

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 8 日現在

機関番号：25301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580150

研究課題名（和文）酢酸のメタボリックシンドローム抑制効果に関する研究

研究課題名（英文）Studies on the protective effect of acetate on metabolic syndrome

研究代表者

山下 広美（YAMASHITA HIROMI）

岡山県立大学・保健福祉学部・教授

研究者番号：70254563

研究成果の概要（和文）：申請者らはこれまで、肥満と2型糖尿病を発症する病態動物(OLETFラット)に酢酸を摂取させると、肝臓の脂肪合成を抑制することにより肥満を抑制することを示してきた。酢酸は肝臓以外に骨格筋や脂肪組織にも作用し、メタボリックシンドロームを予防する可能性がある。本研究では骨格筋、脂肪組織などの培養細胞を用いて酢酸の作用を詳細に解析した。その結果、酢酸は骨格筋における AMPK のリン酸化を介してミオグロビンや GLUT4 遺伝子の発現を促進し脂肪代謝や糖取り込みを促進させることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Previously, we reported that oral administrated acetate contributed to suppression of lipogenesis in the liver, to the reduction of lipid accumulation in adipose tissue, and to the improvement of glucose tolerance of Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats. Acetate has a potential for prevention of metabolic syndrome. In this study, we investigated the effect of acetate on skeletal muscle and adipose tissue. It was shown that acetate stimulated expressions of myoblobin and GLUT4 via activation of AMP-activated protein kinase (AMPK) and it enhanced fatty acid metabolism and glucose uptake in skeletal muscle.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成21年度	2,000,000	600,000	2,600,000
平成22年度	1,100,000	330,000	1,430,000
平成23年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：農芸化学

科研費の分科・細目：食品科学・機能性食品

キーワード：メタボリックシンドローム、脂質代謝、食品、酢酸、細胞・組織

1. 研究開始当初の背景

肥満や2型糖尿病などの生活習慣病の増加と共にメタボリックシンドロームの増加が大きな社会問題となっている。内臓脂肪の蓄積は脂肪組織の質的悪化を招き、

遊離脂肪酸や炎症性サイトカインの放出、またアディポネクチン分泌低下を引き起こす。炎症性サイトカインの分泌亢進やアディポネクチンの分泌低下などアディポカインの産生調節異常は、インスリン抵抗性ならびに糖・

脂質代謝異常を引き起こし、メタボリックシンドロームの病態である動脈硬化性疾患発症の引き金になると報告されている (Greenberg, A. S. and Obin, M. S., *Am. J. Clin. Nutr.* 83, 461S-465S (2006)). 申請者らはこれまでの研究において、肥満と2型糖尿病を発症する病態動物に酢酸を摂取させると、体脂肪蓄積の抑制や肥満の抑制、また脂肪肝を抑制し、2型糖尿病を改善することを示してきた (Yamashita, H., et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71, 1236-1243 (2007)). 即ち、経口的に摂取した酢酸は容易に血中に移行し、組織に速やかに取り込まれた後肝臓において代謝される。その過程で生じるAMPの増加により、エネルギー代謝の調節因子として知られるAMPキナーゼ (AMPK) が活性化され、転写因子ChREBPの不活性化と脂肪合成関連遺伝子の転写量の低下が起こり、肝臓の脂肪合成が抑制されることを示した。

2. 研究の目的

メタボリックシンドロームを抑制するためには、内蔵脂肪蓄積を抑制すると共に骨格筋における脂肪代謝を亢進することが重要である。メタボリックシンドローム抑制と密接に関わる因子として、脂肪細胞から分泌されるアディポネクチンがよく知られているが、アディポネクチンの作用は、骨格筋や肝臓のAMPキナーゼ (AMPK) 活性化を介するものであることが報告されている (Yamauchi, T., et al., *Nature Med.* 8, 1288-1295 (2002)). 我々の最近の知見においても、酢酸投与した肥満動物では脂肪代謝が促進し、その骨格筋ではAMPKが活性化されることを観察している。この動物の筋肉組織を解析するとミオグロビンおよびグルコーストランスポーター4 (GLUT4) の転写量が増加していた。また脂肪組織においては脂肪滴肥大化が抑制され、脂肪分解系遺伝子の発現が増加していた。酢酸は肝臓以外に骨格筋や脂肪組織にも作用し、それら臓器の糖・脂質代謝不全の予防・改善を介してメタボリックシンドロームを予防する可能性がある。本研究では主に培養細胞を用いて、骨格筋、脂肪組織、並びに血管内皮細胞等における酢酸の作用を明らかにし、酢酸代謝がもたらすメタボリックシンドローム抑制効果について検討することを目的として、まず(1) L6筋芽/筋管細胞を用いて、酢酸によるAMPK活性化とミオグロビンおよびGLUT4発現との関連、また酢酸による脂肪代謝および糖取り込

みの促進作用およびそれらの機序について検討する。次に(2)脂肪組織における酢酸の脂肪滴肥大化抑制作用について内蔵脂肪細胞ならびに3T3-L1細胞を用いて検討する。一方最近、血管内皮細胞における動脈硬化抑制因子として知られるeNOSの活性化にAMPKが関与することが報告されている。そこで(3)酢酸による動脈硬化性疾患の予防の可能性についてヒト血管内皮細胞 (HUVEC) を用いて検討する。本報告書においては、主に骨格筋における作用をL6筋管細胞を用いて検討した結果に焦点を絞って以下に示す。

3. 研究の方法

(1) L6筋芽/筋管細胞の培養および分化

L6筋芽細胞は37°C、5%CO₂に設定したCO₂インキュベータで培養した。10%FBS、1%抗生物質(100IU/mlペニシリン、100μg/mlストレプトマイシン)を含むDMEM増殖培地で毎日培地交換を行い、80%コンフルエントになるまで培養した。その後、トリプシン処理により継代を行い、4000cell/cm²の濃度で播種し、24時間後、2%FBS/DMEM培地に交換し、分化誘導を行った。完全に筋管に分化した8-11日目の細胞を実験に用いた(図1)。分化の確認は、図2に示すようにヘマトキシリン-エオジン(HE)染色により行った。

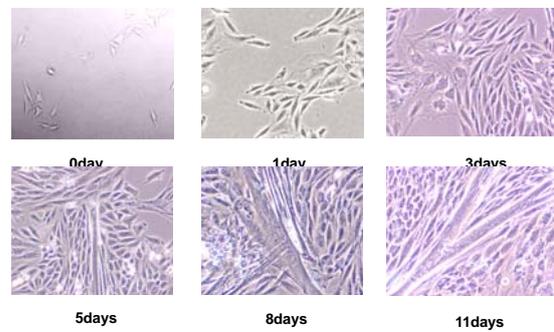


図1 L6筋芽/筋管細胞の分化

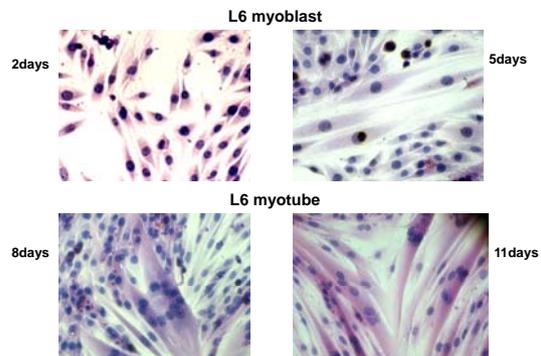


図2 L6細胞の分化の確認

(2) タンパク質の抽出および SDS-PAGE によるタンパク質およびリン酸化タンパク質の解析

培地を取り除き冷却した PBS で洗浄後、RIPA Lysis Buffer を用いて細胞を回収し、21G の針で 10 回混和し、氷上で 30-60 分静置した。その後、遠心分離 (12,000rpm, 4°C, 10min) した上清を試料とした。定法により SDS-PAGE を行った後、分離されたゲル上のタンパク質を PVDF 膜に転写しイムノブロット分析に供した。一次抗体を反応させた後二次抗体を反応させて最終的に HRP 発光試薬である ECL にて発光させてタンパク質バンドを検出した。

(3) リアルタイム PCR 法による遺伝子発現解析

培地を取り除き、PBS で洗浄後 Aurum Total RNA Mini Kit を用いて総 RNA を抽出した。抽出した RNA は PrimeScript RT reagent Kit を用いて逆転写反応を行い、cDNA を作成した。次に SYBR Premix Ex Taq を用いて、iQ5 リアルタイム PCR 解析システムにより mRNA 発現量を解析した。PCR 反応は、95°C10 秒初期変性した後、95°C5 秒、60°C30 秒の反応を 40 サイクル繰り返した。それぞれの遺伝子の mRNA 発現量は GAPDH の mRNA 量で補正し、算出した。

(4) ゲルシフト解析

細胞から抽出した核画分に定法により DIG 標識した MEF2consensus 配列のオリゴ DNA およびゲルシフト解析用の試薬を加え室温で 15 分インキュベートした。その後未変性ゲルにより 80V 一定電圧でタンパク質-DNA 複合体を分離した。その後平行化したナイロンメンブレンに転写し、POD 標識した抗 DIG 抗体により交差反応させ CSPD を用いて発光検出した。

(5) L6 細胞による糖および脂肪酸取り込み量と中性脂肪 (TG) 蓄積量の測定

①糖取り込み量の測定

細胞に、各試薬 (酢酸、AICAR、インスリン) を添加し 24 時間、48 時間培養後、培地を回収した。培地中のグルコース濃度をグルコース CII-テストワコーを用いて測定し、細胞による糖取り込み量を算出した。

②脂肪酸取り込み量の測定

BSA に溶かしたパルミチン酸を約 250 μ Eq/1 になるように培地に添加した。さらに各試薬 (酢酸、AICAR) を添加し 24 時間、48 時間培養後、培地と細胞を回収した。回収した培

地中の NEFA 濃度を NEFA C-テストワコーを用いて測定し、細胞による脂肪酸取り込み量を算出した。

③TG 蓄積量の測定

回収した細胞を破碎後、遠心分離 (4°C, 1300rpm, 5min) し、上清中の TG 量をカイノスのキットを用いて測定し、細胞による TG 蓄積量を算出した。

(6) 蛍光免疫染色

L-リジンコートしたカバーガラス上で細胞を培養し、酢酸等の試薬を添加後 PBS で洗浄、4%パラホルムアルデヒドで固定、10mM グリシン/PBS で洗浄、0.1%Triton X-100/PBS で透過処理を行った。次に PBS で洗浄、3% BSA/PBS でブロッキング後、一次抗体で 4°C、一晚反応させた。さらに 0.01%Tween/PBS で洗浄後、二次抗体を暗室で 1 時間インキュベートした。退色防腐剤入り封入剤でマウントし、共焦点レーザー顕微鏡にて蛍光免疫染色した細胞を観察した。

4. 研究成果

(1) L6 筋芽/筋管細胞における酢酸のミオグロビン、GLUT4 発現に及ぼす影響

L6 筋管細胞に酢酸を添加すると、酢酸は 48 時間後まで継続して吸収された (図 3)。

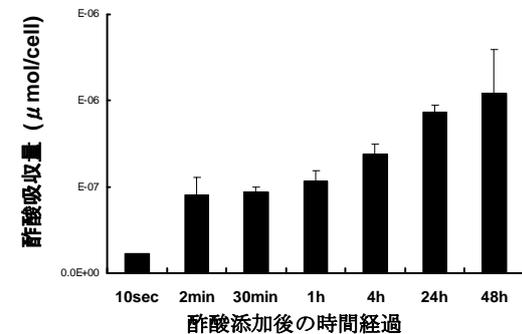


図3 L6筋管細胞による酢酸の吸収

酢酸が細胞内で代謝されると AMP が生成されるため、核酸の濃度を測定すると AMP が増加し AMP/ATP 比は、コントロールと比較して、酢酸添加 2 分で約 3 倍、30 分で約 2 倍、1 時間で約 6 倍、4 時間で約 4 倍、24 時間で約 2 倍していた (表 1)。またそれに伴い AMP キナーゼ (AMPK) のリン酸化が促進し、AMPK 阻害剤である compoundC の共存によりリン酸化は低下した (図 4)。

さらにミオグロビンおよび GLUT 4 の mRNA 発現レベルをリアルタイム PCR 法により測定した結果、ミオグロビン遺伝子は、酢酸添加 2 分で 2.9 倍、30 分で 1.2 倍、

表 1 酢酸によるL6筋骨細胞のAMP/ATP比に対する影響

Time(min)	ATP		ADP		AMP		total	AMP/ATP
	μmol/g							
0	21.41 ± 10.80	5.09 ± 1.95	0.89 ± 0.13	1.57 ± 0.41	27.72 ± 4.37	0.063 ± 0.036		
0.5	18.52 ± 4.89	6.48 ± 0.28	2.47 ± 1.61*	3.38 ± 2.85	30.08 ± 0.98	0.130 ± 0.134		
2	21.44 ± 3.81	7.27 ± 0.43	6.75 ± 3.01	4.04 ± 1.18*	40.68 ± 1.16	0.298 ± 0.163		
30	18.95 ± 1.74	8.66 ± 0.53	8.14 ± 0.77*	3.47 ± 2.68**	29.46 ± 2.99	0.109 ± 0.074*		
60	21.72 ± 5.19	10.43 ± 1.11	4.04 ± 1.18*	3.47 ± 2.68**	29.46 ± 2.99	0.109 ± 0.074*		
240	19.13 ± 2.57	8.14 ± 0.77*	4.04 ± 1.18*	3.47 ± 2.68**	29.46 ± 2.99	0.109 ± 0.074*		
1440	17.90 ± 2.92	8.09 ± 3.73**	3.47 ± 2.68**	3.47 ± 2.68**	29.46 ± 2.99	0.109 ± 0.074*		

Adnine nucleotides in L6 myotubes treated with 500μM acetate for indicated time periods. Each date value is shown as the mean ± SD (n=3-4). Statistical differences are shown as **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001 compared with that 0 min point.

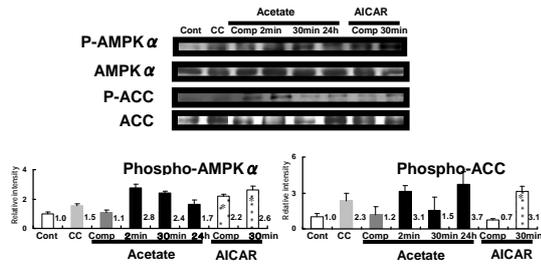


図4 L6筋骨細胞におけるAMPKリン酸化およびACCリン酸化に及ぼす酢酸の影響

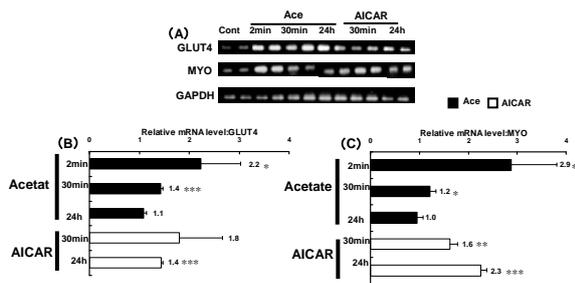


図5 L6筋骨細胞のGLUT4およびミオグロビン遺伝子の発現における酢酸の影響

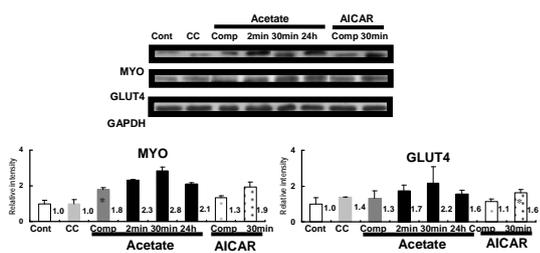


図6 L6筋骨細胞におけるミオグロビンおよびGLUT4のタンパク質発現に及ぼす酢酸の影響

AICAR 添加 30 分で 1.6 倍、24 時間で 2.3 倍増加していた (図 5)。GLUT4 遺伝子については、コントロール群と比較して酢酸添加 2 分で 2.2 倍、30 分で 1.4 倍、AICAR 添加 30 分で 1.8 倍、24 時間で 1.4 倍に増加していた。また、GLUT4 及び MYO 遺伝子発現における酢酸濃度の影響を調べたところ、濃度依存的に

遺伝子発現レベルの増加傾向が見られた。さらに酢酸によりミオグロビンおよび GLUT4 はタンパク質レベルにおいても増加していた (図 6)。ミオグロビンや GLUT4 遺伝子の発現制御には転写因子 MEF2A が関わっていると報告されている。酢酸により AMPK のリン酸化が促進すると MEF2A が活性化されるかどうかを調べたところ、酢酸の添加により核内における MEF2A レベルが増加していた (図 7)。また酢酸により MEF2A のリン酸化が増加した (図 8)。ゲルシフト分析により MEF2A の DNA 結合活性を測定すると、酢酸の添加により活性が増加した。

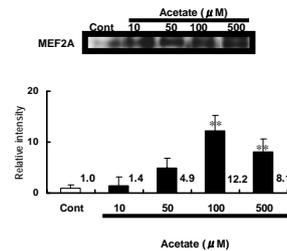


図7 酢酸によるL6筋骨細胞におけるMEF2Aの核内局在

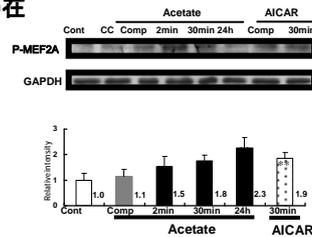


図8 L6筋骨細胞におけるMEF2Aのリン酸化に及ぼす酢酸の影響

さらに共焦点レーザー顕微鏡を用いて MEF2A の細胞内局在を観察すると、酢酸添加により MEF2A の局在は核内に移行していた (図 9)。MEF2A 活性化は AMPK による MEF2A のリン酸化により起こると推測し、酢酸による MEF2A (Thr312) リン酸化

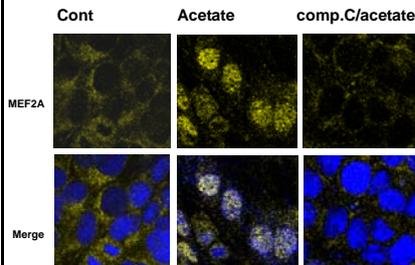


図9 酢酸によるL6筋骨細胞のMEF2Aの局在変化

レベルの変化を解析した。その結果酢酸添加によりそのリン酸化レベルが増加していた。これより、酢酸は AMPK の活性化を促進し、転写因子 MEF2A のリン酸化、核内移行および DNA 結合能を増加させミオグロビンの転写を増加することが強く示唆された。

(2)筋芽/筋管細胞における酢酸の脂肪代謝促進および糖取り込み促進効果の検討
筋管細胞における糖取り込み量、脂肪酸取り込み量および脂肪蓄積量を測定した。酢酸を添加した細胞では糖取り込み量が増加していた (図 10)。培地中にパ

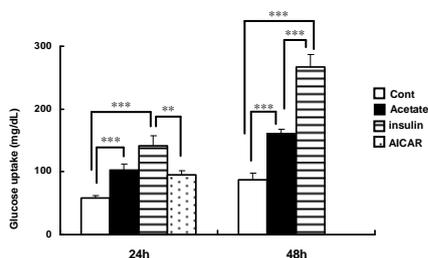


図10 L6筋管細胞におけるグルコースの取り込み量に及ぼす酢酸の影響

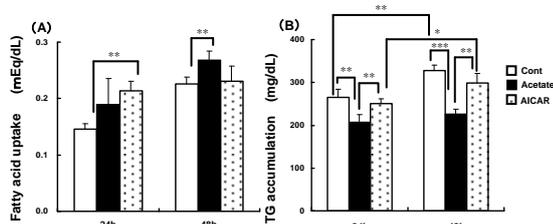


図11 L6筋管細胞における脂肪酸の取り込み量および中性脂肪の蓄積量に及ぼす酢酸の影響

ルミチン酸を添加した場合の脂肪酸取り込みと細胞中の中性脂肪 (TG) 蓄積量を測定したところ、脂肪酸取り込み量は、酢酸及び AICAR 添加 24 時間でコントロールと比べて増加しており、AICAR では有意に取り込みが増加していた。また、48 時間後においては、AICAR ではコントロールとあまり変化が見られなかったが、酢酸添加ではコントロールと比較して有意に取り込み量が増加していた (図 11)。一方、細胞への TG 蓄積は酢酸添加により、24 時間、48 時間後ともコントロールと比較して有意に減少していた (図 11)。また、コントロールおよび AICAR では 24 時間後から 48 時間後で有意な増加が見られたのに対して、酢酸添加では蓄積量の増加

は見られなかった。酢酸添加により糖取り込みや脂肪燃焼が増加していると考えられる。以上の結果より、酢酸は骨格筋における AMPK のリン酸化を介してミオグロビンや GLUT4 遺伝子の発現を促進し脂肪代謝や糖取り込みを促進させることが示唆された。

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 13 件)

- ① Ishikawa, A., Hiemori, M., Kimoto, M., Yamashita, H., Tsuji, H., Development of a method for the determination of γ -aminobutyric acid in foodstuffs, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 55(3):292-5 (2009).
- ② Yamashita, H., Maruta, H., Jozuka, M., Kimura, R., Iwabuchi, H., Yamato, M., Saito, T., Fujisawa, K., Takahashi, Y., Kimoto, M., Hiemori, M., Tsuji, H., 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(3), 570-576 (2009).

[学会発表] (計 39 件)

- ① 山口由美子、小倉千明、松田知果、森はるか、我如古菜月、木本眞順美、辻英明、高橋吉孝、山下広美、動物のエネルギー代謝における運動トレーニングと酢酸取り込みの影響、第44回日本栄養・食糧学会中国・四国支部大会、平成23年1月13日、岡山県立大学 (総社市)
- ② 吉岡尚美、丸山祐佳、我如古菜月、治部祐里、山下広美、ままかりの酢漬け処理における魚肉の機能性および物性変化、第58回日本家政学会中国・四国支部大会、平成23年10月8日、鳴門教育大学 (徳島市)
- ③ 田中あや、丸田ひとみ、我如古菜月、木本眞順美、辻英明、高橋吉孝、山下広美、L6細胞における分化レベルによるAMPKおよびMEF2Aの細胞内局在変化とそれらに及ぼす酢酸の影響、第84回日本生化学会大会、平成23年9月23日、国立京都国際会館 (京都市)
- ④ 丸山祐佳、土井絵梨子、中田和江、我如古菜月、木本眞順美、辻英明、高橋吉孝、山下広美、マクロファージの免疫能に及ぼす酢酸の影響、平成23年度日本農芸化学会西日本支部・中四国支部合同大会、平成23年9月17日、宮崎大学 (宮崎市)

- ⑤ 山下広美、酢酸の代謝と酢酸が脂質代謝に及ぼす影響に関する研究、日本農芸化学会中四国支部創立10周年記念第30回講演会、平成23年5月21日、岡山大学（岡山市）
- ⑥ 山口由美子、小倉千明、我如古菜月、木本眞順美、辻英明、高橋吉孝、山下広美、動物のエネルギー代謝における運動トレーニングと酢酸摂取の影響、第65回日本栄養・食糧学会大会、平成23年5月14日、お茶の水女子大学（東京都）
- ⑦ 山下広美、Improvement of Obesity and Glucose Tolerance by Acetate in Rats、Keystone Symposia- Type 2 Diabetes, Insulin Resistance and Metabolic Dysfunction、平成23年1月16日、Keystone, Colorado, USA.
- ⑧ 田中あや、丸田ひとみ、我如古菜月、木本眞順美、辻英明、高橋吉孝、山下広美、L6筋管細胞分化過程におけるAMPK α およびMEF2Aの細胞内局在変化とそれらのリン酸化に及ぼす酢酸の影響、日本農芸化学会2010年度大会、平成23年3月27日、京都女子大学（京都市）
- ⑨ 田中あや、丸田ひとみ、我如古菜月、木本眞順美、辻英明、高橋吉孝、山下広美、L6筋管細胞におけるエネルギー代謝に及ぼす酢酸の影響、日本農芸化学会中四国支部第29回講演会、平成23年1月22日、徳島大学
- ⑩ 田中あや、丸田ひとみ、我如古菜月、木本眞順美、辻英明、高橋吉孝、山下広美、L6筋管細胞のAMPK活性化とエネルギー代謝に及ぼす酢酸の影響、第83回日本生化学会大会、平成22年12月7-10日、神戸ポートアイランド
- ⑪ 我如古菜月、黒田順子、椿苑子、木本眞順美、辻英明、山下広美、酢を添加した野菜搾汁液の機能性の検討、第43回日本栄養・食糧学会中国・四国支部大会、平成22年11月7日、高知女子大学（高知市）
- ⑫ 山下広美、脂肪肝予防や筋肉における脂肪燃焼を促進する食品中の機能性成分、第43回日本栄養・食糧学会中国・四国支部大会、平成22年11月6日、高知女子大学（高知市）
- ⑬ 山下広美、多賀友里恵、小宮山展子、我如古菜月、木本眞順美、辻英明、羽原正秋、果実浸漬酢の酸味評価の解析、日本調理科学会大会、平成22年8月27日、中村学園大学（福岡市）
- ⑭ 山下広美、熊野愛恵、横田博美、中野裕子、田中恵里、小宮山展子、木本眞順美、中田和江、辻英明、内臓脂肪細胞における脂

肪滴肥大化に対する酢酸の影響、第64回日本栄養・食糧学会大会、平成22年5月21-23日、アスティとくしま（徳島市）

- ⑮ 山下広美、食酢の肥満抑制効果とメタボリックシンドローム予防、第38回日本総合検診医学会 ランチョンセミナー、平成22年1月23日
- ⑯ 山下広美、熊野愛恵、横田博美、中野裕子、小宮山展子、木本眞順美、高橋吉孝、辻英明、3T3-L1 脂肪細胞における酢酸の影響、日本農芸化学会2010年度大会、平成22年3月28日、東京大学駒場キャンパス
- ⑰ 山下広美、多賀友里恵、木本眞順美、比江森美樹、辻英明、果実浸漬酢の飲みやすさと含有成分との関連、日本家政学会第61回大会、平成21年8月31日、武庫川女子大学
- 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、平成21年5月22日、長崎ブリックホール・長崎新聞文化ホール・長崎文化放送ホール

〔図書〕（計1件）

山下広美、(株)大学教育出版、酢つきり爽快酢の健康レシピ、2011年6月132ページ

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.fhw.oka-pu.ac.jp/eiyo/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下 広美 (YAMASHITA HIROMI)

岡山県立大学・保健福祉学部・教授
研究者番号：70254563

(2) 研究分担者

木本 眞順美 (KIMOTO MASUMI)

岡山県立大学・保健福祉学部・教授
研究者番号：40108866

高橋 吉孝 (TAKAHASHI YOSHITAKA)

岡山県立大学・保健福祉学部・教授
研究者番号：10236333

(3) 連携研究者

なし