

## 平成23年度豆類振興事業調査研究（雑豆需要促進研究）成果概要

### 1 課題名

胎生期低栄養に起因する糖尿病の小豆ポリフェノールによる予防効果の検討

### 2 研究組織及び研究者

青森県立保健大学 健康科学部 栄養学科 教授 佐藤 伸

青森県立保健大学 健康科学部 栄養学科 助教 向井 友花

### 3 成果概要

#### (1) 研究目的

近年、胎児期や新生児期の低栄養状態が、成人期における糖や脂質の代謝異常の発症リスクを高めることが明らかになりつつある。しかし、胎児・新生児期の低栄養環境によって児に生じる糖や脂質の代謝異常に影響を及ぼす食品成分についての知見は少ない。

AMP活性化プロテインキナーゼ（AMP-activated protein kinase: AMPK）は、細胞内のエネルギーの重要なセンサーとして働き、エネルギー代謝を制御する重要な酵素である<sup>1)</sup>。たとえば、AMPKの活性化により、脂肪酸の合成や酸化を調節する酵素であるアセチル-CoA カルボキシラーゼ（acetyl-CoA carboxylase: ACC）がリン酸化されると、その活性が抑制され、「脂肪燃焼」が亢進する<sup>2)</sup>。しかし、AMPK活性に及ぼす小豆の影響に関する知見はほとんどない。

本研究では、妊娠中に低栄養状態とした母ラットの授乳期に小豆ポリフェノールを多く含む小豆種皮（小豆 PP）含有餌を摂取させ、産まれた仔ラットにおける小豆 PP の生理調節機能を明らかにするために、小豆 PP は、①成長後の仔ラットの血糖値を低下させるか、②仔ラットの肝臓の AMPK 発現及び活性に影響を及ぼすかを検討した。

#### (2) 研究方法

##### 1) 実験デザイン

本研究は、青森県立保健大学動物実験委員会の承認を得て「青森県立保健大学動物実験に関する指針」に従って実施された。雌性 Wistar 系ラット（13～14 週齢）を交配させ、妊娠確認後、妊娠期・授乳期全期間を通じて 20%カゼイン含有食群（CC 群）、妊娠期 8%カゼイン含有食＋授乳期 20%カゼイン含有食群（LPC 群）、及び妊娠期 8%カゼイン含有食＋授乳期 1.0%小豆 PP を添加した 20% カゼイン含有食群（LPAP 群）の 3 群に分けた。仔ラットは離乳時（3 週齢）に血漿及び肝臓を採取した。残りの仔ラットは標準動物飼料で飼育し、23 週齢のときに血漿及び肝臓を採取した。

##### 2) 血液生化学検査及び肝臓中のトリグリセリド濃度の測定

血漿中のグルコース（Glc）、トリグリセリド（Tg）、総コレステロール（T-cho）及びアディポネクチンを測定した。Folch 法により脂質を抽出した後、肝臓の Tg 濃度を測定した。

##### 3) ウェスタンブロット法

肝臓をホモジネイトし、タンパク質濃度を測定した。その後、SDS-PAGE電気泳動法に供しブロッティングした。AMPK抗体（1：1000 希釈）とリン酸化AMPK（p-AMPK）抗体（1：1000 希釈）、リン酸化ACC（p-ACC）抗体（1：500 希釈）及びβ-actin抗体（1：500 希釈）を反応させた後、二次抗体を反応させた。抗原検出にはECLウェスタンブロッティング検出試薬を用いた。

#### 4) リアルタイム PCR

肝臓からの総 RNA を抽出し cDNA を合成した。この cDNA を用いて Sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c) の mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法により評価した。内在性コントロールとして glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を用いた。

### (3) 研究成果

#### 1) 授乳期及び離乳期以後の出生仔の体重の変化

授乳期の仔ラットの体重は、3 群ともに順調に増加し、群間に有意な差は認められなかった。14 週齢以降では、LPAP 群の体重は、LPC 群に比べて有意に低値を示した。

#### 2) 授乳期の小豆 PP 摂取が仔ラットの血液生化学検査値に及ぼす影響

23 週齢の仔ラットの血漿 Tg 及び T-cho 濃度では 3 群間に有意差はみられなかった。LPAP 群の Glc 濃度は、LPC 群に比べてやや減少傾向がみられた。LPAP 群の血漿アディポネクチン濃度は LPC 群に比べて高値を示した (表 1)。

表 1. 授乳期の小豆 PP 摂取が仔ラット(23 週齢)の血液生化学検査値に及ぼす影響

	CC 群	LPC 群	LPAP 群
トリグリセリド(mg/dl)	108±12	159±25	142±19
総コレステロール (mg/dl)	63±3	69±7	64±5
グルコース (mg/dl)	153±5	150±6	144±4
アディポネクチン (ng/ml)	643±24	582±11 <sup>a</sup>	658±15 <sup>b</sup>

CC 群, 妊娠期・授乳期期間を通じて、20%カゼイン含有食群; LPC 群, 妊娠期 8%カゼイン含有食+授乳期 20%カゼイン含有食群; LPAP 群, 妊娠期 8%カゼイン含有食+授乳期 1.0%小豆 PP を添加した 20% カゼイン含有食群。  
値は平均値±標準誤差 (n=5-11)。<sup>a</sup>p<0.05 vs CC群。<sup>b</sup>p<0.05 vs LPC群。

#### 3) 授乳期の小豆 PP 摂取が仔ラットの肝臓中 Tg 濃度に及ぼす影響

LPAP 群の肝臓中の Tg 濃度は、LPC 群に比べて有意に低値を示した。すなわち、CC 群 ; 29.2±2.8 mg/g 肝重量 (n=7)、LPC 群 ; 39.9±3.4 mg/g 肝重量 (n=4)、LPAP 群 ; 27.4±1.7 mg/g 肝重量 (n=11) (p<0.05 vs LPC 群) であった。この結果は授乳期に母ラットが摂取した小豆 PP は仔ラットの肝臓中 Tg 濃度を低下させることを示唆していた。

#### 4) 授乳期の小豆 PP 摂取が仔ラットの肝臓の AMPK 及び ACC 発現に及ぼす影響

3 週齢の仔ラット肝臓中の総AMPKのタンパク質の発現量は 3 群ともに有意な差は見られなかった。一方、LPAP群のリン酸化したAMPKのタンパク質量はLPC群に比べて有意に高値を示した。23 週齢の仔ラットの肝臓も同様に、AMPKのタンパク質量は 3 群ともに有意な差は見られなかったが、LPAP群のリン酸化したAMPKのタンパク質量はLPC群に比べて高値であった (図 1)。ケルセチン、カテキンやレスベラトロールはAMPKのアクチベーターとして知られている<sup>3)</sup>。また、小豆PPにはカテキンやケルセチンが含まれている<sup>4)</sup>。一方、アディポネクチンは、AMPKを活性化することも知られている。このことから、授乳期に母ラットが摂取した小豆PPは、直接あるいはアディポネクチン濃度の増加を介して、仔ラットの肝臓中のAMPK活性を上昇させることが推察された。

AMPK が活性化すると、ACC はリン酸化され、活性が抑制される。そこで、リン酸化 ACC のタンパク質量を検討した。23 週齢の LPAP 群のリン酸化 ACC の発現量は、LPC 群に比べてほとんど差は認められなかった。

#### 5) 授乳期の小豆 PP 摂取が仔ラットの肝臓の SREBP-1c の mRNA 発現に及ぼす影響

SREBP-1cは、肝臓や脂肪組織などにおいてACCや脂肪酸合成酵素などの脂質合成に関連した酵素の遺伝子発現を促進する転写因子である<sup>6)</sup>。肝臓でSREBP-1cの発現が増加すると、脂肪酸やTgの合成を促進して高Tg血症の原因となる<sup>5)</sup>。

そこで、授乳期の小豆PP摂取が仔ラット肝臓のSREBP-1cのmRNA発現量に及ぼす影響を検討した。その結果、23週齢の仔ラットのSREBP-1cのmRNA発現量を比較すると、LPC群に比べてLPAP群の発現量は有意に低下していた(図2)。これらの結果は、授乳期の小豆PP摂取が仔ラット肝臓中のSREBP-1cの

mRNA発現を抑制することを示唆している。AMPKが活性化するとSREBP-1cの発現が抑制されることが報告されているので<sup>6)</sup>、本研究でみられたSREBP-1cのmRNA発現の低下は、AMPKの活性化によることが推察された。また、SREBP-1cのmRNA発現の低下は、肝臓中のTg濃度の低下を反映していると考えられた。

以上のことから、妊娠期にタンパク質制限した母ラットの授乳期に小豆PP含有餌を摂取させた結果、成長後の仔ラット(LPAP群)の肝臓において、次のことが明らかになった。i) 細胞内のエネルギーバランスを制御する重要なセンサーであり、その活性化は高血糖症や肥満の抑制に寄与するというAMPKの活性が上昇した、ii) ACC活性の抑制は認められなかった。一方、肝臓中のTg濃度は減少した、iii) 脂質合成に関連した種々の酵素の遺伝子発現を促進する転写因子SREBP-1cのmRNA発現量が減少した。

#### (4) 今後の展開

得られた結果から妊娠期に低栄養状態であっても授乳期に小豆PPを摂取することにより、少なくとも、成長後の児のエネルギー代謝、糖・脂質代謝に関わる因子に影響を及ぼす可能性が示唆された。今後、授乳期に小豆PP摂取することで小豆PPが成長後の児のエネルギー代謝、糖・脂質代謝に関わる因子を改善することが期待できる。

#### (5) 参考文献

- 1) Zhang BB, Zhou G, Li C. *Cell Metab* 2009;9:407-416.
- 2) Thomson DM, Winder WW. *Acta Physiol (Oxf)* 2009;196:147-154.
- 3) Eid HM, Martineau LC, Saleem A, Muhammad A, Vallerand D, Benhaddou-Andalousi A, et al. *Mol Nutr Food Res* 2010;54:991-1003.
- 4) Mukai Y, Sato S. *J Nutr Biochem* 2011;22:16-21.
- 5) 島野仁: 医学のあゆみ, 2010;234:765-768.
- 6) Yuan H, Shyy JY, Martins-Green M. *J Hepatol* 2009;51:535-547.

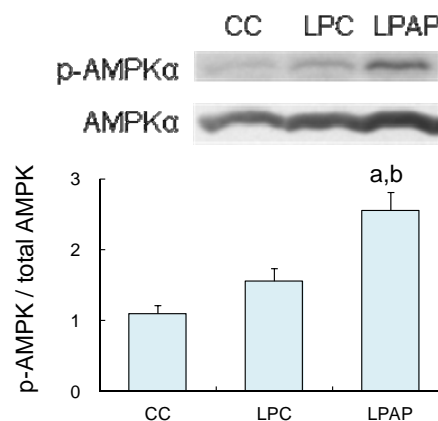


図1. 授乳期の小豆PP摂取が成長後の仔ラット(23週齢)の肝臓のAMPK発現に及ぼす影響。値は平均値±標準誤差(n=5-11)。<sup>a</sup>p<0.05 vs CC群。<sup>b</sup>p<0.05 vs LPC群。

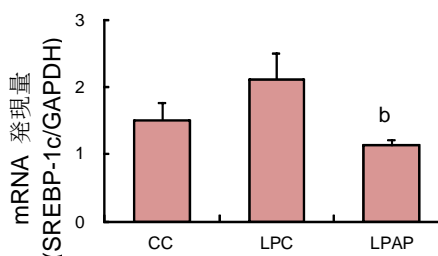


図2. 授乳期の小豆PP摂取が仔ラット(23週齢)の肝臓のSREBP-1cのmRNA発現に及ぼす影響。値は平均値±標準誤差(n=5-11)。<sup>b</sup>p<0.05 vs LPC群。