

大豆たん白質 β -コングリシニンの非アルコール性脂肪肝発症予防 および治療効果と作用機序の解明

山崎聖美*

(独) 国立健康・栄養研究所基礎栄養プログラム

Effect of Soy Protein β -Conglycinin on Nonalcoholic Fatty Liver Disease

Tomomi YAMAZAKI

National Institute of Health and Nutrition, Tokyo 162-8636

ABSTRACT

Diets high in sucrose/fructose or fat can result in hepatic steatosis (fatty liver). Mice fed a high-fat diet, especially one of saturated fat-rich oil, develop fatty liver with an increase in PPAR γ 2 protein in the liver. The fatty liver induced by a high-fat diet is improved by knockdown of liver PPAR γ 2. In this study, we investigated whether β -conglycinin (a major protein of soy protein) could reduce PPAR γ 2 protein and prevent high-fat-diet-induced fatty liver in ddY mice. Mice were fed a high safflower oil (60 en%) or a butter diet (60 en%) for 11 weeks, from which fatty liver is developed. As a control, mice were fed a high-starch diet with drinking water. Either β -conglycinin or casein (control) was given as dietary protein. β -conglycinin supplementation completely prevented fatty liver induced by each type of diet. β -conglycinin decreased PPAR γ 2 mRNA in mice fed a high-fat (safflower oil or butter) diet with concomitant decreases in their target genes. β -conglycinin decreased PPAR γ 2 protein and liver TG concentration in a dose-dependent manner in mice fed a high-butter diet; a significant decrease in liver TG concentration was observed at a concentration of 15 en%. *Conclusion*: A dietary compound that reduces liver PPAR γ 2 was found. β -conglycinin effectively prevents the fatty liver induced by a high-fat diet through a decrease in liver PPAR γ 2 protein. *Soy Protein Research, Japan* **13**, 128-132, 2010.

Key words : fatty liver, β -conglycinin, sucrose, high-fat diet, PPAR γ 2

*〒162-8636 新宿区戸山1-23-1

非アルコール性脂肪肝（NAFLD）は良性疾患と軽く考えられていたが、メタボリックシンドローム発症にも関係し、肝硬変、肝臓にも至ることがあり、さらに、日本人中年男性を対象とした研究からNAFLDはⅡ型糖尿病の危険因子であると報告され¹⁾、臨床的に重要な疾患として認識されるようになってきた。

食事が関係するNAFLDの原因として、砂糖過剰摂取、脂肪過剰摂取があげられる。しかし、一般的な予防・治療法としてはカロリー制限、運動が知られているが、食事成分による予防・治療法に関して殆ど研究されていない。最近我々は、魚油の脂肪肝への効果はその原因により異なることを見いだした。すなわち、砂糖過剰摂取による脂肪肝では肝臓でのsterol regulatory element-binding protein (SREBP) -1c活性化が主因で、高脂肪食による脂肪肝ではperoxisome proliferators-activated receptor (PPAR) γ 活性化が主因であるため、SREBP-1cの活性を抑制する魚油は低用量でも砂糖過剰摂取による脂肪肝には効果が認められたが、高脂肪食による脂肪肝に対しては効果がなかった²⁾。

大豆に含まれるたん白質の一つ β -コングリシニン³⁾は、血中中性脂肪および内臓脂肪を減少させ、肝臓では脂肪酸の β 酸化をさかんにし、脂肪酸合成酵素を不活性化させることが知られており³⁾、メタボリックシンドローム発症を抑制する食品成分として注目されている。そこで、本研究では、まず、PPAR γ 2の発現を抑制するショートヘアピン (sh) RNAを発現するアデノウィルスを作製し、マウス肝臓でPPAR γ 2遺伝子の発現を抑制することによって高脂肪食により発症する脂肪肝を改善できるか調べ、さらに、 β -コングリシニンによる高脂肪食による脂肪肝発症予防と肝臓におけるPPAR γ 遺伝子発現への影響について調べた。

方 法

PPAR γ 2ノックダウンアデノウィルスの作製

PPAR γ 2の発現をノックダウンするために、5'gatccgCTATGAGCACTTCACAAGAtagtgctctggttgTGTGTGAAGTGCTCATAGctttttta (forward), 5'agcttaa aaaagCTATGAGCACTTCACAAGAcaaccaggagcactaTCTTGTAAGTGCTCATAGcg (reverse)を合成してアニーリング後、sh RNAを発現するアデノウィルスを作製した。

肝臓特異的PPAR γ 2ノックダウンマウスの作製

6週齢のC57BL/6J (♂) マウスに1週間普通エサを食べさせて飼育した後3群に分け、Table 1に示し

Table 1. Dietary composition I

	LF ^a	MF ^b	
	Safflower oil	Safflower oil	Butter
Components	g (% of total energy)		
Safflower oil	40 (9.7)	190 (41.5)	—
Butter	—	—	190 (41.5)
Casein	200 (20.3)	290 (26.3)	290 (26.3)
Sucrose	110 (11.7)	63 (5.4)	63 (5.4)
α -Cornstarch	552 (58.3)	315 (26.8)	315 (26.8)
Vitamin mixture (AIN-93)	10	14	14
Mineral mixture (AIN-93)	35	51	51
Cellulose powder	50	73	73
L-Cystine	3	4	4
Fatty acids	% of total energy		
Σ SFA ^d	0.8	3.5	29.8
C4:0	n.d. ^c	n.d.	1.8
C6:0	n.d.	n.d.	1.2
C8:0	n.d.	n.d.	0.6
C10:0	n.d.	n.d.	1.4
C12:0	n.d.	n.d.	1.5
C14:0	n.d.	n.d.	5.1
C16:0	0.5	2.3	13.5
C18:0	0.2	0.9	4.5
C20:0	0.1	0.2	0.1
Σ MUFA ^e	4.4	18.8	10.0
C16:1	0.0	0.1	0.6
C18:1	4.4	18.7	9.0
C20:1	0.0	0.1	0.1
Σ PUFA ^f	4.5	19.1	1.1
C18:2 (n-6)	4.4	19.0	0.8
C18:3 (n-3)	0.0	0.1	0.2

^aLF, low-fat diet. ^bMF, middle-fat diet. ^cn.d., not detectable. ^dSFA, saturated fatty acid. ^eMUFA, monounsaturated fatty acid. ^fPUFA, polyunsaturated fatty acid.

た組成の低脂肪食 (LF-Saf, コントロール), 40 en% サフラワー油食 (MF-Saf), 40 en%バター食 (MF-But) を4週間与えた。各群をさらに2群に分け、ネガティブコントロール (NC) shRNAを発現するアデノウィルスあるいはsh PPAR γ 2を発現するアデノウィルスを静脈注射し、5日後に解剖し解析を行った (各群n=4)。

マウスへの β -コングリシニン投与

6週齢のddYマウス (♂) に1週間普通エサを食べさせて飼育した後、Table 2に示すように、エネルギー%のうち20 en%をたん白質とし、全てカゼインの場

合の β -コングリシニン0 (β -0), 4分の1が β -コングリシニンの β -コングリシニン5 (β -5), 2分の1が β -コングリシニンの β -コングリシニン10 (β -10), 4分の3が β -コングリシニンの β -コングリシニン15 (β -15), 全てが β -コングリシニンの β -コングリシニン20 (β -20)と5種類の組成の β -コングリシニン含有高脂肪食を11週間投与し, 解剖後解析を行った(各群 $n=8$).

肝臓トリグリセリド量の測定

肝臓の総脂質をクロロホルム:メタノール(2:1)にて抽出し, 肝臓中のトリグリセリド(TG)量を測定した.

肝臓におけるmRNA発現量

リアルタイムPCRを用いて肝臓中のmRNA量について調べた.

Western Blotting

肝臓から核たん白質を抽出し, SDS-PAGE(7.5% gel)を行い, ウサギ抗マウスPPAR γ 2抗体(PA1-824, Thermo Scientific, Rockford, IL)を一次抗体として, HRP標識抗ウサギIgG抗体を二次抗体として用い, Western Blottingを行った.

結 果

肝臓特異的PPAR γ 2ノックダウンマウスの解析

Fig. 1Aにsh PPAR γ 2アデノウイルスを発現させて5日後の肝臓におけるPPAR γ 2 mRNA発現量について示す. LF-Safに比べ, MF-Saf, MF-But投与マウスでPPAR γ 2発現が増加していたが, sh PPAR γ 2アデノウイルス投与によるPPAR γ 2発現ノックダウンにより, MF-But群で発現減少が有意であった. PPAR γ 2たん白質発現量についてWestern Blottingを行った結果, LF-Safに比べ, MF-Saf, MF-But投与マウスでPPAR γ 2たん白質発現量が増加していたが, PPAR γ 2発現ノックダウンにより, MF-Saf, MF-But群で発現増加が抑制されていた(Fig. 1B). 肝臓TG量は, PPAR γ 2 mRNA, たん白質量と同様に, LF-Safに比べ, MF-Saf, MF-But投与マウスで増加していたが, PPAR γ 2発現ノックダウンにより, MF-But群で有意に減少していた(Fig. 1C).

高脂肪食による脂肪肝発症に対する β -コングリシニンの影響

たん白質が全てカゼインである β -0投与群では脂肪肝を発症していたが, β -15, β -20投与群では有意に肝臓TG量が減少していた. 肝臓におけるmRNAの発現について調べた結果, PPAR γ 2の発現は β -15, β

Table 2. Dietary composition II

Ingredients	β -conglycinin				
	0	5	10	15	20
	g/100g				
Butter	32.6	32.6	32.6	32.6	32.6
Casein	25.5	19.1	12.8	6.4	—
β -conglycinin	—	6.7	13.5	20.1	26.8
α -Starch	27.7	27.4	26.9	26.7	26.4
Vitamin mix (AIN-93)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Mineral mix (AIN-93)	5.1	5.1	5.1	5.1	5.1
Cellulose powder	7.3	7.3	7.3	7.3	7.3
L-cystine	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4

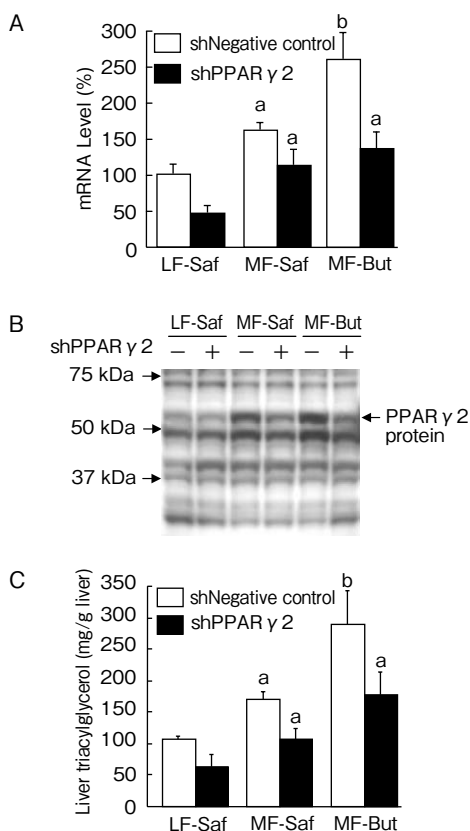


Fig. 1. Effect of PPAR γ 2 RNAi-mediated knockdown for 5 days on hepatic PPAR γ 2 mRNA expression (A) and protein expression (B) and liver TG concentration (C). Values are means $\pm$ SEM, $n=4$. Means without a common letter differ ($p<0.05$). Two-way ANOVA P values are significant in effects of diet and interaction.

Table 3. Liver TG and Hepatic Gene Expression Profile Related to Liver TG of Mice After 11 Weeks on Experimental Diets

	β -conglycinin				
	0	5	10	15	20
Liver TG (mg/g Liver)	357 $\pm$ 73 ^a	347 $\pm$ 37 ^{ab}	311 $\pm$ 42 ^{ab}	242 $\pm$ 25 ^{bc}	165 $\pm$ 20 ^c
PPAR γ and target genes					
PPAR γ 2	100 $\pm$ 26 ^a	84 $\pm$ 22 ^a	60 $\pm$ 24 ^{ab}	26 $\pm$ 11 ^{bc}	4 $\pm$ 2 ^c
CD36	100 $\pm$ 24 ^a	99 $\pm$ 34 ^a	89 $\pm$ 17 ^{ab}	50 $\pm$ 8 ^{ab}	33 $\pm$ 6 ^b
ADRP	100 $\pm$ 12	101 $\pm$ 14	97 $\pm$ 18	88 $\pm$ 7	78 $\pm$ 10
FSP27	100 $\pm$ 33 ^a	76 $\pm$ 15 ^{ab}	59 $\pm$ 13 ^{ab}	36 $\pm$ 5 ^b	36 $\pm$ 7 ^b
aP2	100 $\pm$ 16	100 $\pm$ 7	100 $\pm$ 12	92 $\pm$ 13	72 $\pm$ 6

Means without a common letter differ ($p < 0.05$).

-20投与群では有意に減少していた。PPAR γ 2の標的遺伝子についても同様に調べた結果、CD36は β -20投与群で、FSP27は β -15、 β -20投与群で有意に発現が減少していた。その他、ADRP、aP2は β -コングリシニン濃度が増えるにつれて発現が減少傾向にあったが、有意差はみられなかった。

考 察

同じ脂肪エネルギー %でも不飽和脂肪酸よりも飽和脂肪酸を多く含む脂肪食を摂取した方が早く脂肪肝を発症する⁴⁾。その際、肝臓ではPPAR γ 2発現増加が顕著である。このPPAR γ 2発現増加を抑制することで発症した脂肪肝を改善することができた。PPAR γ 2発現抑制による脂肪肝改善効果をもたらすためには、長

期的にPPAR γ 2発現を抑制できる物質が必要である。 β -コングリシニン、大豆たん白質の一種でグリシニンに次いで二番目に多く含まれている。ヒトを対象とした研究では、1日に β -コングリシニンを5 g摂取すると血中中性脂肪の減少と内臓脂肪低減がみられたという報告がある⁵⁾。 β -コングリシニンは、高脂肪食摂取による脂肪肝発症の原因となる肝臓でのPPAR γ 2の発現を減少させ脂肪肝発症予防効果を示したが、このような作用を持つ食品成分は初めてであり、長期にPPAR γ 2の発現抑制を行うことができる点で高脂肪食摂取による脂肪肝発症に対する予防効果を持つ食品成分として大いに期待できる。本研究からは、比較的少量の β -コングリシニン摂取が必要と考えられたが、 β -コングリシニン全体ではなく一部が大きく寄与している可能性がある。

要 約

高脂肪食、特に飽和脂肪酸を多く含む高脂肪食を摂取すると肝臓でPPAR γ 2の発現がmRNA、たん白質ともに増加し脂肪肝を発症する。肝臓でのPPAR γ 2の発現を抑制することによって高脂肪食摂取により発症した脂肪肝を改善することができる。高脂肪食摂取により発症する脂肪肝の予防には、肝臓においてPPAR γ 2の発現を抑制する働きをもつ食品成分を摂取することが望ましいが、大豆たん白質の一つ β -コングリシニンにその効果が認められ、 β -コングリシニンは高脂肪食摂取による肝臓PPAR γ 2の発現増加の抑制により脂肪肝発症を予防した。

文 献

- 1) Shibata M, Kihara Y, Taguchi M, Tashiro M and Otsuki M (2007): Nonalcoholic fatty liver disease is a risk factor for type 2 diabetes in middle-aged Japanese men. *Diabetes Care*, **30**, 2940-2944.
- 2) Yamazaki T, Nakamori A, Sasaki E, Wada S and Ezaki O (2007): Fish oil prevents sucrose-induced fatty liver but exacerbates high-safflower oil-induced fatty liver in ddY mice. *Hepatology*, **46**, 1779-1790.
- 3) Fukui K, Kojima M, Tachibana N, Kohno M, Takamatsu K, Hirotsuka M and Kito M (2004): Effects of soybean β -conglycinin on hepatic lipid

metabolism and fecal lipid excretion in normal adult rats. *Biosci Biotechnol Biochem*, **68**, 1153-1155.

- 4) Yamazaki T, Shiraishi S, Kishimoto K, Miura S and Ezaki O: An increase in liver PPAR γ 2 is an initial event to induce fatty liver in response to a diet high in butter: PPAR γ 2 knockdown

improves fatty liver induced by high-saturated fat. *J Nutr Biochem*, in press.

- 5) Kohno M, Hirotsuka M, Kito M and Matsuzawa Y (2006): Decreases in serum triacylglycerol and visceral fat mediated by dietary soybean β -conglycinin. *J Atheroscler Thromb*, **13**, 247-255.