

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・治療効果と作用機序の解明

山崎聖美*

独立行政法人国立健康・栄養研究所基礎栄養研究部

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

Tomomi YAMAZAKI*

Department of Nutritional Science, National Institute of Health and Nutrition, Tokyo 162-8636

ABSTRACT

Diets high in 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 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 butter diet (60 en%) for 11 weeks, by which fatty liver is developed. Either β -conglycinin or casein (control) was given as dietary protein. β -conglycinin supplementation completely prevented fatty liver. β -conglycinin decreased PPAR γ 2 mRNA in mice fed a high-butter diet with concomitant decreases in their target genes. Oxygen consumption, RQ ratio, energy production and daily activity levels did not differ significantly between the two groups. β -conglycinin-derived peptide decreased the accumulation of TG in the mouse hepatocytes *in vitro*. 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* **14**, 86-90, 2011.

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

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、肝がん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2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

*〒162-8636 東京都新宿区戸山1-23-1

されていない。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⁾。高脂肪食摂取による脂肪肝発症にはPPAR γ 発現抑制が有効である³⁾。

大豆に含まれるたん白質の一つ β -コングリシニン⁴⁾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⁴⁾、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、 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効果とその機序について調べた。

方 法

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、60 en%バター、20 en%スターチ、20 en%カゼイン食（カゼイン摂取群）、60 en%バター、20 en%スターチ、20 en% β -コングリシニン食（ β -コングリシニン摂取群）を11週間投与し解剖後解析を行った（各群n=8）。

肝臓、脂肪組織、筋肉におけるmRNA発現量解析

肝臓、脂肪組織、筋肉よりRNAを抽出、精製し、リアルタイムPCR、DNAマイクロアレイを用いて肝臓、脂肪組織、筋肉のmRNA量について調べた。さらに、DNAマイクロアレイから得られたデータをIngenuity Pathways Analysis (IPA) を用いて解析した。

酸素消費量測定

カゼイン摂取群および β -コングリシニン摂取群のマウスの安静時の酸素消費量について、代謝チャンバーを用いて測定した。

たん白質の酵素消化

マウスへの投与に用いたカゼイン、 β -コングリシニンを酵素消化し、低分子ペプチドを得た。

ペプチドの細胞内トリグリセリド蓄積への影響

カゼインおよび β -コングリシニンから得られたペプチドを肝臓由来培養細胞に作用させた後、オレイン酸を添加し、細胞内に蓄積したトリグリセリド量を測

定した。

結 果

肝臓、脂肪組織、筋肉におけるmRNA発現量解析

β -コングリシニン摂取群は肝臓ではPPAR γ 2の発現がカゼイン摂取群に比べ減少していたが、白色脂肪組織では、 β -コングリシニン摂取群の方がカゼイン摂取群に比べ、PPAR γ 2の発現は増加傾向にあり、PPAR γ 1の発現は有意に増加していた。それに伴い、アディポネクチンmRNAの発現が有意に増加していた。

カゼイン摂取群、 β -コングリシニン摂取群の肝臓、白色脂肪組織、褐色脂肪組織、筋肉より得たmRNA発現量についてDNAマイクロアレイで解析後、さらにIPAを用いてパスウェイ解析を行った結果、肝臓で最も多くの遺伝子の発現が変化していることが明らかになった（Table 1）。

血清解析

11週間投与後3時間絶食させたのち、マウスから血液を採取し、血清の解析を行った。その結果、 β -コングリシニン摂取群はカゼイン摂取群に比べ、血中のTG、インシュリン、レプチン濃度が有意に低く、アディポネクチン濃度が有意に高かった（Table 2）。

酸素消費量

カゼインあるいは β -コングリシニンを摂取させてから2週間後（体重に有意差がつく前）と8週間後に測定した（Table 3）。酸素消費量、二酸化炭素排出量、呼吸商、活動量、エネルギー産生量について解析したが、暗期、明期ともに両群間で差は見られなかった。

カゼインあるいは β -コングリシニン由来ペプチドの細胞内トリグリセリド蓄積への影響

カゼインおよび β -コングリシニンをそれぞれ酵素消化し、低分子のペプチドを得た。このペプチド混合物を肝臓由来培養細胞に作用させた後、BSAに結合させたオレイン酸を培地に添加し細胞内への脂肪の取り込みについて調べた結果、 β -コングリシニン由来のペプチドは有意に細胞内TGの取り込みを抑制した（61%）。

考 察

マウスを用いた場合、飽和脂肪酸を多く含む脂肪食を摂取させると早期に脂肪肝を発症する。その際、肝臓ではPPAR γ 2発現増加が顕著であり、この発現増加を抑制すると脂肪肝を改善することができる³⁾。PPAR γ 2発現抑制による脂肪肝改善効果をもたらし

Table 1. IPA analysis of genes in liver, WAT, BAT and gastrocnemius

TOP NETWORKS			Score
ASSOCIATED NETWORKS FUNCTIONS			
Liver	1	Lipid Metabolism, Small Molecule Biochemistry, Vitamin and Mineral Metabolism	22
	2	Lipid Metabolism, Molecular Transport, Small Molecule Biochemistry	6
	3	Lipid Metabolism, Small Molecule Biochemistry, Molecular Transport	6
	4	Lipid Metabolism, Molecular Transport, Small Molecule Biochemistry	6
WAT	1	Genetic Disorder, Nutritional Disease, Connective Tissue Disorders	3
	2	Genetic Disorder, Nutritional Disease, Lipid Metabolism	2
BAT	1	Genetic Disorder, Nutritional Disease, Lipid Metabolism	2
Gastrocnemius	1	Cellular Function and Maintenance, Cell Death, Lipid Metabolism	3
	2	Carbohydrate Metabolism, Small Molecule Biochemistry, Molecular Transport	2
	3	Cardiovascular System Development and Function, Cellular Development, Skeletal and Muscular System Development and Function	1

Table 2. Serum parameters of mice after 11 weeks with and without β -conglycinin (20 en%) on a high-butter diet

	Casein	β -Conglycinin
Glucose (mg/100mL)	152 $\pm$ 7	154 $\pm$ 11
TG (mg/100mL)	86 $\pm$ 5	116 $\pm$ 10*
Insulin (ng/mL)	6.11 $\pm$ 1.17	3.43 $\pm$ 1.17*
Adiponectin (μ g/mL)	14.9 $\pm$ 1.1	18.3 $\pm$ 0.8*
Leptin (ng/mL)	10.26 $\pm$ 1.21	3.98 $\pm$ 1.06***

* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs. Casein.Table 3. Oxygen consumption, carbon dioxide production, RQ ratio, and spontaneous motor activity of mice after 2 and 8 weeks with and without β -conglycinin (20 en%) on a high-butter diet

β -Conglycinin	2 weeks		8 weeks	
	-	+	-	+
n	8	8	6	6
Body Weight (g)	42.9 $\pm$ 0.9	42.3 $\pm$ 0.7	51.1 $\pm$ 2.2	46.3 $\pm$ 2.8
Dark				
VO ₂ (mL/min/kg ^{0.75})	22.9 $\pm$ 0.5	22.8 $\pm$ 0.7	22.8 $\pm$ 0.4	23.4 $\pm$ 0.5
VCO ₂ (mL/min/kg ^{0.75})	17.2 $\pm$ 0.5	17.1 $\pm$ 0.7	18.5 $\pm$ 0.4	18.8 $\pm$ 0.6
RQ	0.75 $\pm$ 0.01	0.75 $\pm$ 0.01	0.81 $\pm$ 0.01	0.80 $\pm$ 0.01
Activity (count/min)	175 $\pm$ 12	176 $\pm$ 13	144 $\pm$ 18	161 $\pm$ 9
Energy production (J/min/kg ^{0.75})	452 $\pm$ 13	452 $\pm$ 17	460 $\pm$ 8	469 $\pm$ 13
Energy production (J/min/mouse)	41.1 $\pm$ 1.0	41.5 $\pm$ 1.3	49.2 $\pm$ 1.9	46.6 $\pm$ 1.5
Light				
VO ₂ (mL/min/kg ^{0.75})	19.0 $\pm$ 0.4	18.5 $\pm$ 0.8	19.5 $\pm$ 0.5	20.3 $\pm$ 0.4
VCO ₂ (mL/min/kg ^{0.75})	14.2 $\pm$ 0.4	13.7 $\pm$ 0.7	15.6 $\pm$ 0.4	16.1 $\pm$ 0.4
RQ	0.74 $\pm$ 0.01	0.73 $\pm$ 0.01	0.80 $\pm$ 0.01	0.79 $\pm$ 0.01
Activity (count/min)	79 $\pm$ 9	64 $\pm$ 8	64 $\pm$ 8	81 $\pm$ 8
Energy production (J/min/kg ^{0.75})	377 $\pm$ 8	364 $\pm$ 17	389 $\pm$ 8	410 $\pm$ 8
Energy production (J/min/mouse)	35.1 $\pm$ 0.8	32.2 $\pm$ 1.5	42.0 $\pm$ 1.9	40.8 $\pm$ 1.8

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⁵⁾は、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。

β-コングリシニンは脂肪肝予防とともに肥満予防効果を示す⁶⁾。肝臓、脂肪組織、筋肉など、調べた全ての臓器で様々なmRNAの発現が変化していた。その中で、最も多くの遺伝子発現変化がみられたのは肝臓であった。脂肪組織、血清解析から、β-コングリシニンが脂肪組織からアディポネクチン分泌を増加させていることは既報⁷⁾と同様に本研究でも明らかであり、アディポネクチンがβ-コングリシニンの脂肪肝予防効果をもたらせたという考えも否定できないが、IPA解析結果から、肝臓そのものにおけるβ-コングリシ

ニンの直接作用が示唆された。さらに、培養肝臓由来細胞を用いた研究から、β-コングリシニン由来ペプチドが細胞内TG蓄積を抑制したことからもβ-コングリシニンの直接作用があることが裏付けられた。

β-コングリシニンの脂肪肝予防効果、抗肥満効果の一因としてエネルギー消費の増加が考えられる。そこで、代謝チャンバーを使って酸素消費などを調べたが、カゼイン摂取群とβ-コングリシニン摂取群に違いはみられなかった。11週間でβ-コングリシニン摂取群はカゼイン摂取群よりも10.2 g体重が少なかった。1 gの脂肪組織を燃焼させるのに29.3 kJ (7 kcal) 余計にエネルギーを消費する。10.2 gの体重減少、すなわち、10.2 gの脂肪組織重量の減少をもたらすには、299 kJ (10.2 g×29.3 kJ/g) 余計にエネルギーを消費する必要がある。77日で299 kJなので1日あたり、3.88 kJ余計に消費していることになる。β-コングリシニン摂取群は週間後には、1日あたり55.2±1.7 kJ、8週間後には、1日あたり62.8±2.5 kJ消費していた。したがって、今回使用した間接熱量測定法では体重減少をもたらすだけのエネルギー消費量増加を見出すことが困難であったためと考えられ、β-コングリシニン摂取群のエネルギー消費量増加の可能性は否定できない。

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の発現が増加し脂肪肝を発症する。肝臓でのPPAR γ 2の発現を抑制した場合、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、肝臓でPPAR γ 2の発現を抑制する働きをもつような食品成分を摂取することが望ましいが、本研究により、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た。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。抗肥満効果、血中アディポネクチン濃度増加もみられたが、肝臓、脂肪組織、筋肉の中では、肝臓における遺伝子変化が最も大きくみられた。また、β-コングリシニン由来ペプチドが培養肝臓細胞の細胞内TG蓄積を抑制したことから、β-コングリシニンが肝臓への直接作用を有していると考えられる。β-コングリシニンがエネルギー消費量の増加をもたらす可能性も考えられたが、間接熱量測定法では増加の差異はみとめられなかった。以上のことから、β-コングリシニンは抗肥満、抗脂肪肝発症に大変有効な食品成分であることが期待される。

文 献

- 1) Shibata M, Kihara Y, Taguchi M, Tashiro M and Otsuki M (2007): Nonalcoholic 5 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) Yamazaki T, Shiraishi S, Kishimoto K, Miura S and Ezaki O (2011): 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*, **22**, 543-553.
- 4) 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.
- 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.
- 6) Yamazaki T, Kishimoto K, Miura S and Ezaki O (2012): Dietary β -conglycinin prevents fatty liver induced by a high-fat diet by a decrease in peroxisome proliferator-activated receptor γ 2 protein. *J Nutr Biochem*, **23**, 123-132.
- 7) Tachibana N, Iwaoka Y, Hirotsuka M, Horio F and Kohno M (2010): β -conglycinin lowers very-low-density lipoprotein-triglyceride levels by increasing adiponectin and insulin sensitivity in rats. *Biosci Biotechnol Biochem*, **74**, 1250-1255.