

緑豆タンパク質 8S α グロブリンのインスリン感受性亢進作用と 脂肪肝抑制作用の検証

名古屋大学大学院生命農学研究科 応用分子生命科学専攻

小林 美里

1. 研究の目的と背景

モヤシ種子として利用されている緑豆 (mung bean) の可食部の 20% はタンパク質である 8S α グロブリン (8S α globulin) が占める。この 8S α グロブリンは大豆タンパク質の β -コングリシニン (β -CG) と高い相同性 (70%) を持ちながら (*Acta Cryst.*, D62:824 (2006)), β -CG に比べて極めて効率的に精製できるという利点を持つ。精製した 8S α グロブリンの食品への有効利用が期待されるが、このタンパク質の生理機能の解析例はほとんどない。そこで本研究では、緑豆 8S α グロブリンのインスリン感受性亢進作用と脂肪肝抑制作用を 2 型糖尿病・脂肪肝モデルである KK- A^y マウスを用いて検討することを目的とし、緑豆 8S α グロブリンが新規かつ利用性の高い糖尿病および脂肪肝予防食品素材であることを示す基礎的知見を構築する。

2. 研究の方法

インスリン抵抗性 (インスリン感受性の低下) を主因として 2 型糖尿病・脂肪肝を発症する KK- A^y マウスを用いて、8S α グロブリン摂取のインスリン感受性亢進効果と脂肪肝抑制効果を検討する。飼料作成に使用するタンパク質として 8S α グロブリンを 80% 以上の含量で含む分離緑豆タンパク質 (MPI) を用いて、MPI を 20% 含む飼料の摂取群 (MPI 群) を設けた。対照タンパク質としてマウスおよびラットの実験用試料として世界的スタンダードである AIN93 飼料に用いられているカゼインを用いてカゼインを 20% 含む飼料の摂取群 (Casein 群) を設けた。さらに、今までにインスリン感受性亢進作用が報告されている β -CG を 20% 含む飼料の摂取群 (β -CG 群) を設けて合計 3 群で比較した。以下の 2 種の実験を行った。

【実験 1】

KK- A^y マウス (4 週齢, 雄) に各飼料 (3 群, 各群 6-7 匹) を 22 日間与えた。実験期間中に血糖値と血中インスリン濃度の経時的測定とインスリン負荷試験 (インスリン感受性判定試験, 一晩絶食後にインスリン 0.15 U/kg BW を腹腔内注射) を行い、解剖時の肝臓脂質量を測定した。肝臓、骨格筋、脂肪組織でのインスリン感受性に関与する因子の発現レベルと、肝臓の脂質代謝関連因子の発現レベルを測定した。

【実験 2】

実験 1 と同一の飼育実験を行い、20 日目に KK- A^y マウスを絶食後にインスリン (0.67 U/kgBW) を腹腔内注射して、肝臓、骨格筋、脂肪組織のインスリンシグナル伝達因子 (インスリン受容体および Akt) の活性化 (リン酸化) を 3 群で比較した。また、対照群としてインスリンの代わりに生理食塩水を腹腔内注射する 3 飼料群も設け、合計 6 群とした。

結果の有意差検定は、3 群間の Scheffe test により $P < 0.05$ の場合を有意とした。

3. 研究内容

【実験 1】 MPI の個体レベルでのインスリン感受性亢進作用と脂肪肝抑制作用

カゼイン群の血糖値上昇に比べて β -CG 群と MPI 群では 7 日目および 14 日目において血糖値の上昇が有意に抑制された。実験開始後 18 日目に実施したインスリン負荷試験では、カゼイン群に比べて β -CG 群ではインスリン投与後 30 分の血糖値が有意に低く、MPI 群でも 30 分後の血糖値が有意な低値を示した。これらの結果は、カゼイン群に比べて β -CG 群と MPI 群では個体全体のインスリン感受性が亢進していることを示している。解剖時の非絶食時血中インスリン濃度はカゼイン群に比べて β -CG 群が低い傾向が観察され、MPI 群ではさらに低い値を示した。このこともインスリン負荷試験の結果と一致していた。

解剖時の肝臓重量は、カゼイン群に比べて β -CG 群は有意ではないが低値を示し、MPI 群では有意に低い値となった。この肝臓の脂肪含量を測定したところ、カゼイン群は高いトリグリセリド (TG) 含量を示し、顕著な脂肪肝が見られた。 β -CG 群ではトリグリセリド含量は有意ではないが低下し、MPI 群では有意に低下した。肝臓の脂質代謝関連の遺伝子の mRNA レベルを測定した結果、脂肪酸合成系遺伝子の発現を正に制御する SREBP-1 のレベルがカゼイン群に比べて β -CG 群と MPI 群で有意に低下した。SREBP-1 に制御される脂肪酸合成酵素 (FAS), Acetyl CoA carboxylase (ACC) の mRNA レベルも SREBP-1 同様にカゼイン群に比べて MPI 群で有意に低下していた。これらの結果は、MPI 群では脂肪酸の生合成がカゼイン群に比べて低下していることが強く推定され、肝臓 TG 含量の低下の要因になっていると考えられた。

【実験2】MPIの肝臓、脂肪組織、骨格筋におけるインスリンシグナル伝達に対する促進効果の検討

肝臓、脂肪組織および骨格筋におけるインスリンシグナルの伝達系を図1に示した。各組織の細胞の細胞膜上にあるインスリン受容体（IR）がインスリンを認識すると、受容体の細胞内ドメインのチロシン（Tyr）残基がリン酸化されると同時に細胞内タンパク質 IRS-1 および IRS-2 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 IRS は PI3-キナーゼのリン酸化を行い、それに続いて PI3-キナーゼは Akt のリン酸化を行い、図1に示すような種々のインスリン作用が発揮される。本研究では、各群のマウスを各飼料で20日間飼育後、一晚絶食を行って血中インスリンを絶食レベルの低値にした。そして、イ

ンスリンを腹腔内注射によって各群に投与した。同時に、対照群として生理食塩水を投与する各飼料群を設けた。インスリン投与後15分後の各群のマウスの肝臓、脂肪組織および骨格筋の IR と Akt のリン酸化レベルを測定した。脂肪組織（精巢上体脂肪組織）の IR のリン酸化レベルはカゼイン群、 β -CG 群および MPI 群の間で差は見られなかった。しかしながら、Akt のリン酸化レベルはカゼイン群に比べて MPI 群で有意に上昇していた。 β -CG 群においても Akt のリン酸化レベルはカゼイン群よりも有意に上昇していた。肝臓と骨格筋（腓腹筋とヒラメ筋の両者を含む筋肉）の解析結果は示していないが、両組織において IR リン酸化レベルおよび Akt リン酸化レベルともに各飼料の摂取により有意な変化は観察されなかった。

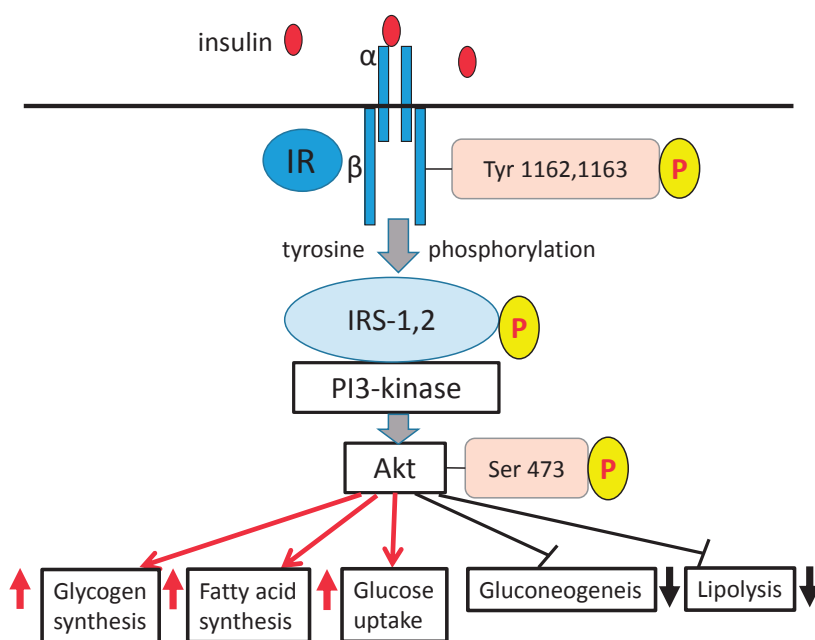


図1 インスリンシグナル伝達とインスリン作用の概路

4. 研究の実施経過

実験1については、血糖値（非絶食時血糖値）の経時的変化と組織サンプリングを行う実験1回と、全く同様の計画でインスリン負荷試験を行う実験1回の計2回を行った。2回の実験を行った第一の理由は、インスリン負荷試験実施の際には一晚の絶食を行った後にインスリン投与をしてさらに血糖値の降下を測定するため、非絶食時血糖値を数日間にわたって大きく低下させてしまうからである。第二の理由は、MPI 摂取の血糖値低下作用の再現性を確認できるからである。

実験2については、投与するインスリン量を0.67 U/kgBW と1.5 U/kgBW とにして予備実験を行って各組織のインスリンシグナルを確認し、インスリン投与量を0.67 U/kgBW に決定した。本実験においては、インスリン投与後15分においてマウスから肝臓、脂肪組織および骨格筋を迅速かつ一定に採取する実験に成功した。

5. 研究から得た結論・考察

- (1) 実験用マウスおよびラットの実験用精製飼料の世界的標準飼料である AIN93G (J.Nutr.,123:1939 (1993)) のタンパク質であるカゼインを比較対照として、MPI のインスリン感受性改善効果と脂肪肝改善効果を検討することは国内的にも国際的にも評価されるものと考えられる。本研究の結果より、MPI は体全体のインスリン感受性を亢進して、血糖値上昇の抑制と血中インスリン濃度の上昇抑制をもたらす食品タンパク質であることが見出された。そして、絶食により血中のインスリンプールを低レベルにした状態でインスリンを投与して各組織でのインスリンシグナル伝達を測定した結果、MPI 摂取はカゼインに比べて脂肪組織でインスリンによる Akt リン酸化を有意に上昇させる結果を得ることができ、インスリン感受性亢進を組織レベルで直接に証明することができた。MPI がなぜ脂肪組

織に対して作用が強いのかについては今後の研究で明らかにしていくべき課題である。

- (2) インスリン抵抗性の存在によって肝臓での脂肪酸合成が上昇したままの状態では脂肪肝を発症している KK- A^y マウスにおいて、MPI 摂取は肝臓トリグリセリド含量をカゼインに比べて有意に低下させ、脂肪酸合成を正に制御する転写因子 SREBP1 の発現を低下させて脂肪酸合成系酵素の発現も低下させることが初めて明らかとなった。脂肪肝は肝臓のみならず肝外組織のインスリン抵抗性に導く代謝異常であることから、前述の MPI のインスリン感受性亢進効果の一員として脂肪肝改善が寄与していると考えられる。これらの結果から、MPI は肥満症や 2 型糖尿病などのインスリン抵抗性を持つ患者に対して、肝機能維持を目指した脂肪肝改善タンパク質として有望な素材となる。

6. 残された課題、今後の課題

MPI がインスリン抵抗性改善効果あるいは脂肪肝改善効果を発揮するメカニズムは現在では明らかではない。1 つの仮説として、アミノ酸組成に着目すると MPI や β -CG はカゼインに比べてアルギニン含量が高いことから、このアミノ酸が MPI の効果に寄与している可能性が考えられる。今後はカゼインにアルギニンを添加して検討する実験や、アミノ酸を窒素源とする飼料を作成して検討する実験を計画して、アルギニンのインスリン感受性・脂肪肝改善作用を検討することが必要と考える。

また、 β -CG のアミノ酸配列の中にはインスリン抵抗性改善作用を発揮するペプチドである Soymorphin-5 (Am.J.Physiol.,302:E433 (2012)) があるが、このようなインスリン抵抗性改善効果や脂肪肝改善作用を持つペプチドが 8S α -グロブリンの構造の中に存在している可能性はある。Soymorphin-5 の構造は 8S α -グロブリンの中には存在しないが、今後、このような活性ペプチドの探索も必要な課題と思われる。