

大豆たん白質の抗肥満効果における褐色脂肪組織内脱共役たん白質の関与：OLETF ラットのカロリー制限による減量実験での検討

森 豊¹・斉藤昌之²・黒川修行³・小宮秀明³・池田義雄^{*4}

¹ 国立療養所東宇都宮病院 ² 北海道大学大学院獣医学研究科

³ 宇都宮大学教育学部 ⁴ 東京慈恵会医科大学健康医学センター

Effect of Soy Protein Isolate on Uncoupling Protein in Brown Adipose Tissue in the Experiment of Body Weight Reduction by Energy Restriction Using OLETF Rats

Yutaka MORI¹, Masayuki SAITOH², Naoyuki KUROKAWA³,
Hideaki KOMIYA³ and Yoshio IKEDA⁴

¹ National Higashi Utsunomiya Hospital, Utsunomiya 329-1104

² Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University, Sapporo 060-0818

³ Faculty of Education, Utsunomiya University, Utsunomiya 321-8505

⁴ Center for General Health Care, The Jikei University School of Medicine, Tokyo 105-8461

ABSTRACT

Effect of soy protein isolate (SPI) on the mitochondrial uncoupling protein (UCP) was examined in the experiment of body weight reduction by energy restriction using a genetically obese-hyperglycemic OLETF rat. Obese OLETF rats whose body weights were over 600 g were fed with the energy-restricted diets containing SPI or casein as protein source for 3 weeks. Body weight reduction was significantly greater and body fat content was significantly decreased in SPI-diet group compared with those in casein-diet group, although body protein content was significantly higher in SPI-diet group. Moreover, the decrease in plasma levels of leptin and FFA was significantly greater in SPI-diet group. There was no significant difference in UCP1 mRNA levels in brown adipose tissue (BAT) between casein-diet and SPI-diet groups. Concerning the cellularity of subcutaneous and retroperitoneal adipose tissues, the average size of white adipocytes in SPI-diet group was significantly smaller than in casein-diet group. In the experiment of body weight reduction by energy restriction using obese animal model, it was unclear whether the mitochondrial UCP in BAT contributed to anti-obesity effect of SPI. The decrease in plasma leptin and FFA levels in SPI-diet group might be caused by the transformation into small-sized adipocytes. *Soy Protein Research, Japan* **2**, 118-124, 1999.

Key words : Otsuka Long Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats, soy protein isolate (SPI), brown adipose tissue (BAT), uncoupling protein (UCP), cellularity of adipose tissue

*〒 105-8461 東京都港区西新橋 3-25-8

熱産生臓器である褐色脂肪組織 (brown adipose tissue, BAT)¹⁾ の機能低下が、肥満の一成因になりうる事が各種の実験肥満モデルにおいて証明されており^{2,3)}、この低下した BAT 機能の活性化が肥満の軽減に有効である可能性が報告されている⁴⁾。一方、大豆ペプチドが交感神経系の活性化を介して BAT での熱産生を亢進させ、エネルギー効率の低下を引き起こすことが報告されている^{5,6)}。さらに、我々は大豆たん白質 (大豆ペプチド) の長期摂取が内臓脂肪型肥満モデルである OLETF ラット⁷⁻⁹⁾ におけるエネルギー効率を低下させ、肥満の進展を軽減させる効果を持たらすという成績¹⁰⁾や肥満を既に呈した OLETF ラットに対し、摂取カロリーを 60% に制限した低エネルギー食を与えて減量させた際の、大豆たん白質の効果を報告した¹¹⁾。

そこで今回は、大豆たん白質の抗肥満効果の機序を検討する目的で、肥満 OLETF ラットに対する低エネルギー食による減量実験において、褐色脂肪組織内脱共役たん白質 (uncoupling protein, UCP) ファミリーの mRNA 量を測定し、大豆たん白質並びにカゼイン投与間で比較検討した。

方 法

大塚製薬(株)より提供された生後4週齢の雄性 OLETF ラットを市販固形飼料 (MB3, 船橋農場(株)) にて 25 週齢まで個別ケージにて飼育して 600 g 以上の体重になったことを確認後、各群の体重が等しくなるように、Initial Control (IC) 群 (n = 5)、Casein 群 (n = 12)、大豆たん白質 (SPI) 群 (n = 12) の計 3 群に分けた。IC 群は群分けした直後に、同じく大塚製薬(株)より提供された同齢の正常対照 LETO ラット (NC 群) (n = 5) とともに 16 時間絶食後採血、解剖を行った。Casein 群、SPI 群の摂餌量は、実験開始前 7 日間のラットの 1 日平均摂餌量を計測、その 60% に設定した。実験食の基本組成は市販飼料 (MB3) と同等とし、実験開始後のたん白質摂取量を実験開始前と同程度に保つため、実験食のたん白質含量を 45% (N % × 6.25) に設定し、たん白質量の違いによる配合比の差はコーンスターチで補正した。Casein 群、SPI 群は個別ケージにて温度 23 ± 1℃、湿度 55 ± 5% で 12 時間明暗サイクル (7:00 ~ 19:00 照明) の条件下で 3 週間飼育した。飼育期間中、摂餌量は毎日、体重は 3 日に 1 回計測し、実験終了時 8:00 am より 6 時間絶食後、解剖した。

解剖時、眼窩静脈叢より採血し血漿をサンプルとして、血糖、インスリン (IRI)、レプチン (IRL)、中性

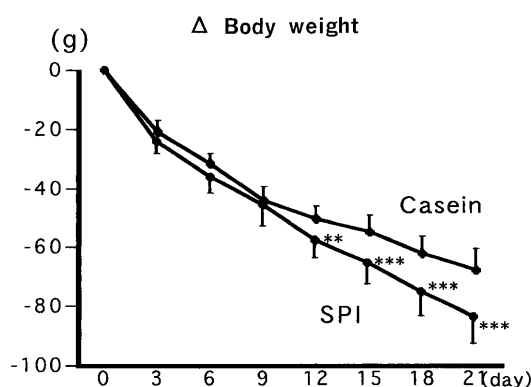
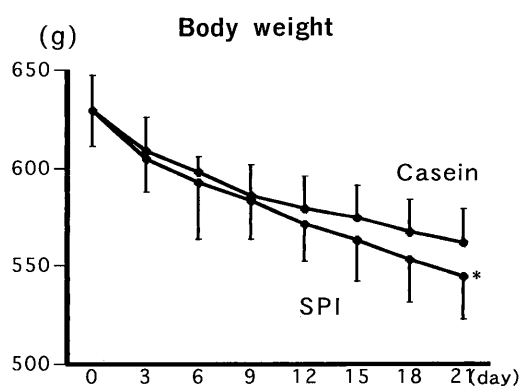
脂肪 (TG)、総コレステロール (TC)、遊離脂肪酸 (FFA) を測定した。体組成については、カーカス処理を行った後、体たん白質含量、体脂肪含量、体灰分含量を測定した。すなわち、体たん白質含量については、窒素素の定量をケルテックオートアナライザー 1030 (日本ゼネラル(株)) を用い、窒素たん白質換算係数として一律 6.25 を用いて粗たん白質含量を算出した。体脂肪含量は、ジエチルエーテル溶媒でエクスファット (日本ゼネラル(株)) を用いて脂肪を抽出し、抽出前後の重量差で算出した。体灰分含量は、600℃ で 4 時間加熱灰化した後の残存量で測定した。さらに、左後腹膜 (腎周囲) 脂肪、腸間膜脂肪、左副睾丸周囲脂肪、左腹部皮下脂肪の各脂肪組織重量の測定を行った。後腹膜脂肪、腸間膜脂肪、副睾丸周囲脂肪の合計を腹腔内脂肪とし、腹部皮下脂肪の切除範囲は、Krotkiewski and Björntorp の方法¹²⁾ に従った。各脂肪組織は、20% ホルマリン固定パラフィンブロック封埋後 HE 染色を行い、組織標本を用いて光学顕微鏡下、画像解析装置で単位面積当たりの脂肪細胞数から平均脂肪細胞面積を算出するとともに、一部の標本については個々の脂肪細胞の面積を計測し、度数分布を作成した。褐色脂肪組織内 UCP ファミリーの定量は、褐色脂肪組織より RNA を抽出し、UCP1, UCP2, UCP3 の cDNA プローブを 32P-CTC でラベルして Northern blot hybridization 法により mRNA 量を定量した。全ての UCP 活性はスタンダードとして用いた glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) の値で補正した。

統計処理として、数値は全て、Mean ± SD で表し、有意差検定は unpaired *t*-test を用いた。

結 果

実験開始前に計測した市販飼料の 1 日平均摂取量から算出した Casein 群、SPI 群の飼料投与量は、16.0 g/日であった。Casein 群、SPI 群の体重は両群ともに実験開始後の経過に伴い減少したが、SPI 群の体重は Casein 群と比較し実験開始直後より、より減少傾向が強く、実験開始 21 日目においては SPI 群の体重は Casein 群と比較して有意な減少を示した (Fig. 1)。また、体重変化量で評価すると、実験開始 12 日目以後、SPI 群の体重減少は Casein 群と比較して有意に大きかった (Fig. 1)。すなわち、エネルギー効率に関して、SPI 群は Casein 群より全期間を通じて低い傾向にあり、特に実験開始 12 日目以後は、SPI 群のエネルギー効率は Casein 群と比較して有意に低かった (Fig. 2)。

実験終了時における体組成の分析では、SPI 群は



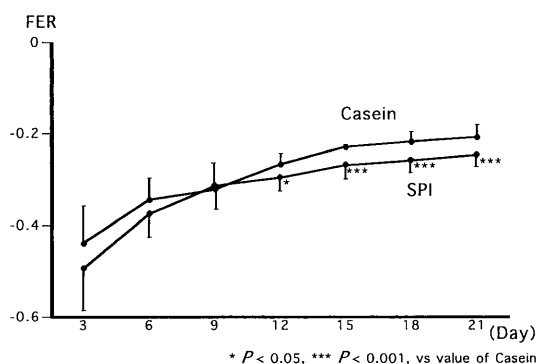
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs value of Casein

Fig. 1. Changes in body weights and body weight gains in casein-diet and SPI-diet groups.

Casein 群と比較して体脂肪%が有意に減少しており、逆に体たん白質%が有意に増加していた (Fig. 3)。また、体脂肪分布の検討では、SPI 群の腹腔内脂肪、腹部皮下脂肪の組織重量はいずれも Casein 群と比較して有意に低下していた。

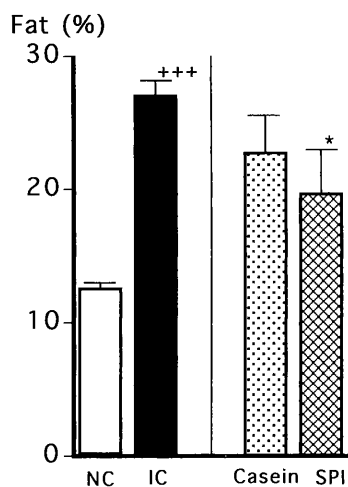
実験終了時の血糖、IRI については、Casein 群と SPI 群の間で有意差は認められなかったが、SPI 群の IRL は Casein 群と比較して有意に低下していた。また、脂質に関しても、TG については両群間に有意差を認めなかったが、SPI 群の TC、FFA は Casein 群と比較して有意に低下していた。

褐色脂肪組織の UCP に関しては、IC 群と NC 群の間で UCP1 mRNA に有意差は認められなかったが、SPI

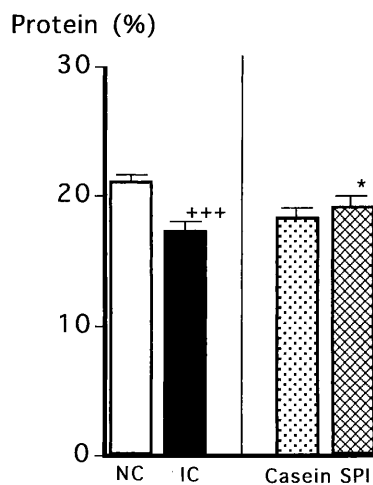


* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, vs value of Casein

Fig. 2. Changes in food efficacy in casein-diet and SPI-diet groups.



+++ : $P < 0.001$, vs value of NC



* : $P < 0.05$, vs value of Casein

Fig. 3. Body composition analysis in normal control (NC) LETO, initial control (IC) OLETF, casein-diet and SPI-diet groups.

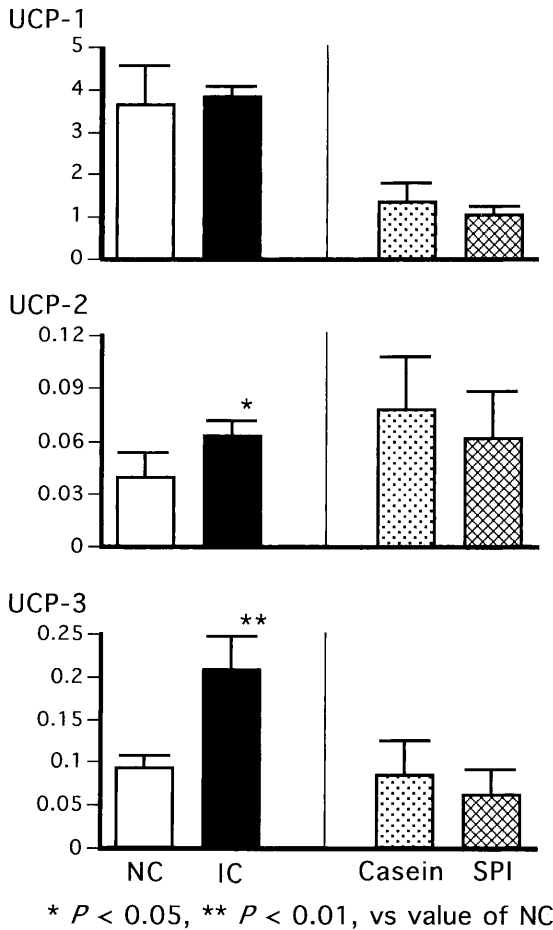


Fig. 4. Uncoupling protein mRNA levels in brown adipose tissue in normal control (NC) LETO, initial control (IC) OLETF, casein-diet and SPI-diet groups.

群の UCP1 mRNA は Casein 群と比較して有意差はないもののむしろ低下していた。UCP2 mRNA, UCP3 mRNA に関しては、IC 群は NC 群と比較して有意に増加していたが、SPI 群と Casein 群の間では有意差は認められなかった (Fig. 4)。

脂肪組織の cellularity について、腹部皮下脂肪組織の平均脂肪細胞面積は、SPI 群において Casein 群と比較して有意に減少していた (Fig. 5)。一方、後腹膜脂肪組織の平均脂肪細胞面積についても、有意差はないものの、SPI 群において減少傾向であった (Fig. 5)。さらに、脂肪細胞面積の度数分布では、いずれの脂肪組織においても SPI 群は Casein 群と比較してそのピークが左方にシフトしており、SPI 群において脂肪細胞の小径化が観察された (Fig. 6)。

BAT はエネルギー貯蔵を目的とする白色脂肪組織と異なり、寒冷時と過食後に熱産生を行い、エネルギーを消費する重要な部位として知られている。また、BAT の熱産生は交感神経系の刺激を介して行われており、肥満動物では、しばしば BAT の熱産生能に障害があり、これが肥満の一成因になると考えられている。このため、逆に、この BAT 機能の活性化が肥満の軽減に有効である可能性も報告されている。斉藤は、大豆たん白質由来の大豆ペプチドの肥満改善効果を GTG 肥満マウスと MSG 肥満マウスを用いて検討し、大豆ペプチドが交感神経の活性化を介して熱産生機能を有する BAT の活性を高める成績¹³⁾を、さらには大豆たん白質の摂取が肥満の改善に結びつく可能性¹⁴⁾を報告している。これらの成績を踏まえて、今回の実験における SPI の肥満改善効果の機序にも BAT での熱産生の亢進が寄与している可能性が考えられたため、BAT 中の UCP mRNA の測定を行った。褐色脂肪組織に特異的に存在しエネルギー消費調節系の重要な役割を担っている UCP1¹⁵⁾に関して、IC 群と NC 群の間では有意差を認めず、また予想に反して SPI 群では Casein 群よりも有意差はないもののむしろ低下していた。すなわち、OLETF ラットにおいてはその肥満の成因として褐色脂肪組織でのエネルギー消費調節系障害の関与は否定的と考えられた。さらに、SPI 群の UCP1 mRNA が Casein 群よりもむしろ低下していた理由として、実験終了時の SPI 群の体重が Casein 群よりも有意な低体重であったことが考えられる。すなわち、大豆たん白質の褐色脂肪組織内 UCP1 への直接的作用よりも、大豆たん白質による熱産生亢進を介して結果的に肥満が改善された効果の方がより大きかった可能性が考えられた。さらに、遺伝性肥満糖尿病モデルである Yellow KK マウスに β_3 -受容体作動薬を投与した実験では UCP の発現増加を伴う褐色脂肪の過形成に加えて、白色脂肪組織や骨格筋にまで UCP が出現し、熱産生能が全身的に亢進し、効果的に体脂肪が減少する成績が報告されている¹⁶⁾。今回の実験では、褐色脂肪組織以外に白色脂肪組織や骨格筋など全身組織に広汎に存在する UCP2^{17,18)}や骨格筋の主要な UCP と考えられる UCP3^{19,20)}について BAT 内での測定は行ったが、白色脂肪組織や骨格筋での検討は行わなかった。このような理由から、今回の実験における IC 群 (OLETF ラット) の BAT 内 UCP2 mRNA, UCP3 mRNA が NC 群 (LETO ラット) と比較して有意に増加していた原因も明らかでない。

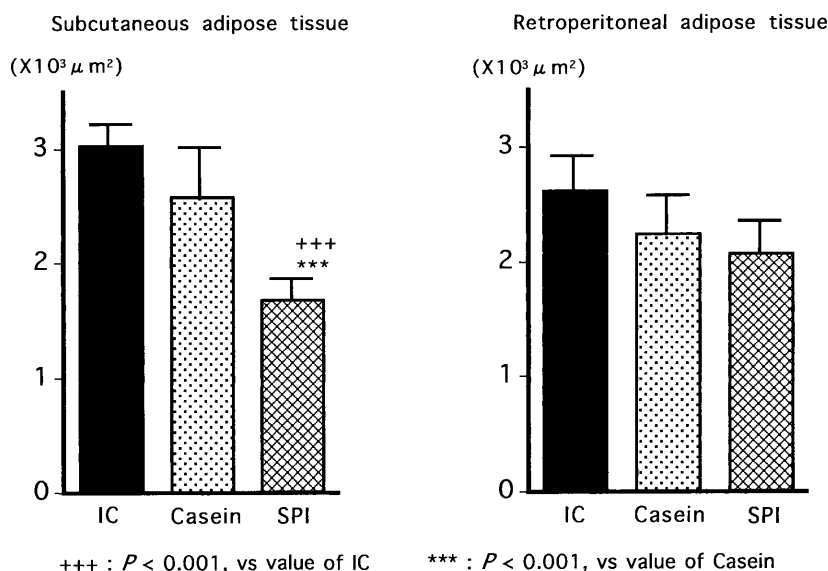


Fig. 5. Average size of adipocytes in initial control (IC) OLETF, casein-diet and SPI-diet groups. Subcutaneous and retroperitoneal adipose tissues were stained by hematoxylin and eosin after formalin fixation. All sections were cut to a thickness of 20 μm . Number of adipocytes and their sizes in a fixed area (900,000 μm^2) were quantitated by an image analysis system.

今後、大豆たん白質のUCPに対する作用をより明確にするためには、対照たん白質を摂取させた動物と体重に差のない条件下での検討、さらには、褐色脂肪組織以外の白色脂肪組織や骨格筋などにおけるUCP2、UCP3の検討が必要と思われる。

次に脂肪組織のcellularityの検討において、腹部皮下脂肪組織、後腹膜脂肪組織の平均脂肪細胞面積は、SPI群においてCasein群と比較して有意に減少しており、脂肪細胞面積の度数分布でも、両脂肪組織においてSPI群はCasein群と比較してそのピークが左方にシフトして、脂肪細胞の小径化が観察された。最近、脂肪組織のcellularityとインスリン抵抗性の関連性が提唱されているが²¹⁾、今回の実験で観察された大豆たん白質による体脂肪量の減少は脂肪細胞のサイズの減少(小型化)によるものであり、この変化がインスリン抵抗性、レプチン抵抗性、高FFA血症を改善したものと思われた。しかし、SPI群における脂肪細胞の小型化の機序は不明であり、PPAR γ などとの関連も含めて今後の検討を要する。

以上、大豆たん白質の抗肥満効果の機序として、褐色脂肪組織のUCPの関与に関しては、今回の実験では明らかでなかった。なおSPI群でみられた有意な減量

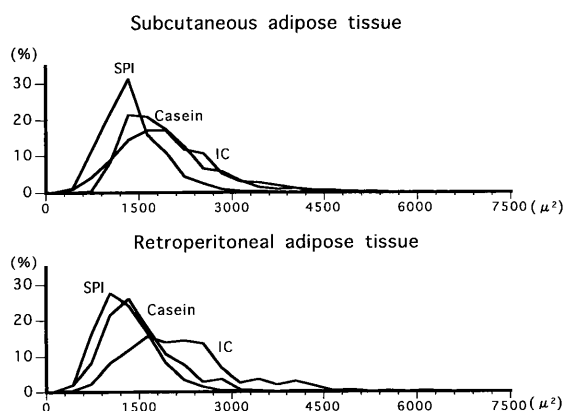


Fig. 6. Distribution of sizes of white adipocytes. The representative results from initial control (IC) OLETF, casein-diet and SPI-diet groups in subcutaneous and retroperitoneal adipose tissues.

は、インスリン抵抗性、レプチン抵抗性、高FFA血症の改善をもたらした。その機序としては、脂肪組織におけるcellularityの変化(脂肪細胞の小型化)が考えられた。しかし、脂肪細胞の小型化がどうして起こってくるのか、そのメカニズムは不明であり、今後の検討課題としたい。

要 約

大豆たん白質の抗肥満効果の機序を検討する目的で、内臓脂肪型肥満 OLETF ラットに対し摂取カロリーを 60% に制限して減量させた際の褐色脂肪組織内 UCP ファミリーの mRNA 量を測定し、大豆たん白質並びにカゼイン投与間で比較検討した。4 週齢の雄性 OLETF ラットを 25 週齢まで飼育して肥満状態にした後、Initial-Control (IC) 群、60% カロリー制限大豆たん白質 (SPI) 群、60% カロリー制限 Casein 群の 3 群に分け、SPI 群、Casein 群を 3 週間経過観察した。IC 群は同齢の正常対照 LETO ラット (NC 群) とともに実験開始時に解剖した。SPI 群、Casein 群の体重は両群ともに経過に伴い減少したが、2 週以後の SPI 群の体重は、Casein 群と比較して有意な減少を示した。実験終了時における体組成の分析では、SPI 群は Casein 群と比較して体脂肪% が有意に減少しており、逆に体たん白質% が有意に増加していた。さらに、体脂肪分布の検討では、SPI 群の腹腔内脂肪、皮下脂肪の組織重量はいずれも Casein 群と比較して有意に低下していた。さらに、SPI 群の血中レブチン、FFA も、Casein 群と比較して有意に低下していた。褐色脂肪組織の UCP に関しては、IC 群と NC 群の間で UCP1 mRNA に有意差は認められなかったが、SPI 群の UCP1 mRNA は Casein 群と比較して低下傾向にあった。UCP2 mRNA、UCP3 mRNA に関しては、IC 群は NC 群と比較して有意に増加していたが、SPI 群と Casein 群の間では有意差は認められなかった。一方、内臓脂肪と皮下脂肪の脂肪組織の cellularity の検討では、いずれの脂肪組織においても、SPI 群、Casein 群とも IC 群と比較して脂肪細胞の小径化が観察されたが、SPI 群は Casein 群と比較してより小径化していた。大豆たん白質の抗肥満効果の機序として、褐色脂肪組織の UCP の関与に関しては、今回の実験では明らかでなかった。なお、SPI 群でみられた有意な減量は、インスリン抵抗性、レブチン抵抗性、高 FFA 血症の改善をもたらしたが、その機序として脂肪組織における cellularity の変化 (脂肪細胞の小型化) が考えられた。

文 献

- 1) Rothwell NJ and Stock MJ (1979) : A role for brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis. *Nature*, **281**, 31-35.
- 2) Yoshida T, Nishioka H, Nakamura Y and Kondo M (1984) : Reduced norepinephrine turnover in mice with monosodium glutamate-induced obesity. *Metabolism*, **33**, 1060-1063.
- 3) Yoshida T, Nishioka H, Yoshioka K and Kondo M (1987) : Reduced norepinephrine turnover in interscapular brown adipose tissue of obese rats after ovariectomy. *Metabolism*, **36**, 1-6.
- 4) Arch JR, Ainsworth AT, Cawthorne MA, Piercy V, Sennitt MV, Thody VE, Wilson C and Wilson S (1984) : Atypical β -adrenoceptor on brown adipocytes as target for anti-obesity drugs. *Nature*, **309**, 163-165.
- 5) 斉藤昌之 (1989) : 大豆たん白質ペプチドの経管栄養への応用 : 熱産生に及ぼす影響。大豆たん白質栄養研究会誌, **10**, 81-83.
- 6) 斉藤昌之 (1990) : 交感神経活動に及ぼす大豆たん白質ペプチドの影響。大豆たん白質栄養研究会誌, **11**, 95-97.
- 7) Kawano K, Hirashima T, Mori S, Saitoh Y, Kurosumi M and Natori T (1992) : Spontaneous long-term hyperglycemic rat with diabetic complications Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) strain. *Diabetes*, **41**, 1422-1428.
- 8) Mori Y, Yokoyama J, Nemoto M, Katoh S, Nishimura M and Ikeda Y (1992) : Characterization of a new genetically obese-hyperglycemic OLETF rat. *Jikeikai Med J*, **39**, 349-359.
- 9) 森 豊, 横山淳一, 畑 章一, 加藤秀一, 村川祐一, 磯貝行秀 (1994) : 肥満を伴った自然発症糖尿病 OLETF ラットに関する研究 - 第 3 報 : Zucker fa/fa ラットとの比較検討 -。第 14 回日本肥満学会記録, 275-279.
- 10) 森 豊, 畑 章一, 村川祐一, 加藤秀一, 池田義雄 (1996) : 内臓脂肪型肥満 OLETF ラットの体脂

- 肪分布並びに耐糖能に及ぼす大豆たん白質の効果. 大豆たん白質研究会会誌, **17**, 108-113.
- 11) 森 豊, 青山敏明, 福井健介, 黒川修行, 小宮秀明, 池田義雄 (1998) : OLETF ラットのカロリー制限による減量に及ぼす大豆たん白質の効果. 大豆たん白質研究, **1**, 96-101.
 - 12) Krotkiewski M and Björntorp P (1979) : The effect of progesterone and of insulin administration of regional adipose tissue cellularity in the rat. *Acta Physiol Scand*, **96**, 122-127.
 - 13) 斉藤昌之 (1991) : 肥満モデル動物におけるエネルギー代謝と大豆たん白質ペプチド. 大豆たん白質栄養研究会会誌, **12**, 91-94.
 - 14) 斉藤昌之 (1992) : 肥満モデル動物における大豆ペプチドの減量効果. 大豆たん白質栄養研究会会誌, **13**, 50-52.
 - 15) Kingenber M (1990) : Mechanism and evaluation of the uncoupling protein of brown adipose tissue. *Trends Biochem Sci*, **15**, 108-112.
 - 16) Nagase I, Yoshida T, Kumamoto K, Umezawa T, Sakane N, Nikami H, Kawada T and Saito M (1996) : Expression of uncoupling protein in skeletal muscle and white fat of obese mice treated with thermogenic β_3 -adrenergic agonist. *J Clin Invest*, **97**, 2898-2904.
 - 17) Fleury C, Neverova M, Collins S, Raimbault S, Champigny O, Levi-Meyrueis C, Bouillaud F, Seldin MF, Surwit RS, Ricquier D and Warden-CH (1997) : Uncoupling protein-2 : a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. *Nature Genet*, **15**, 269-272.
 - 18) Gimeno RE, Dembski M, Weng X, Deng N, Shyjan AW, Gimeno CJ, Iris F, Ellis SJ, Woolf EA and Tartaglia LA (1997) : Cloning and characterization of an uncoupling protein homologue. *Diabetes*, **46**, 900-906.
 - 19) Boss O, Samec S, Paoloni-Giacobino A, Rossier C, Dulloo A, Seydoux J, Muzzin P and Giacobino JP (1997) : Uncoupling-3 : a new member of the mitochondrial carrier family with tissue specific expression. *FEBS Lett*, **408**, 39-42.
 - 20) Vidal-Puig A, Solanes G, Grujic D, Flier JS and Lowell BB (1997) : UCP-3 : an uncoupling protein homologue expressed preferentially and abundantly in skeletal muscle and brown adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun*, **235**, 79-82.
 - 21) Okuno A, Tamemoto H, Tobe K, Ueki K, Mori Y, Iwamoto K, Umesono K, Akanuma Y, Fujiwara T, Horikoshi H, Yazaki Y and Kadowaki T (1998) : Troglitazone increases the number of small adipocytes without the change of white adipose tissue mass in obese Zucker rats. *J Clin Invest*, **101**, 1354-1361.