

大豆たん白質摂取による代謝改善効果の分子標的解析研究（第三報）

佐藤隆一郎・清水 誠・井上裕康*・中田理恵子*

東京大学大学院農学生命科学研究科・応用生命化学専攻

*奈良女子大学・生活環境学部

Study of the Molecular Targets of Metabolic Improvement Caused by Soy Protein Intake

Ryuichiro SATO, Makoto SHIMIZU, Hiroyasu INOUE* and Rieko NAKATA*

Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, Tokyo 113-8657

*Department of Food Science and Nutrition, Nara Women's University, Nara 630-8506

ABSTRACT

C57BL/6 mice were fed a high-fat diet containing either casein or β -conglycinin for 9 weeks. Blood parameters were improved and increased weight gain was suppressed by β -conglycinin consumption, consistent with several previously published results. The wet weights of adipose tissues of mice fed the β -conglycinin diet were significantly lowered, reflecting the inhibition of body weight gain. Analyses of the expression of the genes related to heat generation in subcutaneous white adipose tissue (subWAT) reveal that *ucp-1* gene expression was increased by β -conglycinin. In contrast, there were no major changes in brown adipose tissues. Moreover, increased FGF21 gene expression was observed in subWAT of mice fed the β -conglycinin diet. When FGF21-deficient mice were fed the same set of diets for 9 weeks, the mRNA levels of *ucp-1* in subWAT were substantially low and kept constant even after β -conglycinin consumption. Taken together, the anti-obesity effect of β -conglycinin consumption might be partly accounted for by an increase in heat generation caused by increased *ucp-1* expression in subWAT. It may also be concluded that FGF21 is involved in the up-regulation of *ucp-1* gene expression. Further studies are needed to elucidate the mechanism by which FGF21 gene expression in subWAT is increased by β -conglycinin ingestion. *Soy Protein Research, Japan* **18**, 12-16, 2015.

Key words : β -conglycinin, FGF21, *ucp-1*

*〒113-8657 東京都文京区弥生1-1-1

大豆たん白質の代謝改善効果は数多くの先行研究により明らかにされている^{1,3)}。我々の中でも β -コングリシニン (β -con) の効果に着目し研究を進め、第一報、第二報において、その代謝改善効果、抗肥満効果について報告をしてきた。 β -conをたん白質源とする高脂肪食をマウスに長期間投与すると、顕著な代謝改善、抗肥満効果が現れ、それを説明する種々の遺伝子の発現の変化が確認された。その中で一つの標的分子としてFGF21を見出した。FGF21は絶食時に発現、血中濃度が上昇し、脂質代謝を改善し、熱産生上昇等を介して抗肥満活性を示すことが知られている⁴⁾。

第三報研究では、 β -コングリシニン (β -con) の機能についての第二報までの研究成果に基づき、さらなる解析を進展させた。 β -con食で認められた抗肥満効果の原因とも考えられる脂肪組織の重量減少について、特に白色脂肪組織における応答について解析を進めた。その結果、 β -コングリシニンの代謝改善効果の一部を説明する知見を得ることに成功した。

実 験 方 法

【大豆たん白質】

不二製油株式会社より提供いただいた、精製 β -コングリシニン (β -con) を用いた。コントロールの動物性たん白質としてカゼインを用いた。

【実験動物+実験食】

雄C57BL/6マウス (5週齢, 日本クレア社) を7日間、カゼインをたん白質源とする高脂肪食 (カロリー比として50%脂質含む) で予備飼育した (Table 1)。その後2群に分け、それぞれ20%カゼインもしくは β -conを含む高脂肪食を9週間自由摂取させた。摂食量を記録し、体重は7日毎に測定した。最終日朝、餌を回収し、6時間絶食後に屠殺した。皮下脂肪、精巣上体脂肪、肩甲骨間褐色脂肪組織を回収し、その重量を測定した。FGF21欠損マウスは京都大学大学院・伊藤信行教授より恵与いただいた⁵⁾。野生型マウスと同様に9週間の摂食実験に用いた。

【血中成分解析】

血糖値はグルコース測定キット (グルコースCII-テストワコー, 和光純薬) を用いて定量した。インスリンは、インスリン測定キット (レビスインスリン-マウスT, (株) シバヤギ) を用いて定量した。

トリグリセリド、総コレステロール、HDL-コレステロール、遊離脂肪酸、胆汁酸は、トリグリセリド測定用キット、総コレステロール測定用キット、HDL-コレステロール測定用キット、遊離脂肪酸測定用キッ

Table 1. Composition of experimental diets

	Casein	β -conglycinin	
	(g/100 g)	(kcal)	(g/100 g) (kcal)
Casein	22.9	79.0	
β -conglycinin			20.8 80.5
Amino acid mix			
Cornstarch	20.9	83.8	22.8 91.2
α -Cornstarch	6.8	27.0	7.4 29.5
Sucrose	10.0	40.0	10.0 40.0
Soybean oil	7.0	63.0	7.0 63.0
Fiber	6.2		6.2
Mineral Mix (AIN-93)	4.3		4.3
Vitamin Mix (AIN-93)	1.2		1.2
L-cystine	0.3	1.2	
Choline Bitartrate	0.3		0.3
Lard	20.0	180.0	20.0 180.0
Total	100.0	474.0	100.0 484.2
Protein	20.0%		20.0%
Energy (%)			
Carbohydrate		31.8	33.2
Protein		16.7	16.6
Lipid		51.3	50.2

ト、胆汁酸測定用キット (いずれも和光純薬) を用いて定量した。

【皮下脂肪組織における遺伝子発現量解析】

解剖後、皮下脂肪、精巣上体脂肪、褐色脂肪組織より総RNAを抽出し、逆転写酵素によりcDNAを調製後、real-time PCR法によりmRNA量を定量した。多くの遺伝子について、それぞれのTaqman probeを用い、定量PCRを行った。一部の遺伝子は、固有のprimerを設計し、同じく定量PCRを行った。ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems) を用いて定量を行った。内部標準として18S rRNA量を測定し、その数字で各遺伝子発現量を標準化した。

結 果 と 考 察

高脂肪 β -con食の長期投与の効果

カゼインもしくは β -conを20%含む高脂肪食をマウスへ9週間投与した。 β -con食の摂食量は、カゼイン食のそれとほぼ同等であった。9週間の体重増加は、カゼイン食に比べ、 β -con食で1週目より9週目まですべての測定時において有意に低かった。それを反映して、各種脂肪組織の湿重量は、 β -con食マウスで著しく低値を示した (Fig. 1)。また、血中グルコース濃度、総コレステロール濃度、インスリン濃度はいずれも β -con食摂取マウスで低かった (data not shown)。

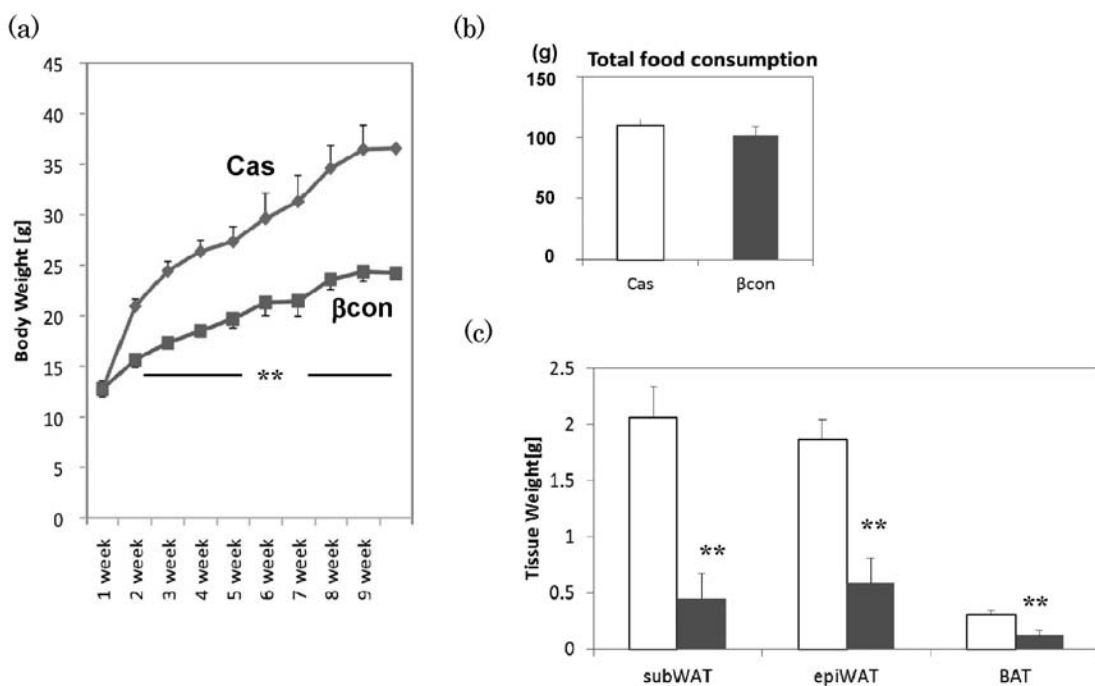


Fig. 1. Changes in body and tissue weights in mice either the casein or β -conglycinin diet for 9 weeks. Five-week old male mice (C57BL/6) were acclimated to the casein high fat diet for 7 days, and the fed either the casein (Cas) or β -conglycinin (β -con) diet for 9 weeks. After 6 h starvation, the mice were sacrificed. (a) Body weight of mice. Error bars represent mean $\pm$ SD (n=4). (b) Total food consumption for 9 weeks. (c) Weight of subcutaneous (subWAT), epididymal (epiWAT), and brown adipose tissue (BAT). ** $p < 0.01$ determined by two-tailed Student's t -test.

脂肪組織における各種遺伝子発現変動

皮下脂肪組織において、複数の遺伝子発現が β -con を20%含む高脂肪食を摂取したマウスで変動した (Fig. 2)。中でも *ucp-1* は熱産生に直接関与する因子であり、白色脂肪の褐色化 (Browning) の指標となる遺伝子である。PGC-1 α については抗肥満活性から上昇が期待されたものの、有意な上昇は示さなかった。熱産生を制御する *DiO2* については、 β -con食でわずかながらも有意な減少が認められ、抗肥満効果の直接関与因子として機能していないことが示唆された。また、褐色脂肪分化を促す *Prdm16* 遺伝子発現が上昇傾向 (平均値はほぼ倍増) であったことは、Browningが進行していることを示唆する結果と言える。すでに、血中FGF21の上昇が皮下脂肪における *ucp-1* 発現を増加させることは報告されている。第二報において、 β -conを20%含む高脂肪食を摂取したマウスの血液中のFGF21が上昇することを報告しており、この結果は、それと一致したものである。

一方、褐色脂肪組織においては、種々の遺伝子応答

に変化は認められなかった。褐色脂肪組織重量は β -conを20%含む高脂肪食を摂取したマウスで減少していたものの、その減少はマウス個体全体、特に肝臓における代謝改善効果による体重減少に伴うものであり、褐色脂肪組織において大きな代謝変動を引き起こした結果でないことが示唆された。実際、皮下脂肪組織の重量が25%程度まで減少していたのに対し、褐色脂肪組織のそれは50%程度の減少であり、白色脂肪組織において劇的な代謝変動が生じたことがうかがえる。

皮下脂肪組織におけるFGF21発現とUCP1発現上昇におけるFGF21の重要性

血中FGF21の大半は肝臓で合成され、分泌されたものであると推測されている。しかし、脂肪組織、骨格筋も無視できない量のFGF21を合成・分泌していることが明らかにされている。9週間 β -conを20%含む高脂肪食を摂取したマウスでは、コントロールのカゼイン食に比べて著しいFGF21遺伝子発現の上昇がみられた

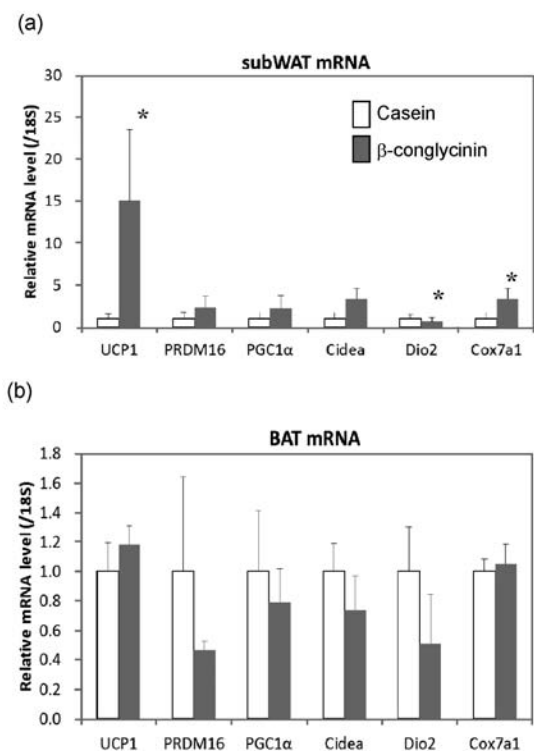


Fig. 2. mRNA levels of genes related to energy metabolism in subcutaneous (subWAT) and brown adipose tissue (BAT). Total RNA was isolated from adipose tissues of mice fed either a casein or β -conglycinin diet for 9 weeks. The mRNA levels of the indicated genes were determined by quantitative RT-PCR ($n=4$). Relative mRNA levels were determined after being normalized to 18S rRNA. Relative mRNA levels in casein diet-fed mice were set to 1. The data represent means $\pm$ SD. * $p < 0.01$ determined by two-tailed Student's t -test.

(Fig. 3a). 肝臓とはほぼ同様のパターンを示し、現時点ではどのような機構で上昇するのか、その詳細な機構は不明である。

皮下脂肪組織で認められたucp-1上昇とFGF21の関係を明らかにすべく、同じく9週間の長期投与実験をFGF21欠損マウスを用いて行った。FGF21欠損マウスでは β -conによる抗肥満効果が減弱しており、FGF21が体重増加抑制のすべてではないものの、かなりの部分を担っていることが示唆された (data not shown)。FGF21欠損マウスの皮下脂肪組織においては β -con食によるucp-1遺伝子発現の上昇はほぼ完全に打ち消されていた (Fig. 3b)。従って、白色脂肪組織における

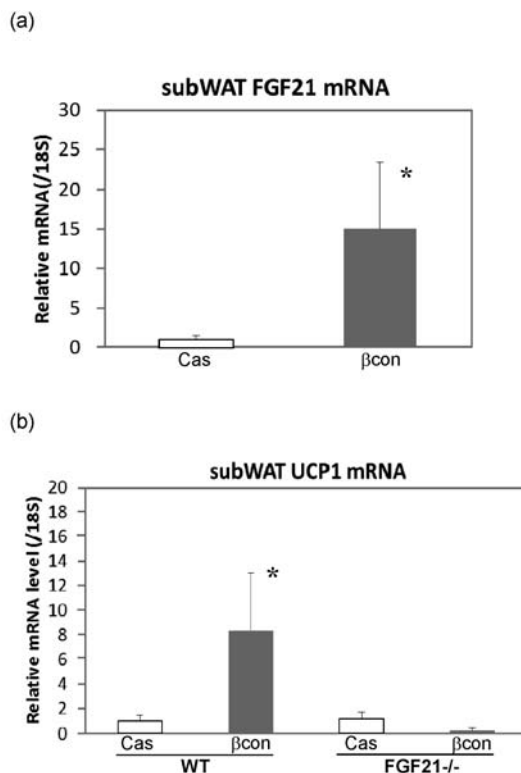


Fig. 3. FGF21 and ucp-1 mRNA levels in subcutaneous adipose tissue of wild-type (WT) and FGF21-deficient (FGF21-/-) mice fed either the casein (Cas) or β -conglycinin (β con) diet for 9 weeks. Total RNA was isolated from subWAT of mice. The mRNA levels of the indicated genes were determined by quantitative RT-PCR ($n=4$). Relative mRNA levels were determined after being normalized to 18S rRNA. Relative mRNA levels in casein diet-fed mice were set to 1. The data represent means $\pm$ SD. * $p < 0.01$ determined by two-tailed Student's t -test.

ucp-1遺伝子発現上昇には、FGF21が必須と言える。

一方、最近の報告によると、ucp-1欠損マウスにおいてもFGF21は体重増加抑制効果、血糖降下作用を発揮し、FGF21による代謝改善効果はucp-1非依存的なものであるという^{6,7)}。今回の実験結果は、FGF21、ucp-1のいずれもが上昇しているので、その相加、相乗効果により β -con食の効果は発揮されていると考えられることができる。

脂肪組織において発現・分泌されたFGF21は、局所的に脂肪細胞に作用するオートクライン様の活性を示すと考えられている。従って本結果は、野生型マウ

スにおいて β -con食摂取により白色脂肪組織でFGF21発現が上昇し、分泌されたFGF21が脂肪細胞に作用してucp-1発現を上昇させた可能性が挙げられる。一方、肝臓が血液中のFGF21の大半の供給源であるとすれば、野生型マウスでは肝臓から十分量のFGF21が分

泌され、血液中のFGF21濃度が上昇した結果、皮下脂肪組織でucp-1発現が増加したと考えることもできる。脂肪組織から分泌されるFGF21の寄与、その機能の及ぶ範囲については今後十分に解明される必要がある。

要 約

マウスにカゼインもしくは β -conglycinin含有高脂肪食を9週間投与する実験を行った。各種パラメーター変動、体重増加抑制効果など、既知のデータと一致する結果が得られた。体重増加抑制を反映して、各種脂肪組織の重量は有意に減少していた。皮下脂肪組織での熱産生代謝関連遺伝子発現を解析したところ、ucp-1 mRNAの有意な上昇を認めた。一方、褐色脂肪組織においては大きな変動は認められなかった。皮下脂肪組織においては、 β -conglycinin摂取によりFGF21遺伝子発現の有意な上昇が確認された。同様の投与実験をFGF21欠損マウスを用いて行ったところ、皮下脂肪組織においてucp-1発現は低値を示し、 β -conglycinin摂取により変動しなかった。以上の結果より、皮下脂肪組織においてucp-1発現が上昇し、熱産生の増加が β -conglycinin摂取による抗肥満効果の一部を説明することが出来る。また、この発現上昇にはFGF21が関与することも明らかになった。皮下脂肪組織において β -conglycinin摂取がFGF21発現を上昇する機構について更なる研究が必要である。

文 献

- 1) Hashidume T, Sasaki T, Inoue J and Sato R (2011): Consumption of soy protein isolate reduces hepatic SREBP-1c and lipogenic gene expression in wild-type mice, but not in FXR-deficient mice. *Biosci Biotechnol Biochem*, **75**, 1702-1707.
- 2) Yamazaki T, Kishimoto K, Miura S and Ezaki O (2011): 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.
- 3) 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.
- 4) Inagaki T, Lin VY, Goetz R, Mohammadi M, Mangelsdorf DJ, and Kliewer SA (2008): Inhibition of growth hormone signaling by the fasting-induced hormone FGF21. *Cell Metabolism*, **8**, 77-83.
- 5) Hotta Y, Nakamura H, Konishi M, Yusuke Murata, Hiroyuki Takagi, Shigenobu Matsumura, Inoue K, Fushiki T and Itoh N (2009): Fibroblast Growth Factor 21 Regulates lipolysis in white adipose tissue but is not required for ketogenesis and triglyceride clearance in liver. *Endocrinology* **150**, 4625-4633.
- 6) Samms RJ, Smith DP, Cheng CC, Antonellis PP, Perfield JW, Kharitonov A, Gimeno RE and Adams AC (2015): Discrete aspects of FGF21 *in vivo* pharmacology do not require UCP1 *Cell Reports*, **11**, 991-999.
- 7) Ve'niant MM, Sivits G, Helmering J, Komorowski R, Lee J, Fan W, Moyer C and Lloyd DJ (2015): Pharmacologic effects of FGF21 are independent of the "Browning" of white adipose tissue. *Cell Metabolism*, **21**, 731-738.