

**<sup>13</sup>C-グルコースを用いたエネルギー代謝測定による、  
大豆β-コングリシニン摂食が糖代謝に与える影響に関する研究**

井上奈穂\*・船山明日和・池田郁男

東北大学大学院農学研究科食品化学分野

**The Evaluation of the effect of Soybean β-Conglycinin on Glucose Metabolism  
in Wistar Rats by Oral <sup>13</sup>C-Glucose Administration**

Nao INOUE\*, Asuwa FUNAYAMA and Ikuo IKEDA

Laboratory of Food and Biomolecular Science, Graduate School of Agricultural Science,  
Tohoku University, Sendai, 981-8555

ABSTRACT

Previously, we suggested that β-conglycinin (β-CG) prevents the development of type 2 diabetes through the improvement of carbohydrate metabolism and insulin sensitivity in GK rats. However, though serum glucose and insulin levels were significantly lower in the β-CG group as compared with the casein group, there was no significant difference in OGTT. From these results, we hypothesized that OGTT caused stress in the experimental animals from continuous tail blood sampling. Therefore, we evaluated the effect of soybean β-CG on glucose metabolism in Wistar rats by oral <sup>13</sup>C-glucose administration. Male GK rats were fed an AIN-93G diet containing casein or β-CG for 1wk. As the result of respiratory gas analysis after oral <sup>13</sup>C-glucose administration, the peak of <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C rate appeared faster in the β-CG-fed rats than in the casein-fed rats. The serum adiponectin level was significantly higher in the β-CG-fed rats, but there were no significant differences in serum glucose and insulin levels. Serum and hepatic triacylglycerol levels in the β-CG-fed rats were significantly lower. The feeding of β-CG suppressed the activities of enzymes related to fatty acid synthesis and enhanced the activity of carnitine palmitoyltransferase in the liver compared to the feeding of casein. In this study, we showed that the measurement of energy metabolism by oral <sup>13</sup>C-glucose administration was an effective alternative evaluation to OGTT. Furthermore, we clarified that soybean β-CG improved carbohydrate metabolism through the preferential glucose consumption and the enhancement of adiponectin secretion. *Soy Protein Research, Japan* **17**, 145-149, 2014.

\*〒981-8555 宮城県仙台市青葉区堤通雨宮町1-1

Key words :  $\beta$ -conglycinin, Wistar rats,  $^{13}\text{C}$ -glucose, glucose metabolism, energy metabolism

近年、食生活の欧米化や運動不足などにより、肥満、脂質異常症、糖尿病などの生活習慣病が増加している。これら生活習慣病は動脈硬化性疾患の発症リスクを高めることが知られており、その予防・改善に有効な機能性食品成分の研究が盛んに行われている。大豆は古来より日本で食され、その栄養価の高さや健康に対する有益な機能が注目される食品素材である。大豆たん白質はこれまでに、血中コレステロール低下作用や抗がん作用などが報告され<sup>1,2)</sup>、大豆たん白質成分のひとつである $\beta$ -コングリシニン ( $\beta$ -CG) にも血中コレステロールおよびトリアシルグリセロール (TAG) 低下作用などが報告されている<sup>3,4)</sup>。我々の過去の研究において、Wistarラットに $\beta$ -CGを摂取させたところ、血清TAG低下作用や肝臓からのVLDL放出阻害作用に加え、炭水化物消費亢進作用および血清アディポネクチン上昇作用を示した<sup>5)</sup>。これまでも、Moriyamaらは $\beta$ -CGが健常または肥満モデルマウスの空腹時血糖値および血清インスリン濃度を低下させることを報告し<sup>6)</sup>、Tachibanaらは $\beta$ -CGが血清アディポネクチン濃度を上昇させ、耐糖能を改善することを報告している<sup>7)</sup>。このように、 $\beta$ -CGは脂質代謝だけでなく、糖代謝異常を改善する新たな可能性を有すると考えられる。

経口グルコース負荷試験 (OGTT) は一般的に耐糖能評価試験として用いられる。しかしながら、OGTTは経時的な尾採血を必要とし、この尾採血は実験動物にストレスを与える。ストレスが糖代謝に影響を及ぼす可能性は否定出来ず、そのため耐糖能を正確に測定できているとは言い難い。一方、安定同位体 $^{13}\text{C}$ -グルコースを経口投与し、呼気中に排出される $^{13}\text{CO}_2$ を検出する方法は尾採血の必要がないだけでなく、摂取したグルコースの消費について、より明確に測定することを可能とする。

これまで、 $^{13}\text{C}$ -グルコース投与条件下でエネルギー代謝測定を行い、 $\beta$ -CG摂取が糖代謝に及ぼす影響を検討した研究はない。そこで、本研究では、 $^{13}\text{C}$ -グルコースを用い、 $\beta$ -CGが糖代謝、とくに耐糖能に与える影響を明確にすることを目的とした。

## 方 法

5週齢雄性Wistarラットは日本クレア (東京) から購入した。飼育条件は室温 $21^\circ\text{C} \sim 25^\circ\text{C}$ 、明暗12時間サ

イクル、金属ケージにて個飼いとす。1週間の馴化後、AIN-93G組成に準じ窒素含量が等しくなるように調製したカゼイン食 (Con群) もしくは $\beta$ -コングリシニン食 ( $\beta$ -CG群) を与え、1週間の試験飼育を行った (Table 1)。試験飼育6日目に5時間絶食後、 $^{13}\text{C}$ -グルコースの経口投与を行った。投与液は $^{13}\text{C}$ -グルコース 8 mg/mL、 $^{12}\text{C}$ -グルコース 40 mg/mLの組成で調製し、投与量は $^{13}\text{C}$ -グルコース 12 mg/100g BW、 $^{12}\text{C}$ -グルコース 60 mg/100g BWとした。経口投与後、即座に生体ガス質量分析装置ARCO-2000 (アルコシステム、千葉) を用いて $^{13}\text{CO}_2$ 排出量および $^{12}\text{CO}_2$ 排出量の測定を6時間行った。呼気ガス測定中は絶食し、水は自由摂取させた。データは $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 比で表し、1時間ごとの平均値を算出した。さらに、 $^{13}\text{C}$ グルコース投与前1時間の呼気ガス中の平均 $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 比を測定し、これをベースラインとして、投与後1時間毎の変化量を示した。飼育最終日に絶食せずに腹部大動脈採血により屠殺し、血液、肝臓、白色脂肪組織を採取した。

データの統計解析は、Student's t-testを用いて行い、 $p < 0.05$ を有意とした。

## 結果と考察

$^{13}\text{C}$ -グルコース投与後の呼気ガス測定試験の結果、 $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ 比の曲線下面積に2群間で差はなかったものの、 $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ 比のピークはCon群と比べて $\beta$ -CG群で早く現れ、投与後2~3、3~4、4~5、5~6時間

Table 1. Composition of the diets (g/kg)

Ingredients	Control	$\beta$ -CG
Casein <sup>1</sup>	233.4	0
$\beta$ -Conglycinin <sup>2</sup>	0	220.8
$\beta$ -Cornstarch	367.486	381.486
$\alpha$ -Cornstarch	132	132
Sucrose	100	100
Cellulose	50	50
Soybean oil	70	70
Vitamin Mixture (AIN-93)	10	10
Mineral Mixture (AIN-93G)	35	35
Choline bitartrate	2.5	2.5
<i>tert</i> -butylhydroquinone	0.014	0.014
Total	1,000	1,000

<sup>1</sup>Crude protein content was 83.2%, Wako Pure Chemicals.

<sup>2</sup>Crude protein content was 90.6%, Fuji Oil.

においては $\beta$ -CG群がCon群より有意に低い値を示した (Fig. 1). このことから,  $\beta$ -CG摂取によりグルコース処理能力が亢進し, 摂取したグルコースが速やかに消費される可能性が示唆された.

飼育終了後の終体重, 体重増加量, 総摂食量, 摂食効率は $\beta$ -CG群がCon群より有意に低い値を示した (Table 2). 各組織重量は肝臓および精巣周囲白色脂肪組織重量が $\beta$ -CG群でCon群より有意に低かった (Table 2).

血清グルコース, インスリン, レプチン濃度に群間で差は見られなかったものの, 血清アディポネクチン濃度は $\beta$ -CG群でCon群より有意に高い値を示した (Fig. 2). 血清および肝臓TAG濃度は $\beta$ -CG群がCon群より

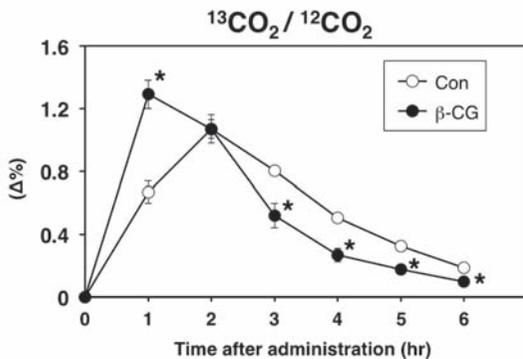


Fig. 1.  $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$  ratio in respiratory gas after  $^{13}\text{C}$ -glucose administration. Data are means  $\pm$  SE of 6 rats. Asterisks show significant differences at  $p < 0.05$ . Con: Control group,  $\beta$ -CG:  $\beta$ -Conglycinin group.

Table 2. Effect of dietary  $\beta$ -conglycinin on body weight, body weight gain, food intake and liver and WAT weights

	Control	$\beta$ -CG
Final BW (g)	217 $\pm$ 3	178 $\pm$ 3*
BW gain (g)	45.9 $\pm$ 1.9	5.95 $\pm$ 2.51*
Total food intake (g)	121 $\pm$ 2	99.2 $\pm$ 5.5*
Food efficiency	0.379 $\pm$ 0.010	0.0549 $\pm$ 0.0228*
Liver weight (g/100g BW)	5.35 $\pm$ 0.06	4.54 $\pm$ 0.09*
Total WAT weight (g/100g BW)	2.84 $\pm$ 0.10	2.52 $\pm$ 0.15
Epididymal WAT	0.951 $\pm$ 0.027	0.691 $\pm$ 0.043*
Perirenal WAT	0.865 $\pm$ 0.032	0.937 $\pm$ 0.058
Omental WAT	0.198 $\pm$ 0.009	0.225 $\pm$ 0.052

Data are means  $\pm$  SE of 6 rats. Asterisks show significant differences at  $p < 0.05$ . BW; body weight, WAT; white adipose tissue

有意に低かった (Fig. 3).  $\beta$ -CG 摂取によるTAG低下作用が認められたことから, 肝臓の脂質代謝関連酵素活性を測定したところ, 脂肪酸生合成系酵素である脂肪酸合成酵素 (FAS) およびグルコース6リン酸脱水素酵素 (G6PDH) の活性はCon群より $\beta$ -CG群で有意に低く,  $\beta$ 酸化系のカルニチンパルミトイル転移酵素 (CPT) の活性は有意に高かった (Fig. 4). 以前, 我々が行った4週間の試験飼育でも同様の結果が示されたが<sup>5)</sup>, 今回の結果より,  $\beta$ -CGは1週間という短期摂取であっても, アディポネクチン産生亢進作用および脂質低下作用を示すことが明らかとなった.

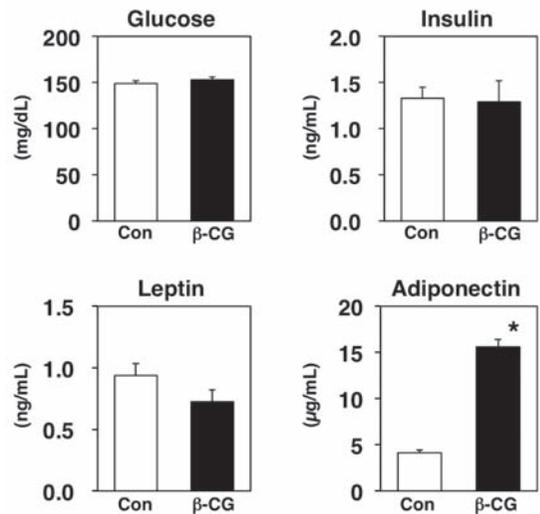


Fig. 2. Effect of dietary  $\beta$ -conglycinin on serum glucose, insulin, leptin and adiponectin levels. Data are means  $\pm$  SE of 6 rats. Asterisks show significant differences at  $p < 0.05$ . Con: Control group,  $\beta$ -CG:  $\beta$ -Conglycinin group.

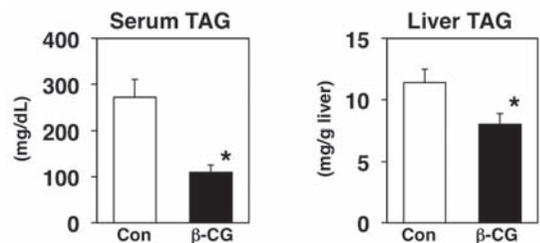


Fig. 3. Effect of dietary  $\beta$ -conglycinin on serum and liver triacylglycerol levels. Data are means  $\pm$  SE of 6 rats. Asterisk shows significant difference at  $p < 0.05$ . TAG; Triacylglycerol, Con: Control group,  $\beta$ -CG:  $\beta$ -Conglycinin group.

アディポネクチン発現亢進には脂肪細胞の分化に関わるPPAR $\gamma$ が関わっている。そこで、白色脂肪組織中のPPAR $\gamma$ mRNA発現量を測定したところ、Con群と比較して $\beta$ -CG群で有意に高い値を示した。また、糖の取り込みに関わるGLUT4 mRNA発現量も $\beta$ -CG群で有意に高い値を示した。しかしながら、Adiponectin mRNA発現量は群間に差は認められなかった (Table 3)。

本研究により、 $\beta$ -CG摂取によりグルコース処理能力が亢進し、摂取したグルコースが速やかに消費される可能性が示唆され、以前、我々が糖尿病モデルラットを用いて行ったOGTTでは明らかにならなかった $\beta$ -CG摂食による糖代謝亢進作用を明確に示す結果が得られた。さらに、 $\beta$ -CGは短期摂取であってもアディポネクチン産生亢進作用および脂質低下作用を示すことが明らかとなった。

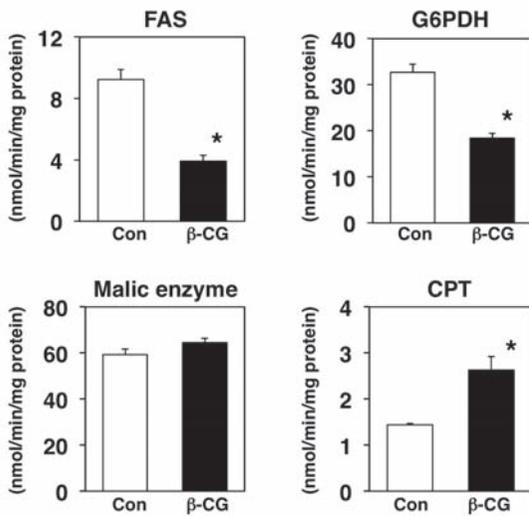


Fig. 4. Effect of dietary  $\beta$ -conglycinin on hepatic enzyme activities related to lipid metabolism. Data are means  $\pm$  SE of 6 rats. Asterisks show significant differences at  $p < 0.05$ . FAS; Fatty acid synthase, G6PDH; Glucose-6-phosphate dehydrogenase, CPT; Carnitine palmitoyltransferase, Con: Control group,  $\beta$ -CG:  $\beta$ -Conglycinin group.

Table 3. Effect of dietary  $\beta$ -conglycinin on mRNA expressions of PPAR $\gamma$ , adiponectin and GLUT4 in WAT

Arbitrary unit	Control	$\beta$ -CG
Genes related to adiponectin		
PPAR $\gamma$	1.00 $\pm$ 0.06	1.40 $\pm$ 0.09*
Adiponectin	1.00 $\pm$ 0.05	1.16 $\pm$ 0.08
Glucose transporter		
GLUT4	1.00 $\pm$ 0.09	1.78 $\pm$ 0.14*

Data are means  $\pm$  SE of 6 rats. Asterisks show significant differences at  $p < 0.05$ . WAT; white adipose tissue, PPAR $\gamma$ ; peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ , Con: Control group,  $\beta$ -CG:  $\beta$ -Conglycinin group.

## 要 約

食品成分が糖代謝に及ぼす影響を検討する場合、一般的に、経口グルコース負荷試験 (OGTT) が用いられる。しかしながら、経時的に連続して尾採血を行うことは実験動物にストレスをかける。このストレスが糖代謝に影響を及ぼしている可能性は否定出来ず、耐糖能を正確に測定できているとは言い難い。一方、 $^{13}\text{C}$ -グルコースを用いたエネルギー代謝測定は尾採血のストレスをかけることなく耐糖能を測定することができ、糖代謝、とくに糖消費を明確に測定することが可能である。これまでに $^{13}\text{C}$ -グルコース投与による大豆  $\beta$ -コングリシニン摂取の糖代謝への影響を評価した研究はない。そこで、本研究では、 $^{13}\text{C}$ -グルコースを用いた呼気ガス測定により、大豆  $\beta$ -コングリシニン摂取が糖代謝、とくに耐糖能に与える影響を明確にすることを目的とした。5週齢雄性WistarラットにAIN-93G組成に準じ、窒素含量が等しくなるように調製したカゼイン食 (Con群) もしくは  $\beta$ -コングリシニン食 ( $\beta$ -CG群) を与えた。飼育6日目に $^{13}\text{C}$ -グルコース投与による呼気ガス測定試験を行い、7日目に絶食なしで屠殺した。 $^{13}\text{C}$ -グルコース投与後、6時間の呼気ガス測定を行った結果、 $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ 比の曲線下面積に2群間で差はなかったものの、 $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ 比のピークはCon群と比べて  $\beta$ -CG群で45分程度早く現れ、 $\beta$ -CG摂取により糖が優先的に利用されることが示唆された。また、飼育終了後の血糖値および血清インスリン濃度に差は見られなかったものの、血清アディポネクチン濃度は  $\beta$ -CG群で有意に高かった。今回の $^{13}\text{C}$ -グルコース投与試験によって、以前、我々が糖尿病モデルラットを用いて行ったOGTTでは明らかにならなかった  $\beta$ -CG摂取による糖代謝亢進作用を明確に示す結果が得られた。

## 文 献

- 1) Sugano M and Koba K (1993): Dietary protein and lipid metabolism: a multifunctional effect. *Ann NY Acad Sci*, **676**, 215-222.
- 2) Anderson JW, Johnstone BM and Cook-Newell ME (1995): Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. *N Eng J med*, **333**, 276-282.
- 3) Kohno M, Hirotsuka M, Kito M and Matsuzawa Y (2006): Decreases in serum triacylglycerol and visceral fat mediated by dietary soybean  $\beta$ -conglycinin. *J Atheroscler Thromb*, **13**, 247-255.
- 4) Fukui K, Kojima M, Tachibana N, Kohno M, Takamatsu K, Hirotsuka M and Kito M (2004): Effects of soybean  $\beta$ -conglycinin on hepatic lipid metabolism and fecal lipid excretion in normal adult rats. *Biosci Biotechnol Biochem*, **68**, 1153-1155.
- 5) 井上奈穂, 藤原由佳, 船山明日和, 加藤正樹, 池田郁男 (2012):  $\beta$ -コングリシニンのエネルギーおよび脂質代謝に与える影響に関する研究. 大豆たん白質研究 **15**, 68-71.
- 6) Moriyama T, Kishimoto K, Nagai K, Urade R, Ogawa T, Utsumi S, Maruyama N and Maebuchi M (2004): Soybean  $\beta$ -conglycinin diet suppresses serum triglyceride levels in normal and genetically obese mice by induction of  $\beta$ -oxidation, downregulation of fatty acid synthase, and inhibition of triglyceride absorption. *Biosci Biotechnol Biochem*, **68**, 352-359.
- 7) Tachibana N, Iwaoka Y, Hirotsuka M, Horio F and Kohno M (2010):  $\beta$ -Conglycinin lowers very-low-density lipoprotein-triglyceride levels by increasing adiponectin and insulin sensitivity in rats. *Biosci Biotechnol Biochem*, **74**, 1250-1255.