上昇した。さらに酢酸を投与した動物の肝臓における AMP キナーゼ (AMPK) の

リン酸化レベルも増加した。肝臓における脂肪合成関連遺伝子の発現の制御する転写因子 ChREBP は AMPK のリン酸化により不活性化することが報告されている。そこで酢酸が肝臓の脂肪合成系酵素遺伝子の発現レベルに対して影響を及ぼす可能性について調べるために、ノザンプロットによる解析を行った。その結果、酢酸投与した OLETF ラットの肝臓において種々の脂肪合成酵素遺伝子の転写量の低下が見られた。これより酢酸による脂肪蓄積抑制効果の少なくとも一部は肝臓における脂肪合成抑制を介して生じたものであり、そのことが耐糖能の改善をももたらしたと考えられた。

次に、酢酸摂取が KK-A^y マウスにおいても、余剰脂肪の合成と蓄積を抑制するか調べたところ、KK-A^y マウスに酢酸を 11 週間投与すると腹腔内脂肪量は低下の傾向を示した。また血中 TG およびコレステロールも低下の傾向であった。

酢酸を投与した OLETF ラットの骨格筋および脂肪組織における酢酸の効果について検討した。酢酸を投与した OLETF ラットの酸素消費量は水を投与した動物に比較して有意に高かった。そこで骨格筋における脂肪代謝関連遺伝子の発現レベルを解析したところ、酢酸添加後ミオグロビンおよび GLUT4 の発現量が有意に増加していた(図 6)。骨格筋における AMP/ATP 比の動態を調べると、酢酸投与により増加していた。AMPK のリン酸化レベルについても解析を行った結果、AMPK のリン酸化のレベルは酢酸の投与後増加していた(図 7)。培養細胞を用いた解析においても動物組織で得た結果と同様であった。これより酢酸は骨格筋に取り込まれた後、その代謝過程において AMP を生成し、AMPK を活性化すると共に、ミオグロビンの発現増加を介して脂肪代謝を促進すると共に GLUT4 の発現増加を介して糖取り込みを促進すると示唆された。酢酸を摂取した動物の脂肪細胞においてはその肥大化が著しく抑制され(図 8)、また脂肪組織における脂肪代謝系遺伝子の発現レベルが増加する傾向にあった。以上より酢酸は肝臓、骨格筋および脂肪組織への作用を介して脂肪代謝を促進、脂肪蓄積を抑制するように作用すると示唆された。

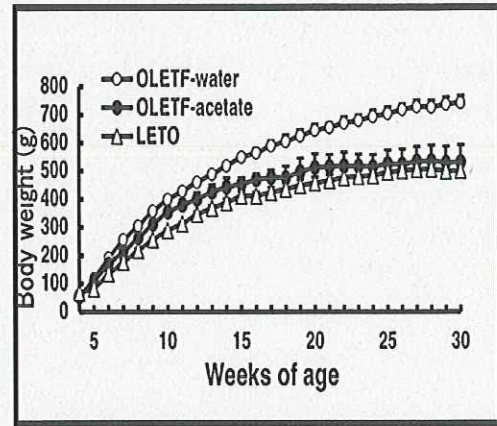


図 1 OLETF ラットの体重変化
水および酢酸を OLETF ラットに 5 週齢から 31 週齢まで経口的に酢酸を投与した。

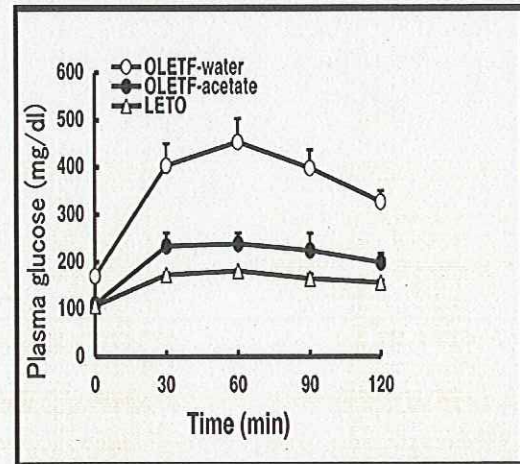


図 2 OLETF ラットの耐糖能に対する酢酸の影響
水および酢酸を 31 週齢まで摂取させた OLETF ラットにグルコース (2g/kg 体重) を経口的に投与した。

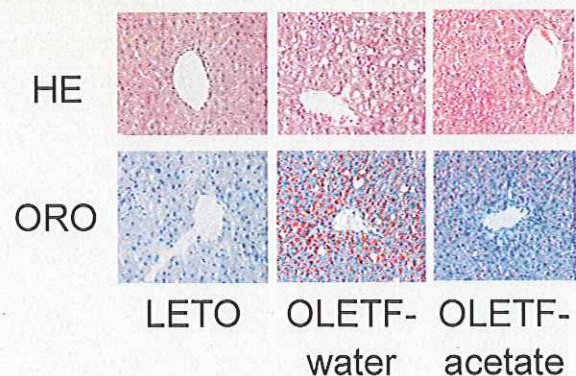


図 3 OLETF ラット肝臓の脂肪蓄積に対する酢酸の影響
A, HE 染色 (200 倍) B, オイルレッド染色 (200 倍)

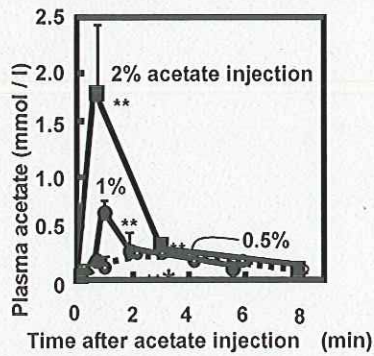


図4 酢酸を経口投与したラットの血中酢酸レベルの変化

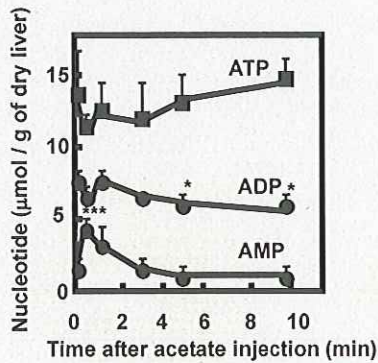


図5 酢酸を経口投与したラットの肝臓における核酸レベルの変化

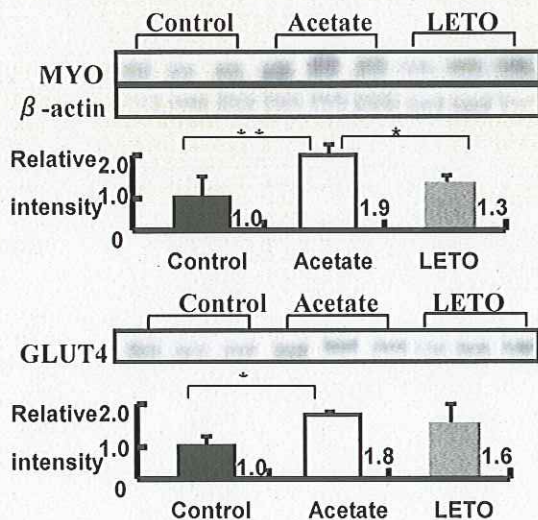


図6 水 (Control) または酢酸 (Acetate) を投与した OLETF ラットの骨格筋におけるミオグロビンおよび GLUT4 mRNA の発現レベルの変化

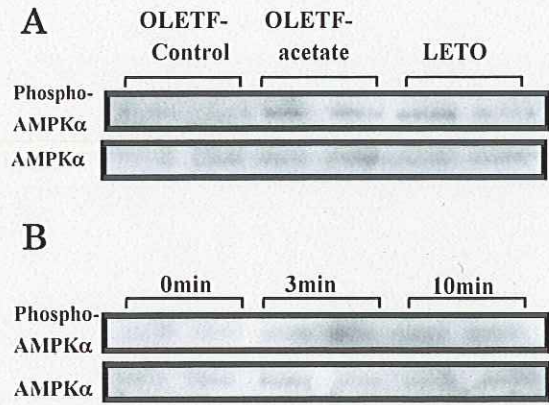


図7 酢酸を投与したラットの骨格筋における AMPK のリン酸化レベル

A: OLETF ラットに 5 週齢から 32 週齢まで水 (Control) または酢酸 (Acetate) を投与した場合の 32 週齢時の骨格筋を解析した。
B: 10 週齢の SD ラットに酢酸を投与し、一定時間後の骨格筋を解析した。

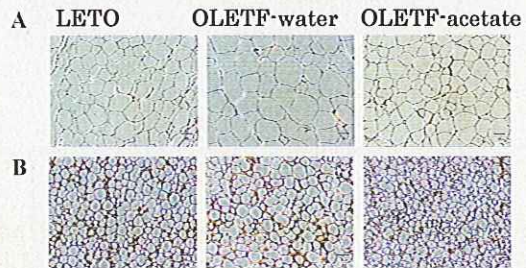


図8 水 (OLETF-water) または酢酸 (OLETF-acetate) を投与した OLETF ラットの白色脂肪組織 (A) および褐色脂肪組織 (B) の組織化学的観察 (HE 染色)

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9件)

1) Ai Itsuki-Yoneda, Masumi Kimoto, Hideaki Tsuji, Miki Hiemori, Hiromi Yamashita, Effect of a hypolipidemic drug, di(2-ethylhexyl)phthalate, on mRNA-expression associated fatty acid and acetate metabolism in rat tissues, Biosci. Biotechnol. Biochem. 71, 414-420(2007)、査読有り

2) Akiko Ishikawa, Hiromi Yamashita, Miki Hiemori, Eiko Inagaki, Masumi Kimoto, Masahiko Okamoto, Hideaki Tsuji, Allah

Nawaz Memon, Alli Mohammadi, Yasuo Natori, Characterization of inhibitors of postprandial hyperglycemia from the leaves of *Nerium indicum*, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 53, 166-173(2007)、査読有り

3) Hiromi Yamashita, Katsuhiko Fujisawa, Erina Ito, Seika Idei, Nobuyo Kawaguchi, Masumi Kimoto, Miki Hiemori, Hideaki Tsuji, Improvement of obesity and glucose tolerance by acetate in type 2 diabetic Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71, 1236-1243(2007)、査読有り

4) Miki Hiemori, Yuki Eguchi, Masumi Kimoto, Hiromi Yamashita, Kyoko Takahashi, Kiyoshi Takahashi, Hideaki Tsuji, Characterization of New 18-kDa IgE-binding proteins in beer, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72, 1095-1098(2008)、査読有り

5) Masumi Kimoto, Makiko Suzuki, Nobuko Komiya, Ayumi Kunimoto, Hiromi Yamashita, Miki Hiemori, Isolation and molecular cloning of a major wheat allergen, Tri a Bd 27K, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73, 85-92(2009)、査読有り

6) Hiromi Yamashita, Hitomi Maruta, Michiyo Jozuka, Rie Kimura, Hiromi Iwabuchi, Makiko Yamato, Tsukasa Saito, Katsuhiko Fujisawa, Yoshitaka Takahashi, Masumi Kimoto, Miki Hiemori, Hideaki Tsuji, Effects of acetate on lipid metabolism in muscle and adipose tissue of type 2 diabetic Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73, 570-576(2009)、査読有り

7) Ayumi Kunimoto, Takako Sisino, Kentaro Sakai, Tomoaki Matsumoto, Kyoko Takahashi, Hiromi Yamashita, Miki Hiemori, Hideaki Tsuji, Masumi Kimoto, Molecular Cloning and Allergenicity of Pen j 1, a major allergen of Kuruma Prawn, *Penaeus japonicus*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73, 840-848(2009)、査読有り

8) Yuki Kawakami, Tomoko Nakamura, Tomoko Hosokawa, Toshiko Suzuki-Yamamoto, Hiromi Yamashita, Masumi Kimoto, Hideaki Tsuji, Hideki Yoshida, Takahiro Hada, Yoshitaka Takahashi, Antiproliferative activity of guava leaf extract via inhibition of prostaglandin endoperoxide H synthase isoforms, Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids, 80, 239-245(2009)、査読有り

9) Akiko Ishikawa, Miki Hiemori, Masumi Kimoto, Hiromi Yamashita, Hideaki Tsuji,

Development of a method for the determination of γ -aminobutyric acid in foodstuffs, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* (2009) In press、査読有り

〔学会発表〕(計 22 件)

1) 山下広美、高鍋弘子、木本真順美、比江森美樹、辻英明、酢酸の抗肥満効果の評価、第 61 回日本栄養・食糧学会大会、2007 年 5 月 20 日、国立京都国際会館(京都)

2) 丸田ひとみ、藤澤克彦、定塚倫世、辻英明、木本真順美、比江森美樹、山下広美、OLETF ラットの抗肥満効果に対する酢酸カルシウムの影響、第 61 回日本栄養・食糧学会大会、2007 年 5 月 20 日、国立京都国際会館(京都)

3) 横路三有紀、國本あゆみ、比江森美樹、山下広美、辻英明、木本真順美、血液細胞による血中 ADMA レベルの調節機構に関する研究、第 61 回日本栄養・食糧学会大会、2007 年 5 月 19 日、国立京都国際会館(京都)

4) 比江森美樹、森川恵都子、木本真順美、山下広美、辻英明、黒大豆種皮エキスにおける抗アレルギー効果の検討、第 61 回日本栄養・食糧学会大会、2007 年 5 月 19 日、国立京都国際会館(京都)

5) 石川顕子、岡博之、比江森美樹、山下広美、木本真順美、川崎仁士、辻英明、食品における γ -アミノ酪産(GABA)の簡便定量法の開発、第 61 回日本栄養・食糧学会大会、2007 年 5 月 20 日、国立京都国際会館(京都)

6) 山下広美、藤澤克彦、伊東えりな、出井世衣佳、川口靖世、木本真順美、比江森美樹、辻英明、肥満・2 型糖尿病モデル動物 OLETF ラットの酢酸による肥満および耐糖能の改善、第 28 回日本肥満学会、2007 年 10 月 19 日、都市センターホテル(東京)

7) 横路三有紀、國本あゆみ、比江森美樹、山下広美、辻英明、木本真順美、内因性 NOS 阻害剤である ADMA は主に赤血球において代謝される、BMB2007 (日本分子生物学会・日本生化学会合同大会)、2007 年 12 月 14 日、パシフィコ横浜

8) 丸田ひとみ、定塚倫世、木村りえ、山戸麻紀子、藤澤克彦、辻英明、木本真順美、比江森美樹、山下広美、OLETF ラットの筋肉に対する酢酸の影響、第 62 回日本栄養・食糧学会大会、2008 年 5 月 3 日、女子栄養大学(埼玉)

9) 石川顕子、山下広美、比江森美樹、木本真順美、岡本昌彦、高橋吉孝、方定志、辻英明、きびみどりにおける α -グルコシダーゼ阻害剤の単離・同定、第 62 回日本栄養・食糧学会大会、2008 年 5 月 4 日、女子栄養大学(埼玉)

10) 國本あゆみ、鈴木麻紀子、室田佳恵子、安光亜矢、比江森美樹、山下広美、辻英明、

木本眞順美、エビの主要アレルゲン、トロポミオシンの消化・吸収性、第62回日本栄養・食糧学会大会、2008年5月4日、女子栄養大学(埼玉)

11) 鈴木麻紀子、藤井秀比古、篠田伸司、辻英明、比江森美樹、高橋吉孝、山下広美、清島満、木本眞順美、卵アレルギー発症機構・non-IgE型食物アレルギーが関与する可能性、第62回日本栄養・食糧学会大会、2008年5月4日、女子栄養大学(埼玉)

12) 丸田ひとみ、山戸麻紀子、藤澤克彦、辻英明、木本眞順美、比江森美樹、山下広美、Effect of acetate on energy metabolism in the skeletal muscles、BMB2008(日本分子生物学会・日本生化学会合同大会)、2008年12月12日、神戸ポートアイランド

13) 木本眞順美、矢谷真知子、横路三有紀、高橋吉孝、鈴木麻希子、飯田真惟、宮崎純一、山下広美、比江森美樹、辻英明、ADMA代謝系におけるDDAHsアイソフォームに特異的な触媒活性、BMB2008(日本分子生物学会・日本生化学会合同大会)、2008年12月9日、神戸ポートアイランド

14) 横路三有紀、鈴木麻希子、室田佳恵子、山下広美、比江森美樹、辻英明、木本眞順美、内因性NOS阻害剤ADMA赤血球における代謝機構、BMB2008(日本分子生物学会・日本生化学会合同大会)、2008年12月10日、神戸ポートアイランド

15) 山下広美、丸田ひとみ、定塚倫世、藤澤克彦、比江森美樹、木本眞順美、辻英明、OLETFラットの骨格筋およびL6筋管細胞のエネルギー代謝に対する酢酸の影響、日本農芸化学会2009年度大会、平成21年3月28日、マリンメッセ福岡・福岡国際会議場(福岡)

16) 木本眞順美、鈴木麻希子、高橋吉孝、横路三有紀、比江森美樹、山下広美、辻英明、内因性NOS阻害剤であるADMAの分解酵素DDAHsの機能解析、日本農芸化学会2009年度大会、平成21年3月28日、マリンメッセ福岡・福岡国際会議場(福岡)

17) 比江森美樹、大倉慶子、坂井康祐、落合孝次、村田健二、鈴木麻希子、木本眞順美、山下広美、辻英明、発芽ブドウ種子エキスの抗アレルギー効果について、日本農芸化学会2009年度大会、平成21年3月29日、マリンメッセ福岡・福岡国際会議場(福岡)

18) 山下広美、丸田ひとみ、比江森美樹、木本眞順美、辻英明、筋管細胞のエネルギー代謝に対する酢酸の影響、第63回日本栄養・食糧学会大会、2009年5月22日、長崎ブリックホール・長崎新聞文化ホール(長崎)

19) 小宮山展子、比江森美樹、木本眞順美、鈴木麻希子、山下広美、辻英明、小麦主要アレルゲンTri a Bd 27Kに対するモノクローナル抗体の作製およびその応用、第63回日本栄養・食糧学会大会、2009年5月22日、長崎

ブリックホール・長崎新聞文化ホール(長崎)

20) 比江森美樹、Koh Eunmi、Mitchell Alyson、鈴木麻希子、木本眞順美、山下広美、辻英明、炊飯における黒米のアントシアニンの挙動とその分解産物の同定、第63回日本栄養・食糧学会大会、2009年5月21日、長崎ブリックホール・長崎新聞文化ホール(長崎)

21) 川上祐生、細川朋子、小林弘和、吉岡晶子、横路三有紀、木本眞順美、山本登志子、山下広美、辻英明、土井忍、由谷親夫、吉田英生、羽田尚彦、高橋吉孝、第63回日本栄養・食糧学会大会、2009年5月21日、長崎ブリックホール・長崎新聞文化ホール(長崎)

22) 鈴木麻希子、河村恵美、比江森美樹、山下広美、高橋吉孝、辻英明、木本眞順美、鶏 lipocalin-type prostaglandin D synthase に対するモノクローナル抗体の作製とその定量法への応用、第63回日本栄養・食糧学会大会、2009年5月22日、長崎ブリックホール・長崎新聞文化ホール(長崎)

〔図書〕(計2件)

1) 大鶴 勝 編集
食品学・食品機能学
朝倉書店

2) 辻英明・小西洋太郎 編集
栄養科学シリーズNEXT 食品学
講談社

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称:機能性を持つ飼料、食品、医薬品組成物

発明者:山下広美

権利者:岡山県中小企業団体中央会

種類:特願

番号:2008-252216

出願年月日:平成20年9月30日

国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

山下広美

岡山県立大学・保健福祉学部栄養学科・准教授

研究者番号:70254563

(2)連携研究者

木本眞順美

岡山県立大学・保健福祉学部栄養学科・教授

研究者番号:40108866