

ダイゼインのメスラット特異的食欲抑制効果

岸田太郎*・岩原麻美・海老原 清

愛媛大学農学部

Female Specific Appetite Regulation of Daidzein in Rats

Taro KISHIDA, Asami IWAHARA and Kiyoshi EBIHARA

Faculty of Agriculture, Ehime University Matsuyama 790-8566

ABSTRACT

Previously, we showed that soy isoflavone daidzein decreased food intake specifically in female rats. Although we have evaluated hypothalamus gene expression of appetite-related neurotransmitter to investigate the mechanism of decreasing food intake by daidzein, we have failed to acquire useful information, because of variation in the meal patterns of individual rats. In the present study, we examined hypothalamus gene expression of appetite-related neurotransmitter by synchronized meal pattern by means of meal feeding. After 10 days of training, the rats did not adapt meal feeding (two times) and daily food intake of rats in meal feeding is about 80% of rats in ad libitum feeding. Daidzein did not decrease the food intake of meal feeding rats (Experiment 1). After 12 days of training, the rats well adapted meal feeding (three times) and daily food intake of rats in meal feeding is well matched with rats in ad libitum feeding. Daidzein decreased the food intake of the meal feeding rats the same as in the ad libitum feeding rats (Experiment 2). In both experiments, we observed potential response of these gene expressions to decreasing food intake by daidzein after 14 days of test feeding but there is no explanation on the decrease of food intake by daidzein administration. Examination of more short-term meal feeding (three times) might be needed. *Soy Protein Research, Japan* **9**, 87-95, 2006.

Key words : soy isoflavone, daidzein, hypothalamus neurotransmitter, meal feeding, rat

*〒790-8566 松山市樽味3-5-7

目 的

先の研究で我々は大豆イソフラボン・ダイゼインがメス特異的な食欲低下作用をもたらすことを見出した。我々はこの作用物質と機構を明らかにすることを目指している。最近の研究により食欲制御のかかなりの部分が視床下部における食欲関連神経伝達物質の発現により制御されていることが明らかになりつつある (Fig. 1)¹⁻³⁾。またレプチンをはじめとする血液中の摂食シグナルの関与も報告されている⁴⁻⁶⁾。昨年度は視床下部食欲関連神経伝達物質の遺伝子発現および血中食

欲関連シグナルのプロファイルを調べたが、データにバラツキが多く (ラット間および実験ロット間)、飼料摂取量の低下を説明する現象は捉えられなかった。この原因は、食欲関連がエネルギー摂取に敏感に反応して変動している中で、自由摂取で飼料摂取タイミングがまちまちな飼育形態では正確なデータを捉えることができないためと推測した。そこで本年度は1日2回一定の短時間飼料を自由摂取させる2食制の飼育形態で飼料摂取タイミングを揃え、データを取得することを試みた。後述するように2食制では自由摂取と同等の飼料摂取量を確保させることができなかったため、申請の研究では3食制も試みた。

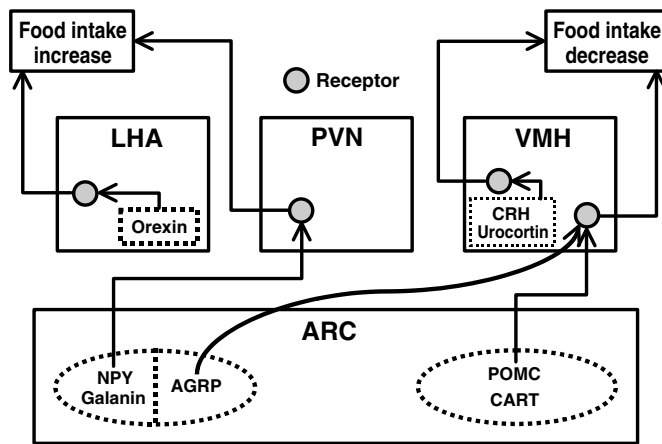


Fig. 1. Appetite-regulated factor in hypothalamus. Neuropeptide Y (NPY), Galanin, Agouti-gene related protein (AGRP) and Orexin were orectic factor. Cocaine and amphetamine-regulated transcript (CART), Corticotrophin-releasing hormone (CRH), Pro-opiomelanocortin (POMC) and Urocortin were anorectic factor. Paraventricular nucleus (PVN), Lateral hypothalamus (LHA) and Arcuate nucleus (ARC) were localized in hypothalamus.

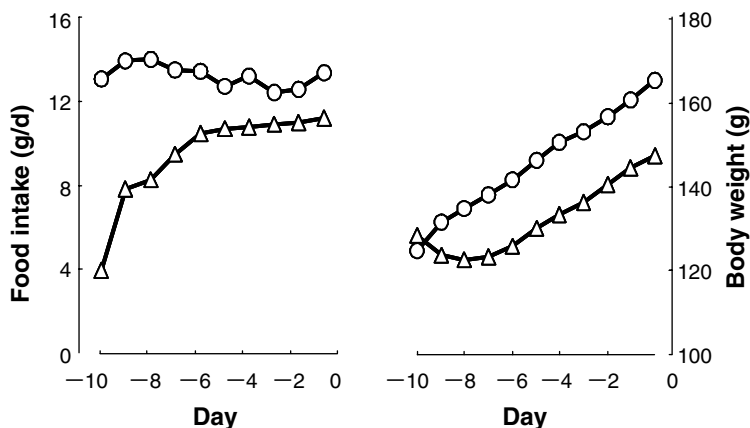


Fig. 2. Daily changes of the food intake and the body weight in female rats for 14 d of training period in ad libitum feeding (○) or meal feeding (2 times, △) (experiment 1). Values are the means of six rats.

実験方法

実験 1

雌ラットをそれぞれ2つの群に分け (n=12), AIN-93に基づいたコントロール飼料を自由摂取, または8:00~20:00明期の明暗サイクルにおいて暗期開始直後および6時間後にそれぞれ1時間ずつ食事させる食餌

様式(2食制)で与え, 10日間予備飼育した. 各々の群をさらに2群に組み分け, コントロール飼料またはこれに飼料1 kgあたりダイゼインを150 mg混合した飼料を予備飼育と同じ様式で与え14日間飼育した. 最終日には断頭採血後, 脳を摘出し, 視床下部を採取した. 血清レプチン, インスリン, およびCCK濃度を市販キット(ELISA法)で測定した. 摘出した視床下部は, 分析まで-80℃で保存した. 視床下部の食欲関連神経

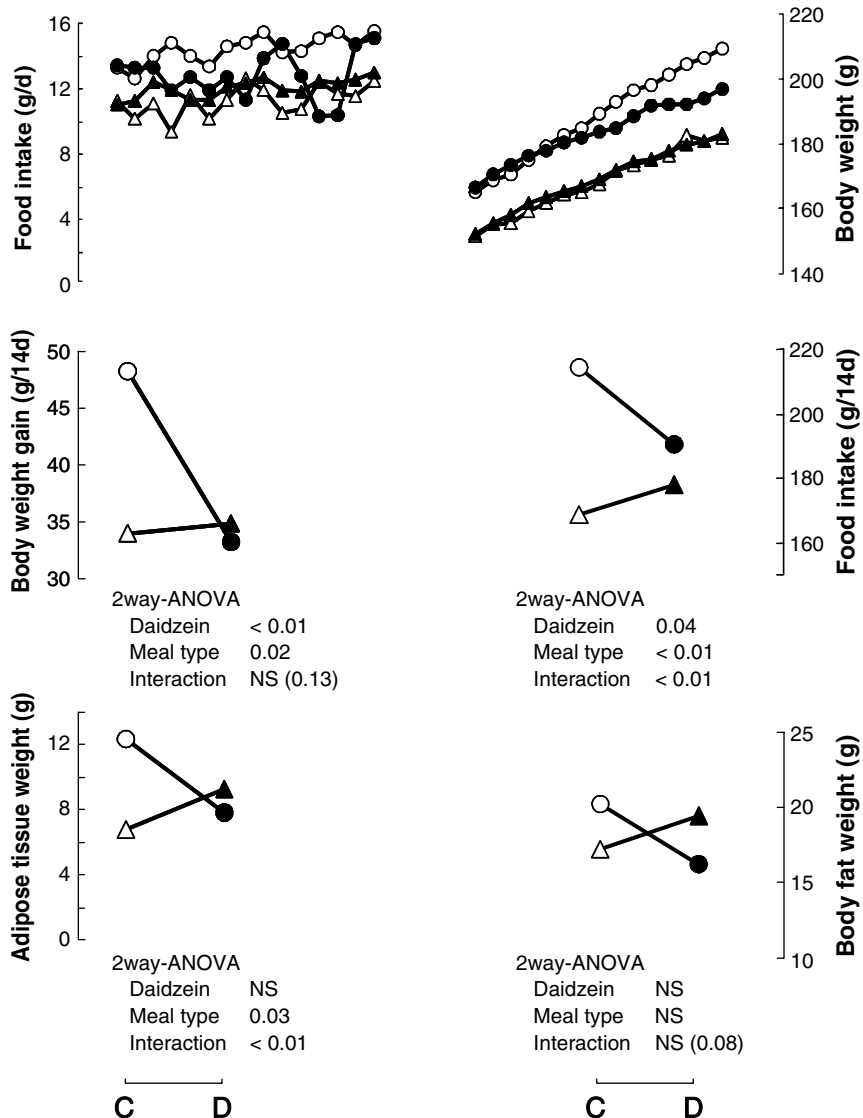


Fig. 3. Daily changes of the food intake and the body weight, food intake and body weight gain for 14d, and adipose tissue and body fat weight in female rats fed the diet containing daidzein or the control diet in ad libitum feeding or meal feeding (2 times) (experiment 1). ○, control diet in ad libitum feeding; ●, daidzein diet in meal feeding (2 times); △, control diet in meal feeding (2 times); ▲, daidzein diet in meal feeding (2 times). Values are the means of six rats.

伝達物質の遺伝子発現をリアルタイムモニタリング RT-PCR法によりプロファイリングした。

実験 2

実験 1 と同様の実験を自由摂取または暗期開始直後、3 時間後および 6 時間後にそれぞれ 1 時間ずつ食事させる食餌様式（3 食制）で行った。

結 果

実験 1

予備飼育中 2 食制で食餌させたラットの飼料摂取量は初期には自由摂取の 25% 程度でその後適応的に増加したものの自由摂取の 80% までで、その後差は縮まらなかった (Fig. 2)。これらラットにダイゼイン飼料を与えると自由摂取では飼料摂取量が有意に低下し、これ

に伴い体重増加量、脂肪組織重量、体脂肪量および血清レプチン濃度が有意に低下したが、2 食制ではこれらのパラメーターにダイゼインの効果は認められなかった (Fig. 3, 4)。ダイゼインの摂取により 2 食制でのみ NPY の遺伝子発現が有意に増加した (Fig. 5)。2 食制により CART, POMC が有意に低下したが、ダイゼインを摂取するとこの差は見られなくなった。その他の遺伝子発現に差は見られなかった (Fig. 5)。また 2 食制により血清 CCK 濃度が有意に増加したが、ダイゼインの影響は見られなかった (Fig. 4)。

実験 2

予備飼育中 3 食制で食餌させたラットの飼料摂取量も初期には自由摂取の 25% 程度であったがその後適応的に増加し、予備飼育 4 日目以降自由摂取とはほぼ同等の飼料摂取量となった (Fig. 6)。これらラットにダイ

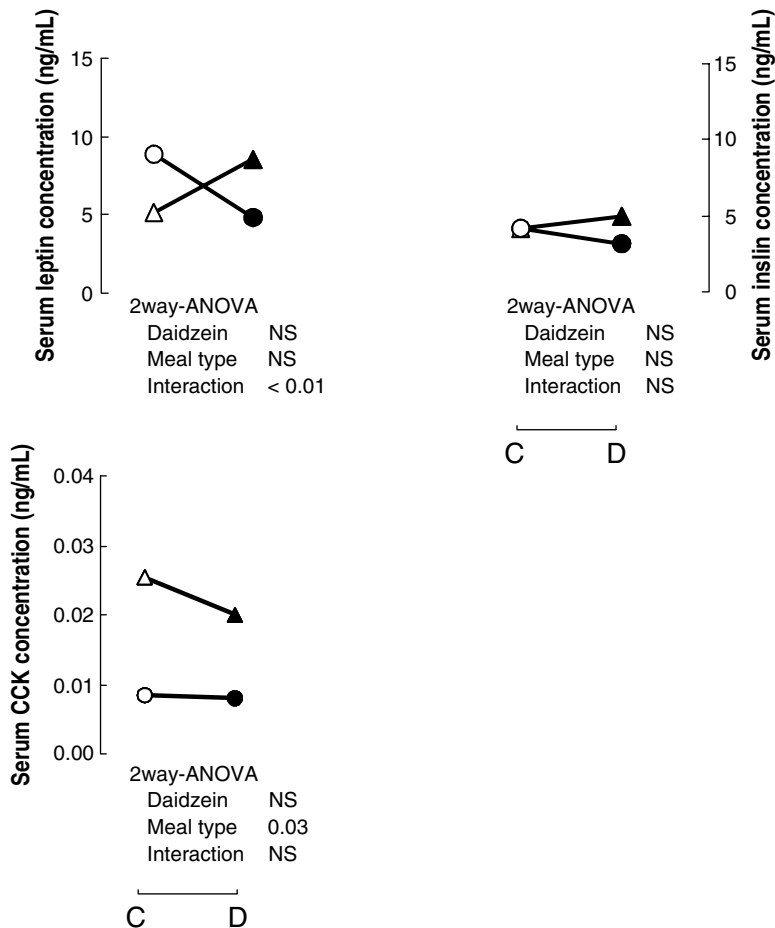


Fig. 4. Serum leptin, insulin and cholecystokinin in female rats fed the diet containing daidzein or the control diet in ad libitum feeding or meal feeding (2 times) (experiment 1). CCK, cholecystokinin. O, control diet in ad libitum feeding; ●, daidzein diet in meal feeding (2 times); △, control diet in meal feeding (2 times); ▲, daidzein diet in meal feeding (2 times). Values are the means of six rats.

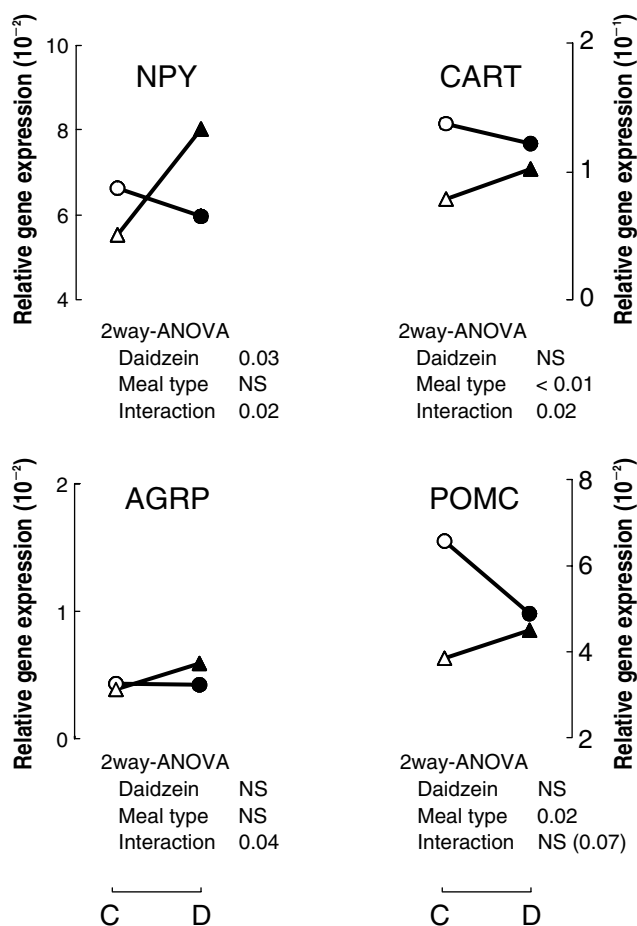


Fig. 5. Hypothalamus gene expression of appetite-regulated neurotransmitter in female rats fed the diet containing daidzein or the control diet in ad libitum feeding or meal feeding (2 times) (experiment 1). NPY, neuropeptide Y; AGRP, agouti gene-related peptide; CART, cocaine and amphetamine-regulated transcript; POMC, pro-opiomelanocortin. ○, control diet in ad libitum feeding; ●, daidzein diet in meal feeding (2 times); △, control diet in mealfeeding (2 times); ▲, daidzein diet in meal feeding (2 times). Values are the means of six rats.

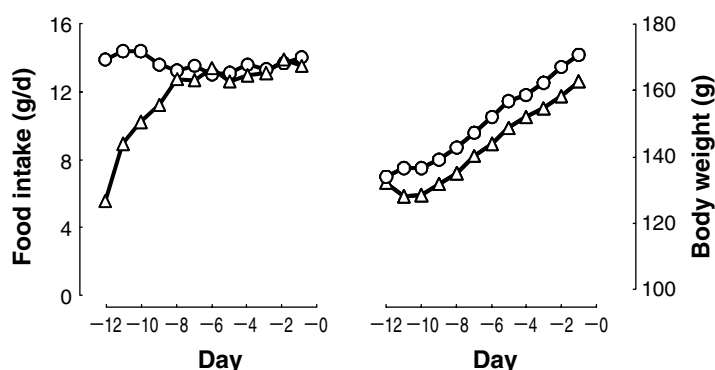


Fig. 6. Daily changes of the food intake and the body weight in female rats for 14 d of training period in ad libitum feeding (○) or meal feeding (3 times, △) (experiment 2). Values are the means of six rats.

ゼイン飼料を与えると自由摂取，3食制ともに飼料摂取量が有意に低下し，これに伴い体重増加量，脂肪組織重量，体脂肪量および血清レプチン濃度が有意に低下した (Fig. 7, 8)．視床下部遺伝子発現はCARTおよびPOMCが食事様式の違いに関わらず，ダイゼインの

摂取により有意に低下した (Fig. 9)．NPY，AGRPは3食制で有意に上昇したが，ダイゼイン摂取の影響は見られなかった (Fig. 9)．その他の遺伝子発現に有意な差はみられなかった (Fig. 8)．

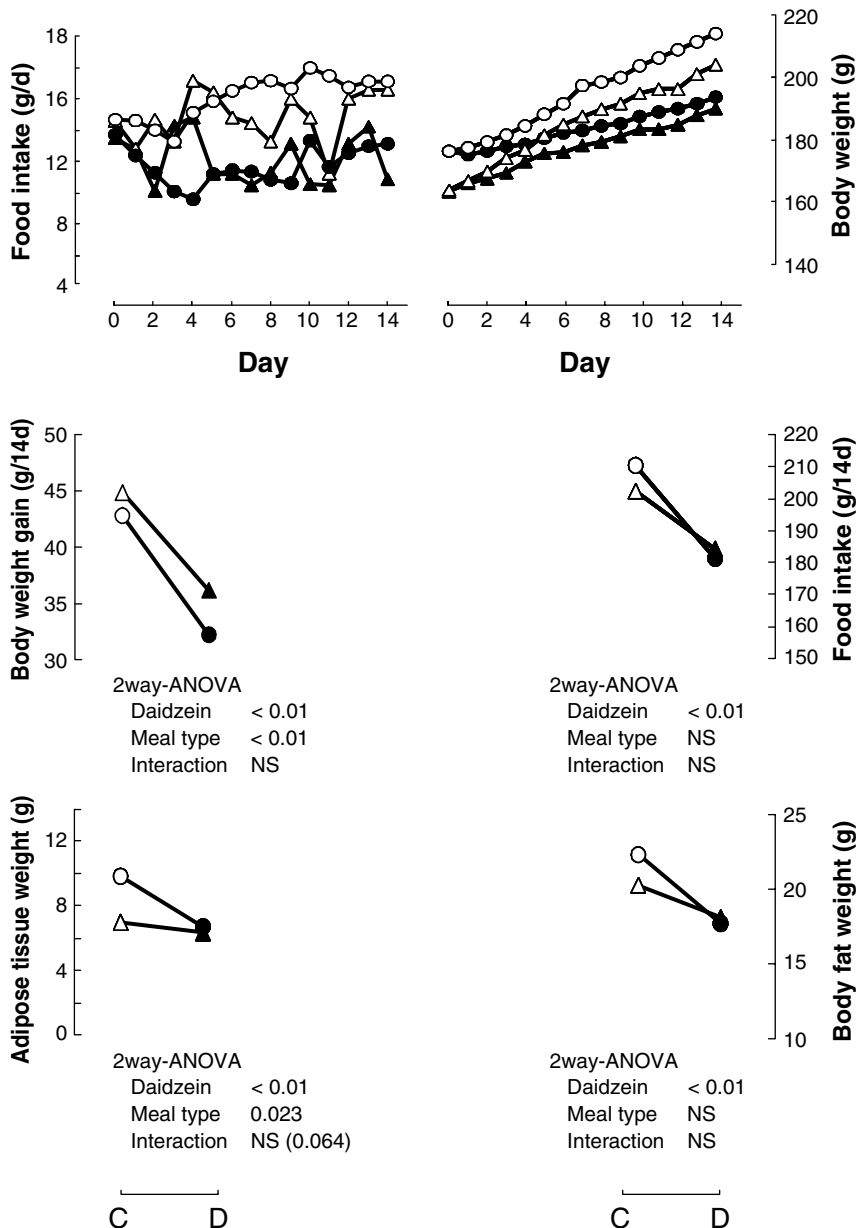


Fig. 7. Daily changes of the food intake and the body weight, food intake and body weight gain for 14d, and adipose tissue and body fat weight in female rats fed the diet containing daidzein or the control diet in ad libitum feeding or meal feeding (3 times) (experiment 2). ○, control diet in ad libitum feeding; ●, daidzein diet in ad libitum feeding; △, control diet in meal feeding (3 times); ▲, daidzein diet in meal feeding (3 times). Values are the means of six rats.

考 察

当初の計画の2食制の実験においてはダイゼインの摂取による飼料摂取量の低下は観察されなかったが、新たに計画した3食制の実験では自由摂取時と同様の飼料摂取量の低下作用が観察された。2食制でダイゼインの効果が消失したのは、2食制では飼料摂取量が自由摂取の場合の80%まで制限されてしまったためと考えている。ダイゼインはエネルギーが余剰あるいはある程度の余裕のある状況下でしか作用を発現しないのかもしれない。2食制でのみ血清CCK濃度が自由摂取より有意に高くなった。血清CCK濃度が2食制でのみ自由摂取よりも高い値になったのは一見摂取量制限と矛盾するかもしれない。しかし、与えられた1時間

に摂取できる消化管の物理的境界が、確保すべき摂取量を下回っているとすれば説明できる。

3食制において全群間の飼料摂取パターンを同期させた条件でダイゼインの飼料摂取量低下作用を観察することができた。しかし視床下部遺伝子発現および血液中の摂食シグナルのどのパラメーターにもダイゼインの飼料摂取量低下を説明しうる結果は得られなかった。今回の実験では多食制においてダイゼインの効果が見られるかを確実に確認する必要もあったため、サンプリングはダイゼイン摂取14日目に行っている。これまでの検討でダイゼインの飼料摂取量への効果が最大となるのは14日目前後であることがわかっているが、効果が現れ始めるのは2～3日目である。今後ダイゼイン摂取2～3日目を中心にデータを蓄積していく必要がある。

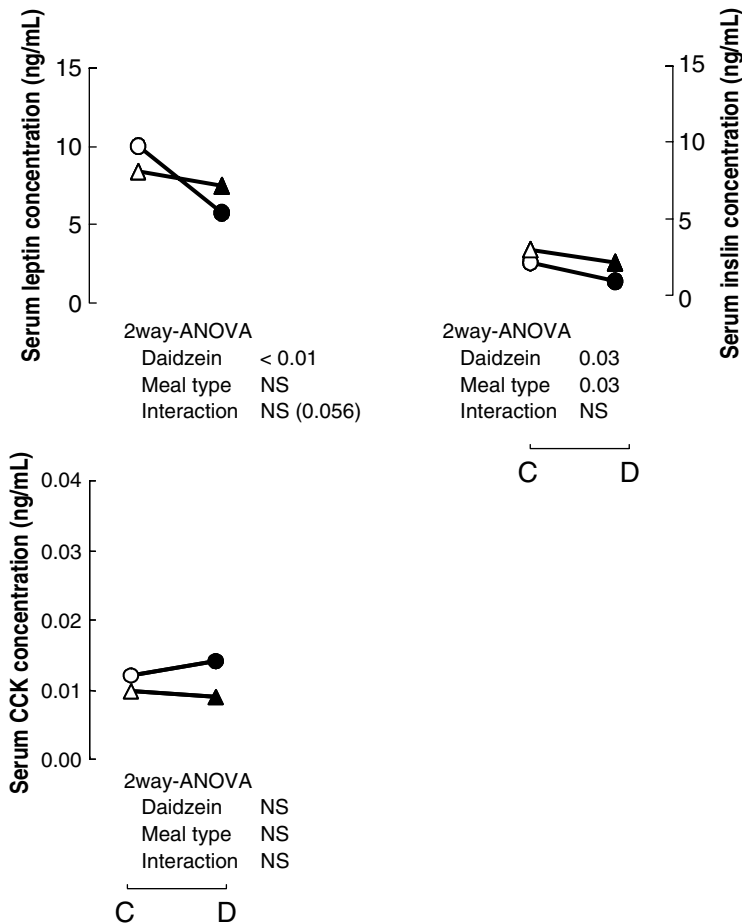


Fig. 8. Serum leptin, insulin and cholecystokinin in female rats fed the diet containing daidzein or the control diet in ad libitum feeding or meal feeding (3 times) (experiment 2). CCK, cholecystokinin. ○, control diet in ad libitum feeding; ●, daidzein diet in ad libitum feeding; △, control diet in meal feeding (3 times); ▲, daidzein diet in meal feeding (3 times). Values are the means of six rats.

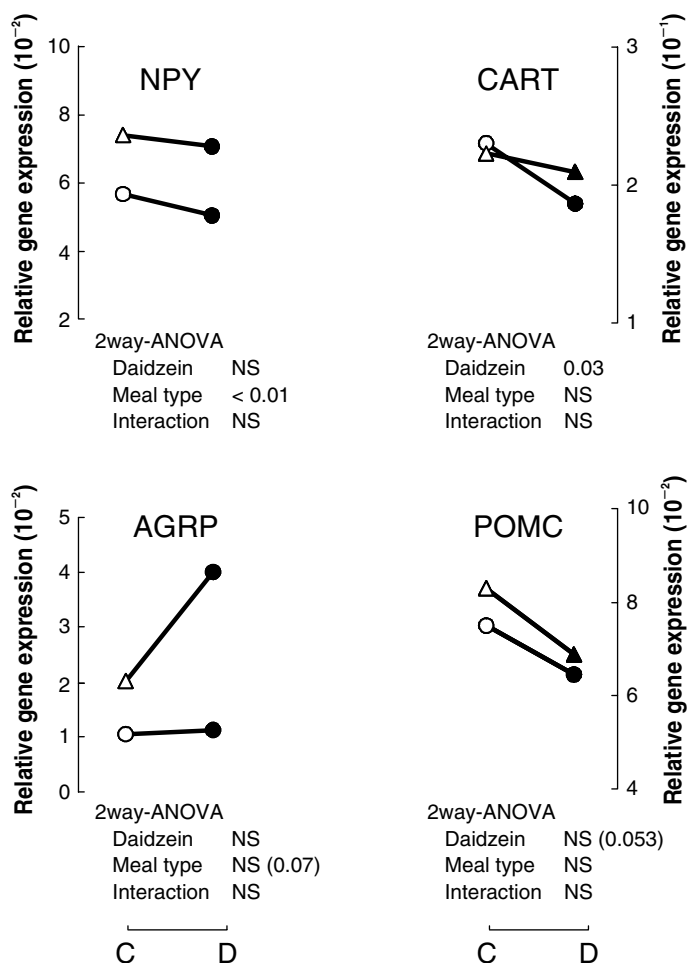


Fig. 9. Hypothalamus gene expression of appetite-regulated neurotransmitter in female rats fed the diet containing daidzein or the control diet in adlibitum feeding or meal feeding (3 times) (experiment 2). NPY, neuropeptide Y; AGRP, agouti gene-related peptide; CART, cocaine and amphetamine-regulated transcript; POMC, pro-opiomelanocortin. ○, control diet in ad libitum feeding; ●, daidzein diet in ad libitum feeding; △, control diet in meal feeding (3 times); ▲, daidzein diet in meal feeding (3 times). Values are the means of six rats.

要 約

昨年度の研究で我々は大豆イソフラボン・ダイゼインが雌ラット特異的に飼料摂取量を低下させることを見出した。この作用機構を求め、視床下部食欲関連神経伝達物質の遺伝子発現および血中食欲関連シグナルのプロファイルを調べたが、データにバラツキが多く（ラット間および実験ロット間）、飼料摂取量の低下を説明する現象は捉えられなかった。この原因は、食欲関連がエネルギー摂取に敏感に応答して変動している中で、自由摂取で飼料摂取タイミングがまちまちな飼育形態では正確なデータを捉えることができないためと推測した。そこで本年度は1日2回一定の短時間飼料を自由摂取させる2食制の飼育形態で飼料摂取タイミングを揃え、データを取得することを試みた。2食制では10日間の馴化の後にも自由摂取時の80%程度の飼料摂取量にとどまり、この際ダイゼインの摂取は飼料摂取量に影響を与えなかった。自由摂取では視床下部の食欲関連遺伝子発現に差は見られなかったが、2食制では摂食時間終了直後の食欲抑制物質のCARTが有意に増加した。

他，食欲促進物質のNPY，AGRPでも有意な増加が観察された．2食制ではダイゼインの効果が見られておらず，パラメータの変動の意義がわからないため，3食制により飼料摂取量を自由摂取に近づけることを試みた．3食制では5日間の馴化で自由摂取と同等の飼料摂取量を十分確保でき，この際ダイゼイン摂取は自由摂取時と同様に飼料摂取量を低下させた．しかし，3食制では摂食時間終了直後の視床下部食欲関連遺伝子発現のバラツキは小さくなったもののダイゼインによる効果は認められなかった．引き続き3食制においてさまざまなタイミングでの視床下部食欲関連遺伝子発現の変動を検討している．

文 献

- 1) Mezei O, Banz WJ, Steger RW, Peluso MR, Winters TA and Shay N (2003): Soy isoflavones exert antidiabetic and hypolipidemic effects through the PPAR pathways in obese Zucker rats and murine RAW 264.7 cells. *J Nutr*, **133**, 1238-1243.
- 2) Prolo P, Wong ML and Licinio J (1998): Leptin. *Int J Biochem Cell Biol*, **30**, 1285-1290.
- 3) 大村 裕，坂田利家 (1996): 脳と食欲—頭で食事をする．共立出版，東京．
- 4) 嶋津 孝 (1999): 脳の中の視床下部 成人病との関連をさぐる．ブレーン出版，東京．
- 5) Attelle AS, Shi ZQ and Yuan CS (2002): Leptin, gut, and food intake. *Biochem Pharmacol*, **63**, 1579-1583.
- 6) Jequier E (2002): Leptin signaling, adiposity, and energy balance. *Ann N Y Acad Sci*, **967**, 379-388.