

令和元年度博士学位論文

β-コングリシニンのメタボリックシンドローム改善作用に関する  
栄養学的研究

Nutritional studies on ameliorative effects of β-conglycinin  
against metabolic syndrome

D3216001

川邊田 晃司

2020年3月

長崎県立大学大学院  
人間健康科学研究科 栄養科学専攻

専攻分野 食品機能学  
指導教員 古場 一哲 印

## 目次

第1章 序論	-----1
第2章 $\beta$ -コングリシニン摂取が OLETF ラットの血漿・肝臓脂質濃度および脂質代謝に及ぼす影響	
2-1. 緒言	-----5
2-2. 実験方法	-----6
2-3. 実験結果	-----18
2-4. 考察	-----28
2-5. 小括	-----33
第3章 高脂肪食摂取 OLETF ラットのエネルギー代謝に及ぼす $\beta$ -コングリシニンの効果	
3-1. 緒言	-----35
3-2. 実験方法	-----36
3-3. 実験結果	-----41
3-4. 考察	-----53
3-5. 小括	-----57

第4章  $\beta$ -コングリシニン摂取が2型糖尿病モデル(KK-A<sup>y</sup>)マウスの血糖値および血清・肝臓脂質濃度に及ぼす影響

4-1. 緒言	-----59
4-2. 実験方法	-----60
4-3. 実験結果	-----65
4-4. 考察	-----82
4-5. 小括	-----87

第5章  $\beta$ -コングリシニン摂取が本態性高血圧モデルラットの血圧に及ぼす影響

5-1. 緒言	-----90
5-2. 実験方法	-----90
5-3. 実験結果	-----94
5-4. 考察	-----102
5-5. 小括	-----104

第6章  $\beta$ -コングリシニン摂取によるメタボリックシンドローム改善作用

6-1. 緒言	-----107
6-2. 実験方法	-----108

6-3. 実験結果	-----113
6-4. 考察	-----129
6-5. 小括	-----133
第7章 総括	-----136
謝辞	-----140
参考文献	-----141

## 略語表記一覧

Ace	angiotensin converting enzyme
ACO	acyl-CoA oxidase
Adipor	adiponectin receptor
Adipoq	adiponectin
Agtr	angiotensin II receptor type
Ang	angiotensinogen
AMPK	adenosine monophosphate-activated protein kinase
Akt	protein kinase B
Agtr	angiotensin II type
Pnpla2	adipose triglyceride lipase
ATP	adenosine triphosphate
BW	body weight
Cd36	cluster of differentiation 36
Cpt	carnitine palmitoyltransferase
Dgat	acyl-CoA diacylglycerol acyltransferase
Fasn	fatty acid synthase
G6PDH	Glucose-6-phosphate dehydrogenase
Irs	insulin receptor substrate
LDL	low density lipoprotein
Lipe	hormone-sensitive lipase
NIH	national institutes of health
Nr1h3	liver X receptor
Nos3	endothelial nitric oxide synthase
OLETF	Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty
PAP	phosphatidate phosphohydrolase
PI3K	phosphatidylinositol 3-kinase
Pnala2	adipose triglyceride lipase
Ppar	peroxisome proliferator-activated receptor
Ppargc1a	peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha
Rplp0	ribosomal protein lateral stalk subunit P0
SD	Splague Dawley
SHR	spontaneously hypertensive rat
Slc2a4	glucose transporter type 4
Srebf1c	sterol regulatory element - binding protein
Tnfa	tumor necrosis factor arufa

Ucp	uncoupling protein
WHO	World Health Organization
$\beta$ -CON	$\beta$ -conglycinin

## 第1章

### 緒論

2017年度の人口動態統計によると、日本人死因の第1位は悪性新生物(27.9%)で、心疾患(15.7%)および脳血管疾患(8.2%)がそれに続く。心疾患および脳血管疾患はいずれも動脈硬化が原因となる循環器系疾患であり、両者の合計は第1位の悪性新生物に匹敵する(平成29年度 人口動態統計(確定数)の概況)。一般に動脈硬化は加齢に伴い進行し、肥満、高血糖、高血圧または脂質異常を伴うとさらに加速する(北 1998)ため、動脈硬化を予防するためにはこのようなリスク因子を減らすことが重要である。

動脈硬化の進行に際し、従来最も大きなリスクファクターとして考えられてきたのは、高LDLコレステロール血症である。しかし、LDLコレステロール濃度の低下による心疾患の予防効果は約30%程度に留まり、LDLコレステロールとは別に心疾患に関連するリスクファクターがあると考えられてきた。1980年代後半から、耐糖能異常、高血圧、肥満、脂質異常症が集積した状態をマルチプルリスクファクター症候群と定めて1つの病態として捉えられるようになった。マルチプルリスクファクター症候群が循環器疾患の基盤になっていることが、アメリカおよび日本から報告され、ReavenらのシンドロームX(Reaven, 1988)、Defronzoらのインスリン抵抗性症候群(Defronzo *et al.*, 1991)、Kaplanの死の四重奏(Kaplan, 1989)および松澤の内臓脂肪症候群(Matsuzawa, 1997)として報告され、現在のメタボリックシンドロームの原型となった。1999年にWHOから出されたメタボリックシンドローム診断基準はインスリン抵抗性を

重視したものであったものに対して、2001年にNIHのNCEP(National Cholesterol Education Program)からのメタボリックシンドローム診断基準は腹部肥満を重視したものであった。2005年に日本においてメタボリックシンドロームの診断基準が発表された。基準項目は内臓脂肪蓄積(腹部肥満)を必須項目とし、これに高血圧、脂質異常、高血糖のうち3項目のうち2つ以上を有するものと定義され、その病態の基盤にはインスリン抵抗性が存在すると考えられてきた。メタボリックシンドロームは内臓脂肪蓄積(腹部肥満)を基盤として、それに伴いインスリン抵抗性が発症し、高血圧や脂質異常、耐糖能異常が誘導され、最終的に循環器疾患をおこしやすい病態と考えられている(Alberti *et al.*, 1998)。

我が国において、生活習慣の変化によってメタボリックシンドローム並びにその予備軍は1410万人に達した(平成28年 国民健康・栄養調査報告)。2008年からは特定健康診断・特定保健指導が実施されるようになり、動脈硬化の高リスク群を的確に抽出し、対象者には保健指導を行っている。メタボリックシンドロームの構成病態である肥満、高血圧、脂質異常および高血糖は日常の食習慣や運動習慣などの生活習慣が影響しており、生活習慣の是正でメタボリックシンドロームを予防、改善することが期待できる。

大豆は日本において馴染み深い食品であり、健康の保持・増進に寄与する機能性があることが報告されている(廣塚, 2005; 河村, 2000)。ラットを用いた研究において、植物性タンパク質の代表的な存在である大豆タンパク質は、血中トリグリセリド濃度(Aoyama *et al.*, 2000)およびコレステロール濃度の低下作用(Hamilton and Carroll, 1976)、肝臓での脂肪酸合成能の低



下作用 (Aoyama *et al.*, 2001) を示すことが報告されている。大豆タンパク質は主にグリシニン (46%)、 $\beta$ -コングリシニン (23%) および脂質会合タンパク質 (31%) の 3 画分で構成されている (Samoto *et al.*, 2007)。ラットを用いた研究において、大豆タンパク質摂取による血清および肝臓トリグリセリド濃度低下作用は  $\beta$ -コングリシニンによるものであることが示唆されている (Aoyama *et al.*, 2001, 古場ら, 2002, Ferreira *et al.*, 2010)。さらに  $\beta$ -コングリシニンは血中アディポネクチン濃度を高めることも報告されている (Tachibana *et al.*, 2010; 古場ら, 2011; 古場ら, 2013; Inoue *et al.*, 2015)。アディポネクチンは脂肪細胞から分泌されるホルモンであり、肝臓における脂肪酸  $\beta$  酸化能の亢進作用がある (Kadowaki *et al.*, 2006) ことから、 $\beta$ -コングリシニンによる脂質代謝改善作用の少なくとも一部はアディポネクチンを介していると考えられる。アディポネクチンは脂質代謝以外にも、インスリン感受性亢進作用を介した筋肉への血糖取り込み促進作用、血圧調節作用、抗炎症作用を示すことが報告されている (Karbowska *et al.*, 2006; Kadowaki *et al.*, 2006; Ohashi *et al.*, 2011)。したがって、 $\beta$ -コングリシニンの摂取は、血清アディポネクチン濃度の上昇を介して脂質代謝異常改善作用のみならず、高血糖および高血圧といったメタボリックシンドロームの諸因子に対しても改善作用を示すことが期待される。

そこで本研究では、大豆タンパク質の一画分である  $\beta$ -コングリシニンに焦点をあて、メタボリックシンドロームを構成する肥満、高血圧または高血糖を呈する病態モデル動物を用いた摂食試験を行い、 $\beta$ -コングリシニンのメタボリックシンドローム改善作用について検討した。第 2 章では、肥満モデルラットを用いて、 $\beta$ -コングリシニンの体脂肪、インスリン感受性および脂質

代謝への影響を検討した。第 3 章では、肥満モデルラットを用いて、 $\beta$ -コングリシニンのエネルギー代謝への影響を検討した。第 4 章では、2 型糖尿病モデルマウスを用いて、 $\beta$ -コングリシニンによるインスリン感受性さらには糖代謝への影響について調べた。第 5 章では、本態性高血圧モデルラットを用いて、 $\beta$ -コングリシニンの血圧への影響を検討した。そして第 6 章では、メタボリックシンドローム様の病態を自然発症するモデル動物を用い、 $\beta$ -コングリシニンの脂質代謝、血圧調節および耐糖能に対する改善作用を検討した。第 7 章ではこれらの実験結果から、 $\beta$ -コングリシニンのメタボリックシンドローム改善効果について総括した。

## 第2章

### β-コングリシニン摂取が OLETF ラットの血漿・肝臓脂質濃度および脂質代謝に及ぼす影響

#### 2-1. 緒言

健常ラットに β-コングリシニンを摂取させると、血清および肝臓トリグリセリド濃度の低下や体脂肪の低減を示すことが報告されている (Fukui *et al.*, 2004; 古場ら, 2013)。また β-コングリシニンの摂取は、インスリン感受性の亢進や血清アディポネクチン濃度の上昇をきたすことも報告されている (Tachibana *et al.*, 2010)。アディポネクチンは、肝臓において脂肪酸 β 酸化能を亢進させるだけでなく、脂肪酸合成能および糖新生を抑制し、筋肉へ糖の取り込みを促進する作用が報告されている (Kadowaki *et al.*, 2006)。したがって、健常ラットにおいて β-コングリシニン摂取で認められる体脂肪低減作用、肝臓における脂質代謝改善作用およびインスリン感受性の亢進作用には血清アディポネクチン濃度の上昇が関与している可能性がある。

第2章では、肥満モデル動物を用い、このような β-コングリシニンの作用が肥満状態でも発揮されるか検討した。そして、それらの作用にアディポネクチンが関与するかについても検討した。

## 2-2. 実験方法

### 【飼育条件】

実験食は AIN-93G 組成 (Reeves *et al.*, 1993) に準拠して調製した (Table 2-1)。食餌タンパク質として、カゼイン (CAS; 乳製カゼイン、和光純薬工業 (株)、大阪) を 20% 含む純化食を対照食とし、その半量を分離大豆タンパク質 (SOY; タンパク質純度 90% 以上, フジプロ、不二製油 (株)、大阪) または、 $\beta$ -コングリシニン ( $\beta$ -CON; タンパク質純度 88% 以上, リポフ-700、不二製油 (株)) で置き換えた食餌を試験食とした。肥満モデル動物として、6 週齢の雄姓 Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) ラット (日本エスエルシー (株)、静岡) 18 匹を用いた。この動物種はコレシストキニン受容体が欠損しており、過食により肥満となり、25 週齢を過ぎたころから高血糖、高インスリン血症になり 2 型糖尿病の初期症状を発症する (Lee *et al.*, 2010)。本研究では、2 型糖尿病発症前の過食による肥満状態で実験を行った。

市販固形飼料 (Type NMF、オリエンタル酵母 (株)、東京) による 6 日間の予備飼育後、6 時間絶食させ尾部から血液を採取し、血糖値測定器 (アキュチェックアビバ; ロシュ・ダイアグノスティックス (株)、東京) で血糖値測定を行った。血糖値および平均体重に差が出ないように 1 群 6 匹で 3 群に分けた。実験食による飼育を開始して 3、6 および 9 週目にラットを 6 時間絶食させ、尾部から血液を採取し、血糖値測定器で血糖値測定を行った。また、12 週目にはインスリン耐性試験を行った。インスリン耐性試験は、6 時間絶食後、インスリン (ヒューマリン R 注 100 IU/mL、日本イーライリリー (株)、兵庫) を 0.75 IU/kg の用量で腹腔内投与し、0、30、60、90、

120 および 180 分後の血糖値を血糖値測定器を用いて測定した。インスリン耐性試験の 4 日後、ラットを 6 時間絶食させ、イソフルランおよびペントバルビタール併用麻酔下で EDTA・2Na 溶液 (0.1%) を 1 mL 添加したシリンジを用いて腹部大動脈から 10 mL 採血した。血液は 4°C、700 × g で 15 分間遠心し血漿を調製した。また、肝臓、白色脂肪組織 (腎臓周辺、睾丸周辺、腸間膜) および肩甲間褐色脂肪組織を摘出し、それぞれ重量を測定後、-80°C で保存した。腓腹筋は遺伝子測定に用いるために、一部採取し -80°C で保存した。

本実験は「長崎県立大学動物実験委員会」の審査を受け、承認された上で、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準 (平成 18 年 6 月 1 日環境省告示第 88 号)」に則して実施した。

Table 2-1. Diet composition (g/kg diet)

	Groups		
	CAS	SOY	$\beta$ -CON
Casein	200	100	100
Soy protein isolate	-	100	-
$\beta$ -Conglycinin	-	-	100
Cornstarch	200	200	200
Pregelatinized cornstarch	132	132	132
Sucrose	300	300	300
Soybean oil	70	70	70
Cellulose	50	50	50
Mineral mixture (AIN-93G) <sup>*</sup>	35	35	35
Vitamin mixture (AIN-93) <sup>*</sup>	10	10	10
Choline bitartrate	2.5	2.5	2.5
<i>t</i> -Butylhydroquinone	0.014	0.014	0.014

CAS, casein; SOY, soy protein isolate;  $\beta$ -CON,  $\beta$ -conglycinin.

<sup>\*</sup>Reeves *et al.*, 1993

## 【血漿分析】

トリグリセリド、総コレステロール、リン脂質、遊離脂肪酸およびグルコースの濃度をそれぞれ市販のキットを用いて測定した(トリグリセリド E-テストワコー、コレステロール E-テストワコー、リン脂質 C-テストワコー、NEFA C-テストワコー、グルコース CII-テストワコー、和光純薬工業(株))。

インスリン、レプチンおよびアディポネクチンの濃度は酵素免疫測定法 (enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) 法) による市販のキットを用いて測定した(モリナガ ラットインスリン測定キット、森永生化学研究所(株) 神奈川;モリナガ レプチン測定キット、森永生化学研究所(株) 神奈川); マウス/ラット アディポネクチン ELISA キット、大塚製薬(株)、東京)。

## 【肝臓脂質分析】

肝臓からの総脂質の抽出は Folch らの方法 (Folch *et al.*, 1957) に従って行った。すなわち、肝臓組織 0.1 g にメタノール 6 mL を加え、ホモジナイズし、クロロホルム 12 mL を加えた後さらにホモジナイズした。40°Cで 30 分間振盪し、脂質を抽出した。溶液を濾過した後、蒸留水 3.6 mL を加えて混和した。700 × g で 5 分間遠心し、上層を除去し、下層を窒素乾固した。これをクロロホルム 5 mL に再溶解させたものを肝臓総脂質抽出液とした。抽出後は、各測定に用いるまで -20°C で保存した。コレステロール濃度およびトリグリセリド濃度の測定に際しては、総脂質抽出後の一部を窒素乾固した後、Triton X-100 /メタノール溶液 (w/v=1:1) を 20 μL

加え、105°Cで20分間乾燥させた。その後、蒸留水100 µL 加え、抽出物を溶解させたものを試験試料とした。コレステロール濃度およびトリグリセリド濃度をそれぞれ市販のキットで測定した。

リン脂質濃度は、Rouserらの方法(Rouser *et al.*, 1966)で測定した。

#### 【酵素活性測定用試料の調製】

肝臓2 g をスクロース(0.25 M)およびEDTA・2Na(1 mM)を含む10 mM トリス塩酸緩衝液(pH 7.4)12 mL でホモジナイズし、4°C、1,200 × g で15分間遠心した。その上清を4°C、10,000 × g で20分間遠心して得られた沈殿物を上記のトリス塩酸緩衝液2 mL で懸濁し、肝臓ミトコンドリア／ペルオキシソーム画分とした。上清を、さらに4°C、125,000 × g で60分間超遠心し、その上清を肝臓サイトソーム画分とし、沈殿物を上記のトリス緩衝液2 mL で懸濁したものを肝臓マイクロソーム画分とした。分画した各試料は酵素活性測定に使用するまで−80°Cで保存した。

褐色脂肪組織を上記のトリス塩酸緩衝液4 mL でホモジナイズし、試料とした。試料は酵素活性測定に使用するまで−80°Cで保存した。

#### 【酵素活性測定】

〈Fatty acid synthase (FAS) 活性〉



肝臓サイトソールの FAS 活性は、Kelley らの方法 (Kelly *et al.*, 1986) に準じて行った。すなわち、FAS による脂肪酸の伸長反応が起こる際に消費される NADPH の減少速度を測定した。この反応は、酵素源 (サイトソール試料)、アセチル CoA (0.05 mM)、NADPH (0.3 mM)、EDTA・2Na (0.2 mM) を含む 0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) に、マロニル CoA (0.2 mM) を加えることにより酵素反応を開始し、分光光度計 (波長: 340 nm、温度: 30°C) で吸光度の変化を 3 分間測定した。試料のタンパク質量は Lowry らの方法 (Lowry *et al.*, 1951) により測定し、酵素活性を nmol/min/mg protein で表した。

#### 〈Malic enzyme 活性〉

肝臓サイトソールの Malic enzyme 活性は、Ochoa の方法 (Ochoa, 1955) に従い、L-リンゴ酸を NADP 存在下で脱炭酸し、生成する NADPH の増加速度を測定した。この反応は、L-リンゴ酸 (1.2 mM)、塩化マンガン (4 mM)、および NADP (1.2 mM) を含む 64 mM トリエタノールアミン緩衝液 (pH 7.4) に酵素源 (サイトソール試料) を加えることにより酵素反応を開始し、NADPH 生成による吸光度の上昇を分光光度計 (波長: 340 nm、温度: 27°C) で 3 分間測定した。試料のタンパク質量は Lowry らの方法 (Lowry *et al.*, 1951) により測定し、酵素活性を nmol/min/mg protein で表した。

#### 〈Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) 活性〉

肝臓サイトソールの G6PDH 活性の測定は Kelley および Kletzien の方法 (Kelley and Kletzien, 1984) に従い、ペントースリン酸回路においてグルコース 6-リン酸から 6-ホスホグルコノ $\delta$ ラクトンが生成する際に生成する NADPH の生成速度を測定した。この反応は、グルコース 6-リン酸 (3.3 mM)、NADP (1.2 mM)、6-ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼ (0.5 U/mL) および塩化マグネシウム (30 mM) を含む 0.16M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.6) に酵素源 (サイトソール試料) を加えることにより酵素反応を開始し、NADPH 生成による吸光度の上昇を分光光度計 (波長: 340 nm、温度: 30°C) で 3 分間測定した。試料のタンパク質量は Lowry らの方法 (Lowry *et al.*, 1951) により測定し、酵素活性を nmol/min/mg protein で表した。

#### 〈Phosphatidate phosphohydrolase (PAP) 活性〉

肝臓ミクロソームの PAP 活性の測定は Surette らの方法 (Surette *et al.*, 1992) に従い測定した。PAP はトリグリセリド合成酵素系の反応で、ホスファチジン酸をジアシルグリセロールとリン酸に加水分解する酵素で、酵素活性は反応により生成するリン酸を無機リンとして測定することにより求めた。この反応は塩化マグネシウム (0.325 mM)、EDTA $\cdot$ 2Na (0.125 mM)、ホスファチジン酸 (PA) (1.0 mM) およびホスファチジルコリン (PC) (1.0 mM) を含む 0.05 M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.0) に酵素源 (ミクロソーム試料) を加え、37°C で 15 分間反応させた後、4 倍量の混合試薬 (ラウリル硫酸ナトリウム (0.13%)、アスコルビン酸 (1.25%)、モリブデン酸アンモニウム (0.32%) および硫酸 (0.375 M)) を加えて混合し、45°C で 20 分間インキュベート後、820 nm

における吸光度を分光光度計で測定した。酵素活性は PC-PA 添加時と無添加時の差より求めた。試料のタンパク質量は Lowry らの方法 (Lowry *et al.*, 1951) により測定し、活性を nmol/min/mg protein で表した。

#### 〈Carnitine palmitoyltransferase (CPT) 活性〉

肝臓ミトコンドリアの  $\beta$  酸化能は、Bieber らの方法 (Bieber *et al.*, 1972) に従い、CPT 活性を測定することにより評価した。すなわち、パルミトイル CoA から遊離する CoA を 5,5'-ジチオピス (DTNB) と反応させて生成する黄色色素 2-nitro-5-thio benzoic acid (TNB) による吸光度の上昇速度を測定した。この反応は、パルミトイル CoA (3.5  $\mu$ M)、DTNB (23.6  $\mu$ M)、EDTA $\cdot$ 2Na (1.06 mM) および Triton X-100 (0.085%) を含む 49.2 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) に酵素源 (ミトコンドリア / ペルオキシソーム画分試料) を加えてベースラインを測定後、L-カルニチン (11.8  $\mu$ M) を加えることにより酵素反応を開始 (27°C) し、412 nm の吸光度の変化を測定した。L-カルニチンを加える前と後の反応速度の差から CPT 活性を求めた。試料のタンパク質量は Lowry らの方法 (Lowry *et al.*, 1951) により測定し、活性を nmol /min/mg protein で表した。

#### 〈Acyl-CoA oxidase (ACO) 活性〉

肝臓ペルオキシソームの $\beta$ 酸化能として、Hashimoto らの方法 (Hashimoto *et al.*, 1981) により ACO 活性を測定した。酵素反応は、酵素源(ミトコンドリア/ペルオキシソーム画分試料)、フェノール(10.6 mM)、4-アミノアチピリン(0.82 mM)、フラビンアデニンジヌクレオチド(FAD)(10 mM)、西洋わさび由来ペルオキシダーゼ(4 units)および牛血清アルブミン(0.2 mg/mL)を含む 58 mM リン酸カリウム緩衝液(pH 7.4)にパルミトイル CoA(0.1 mM)を加えることにより開始し、生成した過酸化水素をフェノール、4-アミノアチピリンおよびペルオキシダーゼで発色させ、その経過を分光光度計(波長:500 nm、温度:30°C)を用いて測定した。試料のタンパク質量は Lowry らの方法 (Lowry *et al.*, 1951) により測定し、酵素活性を nmol/min/mg protein で表した。

#### 【各組織の総 RNA の抽出および逆転写反応】

総 RNA の抽出は、次の手順で行った。肝臓および腓腹筋については組織 100 mg に対し TriPure Isolation Reagent(ロシュ・ダイアグノスティックス(株)、バーゼル、スイス)2 mL、腸間膜脂肪組織については組織 600 mg に対し TriPure Isolation Reagent 3 mL を加え、RNase AWAY (Molecular BioProducts, San Diego, CA, USA) で予め RNase 除去処理をしたホモジナイザー (EYELA MAZELA Z; 東京理化工機, 東京) を用いて氷冷下でホモジナイズした。ホモジネート 1 mL に対し 200  $\mu$ L のクロロホルムを加え攪拌した後、室温 5 分間静置した。その後、ホモジネートを 4°C、12,000  $\times$  g で 15 分間遠心分離し、上層 250  $\mu$ L にイソプロパノール

250  $\mu$ L を加えて混合した後、室温で 10 分間静置し、12,000  $\times$  g で 10 分間遠心して、total RNA を沈殿させた。上清を除去し、1 mL の 75%エタノールを加え、4 $^{\circ}$ C、12,000  $\times$  g で 5 分間遠心分離した。上清を除去し、total RNA を乾燥させた。total RNA に 50  $\mu$ L の Depec 処理水(ニッポンジーン(株)、東京)を加え、50 $^{\circ}$ Cで 5 分加温して total RNA を溶解し、総 RNA 溶液の吸光度を測定後(NanoVue plus with printer; GE ヘルスケア・ジャパン, 東京)、溶解した。RNA 濃度は 1.0  $\mu$ g/ $\mu$ L になるように Tris-EDTA buffer (pH 8.0) (ニッポンジーン(株))で希釈した。total RNA 溶液は遺伝子分析まで $-80^{\circ}$ Cで冷凍保存した。

逆転写反応は、Prime Script RT Master Mix (タカラバイオ(株)、滋賀)を用いて行った。逆転写反応液の組成は、各組織由来 RNA 試料:5 $\times$ PrimeScript RT Master Mix:RNase Free dH<sub>2</sub>O:総 RNA 溶液 = 2:7:1 (v/v/v) の割合で調整した。反応液を混和した後、37 $^{\circ}$ Cで 15 分間の逆転写反応を行い、85 $^{\circ}$ Cで 10 秒間逆転写酵素を熱失活させ、直ちに氷上に置いた。逆転写反応産物である complementary DNA (cDNA) 溶液は遺伝子発現の測定に用いるまで $-20^{\circ}$ Cで保存した。

#### 【リアルタイム RT-PCR 法による遺伝子発現の解析】

リアルタイム PCR の反応液は、超純水、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (東洋紡(株)、大阪)、0.4  $\mu$ M に調整したプライマーおよび 50 X ROX reference dye を混合したものをを用いた。プライマーはプライマー設計ツール Primer-BLAST (National Center for Biotechnology

Information, NCBI; Bethesda, MD, USA)を用いて設計し、(株)ファスマック(神奈川県)に合成を依頼した。反応液 19  $\mu\text{L}$  と調製した cDNA 1  $\mu\text{L}$  を加え混合し、インターカレーション法によりリアルタイム PCR 装置 (7300 Real-Time PCR System, (アプライドバイオシステムズジャパン(株)、東京)を用いて、各々の遺伝子発現を測定した。測定条件は、初期変性が 95°C、60 秒で 1 サイクル、PCR 反応、95°C で 15 秒間の変性反応および 60°C で 60 秒間の伸長反応で 40 サイクルとした。同時に、95°C で 15 秒間、60°C で 30 秒間、95°C で 15 秒間で 1 サイクル融解曲線分析も確認した。各目的遺伝子の発現の相対比 (R) を ribosomal protein lateral stalk subunit P0 (*Rplp0*) を内部標準遺伝子として、相対的な遺伝子発現は比較 Ct 法 (Livak *et al.*, 2001) を用いて、計算した。測定に用いたプライマーの塩基配列は Table 2-3 に示した。

#### 【統計処理】

全てのデータは平均 $\pm$ 標準誤差 (SE) で示した。群間の有意差の検定は統計解析ソフト Super ANOVA software (Abacus Concepts, Berkeley, CA) を用いて行い、Tukey-Kramer test により統計的有意差 ( $p < 0.05$ ) を検定した。

Table 2-2. Sequence of quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction primers.

Gene	Accession no	Primer sequence
<i>Nr1h3</i>	NM_031627.2	F 5'-AGAGCATCACCTTCCTCAAGA-3 R 5'-GGAGAACTCAAAGATGGGGTTA-3
<i>Fasn</i>	NM_017332.1	F 5'-GGTAGGCTTGGTGAAGTGTCTC-3 R 5'-TCTAACTGGAAGTGACGGAAGG-3
<i>Srebfl</i>	XM_213329	F 5'- CATCAACAACCAAGA CAGTG -3 R 5'- GAAGCAGGAGAAGAG AAGC -3
<i>Irs2</i>	NM_001168633.1	F 5'-GTCGTTGTCTCCACCACCG-3 R 5'-AGGGACCCACCTGACTTC-3
<i>Irs1</i>	NM_012969.1	F 5'-CAAGACTGCCCTCTCAACA-3 R 5'-CGGTCCTCTGGTTGCTTCTG-3
<i>Slc2a4</i>	XM_006246596.3	F 5'-AGATGCCGTCGGGTTTCC-3 R 5'-CCAAACTGAAGGGAGCCAAG-3
<i>Adipor</i>	XM_006249852.3	F 5'-TCTTCCGCATCCACACAGAA-3 R 5'-ATATTTGCTCTGAGCATGGTCAAG-3
<i>Cpt1</i>	NM_031559.2	F 5'-AACCTCGGACCCAATTGC-3 R 5'-GGCCCCGCAGGTAGATATATT-3
<i>Ppargc1a</i>	XM_017599391.1	F 5'-CGGTACAGTGAGTGTCTGG-3 R 5'-TGAGGACTTGCTGAGTTGTG-3
<i>Cpt1b</i>	NM_013200.1	F 5'-CGAGGTGGGATTGGAGTGG-3 R 5'-GCACCTAAGGGCTGAGAGAG-3
<i>Tnfa</i>	NM_012675.3	F 5'- CGTAGCCCACGTCGTAGCAAAC -3 R 5'-ACGTAGTCGGGGCAGCCTTGT-3
<i>Dgat1</i>	NM_053437.1	F 5'-CCGTGGTATCCTGAATTGGT-3 R 5'-GGCGCTTCTCAATCTGAAAT-3
<i>Adipoq</i>	NM_144744.3	F 5'- AATCCTGCCAGTCATGAAG -3 R 5'- CATCTCCTGGGTCACCCTTA -3
<i>Pnpla2</i>	XM_017604198.1	F 5'-CCAACGCCACTCACATCTA-3 R 5'-CCTCCTTGGACACCTCAATA-3
<i>Pparg</i>	XM_006237009.3	F 5'-CCCTTTACCACGGTTGATTTCTC-3 R 5'-GCAGGCTCTACTTTGATCGCACT-3
<i>Lipe</i>	NM_012859.1	F 5'-CGATTGTGGAAAGATGTCAGGAT-3 R 5'-CCCTTTACCACGGTTGATTTCTC-3
<i>Rplp0</i>	NM_022402.2	F 5'-GGTGTGTTGACAATGGCAGCAT-3 R 5'-ATTGCGGACACCCTCTAGGA-3

### 2-3. 実験結果

#### 【体重、摂食量および各臓器重量】

ラットの終体重、摂食量および食餌効率には各群間で有意な差はみられなかった。腸間膜脂肪組織重量は、CAS 群に比べ SOY 群および  $\beta$ -CON 群で有意に低値であった (Table 2-3)。  
 睾丸周辺の脂肪組織重量および腎臓周辺の脂肪組織重量、褐色脂肪組織重量、肝臓重量は各群間で差はみられなかった。

Table 2-3. Effect of dietary  $\beta$ -conglycinin on growth parameters in OLETF rats.

	Groups		
	CAS	SOY	$\beta$ -CON
Body weight (g)			
Initial	178 $\pm$ 5	178 $\pm$ 4	177 $\pm$ 5
Final	642 $\pm$ 18	650 $\pm$ 17	615 $\pm$ 14
Food intake (g/day)	28.2 $\pm$ 0.7	26.6 $\pm$ 0.6	26.4 $\pm$ 0.5
Food efficiency (g gain/g diet)	0.193 $\pm$ 0.003	0.203 $\pm$ 0.005	0.189 $\pm$ 0.003
Relative tissue weights (g/100g body weight)			
Liver	3.42 $\pm$ 0.1	3.54 $\pm$ 0.25	3.45 $\pm$ 0.09
Epididymal adipose tissue	3.69 $\pm$ 0.24	3.59 $\pm$ 0.16	3.49 $\pm$ 0.12
Perirenal adipose tissue	4.89 $\pm$ 0.21	4.84 $\pm$ 0.11	4.56 $\pm$ 0.12
Mesenteric adipose tissue	3.50 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>	2.86 $\pm$ 0.10 <sup>b</sup>	2.58 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>
Interscapular brown adipose tissue	0.169 $\pm$ 0.090	0.182 $\pm$ 0.020	0.189 $\pm$ 0.027

CAS, casein; SOY, soy protein isolate;  $\beta$ -CON,  $\beta$ -conglycinin.

Values are expressed as mean  $\pm$  SE of 6 rats.

Values without sharing a common superscript letter are significantly different at  $p < 0.05$ .



【空腹時血糖値の推移およびインスリン感受性評価】

摂食期間を通して空腹時血糖値は、各群間で違いはみられなかった (Fig. 2-1A)。

インスリン耐性試験では、30 分後の血糖値は CAS 群に比べ SOY 群で低い傾向にあり、 $\beta$ -

CON 群では有意に低かった ( $p=0.033$ ) (Fig 2-1B)。60 分以降の血糖値は、各群間で有意な

違いはなかった。

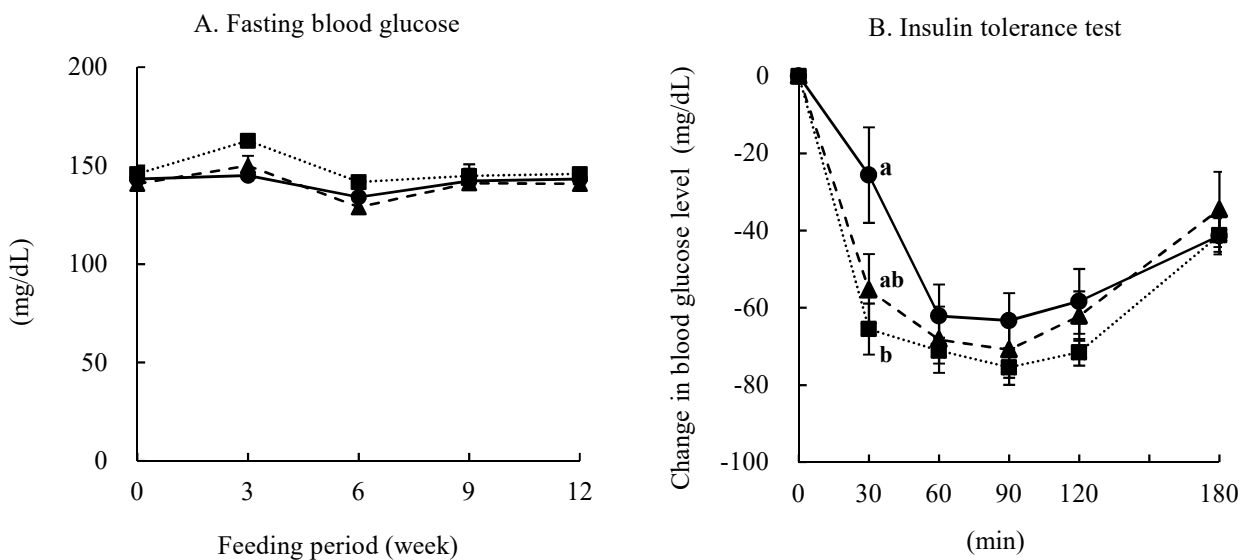


Fig. 2-1. Effect of dietary  $\beta$ -conglycinin on (A) fasting blood glucose level and (B) insulin tolerance in OLETF rats. At week 12, rats received 0.75 IU/kg body weight insulin by intraperitoneal injection after a 6 h fast. Blood glucose was measured at the intervals indicated over 3h.

Values are expressed as mean  $\pm$  SE of 5 rats.

Values without sharing a common letter are significantly different at  $p < 0.05$ .

●, casein group; ▲, soy protein group; and ■,  $\beta$ -conglycinin group.

## 【血漿分析】

血漿トリグリセリド濃度は3群間で有意差はなかったものの、CAS群に比べSOY群は同程度、 $\beta$ -CON群でやや低い傾向を示した( $p=0.053$ ) (Table 2-4)。コレステロール、リン脂質、血漿遊離脂肪酸およびグルコース濃度は各群間で差は認められなかった。血漿インスリン濃度は有意差はなかったが、CAS群に比べSOY群でやや低く、 $\beta$ -CON群で低い値を示した。血漿グルコース濃度は3群間で差はなかった。インスリン抵抗性指標＝血漿グルコース濃度(mg/dL)×血漿インスリン濃度(ng/mL)/405(Matthews *et al.*, 1985)も3群間で有意差はなかったが、CAS群およびSOY群( $p=0.080$ )、 $\beta$ -CON群で低い傾向を示した( $p=0.059$ )。血漿アディポネクチン濃度で有意差はなかったが、CAS群に比べSOY群は同程度であり、 $\beta$ -CON群では高い傾向がみられた( $p=0.092$ )。レプチン濃度は各群間で違いはなかった。

Table 2-4. Effect of dietary  $\beta$ -conglycinin on plasma concentrations of lipids, glucose and hormones in OLETF rats.

	Groups		
	CAS	SOY	$\beta$ -CON
Triglyceride (mg/dL)	165 $\pm$ 8	160 $\pm$ 19	130 $\pm$ 9
Total cholesterol (mg/dL)	119 $\pm$ 6	104 $\pm$ 7	105 $\pm$ 12
Phospholipid (mg/dL)	192 $\pm$ 11	185 $\pm$ 12	180 $\pm$ 9
Free fatty acid (mmol/mL)	0.673 $\pm$ 0.039	0.586 $\pm$ 0.047	0.639 $\pm$ 0.073
Glucose (mg/dL)	200 $\pm$ 19	200 $\pm$ 12	202 $\pm$ 7
Insulin (ng/mL)	13.2 $\pm$ 1.4	10.6 $\pm$ 1.7	9.38 $\pm$ 1.16
Index of insulin resistance	7.56 $\pm$ 1.08	4.88 $\pm$ 0.7	4.70 $\pm$ 0.61
Adiponectin ( $\mu$ g/mL)	2.75 $\pm$ 0.11	2.63 $\pm$ 0.41	3.98 $\pm$ 0.83
Leptin (ng/mL)	32.0 $\pm$ 3.7	26.8 $\pm$ 2.2	26.9 $\pm$ 2.0

CAS, casein; SOY, soy protein isolate;  $\beta$ -CON,  $\beta$ -conglycinin.

Index of insulin resistance = plasma glucose (mg/dL)  $\times$  plasma insulin (ng/mL) / 405

Values are expressed as mean  $\pm$  SE of 6 rats.

Values without sharing a common superscript letter are significantly different at  $p < 0.05$ .

### 【肝臓脂質濃度】

肝臓トリグリセリド濃度は、CAS 群に比べ SOY 群および  $\beta$ -CON 群で有意に低かった (Table 2-5)。肝臓コレステロール濃度およびリン脂質濃度は、各群間で差はみられなかった。

Table 2-5. Effect of dietary  $\beta$ -conglycinin on hepatic lipid concentrations in OLETF rats.

	Groups		
	CAS	SOY	$\beta$ -CON
Triglyceride (mg/g liver)	34.4 $\pm$ 1.1 <sup>a</sup>	29.5 $\pm$ 1.5 <sup>b</sup>	26.3 $\pm$ 0.9 <sup>b</sup>
Cholesterol (mg/g liver)	4.19 $\pm$ 0.80	3.99 $\pm$ 1.84	3.92 $\pm$ 0.56
Phospholipid (mg/g liver)	16.9 $\pm$ 1.3	18.0 $\pm$ 0.8	18.2 $\pm$ 0.2

CAS, casein; SOY, soy protein isolate;  $\beta$ -CON,  $\beta$ -conglycinin.

Values are expressed as mean  $\pm$  SE of 6 rats.

Values without sharing a common superscript letter are significantly different at  $p < 0.05$ .

【酵素活性】

肝臓サイトソール画分の FAS 活性は、CAS 群に比べ SOY 群は同程度で  $\beta$ -CON 群は有意に低かった (Table 2-6)。肝臓サイトソール画分の Malic enzyme 活性および G6PDH 活性は FAS 活性と同様の傾向を示した。肝臓ミクロソーム画分の PAP 活性は、群間で有意な差はみられなかった。肝臓ミトコンドリア画分の CPT 活性および肝臓ペルオキシソーム画分の ACO 活性は、群間で有意な差はみられなかった。

Table 2-6. Effect of dietary  $\beta$ -conglycinin on enzyme activities in liver and brown adiposein tissue in OLETF rats.

	Groups		
	CAS	SOY	$\beta$ -CON
Liver	(nmol/min/mg protein)		
Cytosolic FAS	14.3 $\pm$ 2.1 <sup>a</sup>	13.5 $\pm$ 0.6 <sup>ab</sup>	10.5 $\pm$ 0.6 <sup>b</sup>
Cytosolic malic enzyme	57.5 $\pm$ 7.2	63.6 $\pm$ 2.6	40.0 $\pm$ 5.6
Cytosolic G6PDH	79.0 $\pm$ 12.3	71.5 $\pm$ 8.7	53.1 $\pm$ 12.6
Microsomal PAP	6.97 $\pm$ 0.43	8.10 $\pm$ 0.47	7.67 $\pm$ 1.33
Mitochondrial CPT	5.14 $\pm$ 0.43	4.57 $\pm$ 0.58	5.32 $\pm$ 0.70
Peroxisomal ACO	2.64 $\pm$ 0.18	2.32 $\pm$ 0.23	2.11 $\pm$ 0.29
Brown adipose tissue CPT	11.6 $\pm$ 0.6	11.7 $\pm$ 0.7	11.7 $\pm$ 0.6

CAS, casein; SOY, soy protein isolate;  $\beta$ -CON,  $\beta$ -conglycinin.

FAS, fatty acid synthase; G6PDH, glucose 6 phosphate dehydrogenase; PAP, phosphatidate phosphohydrolase; CPT, carnitine palmitoyltransferase; ACO, acyl CoA oxidase.

Values are expressed as mean  $\pm$  SE of 6 rats.

Values without sharing a common superscript letter are significantly different at  $p < 0.05$ .

### 【肝臓における遺伝子発現】

脂肪酸合成に関連する *Fasn* の発現は有意差はなかったが CAS 群に比べ SOY 群で低い傾向、 $\beta$ -CON 群ではさらに低い傾向を示した (Fig. 2-2)。 *Fasn* の上流に位置する *Srebflc* および *Nr1h3* 発現も同様の傾向であった。インスリン受容体基質の *Irs2* の発現は CAS 群に比べ SOY 群では同程度、 $\beta$ -CON 群では有意に高かった。

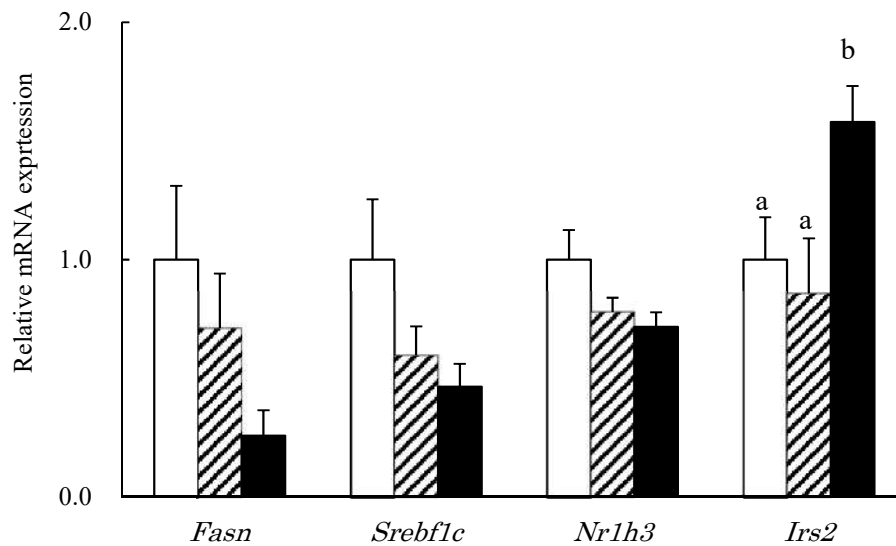


Fig. 2-2. Effect of dietary  $\beta$ -conglycinin on hepatic gene expressions in OLETF rats.

Values are expressed as mean  $\pm$  SE of 6 rats.

Values without sharing a common letter are significantly different at  $p < 0.05$ .

*Fasn*, fatty acid synthase; *Srebflc*, sterol regulatory element-binding protein 1c; *Nr1h3*, liver X receptor  $\alpha$ ; *Irs2*, insulin receptor substrate 2.

Open bar, casein group; hatched bar, soy protein group; solid bar,  $\beta$ -conglycinin group.

### 【腓腹筋における遺伝子発現】

エネルギー代謝の転写因子である *Pparg1a* の発現は、CAS 群および SOY 群に比べ  $\beta$ -CON 群で有意に高かった (Fig. 2-3)。 *Cpt1* の発現は、CAS 群および SOY 群に比べ  $\beta$ -CON 群で有意に高い値を示した。アディポネクチン受容体およびインスリン受容体基質である *Adipor1* および *Irs1* の発現に有意差はなかったが、CAS 群に比べ SOY 群および  $\beta$ -CON 群で高い傾向を示した。 *Slc2a4* の発現に有意差はなかったが、CAS 群および SOY 群に比べ  $\beta$ -CON 群で高い値を示した。

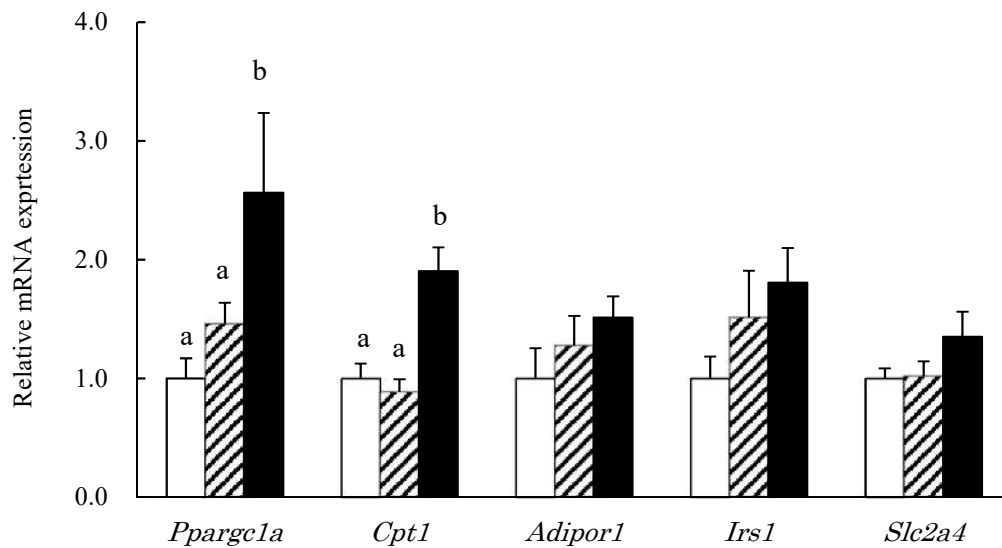


Fig.2- 3. Effect of dietary  $\beta$ -conglycinin on gene expressions in gastrocnemius muscle in OLETF rats.

Values are expressed as mean  $\pm$  SE of 6 rats.

Values without sharing a common letter are significantly different at  $p < 0.05$ .

*Pparg1a*, peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$ ; *Cpt1*, carnitine palmitoyl-acyltransferase 1; *Adipor1*, adiponectin receptor 1; *Irs1*, insulin receptor substrate 1; *Slc2a4*, glucose transporter 4.

Open bar, casein group; hatched bar, soy protein group; solid bar,  $\beta$ -conglycinin group.

#### 【腸間膜脂肪組織における遺伝子発現】

腸間膜脂肪組織において、*Adipoq* の発現は群間で有意差はなかったものの、CAS 群、SOY 群、 $\beta$ -CON 群の順に高くなる傾向を示した。*Pparg* の発現は CAS 群および SOY 群に比べ  $\beta$ -CON 群で有意に高かった (Fig. 2-4)。脂肪細胞の分解に関与する *Lipe* の発現は CAS 群および SOY 群に比べ  $\beta$ -CON 群で有意に高かった。*Pnpla2* の発現は有意差はなかったが CAS 群に比べ SOY 群やや高く、 $\beta$ -CON 群でさらに高い傾向を示した。*Dgat1* の発現は群間で差はなかった。*Slc2a4* の発現は有意差はなかったが CAS 群に比べ SOY 群でやや高く、 $\beta$ -CON 群で高い傾向を示した。炎症性サイトカインのマーカである *Tnfa* の発現は、有意差はなかったが CAS 群および SOY 群にくらべ  $\beta$ -CON 群でわずかに低い傾向を示した。



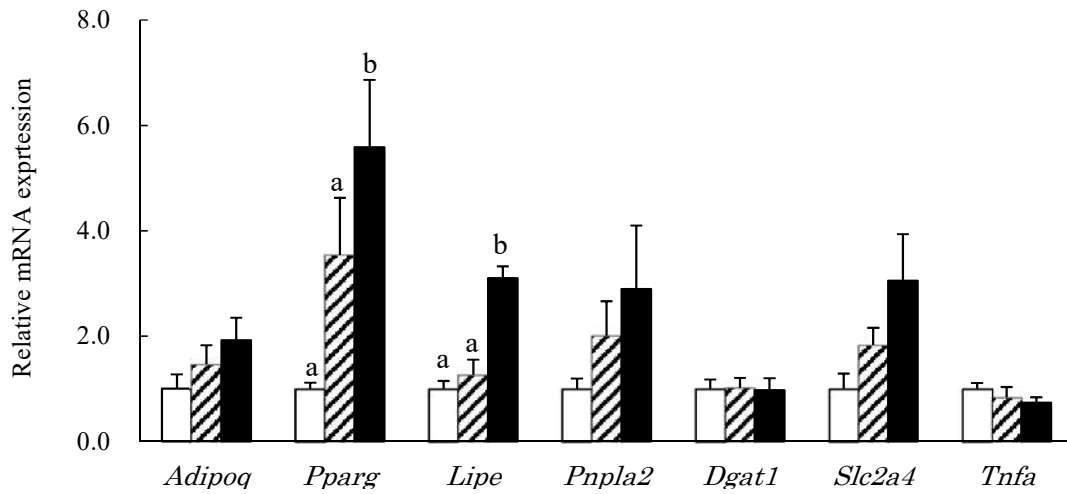


Fig. 2-4. Effect of dietary  $\beta$ -conglycinin on gene expressions in mesenteric adipose tissue in OLETF rats.

Values are expressed as mean  $\pm$  SE of 6 rats.

Values without sharing a common letter are significantly different at  $p < 0.05$ .

*Adipoq*, adiponectin; *Pparg*, peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ ; *Lipe*, hormone sensitive lipase, *Pnpla2*, adipose triglyceride lipase; *Dgat1*, acyl-CoA diacylglycerol acyltransferase 1; *Slc2a4*, glucose transporter 4; *Tnfa*, tumor necrosis factor  $\alpha$ .

Open bar, casein group; hatched bar, soy protein group; solid bar,  $\beta$ -conglycinin group.

#### 2-4. 考察

本研究では、2型糖尿病の発症前段階である肥満状態の OLETF ラットで  $\beta$ -CON 摂取が体脂肪および脂質代謝ならびにインスリン感受性に及ぼす影響について検討した。各実験食を 12 週間摂食させた OLETF ラットの単位重量あたりの脂肪組織重量の合計(腸間膜脂肪組織重量+睾丸周辺脂肪組織重量+腎臓周辺脂肪組織)は CAS 群( $2.1 \pm 0.6$ g/100g 体重)、SOY 群( $11.3 \pm 0.3$ g/100g 体重)、 $\beta$ -CON 群( $10.6 \pm 0.2$ g/100g 体重)であった。今回と同じ実験食を OLETF ラットに 6 週間摂食させた先行研究においては、脂肪組織重量の合計は CAS 群( $8.80 \pm 0.2$ g/100g 体重)、SOY 群( $8.53 \pm 0.33$ g/100g 体重)、 $\beta$ -CON 群( $7.91 \pm 0.50$ g/100g 体重)(未発表データ)で、このときの脂肪組織重量に比べ本研究の脂肪組織重量は、CAS 群で 1.4 倍、SOY および  $\beta$ -CON 群で 1.3 倍それぞれ重かった。このことから、本研究の実験条件では先行研究よりも肥満が進行していたと判断した。

本研究では、 $\beta$ -CON 群において、血漿アディポネクチン濃度の増加は明らかではなかったものの、腸間膜脂肪組織重量の有意な減少が観察された。Tachibana らは、19 週齢の雄性 Wistar ラットに  $\beta$ -CON 含有の食餌(AIN-93G 組成と同じ)を 4 週間摂食させると、白色脂肪組織重量の低下および血漿アディポネクチン濃度が増加することを報告している(Tachibana *et al.*, 2010)。そのため、 $\beta$ -コングリシニンの摂取は血漿アディポネクチン濃度の上昇に関与する可能性も考えられる。腸間膜脂肪組織においてトリグリセリドの分解に関わる *Lipe* の発現は  $\beta$ -CON 群で有意に高く、*Pnpla2* の発現も高い傾向を示した。マウスでは、脂肪組織におけるトリ

グリセリドの加水分解の 95%以上は adipose triglyceride lipase (ATGL) および hormone sensitive lipase (HSL) による作用であることが示唆されていることから (Schweiger *et al.*, 2006)、 $\beta$ -CON 群は白色脂肪組織から脂肪酸への分解を亢進し、脂肪細胞の肥大を抑えることが示唆された。

$\beta$ -CON 群において、腸間膜脂肪組織における *Pparg* の発現も高くなっていた。db/db マウスに PPAR $\gamma$  アゴニストを投与すると、脂肪組織におけるアディポネクチンの発現が高まり、血漿アディポネクチン濃度が上昇することが報告されている (Combs *et al.*, 2002)。 $\beta$ -CON 群の腸間膜脂肪組織における *Adipoq* の発現は CAS 群に比べ高くなっており、*Pparg* の発現が関与した可能性が示唆された。

本研究で、摂食期間中の空腹時血糖値は各群間で違いはなかったものの、インスリン耐性試験において、 $\beta$ -CON 群は CAS 群に比べインスリン投与 30 分後の血糖値が有意に低く、インスリン感受性を高めることが示唆された。インスリン抵抗性指標も有意差はなかったものの同様の傾向を示した。また、 $\beta$ -CON 群の肝臓での *Irs2* の発現は高く、腓腹筋における *Adipor1* および *Irs1* の発現は高い傾向を示した。Tachibana らは、 $\beta$ -コングリシニンを健常の Wistar ラットに摂取させるとインスリン感受性が高くなり、耐糖能が改善したことを報告している (Tachibana *et al.*, 2010)。また非肥満 2 型糖尿病モデル動物である Goto-Kakizaki ラットでは、 $\beta$ -コングリシニン摂取はカゼイン摂取に比べ血漿アディポネクチン濃度を高め、血漿インスリン濃度およびグルコース濃度を低下させ、インスリン感受性を亢進させることが観察され、そ

の効果には、骨格筋における Adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) のリン酸化および *Adipor1* の発現の亢進を介した細胞膜への glucose transporter 4 (GLUT4) のトランスロケーションの促進作用並びに肝臓での *Srebf1c* の発現の低下および *Irs2* の発現の亢進を介したインスリン感受性の亢進作用が関わることを示唆されている (Tachibana *et al.*, 2014)。本研究の結果から、 $\beta$ -コングリシニンの摂取は肥満状態においてもインスリン感受性が高い傾向にある可能性がある。その機序として血漿アディポネクチン濃度の上昇による肝臓の *Irs2* の発現および筋肉の *Irs1* および *Adipor1* の発現の増加が関与 (Kadowaki *et al.*, 2006) している可能性が考えられた。

本研究において、血漿トリグリセリド濃度は CAS 群に比べ  $\beta$ -CON 群で低くなる傾向を示し、肝臓トリグリセリド濃度については CAS 群に比べ、 $\beta$ -CON 群で有意に低く、これまでの報告と一致した (Ferreira *et al.*, 2011)。脂質代謝を制御するマスターレギュレーターである *Srebf1c* は脂肪酸合成に関連する *Fasn* の発現を亢進することが報告されている (Horton *et al.*, 2002)。本研究において、 $\beta$ -CON 群では、肝臓における *Srebf1c* および *Fasn* の発現は低下傾向を示し、肝臓サイトソールの FAS 活性は低下したことから、肝臓での脂肪酸合成が抑制されていることが考えられた。これらの結果は、 $\beta$ -コングリシニン摂取による効果を示したこれまでの報告と同様であった (Moriyama *et al.*, 2004; Tachibana *et al.*, 2010; Tachibana *et al.*, 2014)。したがって、本研究で観察された  $\beta$ -CON 群の肝臓トリグリセリド濃度の低下は脂肪酸合成能の抑制による影響であることが示唆された。また、db/db マウスにアディポネクチンを腹

腔内投与すると、肝臓における *Srebp1c* および *Fasn* の発現を抑制することが報告されていることから (Awazawa *et al.*, 2009)、 $\beta$ -コングリシニンの摂取による肝臓での脂肪酸合成能の抑制に血漿アディポネクチン濃度の上昇が関与した可能性がある。一方、肝臓ミトコンドリアにおける脂肪酸  $\beta$  酸化の指標となる CPT 活性は  $\beta$ -CON 群の影響は認められなかった。このことから、本研究で観察された  $\beta$ -コングリシニン摂取による肝臓トリグリセリド濃度の低下作用は、脂肪酸合成系の抑制に起因することが示唆された。

肝臓における *Srebp1c* の発現の低下は、肝臓における脂肪酸合成能やインスリン感受性に影響する可能性がある。Ide らは、肝臓で *Srebp1c* を高発現させトランスジェニックマウスでは *Irs2* の発現が低下し、インスリン抵抗性を惹起したことを報告している (Ide *et al.*, 2004)。本研究において、 $\beta$ -CON 群の肝臓における *Srebp1c* の発現は低く、*Irs2* 発現は高くなっており、インスリン感受性を高めた一因と考えられた。*Srebp1c* の発現は *Nr1h3* および血中インスリン濃度によってアップレギュレーションされることが示唆されている (Tobin *et al.*, 2002; Tian *et al.*, 2016)。本研究において、血漿インスリン濃度および肝臓における *Nr1h3* の発現は有意でなかったものの、CAS 群に比べ  $\beta$ -CON 群で低い傾向を示したことから、これらは  $\beta$ -CON 群の肝臓での *Srebp1c* の発現低下に関与した可能性がある。これらのことから、 $\beta$ -コングリシニンによる肝臓での *Srebp1c* 発現の低下は脂肪酸合成能を抑え、インスリン感受性を高めることが示唆された。

骨格筋は、エネルギー消費の主要な器官である。核内受容体コアクチベーターである

*Ppargc1a* は、筋肉におけるグルコース代謝および脂肪酸  $\beta$  酸化の調節において重要な役割を果たすことが知られている (Wende *et al.*, 2007; Michael *et al.*, 2001; Summermatter *et al.*, 2010)。マウスの骨格筋において、*Ppargc1a* は、アディポネクチンおよびその受容体である *Adipor1* によってアップレギュレーションされることが報告されている (Iwabu *et al.*, 2010)。本研究において、 $\beta$ -CON 群の腓腹筋における *Ppargc1a* の発現は亢進した。これには  $\beta$ -CON 群での腓腹筋における *Adipor1* の発現および血漿アディポネクチン濃度の変化が関与した可能性がある。骨格筋において、*Ppargc1a* の発現の亢進は *Cpt1* の発現を亢進させて脂肪酸  $\beta$  酸化能を高めることが報告されている (Wende *et al.*, 2007; Song *et al.*, 2004)。さらに骨格筋における *Cpt1* の過剰発現は *Irs1* の発現を亢進させ、インスリン抵抗性を改善することも示唆されている (Bruce *et al.*, 2008)。本研究において、 $\beta$ -CON 群の腓腹筋における *Ppargc1a* および *Cpt1* 発現は亢進した。*Irs1* の発現は有意差はなかったものの高い傾向がみられ、 $\beta$ -コングリシニンの摂取はインスリン感受性を高めていることが推察された。

マウス横紋筋細胞 C2C12 を用いた研究で、培養液へのアディポネクチン添加は IRS1 のリン酸化を亢進することが報告されている (Wang *et al.*, 2007)。また、C2C12 を用いた別の研究では、*Ppargc1a* は *Slc2a4* の発現を亢進させることが示唆されている (Michael *et al.*, 2001)。本研究において、 $\beta$ -CON 群の腓腹筋における *Ppargc1a* の発現は CAS 群に比べ有意に高く、腓腹筋の *Slc2a4* の発現は高い傾向を示し、Michael らの報告と矛盾しなかった。

Tachibana らは、ラットへの  $\beta$ -コングリシニン摂取が骨格筋の細胞膜への GLUT4 のトランスロ

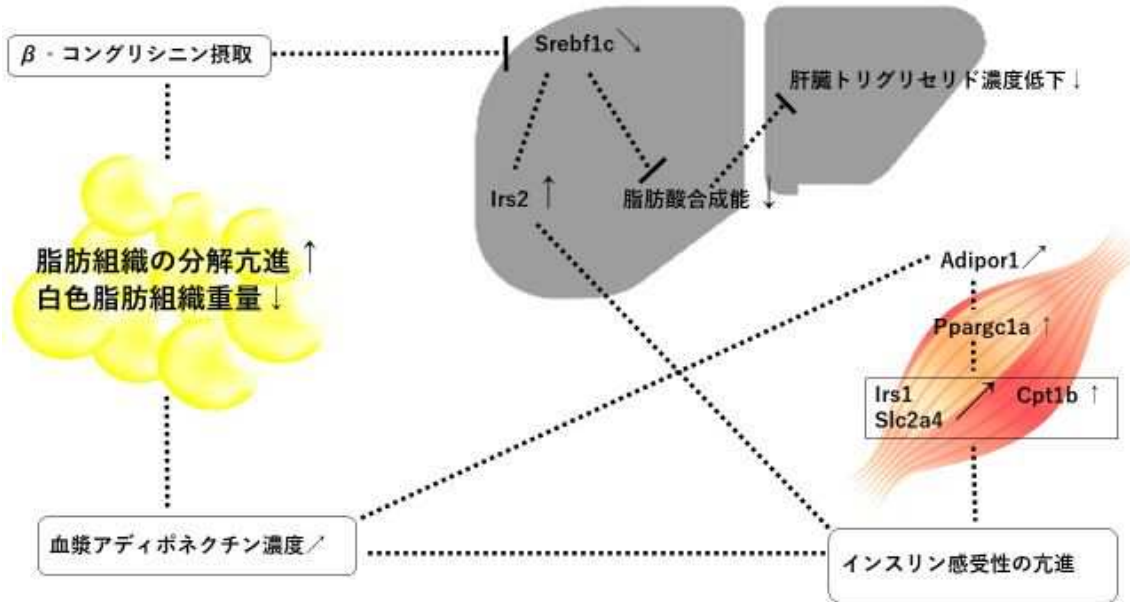
ケーションを高め、インスリン抵抗性を改善することを示唆している (Tachibana *et al.*, 2014)。これらのことから、 $\beta$ -コングリシニン摂取によるインスリン感受性の亢進にはこれまでに報告された IRS1 のリン酸化および GLUT4 のトランスロケーションに加え、*Irs1* および *Slc2a4* の発現が関与していることが推察された。

以上のことから  $\beta$ -コングリシニン摂取は血漿アディポネクチン濃度を高める傾向を示し、体脂肪低減作用および肝臓での脂質代謝改善作用をのみならず、筋肉においても糖の取り込みやエネルギー代謝に影響してインスリン感受性を高めることが示唆された。

## 2-5. 小括

$\beta$ -コングリシニンの摂取は肥満状態においても体脂肪低減作用および肝臓トリグリセリド濃度低下作用を示した。また、 $\beta$ -コングリシニンの摂取は血漿アディポネクチン濃度を高めることが示唆された。さらに、インスリン耐性試験の結果から  $\beta$ -CON 群ではインスリン感受性を高い可能性があり、その作用には肝臓における *Irs2* および筋肉における *Irs1* および *Adipor1* の各発現の亢進が関与していると考えられた。したがって、肥満状態における  $\beta$ -コングリシニンの脂質代謝改善作用には少なくとも、血漿アディポネクチン濃度の上昇およびそれに伴うインスリン感受性の亢進が関与することが示唆された。

第2章における  $\beta$ -コングリシニンの効果





## 第3章

### 高脂肪食摂取 OLETF ラットのエネルギー代謝に及ぼす $\beta$ -コングリシニンの効果

#### 3-1. 緒言

第2章で、 $\beta$ -コングリシニンの摂取は肥満状態において血漿アディポネクチン濃度の上昇傾向、体脂肪低減作用および脂肪酸合成能の低下に伴う肝臓トリグリセリド濃度低下作用を示すことを明らかにした。

これまでの研究において、アディポネクチンは筋肉においてエネルギー消費量を増加させることが報告されている(Yamauchi *et al.*, 2002)。また、大豆タンパク質および  $\beta$ -コングリシニンの摂取は肝臓における脂肪酸合成能の低下および脂肪酸  $\beta$  酸化能の亢進による脂質代謝改善作用および白色脂肪組織重量の低減作用を示すことが報告されている(Moriyama *et al.*, 2004; Tachibana *et al.*, 2010)。一般に、生体内において、消費エネルギー量に対して摂取エネルギーが過剰になると余剰分が体脂肪として貯蔵される。Yamazaki らは高脂肪食条件下で *ddy* マウスに  $\beta$ -コングリシニンを摂取させると白色脂肪組織重量が低下することを報告している(Yamazaki *et al.*, 2012)。第2章において、糖尿病発症前の肥満状態の OLETF ラットを用いて摂食試験を行い、 $\beta$ -コングリシニンの摂取は腸間膜脂肪組織重量を低減し、肝臓の脂質濃度を低下させ、さらに筋肉でのエネルギー代謝を亢進することが示唆された。これらのことから、 $\beta$ -コングリシニンはエネルギー消費量を亢進させる可能性が考えられた。

そこで、第3章では肥満モデル動物である OLETF ラットを用い、エネルギー代謝に注目して  $\beta$ -コングリシニンによる体脂肪低減作用および脂質代謝に及ぼす影響を検討した。

### 3-2. 実験方法

#### 【飼育条件】

実験食は AIN-93G 組成 (Reeves *et al.*, 1993) に準拠し、食餌脂肪の割合を 14% に調整した。第2章と同様に、食餌タンパク質として、CAS を 20% 含む食餌を対照食とし、そのタンパク質の半量を SOY または、 $\beta$ -CON で置き換え、試験食とした (Table 3-1)。実験動物として 4 週齢の雄性 OLETF ラット (日本エルエスシー (株)) を用いた。市販固形飼料 (Type NMF、オリエンタル酵母 (株)) を用いて 1 週間の予備飼育を行った。平均体重に差が出ないように 1 群 6 匹で 3 群に分け、各実験食を 6 週間自由摂食させた。摂食開始後 5 週目に生体ガス分析用質量分析装置 ARCO-2000 (アルコシステム (有)、千葉) を用いて呼気測定を行い、総エネルギー消費量、炭水化物および脂質由来のエネルギー消費量を算出した。飼育環境は室温 22~23°C、湿度 50~60%、12 時間 (8:00-20:00 点灯) の明暗サイクルとした。飼育期間終了後ラットを 6 時間絶食させ、イソフルランおよびペントバルビタールの併用麻酔下で腹部大動脈より採血し血清を調製した。肝臓、白色脂肪組織 (睾丸周辺、腎臓周辺、腸間膜)、肩甲骨褐色脂肪組織およびヒラメ筋を摘出し、それぞれ重量を測定し、-80°C で保存した。

本実験は「長崎県立大学動物実験委員会」の審査を受け、承認された上で、「実験動物の

飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準（平成 18 年 6 月 1 日環境省告示第 88 号）」

に則して実施した。

Table 3-1. Diet composition (g/kg diet)

	Groups		
	CAS	SOY	β-CON
Casein	200	100	100
Soy protein isolate	-	100	-
β-Conglycinin	-	-	100
Cornstarch	130	130	130
Pregelatinized cornstarch	132	132	132
Sucrose	300	300	300
Soybean oil	70	70	70
Lard	70	70	70
Cellulose	50	50	50
Mineral mixture (AIN-93G)*	35	35	35
Vitamin mixture (AIN-93)*	10	10	10
Choline bitartrate	2.5	2.5	2.5
<i>t</i> -Butylhydroquinone	0.014	0.014	0.014

CAS, casein; SOY, soy protein isolate; β-CON, β-conglycinin.

\*Reeves *et al.*, 1993

#### 【酵素活性測定用試料の調製】

酵素活性の試料調製は第 2 章に準じて行った。

#### 【酵素活性測定】

酵素活性の測定は第 2 章に準じて行った。

**【各組織の総 RNA の抽出およびリアルタイム RT-PCR 法による遺伝子発現の解析】**

各組織の総 RNA の抽出およびリアルタイム RT-PCR 法による遺伝子発現の解析は第 2 章に準じて行った。測定に用いたプライマーは Table 3-2 に示した。

Table 3-2. Sequence of quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction primers.

Gene	Accession no	Primer sequence
<i>Fasn</i>	NM_017332.1	F 5'-GGTAGGCTTGGTGAAGTGTCTC-3 R 5'- TCTAACTGGAAGTGACGGAAGG -3
<i>Srebf1c</i>	XM_213329	F 5'- CATCAACAACCAAGA CAGTG-3 R 5'- GAAGCAGGAGAAGAGAAGC -3
<i>Ppara</i>	XM_213329	F 5'- AAGAGAATCCACGAAGCCTACCT-3 R 5'- TGACAAAAGGCGGATTGTTG -3
<i>Cpt1</i>	NM_031559.2	F 5'- AACCTCGGACCCAAATTGC -3 R 5'- GGCCCCGCAGGTAGATATATT -3
<i>Cd36</i>	NM_031561.2	F 5'- CTCGGATGGCTAGCTGATTACT -3 R 5'- AGCACTTGCTTCTTGCCAAC-3
<i>Adipor2</i>	NM_001037979.1	F 5'- CATGTTTGCCACCCCTCAGTA-3 R 5'-ATGCAAGGTAGGGATGATTCCA-3
<i>Adipor</i>	XM_006249852.3	F 5'-TCTTCCGCATCCACACAGAA-3 R 5'-ATATTTGCTCTGAGCATGGTCAAG-3
<i>Ppargc1a</i>	XM_017599391.1	F 5'-CGGTACAGTGAGTGTCTGG-3 R 5'-TGAGGACTTGCTGAGTTGTG-3
<i>Cpt1b</i>	NM_013200.1	F 5'-CGAGGTGGGATTGGAGTGG-3 R 5'-GCACCTAAGGGCTGAGAGAG-3
<i>Shn</i>	NM_001013247.1	F 5'- CTTTGCTTCTCTTCAGGACGTG-3 R 5'- AGGTCTGGGTGAGAACTCCA-3
<i>Adipoq</i>	NM_144744.3	F 5'- AATCCTGCCAGTCATGAAG -3 R 5'- CATCTCCTGGGTCACCCTTA -3
<i>Pnpla2</i>	XM_017604198.1	F 5'-CCAACGCCACTCACATCTA-3 R 5'-CCTCCTTGACACCTCAATA-3
<i>Pparg</i>	XM_006237009.3	F 5'-CCCTTTACCACGGTTGATTTCTC-3 R 5'-GCAGGCTCTACTTTGATCGCACT-3
<i>Lipe</i>	NM_012859.1	F 5'-CGATTGTGGAAAGATGTCAGGAT-3 R 5'-CCCTTTACCACGGTTGATTTCTC-3
<i>Dgat1</i>	NM_022402.2	F 5'- CCGTGGTATCCTGAATTGGT -3 R 5'- GGCGCTTCTCAATCTGAAAT -3
<i>Ucp1</i>	NM_022402.2	F 5'-AATCAGCTTTGCTTCCCTCA -3 R 5'- CAGGCGTTTCTCTCCCTGA -3
<i>Rplp0</i>	NM_022402.2	F 5'-GGTGTGTTGACAATGGCAGCAT-3 R 5'-ATTGCGGACACCCTCTAGGA-3

### 【呼気測定】

飼育開始、5週目に呼気ガス測定を行った。分析は、生体ガス分析用質量分析装置 ARCO-2000(アルコシステム(有)、千葉)を用いて、24時間の呼気ガスサンプルをイオン化したものを各気体分子のコレクターに分離することで行った。ラットを分析用チャンバーに順化させるため、測定開始の10時間前から生体ガス分析用ゲージにて飼育した。測定は、ガスサンプルを24時間採取して行った。データの解析は、マルチプロセスモニターシステム(アルコシステム(有)、千葉)を用いて行い、毎分1.0L流出する空気および吸気ガスからの呼吸商を算出し、エネルギー消費量、脂肪酸酸化量および炭水化物燃焼量を得た(Ishihara *et al.*, 2003)。

### 【統計処理】

統計処理は第2章に準じた。

### 3-3. 実験結果

#### 【体重、摂食量および各臓器重量】

終体重は CAS 群に比べ、SOY 群でやや重い傾向を示し、β-CON 群で有意に軽かった。

食餌効率も CAS 群に比べ SOY 群で同程度、β-CON 群では有意に低かった。摂食量は、各群間で差はみられなかった (Table 3-3)。

体重 100g あたりの睾丸周辺、腎臓周辺および腸間膜の各脂肪組織重量は CAS 群に比べ、SOY 群で同程度、β-CON 群では有意に低い値を示した。体重 100g あたりの肝臓、肩甲骨褐色脂肪組織およびヒラメ筋重量は、各群間で違いは認められなかった。

Table 3-3. Effect of dietary β-conglycinin on growth parameters in OLETF rats.

	Groups		
	CAS	SOY	β-CON
Body weight (g)			
Initial	133 ± 2	133 ± 2	133 ± 3
Final	449 ± 20 <sup>ab</sup>	471 ± 9 <sup>a</sup>	396 ± 12 <sup>b</sup>
Food intake (g/day)	26.7 ± 1.0	27.9 ± 0.4	25.7 ± 0.6
Food efficacy (g gain/g diet)	0.319 ± 0.010 <sup>a</sup>	0.327 ± 0.004 <sup>a</sup>	0.276 ± 0.007 <sup>b</sup>
Relative tissue weights (g/100g body weight)			
Liver	3.75 ± 0.14	3.77 ± 0.06	3.74 ± 0.11
Epididymal adipose tissue	2.52 ± 0.13 <sup>a</sup>	2.63 ± 0.09 <sup>a</sup>	1.98 ± 0.11 <sup>b</sup>
Perirenal adipose tissue	4.35 ± 0.15 <sup>a</sup>	4.45 ± 0.07 <sup>a</sup>	3.67 ± 0.13 <sup>b</sup>
Mesenteric adipose tissue	2.54 ± 0.11 <sup>a</sup>	2.50 ± 0.04 <sup>a</sup>	1.84 ± 0.09 <sup>b</sup>
Interscapular brown adipose tissue	0.219 ± 0.010	0.239 ± 0.012	0.242 ± 0.007
Soleus muscle	0.0259 ± 0.0015	0.0250 ± 0.0006	0.0279 ± 0.0009

CAS, casein; SOY, soy protein isolate; β-CON, β-conglycinin.

Values are expressed as mean ± SE of 6 rats.

Values without sharing a common superscript letter are significantly different at  $p < 0.05$ .

## 【呼気測定】

単位体重あたりの 24 時間の総エネルギー消費量は、CAS 群に比べ、SOY 群で同程度、 $\beta$ -CON 群で有意に高い値を示した (Fig. 3-1A)。炭水化物または脂質由来のエネルギー消費量は群間で有意差は見られなかった (Figs. 3-1B, 3-1C)。

各時間でのエネルギー消費量は各群間で統計的に有意ではなかった。24 時間の総エネルギー消費量の推移では、各群とも明期 (8:00~20:00) でやや低下し、暗期 (20:00~8:00) で上昇する傾向にあった (Fig. 3-2A)。暗期で CAS 群に比べ SOY 群は同程度であったが、 $\beta$ -CON 群は高い傾向を示した。炭水化物消費量においても総エネルギー消費量と同様に明期で減少、暗期で増加の推移を示した (Fig. 3-2B)。脂質消費量については、明期と暗期での違いはなかった。炭水化物および脂質消費量については各群間で差はなかったが、暗期においては炭水化物および脂質消費量は CAS 群、SOY 群に比し、 $\beta$ -CON 群で高い傾向を示した (Fig. 3-2C)。



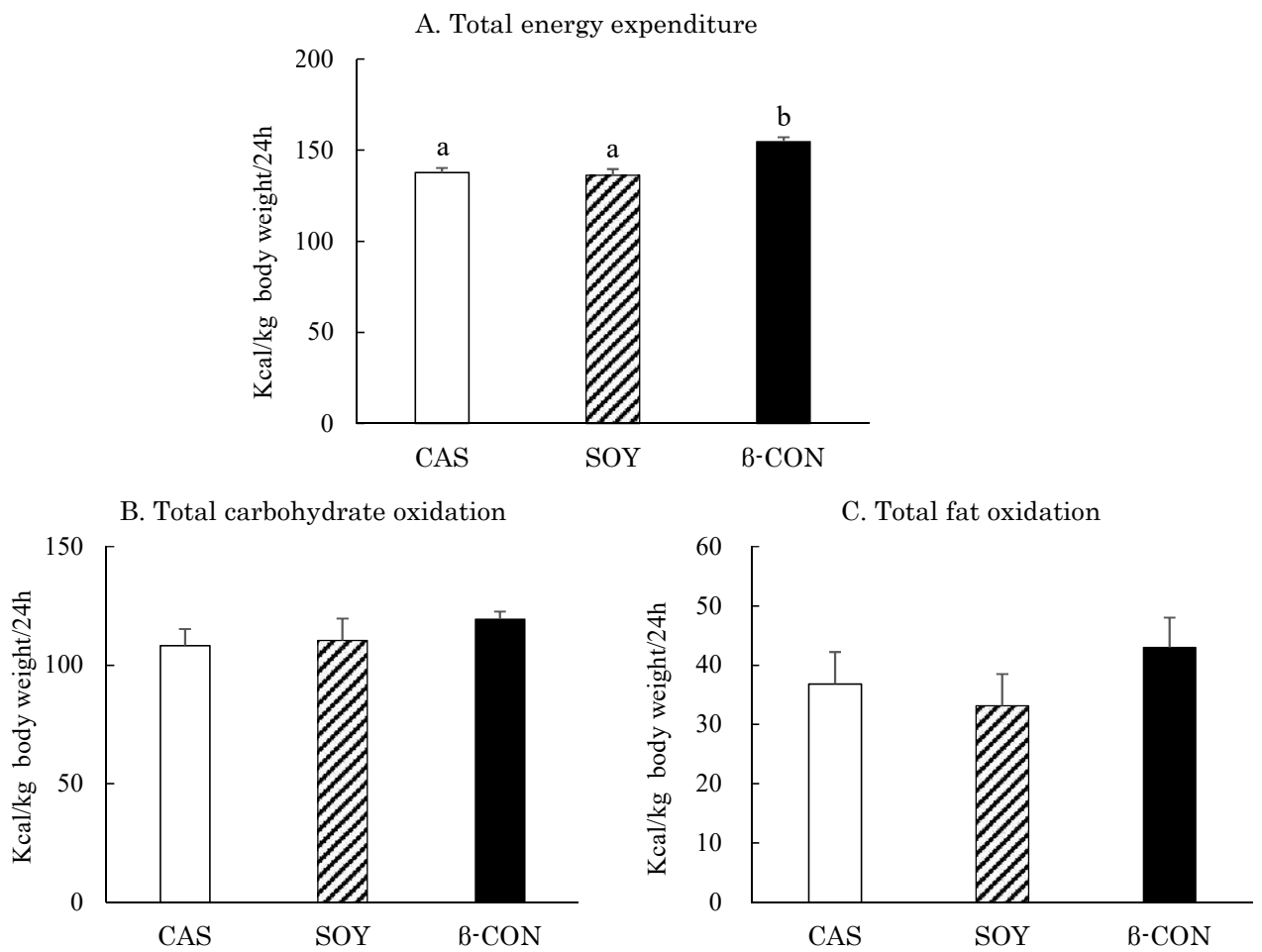


Fig. 3-1. Effect of dietary  $\beta$ -conglycinin on (A) 24 h energy expenditure, (B) carbohydrate oxidation and (C) fat oxidation in OLETF rats.

Values are expressed as mean  $\pm$  SE of 6 rats.

Values without sharing a common letter are significantly different at  $p < 0.05$ .

Open bar, casein group; hatched bar, soy protein group; solid bar,  $\beta$ -conglycinin group.

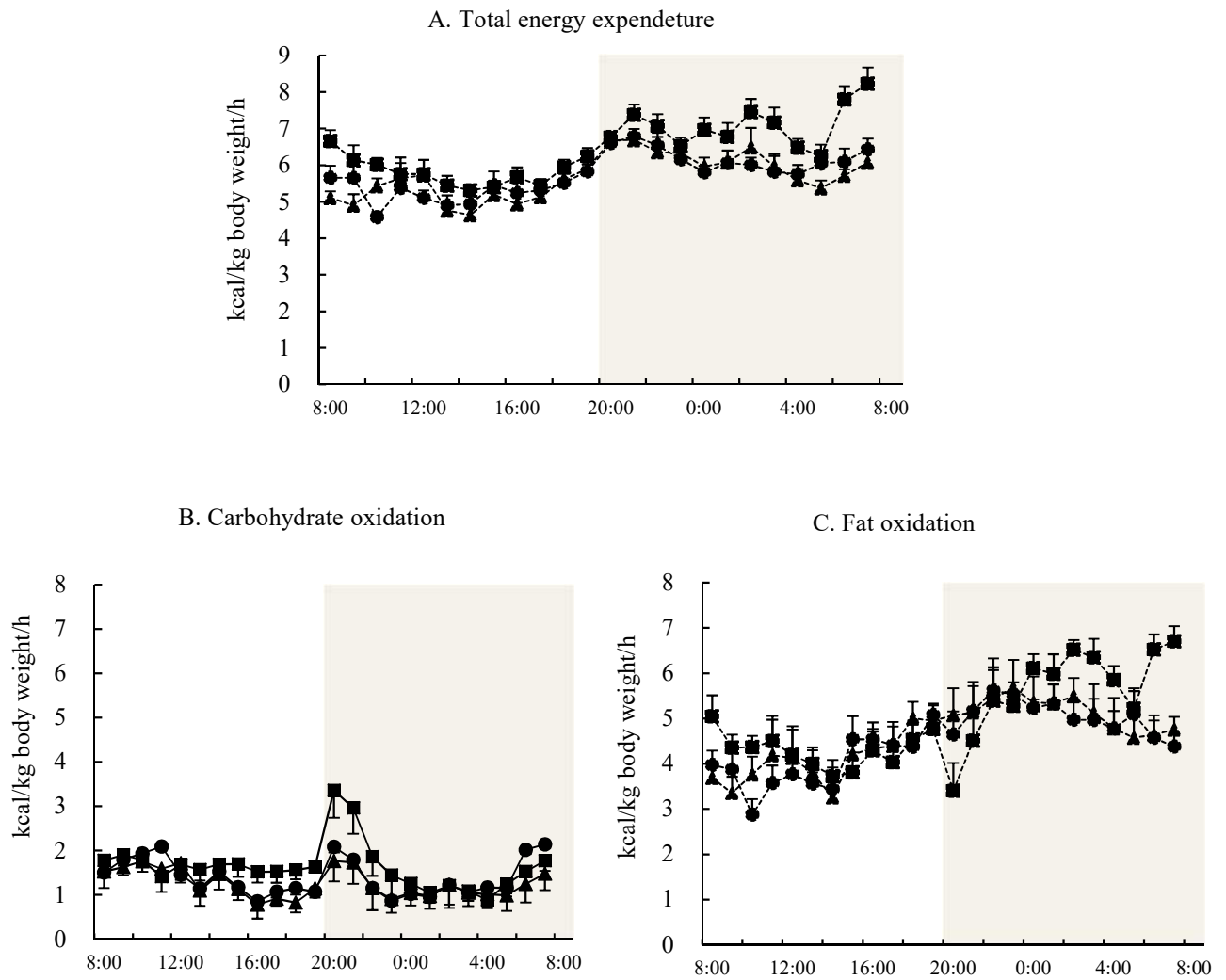


Fig. 3-2. Effect of dietary  $\beta$ -conglycinin on hour-by-hour profiles of (A) 24 h energy expenditure, (B) carbohydrate oxidation and (C) fat oxidation in OLETF rats.

Values are expressed as mean  $\pm$  SE of 6 rats.

●, casein group; ▲, soy protein group; and ■,  $\beta$ -conglycinin group.

## 【血清分析】

血清トリグリセリドおよび遊離脂肪酸の濃度は各群間で有意差はなかった (Table 3-4)。血清総コレステロール、HDL-コレステロール濃度は、CAS 群に比べ SOY 群および  $\beta$ -CON 群で有意に低かった。血清リン脂質濃度は CAS 群に比べ、 $\beta$ -CON 群で有意に低下していた。血清グルコース濃度は CAS 群に比べ、SOY 群および  $\beta$ -CON 群で低い傾向にあった。血清インスリン濃度は CAS 群に比べ、 $\beta$ -CON 群で有意に低かった。血清アディポネクチン濃度は CAS 群および SOY 群に比べ  $\beta$ -CON 群で有意に高かった。血清レプチン濃度は、CAS 群に比べ SOY 群で有意に低く ( $p=0.018$ )、 $\beta$ -CON 群でさらに低かった ( $p<0.0001$ )。

Table 3-4. Effect of dietary  $\beta$ -conglycinin on serum concentrations of lipids, glucose and hormones in OLETF rats.

	Groups		
	CAS	SOY	$\beta$ -CON
Triglyceride (mg/dL)	189 $\pm$ 27	168 $\pm$ 11	176 $\pm$ 14
Total cholesterol (mg/dL)	120 $\pm$ 7 <sup>a</sup>	97.3 $\pm$ 5.1 <sup>b</sup>	91.7 $\pm$ 4.5 <sup>b</sup>
HDL cholesterol (mg/dL)	84.8 $\pm$ 5.0 <sup>a</sup>	67.0 $\pm$ 5.4 <sup>b</sup>	57.9 $\pm$ 2.5 <sup>b</sup>
Phospholipid (mg/dL)	245 $\pm$ 19 <sup>a</sup>	200 $\pm$ 9 <sup>ab</sup>	195 $\pm$ 7 <sup>b</sup>
Free fatty acid (mmol/mL)	1.58 $\pm$ 0.23	1.43 $\pm$ 0.11	1.74 $\pm$ 0.10
Glucose (mg/dL)	270 $\pm$ 13	244 $\pm$ 6	219 $\pm$ 23
Insulin (ng/mL)	10.0 $\pm$ 1.3 <sup>a</sup>	8.17 $\pm$ 0.82 <sup>ab</sup>	6.00 $\pm$ 0.90 <sup>b</sup>
Adiponectin ( $\mu$ g/mL)	4.20 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>	4.80 $\pm$ 0.19 <sup>a</sup>	6.75 $\pm$ 0.57 <sup>b</sup>
Leptin (ng/mL)	17.2 $\pm$ 1.6 <sup>a</sup>	12.8 $\pm$ 0.6 <sup>b</sup>	8.73 $\pm$ 0.41 <sup>c</sup>

CAS, casein; SOY, soy protein isolate;  $\beta$ -CON,  $\beta$ -conglycinin.

Values are expressed as mean  $\pm$  SE of 6 rats.

Values without sharing a common superscript letter are significantly different at  $p < 0.05$ .

### 【肝臓脂質濃度】

肝臓トリグリセリド濃度は、CAS 群に比べ SOY 群で低い傾向、 $\beta$ -CON 群で有意に低かった (Table 3-5)。肝臓コレステロール濃度およびリン脂質濃度は各群間で有意な違いはなかった。

Table 3-5. Effect of dietary  $\beta$ -conglycinin on hepatic lipid concentrations in OLETF rats.

	Groups		
	CAS	SOY	$\beta$ -CON
Triglyceride (mg/g liver)	26.8 $\pm$ 2.2 <sup>a</sup>	21.4 $\pm$ 1.2 <sup>ab</sup>	18.8 $\pm$ 2.0 <sup>b</sup>
Cholesterol (mg/g liver)	3.78 $\pm$ 0.36	3.87 $\pm$ 0.40	4.28 $\pm$ 0.32
Phospholipid (mg/g liver)	25.8 $\pm$ 0.8	27.0 $\pm$ 0.8	27.7 $\pm$ 0.8

CAS, casein; SOY, soy protein isolate;  $\beta$ -CON,  $\beta$ -conglycinin.

Values are expressed as mean  $\pm$  SE of 6 rats.

Values without sharing a common superscript letter are significantly different at  $p < 0.05$ .

【酵素活性】

肝臓サイトソール FAS 活性は、CAS 群に比べ SOY 群および  $\beta$ -CON 群で有意に低かった (Table 3-6)。Malic enzyme 活性および G6PDH 活性についても FAS 活性と同様、CAS 群に比べ、SOY 群および  $\beta$ -CON 群で有意に低かった。肝臓ミトコンドリア CPT 活性は、CAS 群に比べ、SOY 群で高い傾向、 $\beta$ -CON 群では有意に高かった。肝臓ペルオキシソーム ACO 活性は、各群間で違いがなかった。

Table 3-6. Effect of dietary  $\beta$ -conglycinin on hepatic enzyme activities in OLETF rats.

	Groups		
	CAS	SOY	$\beta$ -CON
	(nmol/min/mg protein)		
Cytosolic FAS	25.2 $\pm$ 2.8 <sup>a</sup>	12.3 $\pm$ 2.1 <sup>b</sup>	10.7 $\pm$ 0.7 <sup>b</sup>
Cytosolic malic enzyme	80.4 $\pm$ 9.4 <sup>a</sup>	42.5 $\pm$ 4.6 <sup>b</sup>	45.6 $\pm$ 1.4 <sup>b</sup>
Cytosolic G6PDH	144 $\pm$ 26 <sup>a</sup>	54.1 $\pm$ 9.2 <sup>b</sup>	42.7 $\pm$ 2.0 <sup>b</sup>
Mitochondrial CPT	4.07 $\pm$ 0.35 <sup>a</sup>	5.33 $\pm$ 0.23 <sup>a</sup>	7.19 $\pm$ 0.51 <sup>b</sup>
Peroxisomal ACO	3.69 $\pm$ 0.12	3.58 $\pm$ 0.14	3.75 $\pm$ 0.15

CAS, casein; SOY, soy protein isolate;  $\beta$ -CON,  $\beta$ -conglycinin.

FAS, fatty acid synthase; G6PDH, glucose 6 phosphate dehydrogenase; CPT, carnitine palmitoyltransferase; ACO, acyl CoA oxidase.

Values are expressed as mean  $\pm$  SE of 6 rats.

Values without sharing a common superscript letter are significantly different at  $p < 0.05$ .

### 【肝臓における遺伝子発現】

脂肪酸合成に関わる遺伝子 *Fasn* の発現は CAS 群に比べ SOY 群および  $\beta$ -CON 群で有意に低値であった (Fig. 3-3)。また *Fasn* の上流に位置する *Srebf1c* の発現も同様であった。*Cpt1* の発現は CAS 群および SOY 群に比べ、 $\beta$ -CON 群で高い傾向がみられたが有意差はなかった ( $p=0.094$ )。また *Cpt1* の上流に位置する *Ppara* の発現も同様の傾向であった ( $p=0.118$ )。遊離脂肪酸の取り込みに関わる遺伝子 *Cd36* の発現は各群間で差はなかった。アディポネクチン受容体をコードする遺伝子である *Adipor2* は CAS 群に比べ SOY 群および  $\beta$ -CON 群で高い傾向を示した。

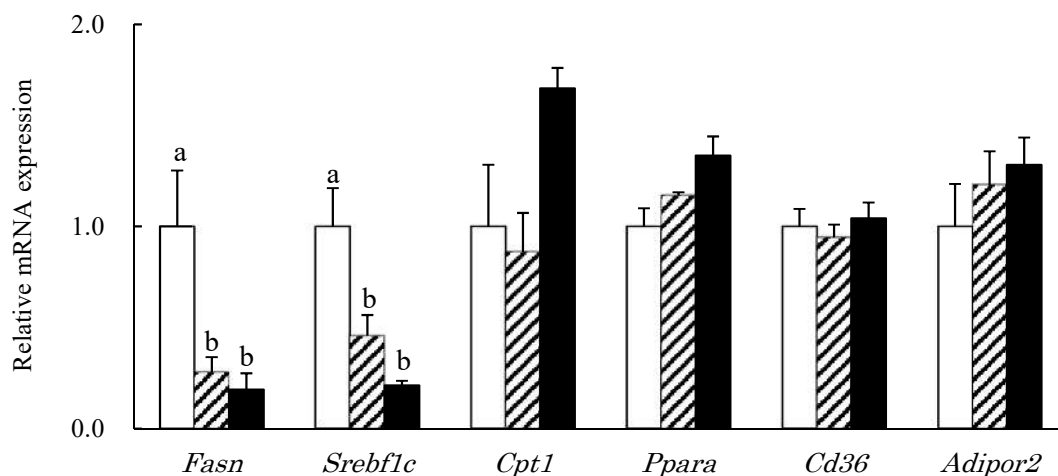


Fig. 3-3. Effect of dietary  $\beta$ -conglycinin on hepatic gene expressions in OLETF rats.

Values are expressed as mean  $\pm$  SE of 6 rats.

Values without sharing a common letter are significantly different at  $p < 0.05$ .

*Fasn*, fatty acid synthase; *Srebf1c*, sterol regulatory element-binding protein 1c; *Cpt1*, carnitine palmitoyl-acyltransferase 1; *Ppara*, peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ ; *Cd36*, cluster of differentiation 36; *Adipor2*, adiponectin receptor 2.

Open bar; casein group, hatched bar; soy protein group, solid bar;  $\beta$ -conglycinin group.

#### 【ヒラメ筋における遺伝子発現】

アディポネクチン受容体をコードする遺伝子 *Adipor1* の発現は CAS 群および SOY 群に比べ、 $\beta$ -CON 群で有意に高かった ( $p=0.009$ ) (Fig. 3-4)。エネルギー代謝に関わる転写因子である *Ppargc1a* の発現は有意差はないものの CAS 群および SOY 群に比べ  $\beta$ -CON 群で高い傾向を示した ( $p=0.054$ )。脂肪酸  $\beta$  酸化に関わる遺伝子 *Cpt1b* の発現は CAS 群および SOY 群に比べ  $\beta$ -CON 群で有意に高かった ( $p=0.030$ )。 *Cpt1b* の上流に位置する *Ppara* の発現は CAS 群および SOY 群に比べ  $\beta$ -CON 群で高い傾向を示した。遊離脂肪酸の取り込みに関わる遺伝子 *Cd36* の発現は有意差はないものの CAS 群に比べ SOY 群および  $\beta$ -CON 群で高値を示した。非ふるえ熱産生に関わる遺伝子 *Sln* の発現は有意差はないものの、CAS 群および SOY 群に比べ  $\beta$ -CON 群で高い傾向を示した ( $p=0.348$ )。

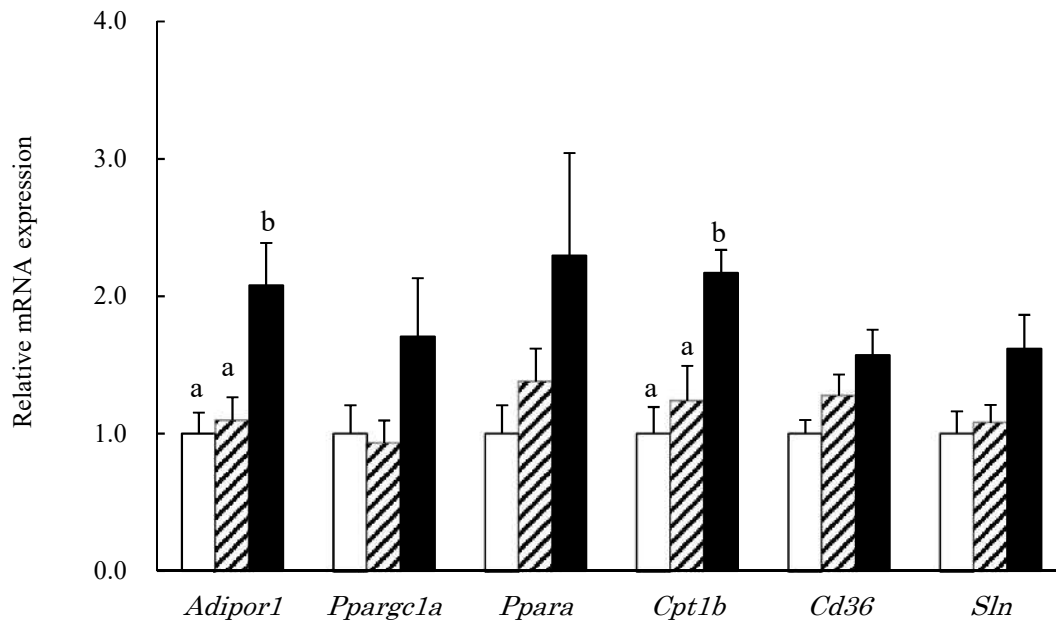


Fig. 3-4. Effect of dietary  $\beta$ -conglycinin on gene expressions in soleus muscle in OLETF rats.

Values are expressed as mean  $\pm$  SE of 6 rats.

Values without sharing a common letter are significantly different at  $p < 0.05$ .

*Adipor1*, adiponectin receptor 1; *Pparg1a*, peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$ ; *Ppara*, peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ ; *Cpt1b*, carnitine palmitoyl-acyltransferase 1 b; *Cd36*, cluster of differentiation 36; *Sln*, sarcolipin.

Open bar, casein group; hatched bar, soy protein group; solid bar,  $\beta$ -conglycinin group.



【腸間膜脂肪組織における遺伝子発現】

*Pparg* および *Adipoq* の発現は統計的に有意差ではなかったものの、CAS 群に比べ SOY 群および  $\beta$ -CON 群で高傾を示した (Fig. 3-5)。 *Lipe* および *Pnpla2* の発現は CAS 群に比べ SOY 群でやや高い傾向にあり、 $\beta$ -CON 群で有意に高かった。 *Dgat1* の発現は群間で差はなかった。

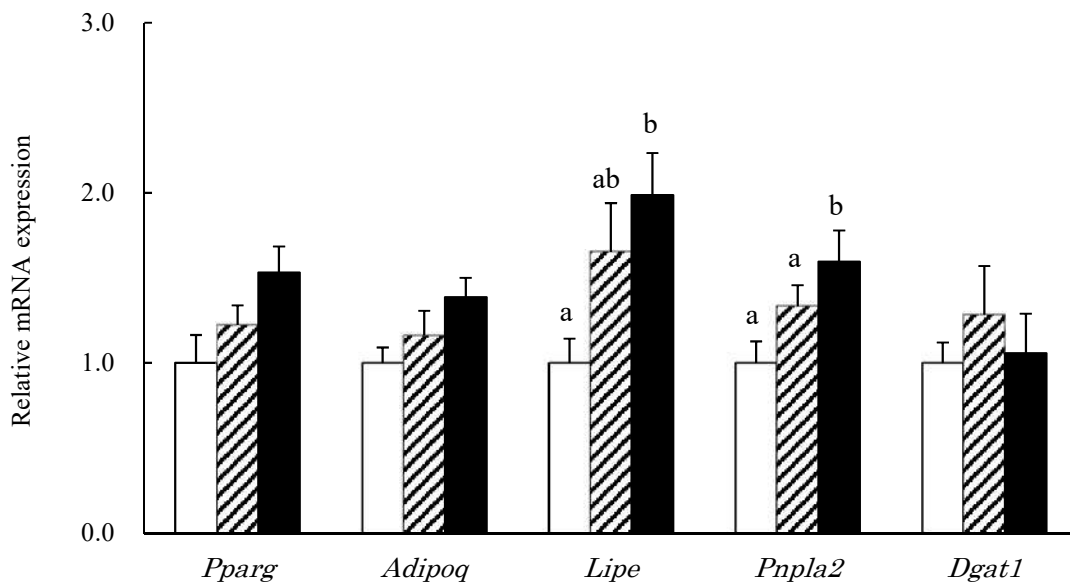


Fig. 3-5. Effect of dietary  $\beta$ -conglycinin on gene expressions in mesenteric adipose tissue in OLETF rats.

Values are expressed as mean  $\pm$  SE of 6 rats.

Values without sharing a common letter are significantly different at  $p < 0.05$ .

*Pparg*, peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ ; *Adipoq*, adiponectin; *Lipe*, hormone sensitive lipase; *Pnpla2*, adipose triglyceride lipase; *Dgat1*, acyl-CoA diacylglycerol acyltransferase 1.

Open bar, casein group; hatched bar; soy protein group, solid bar;  $\beta$ -conglycinin group.

【褐色脂肪組織における遺伝子発現】

エネルギー代謝に関わる転写因子をコードする *Ppargc1a* の発現は CAS 群および SOY 群に比べ  $\beta$ -CON 群で高い傾向を示した ( $p=0.089$ ) (Fig. 3-6)。 *Ucp1* の発現は CAS 群および SOY 群に比べ  $\beta$ -CON 群で有意に高かった ( $p=0.034$ )。 *Cpt1b* の発現は CAS 群および SOY 群はほぼ同レベルで、  $\beta$ -CON 群で高い傾向を示した ( $p=0.097$ )。

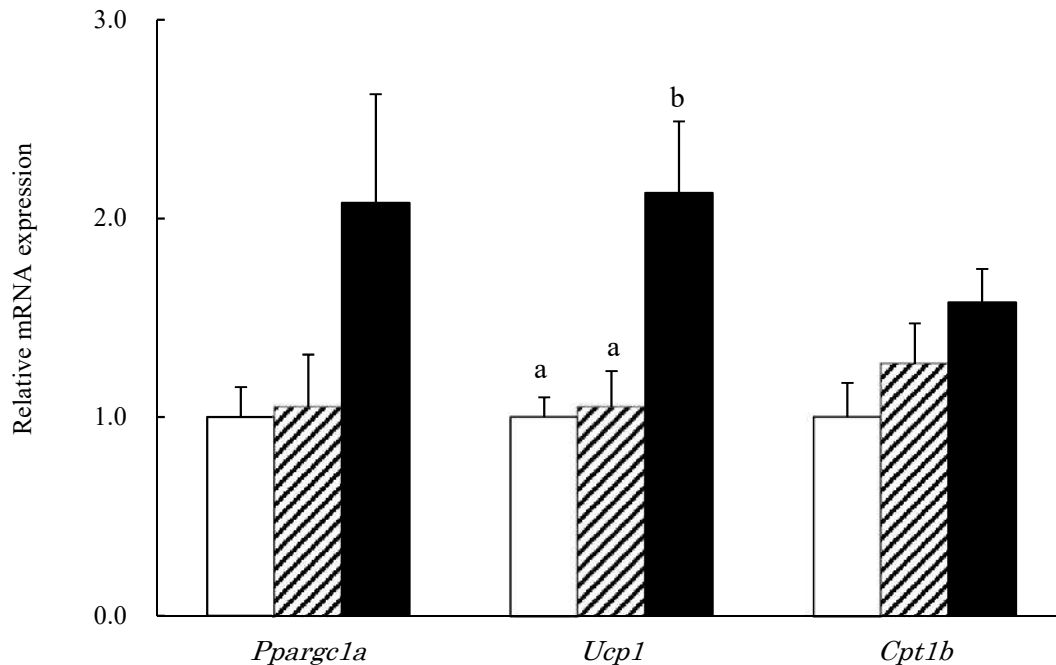


Fig. 3-6. Effect of dietary  $\beta$ -conglycinin on gene expressions in brown adipose tissue in OLETF rats.

Values are expressed as mean  $\pm$  SE of 6 rats.

Values without sharing a common letter are significantly different at  $p < 0.05$ .

*Ppargc1a*, peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$ ; *Ucp1*, uncoupling protein 1; *Cpt1b*, carnitine palmitoyl-acyltransferase 1 b.

Open bar, casein group; hatched bar, soy protein group; solid bar,  $\beta$ -conglycinin group.

#### 3-4. 考察

本研究では、肥満モデル動物である OLETF ラットに高脂肪および高スクロース食を摂食させ、エネルギー代謝の点から  $\beta$ -コングリシニン摂取による体脂肪低減および脂質代謝改善作用の機序を検討した。

摂食量は統計的に有意差はなかったが、CAS 群に比べ SOY 群では 1g 程度多く、 $\beta$ -CON 群では 1g 程度少なかった。終体重は CAS 群に比べ SOY 群は有意に高く  $\beta$ -CON 群で低い傾向を示しており、摂食量の違いが終体重に影響を及ぼした可能性が考えられた。白色脂肪組織重量は睾丸周辺、腎臓周辺および腸間膜のいずれにおいても CAS 群に比べ  $\beta$ -CON 群で有意に低い値を示した。この作用は第 2 章でも述べたように、白色脂肪組織における脂肪分解の亢進により、脂肪細胞の肥大が抑えられたものと考えられた。

本実験の呼気測定において、単位体重あたりの 24 時間の総エネルギー消費量は、CAS 群に比べ、SOY 群で同程度、 $\beta$ -CON 群で有意に高い値を示した。 $\beta$ -コングリシニン摂取による糖質および脂質それぞれの消費量には有意な差を認めなかったが、糖質および脂質の両方を含む総エネルギー消費量は増加していた。そこで、骨格筋におけるエネルギー消費に影響する因子について検討した。酸素性のエネルギー代謝に特性がある骨格筋への影響として、*Adipor1* および *Pparg1a* の発現は CAS 群に比べ  $\beta$ -CON 群で有意に増加していた。速筋に比べ遅筋は脂質代謝に優れて安静時および運動時における脂肪酸  $\beta$  酸化能が高いことが示唆され (Wade *et al.*, 1990)、*Pparg1a* は筋肉の速筋タイプの筋繊維を遅筋タイプに誘導

する作用を有することが報告されている (Lin *et al.*, 2002)。Tadaishi らは、骨格筋における *Ppargc1a* を過剰発現させたマウスでは骨格筋のミトコンドリア量の増加および脂肪酸の代謝亢進を介して運動時の持久力の上昇に寄与することを報告しており (Tadaishi *et al.*, 2011)、 $\beta$ -コングリシニン摂取による *Ppargc1a* の発現の増強が遅筋タイプの割合を高めて骨格筋へのエネルギー消費量に影響を及ぼしている可能性が示唆された、SD ラットに大豆タンパク質を摂取させた研究では、骨格筋の *Ppara* および *Cpt1* の発現亢進、肝臓の CPT1 活性上昇および体脂肪の低減の各作用が報告されている (Morifuji *et al.*, 2006)。これらは、本研究の  $\beta$ -コングリシニンの効果と一致した。これらのことから、高脂肪食摂取の条件下で、 $\beta$ -コングリシニン摂取により生じたエネルギー消費量の増加は、肝臓トリグリセリド濃度低下作用および白色脂肪組織重量低減作用に寄与することが示唆された。

エネルギー代謝に関わる因子としてアディポネクチンを介した肝臓および骨格筋への影響が考えられる。アディポネクチンによる AMPK の活性化は骨格筋および肝臓での脂肪酸  $\beta$  酸化を亢進させることが報告されている (Kadowaki *et al.*, 2006)。マウスへのアディポネクチン投与により、筋肉における脂肪酸の  $\beta$  酸化が亢進し体重が減少したことが報告されている (Fruebis *et al.*, 2001)。C2C12 細胞を用いた実験で、培養液へのアディポネクチン添加は *Ppara* および *Cpt1* の発現を亢進させ、脂肪酸  $\beta$  酸化能を亢進することが報告されている (Yoon *et al.*, 2006)。これらのことから、 $\beta$ -コングリシニン摂取による血清アディポネクチン濃度の上昇は骨格筋において *Ppargc1a* および *Cpt1b* の発現を亢進させ、脂肪酸の  $\beta$  酸化を亢

進させることによりエネルギー消費量を増加させることが示唆された。

体温を保つためのエネルギー産生に、ふるえ熱産生と非ふるえ熱産生がある。骨格筋に高発現するサルコリピンは非ふるえ熱産生に関与するとされている (Bal *et al.*, 2012)。筋小胞体に局在する筋小胞体カルシウムポンプ  $\text{Ca}^{2+}$  ATP アーゼ (SERCA) は筋収縮時に重要な役割を担っており、サルコリピンは SERCA と結合して筋小胞体への  $\text{Ca}^{2+}$  取り込み能を負に制御する因子である。非ふるえ熱産生機構として、サルコリピン結合状態下で、SERCA は  $\text{Ca}^{2+}$  の濃度勾配に逆らって adenosine triphosphate (ATP) 加水分解活性を維持する。さらに SERCA の脱共役による ATP 消費量の増加は非ふるえ熱産生を亢進することが示唆されている (Bal *et al.*, 2012)。そのため、サルコリピンは非運動下において筋肉の熱産生および全身エネルギー代謝の重要な調節因子であることが示唆されている (Bal *et al.*, 2012; Maurya *et al.*, 2015)。サルコリピンノックアウトマウスに高脂肪食を摂取させると、白色脂肪組織重量の増加、耐糖能障害および血漿遊離脂肪酸濃度の上昇が報告されている (MacPherson *et al.*, 2016)。本研究において、骨格筋における *Sln* 発現は CAS 群に比べ  $\beta$ -CON 群で統計的に有意ではないものの高い傾向を示しており、非ふるえ熱産生によるエネルギー消費量の増加が関与した可能性も考えられた。

本研究において、褐色脂肪組織における *Ucp1* の発現は CAS 群に比べ  $\beta$ -CON 群で高値であった。褐色脂肪組織は熱産生に重要な組織であり、これまでに大豆ペプチドの摂取が熱産生亢進によりエネルギー消費量を増進することが報告されている (Saito *et al.*, 1999; Saito *et*

*al.*, 1991; Saito *et al.*, 1992)。熱産生の特異的部位として知られている褐色脂肪組織は、UCP1 によりミトコンドリアでの酸化的リン酸を脱共役させて、エネルギー消費を促進させる。これまでに大豆タンパク質の摂取は褐色脂肪組織における *Ucp1* の発現を亢進させ、熱産生を増加させることで脂肪組織重量の低下に関わることが報告されている (Torre-Villalvazo *et al.*, 2008)。以上のことから、本研究における  $\beta$ -コングリシニン摂取も褐色脂肪組織における脂肪酸  $\beta$  酸化の亢進に関わる可能性が示唆された。

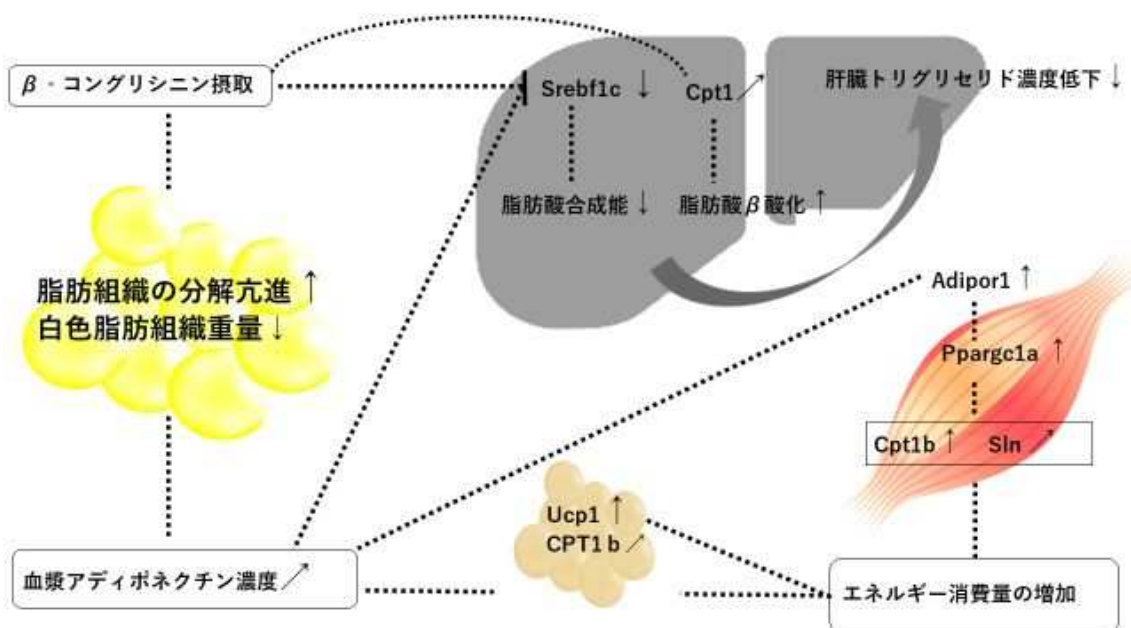
本研究において、血清トリグリセリド濃度に対する  $\beta$ -コングリシニンの影響は明らかではなかった。肝臓トリグリセリド濃度は CAS 群に比べ、 $\beta$ -CON 群で有意に低く、脂肪酸合成系の律速酵素である肝臓サイトソールの FAS、Malic enzyme および G6PDH の酵素活性も CAS 群に比べ SOY 群および  $\beta$ -CON 群で有意に低下しており、第 2 章の結果およびこれまでに報告されている  $\beta$ -コングリシニンの効果と同じ傾向を示した (Yamazaki *et al.*, 2012)。また本研究において、肝臓における *Srebp1c* および *Fasn* の発現は CAS 群に比べ SOY 群および  $\beta$ -CON 群で低かったが、この結果は  $\beta$ -コングリシニンの摂取が肝臓での脂肪合成能を遺伝子レベルで制御することを示したこれまでの報告と一致した (Yamazaki *et al.*, 2012; Moriyama *et al.*, 2004; Tachibana *et al.*, 2010; Tachibana *et al.*, 2014)。一方、肝臓ミトコンドリアの CPT 活性は CAS 摂取に比べ  $\beta$ -CON 摂取で有意に高く、肝臓における *Cpt1* の発現は CAS 摂取に比べ  $\beta$ -CON 摂取で高い傾向であった ( $p=0.099$ )。アディポネクチンは肝臓でのアディポネクチン受容体である *Adipor2* を介して *Ppara* を活性化し肝臓における脂肪酸  $\beta$  酸化能を活性化

することが報告されている(Xu *et al.*, 2003)。本研究において、肝臓における *Adipor2* の発現は統計的に有意ではなかったものの、CAS 群に比べ  $\beta$ -CON 群で高い傾向を示しており、血清アディポネクチン濃度の上昇とそれに伴う肝臓での *Cpt1* の発現亢進により肝臓ミトコンドリア CPT 活性が上昇したことが示唆された。したがって、 $\beta$ -コングリシニン摂取による肝臓トリグリセリド濃度低下作用は、肝臓での脂肪酸合成能の低下および脂肪酸  $\beta$  酸化能亢進に起因することが示唆された。

### 3-5. 小括

OLETF ラットにおいて、高脂肪食摂食条件下で  $\beta$ -コングリシニン摂取により体脂肪低減作用、総エネルギー消費量増加作用および血漿アディポネクチン濃度上昇作用が認められた。アディポネクチンは、肝臓および筋肉でエネルギー消費を亢進する作用を有し、 $\beta$ -CON 群のエネルギー消費量の上昇、体脂肪低減に影響したことが考えられた。この作用には、 $\beta$ -コングリシニン摂取による肝臓での CPT 活性の上昇、骨格筋における *Cpt1b* および褐色脂肪組織における *Ucp1* の各発現の亢進が脂肪酸の  $\beta$  酸化を誘導し、エネルギー消費を亢進することが示唆された。また  $\beta$ -コングリシニン摂取は血清アディポネクチン濃度の上昇を引き起こし、骨格筋における *Adipor1* の発現を亢進を伴って、筋肉での脂肪酸  $\beta$  酸化能を亢進させる機序が存在することも考えられた。

### 第3章で認められたβ-コングリシニンの効果





## 第4章

$\beta$ -コングリシニン摂取が2型糖尿病モデル(KK- $A^y$ )マウスの血糖値および血清・肝臓脂質濃度に及ぼす影響

### 4-1. 緒言

第2章および第3章で、 $\beta$ -コングリシニンの摂取は肥満状態においても体脂肪低減作用および肝臓トリグリセリド濃度低下作用を示すことを明らかにした。

これまでの研究で、アディポネクチンは肝臓および筋肉において、インスリン抵抗性を改善することが報告されている(Yamauchi *et al.*, 2002)。インスリン抵抗性の上昇は2型糖尿病の発症および進行に関与し、動脈硬化症のリスクを上昇させることが示唆されている(Yamazaki *et al.*, 2012)。Yamauchi らは、2型糖尿病が進行した KK- $A^y$  マウスでは、アディポネクチンの濃度が低下しており、アディポネクチンの腹腔内投与は KK- $A^y$  マウスのインスリン抵抗性を改善することを報告している(Yamauchi *et al.*, 2001)。第2章および第3章において、 $\beta$ -コングリシニン摂取は糖尿病発症前の肥満状態の OLETF ラットの体脂肪を低減し、肝臓トリグリセリド濃度を低下させた。 $\beta$ -コングリシニンによるこのような作用は2型糖尿病の進行に影響するのではないかと考えた。

第4章では、糖尿病の進行程度が比較的早い2型糖尿病モデル動物である KK- $A^y$  マウスを用い、糖尿病の進行程度が異なる2つの条件下で摂食試験を行い、 $\beta$ -コングリシニンの

体脂肪低減作用および脂質代謝改善作用、インスリン感受性への影響について調べ、2 型糖尿病に対する効果について検討した。

## 4-2.実験方法

### 【飼育条件】

実験食は AIN-93G 組成 (Reeves *et al.*, 1993) に準拠して、スクロースの割合を 10% に調整した。第 2 章および第 3 章と同様に、食餌タンパク質として、CAS を 20% 含む食餌を対照食とし、食餌タンパク質の半量を SOY または  $\beta$ -CON で置き換え、試験食とした (Table 4-1)。実験動物として 4 週齢の KK-A<sup>y</sup> マウス (KK-A<sup>y</sup>/TaJcl; 日本エスエルシー (株)) を用いた。第 4 章では、糖尿病の進行程度についての影響を検討するために、2 つの摂食期間 (1 週間 (Exp. I) および 4 週間 (Exp. II)) を設定した。Exp. I および Exp. II は市販固形飼料 (Type NMF、オリエンタル酵母 (株)) を用いて 6 日間の予備飼育を行った後、平均体重に差が出ないように 1 群 6 匹で 3 群に分けた。

Exp. I では、各実験食による飼育を開始して 7 日目にマウスを 6 時間絶食させ、インスリン耐性試験を行った。すなわち、インスリン (ヒューマリン R 注 100 IU/mL、日本イーライリリー (株)) を 1.0 IU/kg の用量でマウスの腹腔内に投与し、0、15、30、60、90、および 120 分後に尾部から血液を採取し、血糖値測定器 (アクチェックアビバ; ロシュ・ダイアグノスティックス

(株))で血糖値測定を行った。インスリン耐性試験の4日後、マウスを6時間絶食させ、腹部大静脈より採血した。

Exp.IIでは、6日間の予備飼育後、6時間絶食させ血糖値測定を行った。血糖値および平均体重に差が出ないように1群6匹で3群に分けた。試験食による飼育を開始して14日および28日目にマウスを6時間絶食させ、血糖値測定を行った。摂食開始28日目には、血糖値測定に続き、インスリン耐性試験(インスリン投与量;1.0 IU/kg)を行った。インスリン耐性試験の5日後、マウスを6時間絶食させ、腹部大静脈採血を行い、血清を調製した。いずれの実験においても、摂食間期間中、食餌および水は自由摂取させた。飼育環境は室温22～23℃、湿度50～60%、12時間(8:00-20:00点灯)の明暗サイクルとした。肝臓、白色脂肪組織(腎臓周辺、睾丸周辺、腸間膜)、肩甲間褐色脂肪組織および腓腹筋をそれぞれ摘出し、重量を測定後、-80℃で保存した。

本実験は「長崎県立大学動物実験委員会」の審査を受け、承認された上で、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準(平成18年6月1日環境省告示第88号)」に則して実施した。

Table 4-1. Diet composition (g/kg diet)

	Groups		
	CAS	SOY	$\beta$ -CON
Casein	200	100	100
Soy protein isolate	-	100	-
$\beta$ -Conglycinin	-	-	100
Cornstarch	397.5	397.5	397.5
Pregelatinized cornstarch	132	132	132
Sucrose	300	300	300
Soybean oil	70	70	70
Cellulose	50	50	50
Mineral mixture (AIN-93G) <sup>*</sup>	35	35	35
Vitamin mixture (AIN-93) <sup>*</sup>	10	10	10
Choline bitartrate	2.5	2.5	2.5
L-Cystine	3	3	3
<i>t</i> -Butylhydroquinone	0.014	0.014	0.014

CAS, casein; SOY, soy protein isolate;  $\beta$ -CON,  $\beta$ -conglycinin.

<sup>\*</sup>Reeves *et al.*, 1993

#### 【血清分析】

血清分析は第 2 章に準じて行った。

#### 【肝臓脂質分析】

肝臓脂質分析は第 2 章に準じて行った。

#### 【酵素活性測定用試料の調製】

酵素活性の試料調製は第 2 章に準じて行った。

**【酵素活性測定】**

酵素活性の測定は第 2 章に準じて行った。

**【各組織の総 RNA の抽出およびリアルタイム RT-PCR 法による遺伝子発現の解析】**

各組織の総 RNA の抽出およびリアルタイム RT-PCR 法による遺伝子発現の解析は第 2 章に準じて行った。測定に用いたプライマーは Table 4-2 に示した。

**【統計処理】**

統計処理は第 2 章に準じて行った。

Table 4-2. Sequence of quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction primers.

Gene	Accession no	Primer sequence
<i>Fasn</i>	NM_007988.3	F 5'- TGCACCTCACAGGCATCAAT -3 R 5'- GTCCCACTTGATGTGAGGGG -3
<i>Srebf1c</i>	NM_001358314	F 5'- TTAGGCAGCAATGAGGGCAA -3 R 5'-TCTTCATTCTGCTGTGATGTCCA -3
<i>Irs2</i>	NM_001081212.2	F 5'- CACAGTCGTGAAAGAGTGAAGC -3 R 5'- GTTGGTCGGAAACATGCCAA -3
<i>Irs1</i>	NM_010570.4	F 5'-TTAGGCAGCAATGAGGGCAA-3 R 5'-TCTTCATTCTGCTGTGATGTCCA-3
<i>Slc2a4</i>	NM_001359114.1	F 5'- TCTGACGTAAGGATGGGGAAC -3 R 5'- TTGTGGGATGGAATCCGGTC -3
<i>Adipor1</i>	NM_028320.4	F 5'- TCGTGTATAAGGTCTGGGAG-3 R 5'- GCAGATGTGTCCAGATGTTG-3
<i>Adipor2</i>	NM_197985.4	F 5'-TGGGACATGTTTGCCACC-3 R 5'-ATAGCCAGCCTATCTGCCC-3
<i>Ppara</i>	NM_001113418.1	F 5'-AGGGATTTGCACAGAGGGC-3 R 5'-GATCACCCCCATTTTCGGTAGC-3
<i>Ppargc1a</i>	XM_017320718.2	F 5'- GAGGACTTCAGCGTGTTTGC -3 R 5'- AACCAGAGCAGCACACCTAC -3
<i>Cpt1</i>	NM_013495.2	F 5'- GGACTCCGCTCGCTCATT-3 R 5'- GAGATCGATGCCATCAGGGG-3
<i>Cpt1b</i>	NM_009948.2	F 5'- AGGCACTTCTCAGCATGGTC-3 R 5'- ACGGACACAGATAGCCCAGA-3
<i>Adipoq</i>	NM_009605.5	F 5'- TGACGACACCAAAAGGGCTC-3 R 5'- CACAAGTCCCTTGGGTGGA-3
<i>Pnpla2</i>	NM_001163689.1	F 5'- GCTCATCCAGGCCAATGTCT-3 R 5'- AAGTTGTCTGAAATGCCGCC-3
<i>Pparg</i>	NM_001127330.2	F 5'- CTCACACTCTGACAGGAGCC-3 R 5'- AGAACGTGACTTCTCAGCCC-3
<i>Lipe</i>	XM_006539572.4	F 5'- CTGCGTCTCCAGGAGGATTG-3 R 5'- GAGAACGCTGAGGCTAGGAC-3
<i>Rplp0</i>	NM_007475.5	F 5'- GGGTACCCGATCTGCAGACA-3 R 5'- ATAACCCTGAAGTGCTCGACATC-3

### 4-3. 実験結果

#### 【インスリン耐性試験】

##### *Exp. I (1-week study)*

摂食を開始後 7 日目の空腹時血糖値に各群間で差は認められなかった (Fig. 4-1A)。インスリン耐性試験では、インスリン投与後 30、60、90 および 120 分後の血糖値の低下は CAS 群に比べ SOY 群および  $\beta$ -CON 群で大きい傾向がみられた (Fig. 4-1C)。

##### *Exp. II (4-week study)*

摂食期間中の空腹時血糖値は各群間で統計的に有意差ではなかったものの、摂食日数の増加とともに空腹時血糖値は上昇した (Fig. 4-1B)。摂食を開始して 28 日目にインスリン耐性試験を行ったが、インスリンに対する応答に各群間で違いはなかった (Fig. 4-1D)。

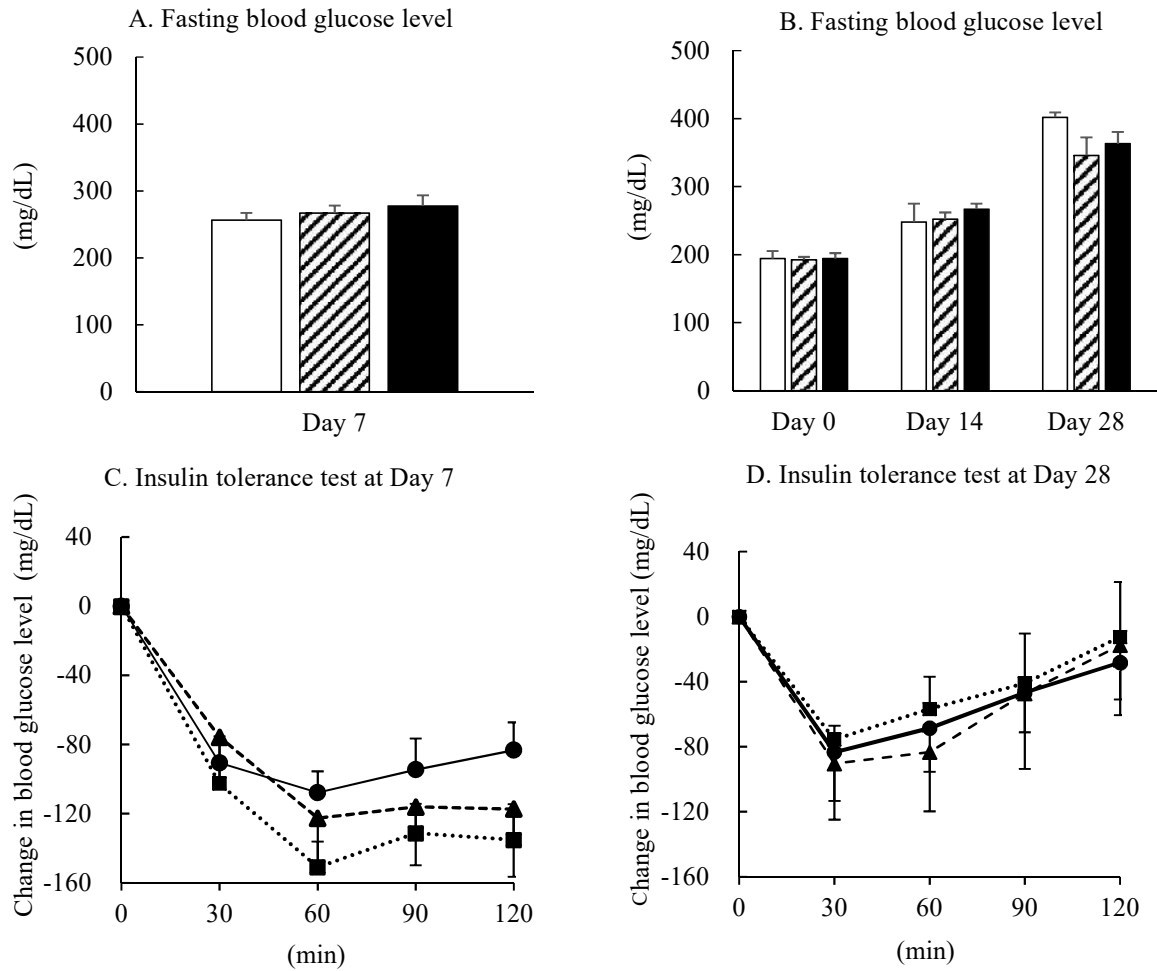


Fig. 4-1. Effect of dietary  $\beta$ -conglycinin on fasting blood glucose level (A and B) and insulin tolerance (C and D) in KK- $A^y$  mice.

At Day 7 and Day 28, mice were intraperitoneally injected with insulin (1.0 IU/kg body weight) after a 6 h fast. Blood glucose was measured at the intervals indicated over 2h.

Values are expressed as mean  $\pm$  SE of 6 mice.

Open bar, casein group; hatched bar, soy protein group; solid bar,  $\beta$ -conglycinin group.

●, casein group; ▲, soy protein group; and ■,  $\beta$ -conglycinin group.



**【体重、摂食量および各臓器重量】**

*Exp. I (1-week study)*

摂食量および終体重に各群間で差は認められなかった (Table 4-3)。体重 100g あたりの腸間膜脂肪組織重量は、CAS 群に比べ SOY 群で低い傾向を示し、 $\beta$ -CON 群で有意に低かった。褐色脂肪組織重量、肝臓重量は各群間で違いは認められなかった。

*Exp. II (4-week study)*

摂食量および終体重に各群間で差は認められなかった (Table 4-3)。体重 100g あたりの腸間膜脂肪組織重量、褐色脂肪組織重量および肝臓重量は Exp.Iと同様の結果であった。

Table 4-3. Effect of dietary  $\beta$ -conglycinin on growth parameters and tissue weights in KK-A<sup>y</sup> mice.

	Groups		
	CAS	SOY	$\beta$ -CON
<i>Exp. I (1-week study)</i>			
Body weight (g)			
Initial	26.4 $\pm$ 0.5	26.5 $\pm$ 0.5	26.4 $\pm$ 0.5
Final	32.7 $\pm$ 0.6	31.2 $\pm$ 0.9	31.2 $\pm$ 0.9
Food intake (g/day)	4.48 $\pm$ 0.11	4.33 $\pm$ 0.12	4.15 $\pm$ 0.24
Food efficiency (g gain/g diet)	0.118 $\pm$ 0.013	0.116 $\pm$ 0.010	0.094 $\pm$ 0.011
Relative tissue weights (g/100g body weight)			
Liver	5.28 $\pm$ 0.18	5.30 $\pm$ 0.09	5.32 $\pm$ 0.27
Epididymal adipose tissue	3.30 $\pm$ 0.12	3.32 $\pm$ 0.17	3.03 $\pm$ 0.27
Perirenal adipose tissue	1.16 $\pm$ 0.07	1.20 $\pm$ 0.06	1.09 $\pm$ 0.09
Mesenteric adipose tissue	1.75 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	1.59 $\pm$ 0.12 <sup>ab</sup>	1.32 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>
Interscapular brown adipose tissue	0.667 $\pm$ 0.051	0.669 $\pm$ 0.058	0.634 $\pm$ 0.057
<i>Exp. II (4-week study)</i>			
Body weight (g)			
Initial	23.3 $\pm$ 0.3	23.0 $\pm$ 0.4	23.1 $\pm$ 0.5
Final	38.8 $\pm$ 1.0	37.1 $\pm$ 1.1	37.6 $\pm$ 1.0
Food intake (g/day)	4.85 $\pm$ 0.19	4.53 $\pm$ 0.13	4.86 $\pm$ 0.17
Food efficiency (g gain/g diet)	0.095 $\pm$ 0.007	0.090 $\pm$ 0.006	0.087 $\pm$ 0.008
Relative tissue weights (g/100g body weight)			
Liver	4.94 $\pm$ 0.15	4.90 $\pm$ 0.05	5.29 $\pm$ 0.14
Epididymal adipose tissue	4.44 $\pm$ 0.28	4.52 $\pm$ 0.14	4.39 $\pm$ 0.14
Perirenal adipose tissue	1.71 $\pm$ 0.07	1.78 $\pm$ 0.19	1.80 $\pm$ 0.05
Mesenteric adipose tissue	2.39 $\pm$ 0.19 <sup>a</sup>	2.04 $\pm$ 0.12 <sup>ab</sup>	1.90 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>
Interscapular brown adipose tissue	0.678 $\pm$ 0.082	0.853 $\pm$ 0.056	0.707 $\pm$ 0.072

CAS, casein; SOY, soy protein isolate;  $\beta$ -CON,  $\beta$ -conglycinin.

Values are expressed as mean  $\pm$  SE of 6 mice.

Values without sharing a common superscript letter are significantly different at  $p < 0.05$ .

## 【血清分析】

### *Exp. I (1-week study)*

血清コレステロール濃度、トリグリセリド濃度およびリン脂質濃度に各群間で差はなかった (Table 4-4)。血清遊離脂肪酸濃度は有意差はなかったものの、CAS 群に比べやや SOY 群で低く、 $\beta$ -CON 群でさらに低い値を示した。血清グルコース濃度は有意差はなかったものの、CAS 群および SOY 群に比べ  $\beta$ -CON 群で低い傾向を示した。血清インスリン濃度は、CAS 群に比べ SOY 群で低い傾向にあり、 $\beta$ -CON 群でさらに低い傾向を示した ( $p=0.057$ )。インスリン抵抗性指標 (Matthews *et al.*, 1985) も有意差はなかったが、CAS 群に比べ SOY 群で同程度、 $\beta$ -CON 群で低い傾向を示した ( $p=0.100$ )。血清レプチン濃度は、CAS 群および SOY 群に比べ、 $\beta$ -CON 群で低い傾向を示した。血清アディポネクチン濃度は、統計的に有意ではなかったものの CAS 群に比べ SOY 群でやや高い傾向にあり、 $\beta$ -CON 群で高い傾向を示した。

### *Exp. II (4-week study)*

血清トリグリセリド濃度は Exp. I に比べ Exp. II では各群とも値が高く、さらに CAS 群に比べ SOY 群および  $\beta$ -CON 群で高い傾向が認められた (Table 4-4)。血清リン脂質濃度は、CAS 群および SOY 群に比べ  $\beta$ -CON 群で高くなる傾向にあった。血清遊離脂肪酸濃度は、統計的に有意ではなかったものの CAS 群に比べ SOY 群でやや低く、 $\beta$ -CON 群で低い傾向にあった。血清グルコース濃度は、Exp. I に比べ Exp. II で高く、糖尿病の進行に伴って血清グルコース濃度は上昇したが、各群間の違いは認められなかった。血清インスリン濃度は、Exp. I と比

べ Exp. IIでは 7~8 倍高い値を示し、CAS 群に比べ SOY 群でやや低く、 $\beta$ -CON 群で有意に低い値を示した。インスリン抵抗性指標は、Exp. Iに比べ Exp. IIで 14~17 倍高い値を示したが Exp. IIでは、CAS 群に比べ SOY 群で同程度、 $\beta$ -CON 群で有意に低かった ( $p=0.021$ )。血清レプチン濃度は各群間で違いはなかった。血清アディポネクチン濃度は、CAS 群に比べ SOY 群で高い傾向を示し、 $\beta$ -CON 群では有意に高かった。

Table 4-4. Effect of dietary  $\beta$ -conglycinin on serum concentrations of lipids, glucose and hormones in KK-A<sup>y</sup> mice.

	Groups		
	CAS	SOY	$\beta$ -CON
<i>Exp. I (1-week study)</i>			
Total cholesterol (mg/dL)	84.8 $\pm$ 2.9	84.2 $\pm$ 5.0	77.2 $\pm$ 3.4
Triglyceride (mg/dL)	109 $\pm$ 18	118 $\pm$ 18	105 $\pm$ 14
Phospholipid (mg/dL)	147 $\pm$ 3	156 $\pm$ 6	139 $\pm$ 6
Free fatty acid (mmol/mL)	0.384 $\pm$ 0.028	0.324 $\pm$ 0.060	0.270 $\pm$ 0.046
Glucose (mg/dL)	330 $\pm$ 14	337 $\pm$ 20	293 $\pm$ 16
Insulin (ng/mL)	3.51 $\pm$ 0.76	3.30 $\pm$ 0.78	1.78 $\pm$ 0.38
Index of insulin resistance	2.85 $\pm$ 0.59	2.79 $\pm$ 0.72	1.23 $\pm$ 0.18
Leptin (ng/mL)	45.8 $\pm$ 3.0	48.3 $\pm$ 2.0	39.6 $\pm$ 1.6
Adiponectin ( $\mu$ g/mL)	11.5 $\pm$ 1.5	13.8 $\pm$ 1.2	15.1 $\pm$ 1.2
<i>Exp. II (4-week study)</i>			
Total cholesterol (mg/dL)	104 $\pm$ 5	106 $\pm$ 4	111 $\pm$ 2
Triglyceride (mg/dL)	128 $\pm$ 17	164 $\pm$ 19	182 $\pm$ 14
Phospholipid (mg/dL)	179 $\pm$ 10	197 $\pm$ 9	240 $\pm$ 15
Free fatty acid (mmol/mL)	1.06 $\pm$ 0.03	0.94 $\pm$ 0.05	0.88 $\pm$ 0.03
Glucose (mg/dL)	563 $\pm$ 30	574 $\pm$ 39	540 $\pm$ 23
Insulin (ng/mL)	29.5 $\pm$ 6.7 <sup>a</sup>	25.5 $\pm$ 7.2 <sup>a</sup>	13.2 $\pm$ 4.4 <sup>b</sup>
Index of insulin resistance	40.2 $\pm$ 8.4 <sup>a</sup>	36.4 $\pm$ 10.6 <sup>a</sup>	18.3 $\pm$ 6.3 <sup>b</sup>
Leptin (ng/mL)	48.7 $\pm$ 3.6	48.3 $\pm$ 3.2	46.6 $\pm$ 2.6
Adiponectin ( $\mu$ g/mL)	9.69 $\pm$ 0.83 <sup>a</sup>	10.7 $\pm$ 0.6 <sup>ab</sup>	13.7 $\pm$ 0.9 <sup>b</sup>

CAS, casein; SOY, soy protein isolate;  $\beta$ -CON,  $\beta$ -conglycinin.

Index of insulin resistance = serum glucose (mg/dL)  $\times$  serum insulin (ng/mL) / 405.

Values are expressed as mean  $\pm$  SE of 6 mice.

Values without sharing a common superscript letter are significantly different at  $p < 0.05$ .

## 【肝臓脂質濃度】

### *Exp. I (1-week study)*

肝臓トリグリセリド濃度は、CAS 群および SOY 群に比べ  $\beta$ -CON 群で有意に低かった (Table 4-5)。肝臓コレステロール濃度も CAS 群に比べ SOY 群および  $\beta$ -CON 群で有意に低かった。リン脂質濃度は、各群間で差はみられなかった。

### *Exp. II (4-week study)*

肝臓トリグリセリド濃度は、統計的に有意ではなかったものの CAS 群に比べ SOY 群および  $\beta$ -CON 群で低い傾向がみられた (Table 4-5)。肝臓コレステロール濃度は、CAS 群に比べ SOY 群で有意に低く、 $\beta$ -CON 群では有意差はないものの低い傾向がみられた。リン脂質濃度は、各群間で差はみられなかった。

Table 4-5. Effect of dietary  $\beta$ -conglycinin on hepatic lipid concentrations in KK-A<sup>y</sup> mice.

	Groups		
	CAS	SOY	$\beta$ -CON
<i>Exp. I (1-week study)</i>			
Triglyceride (mg/g liver)	29.8 $\pm$ 3.0	29.5 $\pm$ 3.3	19.6 $\pm$ 2.0
Cholesterol (mg/g liver)	4.25 $\pm$ 0.31 <sup>a</sup>	3.99 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>	2.66 $\pm$ 0.11 <sup>b</sup>
Phospholipid (mg/g liver)	24.3 $\pm$ 1.0	18.0 $\pm$ 0.0	22.4 $\pm$ 0.9
<i>Exp. II (4-week study)</i>			
Triglyceride (mg/g liver)	32.8 $\pm$ 5.1	24.7 $\pm$ 2.6	24.7 $\pm$ 3.2
Cholesterol (mg/g liver)	4.62 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup>	3.43 $\pm$ 0.14 <sup>b</sup>	4.15 $\pm$ 0.1 <sup>ab</sup>
Phospholipid (mg/g liver)	25.1 $\pm$ 0.8	25.6 $\pm$ 0.9	25.3 $\pm$ 0.4

CAS, casein; SOY, soy protein isolate;  $\beta$ -CON,  $\beta$ -conglycinin.

Values are expressed as mean  $\pm$  SE of 6 mice.

Values without sharing a common superscript letter are significantly different at  $p < 0.05$ .

## 【酵素活性】

### *Exp. I (1-week study)*

肝臓サイトソールの FAS 活性は、統計的に有意ではなかったものの CAS 群に比べ  $\beta$ -CON 群で低い傾向にあった (Table 4-6)。Malic enzyme 活性は CAS 群と SOY 群は同程度、 $\beta$ -CON 群でやや低い傾向であった。肝臓サイトソールの G6PDH 活性、肝臓ミクロソーム PAP 活性は各群間で差はなかった。肝臓ミトコンドリア CPT 活性は、CAS 群に比べ  $\beta$ -CON 群で高い傾向が認められた。肝臓ペルオキシソームの ACO 活性は、CAS 群に比べ SOY 群さらには  $\beta$ -CON 群で高くなる傾向を示した。褐色脂肪組織の CPT 活性は、CAS 群および SOY 群に比べ、 $\beta$ -CON 群で高い傾向を示した。

### *Exp. II (4-week study)*

肝臓サイトソールの FAS 活性は Exp. I に比べ Exp. II では低値を示した。群間で有意差は認められなかったものの、CAS 群に比べ SOY 群でやや低い傾向、 $\beta$ -CON 群で同程度であった (Table 4-6)。FAS 活性と同様、Malic enzyme および G6PDH 活性も Exp. I に比べ Exp. II で低値を示した。Malic enzyme 活性および G6PDH 活性は CAS 群に比べ SOY 群および  $\beta$ -CON 群で低下傾向を示した。肝臓ミクロソーム PAP 活性および肝臓ミトコンドリア CPT 活性に各群間で差は認められなかった。肝臓ペルオキシソーム ACO 活性は、CAS 群に比べ SOY 群で高い傾向にあり、 $\beta$ -CON 群で高い値を示した。褐色脂肪組織の CPT 活性は、CAS 群および SOY 群に比べ、 $\beta$ -CON 群で高い傾向を示した。



Table 4-6. Effect of dietary  $\beta$ -conglycinin on enzyme activities in liver and brown adipose tissue in KK-A<sup>y</sup> mice.

	Groups		
	CAS	SOY	$\beta$ -CON
	(nmol/min/mg protein)		
<i>Exp. I (1-week study)</i>			
Liver			
Cytosolic FAS	25.2 $\pm$ 1.8	22.2 $\pm$ 1.8	19.0 $\pm$ 1.7
Cytosolic malic enzyme	75.4 $\pm$ 2.5	72.1 $\pm$ 6.8	62.1 $\pm$ 6.4
Cytosolic G6PDH	4.90 $\pm$ 0.22	4.47 $\pm$ 0.25	4.75 $\pm$ 0.33
Microsomal PAP	14.0 $\pm$ 0.9	16.3 $\pm$ 0.8	16.2 $\pm$ 2.4
Mitochondrial CPT	11.8 $\pm$ 1.2	13.0 $\pm$ 0.3	16.5 $\pm$ 2.3
Peroxisomal ACO	11.9 $\pm$ 0.5	12.6 $\pm$ 0.6	13.1 $\pm$ 0.7
Brown adipose tissue CPT	33.2 $\pm$ 2.5	33.4 $\pm$ 1.5	38.5 $\pm$ 1.7
<i>Exp. II (4-week study)</i>			
Liver			
Cytosolic FAS	12.8 $\pm$ 0.5	10.8 $\pm$ 0.9	13.8 $\pm$ 1.1
Cytosolic malic enzyme	56.1 $\pm$ 2.7	53.9 $\pm$ 4.1	48.5 $\pm$ 1.8
Cytosolic G6PDH	3.91 $\pm$ 0.17	3.55 $\pm$ 0.50	3.17 $\pm$ 0.18
Microsomal PAP	4.87 $\pm$ 0.47	4.79 $\pm$ 1.03	4.87 $\pm$ 0.75
Mitochondrial CPT	10.6 $\pm$ 0.7	11.3 $\pm$ 0.5	11.7 $\pm$ 0.7
Peroxisomal ACO	7.05 $\pm$ 0.84 <sup>a</sup>	7.73 $\pm$ 0.47 <sup>ab</sup>	8.68 $\pm$ 0.5 <sup>b</sup>
Brown adipose tissue CPT	28.6 $\pm$ 2.9	29.4 $\pm$ 1.1	35.1 $\pm$ 2.7

CAS, casein; SOY, soy protein isolate;  $\beta$ -CON,  $\beta$ -conglycinin.

FAS, fatty acid synthase; G6PDH, glucose 6 phosphate dehydrogenase; PAP, phosphatidate phosphohydrolase; CPT, carnitine palmitoyltransferase; ACO, acyl CoA oxidase.

Values are expressed as mean  $\pm$  SE of 6 mice.

Values without sharing a common superscript letter are significantly different at  $p < 0.05$ .

## 【肝臓における遺伝子発現】

### *Exp. I (1-week study)*

*Adipor2* の発現は CAS 群に比べ SOY 群は差はなかったが、 $\beta$ -CON 群では有意に高かった (Fig. 4-2A)。*Fasn* の発現は CAS 群および SOY 群では差はなかったが、 $\beta$ -CON 群では低い傾向であった。*Srebp1c* の発現は、CAS 群に比べ SOY 群および  $\beta$ -CON 群で有意に低い値を示した。*Irs2* の発現は CAS 群に比べ  $\beta$ -CON 群で有意に高い値を示した。*Cpt1* の発現は CAS 群および SOY 群は差はなかったが、 $\beta$ -CON 群で有意に高かった。*Ppara* の発現は CAS 群に比べ SOY 群はほぼ同レベルであったが、統計的に有意ではなかったものの  $\beta$ -CON 群で高い傾向を示した。

### *Exp. II (4-week study)*

*Adipor2* の発現は CAS 群、SOY 群に比し、 $\beta$ -CON 群では高い傾向を示した (Fig.4-2B)。*Fasn* の発現、*Srebp1c* の発現は、有意差はみられないものの CAS 群に比べ SOY 群、 $\beta$ -CON 群と低下傾向を示した ( $p=0.11$ )。*Irs2* の発現は統計的に有意差ではなかったものの、CAS 群に比べ SOY 群および  $\beta$ -CON 群でやや高い傾向を示した。*Cpt1* の発現は統計的に有意ではなかったものの、CAS 群および SOY 群に比べ  $\beta$ -CON 群でやや高い傾向を示した。*Ppara* の発現は統計的に有意ではなかったものの、CAS 群に比べ SOY 群および  $\beta$ -CON 群で高い傾向を示した。

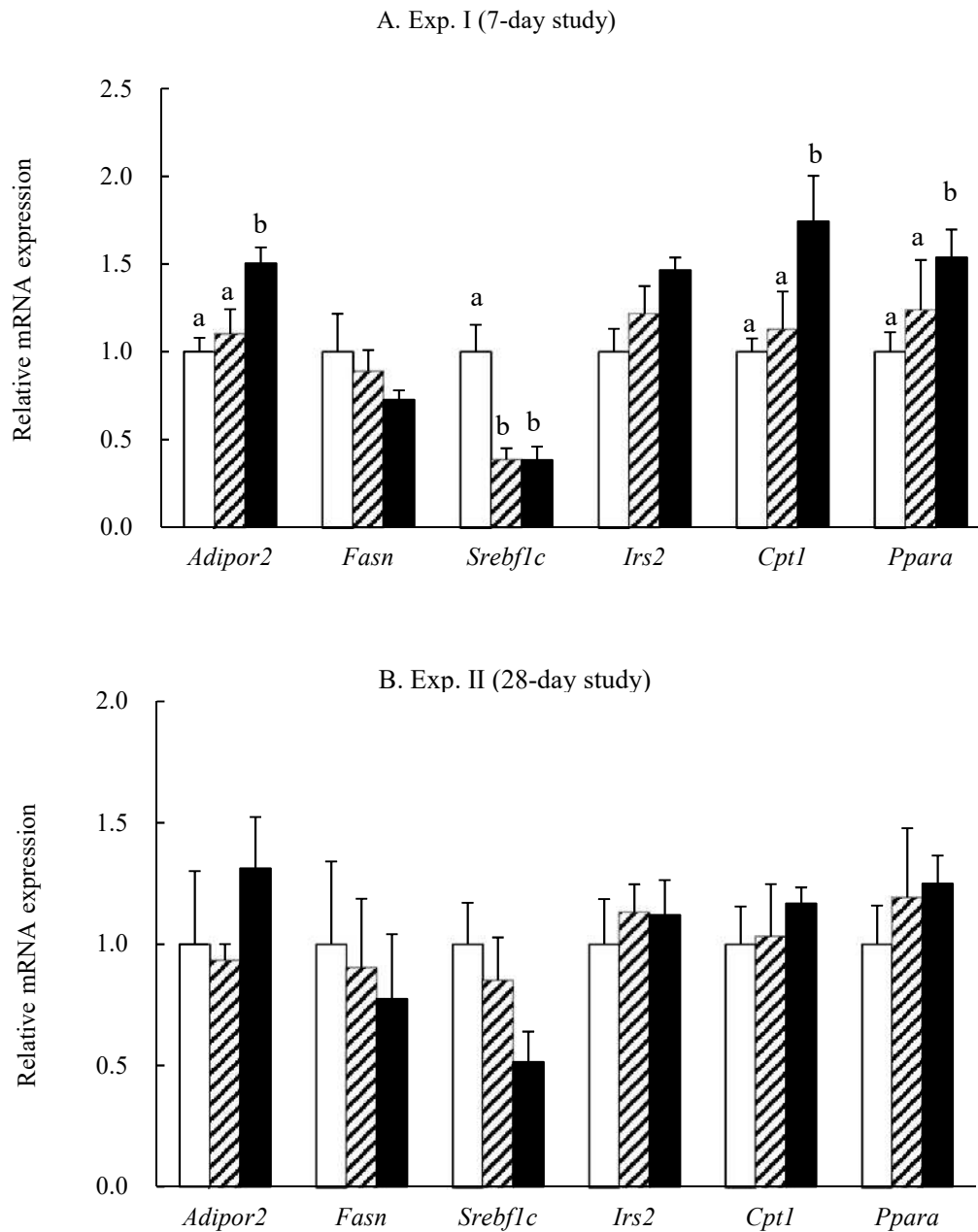


Fig. 4-2. Effect of dietary  $\beta$ -conglycinin on hepatic gene expressions in KK- $A^y$  mice.

Values are expressed as mean  $\pm$  SE of 6 mice.

Values without sharing a common letter are significantly different at  $p < 0.05$ .

*Adipor2*, adiponectin receptor 2; *Fasn*, fatty acid synthase; *Srebp1c*, sterol regulatory element-binding protein 1c; *Irs2*, insulin receptor substrate 2; *Cpt1*, Carnitine palmitoyltransferase 1; *Ppara*; peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ .

Open bar, casein group; hatched bar, soy protein group; solid bar,  $\beta$ -conglycinin group.

## 【腓腹筋における遺伝子発現】

### *Exp. I (1-week study)*

筋肉での主要なアディポネクチン受容体をコードする遺伝子 *Adipor1* の発現、インスリン受容体基質をコードする遺伝子 *Irs1* の発現、*Slc2a4* の発現およびエネルギー代謝の転写因子をコードする遺伝子 *Pparg1a* の発現は CAS 群に比べ SOY 群さらには  $\beta$ -CON 群で高い傾向を示した (Fig. 4-3A)。 *Cpt1b* の発現は CAS 群、SOY 群に比べ  $\beta$ -CON 群で有意に高値を示した。

### *Exp. II (4-week study)*

*Adipor1* の発現は、CAS 群に比べ  $\beta$ -CON 群のみでわずかに高い傾向を示した (Fig. 4-3B)。 *Irs1* の発現は群間で差はなかった。 *Slc2a4* の発現は CAS 群および SOY 群で同レベルで、 $\beta$ -CON 群でやや高い傾向を示した。 *Pparg1a* の発現および *Cpt1b* の発現は CAS 群に比べ SOY 群および  $\beta$ -CON 群で高い傾向を示した。

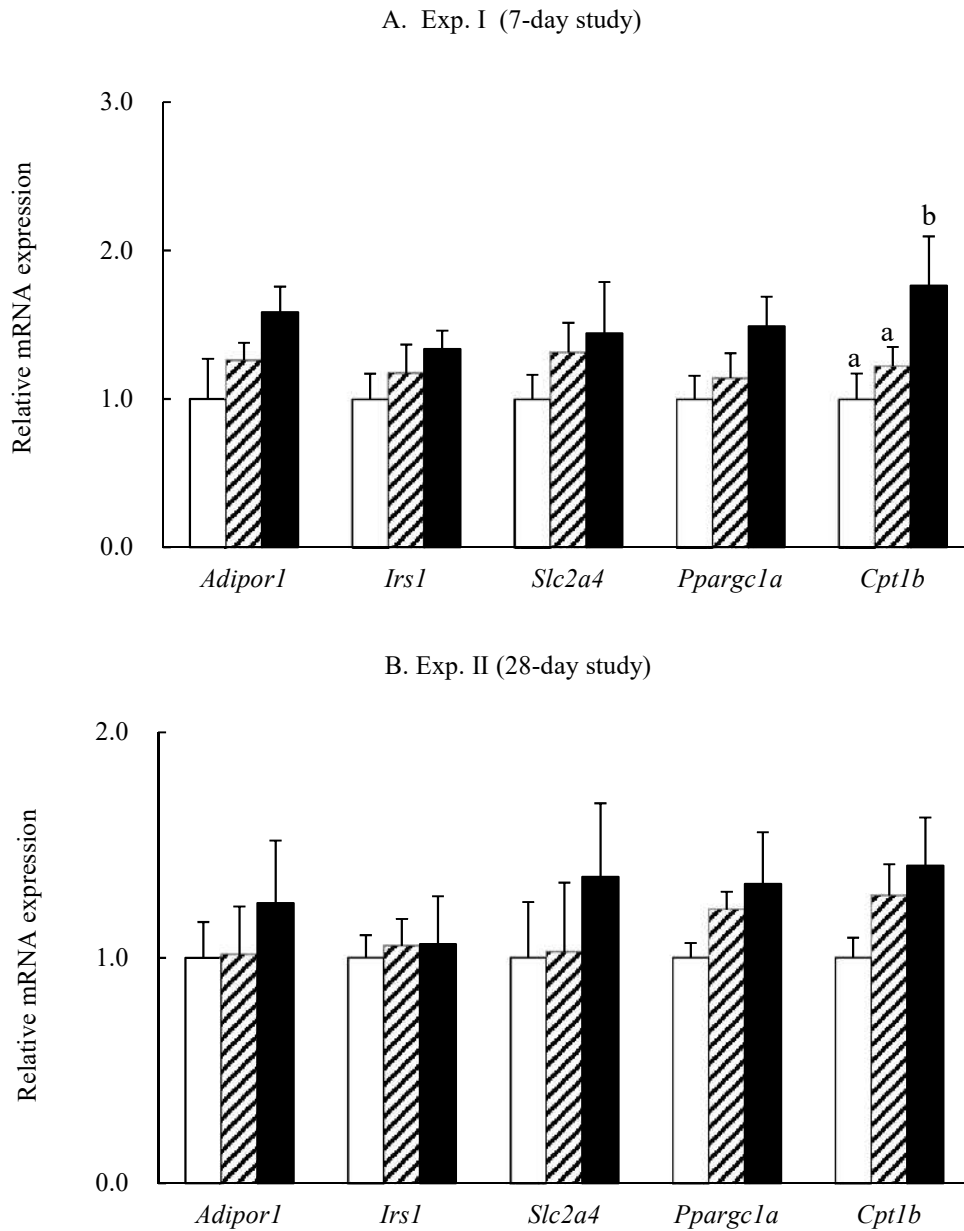


Fig 4-3. Effect of dietary  $\beta$ -conglycinin on gene expressions in gastrocnemius muscle in KK- $A^y$  mice.

Values are expressed as mean  $\pm$  SE of 6 mice.

Values without sharing a common letter are significantly different at  $p < 0.05$ .

*Adipor1*, adiponectin receptor; *Irs1*, insulin receptor substrate 1; *Pparg1a*, peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$ ; *Slc2a4*, glucose transporter 4; *Cpt1b*, carnitine palmitoyl-acyltransferase 1b.

Open bar, casein group; hatched bar, soy protein group; solid bar,  $\beta$ -conglycinin group

## 【腸間膜脂肪組織における遺伝子発現】

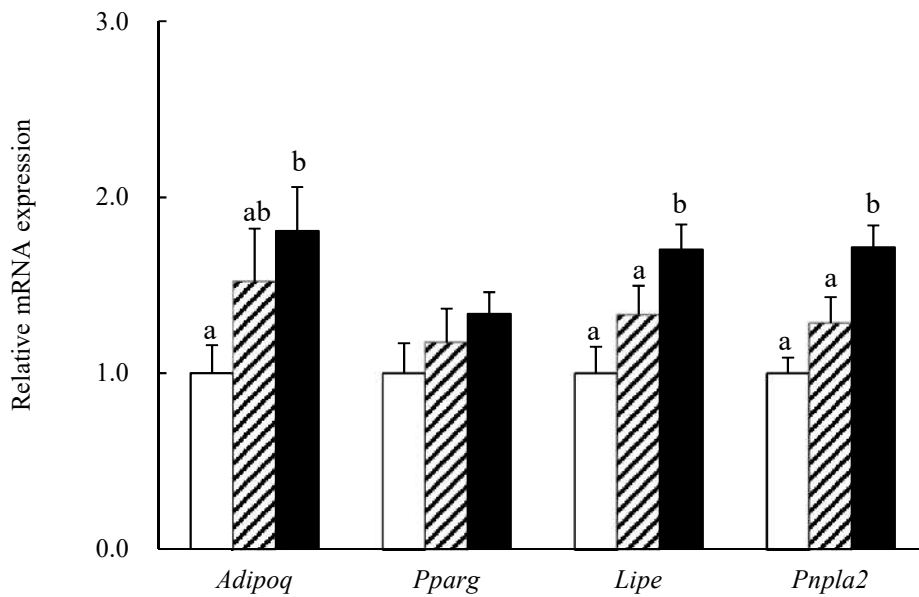
### *Exp. I (1-week study)*

腸間膜脂肪組織における *Adipoq* の発現は CAS 群に比べ SOY 群で高い傾向にあり、 $\beta$ -CON 群では有意に高かった (Fig. 4-4)。 *Pparg* の発現は統計的に有意ではなかったものの、CAS 群に比べ SOY 群ではやや高く、 $\beta$ -CON 群でさらに高い傾向にあった。 *Lipe* および *Pnpla2* の発現は CAS 群に比べ SOY 群でやや高く  $\beta$ -CON 群で有意に高かった。

### *Exp. II (4-week study)*

*Adipoq* の発現は CAS 群に比べ SOY 群で高い傾向、 $\beta$ -CON 群では有意に高かった。 *Pparg* の発現は統計的に有意ではなかったものの、CAS 群に比べ SOY 群ではやや高く、 $\beta$ -CON 群でさらに高い傾向にあった。 *Lipe* の発現は CAS 群に比べ SOY 群でやや高く、 $\beta$ -CON 群は高い傾向を示した ( $p=0.087$ )。 *Pnpla2* の発現は CAS 群に比べ  $\beta$ -CON 群で有意に高い値を示した。

A. Exp. I (7-day study)



B. Exp. II (28-day study)

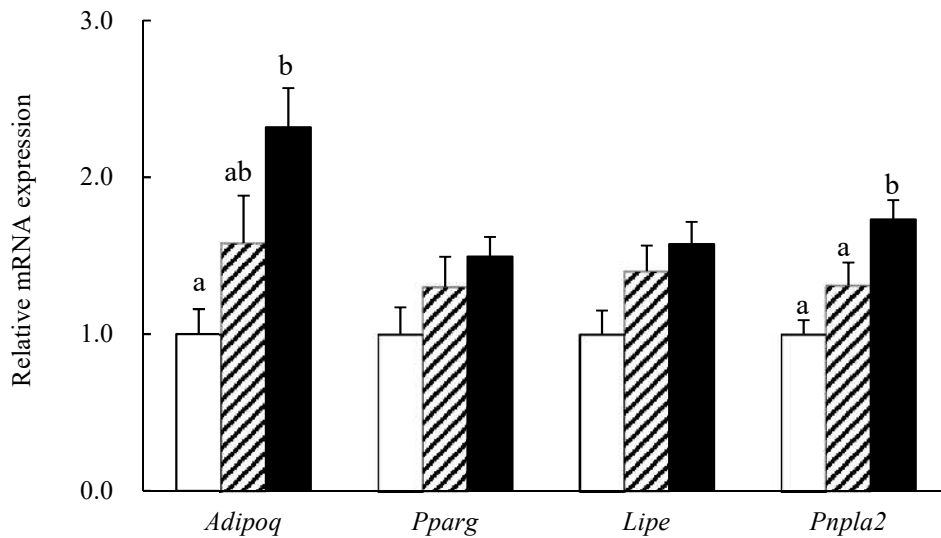


Fig. 4-4. Effect of dietary  $\beta$ -conglycinin on mesenteric adipose gene expressions in KK-A<sup>y</sup> mice.

Values are expressed as mean  $\pm$  SE of 6 mice.

Values without sharing a common letter are significantly different at  $p < 0.05$ .

*Adipoq*, adiponectin; *Pparg*, peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ ; *Lipe*, hormone sensitive lipase, *Pnpla2*, adipose triglyceride lipase.

Open bar, casein group; hatched bar, soy protein group; solid bar,  $\beta$ -conglycinin group.

#### 4-4. 考察

第4章では、2型糖尿病モデル動物である KK-A<sup>y</sup> マウスを用いて、糖尿病の進行程度が異なる2つの条件下で  $\beta$ -CON の摂取がインスリン感受性、血糖値、脂肪組織重量および血清・肝臓脂質濃度にどのように影響するかについて検討した。

Exp. I (1-week study) において、血清グルコース濃度は CAS 群で  $330 \pm 14$  mg/dL、SOY 群で  $337 \pm 20$  mg/dL、 $\beta$ -CON 群で  $293 \pm 16$  mg/dL であり、CAS 群に比べ  $\beta$ -CON 群で低い傾向にあった。血清インスリン濃度は CAS 群で  $3.51 \pm 0.76$  ng/dL、SOY 群で  $3.30 \pm 0.78$  ng/dL、 $\beta$ -CON 群で  $1.78 \pm 0.38$  ng/dL であり、CAS 群に比べ  $\beta$ -CON 群で低い傾向を示した。その結果、インスリン抵抗性指標は CAS 群で  $2.85 \pm 0.59$ 、SOY 群で  $2.79 \pm 0.72$ 、 $\beta$ -CON 群で  $1.23 \pm 0.18$  となり、有意差はないものの CAS 群に比べ  $\beta$ -CON 群で低値であった。糖尿病モデル動物において空腹時血糖値は 300 mg/dL 以上で糖尿病の目安になることから(八木橋ら、2010)、Exp. I では軽微な糖尿病を発症した状態と推察された。

Exp. II (4-week study) において、血清グルコース濃度は CAS 群で  $563 \pm 30$  mg/dL、SOY 群で  $574 \pm 39$  mg/dL、 $\beta$ -CON 群で  $540 \pm 23$  mg/dL であり、血清インスリン濃度は CAS 群で  $29.5 \pm 6.7$  ng/dL、SOY 群で  $25.5 \pm 7.2$  ng/dL、 $\beta$ -CON 群で  $13.2 \pm 4.4$  ng/dL であり、両値は Exp. I と比べ各群とも顕著に高く、高血糖かつ高インスリン血症の状態にあった。インスリン抵抗性指標も CAS 群で  $40.2 \pm 8.4$ 、SOY 群で  $36.4 \pm 10.6$ 、 $\beta$ -CON 群で  $18.3 \pm 6.3$  であり、この値も Exp. II に比べ顕著に高く、インスリン抵抗性をきたしていたと考えられたが、各群間においては



CAS 群および SOY 群に比べ  $\beta$ -CON 群ではインスリン抵抗性指標は有意に低く、インスリン抵抗性の増強程度が低いと考えられた。各群の血清グルコース濃度は 500 mg/dL 以上であり、インスリン抵抗性指標の上昇が認められ、Exp. II の状態は Exp. I よりも糖尿病が進行していると推察された。Exp. I では、インスリン投与後、60、90 および 120 分の血糖値の低下は CAS 群に比べ  $\beta$ -CON 群で大きい傾向がみられた。一方、Exp. II では、インスリン投与後の血糖値の応答に各群間で違いは認められなかった。KK-*A<sup>y</sup>* マウスは、過食により 8 週齢までに高度な肥満、高血糖、高インスリン血症、耐糖能異常を発現することが報告されている (Srinivasan *et al.*, 2007)。本研究において、 $\beta$ -コングリシニンの食餌効果は糖尿病の進行程度で異なっており、糖尿病の進行が軽微な Exp. I の条件のインスリン耐性試験では、 $\beta$ -CON 群ではインスリン投与後の血糖値が低めであり、インスリン抵抗性が低い状態と考えられた。さらに、血清グルコースおよびインスリン濃度およびインスリン抵抗性指標も  $\beta$ -CON 群では低い傾向を示しており、インスリン分泌を増やすことなく血清グルコース濃度を調節したと考えられた。

$\beta$ -コングリシニンの摂取による体脂肪低減作用は本研究においても認められ、Exp. I および Exp. II において、CAS 群に比べ  $\beta$ -CON 群で有意に腸間膜脂肪組織重量は減少した。この作用については第 2 章と同様、 $\beta$ -CON 群では腸管膜脂肪組織の *Lipe* の発現が高値を示しており、白色脂肪組織における脂肪分解を亢進して脂肪細胞の肥大を抑えたものと考えられた。

腓腹筋における *Irs1* の発現は統計的に有意ではないものの、Exp. Iで CAS 群に比べ  $\beta$ -CON 群で高い傾向を示した。しかし、Exp. IIにおいては、腓腹筋での *Irs1* の発現は群間で差はなかった。これまでに、IRS1 および IRS2 欠損マウスにおいて、インスリン負荷試験でインスリンによる血糖値低下作用が減弱することが報告されている (Araki *et al.*, 1994, Withers *et al.*, 1998)。インスリン刺激による糖取り込みにおける主要なシグナル経路は Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Protein kinase B (Akt) 経路である。骨格筋において、インスリンはインスリン受容体に認識されるとチロシン残基がリン酸化されると同時に IRS1 のチロシン残基をリン酸化してシグナルを伝える。リン酸化された IRS1 は PI3K のリン酸化を行い、それに続いて PI3K は Akt のリン酸化を行う。リン酸化された Akt は、骨格筋の細胞内にある GLUT4 を細胞膜へトランスロケーションさせて糖の取り込みを促進すると考えられている (Ducluzeau *et al.*, 2002)。インスリン抵抗性の状態は、インスリンシグナル経路の最も上流にある IRS1 のセリン残基がリン酸化されて、チロシン残基リン酸化が抑制され (Werner *et al.*, 2004)、インスリンシグナル伝達経路に障害をきたすことが報告されている (Wellen *et al.*, 2005)。さらに肥満によりインスリン抵抗性を示す Zucker ラットの骨格筋において、*Irs1* の発現および PI3K の活性が低下していることが報告されている (Anai *et al.*, 1998)。本研究の結果から、Exp.Iでは  $\beta$ -コングリシニン摂取が腓腹筋の *Irs1* の発現の増加させ、インスリンシグナル伝達経路を正常に保つことに寄与した可能性が考えられた。

ラット骨格筋由来の L6 細胞を用いた *in vitro* の実験において、培養液へのアディポネクチンの添加は *Adiopr1* の発現を亢進させ、GLUT4 の細胞膜へのトランスロケーションを引き起こすことによって糖の取り込みを亢進させることが報告されている (Ceddia *et al.*, 2005)。本研究において、*Adiopr1* および *Slc2a4* の発現は Exp. I、Exp. II ともに CAS 群に比べ  $\beta$ -CON 群で高い傾向を示したが、その程度は Exp. Iの方が強かった。この発現の差は糖尿病の進行程度の違いによるインスリン抵抗性の違いによるものと考えられた。

ラットを用いた研究で、 $\beta$ -コングリシニンの摂取は骨格筋において細胞膜への GLUT4 のトランスロケーションを引き起こして、耐糖能改善をすることが報告されている (Tachibana *et al.*, 2014)。以上のことから、 $\beta$ -コングリシニン摂取は骨格筋におけるインスリンシグナル伝達経路の維持、血清アディポネクチン濃度上昇および *Adiopr1* の発現を介した *Slc2a4* の発現の亢進が関与している可能性が示唆された。

Exp. Iおよび Exp. IIにおいて、*Ppargc1a* および *Cpt1b* の発現は CAS 群に比べ  $\beta$ -CON 群で高い傾向を示した。骨格筋における、脂肪の蓄積は IRS1 のセリン残基のリン酸化によるインスリンシグナル伝達の阻害によることが示唆されている (Yu *et al.*, 2002)。骨格筋における *Ppargc1a* の発現の亢進は、*Cpt1* の発現を上方制御して脂肪酸  $\beta$  酸化能を高め (Wende *et al.*, 2007, Song *et al.*, 2004)、*Cpt1* の発現の亢進はトリグリセリドの蓄積を軽減し、IRS1 のセリン残基のリン酸化を阻害することで、インスリン抵抗性を改善することが報告されている (Bruce *et al.*, 2009)。したがって、 $\beta$ -コングリシニンの摂取は、腓腹筋における *Ppargc1a* および *Cpt1b*

の発現の亢進を介して、脂肪酸の $\beta$ 酸化能を高め、インスリン感受性の亢進に寄与することが推察された。

これらのことから、Exp. IIに比べ2型糖尿病の進行が軽微なExp. Iの条件下では、 $\beta$ -コングリシニン摂取はインスリン抵抗性を改善すると考えられた。その一因として血清アディポネクチン濃度の上昇を介した腓腹筋におけるGLUT4のトランスロケーション、インスリンシグナル伝達経路の活性化および糖の取り込み亢進に加え、腓腹筋での脂肪酸の $\beta$ 酸化亢進も関与していることが推察された。

Exp. Iでは肝臓における*Srebp1c*の発現はCAS群に比べ $\beta$ -CON群で有意に低く*Irs2*の発現は、有意に高かった。これまでに肝臓の*Irs2*の発現が低いdb/dbマウスへのアディポネクチンの腹腔内投与は、肝臓での*Irs2*の発現を高め、PI3K-Aktの経路を活性化してインスリン抵抗性を改善することが報告されている(Awazawa *et al.*, 2011)。db/dbマウスを用いた別の研究で、アディポネクチンは*Srebp1c*の発現を抑制することが報告されている(Awazawa *et al.*, 2009)。肝臓において、*Srebp1c*の発現の増加は*Irs2*の発現を抑制し、PI3K-Akt経路を抑制してインスリン感受性を低下させることが示唆されている(Shimomura *et al.*, 2000)。したがってExp. Iにおける $\beta$ -CON群での肝臓*Srebp1c*発現の低下は*Irs2*発現の亢進に寄与すると考えられた。そのため、 $\beta$ -コングリシニン摂取による肝臓でのインスリン感受性の亢進の少なくとも一部は、血清アディポネクチン濃度上昇による肝臓の*Srebp1c*発現の抑制とそれによって誘導される、*Irs2*発現の亢進によるものと考えられた。

本研究において、肝臓トリグリセリド濃度は CAS 群に比べ  $\beta$ -CON 群で低く、この結果は第 2 章の結果と同様であった。また、 $\beta$ -コングリシニン摂取により脂肪酸合成系の遺伝子発現および酵素活性はともに低下し、脂肪酸  $\beta$  酸化系の遺伝子発現および酵素活性は増加しており、 $\beta$ -コングリシニン摂取が肝臓での脂肪酸合成系および脂肪酸  $\beta$  酸化系を遺伝子レベルで制御することを示したこれまでの報告 (Moriyama *et al.*, 2004, Tachibana *et al.*, 2010, Tachibana *et al.*, 2014) と一致した。これらのことから、 $\beta$ -コングリシニン摂取による肝臓トリグリセリド濃度の低下作用には、肝臓での脂肪酸合成の抑制および脂肪酸  $\beta$  酸化の亢進が関与していると考えられた。

以上の結果から 2 型糖尿病モデル動物である KK- $A^y$  マウスにおける  $\beta$ -コングリシニン摂取の糖代謝および脂質代謝への影響は、糖尿病の進行程度の違いにより異なることが示唆された。 $\beta$ -コングリシニン摂取は、糖尿病の進行程度にかかわらず、腸間膜脂肪組織重量を低減し、血清アディポネクチン濃度を上昇させインスリン抵抗性の増強を抑制した。そして、糖尿病の進行が軽微な状態においてはインスリン感受性を改善する作用も示唆された。

#### 4-5. 小括

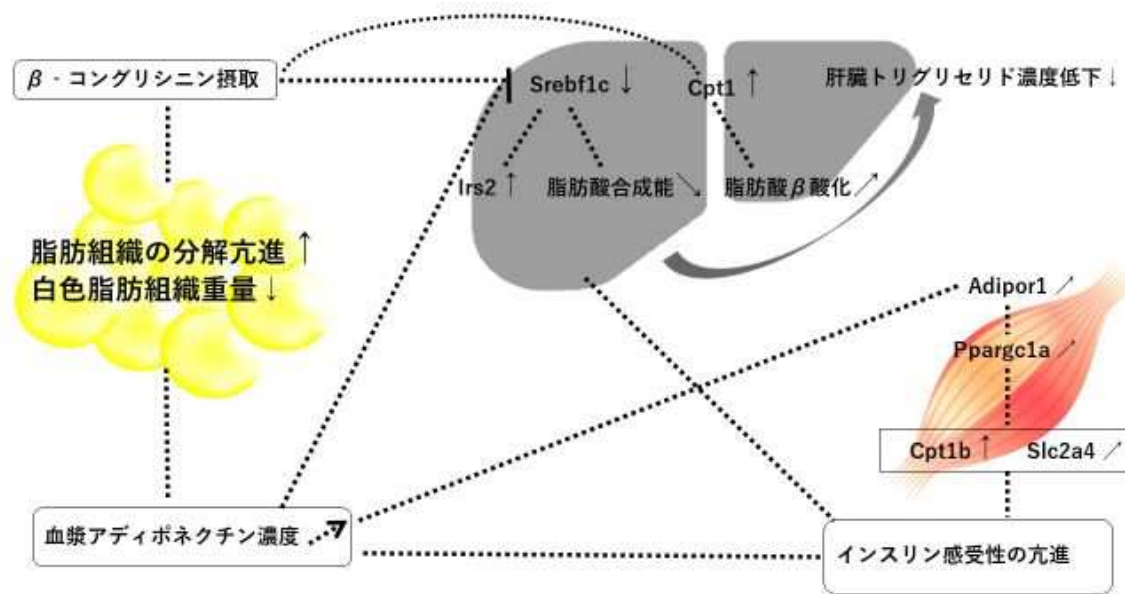
$\beta$ -コングリシニンの摂取は脂質代謝改善作用だけでなくインスリン感受性を維持させた。

2 型糖尿病モデルマウスである KK- $A^y$  マウスに  $\beta$ -コングリシニンを摂取させ、血糖値、インスリン感受性および血清・肝臓脂質の濃度に対してどのように影響するか、糖尿病の進行程度

が異なる2つの摂食期間で検討した。Exp. IIと比べ糖尿病の進行程度が軽微な状態の Exp. IIにおいて  $\beta$ -コングリシニン摂取は、体脂肪低減作用および血清アディポネクチン濃度上昇作用を示した。また、インスリン耐性試験の結果からインスリン感受性を高める可能性が示唆された。その作用には少なくとも肝臓での *Irs2* および筋肉での *Irs1*、*Adipor1* および *Slc2a4* の発現の亢進が関わる可能性が考えられた。

一方、糖尿病が進行した状態の Exp. IIにおいて、 $\beta$ -コングリシニンの摂取は体脂肪低減作用および血清アディポネクチン濃度上昇作用、インスリン抵抗性の進行抑制作用を示したものの、インスリン耐性試験において、血糖値に差がなくインスリン感受性の改善作用は示さなかった。その一因として、Exp. Iで認められた  $\beta$ -コングリシニン摂取による肝臓での *Irs2* および筋肉での *Irs1* の発現が Exp. IIでは減弱し、インスリンによるシグナル伝達経路が抑制されることが考えられた。

第4章で認められたβ-コングリシニンの効果



## 第 5 章

### $\beta$ -コングリシニン摂取が本態性高血圧モデルラットの血圧に及ぼす影響

#### 5-1. 緒言

$\beta$ -コングリシニン摂取により血中アディポネクチン濃度が高くなることを、第 2 章、第 3 章および第 4 章で繰り返し観察した。これまでの研究で、アディポネクチンは脂質代謝および糖代謝だけでなく、血管拡張作用を有する一酸化窒素の血中濃度を上昇させ、血圧調節にも影響する可能性が示唆されている(Ouchi *et al.*, 2003; Ohashi *et al.*, 2006)。このことから、 $\beta$ -コングリシニン摂取は血中アディポネクチン濃度の上昇を介して血圧上昇抑制作用を示す可能性が考えられた。そこで、第 5 章では、本態性高血圧のモデルラットを用いて、 $\beta$ -コングリシニンの摂取が血圧にどのように影響するかについて検討した。

#### 5-2. 実験方法

##### 【飼育条件】

AIN-93G 組成(Reeves *et al.*, 1993)に準拠し、第 2 章と同様の実験食を調製した。飼育環境は、22~23°C、湿度 50~60%、12 時間の明暗サイクル(8:00~20:00 点灯)とした。

実験動物として 5 週齢の雄性高血圧自然発症ラット(SHR/Izm; 日本エスエルシー(株))を用いた。この動物は、高血圧系統ラット同士を掛け合わせるにより作出された動物種で、塩分の摂取に関係なく高血圧を発症するため、本態性高血圧のモデル動物として使用される



(Okamoto *et al.*, 1963)。市販固形飼料(Type NMF、オリエンタル酵母(株))による 6 日間の予備飼育を行った後、食餌タンパク質の違いにより 1 群 6 匹として 3 群に分け、それぞれの実験食を 6 週間自由摂食させた。

摂食開始 0、2、4 および 6 週目 (6、8、10 および 12 週齢時) にテールカフ法により収縮期および拡張期血圧を測定した (MK-2000、室町機械(株)、東京)。飼育期間終了後、ラットを 6 時間絶食させ、イソフルランおよびペントバルビタール併用麻酔下で腹部大動脈より採血した。採血には、3.8%クエン酸三ナトリウム水溶液 (0.1 mM インドメタシン含有) を 1 mL 添加したシリンジを用いた。また、肝臓、腎臓、白色脂肪組織 (腎臓周辺、睪丸周辺および腸間膜) および肩甲間褐色脂肪組織を摘出し、それぞれ重量を測定し、液体窒素で瞬間凍結後、 $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。

なお、本実験は「長崎県立大学動物実験委員会」に基づく審査を受け、承認された上で、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準 (平成 18 年 6 月 1 日環境省告示第 88 号)」に則して実施した。

#### 【血漿分析】

アンジオテンシン変換酵素 (ACE) 活性およびプロスタグランジン  $\text{E}_2$  ( $\text{PGE}_2$ ) 濃度は、市販のキットを用いて測定した (ACE カラー、富士レビオ(株)、東京;  $\text{PGE}_2$  EIA monoclonal kit, Cayman Chemical Company, Ann Arbor MI, USA)。生体内で産生された nitric oxide (NO)

量を評価するため、血液中に存在する NO の安定な代謝産物である NO<sub>2</sub><sup>-</sup> および NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (NO<sub>x</sub>) の濃度を指標として測定した (NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub> Assay Kit-C II (Colorimetric) Griess Reagent Kit、同仁科学研究所、熊本)。

その他の血漿成分分析は、すべて第 2 章の方法に準じて行った。

#### 【肝臓脂質分析】

肝臓の各脂質濃度の測定は第 2 章に準じて行った。

肝臓の総脂質抽出液の一部を薄層プレート (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) にスポットし、石油エーテル/ジエチルエーテル/酢酸 (82:18:1) で展開した後、リン脂質画分を剥ぎ取り、BF<sub>3</sub> メタノール溶液でトランスメチル化し (Carvalho *et al.*, 2005)、その脂肪酸組成をガスクロマトグラフィーにより分析した (使用機器; Shimadzu, GC-2010 Plus、島津製作所、京都)。

#### 【酵素活性測定試料の調製】

試料の調製は第 2 章に準じて行った。

#### 【酵素活性の測定】

各酵素活性の測定は第 2 章に準じて行った。

【肝臓、腎臓および脂肪組織の総 RNA の抽出およびリアルタイム RT-PCR 法による遺伝子発現の解析】

各組織の総 RNA の抽出およびリアルタイム RT-PCR 法による遺伝子発現の解析は、第 2 章に準じて行った。測定に用いたプライマーは Table5-1 に示した。

Table 5-1. Sequence of quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction primers.

Gene	Accession no	Primer sequence
<i>Ang</i>	NM_134432.2	F 5'-CACCTACGTTCACTTCCAAGG-3 R 5'-GTGCTGTTGTCCACCCAGAA-3
<i>Ren</i>	NM_017332.1	F 5'-CGAAGGCTTGAATCCTAACGAA-3 R 5'-GTTGACCTGCAGTCGTTTTGC-3
<i>Adipoq</i>	NM_144744.3	F 5'-AATCCTGCCCAGTCATGAAG-3 R 5'-CATCTCCTGGGTCACCCTTA-3
<i>Pparg</i>	XM_006237009.3	F 5'-CCCTTTACCACGGTTGATTTCTC-3 R 5'-GCAGGCTCTACTTTGATCGCACT-3
<i>Tnfa</i>	NM_012675.3	F 5'-CGTAGCCCACGTCGTAGCAAAC-3 R 5'-ACGTAGTCGGGGCAGCCTTGT-3

【統計処理】

統計処理は第 2 章に準じて行った

### 5-3. 実験結果

#### 【血圧の経時的変化】

CAS 群の収縮期血圧および拡張期血圧は、ともに実験食を摂食開始してから 4 週目にかけて上昇した (Fig. 5-1)。収縮期血圧は、摂食開始 4 週目で CAS 群に比べ SOY 群、 $\beta$ -CON 群で有意に低く、SOY 群と  $\beta$ -CON 群間では有意差はないものの、 $\beta$ -CON 群の方が低かった。この傾向は 6 週目でも同様であった。拡張期血圧も 4 週および 6 週目で CAS 群に比べ、 $\beta$ -CON 群で有意に低い値を示した。

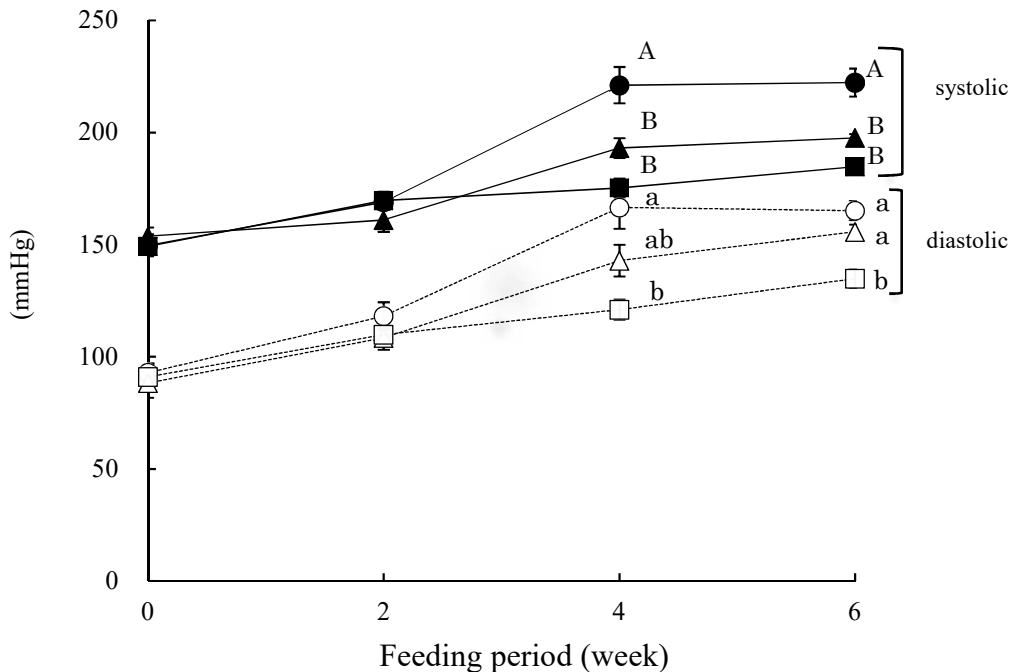


Fig. 5-1. Effect of dietary  $\beta$ -conglycinin on systolic and diastolic blood pressures in SHR.

Values are expressed as mean  $\pm$  SE of 6 rats.

Values without sharing a common letter are significantly different at  $p < 0.05$ .

● and ○, casein group; ▲ and Δ, soy protein group; ■ and □,  $\beta$ -conglycinin group.

【体重、摂食量及び各臓器重量】

終体重、摂食量および食餌効率に各群間で差はみられなかった (Table 5-2)。体重 100g あたりの肝臓および各白色脂肪組織重量は各群間で差はなかった。一方、褐色脂肪組織は CAS 群に比べ  $\beta$ -CON 群では有意に重かった。

Table 5-2. Effect of dietary  $\beta$ -conglycinin on growth parameters and tissue weights in SHR.

	Groups		
	CAS	SOY	$\beta$ -CON
Body weight (g)			
Initial	172 $\pm$ 2	171 $\pm$ 2	172 $\pm$ 4
Final	328 $\pm$ 5	328 $\pm$ 8	337 $\pm$ 6
Food intake (g/day)	19.0 $\pm$ 0.4	19.3 $\pm$ 0.3	19.7 $\pm$ 0.4
Food efficiency (g gain/g diet)	0.179 $\pm$ 0.005	0.177 $\pm$ 0.006	0.182 $\pm$ 0.002
Relative tissue weights (g/100g body weight)			
Liver	3.63 $\pm$ 0.07	3.55 $\pm$ 0.07	3.71 $\pm$ 0.09
Epididymal adipose tissue	1.74 $\pm$ 0.06	1.81 $\pm$ 0.03	1.80 $\pm$ 0.09
Perirenal adipose tissue	1.97 $\pm$ 0.11	2.00 $\pm$ 0.10	2.00 $\pm$ 0.12
Mesenteric adipose tissue	1.21 $\pm$ 0.06	1.21 $\pm$ 0.07	1.24 $\pm$ 0.07
Interscapular brown adipose tissue	0.102 $\pm$ 0.004 <sup>a</sup>	0.110 $\pm$ 0.007 <sup>ab</sup>	0.123 $\pm$ 0.005 <sup>b</sup>

CAS, casein; SOY, soy protein isolate;  $\beta$ -CON,  $\beta$ -conglycinin.

Values are expressed as mean  $\pm$  SE of 6 rats.

Values without sharing a common superscript letter are significantly different at  $p < 0.05$ .

### 【血漿分析】

血漿トリグリセリド濃度は、各群間で差はなかった (Table 5-3)。血漿コレステロール濃度は、CAS 群に比べ SOY 群、 $\beta$ -CON 群で低かった。血漿グルコース濃度および血漿リン脂質濃度は各群間で差は認められなかった。血漿遊離脂肪酸濃度は、CAS 群に比べ SOY 群および  $\beta$ -CON 群で低い傾向にあった。血漿アディポネクチン濃度は CAS 群に比べ SOY 群で高い傾向、 $\beta$ -CON 群で有意に高い値を示した。血漿インスリン濃度および血漿レプチン濃度は CAS 群に比べて SOY 群で同程度、 $\beta$ -CON 群で有意差はないものの低い傾向を示した。血漿 angiotensin converting enzyme (ACE) 活性に各群間で差は認められなかった。血漿 NOx 濃度は、有意差はないものの CAS 群に比べ SOY 群で高い傾向、 $\beta$ -CON 群でさらに高い傾向を示した ( $p=0.056$ )。血漿 PGE<sub>2</sub> 濃度は、各群間で違いはなかった。

### 【肝臓脂質濃度】

肝臓トリグリセリド濃度は CAS 群に比べ SOY 群および  $\beta$ -CON 群で有意に低かった (Table 5-4)。肝臓コレステロール濃度およびリン脂質濃度は各群間で差はなかった。

Table 5-3. Effect of dietary  $\beta$ -conglycinin on plasma lipid concentrations, glucose, hormones and factors influencing blood pressure in SHR.

	Groups		
	CAS	SOY	$\beta$ -CON
Triglyceride (mg/dL)	66.7 $\pm$ 7.2	54.1 $\pm$ 6.5	70.4 $\pm$ 5.8
Total cholesterol (mg/dL)	65.1 $\pm$ 2.0 <sup>a</sup>	57.2 $\pm$ 1.9 <sup>b</sup>	59.1 $\pm$ 1.2 <sup>ab</sup>
Phospholipid (mg/dL)	117 $\pm$ 5	104 $\pm$ 4	116 $\pm$ 3
Free fatty acid (mmol/mL)	1.06 $\pm$ 0.03	0.940 $\pm$ 0.05	0.880 $\pm$ 0.031
Glucose (mg/dL)	172 $\pm$ 10	158 $\pm$ 6	169 $\pm$ 6
Insulin (ng/mL)	3.75 $\pm$ 0.55	4.03 $\pm$ 0.50	2.40 $\pm$ 0.54
Adiponectin ( $\mu$ g/mL)	6.06 $\pm$ 0.33 <sup>a</sup>	6.77 $\pm$ 0.21 <sup>ab</sup>	7.34 $\pm$ 0.36 <sup>b</sup>
Leptin (ng/mL)	6.98 $\pm$ 0.32	6.82 $\pm$ 0.46	6.12 $\pm$ 0.18
ACE (IU/L)	21.7 $\pm$ 0.8	21.5 $\pm$ 0.6	20.8 $\pm$ 0.6
NOx ( $\mu$ mol/L)	5.15 $\pm$ 0.47	5.74 $\pm$ 0.36	6.62 $\pm$ 0.49
PGE <sub>2</sub> (pg/mL)	27.7 $\pm$ 0.8	28.2 $\pm$ 0.7	28.9 $\pm$ 2.0

CAS, casein; SOY, soy protein isolate;  $\beta$ -CON,  $\beta$ -conglycinin.

ACE, angiotensin converting enzyme; NOx, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>+NO<sub>3</sub><sup>-</sup>; PGE<sub>2</sub>, prostaglandin e 2.

Values are expressed as mean  $\pm$  SE of 6 rats.

Values without sharing a common sperscript letter are significantly different at  $p < 0.05$ .

Table 5-4. Effect of dietary  $\beta$ -conglycinin on hepatic lipid concentrations in SHR.

	Groups		
	CAS	SOY	$\beta$ -CON
Triglyceride (mg/g liver)	17.6 $\pm$ 3.0 <sup>a</sup>	10.8 $\pm$ 0.5 <sup>b</sup>	12.6 $\pm$ 0.8 <sup>ab</sup>
Cholesterol (mg/g liver)	3.33 $\pm$ 0.22	3.36 $\pm$ 0.15	3.29 $\pm$ 0.31
Phospholipid (mg/g liver)	30.0 $\pm$ 0.7	28.3 $\pm$ 1.0	27.5 $\pm$ 1.1

CAS, casein; SOY, soy protein isolate;  $\beta$ -CON,  $\beta$ -conglycinin.

Values are expressed as mean  $\pm$  SE of 6 rats.

Values without sharing a common sperscript letter are significantly different at  $p < 0.05$ .

【酵素活性】

肝臓サイトソール画分の FAS 活性は、CAS 群に比べ SOY 群で有意に低く、β-CON 群でも低い傾向がみられた (Table 5-5)。Malic enzyme 活性および G6PDH 活性においても FAS 活性と同様の傾向が認められた。肝臓ミクロソーム画分の PAP 活性は各群間で大きな違いはなかった。肝臓ミトコンドリアの CPT 活性および肝臓ペルオキシソームの ACO 活性は、統計的に有意差ではなかったものの、CAS 群に比べ SOY 群および β-CON 群で高い傾向が認められた。褐色脂肪組織の CPT 活性には、各群間で差はなかった。

Table 5-5. Effect of dietary β-conglycinin on enzyme activities in liver and brown adipose tissue in SHR.

	Groups		
	CAS	SOY	β-CON
Liver	(nmol/min/mg protein)		
Cytosolic FAS	10.0 ± 0.3 <sup>a</sup>	8.17 ± 0.28 <sup>b</sup>	8.77 ± 0.43 <sup>ab</sup>
Cytosolic malic enzyme	31.4 ± 3.2	30.2 ± 1.3	24.7 ± 2.9
Cytosolic G6PDH	45.7 ± 3.9	38.9 ± 1.6	38.6 ± 0.8
Microsomal PAP	4.91 ± 0.50	5.00 ± 0.39	5.43 ± 0.46
Mitochondrial CPT	2.00 ± 0.25	2.50 ± 0.26	2.41 ± 0.20
Peroxisomal ACO	4.41 ± 0.52	5.15 ± 0.85	5.06 ± 1.26
Brown adipose tissue CPT	14.8 ± 0.6	13.8 ± 0.3	15.3 ± 0.5

CAS, casein; SOY, soy protein isolate; β-CON, β-conglycinin.

FAS, fatty acid synthase; G6PDH, glucose-6-phosphate dehydrogenase; PAP, phosphatidate phosphohydrolase; CPT, carnitine palmitoyltransferase; ACO, acyl CoA oxidase.

Values are expressed as mean ± SE of 6 rats.

Values without sharing a common superscript letter are significantly different at  $p < 0.05$ .



【肝臓リン脂質画分の脂肪酸組成】

肝臓リン脂質の 16:0、18:0 および 18:1n-9 の割合は、各群間で差はなかった (Table 5-6)。  
 18:2n-6 の割合は、CAS 群に比べ、 $\beta$ -CON 群では有意に高かった。20:4n-6 の割合は、CAS 群に比べ SOY 群で有意に低かった。 $\beta$ -CON 群でも有意差はないものの SOY 群に比べ低い傾向にあった。リノール酸の不飽和化指標である 20:4n-6/18:2n-6 比は CAS 群に比べ、SOY 群および  $\beta$ -CON 群で有意に低かった。

Table 5-6. Effect of dietary  $\beta$ -conglycinin on fatty acid composition of liver phospholipids in SHR

Fatty acids	Groups		
	CAS	SOY	$\beta$ -CON
	(weight %)		
16:0	17.2 $\pm$ 0.4	19.2 $\pm$ 0.9	18.1 $\pm$ 0.3
16:1n-7	0.5 $\pm$ 0.1	0.5 $\pm$ 0.1	0.5 $\pm$ 0.1
18:0	25.3 $\pm$ 0.3	26.3 $\pm$ 0.3	25.4 $\pm$ 0.4
18:1n-9	2.9 $\pm$ 0.2	2.7 $\pm$ 0.3	2.7 $\pm$ 0.2
18:1n-7	4.1 $\pm$ 0.3	3.3 $\pm$ 0.3	3.9 $\pm$ 0.2
18:2n-6	14.5 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup>	16.0 $\pm$ 0.5 <sup>ab</sup>	16.7 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>
20:4n-6	29.7 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>	27.4 $\pm$ 0.7 <sup>b</sup>	27.6 $\pm$ 0.2 <sup>ab</sup>
20:5n-3	0.7 $\pm$ 0.0	0.7 $\pm$ 0.1	0.8 $\pm$ 0.0
22:5n-3	3.9 $\pm$ 0.2	3.4 $\pm$ 0.2	3.3 $\pm$ 0.1
22:6n-3	4.4 $\pm$ 0.2	5.0 $\pm$ 0.1	5.2 $\pm$ 0.4
20:4n-6/18:2n-6	2.08 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>	1.73 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>	1.66 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>

CAS, casein; SOY, soy protein isolate;  $\beta$ -CON,  $\beta$ -conglycinin.

Values are expressed as mean  $\pm$  SE of 6 rats.

Values without sharing a common superscript letter are significantly different at  $p < 0.05$ .

【肝臓、腎臓および腸間膜脂肪組織における遺伝子発現】

肝臓における *Ang* の発現、腎臓における *Ren* の発現は有意差はないものの CAS 群に比べ SOY 群および  $\beta$ -CON 群で低い傾向が認められた (Fig. 5-2)。

腸間膜脂肪組織における *Adipoq* の発現は CAS 群に比べ SOY 群で高い傾向を示し、 $\beta$ -CON 群で有意に高い値を示した。*Pparg* の発現も CAS 群に比べ SOY 群および  $\beta$ -CON 群でやや高い傾向にあった。*Tnfa* の発現は各群間で違いはなかった。

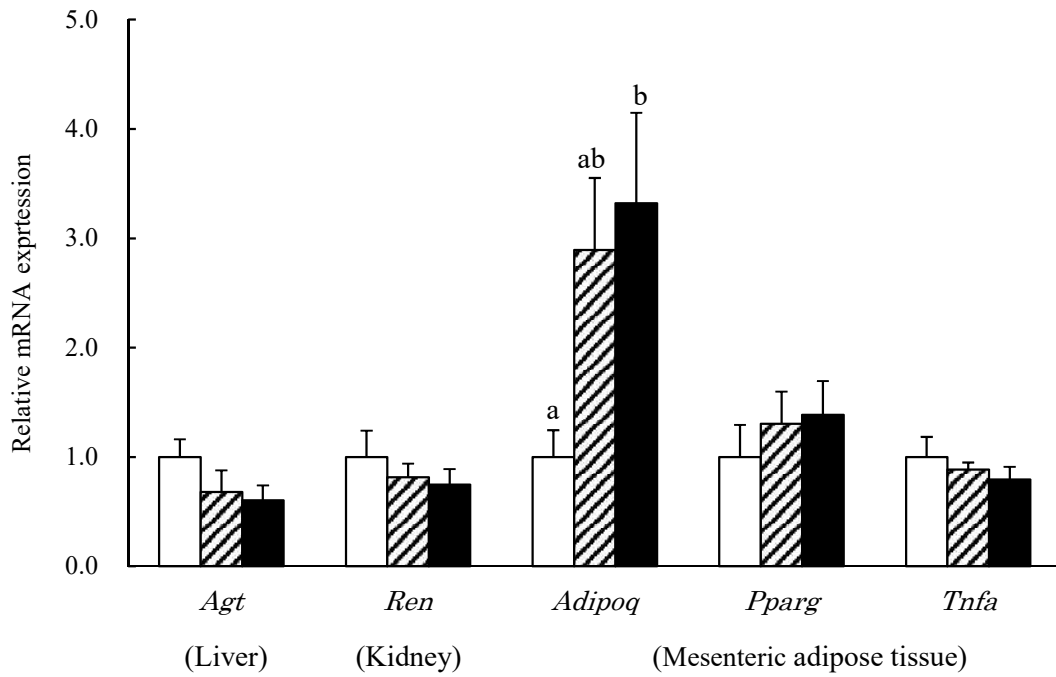


Fig. 5-2. Effect of dietary  $\beta$ -conglycinin on gene expressions in liver, kidney and mesenteric adipose tissue in SHR.

Values are expressed as mean  $\pm$  SE of 6 rats.

Values without sharing a common letter are significantly different at  $p < 0.05$ .

*Agt*, angiotensinogen; *Ren*, renin; *Adipoq*, adiponectin; *Pparg*, peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ ; *Tnfa*, tumor necrosis factor  $\alpha$ .

Open bar, casein group; hatched bar, soy protein group; solid bar,  $\beta$ -conglycinin group.

#### 5-4. 考察

第5章では本態性高血圧モデル動物である高血圧自然発症ラット(SHR/Izm)を用いて血圧に及ぼす $\beta$ -コングリシニン摂取の影響について検討した。本研究において $\beta$ -コングリシニンの摂取は収縮期血圧および拡張期血圧の上昇を抑制する作用を有することが示された。、血漿アディポネクチン濃度は、第2章、第3章および第4章での結果と同様に、SHRにおいてもCAS群に比べ、 $\beta$ -CON群で高値を示した。これまでに、Ouchiらは収縮期血圧と血中アディポネクチン濃度が逆相関することを示しており(Ouchi *et al.*, 2003)、本研究で認められた $\beta$ -コングリシニン摂取によるアディポネクチン濃度上昇と収縮期および拡張期血圧低下の関係はOuchiらの報告と矛盾しなかった。

アディポネクチンは血管拡張作用を有するNOの血中濃度を上昇させ、血圧上昇抑制作用を示すことが示唆されている(Ouchi *et al.*, 2004)。アディポネクチンノックアウトマウスにアディポネクチンを強制発現させた実験では、動脈における*Nos3*およびプロスタグランジン<sub>2</sub>の遺伝子発現量が野生型マウスと同程度まで回復し、高血圧が改善されたことが報告されている(Ohashi *et al.*, 2006)。また、ウシ大動脈内皮細胞を用いた*in vitro*の実験においても、培地へのアディポネクチンの添加により*Nos3*の発現が亢進しeNOS酵素活性が上昇してNO産生が亢進したことが報告されている(Hattori *et al.*, 2003)。そして、Ohashiらはアディポネクチンが血管内皮細胞においてAMPKを活性化し、その下流に位置するPI3Kを活性化してNOの産生を高めるという機序を提唱している(Ouchi *et al.*, 2004)。本研究で、血漿NOx濃

度は統計的に有意ではなかったものの、CAS 群に比べ  $\beta$ -CON 群で高い傾向を示した。したがって、 $\beta$ -コングリシニン摂取による血圧上昇抑制作用の一部は血漿アディポネクチン濃度の上昇およびそれに伴う血漿 NO 濃度上昇に起因すると考えられた。

血圧はさまざまな調節機構によって調節されている。本研究では、アディポネクチン以外にレニン-アンジオテンシン系および血漿プロスタグランジン濃度の関与について検討した。昇圧系の一つであるレニン-アンジオテンシン系においては、肝臓で合成されるアンジオテンシノーゲンは腎臓で合成されるレニンにより触媒されアンジオテンシンIに変換される。続いて、肺から分泌される ACE によりアンジオテンシンIIに変換され、その血管収縮作用により血圧は上昇する。本研究において、肝臓の *Ang* の発現で有意差はなかったものの、CAS 群に比べ  $\beta$ -CON 群で低い傾向を示し、腎臓での *Ren* の発現も同様の傾向を示した。血漿 ACE 活性は各群間で差は認められなかったものの、 $\beta$ -コングリシニンによる血圧上昇抑制作用に、*Ang* および *Ren* の発現の低下傾向が一部関与する可能性が考えられた。

次に、血管拡張作用のある  $\text{PGE}_2$  の関与について検討した。 $\text{PGE}_2$  はアラキドンカスケードを経て生合成される。ホスホリパーゼ  $\text{A}_2$  により細胞膜のリン脂質から遊離したアラキドン酸はシクロオキシゲナーゼにより  $\text{PGG}_2$  に、次いで同じ酵素が持つルオキシダーゼ活性により  $\text{PGH}_2$  に代謝され、さらに  $\text{PGH}_2$  は  $\text{PGE}$  合成酵素により  $\text{PGE}_2$  に代謝される(岳中 1975)。抹消血管拡張作用を有するプロスタグランジンの一つである  $\text{PGE}_2$  の血漿濃度は、本研究において各群

間での違いは認めず、 $\beta$ -コングリシニンの血圧への影響は  $\text{PGE}_2$  を介した作用ではないことが示唆された。

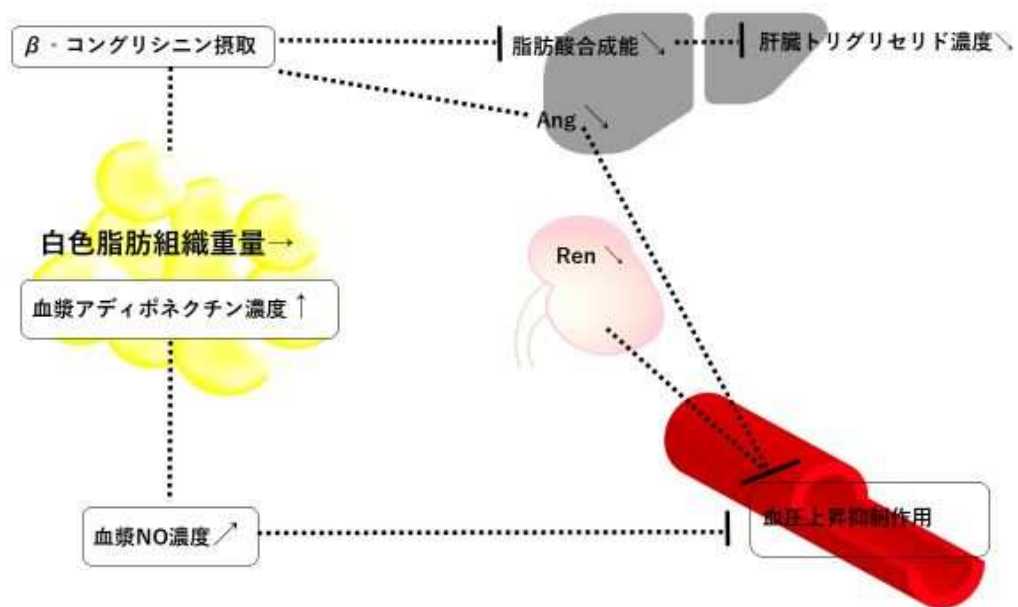
アラキドンカスケードにおける  $\text{PGE}_2$  の前駆体である組織中のアラキドン酸の割合について組織での脂肪酸組成を代表して、肝臓リン脂質の脂肪酸組成を分析した。リノール酸の割合は CAS 群に比べ、 $\beta$ -CON 群で有意に高く、アラキドン酸の割合は 3 群のうち CAS 群が最も高い値を示した。これまでに、大豆タンパク質の摂取は肝臓ミクロソームにおけるリノール酸不飽和化酵素活性を抑制して、肝臓リン脂質のアラキドン酸の割合を増やし、リノール酸の割合を低下させることが報告されている (Huang *et al.*, 1986)。本研究で認められたリノール酸不飽和化指標である 20:4n-6/18:2n-6 の違いは食餌タンパク質の効果によるものと考えられた。これまでに、リノール酸不飽和化酵素の活性の上昇と血圧上昇は正の相関をすることが示唆されている (Daneshmand *et al.*, 2017)。本研究において、CAS 群に比べ SOY および  $\beta$ -CON 群でリノール酸不飽和化指標は有意に低下しており、血漿  $\text{PGE}_2$  濃度も各群間で違いが認められなかったため、アラキドン酸カスケードを介した血圧への影響は事実上ないと考えられた。

#### 5-5 小括

5 週齢の本態性高血圧モデルである高血圧自然発症ラット (SHR/Izm) を用いて、 $\beta$ -コングリシニン摂取の血圧への影響について検討し、 $\beta$ -コングリシニン摂取による収縮期および拡張期血圧の上昇抑制作用を明らかにした。この作用の一部に、 $\beta$ -コングリシニン摂取による血漿

アディポネクチン濃度上昇を介した NO 濃度の上昇およびレニン-アンジオテンシン系を介した血圧調節機構が関与している可能性が考えられた。

第5章で認められたβ-コングリシニンの効果





## 第 6 章

### β-コングリシニン摂取によるメタボリックシンドローム改善作用

#### 6-1. 緒言

第 2 章および第 3 章で β-コングリシニンは肥満モデル動物である OLETF ラットの体脂肪を低減し、肝臓トリグリセリド濃度を低下させエネルギー消費量を亢進することを明らかにした。

第 4 章では、β-コングリシニンは 2 型糖尿病モデル動物である KK-A<sup>y</sup> マウスにおいて、体脂肪を低減させ、インスリン抵抗性を抑えインスリン感受性を維持することを示唆した。第 5 章では、β-コングリシニンは本態性高血圧モデル動物である SHR/Izm において、血圧上昇抑制作用を示し、その作用に血漿 NO 濃度の上昇およびレニン-アンジオテンシン系を介した血圧調節機構が関与している可能性を示唆した。そして、β-コングリシニンによるこれらの作用には、共通して血漿アディポネクチン濃度上昇が関わっていることを示唆した。

そこで本章では、β-コングリシニンの摂取による、これらの作用が代謝異常が複合的に起こったいわゆるメタボリックシンドロームの状態でも認められるのか、メタボリックシンドロームモデル動物を用いて検討した。

## 6-2. 実験方法

### 【飼育条件】

食餌はこれまでと同様に AIN-93G 組成 (Reeves *et al.*, 1993) に準拠して調製した。すなわち、食餌タンパク質として、CAS を 20% 含む食餌を対照食とし、タンパク質の半量を SOY または、 $\beta$ -CON で置き換えた食餌を実験食とした (第 2 章参照)。飼育環境は、22~23°C、湿度 50~60%、12 時間の明暗サイクル (8:00~20:00 点灯) とした。メタボリックシンドロームモデル動物として 5 週齢の雄性 SHR/NDmcr-cp ラット (日本エスエルシー (株)) を用いた。このラットは、高血圧を自然発症する遺伝的背景にレプチン受容体遺伝子にナンセンス変異を持ち過食により 6 週齢ごろから肥満および高血圧を発症し、その後の加齢に伴い、高血糖および脂質異常症を呈することが知られている。さらに、肝臓では脂肪肝および非アルコール性脂肪肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis: NASH) を発症し、腎臓では糖尿病性腎症を呈するため、しばしばメタボリックシンドローム様病態を発症するモデル動物として用いられる (Kagota *et al.*, 2006)。市販固形飼料 (Type NMF、オリエンタル酵母 (株)) を用いて 6 日間の予備飼育を行った後、1 群 6 匹で CAS 群、SOY 群および、 $\beta$ -CON 群の 3 群に分けた。その際、血糖値および平均体重に差が出ないように群分けを行った。実験食による飼育を開始して 4 週目、8 週目および 12 週目に血糖値を測定した。なお、血糖値測定に際して 6 時間絶食を行った。12 週目には血糖値測定に続き、グルコース負荷試験を行った。すなわち、6 時間絶食させたラットに、グルコースを 2.0 g/kg 体重となるように経口投与し、0、30、60、90、120 および 180 分後

の血糖値を測定した。また、摂食開始 2 週目、6 週目および 10 週目 (8 週齢、10 週齢および 14 週齢時) にテールカフ法により収縮期および拡張期血圧を測定した (MK-2000、室町機械 (株))。11 週目に 2 日間の糞を採取した。グルコース負荷試験の 5 日後、ラットを 6 時間絶食させ、インフルランおよびペントバルビタール併用麻酔下で EDTA・2Na 溶液 (0.1%) を 1 mL 添加したシリンジを用いて腹部大動脈から 10 mL 採血した。血液は 700 × g、4°C、で 15 分間遠心し血漿を調製した。肺、肝臓、腎臓、腓腹筋、白色脂肪組織 (腎臓周辺、辜丸周辺および腸間膜)、肩甲間褐色脂肪組織および腓腹筋を摘出し、それぞれ重量を測定後、-80°C で保存した。なお、本実験は「長崎県立大学動物実験委員会」の審査を受け、承認された上で、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準 (平成 18 年 6 月 1 日環境省告示第 88 号)」に則して実施した。

#### 【血漿分析】

血漿成分の分析は第 2 章に準じて行った。

#### 【ヘモグロビン A<sub>1c</sub> 測定】

赤血球のヘモグロビン A<sub>1c</sub> (HbA<sub>1c</sub>) の割合は市販のキットを用いて測定した (ラピディア® オート HbA<sub>1c</sub>-L: 富士レビオ (株)、東京)。

### 【肝臓脂質分析】

肝臓脂質濃度の測定は第 2 章に準じて行った。

### 【酵素活性測定】

肝臓の酵素活性の測定は第 2 章に準じて行った。

#### <アンジオテンシン変換酵素(ACE)活性>

肺における ACE 活性は、Hurst らの方法により、hippuryl-L- histidyl-L-leucine から加水分解によって生成する馬尿酸量測定して求めた (Hurst *et al.*, 1981)。肺組織約 100 mg を 0.1 mM boric acid buffer (pH8.3) 5 mL でホモジナイズし、4°C、700 × g で 10 分間遠心した上清を酵素源とした。Incubation buffer (0.2 M boric acid, 2 M NaCl, pH8.3) を 0.2mL、蒸留水を 0.1mL および酵素源を 0.1mL 加え 37°C で 5 分間加温した。12.5 mM hippuryl-L- histidyl-L-leucine (0.05 M borax, 0.2 M boric acid buffer (pH8.3)) を基質として 0.1 mL 加え、37°C、15 分間反応させた。1M HCl を 0.5 mL 加えて反応を停止し、30 秒後に 1M NaOH を 0.5 mL 加えて中和した。2 mL の蒸留水を加え、3% cyanuric chloride/1,4-dioxan を 1.5 mL 加えて発色させた。700 × g で 10 分間遠心後、上清の吸光度を分光光度計 (波長: 382 nm) で測定した。試料のタンパク質量は Lowry らの方法 (Lowry *et al.*, 1951) によって測定し、活性を U/g protein で示した。

【肝臓、腎臓、肺、腸間膜脂肪組織および大動脈壁の総 RNA の抽出およびリアルタイム RT-

PCR 法による遺伝子発現の解析】

各組織の総 RNA の抽出およびリアルタイム RT-PCR 法による遺伝子発現の解析は、第 2 章に準じて行った。測定に用いたプライマーは Table6-1 に示した。

Table 6-1. Sequence of quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction primers.

Gene	Accession no	Primer sequence
<i>Ppara</i>	XM_213329	F 5'- AAGAGAATCCACGAAGCCTACCT-3 R 5'- TGACAAAAGGCGGATTGTTG -3
<i>Fasn</i>	NM_017332.1	F 5'-GGTAGGCTTGGTGAAGTGTCTC-3 R 5'-TCTAACTGGAAGTGACGGAAGG-3
<i>Srebflc</i>	XM_213329	F 5'- CATCAACAACCAAGA CAGTG -3 R 5'- GAAGCAGGAGAAGAG AAGC -3
<i>Irs2</i>	NM_001168633.1	F 5'-GTCGTTGTCTCCACCACCG-3 R 5'-AGGGACCCACCTGACTTC-3
<i>Irs1</i>	NM_012969.1	F 5'-CAAGACTGCCCTCTCAACA-3 R 5'-CGGTCCTCTGGTTGCTTCTG-3
<i>Slc2a4</i>	XM_006246596.3	F 5'-AGATGCCGTCGGGTTTCC-3 R 5'-CCAAACTGAAGGGAGCCAAG-3
<i>Adipor1</i>	XM_006249852.3	F 5'-TCTTCCGCATCCACACAGAA-3 R 5'-ATATTTGCTCTGAGCATGGTCAAG-3
<i>Adipor2</i>	NM_001037979.1	F 5'- CATGTTTGCCACCCCTCAGTA-3 R 5'-ATGCAAGGTAGGGATGATTCCA-3
<i>Sln</i>	NM_001013247.1	F 5'- CTTTGCTTCTCTTCAGGACGTG-3 R 5'- AGGTCTGGGTGAGAACTCCA-3
<i>Cpt1</i>	XM_006249852.3	F 5'-TCTTCCGCATCCACACAGAA-3 R 5'-ATATTTGCTCTGAGCATGGTCAAG-3
<i>Ppargc1a</i>	XM_017599391.1	F 5'-CGGTACAGTGAGTGTTCTGG-3 R 5'-TGAGGACTTGCTGAGTTGTG-3
<i>Cpt1b</i>	NM_013200.1	F 5'-CGAGGTGGGATTGGAGTGG-3 R 5'-GCACCTAAGGGCTGAGAGAG-3

<i>Dgat1</i>	NM_053437.1	F 5'-CCGTGGTATCCTGAATTGGT-3 R 5'-GGCGCTTCTCAATCTGAAAT-3
<i>Adipoq</i>	NM_144744.3	F 5'-AATCCTGCCCAGTCATGAAG-3 R 5'-CATCTCCTGGGTCACCCTTA-3
<i>Pnpla2</i>	XM_017604198.1	F 5'-CCAACGCCACTCACATCTA-3 R 5'-CCTCCTTGGACACCTCAATA-3
<i>Pparg</i>	XM_006237009.3	F 5'-CCCTTTACCACGGTTGATTTCTC-3 R 5'-GCAGGCTCTACTTTGATCGCACT-3
<i>Lipe</i>	NM_012859.1	F 5'-CGATTGTGGAAAGATGTCAGGAT-3 R 5'-GTGCTGTTGTCCACCCAGAA-3
<i>Ang</i>	NM_0134432.2	F 5'-CACCTACGTTCACTTCCAAGG-3 R 5'-GGCGCTTCTCAATCTGAAAT-3
<i>Ren</i>	NM_017332.1	F 5'-CGAAGGCTTGAATCCTAACGAA-3 R 5'-GTTGACCTGCAGTCGTTTTGC-3
<i>Ace</i>	NM_012544.1	F 5'-ATTGCTTTGGGTGTGGAAGA-3 R 5'-GCATCAGAGTAGAAGTTGAG-3
<i>Agtr1</i>	NM_030985.4	F 5'-ATTCGTGGCTTGAGTCCTGT-3 R 5'-GTTAACTCAGGGAATGTGGCA-3
<i>Agtr2</i>	NM_012494.3	F 5'-TGCTCTGACCTGGATGGGTA-3 R 5'-AGCTGTTGGTGAATCCCAGG-3
<i>Nos3</i>	NM_021838.2	F 5'-ATTGGCATGAGGGACCTGTG-3 R 5'-CCGGGTGTCTAGATCCATGC-3
<i>Rplp0</i>	NM_022402.2	F 5'-GGTGTTTGACAATGGCAGCAT-3 R 5'-ATTGCGGACACCCTCTAGGA-3
<i>Nos3</i>	NM_021838.2	F 5'-ATTGGCATGAGGGACCTGTG-3 R 5'-CCGGGTGTCTAGATCCATGC-3
<i>Rplp0</i>	NM_022402.2	F 5'-GGTGTTTGACAATGGCAGCAT-3 R 5'-ATTGCGGACACCCTCTAGGA-3

#### 【統計処理】

統計処理は第2章に準じて行った。

### 6-3. 実験結果

#### 【血糖値測定およびグルコース負荷試験】

摂食期間中の空腹時血糖値は、摂食開始 4 週目において CAS 群に比べ SOY 群および  $\beta$ -CON 群で有意に高値であったが、8 週目以降はその差は認められなかった (Fig. 6-1A)。

グルコース負荷試験で、血糖値は投与後 30 分間で上昇し、60 分後以降は低下した (Fig. 6-1B)。グルコース投与後の血糖値およびグルコース負荷試験から得られたグルコース曲線下面積 (AUC) は、各群間で差はなかった。

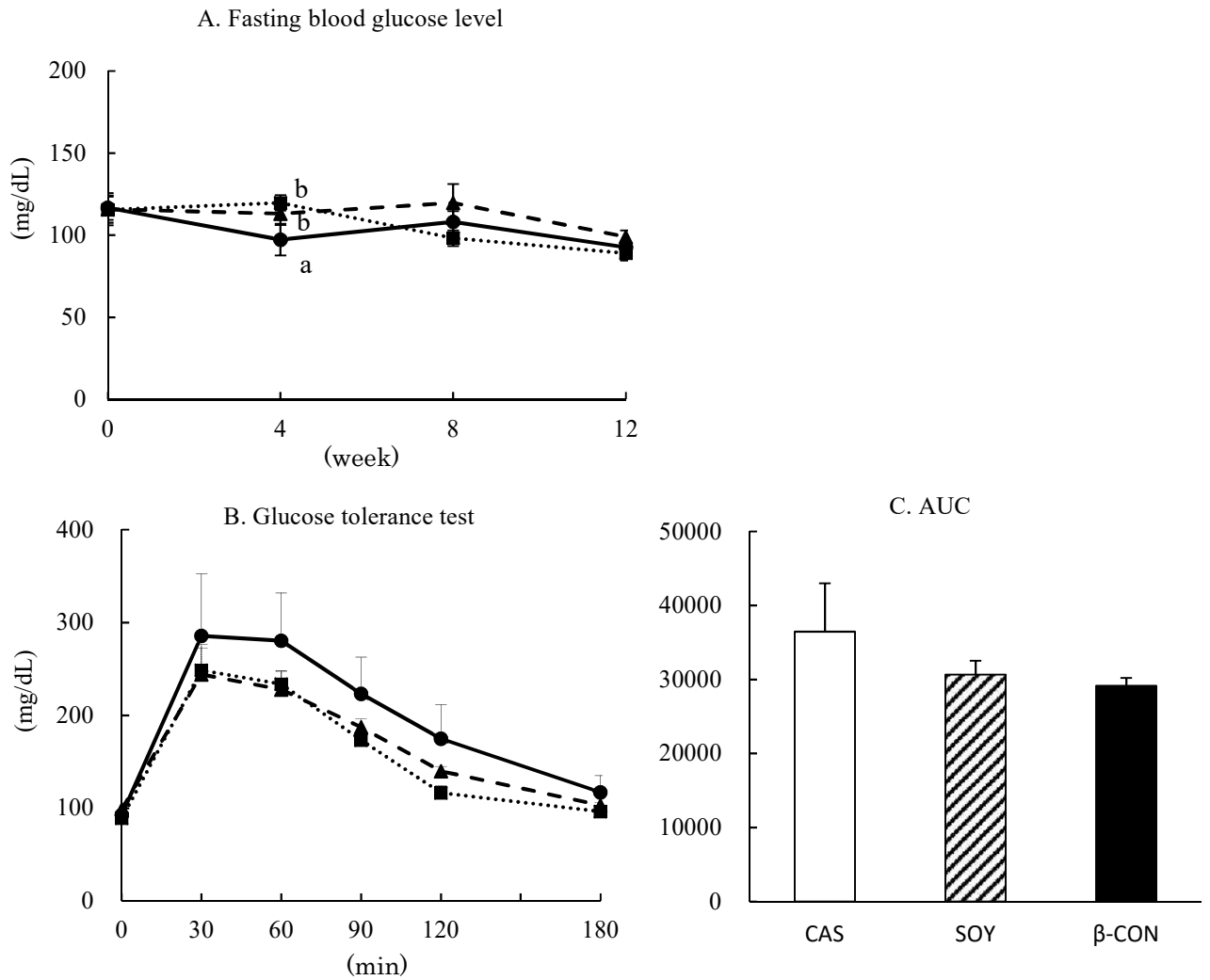


Fig. 6-1. Effect of dietary  $\beta$ -conglycinin on (A) fasting blood glucose level, (B) glucose tolerance test and (C) area under the curve (AUC) of glucose tolerance test in SHR/NDmcr-cp. At week 12, rats received 2 g glucose/kg body weight by oral administration after a 6 h fast. Blood glucose was measured at the intervals indicated over 3h.

Values are expressed as mean  $\pm$  SE of 4-6 rats.

Values without sharing a common letter are significantly different at  $p < 0.05$ .

●, casein group; ▲, soy protein group; and ■,  $\beta$ -conglycinin group.

Open bar, casein group; hatched bar, soy protein group; solid bar,  $\beta$ -conglycinin group.



【血圧測定】

CAS 群の収縮期血圧および拡張期血圧は、ともに実験食を摂食開始してから 2 週目から 6 週目にかけて上昇し、10 週目にかけての血圧上昇は緩やかだった (Fig. 6-2)。収縮期血圧は、摂食開始および 6 週目において CAS 群に比べ、SOY 群および  $\beta$ -CON 群で有意に低く、10 週目ではその差はさらに明確になった。拡張期血圧においても収縮期血圧と同様の応答が認められた。

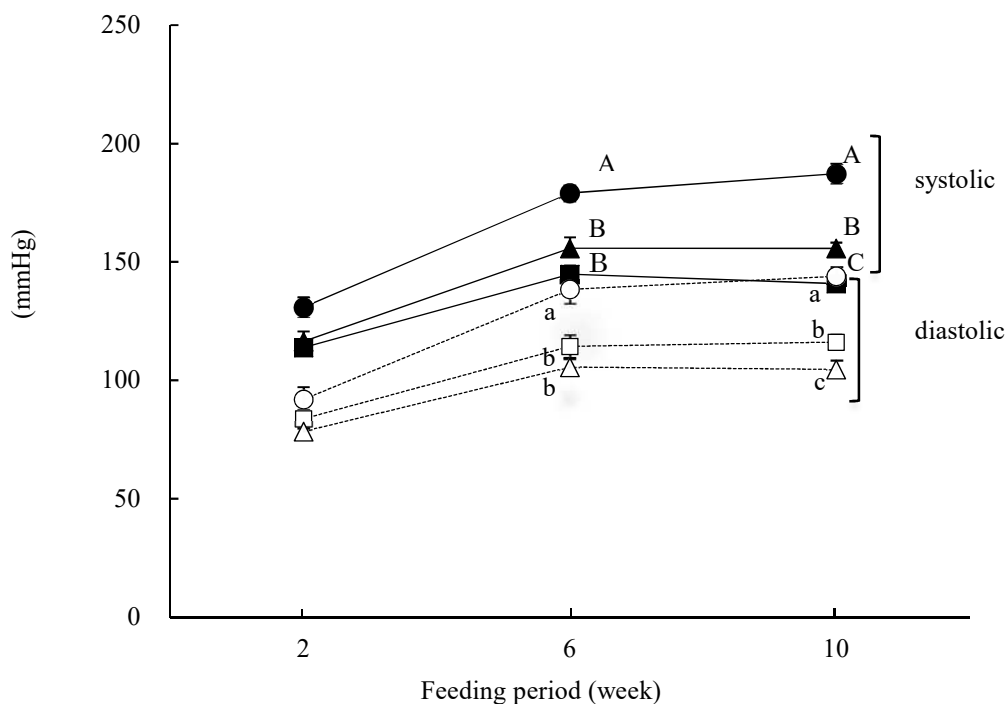


Fig. 6-2. Effect of dietary  $\beta$ -conglycinin on systolic and diastolic blood pressures in SHR/NDmcr-cp.

Values are expressed as mean  $\pm$  SE of 4-6 rats.

Values without sharing a common letter are significantly different at  $p < 0.05$ .

● and ○, casein; ▲ and △, soy protein isolate; ■ and □,  $\beta$ -conglycinin.

【体重、摂食量及び各臓器重量】

終体重、摂食量および食餌効率に各群間で差はなかった (Table 6-2)。

100g 体重あたりの肝臓重量は、CAS 群に比べ SOY 群および  $\beta$ -CON 群で有意に軽かった。100g 体重あたりの白色脂肪組織重量は各群間で違いはなかった。一方、褐色脂肪組織重量は CAS 群、SOY 群では差がなく、 $\beta$ -CON 群で有意差はないもののやや重い傾向にあった。

Table 6-2. Effect of dietary  $\beta$ -conglycinin on growth parameters and tissue weights in SHR/NDmcr-cp.

	Groups		
	CAS	SOY	$\beta$ -CON
Body weight (g)			
Initial	188 $\pm$ 6	189 $\pm$ 4	186 $\pm$ 4
Final	613 $\pm$ 8	622 $\pm$ 13	600 $\pm$ 4
Food intake (g/day)	27.0 $\pm$ 0.5	27.6 $\pm$ 0.2	26.6 $\pm$ 0.6
Food efficiency (g gain/g diet)	0.200 $\pm$ 0.006	0.199 $\pm$ 0.004	0.182 $\pm$ 0.005
Relative tissue weights (g/100g body weight)			
Liver	4.14 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup>	3.55 $\pm$ 0.14 <sup>b</sup>	3.32 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>
Epididymal adipose tissue	1.44 $\pm$ 0.06	1.51 $\pm$ 0.05	1.55 $\pm$ 0.05
Perirenal adipose tissue	4.79 $\pm$ 0.19	4.90 $\pm$ 0.18	4.91 $\pm$ 0.11
Mesenteric adipose tissue	1.82 $\pm$ 0.15	1.69 $\pm$ 0.06	1.74 $\pm$ 0.04
Interscapular brown adipose tissue	0.116 $\pm$ 0.080	0.116 $\pm$ 0.012	0.135 $\pm$ 0.014

CAS, casein; SOY, soy protein isolate;  $\beta$ -CON,  $\beta$ -conglycinin.

Values are expressed as mean  $\pm$  SE of 4-6 rats.

Values without sharing a common superscript letter are significantly different at  $p < 0.05$ .

### 【血漿分析】

血漿トリグリセリド濃度は統計的に有意ではなかったものの、CAS 群および SOY 群に比べ、 $\beta$ -CON 群で低い傾向にあった (Table 6-3)。遊離脂肪酸濃度は、CAS 群に比べ SOY 群および  $\beta$ -CON 群で低い傾向となった。総コレステロール濃度は、CAS 群、SOY 群、 $\beta$ -CON 群の順で低くなる傾向にあった。HDL-コレステロール濃度は各群間で差はなかった。その結果、動脈硬化指数  $Atherogenic\ Index = (\text{血漿総コレステロール濃度} - \text{HDL-コレステロール濃度}) / (\text{HDL-コレステロール濃度})$  は CAS 群、SOY 群、 $\beta$ -CON 群の順で低くなった。

血漿グルコース濃度は、3 群間で大きな違いはなかった。血漿インスリン濃度およびインスリン抵抗性指標は、CAS 群に比べ  $\beta$ -CON 群で有意に低かった。血漿レプチン濃度は各群間で差はなかった。血漿アディポネクチン濃度および血漿 NOx 濃度は CAS 群、SOY 群、 $\beta$ -CON 群の順に高くなった。

### 【HbA<sub>1c</sub>】

赤血球の HbA<sub>1c</sub> は CAS 群、SOY 群、 $\beta$ -CON 群の順に低くなり、CAS 群と  $\beta$ -CON 群の違いは統計的に有意であった (Table 6-4)。

Table 6-3. Effect of dietary  $\beta$ -conglycinin on plasma biochemical parameters in SHR/NDmcr-cp.

	Groups		
	CAS	SOY	$\beta$ -CON
Triglyceride (mg/dL)	378 $\pm$ 42	391 $\pm$ 45	327 $\pm$ 28
Total cholesterol (mg/dL)	110 $\pm$ 6	95.3 $\pm$ 7.8	86.4 $\pm$ 9.0
HDL cholesterol (mg/dL)	65.6 $\pm$ 7.1	65.0 $\pm$ 3.8	68.0 $\pm$ 3.7
Atherogenic index	0.737 $\pm$ 0.203	0.489 $\pm$ 0.142	0.282 $\pm$ 0.108
Free fatty acid (mmol/mL)	1.06 $\pm$ 0.03	0.941 $\pm$ 0.050	0.882 $\pm$ 0.030
Glucose (mg/dL)	172 $\pm$ 10	158 $\pm$ 6	169 $\pm$ 6
Insulin (ng/mL)	35.2 $\pm$ 1.1 <sup>a</sup>	29.4 $\pm$ 1.4 <sup>a</sup>	16.5 $\pm$ 2.1 <sup>b</sup>
Index of insulin resistance	11.3 $\pm$ 1.0 <sup>a</sup>	8.76 $\pm$ 0.99 <sup>a</sup>	4.39 $\pm$ 0.65 <sup>b</sup>
Leptin (ng/mL)	165 $\pm$ 9	154 $\pm$ 6	157 $\pm$ 3
Adiponectin ( $\mu$ g/mL)	5.88 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	6.50 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	7.84 $\pm$ 0.34 <sup>b</sup>
NOx ( $\mu$ mol/L)	24.4 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>	31.9 $\pm$ 1.4 <sup>b</sup>	33.7 $\pm$ 2.0 <sup>b</sup>

CAS, casein; SOY, soy protein isolate;  $\beta$ -CON,  $\beta$ -conglycinin.

NOx, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>+NO<sub>3</sub><sup>-</sup>

Index of insulin resistance, plasma glucose (mg/dL) $\times$ plasma insulin (ng/mL)/405;

Atherogenic index, (Total cholesterol (mg/dL) – HDL cholesterol (mg/dL))/(HDL cholesterol (mg/dL)).

Values are expressed as mean  $\pm$  SE of 4-6 rats.

Values without sharing a common superscript letter are significantly different at  $p < 0.05$ .

Table 6-4. Effect of dietary  $\beta$ -conglycinin on HbA<sub>1c</sub> level in SHR/NDmcr-cp.

	Groups		
	CAS	SOY	$\beta$ -CON
HbA <sub>1c</sub> (%)	8.88 $\pm$ 0.24 <sup>a</sup>	7.59 $\pm$ 0.42 <sup>ab</sup>	6.46 $\pm$ 0.25 <sup>b</sup>

CAS, casein; SOY, soy protein isolate;  $\beta$ -CON,  $\beta$ -conglycinin.

Values are expressed as mean  $\pm$  SE of 4-6 rats.

Values without sharing a common superscript letter are significantly different at  $p < 0.05$ .

### 【肝臓脂質濃度】

肝臓トリグリセリド濃度は、CAS 群に比べ、SOY 群でやや低い傾向、 $\beta$ -CON 群では有意に低い値を示した (Table 6-5)。肝臓コレステロール濃度は、CAS 群に比べ SOY 群および  $\beta$ -CON 群で有意に低かった。リン脂質濃度は各群間で違いは認められなかった。

Table 6-5. Effect of dietary  $\beta$ -conglycinin on liver lipid concentrations in SHR/NDmcr-cp.

	Groups		
	CAS	SOY	$\beta$ -CON
Triglyceride (mg/g liver)	61.3 $\pm$ 2.6 <sup>a</sup>	55.4 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	39.4 $\pm$ 3.8 <sup>b</sup>
Cholesterol (mg/g liver)	6.07 $\pm$ 0.62 <sup>a</sup>	3.37 $\pm$ 0.13 <sup>b</sup>	3.35 $\pm$ 0.11 <sup>b</sup>
Phospholipid (mg/g liver)	33.8 $\pm$ 1.7	37.9 $\pm$ 1.5	38.9 $\pm$ 0.8

CAS, casein; SOY, soy protein isolate;  $\beta$ -CON,  $\beta$ -conglycinin.

Values are expressed as mean  $\pm$  SE of 4-6 rats.

Values without sharing a common superscript letter are significantly different at  $p < 0.05$ .

【肝臓における脂質代謝関連酵素活性】

肝臓サイトソール画分の FAS 活性は、CAS 群および SOY 群に比べ  $\beta$ -CON 群で有意に低かった (Table 6-6)。肝臓サイトソール画分の Malic enzyme 活性は各群間で違いがなかった。G6PDH 活性は、CAS 群に比べ SOY 群で低い傾向、 $\beta$ -CON 群で有意に低い値を示した。肝臓ミクロソーム画分の PAP 活性は、CAS 群に比べ  $\beta$ -CON 群で高い傾向にあったが、統計的に有意な違いではなかった。

肝臓ミトコンドリア画分の CPT 活性は、CAS 群に比べ SOY 群および  $\beta$ -CON 群で有意に高かった。肝臓ペルオキシソームの ACO 活性は各群間で差はなかった。

Table 6-6. Effect of dietary  $\beta$ -conglycinin on hepatic enzyme activities in SHR/NDmcr-cp.

	Groups		
	CAS	SOY	$\beta$ -CON
	(nmol/min/mg protein)		
Cytosolic FAS	21.9 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	19.5 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup>	15.7 $\pm$ 0.5 <sup>b</sup>
Cytosolic malic enzyme	29.9 $\pm$ 3.2	23.9 $\pm$ 1.2	23.3 $\pm$ 1.3
Cytosolic G6PDH	53.4 $\pm$ 7.0 <sup>a</sup>	39.8 $\pm$ 3.4 <sup>ab</sup>	34.1 $\pm$ 2.6 <sup>b</sup>
Microsomal PAP	51.0 $\pm$ 3.8	43.2 $\pm$ 6.0	60.9 $\pm$ 6.3
Mitochondrial CPT	2.53 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	3.49 $\pm$ 0.19 <sup>b</sup>	4.16 $\pm$ 0.22 <sup>b</sup>
Peroxisomal ACO	3.61 $\pm$ 0.38	3.78 $\pm$ 0.42	4.45 $\pm$ 0.45

CAS, casein; SOY, soy protein isolate;  $\beta$ -CON,  $\beta$ -conglycinin.

FAS, fatty acid synthase; G6PDH, glucose-6-phosphate dehydrogenase; PAP, phosphatidate phosphohydrolase; CPT, carnitine palmitoyltransferase; ACO, acyl CoA oxidase.

Values are expressed as mean  $\pm$  SE of 4-6 rats.

Values without sharing a common superscript letter are significantly different at  $p < 0.05$ .

【糞中へのステロール排泄量】

糞中への胆汁酸排泄量は、CAS 群に比べ SOY 群で有意に多かった。β-CON 群は CAS 群よりも多い傾向はあったものの、有意な違いではなかった (Table 6-7)。糞中へのコレステロール排泄量も、統計的に有意ではなかったものの CAS 群に比べ SOY 群および β-CON 群で多い傾向にあった。

Table 6-7. Effect of dietary β-conglycinin on fecal excretion of bile acid and cholesterol in SHR/NDmcr-cp.

	Groups		
	CAS	SOY	β-CON
Bile acid (mg/day)	0.927 ± 0.147 <sup>a</sup>	1.77 ± 0.24 <sup>b</sup>	1.33 ± 0.20 <sup>ab</sup>
Cholesterol (mg/day)	11.7 ± 0.8	15.3 ± 0.9	15.6 ± 2.0

CAS, casein; SOY, soy protein isolate; β-CON, β-conglycinin.

Values are expressed as mean ± SE of 4-6 rats.

Values without sharing a common superscript letter are significantly different at  $p < 0.05$

### 【肝臓における遺伝子発現】

脂肪酸合成に関わる酵素をコードする遺伝子である *Fasn* の発現は CAS 群に比べ SOY 群および  $\beta$ -CON 群で有意に低かった (Fig. 6-3)。また *Fasn* の上流に位置する *Srebf1c* の発現は CAS 群に比べ SOY 群で低い傾向、 $\beta$ -CON 群では有意に低かった。

脂肪酸  $\beta$  酸化に関わる CPT をコードする遺伝子である *Cpt1* の発現、*Cpt1* の上流に位置する *Ppara* の発現はいずれも統計的に有意ではなかったものの、CAS 群に比べ SOY 群、 $\beta$ -CON 群で高くなる傾向がみられた。アディポネクチン受容体をコードする遺伝子 *Adipor2* およびインスリン受容体基質をコードする遺伝子 *Irs2* の発現は CAS 群および SOY 群に比べ  $\beta$ -CON 群で有意に高かった。



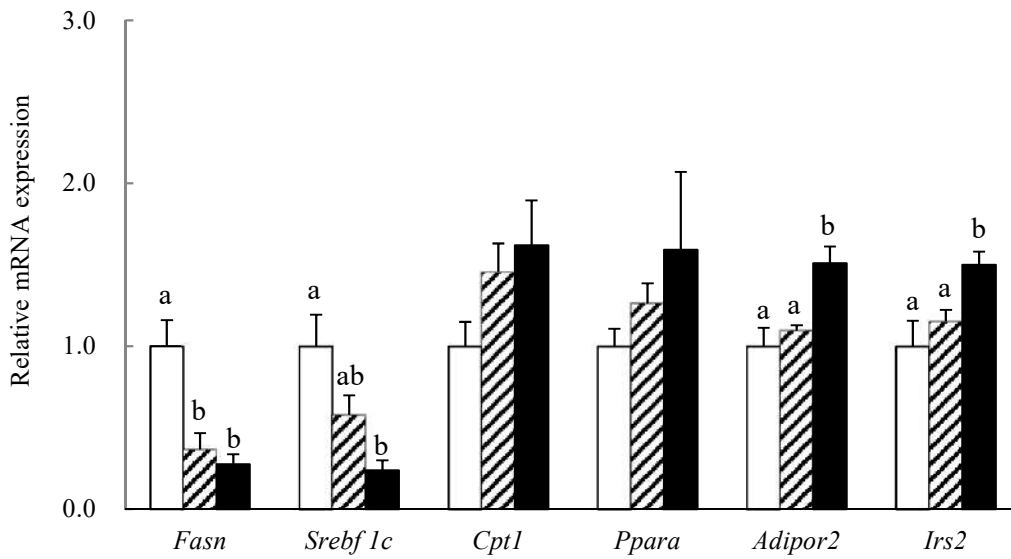


Fig. 6-3. Effect of dietary  $\beta$ -conglycinin on hepatic gene expressions in SHR/NDmcr-cp. Values are expressed as mean  $\pm$  SE of 4-6 rats.

Values without sharing a common letter are significantly different at  $p < 0.05$ .

*Fasn*, fatty acid synthase; *Srebf1c*, sterol regulatory element binding transcription factor 1c; *Cpt1*, carnitine palmitoyl-acyltransferase 1; *PPAR $\alpha$* , peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ ; *Adipor2*; adiponectin receptor 2; *Irs2*, insulin receptor substrate 2.

Open bar, casein group; hatched bar, soy protein group; solid bar,  $\beta$ -conglycinin group.

#### 【腓腹筋における遺伝子発現】

*Ppargc1a* の発現は、CAS 群に比べ、 $\beta$ -CON 群で有意に高かった (Fig. 6-4)。*Cpt1b* の発現および *Cpt1* の上流に位置する *Ppara* の発現は、統計的に有意ではなかったものの、CAS 群に比べ SOY 群、 $\beta$ -CON 群と高くなる傾向がみられた。アディポネクチンの受容体をコードする遺伝子 *Adipor1* の発現は CAS 群に比べ、SOY 群はやや高い傾向、 $\beta$ -CON 群で有意に高かった。非ふるえ熱産生に関わるタンパク質をコードする *Sln* の発現、インスリン受容体基質をコードする *Irs1* の発現は各群間で違いはなかった。血糖の取りこみに関わるタンパク質をコードする *Slc2a4* の発現は統計的に有意ではなかったものの、CAS 群に比べ SOY 群および  $\beta$ -CON 群で高い傾向が認められた。

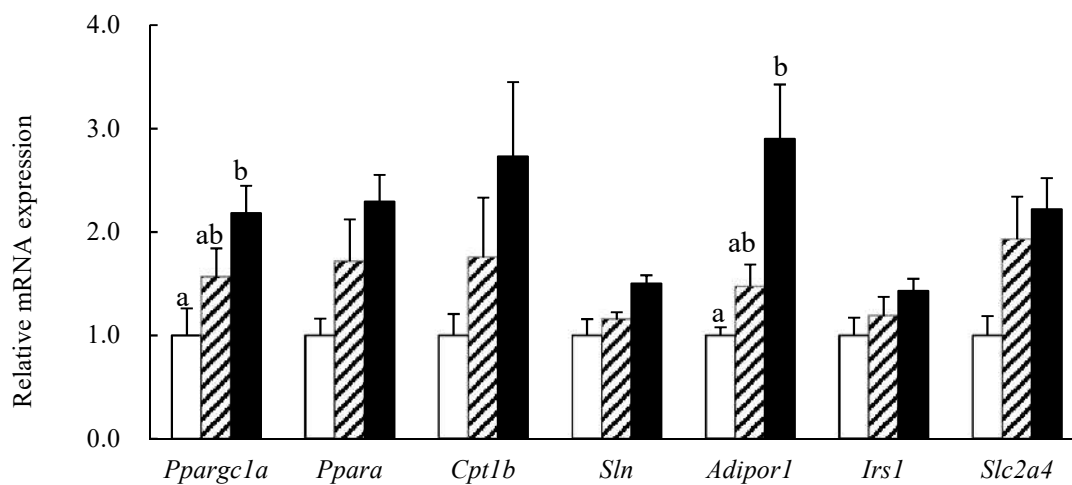


Fig. 6-4. Effect of dietary  $\beta$ -conglycinin on gene expressions in gastrocnemius muscle in SHR/NDmcr-cp.

Values are expressed as mean  $\pm$  SE of 4-6 rats.

Values without sharing a common letter are significantly different at  $p < 0.05$ .

*Pparg1a*, peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$ ; *Ppara*, peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ ; *Cpt1b*, carnitine palmitoyl-acyltransferase 1b; *Sln*, sarcolipin; *Adipor1*, adiponectin receptor 1; *Irs1*, insulin receptor substrate 1; *Slc2a4*, glucose transporter 4. Open bar, casein group; hatched bar, soy protein group; solid bar,  $\beta$ -conglycinin group.

### 【腸間膜脂肪組織における遺伝子発現】

*Pparg* の発現は CAS 群に比べ、 $\beta$ -CON 群で有意に高かった (Fig. 6-5)。 *Adipoq*、*Lipe* および *Pnpla2* の発現は統計的に有意ではなかったものの、CAS 群、SOY 群、 $\beta$ -CON 群の順に高くなる傾向がみられた。 *Dgat1* の発現は各群間で差はなかった。 *Slc2a4* の発現も CAS 群および SOY 群に比べ  $\beta$ -CON 群で高い傾向を示した。

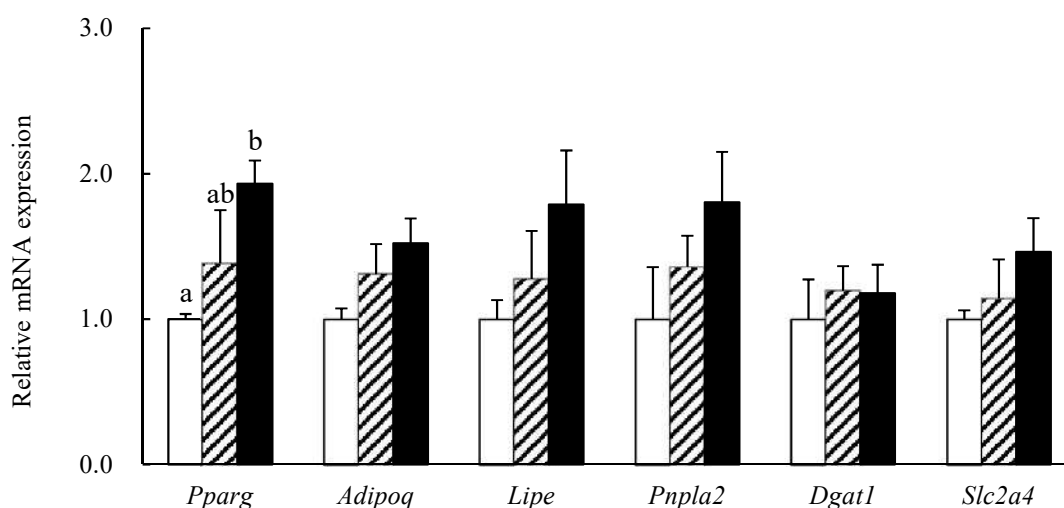


Fig. 6-5. Effect of dietary  $\beta$ -conglycinin on gene expressions in mesenteric adipose tissue in SHR/NDmcr-cp.

Values are expressed as mean  $\pm$  SE of 4-6 rats.

Values without sharing a common letter are significantly different at  $p < 0.05$ .

*Pparg*, peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ ; *Adipoq*, adiponectin; *Lipe*, hormone sensitive lipase; *Pnpla2*, adipose triglyceride lipase; *Dgat1*, acyl-CoA diacylglycerol acyltransferase 1; *Slc2a4*, glucose transporter 4.

Open bar, casein group; hatched bar, soy protein group; solid bar,  $\beta$ -conglycinin group.

#### 【レニン-アンジオテンシン系の遺伝子発現】

肝臓の *Ang* の発現および腎臓の *Ren* の発現は有意差はなかったものの、CAS 群が最も高く、SOY 群、 $\beta$ -CON 群の順に低くなる傾向を示した (Fig. 6-6)。肺の *Ace* の発現は CAS 群に比べ SOY 群および  $\beta$ -CON 群で有意に低かった。大動脈において血管収縮に関わるアンジオテンシンIIの受容体をコードする *Agtr1* の発現は各群で違いは認められなかった。一方、血管拡張に関わる受容体をコードする *Agtr2* は、統計的に有意差はなかったものの、CAS 群、SOY 群、 $\beta$ -CON 群の順に高くなる傾向が認められた。*Nos3* の発現は CAS 群に比べ、SOY 群でやや高い傾向、 $\beta$ -CON 群で有意に高い値を示した。

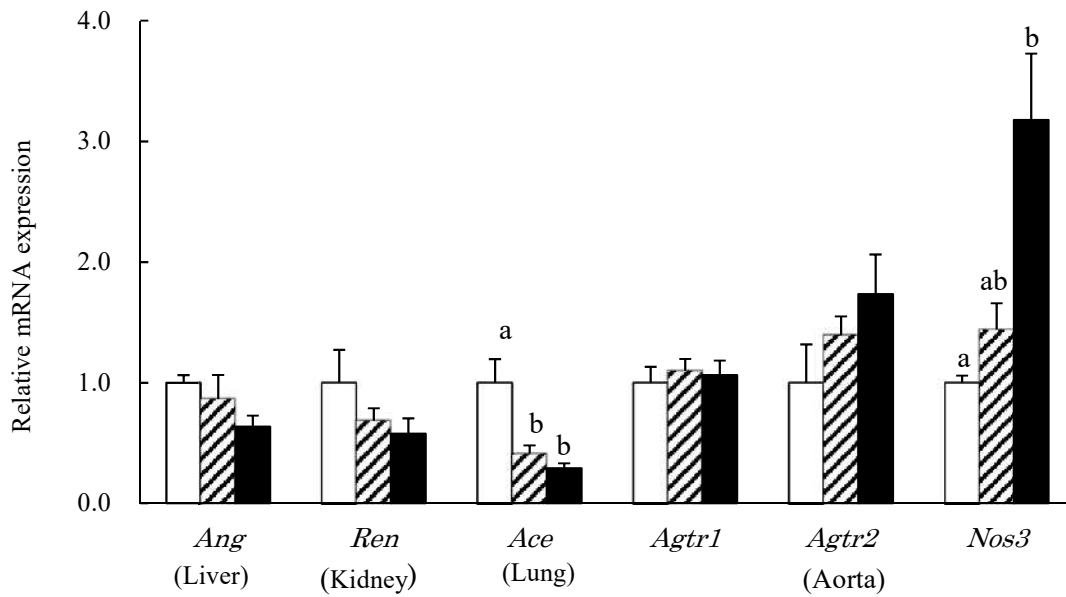


Fig. 6-6. Effect of dietary  $\beta$ -conglycinin on gene expressions of renin-angiotensin system in SHR/NDmcr-cp.

Values are expressed as mean  $\pm$  SE of 4-6 rats.

Values without sharing a common letter are significantly different at  $p < 0.05$ .

*Ang*, angiotensinogen; *Ren*, renin, *Ace*, angiotensin converting enzyme; *Agtr1*, angiotensin II receptor type 1; *Agtr2*, angiotensin II receptor type 2; *Nos3*, nitric oxide synthase 3.

Open bar, casein group; hatched bar, soy protein group; solid bar,  $\beta$ -conglycinin group.

#### 6-4. 考察

第6章では、いわゆるメタボリックシンドロームの状態で、 $\beta$ -コングリシニン摂取の効果を調べるために SHR/NDmcr-cp ラットをメタボリックシンドロームモデル動物として用い、脂質代謝、耐糖能および血圧に及ぼす影響について検討した。 $\beta$ -CON 群の白色脂肪組織重量の減少は認められなかったものの、CAS 群に比べ血漿アディポネクチン濃度が有意に高く、血漿グルコース濃度に違いはなかったものの、インスリン感受性は高く、収縮期血圧および拡張期血圧が低い作用を有することが明らかとなった。

飼育期間を通して空腹時血糖値は、4週目に CAS 群に比べ SOY 群および  $\beta$ -CON 群で有意に高値であったが、8週目以降その差は認められなかった。本実験に用いた SHR/NDmcr-cp ラットの血糖値の上昇が認められなかった原因の詳細は不明である。これまでに、SHR/NDmcr-cp ラットの血糖値は18週齢で200mg/dL程度になることが報告されている(山本ら, 1997)。本研究で血糖値の十分な上昇が認められなかった要因としては、個体差や摂食期間などの影響が考えられた。

血漿インスリン濃度は CAS 群および SOY 群に比べ  $\beta$ -CON 群で有意に低く、インスリン抵抗性指標については、CAS 群および SOY 群に比べ  $\beta$ -CON 群で有意に低値であった。腓腹筋での *Adipor1* および *Ppargc1a* の発現は  $\beta$ -CON 群で有意に高かった。骨格筋特異的 *Adipor1* 過剰発現マウスを用いた実験では、アディポネクチンが *Adipor1* を介して *Ppargc1a* の発現を上方制御し、骨格筋のミトコンドリアの量を増やすことで、耐糖能異常、インスリン抵

抗性を改善することが報告されている(Iwabu *et al.*, 2010)。*Ppargc1a* を筋肉へトランスフェクションさせた Zucker ラットにおいて、*Ppargc1a* の発現の増加は GLUT4 のトランスロケーションを増やし、インスリン感受性を亢進する作用が示唆されている(Benton *et al.*, 2010)。Tachibana らは  $\beta$ -コングリシニンの摂取が筋肉の細胞膜への GLUT4 のトランスロケーションを誘導してインスリン抵抗性を改善することを報告している(Tachibana *et al.*, 2014)。 $\beta$ -CON 群において *Slc2a4* の発現は統計的に有意ではなかったものの高い傾向を示したため、 $\beta$ -コングリシニンの摂取は糖の取り込みを促進する作用を有することが示唆された。本研究の結果から、 $\beta$ -CON 群ではインスリン抵抗性が低く、このことが骨格筋における *Adipor1* および *Ppargc1a* の発現の亢進を介して血糖値の調節に寄与することが示唆された。しかし、本研究のラットは十分な高血糖を呈さなかったため、実際の影響については今後さらなる検討が必要である。

本研究において肝臓トリグリセリド濃度は CAS 群に比べ SOY 群および  $\beta$ -CON 群で有意に低かった。血漿トリグリセリド濃度は統計的に有意ではなかったものの、同じような傾向を示した。肝臓での *Srebp1c* の発現および脂肪酸合成酵素の FAS 活性は  $\beta$ -CON 群で有意に低かった。また、肝臓での *Ppara* および *Cpt1* の発現および脂肪酸  $\beta$  酸化酵素の CPT1 活性は、CAS 群に比べ SOY 群および  $\beta$ -CON 群で高かった。この作用は第 3 章および第 4 章と同様に、肝臓のトリグリセリド濃度の低下には脂肪酸合成能の低下および脂肪酸  $\beta$  酸化能の亢進による影響が示唆された。



本研究では血漿総コレステロール濃度は、有意差はないものの CAS 群、SOY 群、β-CON 群の順で低く、肝臓コレステロール濃度も同様の傾向であったが、CAS 群に比べ β-CON 群では有意差が認められた。糞中への胆汁酸排泄量は CAS 群に比べ SOY 群で有意に高く、β-CON 群では有意差はないものの高い傾向にあった。糞中へのコレステロール排泄量も、有意差はないものの CAS 群に比べ SOY 群および β-CON 群で高い傾向にあった。これまでに SD ラットにおいて大豆タンパク質の摂取は、糞中へのステロイド排泄を促進させ、血漿コレステロール濃度を低下させることが報告されている (Fukui *et al.*, 2002)。大豆タンパク質に含まれる難消化性の高分子画分 (HMF) は糞中へのステロイドへの排泄促進作用があり、大豆タンパク質のコレステロール濃度低下作用は HMF によるものであることが示唆されている (Sugano *et al.*, 1988)。β-コングリシニンに HMF 画分の一部が含まれているかは不明であるものの、β-コングリシニン摂取による肝臓コレステロール濃度低下作用には、糞中へのステロイド排泄の促進が関与することが示唆された。血漿コレステロール濃度は CAS 群、SOY 群、β-CON 群の順で低くなったが、HDL-コレステロール濃度は、3 群とも同じレベルで違いはみられなかった。そこで、動脈硬化の一指標である動脈硬化指数 (Atherogenic Index) = (総コレステロール値 - HDL コレステロール値) / (HDL コレステロール値) を比較したところ、有意差はないものの、CAS 群、SOY 群、β-CON 群の順で低下した。したがって、SHR/NDmcr-cp ラットにおいて β-コングリシニンの摂取は、動脈硬化を予防する可能性が考えられた。

本研究では第 5 章と同様の β-コングリシニン摂取による血圧上昇抑制作用が認められた。

第 5 章では  $\beta$ -コングリシニンの摂取が血漿 NO<sub>x</sub> 濃度の上昇および *Ang* の発現、腎臓における *Ren* の発現低下傾向が血圧調節に関与している可能性を見出した。本研究においては、再度レニン-アンジオテンシン系、血管弛緩作用のある NO について検討し、第 5 章で認められた作用機序が確認された。さらに、血管弛緩作用に関わる *Nos3* の発現を大動脈で測定したところ、CAS 群に比べ  $\beta$ -CON 群で *Nos3* の発現は有意に高く、血漿 NO<sub>x</sub> 濃度も同様に  $\beta$ -CON 群で高値を示した。したがって、 $\beta$ -コングリシニン摂取による血漿アディポネクチン濃度の上昇は動脈壁での NO 産生を高めて血漿 NO 濃度を上昇させ、血管を弛緩させることにより血圧上昇を抑えることが示唆された (Ohashi *et al.*, 2011)。

レニン-アンジオテンシン系での血圧上昇抑制作用については、第 5 章と同様、 $\beta$ -CON 群での肝臓における *Ang* および腎臓における *Ren* の発現は低い傾向であり、肺における *Ace* の発現および ACE 活性は CAS 群に比べ  $\beta$ -CON 群で有意に低下した。さらに、大動脈のアンジオテンシンIIの受容体をコードする *Agtr* について検討した結果、血管収縮に関わる *Agtr1* の発現に 3 群間で違いはなかったが、血管拡張に関わる *Agtr2* の発現が、有意差はないものの CAS 群に比べ SOY 群および  $\beta$ -CON 群で高い傾向を示した。したがって、 $\beta$ -コングリシニンの摂取は *Ang* および *Ren* の発現を抑制し、ACE 活性を低下させ、さらに大動脈での *Agtr2* の発現を高めることにより血圧上昇抑制作用を示すことも示唆された。これらの結果から、 $\beta$ -コングリシニン摂取による血圧上昇抑制作用は血漿アディポネクチン濃度上昇を介した、NO による血管拡張作用およびレニン-アンジオテンシン系の抑制が関与していることが示

唆された。

以上のことから、 $\beta$ -コングリシニンはメタボリックシンドロームモデル動物において、肝臓での脂質代謝改善作用、インスリン抵抗性の軽減、血圧上昇抑制作用が観察され、 $\beta$ -コングリシニンはメタボリックシンドロームに一定の改善効果をもたらすことが示唆された。

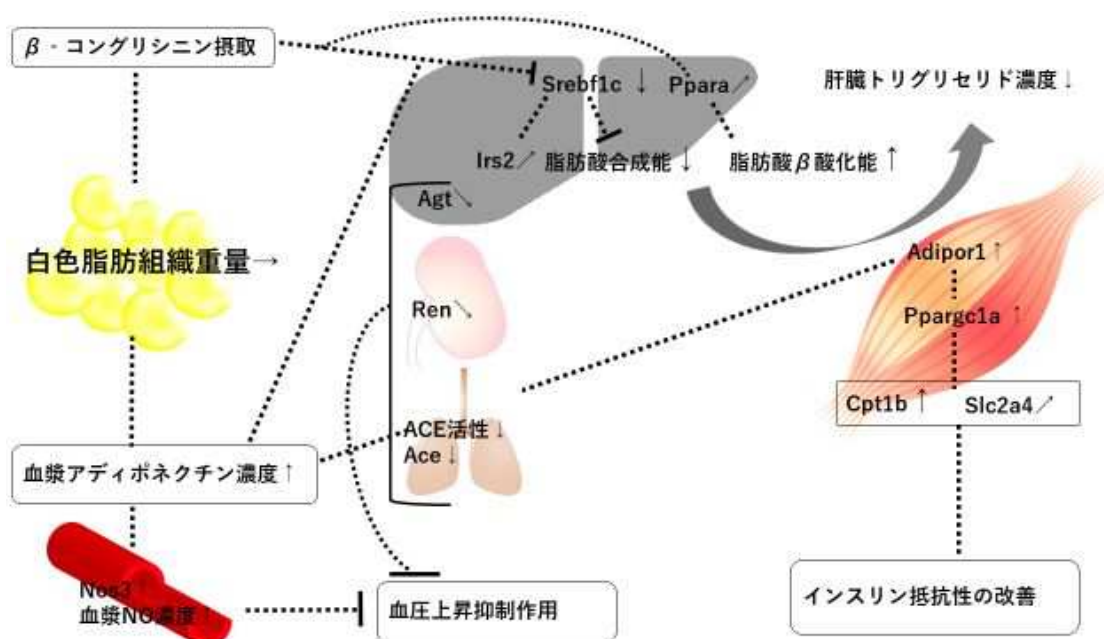
## 6-5 小括

メタボリックシンドロームモデル動物である5週齢の雄性 SHR/NDmcr-cp ラットを用いて、 $\beta$ -コングリシニン摂取による脂質代謝、糖代謝および血圧への影響について検討した。第2章～第5章の実験と同様、本研究においても  $\beta$ -コングリシニン摂取はアディポネクチン濃度を上昇させた。

脂質代謝においては、動脈硬化に対し予防的に作用する可能性が示唆された。糖代謝においては、血糖値の上昇が認められなかったこともあり、グルコース負荷試験においても、 $\beta$ -コングリシニン摂取の耐糖能への明確な影響は認められなかった。しかし、インスリン抵抗性指標は  $\beta$ -コングリシニン摂取で有意に低く、肝臓における *Irs2*、筋肉における *Adiopr1* および *Sl2a4* の発現への影響もインスリン抵抗性を軽減させることを示唆しており、耐糖能異常を改善する可能性が示唆された。血圧上昇抑制作用については NO を介した血管拡張作用だけでなくレニン-アンジオテンシン系を介した血圧調節機構が関与していることが明らかとなった。

以上のことから、 $\beta$ -コングリシニンはメタボリックシンドロームに一定の改善効果をもたらすことが示唆された。

第6章で認められたβ-コングリシニンの効果



## 第7章

### 総括

大豆タンパク質の主要な画分の一つである  $\beta$ -コングリシニン<sup>1</sup>は、これまでに体脂肪低減作用や肝臓トリグリセリド濃度低下作用を示すことが知られている。大豆タンパク質摂取により確認されてきた血清および肝臓トリグリセリド濃度低下作用は、 $\beta$ -コングリシニンによるものと示唆されている。 $\beta$ -コングリシニンは血中アディポネクチン濃度を高めることも報告されている。アディポネクチンは脂質代謝改善作用だけでなく糖代謝改善作用や血圧調節作用を有すると考えられることから、 $\beta$ -コングリシニン摂取は、血清アディポネクチン濃度の上昇を介して脂質代謝だけでなく、糖代謝および血圧調節にも影響を及ぼすことが期待された。そこで本研究では、 $\beta$ -コングリシニン摂取にそのような作用があるのか、さらにはメタボリックシンドロームに対して改善作用を示しうるかについて種々の病態モデル動物を用いた摂食試験により検討した。

第2章では、過食により肥満を呈した OLETF ラットにおいて、 $\beta$ -コングリシニン摂取が体脂肪を低減し、肝臓トリグリセリド濃度の低下させることを示した。また血漿アディポネクチン濃度を高める傾向が示唆された。体脂肪低減作用には、白色脂肪組織におけるトリグリセリド分解の亢進によるものと考えられた。また、血漿アディポネクチン濃度の上昇は、脂肪組織における *Pparg* の発現の亢進およびそれに伴う *Adipoq* の発現の亢進により、アディポネクチンの産生が亢進することと推察された。 $\beta$ -コングリシニンによるインスリン感受性亢進作用には血中のアディポネクチンを介して肝臓での *Irs2* の発現亢進および筋肉での *Adipor1* および

*Ppargc1a* の発現の増加傾向が認められ、各組織での遺伝子レベルの応答の変化が関与していることが示唆された。

第3章では、OLETF ラットへの高脂肪食摂食条件下においても、 $\beta$ -コングリシニン摂取が体脂肪低減作用および血漿アディポネクチン濃度上昇作用を示すこと示した。そして呼吸測定の結果から、 $\beta$ -コングリシニン摂取により総エネルギー消費量が増加することを明らかにした。 $\beta$ -コングリシニン摂取は筋肉において、 $\beta$ 酸化に関わる *Ppargc1a* および *Cpt1b* の発現を亢進させ、さらに褐色脂肪組織において *Ucp1* の発現を亢進させることを明らかにした。さらに、筋肉においては  $\beta$ -コングリシニン摂取による血清アディポネクチン濃度の上昇に加え、*Adipor1* の発現の亢進がアディポネクチン作用を増大させ筋肉での  $\beta$ 酸化能を亢進させることも示した。これらの作用が  $\beta$ -コングリシニン摂取によるエネルギー消費量の増加に寄与することが示唆された。

第4章では、2型糖尿病モデルマウスである KK- $A^y$  マウスに  $\beta$ -コングリシニンを摂取させ、 $\beta$ -コングリシニン摂取は、糖尿病の進行の程度にかかわらず体脂肪低減作用、肝臓トリグリセリド濃度低下作用、血清アディポネクチン濃度上昇作用、インスリン感受性亢進作用を示すことを示した。インスリン感受性については、糖尿病の進行程度が軽微状態では一定の改善作用を認めた。

インスリン感受性に対する作用には肝臓での *Srebf1c* の発現低下による *Irs2* 発現の上方制御および筋肉での *Ppargc1a* を介した *Cpt1b* および *Slc2a4* 発現の増加が関与すること指摘し

た。このことから、 $\beta$ -コングリシニン摂取は糖尿病の進行の程度にかかわらず脂質代謝を改善し、インスリン抵抗性を抑制したものの、食餌タンパク質の違いによるインスリン感受性への影響の違いは糖尿病の進行程度で異なることが示唆された。

第5章では、本態性高血圧モデルラットである SHR/Izm において、 $\beta$ -コングリシニン摂取は血圧上昇抑制作用を示した。この作用の少なくとも一部に、血漿アディポネクチンおよび NO 濃度の上昇傾向およびレニン-アンジオテンシン系を介した機構が関わる可能性が示唆された。

第6章では、代謝異常が複合的に起こったメタボリックシンドロームの状態を呈する病態モデル動物である SHR/NDmcr-cp ラットにおいて、 $\beta$ -コングリシニンは血漿アディポネクチン濃度を上昇させインスリン抵抗性指標を有意に低下し、血圧上昇を抑制させることを観察した。 $\beta$ -コングリシニン摂取によるインスリン抵抗性の軽減には、肝臓の *Irs2* 発現の亢進、筋肉における *Adipor1* および *Pparg1a* の発現の亢進および脂肪酸  $\beta$  酸化能亢進作用が関与する可能性が考えられた。血圧上昇抑制作用に関しては、レニン-アンジオテンシン系を抑制する機序(肺における ACE 活性の抑制、*Ang* および *Ren* の発現の低下傾向および *Agtr2* の発現の増加)に加え、血漿アディポネクチン濃度の上昇に伴う大動脈壁における *Nos3* の発現の亢進および血漿 NO 濃度上昇による血管拡張作用が関与することが考えられた。



以上のことから、メタボリックシンドロームやその構成病態の条件下で  $\beta$ -コングリシニンは進行抑制に関わる生理機能を発揮することが示された。これらの作用には共通して血漿アディポネクチンの上昇が関わることが示唆された。

本研究により  $\beta$ -コングリシニンはメタボリックシンドローム改善が期待できる食品成分であることが示された。これらの結果は  $\beta$ -コングリシニンの多機能性を示しており、メタボリックシンドロームの予防・改善因子としての  $\beta$ -コングリシニンの有用性が示唆された。

## 謝辞

本研究を遂行し学位論文をまとめるにあたり、終始懇切丁寧なご指導、ご支援を賜りました、長崎県立大学大学院人間健康科学研究科栄養科学専攻古場一哲教授に謹んで感謝の意を表します。

本学位論文審査の労をお執りくださいました、長崎県立大学大学院人間健康科学研究科栄養科学専攻 世羅至子教授、大曲勝久教授ならびに飛奈卓郎准教授に深謝いたします。

実験の実施や日常の議論を通じて多くの知識や示唆を賜りました駿河和仁准教授、長谷(田丸)静香助教(現福岡工業大学工学部生命環境科学科准教授)、湯浅正洋助教に心より厚くお礼申し上げます。

食品機能学研究室の学生並びに大学院生には、ともに研究に励み、精神的にも支えられました。心よりお礼申し上げます。

## 参考文献

Alberti KG, Zimmet, PZ (1998) Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a WHO consultation, *Diabet Med*, 15, 539-553.

Aoyama T, Fukui K, Takamatsu K, Hashimoto Y, Yamamoto T (2000) Soy protein isolate and its hydrolysate reduce body fat of dietary obese rats and genetically obese mice (yellow KK), *Nutrition*, 16, 349-354.

Aoyama T, Kohno M, Saito T, Fukui K, Takamatsu K, Yamamoto T, Hashimoto Y, Hirotsuka M, Kito M (2001) Reduction by phytate-reduced soybean  $\beta$ -conglycinin of plasma triglyceride level of young and adult rats plasma triglyceride level of young and adult rats, *Biosci Biotechnol Biochem*, 65, 1071-1075.

Araki E, Lipes MA, Patti ME, Brüning JC, Haag BIII, Johnson RS, Kahn CR (1994) Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene, *Nature*, 372, 186-190.

Anai M, Funaki M, Ogihara T, Terasaki J, Inukai K, Katagiri H, Fukushima Y, Yazaki Y, Kikuchi M, Oka Y, Asano T (1998) Altered expression levels and impaired steps in the pathway to phosphatidylinositol 3-kinase activation via insulin receptor substrates 1 and 2 in Zucker fatty rats, *Diabetes*, 47, 13-23.

Awazawa M, Ueki K, Inabe K, Yamauchi T, Kaneko K, Okazaki Y, Bardeesy N, Ohnishi S, Nagai R, Kadowaki T (2009) Adiponectin suppresses hepatic SREBP1c expression in an AdipoR1/LKB1/AMPK dependent pathway, *Biochem Biophys Res Commun*, 382, 51-56.

Awazawa M, Ueki K, Inabe K, Yamauchi T, Kubota N, Kaneko K, Kobayashi M, Iwane A, Sasako T, Okazaki Y, Ohsugi M, Takamoto I, Yamashita S, Asahara H, Akira S, Kasuga M, Kadowaki T (2011) Adiponectin enhances insulin sensitivity by increasing hepatic IRS-2 expression via a macrophage-derived IL-6-dependent pathway, *Cell Metab*, 13, 401-412.

Bal NC, Maurya SK, Sopariwala DH, Sahoo SK, Gupta SC, Shaikh SA, Pant M, Rowland LA, Bombardier E, Goonasekera SA, Tupling AR, Molkentin JD, Periasamy M (2012) Sarcolipin is a newly identified regulator of muscle-based thermogenesis in mammals, *Nat Med*, 18, 1575-

1579.

Benton CR, Holloway GP, Han XX, Yoshida Y, Snook LA, Lally J, Glatz JF, Luiken JJ, Chabowski A, Bonen A (2010) Increased levels of peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha (PGC-1alpha) improve lipid utilisation, insulin signalling and glucose transport in skeletal muscle of lean and insulin-resistant obese Zucker rats, *Diabetologia*, 53, 2008-2019.

Bieber LL, Abraham T, Helmrath T (1972) A rapid spectrophotometric assay for carnitine palmitoyltransferase, *Anal Biochem*, 50, 509-518.

Bruce CR, Hoy AJ, Turner N, Watt MJ, Allen TL, Carpenter K, Cooney GJ, Febbraio MA, Kraegen EW (2008) Overexpression of carnitine palmitoyltransferase-1 in skeletal muscle is sufficient to enhance fatty acid oxidation and improve high-fat diet-induced insulin resistance, *Diabetes*, 58, 550-558.

Carvalho AP, Malcata FX (2005) Preparation of fatty acid methyl esters for gas-chromatographic analysis of marine lipids: insight studies, *J Agric Food Chem*, 53, 5049-5059.

Ceddia RB, Somwar R, Maida A, Fang X, Bikopoulos G, Sweeney G (2005) Globular adiponectin increases GLUT4 translocation and glucose uptake but reduces glycogen synthesis in rat skeletal muscle cells, *Diabetologia*, 48, 132-139.

Combs TP, Wagner JA, Berger J, Doebber T, Wang WJ, Zhang BB, Tanen M, Berg AH, O'Rahilly S, Savage DB, Chatterjee K, Weiss S, Larson PJ, Gottesdiener KM, Gertz BJ, Charron MJ, Scherer PE, Moller DE (2002) Induction of adipocyte complement-related protein of 30 kilodaltons by PPAR agonists: a potential mechanism of insulin sensitization, *Endocrinology* 143, 998-1007.

Daneshmand R, Kurl S, Tuomainen TP, Virtanen JK (2017) Associations of estimated  $\Delta$ -5-desaturase and  $\Delta$ -6-desaturase activities with stroke risk factors and risk of stroke: the Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor Study, *Br J Nutr*, 117, 582-590.

DeFronzo RA, Barzilai NIR, Simonson DC (1991) Mechanism of metformin action in obese and lean noninsulin-dependent diabetic subjects, *J Clin Endocrinol Metab*, 73, 1294-1301.

Ducluzeau PH, Fletcher LM, Welsh GI, Tavaré JM (2002) Functional consequence of targeting protein kinase B/Akt to GLUT4 vesicles, *J Cell Sci*, 115, 2857-2866.

Ferreira EDS, Silva MA, Demonte A, Neves VA (2011) Soy  $\beta$ -conglycinin (7S globulin) reduces plasma and liver cholesterol in rats fed hypercholesterolemic diet, *J Med Food*, 14, 94-100.

Fukui K, Tachibana N, Wanezaki S, Tuzaki S, Takamatsu K, Yamamoto T, Hashimoto Y, Shimoda T (2002) Isoflavone-free soy protein prepared by column chromatography reduces plasma cholesterol in rats, *J Agric Food Chem*, 50, 5717-5721.

Fukui K, Kojima M, Tachibana N, Kohno M, Takamatsu K, Hirotsuka M, 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.

Fruebis J, Tsao TS, Javorschi S, Ebbets-Reed D, Erickson MR, Yen FT, Bihain BE, Lodish HF (2005) Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice, *Proc Natl Acad Sci USA*, 98, 2005-2010.

Hamilton RMG, Carroll KK (1976) Plasma cholesterol levels in rabbits fed low fat, low cholesterol diets Effects of dietary proteins, carbohydrates and fibre from different sources, *Atherosclerosis*, 24, 47-62.

Hashimoto T, Miyazawa S, Gunarso D, Furuta S (1981)  $\alpha$ -Amanitin inhibits the oxidation of long chain fatty acids in mouse liver, *J Biol Chem*, 90, 415-421.

Hattori Y, Suzuki M, Hattori S, Kasai K (2003) Globular adiponectin upregulates nitric oxide production in vascular endothelial cells, *Diabetologia*, 46, 1543-1549.

Horton JD, Goldstein JL, Brown MS (2002) SREBPs: Activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver, *J Clin Invest*, 109, 1125-1131.

Huang YS, Cunnane SC, Horrobin DF (1986) Effect of different dietary proteins on plasma and liver fatty acid compositions in growing rats, *Proc Soc Exp Biol Med*, 181, 399-403.

Hurst PL, Lovell-Smith CJ (1981) Optimized assay for serum angiotensin converting enzyme

activity, *Clin Chem*, 27, 2048-2052.

Ide T, Shimano H, Yahagi N, Matsuzaka T, Nakakuki M, Yamamoto T, Nakagawa Y, Takahashi A, Suzuki H, Sone H, Toyoshima H, Fukamizu A, Yamada N (2004) SREBPs suppress IRS-2-mediated insulin signaling in the liver, *Nat Cell Biol*, 6, 351-357.

Ishihara K, Oyaizu S, Fukuchi Y, Mizunoya W, Segawa K, Takahashi M, Mita Y, Fukuya Y, Fushiki T, Yasumoto K (2003) A soybean peptide isolate diet promotes postprandial carbohydrate oxidation and energy expenditure in type II diabetic mice, *J Nutr*, 133, 752-757.

Inoue N, Fujiwara Y, Kato M, Funayama A, Ogawa N, Tachibana N, Kohno M, Ikeda I (2015) Soybean  $\beta$ -conglycinin improves carbohydrate and lipid metabolism in Wistar rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem*, 79, 1528-1534.

Iwabu M, Yamauchi T, Okada-Iwabu M, Sato K, Nakagawa T, Funata M, Yamaguchi M, Namiki S, Nakayama R, Tabata M, Ogata H, Kubota N, Takamoto I, Hayashi YK, Yamauchi N, Waki H, Fukayama M, Nishino I, Tokuyama K, Ueki K, Oike Y, Ishii S, Hirose k, Shimizu T, Touhara K, Kadowaki K (2010) Adiponectin and AdipoR1 regulate PGC-1 $\alpha$  and mitochondria by Ca<sup>2+</sup> and AMPK/SIRT1, *Nature*, 464, 1313-1319.

Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N, Hara H, Ueki H, Tobe K (2006) Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome, *J Clin Invest*, 116, 1784-1792.

Kagota S, Yamaguchi Y, Tanaka N, Kubota Y, Kobayashi K, Nejime N, Nakamura K, Kunitomo M, Shinozuka K (2006) Disturbances in nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate system in SHR/NDmcr-cp rats, a model of metabolic syndrome, *Life Sci*, 78, 1187-1196.

Kaplan NM (1989) The deadly quartet: upper-body obesity, glucose intolerance, hypertriglyceridemia, and hypertension, *Arch Intern Med*, 149, 1514-1520.

Karbowska J, Kochan Z (2006) Role of adiponectin in the regulation of carbohydrate and lipid metabolism, *J Physiol Pharmacol*, 57, 103-113.

Keane PM, Kay JM, Suyama KL, Gauthier D, Andrew K (1982) Lung angiotensin converting enzyme activity in rats with pulmonary hypertension, *Thorax*, 37, 198-204.

- Kelley DS, Nelson GJ, Hunt JE (1986) Effect of prior nutritional status on the activity of lipogenic enzymes in primary monolayer cultures of rat hepatocytes, *Biochem J*, 235, 87-90.
- Kelley DS, Kletzien RF (1984) Ethanol modulation of the hormonal and nutritional regulation of glucose 6-phosphate dehydrogenase activity in primary cultures of rat hepatocytes, *Biochem J*, 217, 543-549.
- Lee Y, Lingvay I, Szczepaniak LS, Ravazzola M, Orci L, Unger RH (2010) Pancreatic steatosis: harbinger of type 2 diabetes in obese rodents, *Int J Obes*, 34, 396-400.
- Lin J, Wu H, Tarr PT, Zhang CY, Wu Z, Boss O, Michael LF, Puigserver P, Isotani E, Olson EN, Lowell BB, Bassel-Duby R, Spiegelman BM (2002) Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres, *Nature*, 418, 797-801.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(-Delta Delta C (T)) methods, *Methods*, 25, 402-408.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent, *J Biol Chem*, 193, 265-275.
- MacPherson RE, Gamu D, Frendo-Cumbo S, Castellani L, Kwon F, Tupling AR, Wright DC (2016) Sarcolipin knockout mice fed a high-fat diet exhibit altered indices of adipose tissue inflammation and remodeling, *Obesity*, 24, 1499-1505.
- Matsuzawa Y (1997) Pathophysiology and molecular mechanisms of visceral fat syndrome: the Japanese experience, *Diabetes Metab Rev*, 13, 3-13.
- Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC (1985) Homeostasis model assessment: Insulin resistance and  $\beta$ -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentration in man, *Diabetologia*, 28, 412-419.
- Maurya SK, Bal NC, Sopariwala DH, Pant M, Rowland LA, Shaikh SA, Periasamy M (2015) Sarcolipin is a key determinant of the basal metabolic rate, and its overexpression enhances energy expenditure and resistance against diet-induced obesity, *J Biol Chem*, 24, 10840-10849.

Michael LF, Wu Z, Cheatham RB, Puigserver P, Adelmant G, Lehman JJ, Kelly DP, Spiegelman BM (2001) Restoration of insulin-sensitive glucose transporter (GLUT4) gene expression in muscle cells by the transcriptional coactivator PGC-1, *Proc Natl Acad Sci USA*, 98, 3820-3825.

Morifuji M, Sanbongi C, Sugiura K (2006) Dietary soya protein intake and exercise training have an additive effect on skeletal muscle fatty acid oxidation enzyme activities and mRNA levels in rats, *Br J Nutr*, 96, 469-475.

Moriyama T, Kishimoto K, Nagai K, Urade R, Ogawa T, Utsumi S, Maruyama N, 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.

Ochoa S (1955) "Malic"enzyme, *Method Enzymol*, 1, 739-753.

Ohashi K, Kihara S, Ouchi N, Kumada M, Fujita K, Hiuge A, Hibuse T, Ryo M, Nishizawa H, Maeda N, Maeda K, Shibata R, Walsh K, Funahashi T, Shimomura I (2006) Adiponectin replenishment ameliorates obesity-related hypertension, *Hypertension*, 47, 1108-1116.

Ohashi K, Ouchi N, Matsuzawa Y (2011) Adiponectin and hypertension, *Am J Hypertens*, 24, 263-269.

Okamoto K, Aoki K (1963) Development of a strain of spontaneously hypertensive rats, *Jpn Circ J*, 27, 282-293.

Ouchi N, Ohishi M, Kihara S, Funahashi T, Nakamura T, Nagaretani T, Kumada M, Ohashi K, Okamoto Y, Nishizawa H, Kishida K, Maeda N, Nagasawa A, Kobayashi H, Hirooka H, Komai N, Kaibe M, Rakugi H, Ogihara T (2003) Association of hypo adiponectinemia with impaired vasoreactivity, *Hypertension*, 42, 231-234.

Ouchi N, Kobayashi H, Kihara S, Kumada M, Sato K, Inoue T, Funahashi T, Walsh K (2004) Adiponectin stimulates angiogenesis by promoting cross-talk between amp-activated protein kinase and akt signaling in endothelial Cells, *J Biol Chem*, 279, 1304-1309.

Reaven GM (1988) Role of insulin resistance in human disease, *Diabetes*, 37, 1595-1607.



Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC (1993) AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet, *J Nutr*, 123, 1939-1951.

Rouser G, Siakotos AN, Fleischer S (1966) Quantitative analysis of phospholipids by thin-layer chromatography and phosphorus analysis of spots, *Lipids*, 1, 85-86.

Saito, M (1990) Effects of soy protein peptides on sympathetic nerve activity, 大豆タンパク質栄養研究会会誌, 11, 95-97.

Saito, M (1991) Effects of soy peptides on energy metabolism in obese animals, 大豆タンパク質栄養研究会会誌, 12, 91-94.

Saito, M (1992) Effects of soy peptides on weight reduction in hypothalamic obese mice, 大豆タンパク質栄養研究会会誌, 13, 50-52.

Samoto M, Maebuchi M, Miyazaki C, Kugitani H, Kohno M, Hirotsuka M, Kito M (2007) Abundant proteins associated with lecithin in soy protein isolate, *Food Chem*, 102, 317-322.

Schweiger M, Schreiber R, Haemmerle G, Lass A, Fledelius C, Jacobsen P, Tornqvist H, Zechner R, Zimmermann R (2006) Adipose triglyceride lipase and hormone sensitive lipase are the major enzymes in adipose tissue triacylglycerol catabolism, *J Biol Chem*, 281, 40236-40241.

Shimomura I, Matsuda M, Hammer RE, Bashmakov Y, Brown MS, Goldstein JL (2000) Decreased IRS-2 and increased SREBP-1c lead to mixed insulin resistance and sensitivity in livers of lipodystrophic and ob/ob mice, *Mol Cell*, 6, 77-86.

Song S, Zhang Y, Ma K, Jackson-Hayes L, Lavrentyev EN, Cook GA, Elam MB, Park EA (2004) Peroxisomal proliferator activated receptor gamma coactivator (PGC-1 alpha) stimulates carnitine palmitoyltransferase I (CPT-I alpha) through the first intron, *Biochim Biophys Acta*, 1679, 164-173.

Srinivasan K, Ramarao P (2007) Animal model in type 2 diabetes research: An overview, *Indian J Med Res*, 125, 451-472.

Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL (1989) Beyond cholesterol.

Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med*, 320, 915-924.

Sugano M, Yamada Y, Yoshida K, Hashimoto Y, Matsuo T, Kimoto M (1988) The hypocholesterolemic action of the undigested fraction of soybean protein in rats, *Atherosclerosis*, 72, 115-122.

Summermatter S, Baum O, Santos G, Hoppeler H, Handschin C (2010) Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) promotes skeletal muscle lipid refueling in vivo by activating de novo lipogenesis and the pentose phosphate pathway, *J Biol Chem*, 285, 32793-32800.

Surette ME, Whelan J, Broughton KS, Kinsella JE (1992) Evidence for mechanisms of the hypotriglyceridemic effect of n-3 polyunsaturated fatty acids, *Biochim Biophys Acta*, 1126, 199-205.

Tachibana N, Iwaoka Y, Hirotsuka M, Horio F, 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.

Tachibana N, Yamashita Y, Nagata M, Wanezaki S, Ashida H, Horio F, Kohno M (2014) Soy  $\beta$ -conglycinin improves glucose uptake in skeletal muscle and ameliorates hepatic insulin resistance in Goto-Kakizaki rats, *Nutr Res*, 34, 160-167.

Tadaishi M, Miura S, Kai Y, Kano Y, Oishi Y, Ezaki O (2011) Skeletal muscle-specific expression of PGC-1 $\alpha$ -b, an exercise-responsive isoform, increases exercise capacity and peak oxygen uptake, *PLoS One*, 6, e28290.

Tian J, Goldstein JL, Brown MS (2016) Insulin induction of SREBP-1c in rodent liver requires LXR $\alpha$ -C/EBP $\beta$  complex, *Proc Natl Acad Sci USA*, 113, 8182-8187.

Tobin KA, Ulven SM, Schuster GU, Steineger HH, Andresen SM, Gustafsson JA, Nebb HI (2002) Liver X receptors as insulin-mediating factors in fatty acid and cholesterol biosynthesis, *J Biol Chem*, 277, 10691-10697.

Torre-Villalvazo I, Tovar AR, Ramos-Barragán VE, Cerbón-Cervantes MA, Torres N (2008) Soy protein ameliorates metabolic abnormalities in liver and adipose tissue of rats fed a high fat

diet, *J Nutr*, 138, 462-468.

Wang C, Mao X, Wang L, Liu M, Wetzel MD, Guan KL, Dong LQ, Liu F (2007) Adiponectin sensitizes insulin signaling by reducing p70 S6 kinase-mediated serine phosphorylation of IRS-1, *J Biol Chem*, 282, 7991-7996.

Wade AJ, Marbut MM, Round JM (1990) Muscle fibre type and aetiology of obesity, *Lancet*, 335, 805-808.

Werner H, Katz J (2004) The emerging role of the insulin-like growth factors in oral biology, *J Dent Res*, 83, 832-836.

Withers DJ, Gutierrez JS, Towery H, Burks DJ, Ren JM, Previs S, Zhang Y, Bernal D, Pons S, Shulman GI, Bonner-Weir S, White MF (1998) Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice, *Nature*, 26, 900-904.

Wellen KE, Hotamisligil GS (2005) Inflammation, stress, and diabetes, *J Clin Invest*, 115, 1111-1119.

Wende AR, Schaeffer PJ, Parker GJ, Zechner C, Han DH, Chen MM, Hancock CR, Lehman JJ, Huss JM, McClain, DA, Holloszy JO, Kelly DP (2007) A role for the transcriptional coactivator PGC-1alpha in muscle refueling, *J Biol Chem*, 282, 36642-36651.

Xu A, Wang Y, Keshaw H, Xu LY, Lam KS, Cooper GJ (2003) The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice, *J Clin Invest*, 112, 91-100.

Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Akanuma Y, Gavilova O, Vison C, Reitman M, Kagechika H, Shudo K, Yoda M, Nakano Y, Tobe K, Nagi R, Kimura S, Tomita M, Froguel P, Kadowaki T (2001) The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity, *Nat Med*, 7, 941-946.

Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, Eto K, Akanuma Y, Froguel P, Foufelle F, Ferre P, Carling D, Kimura S, Nagai R, Kahn

BB, Kadowaki T (2002) Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase, *Nat Med*, 8, 1288-1295.

Yamazaki T, Kishimoto K, Miura S, Ezaki O (2012) Dietary  $\beta$ -conglycinin prevents fatty liver induced by a high-fat diet by a decrease in peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ 2 protein, *J Nutr Biochem*, 23, 123-132.

Yoon MJ, Lee GY, Chung JJ, Ahn YH, Hong SH, Kim JB (2006) Adiponectin increases fatty acid oxidation in skeletal muscle cells by sequential activation of AMP-activated protein kinase, p38 mitogen-activated protein kinase, and peroxisome proliferator-activated receptor alpha, *Diabetes*, 55, 2562-2570.

Yu C, Chen Y, Cline GW, Zhang D, Zong H, Wang Y, Bergeron R, Kim JK, Cushman SW, Cooney GJ, Atcheson B, White MF, Kraegen EW, Shulman GI (2002) Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle, *J Biol Chem* 277, 50230-50236.

北 徹 (1998) 加齢と動脈硬化, 日老医誌, 35, 805-810.

古場一哲, 菅野道廣 (2002) ラットにおける脂質代謝に及ぼす食餌タンパク質とコレステロールの相互作用, 必須アミノ酸研究, 164, 52-55

古場一哲, 及川大地, 田丸静香, 田中一成, 菅野道廣 (2011)  $\beta$ -コングリシニンの栄養生理機能に関する研究摂食量およびアミノ酸組成の影響について, 大豆たん白質研究, 14, 91-95.

古場一哲, 福田英里子, 田丸静香, 及川大地 (2013)  $\beta$ -コングリシニンの脂質代謝調節機能および糖代謝調節機能に関する栄養化学的研究, 大豆たん白質研究, 16, 48-52.

岳中典男 (1975) プロスタグランジンと循環系, 心臓, 7, 765-772.

平成 29 年度 人口動態統計(確定数)の概況 厚生労働省

平成 28 年度 国民健康・栄養調査 厚生労働省

八木橋操六, 寺内康夫, 森豊, 池上博司, 佐藤譲 (2010) 実験動物における糖尿病の診断基準について, *糖尿病*, 53, 379-384.

山本潤子, 池田克巳, 奈良安雄, 家森幸男 (1997) 肥満・高血圧自然発症ラット SHR/NDmcr-cp. *Biochem Biophys Res Commun*, 231, 582-585.