

アンジオテンシン変換酵素を標的とした 大豆由来内臓脂肪型肥満症改善物質の探索

板垣史郎*

弘前大学医学部附属病院薬剤部

Search for the Bioactive Molecule in Soybeans to Improve Visceral Fat Accumulation Through Targeting an Angiotensin-Converting Enzyme

Shiro ITAGAKI*

Department of Pharmacy, School of Medicine & Hospital, Hirosaki University, Hirosaki 036-8563

ABSTRACT

Obesity is considered to be the background for the three main causes of death in Japanese, cancer, cardiac disease and cerebrovascular disease. Obesity prevention is therefore a growing problem in our country. However, a product that can improve visceral fat accumulation has not yet been launched. A dietary approach to ingesting food factors from the diet is important in preventing lifestyle-related diseases, including obesity. In clinical practice, ACE inhibitors or angiotensin receptor blockers are the antihypertensives of choice because they have the most beneficial effects on overall morbidity and mortality. In addition to hypertension, the use of an ACE inhibitor has been associated with reductions in visceral fat. Angiotensinogen (AGT) is the precursor of angiotensin and is cleaved into angiotensin I and II in the renin-angiotensin system. It has been reported that AGT is present in fat tissue and that AGT produced by adipose tissue plays a role in local adipose tissue development. These findings suggest that AGT in fat tissue may be the key to the improving effects of ACE inhibitors on visceral fat and maybe a therapeutic target for visceral fat accumulation. The aim of this study is to identify the ACE Inhibitors in soybeans and to elucidate the effect of ACE on the nature of AGT in fat tissue. I have identified an ACE inhibitor (nicotianamine) in soybeans. I found that AGT in fat tissue is composed of four different glycosylated (single, double, triple, and quadruple) AGTs and that quadruple glycosylated AGT is the key to the improving the effects of ACE inhibitors on visceral fat and maybe a therapeutic target. *Soy Protein Research, Japan* **16**, 144-149, 2013.

*〒036-8563 青森県弘前市本町53

Key words : angiotensinogen, angiotensin-converting enzyme, glycosylation, visceral fat accumulation

肥満症は、日本人の三大死因である、がん・心疾患・脳血管疾患の基盤と位置づけられる、極めて重要な病態である。即ち、肥満症の改善方策の確立は、国民の健康な生活と福祉向上に多大な貢献をする、臨床医学上の重要な課題であるといえる。肥満症の中でも内臓脂肪型肥満症と三大死因疾患との関係については多くの臨床研究や疫学研究がなされ、両者が密接に関連していることが明らかにされてきた^{1~4)}。しかしながら、現在まで内臓脂肪型肥満改善効果を標榜できる医薬品は上市に至っていない。

近年、代表的高血圧治療薬であるアンジオテンシン変換酵素（ACE）阻害薬が内臓脂肪型肥満改善効果をも併せ持つとする、大規模臨床試験の結果が相次いで報告された^{5,6)}。生体の血圧調節機構レニン-アンジオテンシン（RAS）系における最初の基質は肝臓で産生されるアンジオテンシノーゲン（AGT）であり、AGTがレニンによってアンジオテンシンⅠへと変換され、アンジオテンシンⅠがさらにACEによって、昇圧物質アンジオテンシンⅡへと変換される。このように、AGTは高血圧の発症と極めて密接な関係にある物質であるが、肝臓で産生され、全身循環血中に分泌される経路以外にも、肥大化脂肪細胞からも産生・分泌されることが明らかにされている（Fig. 1）⁷⁾。さらに、正常なマウスにAGTを過剰発現させたトランスジェニックマウスでは、正常マウスに比して脂肪量の増加を認め、一方AGTを欠損したノックアウトマウスでは、正常マウスに比して脂肪量の減少が確認されたとの報告がある⁸⁾。これらの知見を統合すると、脂肪細胞に存在するAGTはACE阻害薬の内臓脂肪型肥満改善効果発現の鍵因子であり、内臓脂肪型肥満改善の有用なターゲットとなる可能性が示唆される。

また、著者らは、大豆由来の機能成分を活用した疾病予防研究の経験⁹⁾から、大豆抽出液が強力なACE阻害作用を有することを見出し、科学的根拠に基づいて内臓脂肪型肥満症の改善方策を確立する上で、大豆摂取が有用な切り口となる可能性を考えた。

そこで本研究では、1) 大豆に含有されるACE阻害成分を特定した後、2) RAS系の制御が皮下および腹腔内脂肪の蓄積ならびに脂肪組織におけるAGTの発現に与える影響を評価し、最後に、3) 大豆摂取の脂肪蓄積抑制効果について検討した。

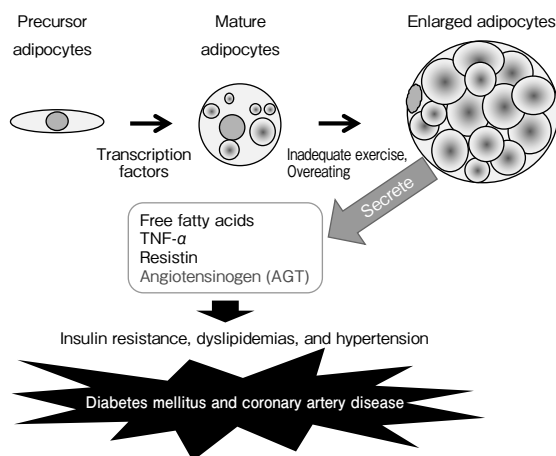


Fig. 1. Secretion of physiological active substances including angiotensinogen (AGT) from enlarged adipocyte.

方 法

実験材料

青森県産大豆は市販品を購入し使用した。Sprague-Dawley (SD) 系雄性ラット（日本クレア）は6週齢で東北化学薬品より購入した。水は新鮮水道水、飼料はオリエンタル酵母Certified Diet MFを自由摂食させた。

大豆抽出液

大豆5 gの細片に9倍量の蒸留水を加え、ポリトロンホモジナイザーで微細粒化後、4℃、25,000×g、30分間遠心して上清を得た。

ACE活性測定法

SDラット肺（約50 g）に5倍量の20 mMトリス塩酸緩衝液（pH 7.5）を加えてホモジナイズし、20%ホモジネートを調製した。次に、ホモジネートを75,000×gにて60分間遠心し、得られた沈査物を50 mLの1% Triton X-100を含む20 mMトリス塩酸緩衝液（pH 7.5）に再溶解後、4℃にて3時間攪拌し、ACEを膜画分から抽出した。抽出液を75,000×gにて60分間遠心し、上清（約50 mL）を得た。上清を、300 mM NaClを含む50 mMホウ酸ナトリウム緩衝液（pH 8.3, 0.01% Triton X-100含有）で平衡化したリシノプリル-Sephadex 6B

アフィニティーカラム (2.5×15 cm) に付し、ACEを同カラムに吸着させた。同緩衝液にて十分に洗浄後、100 μ M カプトプリル/5 mM リン酸緩衝液 (pH 6.5) 溶液200 mLにてACEを溶出した。ACE活性のある画分をそれぞれ50 mM リン酸緩衝液 (pH 8.3, 3L×3回8.3, 0.01% Triton X-100および0.1% アジ化ナトリウム含有) で4℃にて2日間透析し、カプトプリルおよびNaClを完全に除去したものをACE酵素標本として用いた。

ACE活性の測定には、Hayakariらが開発した方法を用いた¹⁰⁻¹¹⁾。すなわち、300 nM NaClを含む100 mM ホウ酸ナトリウム緩衝液中で、人工基質5 mM hippuryl-histidyl-leucineとACE (60 ~ 65 mU/mL溶液, 25 μ L) とを30分間反応させた。2N塩酸、50 μ Lで反応停止後、反応生成物の馬尿酸を3%塩化シアヌール/ジオキサン溶液にて発色させ、波長382 nmでの吸光度を酵素活性とした。なお、1分間に産生される馬尿酸1 μ molを酵素1単位 (U) とした。

また、ACE阻害活性は、酵素反応液に大豆抽出液を添加し、非添加時のACE阻害活性を100%としたときの比率 (%) で表現した。

大豆抽出液からのACE阻害物質精製

大豆抽出液をアンモニウム溶液にてpH 9.0に調整後、OH型に平衡化した陰イオン交換樹脂 (AG 1-x8, 5×50 cm, Bio-Rad) カラムに付した。蒸留水 (5,000 mL) にて洗浄後、0.5 M HClにてACE阻害物質を溶出した。溶出液はエバポレーターにて濃縮した (分画1, 約200 mL)。

分画1の6分の1 (30 mL) を蒸留水で平衡化したSephadex G-25 (7×17 cm) カラムに付し糖類の除去を行った。溶出液についてACE活性の測定を行い、ACE阻害を示す分画を集め濃縮した。分画Iの残り50 mLについても同様の操作を実施し、ACE阻害を示す分画を集め濃縮した。続いて、濃縮液の4分の1を再びSephadex G-25 (2.5×50 cm) カラムに付し、溶出液についてACE阻害活性を示す部分を集め濃縮した (分画2, 約15 mL)。

分画2の3分の1 (5 mL) を蒸留水で平衡化したSephadex G-15 (2.5×50 cm) カラムにて分離した。残りの分画2についても同様の分離操作を行い、ACE阻害活性部分を集め濃縮した (分画3, 約5 mL)。

分画3をOH型に平衡化したAG 1-x8 (2.5×30 cm) に再び付し、0.20 M HClリニアグラジエント法にてACE阻害物質を分離し、阻害活性分画を集め濃縮後乾燥した (分画4, 約30 mg)。

分画4を0.1%トリフルオロ酢酸 (TFA) 水溶液2 mL

に溶解後、同溶液で平衡化したC18 (Wako Gel LP-60C18, 2×10 cm, 和光純薬工業) カラムに付し、未吸着画分を集め、濃縮後凍結乾燥した (分画5, 約20 mg)。

分画5をアンモニア水溶液 (pH 9.6) 2 mLに溶解後、同溶液で平衡化したSAXカラム (陰イオン交換樹脂, 4.6×15 cm, 東ソー) を用いたHPLC法にて分離精製した。なお、試料の注入は50 μ L/回とした。HPLCの分離条件は、A液にアンモニア水溶液 (pH 9.6)、B液に200 mMギ酸アンモニウム (pH 4.5) を用い、2分までをA液100%、2 ~ 60分までをA液85%、B液15%とした。流速は0.9 mL/分とした。分離したACE阻害画分を分取後に集めて濃縮し、凍結乾燥した (分画6, 約4 mg)。

大豆含有ACE阻害物質の同定

前項で得た分画6について、NMRスペクトル解析ならびに質量分析を行った。NMRスペクトル解析は、D₂Oを溶媒として α -400 (日本電子) により行った。NMRスペクトル解析の内部標準物質として、HOD (δ_H 4.63 ppm) を用いた。質量分析は、Nano Frontier LD (日立製作所) により行った。

大豆含有飼料の調製

ラット投与飼料の調製は以下のように行った。まず大豆を蒸留水と共にミキサーにて粉碎し、ラット用粉餌 (Certified Diet MF) と大豆含有量が10%となるように混合した。それらを適当な大きさに裁断したものを十分乾燥させ飼料として用いた。

RAS系制御薬および大豆がラット皮下および腹腔内脂肪の蓄積に与える影響

動物実験の内容については、弘前大学医学部動物実験委員会の承認を得て実施した。ラットの成長に伴う皮下および腹腔内脂肪蓄積は、体重150 gのSDラットを15週間、3週間、6週間、10週間、30週間飼育し、飼育期間終了後、速やかに放血致死させ、皮下および腹腔内脂肪組織を摘出し、その重量を測定することにより評価した。ACE阻害薬が脂肪蓄積に与える影響は、体重150 gのSDラットにACE阻害剤Captopril (5 mg/mg, 20 mg/kg)、アンジオテンシン受容体拮抗薬 (ARB) Olmesartan (1 mg/kg, 4 mg/kg)、Losartan (5 mg/kg, 20 mg/kg) を毎日腹腔内投与し、2週間飼育した。大豆摂取が脂肪蓄積に与える影響の評価は、体重150 gのSDラットを大豆含有飼料にて2週間飼育することにより行った。ラットは飼育期間終了後、速やか

に放血致死させ、皮下および腹腔内脂肪組織を摘出し、その重量を測定した。

ラット脂肪組織AGTの定量

皮下および腹腔内脂肪組織のAGTは、ラットAGTのC-末端ペプチドを合成後、ヘモシアニンと化学結合した複合体をウサギに免疫して作製した自作抗体を用いたイムノプロット法により定量した。

統計解析

統計的評価を要する実験結果は平均値±標準偏差で表した。多群間の比較には、一元配置分散分析を行い、有意差が認められた場合、Dunnettの多重比較検定を行った。統計学的解析は、IBM SPSS21 Statistics Base（日本アイ・ビー・エム）を用いた。

結果と考察

大豆より単離精製したACE阻害物質は、NMRスペクトル、質量分析により、ムギネ酸前駆物質ニコチアナミンであることが明らかになった。大豆をはじめとする多くの豆類にはニコチアナミンが含有され、それが豆類のACE阻害活性の大部分を占めることが既に報告されている¹²⁻¹³⁾。

続いて、脂肪蓄積ならびに脂肪組織におけるAGTの発現に対するRAS系制御薬の影響を評価した。先ず、コントロールたる、SDラットの成長による皮下および腹腔内脂肪の蓄積傾向ならびに脂肪組織におけるAGTの発現傾向をラット長期飼育により確認した。腹腔内脂肪組織では、6週齢（体重約150 g）、7.5週齢（体重約250 g）、9週齢（体重約350 g）において高いAGT発現量を示し、それ以降の週齢では徐々にAGT発現量が減少することが明らかとなった（Fig. 2）。一方、皮下脂肪組織におけるAGT発現量は腹腔内脂肪組織に比べ顕著に低く、さらに体重週齢増加に伴いAGT発現量は徐々に減少することが明らかとなった（Fig. 2）。また、脂肪細胞に発現しているAGTは単一の分子量ではなく、異なる4種の分子量を有しており、これら分子量の異なるAGTはglycopeptidase処理により単一分子量のAGTに収束した。このことから、脂肪細胞に発現しているAGTは結合している糖鎖数が異なる4種が存在することが示唆された。

続いて、AGTの発現が亢進している6週齢のラットに、ACE阻害薬CaptoprilならびにARB OlmesartanおよびLosartanの3種のRAS系制御薬を投与し、RAS系の制御が腹腔内および皮下脂肪の蓄積ならびに脂

肪組織におけるAGTの発現に影響を与えるか否かを検証した。その結果、3種全てのRAS系制御薬で体重減少効果が認められ（Fig. 3）、高濃度のCaptoprilとLosartanでは腹腔内脂肪蓄積抑制効果（Captopril; $65.7 \pm 6.71\%$ of control, Losartan; $57.2 \pm 11.1\%$ of control）が確認された。一方で、RAS系制御薬の皮下脂肪蓄積抑制効果は認められなかった。また、これら3種の

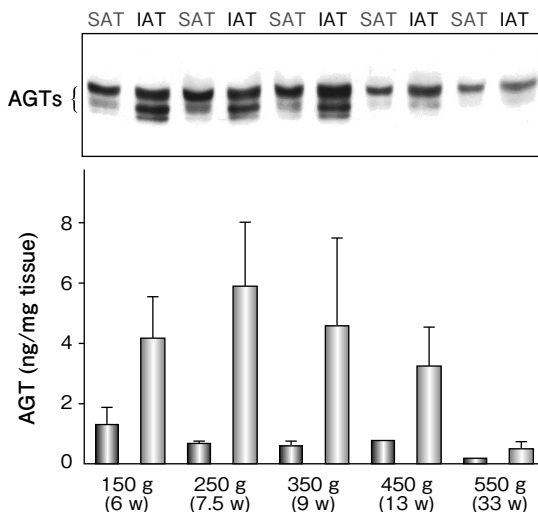


Fig. 2. AGT expressions in rat intra abdominal adipose tissue (IAT) and subcutaneous abdominal adipose tissue (SAT). Expressions of AGTs in rat adipose tissues were determined by Immuno-blot and Dot-blot ELISA. Each column represents the mean with S.D. of 4 rats.

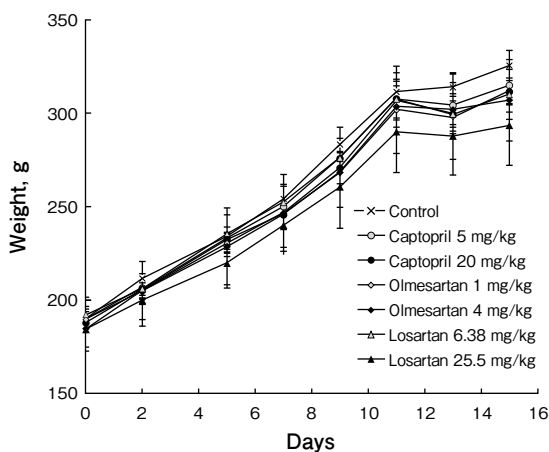


Fig. 3. Effects of Renin-Angiotensin System (RAS) blockade on body weight in rats. Each point represents the mean with S.D. of 3 rats.

RAS系制御薬は、腹腔内脂肪組織におけるAGTの発現を抑制した (Fig. 4)。RAS系制御薬は、皮下脂肪組織におけるAGTの発現に対しても抑制効果を発揮したが、その効果は腹腔内脂肪組織に対するものより弱いものであった (Figs. 5)。

さらに、RAS系制御薬のAGT発現抑制効果について、AGTのglycosylation比率に着目し、解析を加えた。腹腔内脂肪ではglycosylation比率に関係なく、RAS系制御薬投与により、すべての分子サイズのAGTの発現が抑制されていることが確認された (Fig. 3)。一方、皮下脂肪では、結合糖鎖数が少ない低分子サイズAGTの発現はRAS系制御薬投与により顕著に抑制されたものの、高度にglycosylationが進んでいる高分子サイズAGTはRAS系制御薬を投与しても発現量に差は認められなかった (Fig. 4)。これらの結果は、RAS

系制御薬の脂肪蓄積抑制効果は高分子サイズAGTの発現減少を介して発揮されている可能性を示唆するものであった。RAS系制御薬が皮下脂肪細胞において、高分子サイズAGTの発現を減少させることができなかった理由は現在のところ明らかではないが、低分子サイズAGTへのさらなる糖鎖結合の過程が、皮下脂肪細胞さらには内臓脂肪細胞の蓄積を抑制する上での鍵過程である可能性が考えられた。

最後に、大豆摂取による皮下および腹腔内脂肪の蓄積抑制効果を検討した。しかしながら、現在まで大豆摂取による脂肪蓄積抑制効果は確認できていない。飼料の大豆含有量、飼育期間、煮汁から抽出したニコチアナミンの飼料への配合¹³⁾等について更なる検討を蓄積していくことが必要と考えられる。

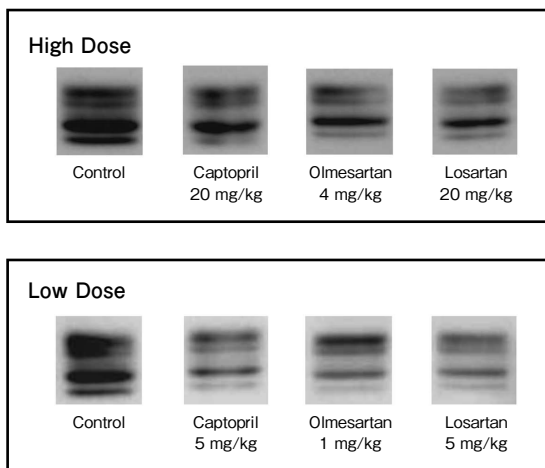


Fig. 4. Effects of RAS blockade on AGT expressions in rat IAT. Expressions of AGTs in rat IAT were determined by Immuno-blot using anti-rat AGT antibody.

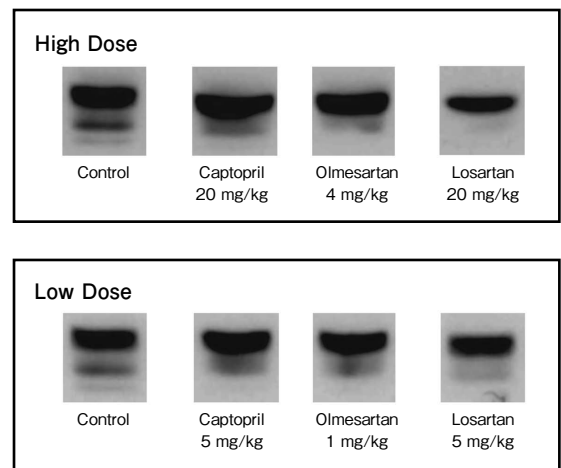


Fig. 5. Effects of RAS blockade on AGT expressions in rat SAT. Expressions of AGTs in rat SAT were determined by Immuno-blot using anti-rat AGT antibody.

要 約

大豆より単離精製したACE阻害物質はムギネ酸前駆物質ニコチアナミンであった。Captopril投与ラットとLosartan投与ラットでは、腹腔内脂肪蓄積抑制を伴う体重減少が確認された。脂肪細胞に発現しているAGTは、結合している糖鎖数が異なる4種が存在していた。高分子サイズAGTが内臓脂肪型肥満改善効果発現の鍵因子であり、内臓脂肪型肥満改善の有用なターゲットとなる可能性が示唆された。

文 献

- 1) Reaven GM (1988): Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*, **37**, 1595-1607.
- 2) Kaplan NM (1989): The deadly quartet. Upper-body obesity, glucose intolerance, hypertriglyceridemia, and hypertension. *Arch Intern Med*, **149**, 1514-1520.
- 3) DeFronzo RA and Ferrannini E (1991): Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care*, **14**, 173-194.
- 4) 徳永勝人, 中村 正, 久保正治, 松澤佑次 (1992): 内臓脂肪症候群. 日本内科学会雑誌, **81**, 1831-1835.
- 5) Abuissa H, Jones PG, Marso SP and O'Keefe JH Jr. (2005): Angiotensin-converting enzyme inhibitors or angiotensin receptor blockers for prevention of type 2 diabetes: a meta-analysis of randomized clinical trials. *J Am Coll Cardiol*, **46**, 821-826.
- 6) Fogari R, Derosa G, Zoppi A, Lazzari P, Corradi L, Preti P and Mugellini A (2008): Effect of delapril/manidipine vs olmesartan/hydrochlorothiazide combination on insulin sensitivity and fibrinogen in obese hypertensive patients. *Intern Med*, **47**, 361-366.
- 7) 下村伊一郎, 船橋 徹, 松澤佑次 (2004): Metabolic syndrome: 診断と治療の進歩 II. 機序と病態 1. 肥満の役割 - アディポサイトカインの産生異常 -. 日本内科学会雑誌, **93**, 655-661.
- 8) Massiéra F, Bloch-Faure M, Ceiler D, Murakami K, Fukamizu A, Gasc JM, Quignard-Boulangé A, Negrel R, Ailhaud G, Seydoux J, Meneton P and Teboul M (2001): Adipose angiotensinogen is involved in adipose tissue growth and blood pressure regulation. *FASEB J*, **15**, 2727-2729.
- 9) Sato Y, Itagaki S, Oikawa S, Ogura J, Kobayashi M, Hirano T, Sugawara M and Iseki K (2011): Protective effect of soy isoflavone genistein on ischemia-reperfusion in the rat small intestine. *Biol Pharm Bull*, **34**, 1448-1454.
- 10) Hayakari M, Kondo Y and Izumi H (1978): A rapid and simple spectrophotometric assay of angiotensin-converting enzyme. *Anal Biochem*, **84**, 361-369.
- 11) Hayakari M, Seito R, Furugori A, Hashimoto Y and Murakami S (1984): An improved colorimetric assay of angiotensin-converting enzyme in serum. *Clin Chem Acta*, **144**, 71-75.
- 12) 伊澤華子, 吉田 望, 白貝紀江, 青柳康夫 (2008): 豆類のニコチアナミン含量とアンジオテンシン I 変換酵素阻害活性. 日本食品科学工学会誌, **55**, 253-257.
- 13) 竹中哲夫 (2009): 大豆煮汁由来アンジオテンシン I 変換酵素阻害物質の単離と高血圧自然発症ラットに対する降圧作用. 日本醸造協会誌, **104**, 858-865.