

卵白による脂質代謝改善効果の時間栄養学的解析

(国) 農研機構食品研究部門食品健康機能研究領域・上級研究員 大池 秀明

■ 緒 言

栄養として“タンパク質”と聞くと、どの食品のタンパク質でも大差ないように感じる人もいるかもしれないが、アミノ酸組成は由来する食品によってまちまちであり、実際の栄養学的な質は異なっている。したがって、摂取した際の味、消化吸収、栄養/機能性効果なども、タンパク質の由来に依存する。例えば、主要な食品タンパク質である卵白は、アミノ酸のバランスが良く、良質なタンパク質であると評価されている。ラットに卵白タンパク質あるいはカゼインを20%含有した飼料をペアフィーディングさせ、比較飼育を行った報告によると、卵白飼料では相対的に肝臓の β 酸化が亢進され、骨格筋重量の増加、内臓脂肪量の低下、肝臓トリグリセリド濃度の低下などが見られている¹⁻³⁾。

また、最近では、食べる時刻に依存して食品の栄養/機能性効果に差が出ることも明らかになり、体内時計の概念を取り入れた“時間栄養学”の必要性が認識されつつある。また、我々はこれまで、マウスを時差環境で飼育することで、脂質・糖代謝が乱され、肥満が誘導されることを示している⁴⁾。ここでは、マウスを利用して、卵白の脂質代謝改善効果の時刻依存性や、時差への適応性を調べることで、時間栄養学の観点から卵白タンパク質の特性を明らかにすることを目的とした。

■ 方 法

実験①：C57BL/6J マウス(5週齢、オス、32匹)を日本チャールス・リバーより入手した。室温 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $65 \pm 10\%$ の環境で、おが屑の床敷きを入れ、2個のシャッター付き餌箱(メルクエスト社、FDB-300W)が入ったケージで4匹ずつ飼育した。1週間の予備飼育後、下記の試験飼料と給餌方法に変更して7週間飼育した。体重は1週間毎に測定し、試験期間の最後に4時間絶食させ、解剖して、血液、肝臓、脂肪等を採取した。血液は血清を分離し、生化学解析に供した(オリエンタル酵母株式会社；測定項目TP、ALB、BUN、CRE、CK、TG、NEFA、T-Cho、LDL-Cho、HDL-Cho、TBA、GLU、GA、T-KB、HbA1c、UA)。肝臓は、TRIzol 試薬(サーモフィッシャー)を使用してRNAを抽出後、ReverTra Ace 酵素(東洋紡)によりcDNAを合成し、PowerUP SYBR 試薬(サーモフィッシャー)を利用して定量PCRを行った。各定量値は、Actbの値で割り戻して標準化を行った。定量PCRに使用したプライマー配列を表1に示す。

試験飼料：飼料A(改変型AIN76精製飼料；AIN76のコーン油を5%から10%に増加させ、その分、コーンスターチを減らしたもの。タンパク質は20%ですべてカゼイン)、飼料E(飼料Aのタンパク質をすべて乾燥卵白(キューピー株式会社タイプK)に置き換えたもの)。

給餌時刻：1日を2つの時間帯に区切り、それぞれに対応する餌箱のシャッターを制御して給餌した。ZT0-12を明期、ZT12-24を暗期とする24時間表記法で、給餌時刻は前半がZT8-16(8時間；暗期的前半がメイン；ヒトの朝食を想定)、後半がZT18-翌6(12時間；暗期の後半がメイン；ヒトの夕食を想定)とした。通常、マウスは暗期(活動期)の前半に摂餌量が多くなることから、なるべく両者の摂餌量がそろるように、1回目の給餌時間を短くした。

群割と給餌：AA群(前後半とも飼料A)、EE群(前後半とも飼料E)、AE群(前半は飼料A、後半は飼料E)、EA群(前半は飼料E、後半は飼料A)

実験②：基本的な飼育条件、試薬、サンプル調製等は実験①と同様。C57BL/6J系統(5週齢、メス、24匹)を6匹ずつ4群に分け、飼料と明暗サイクルを各2つの条件の組み合わせとした。飼料は実験①と同じ、AもしくはEを使用。明暗サイクルは、2群は12時間固定し、残りの2群は、週2回6時間ずつ明暗サイクルを前進させた。2週間の飼育とし、合計4回の明暗サイクル前進を行い、全群の明暗時刻がそろった後、3日後に解剖を実施した。

統計解析および主成分分析はEZRおよびSIMCA14を利用して実施した。

■ 結 果

実験①：体重の経過を図1に示す。いずれの群同士も、有意な差は認められなかった。血液解析16項目について、One-way ANOVAにより有意差が認められたものは、尿素窒素(BUN)、総タンパク

質(TP)、総コレステロール(T-CHO)の3項目であった。これら3項目と中性脂肪(TG)の結果をグラフにして図2Aに示す。また、すべての項目結果を主成分分析した結果を図2Bに示す。肝臓における脂質・糖代謝関連遺伝子の発現解析結果を図3Aに示す。試験した脂質・糖代謝関連の17遺伝子のうち、9遺伝子においてAA群における発現量が最も低くなった。そのうち6遺伝子においては、AE群の発現量が次に低いという特徴的なパターンを示した。一方で、試験した7つの時計遺伝子に関して、これと同じ発現パターンを示したものはPer2のみであった(図3B)。また、図3Aに示した7つの遺伝子について、各個体の発現データを行に、遺伝子を列として並べ、ヒートマップ化したものを図3Cに示す。

実験②：体重の経過および増加率を図4に示す。AIN飼料群では、想定通り2週間の時差飼育で体重の増加傾向が認められた($p=0.08$)。また、タンパク質を卵白に置き換えたことで、体重の増加傾向は抑制方向に作用している可能性が示唆された。血清の解析においては、One-way ANOVAにより群間差があるものはなかった(データ省略)。肝臓の遺伝子発現の解析結果を図5に示す。脂質代謝・糖代謝に関連する遺伝子のうち、G6pc、Pck1、Ppargについては、時差により発現上昇したものが、卵白食により軽減される傾向を示した(図5A)。反対に、Gck、Hmgcr、Ldlrについては、時差により発現が減少するものが、やはり卵白食により軽減されていた(図5B)。一方で、時計遺伝子に関しては、時差なし群と時差あり群で二分される傾向にあった(図5C)。図5A、Bに示した6つの遺伝子にAcaca、Acly、Acsl4、Cebpl、Fasn、Scd1を加えて主成分分析を行った結果を図5Dに示す。視覚的にとらえられる傾向として、やはりAIN飼料の群では、時差により遺伝子発現の傾向が変化している。一方で、卵白飼料群は、時差によって同様の遺伝子発現の影響を受けにくくなっていた。

■ 考 察

まず、実験①において、今回のマウスの試験では、血中パラメータや体重について、緒言で言及したラット試験と同様の脂質代謝改善効果は得られなかった。しかしながら、血中のタンパク質に関連する項目(TP、BUN)で群間有意差が検出されたことから、当初の想定通り、タンパク質の由来による何らかの違いが検出できているものと考えられる(図2A)。主成分分析の結果を見ても、AA群とその他で異なるポピュレーションを形成していることから、卵白摂取による影響が出ていることがわかる(図2B)。さらに、肝臓における脂質・糖代謝関連の遺伝子発現の変化についても、同様に群間による特徴が検出され、AA群においては他の群と顕著に異なっていた(図2C)。これらの結果から、肝臓における脂質・糖代謝に関して、卵白タンパク質の摂取は、明らかにカゼインの摂取とは異なる遺伝子応答を引き出している。また、AE群とEA群を比較すると、差は少ないが、EE群により近いのはEA群であることから(図3Cがわかりやすい)、その効果は、卵白タンパク質を朝食(活動期の前半)に摂取する方が得やすいものと示唆される。

実験②においては、時差環境における脂質・糖代謝の悪化におよぼす卵白タンパク質の効果を検討した。我々は、これまでに、マウスを時差環境で飼育することで、肥満が誘導されるとともに、肝臓における脂質・糖代謝関連の遺伝子発現が変化することを示している⁴⁾。今回の試験において、AIN飼料群では、時差環境において発現量が低下もしくは上昇する遺伝子が多かったのに対し、卵白飼料群では、その発現変動が抑制される傾向にあり、時差に対する代謝異常に許容性を付加する可能性が見出された。実際の体重変動も、有意差はついていないが、AIN飼料群の上昇と比べると低い傾向が確認された。今後、長期試験等によりさらなる検証を進めることで、シフトワークや時差ボケによる肥満の対策に応用できる可能性が期待される。

■ 要 約

タンパク質は由来する食品によってアミノ酸組成が異なっており、質的な違いがある。卵白タンパク質は、ラットの試験からカゼインと比較して脂質代謝改善作用が報告されている。ここでは、マウスを利用して、卵白の脂質代謝改善の時刻依存性や、時差への適応性を調べることで、時間栄養学的な視点から卵白タンパク質の特徴を明らかにすることを目的とした。

C57BL/6Jマウスに、タンパク質がカゼインもしくは卵白の飼料を与えた。給餌時刻は、活動期の前半と後半の1日2回に分け、それぞれにどちらかの飼料を与える合計4通りの組み合わせを比較した(試験①)。7週間の試験飼育後、血液の生化学解析および肝臓の遺伝子発現解析を実施したところ、タンパク質の由来による結果の違いが検出された。時刻の効果は少なかったが、活動期の前半に卵白を与えた方が効果は大きい傾向となった。また、試験②として、上記2種類の飼料について、時差によって引き起こされる脂質・糖代謝の異常に対する効果を検討した。2週間の時差飼育の後、

血液の生化学解析と肝臓の遺伝子発現解析を実施した。その結果、卵白飼料により、時差による代謝関連遺伝子の発現変動が抑制される傾向が認められた。今後、長期試験等によりさらなる検証を進めることで、シフトワークや時差ボケによる肥満の対策に応用できる可能性が期待される。

■ 文 献

- 1) Matsuoka R, *et al.* : Dietary egg-white protein increases body protein mass and reduces body fat mass through an acceleration of hepatic beta-oxidation in rats. *Br J Nutr* 118(6) : 423-430 (2017)
- 2) 武藤彩乃、高橋弥生、松岡亮輔、木村守、増田泰伸、高橋陽子、宇都宮一典：卵白タンパク質の有用性に関する研究(体タンパク質、体脂肪、筋肉に及ぼす影響). 第10回 日本機能食品医学学会総会(2012)
- 3) 高橋弥生、松岡亮輔、木村守、増田泰伸、久能昌朗、和田義明、高橋陽子、宇都宮一典：卵白タンパク質の有用性に関する研究(第3報：内臓脂肪蓄積抑制効果の作用機序). 日本栄養・食糧学会大会講演要旨集(2012)
- 4) Oike H, Sakurai M, Ippoushi K, & Kobori M : Time-fixed feeding prevents obesity induced by chronic advances of light/dark cycles in mouse models of jet-lag/shift work. *Biochem Biophys Res Commun* 465(3) : 556-561 (2015)

表 1. プライマーの配列

	Forward (5'- 3')	Reverse (5'- 3')
Acaca	cagtgctatgctgagattgagg	acacagccagggtcaagtg
Acly	gaagaaggaggggaagctga	tcgcatgtctgggtgttta
Acs14	gaaattcacagcatgcaatcag	tctacttgagggaacgctcaa
Cebpa	aaacaacgcaacgtggaga	gcggtcattgtcactggtc
Cpt1	gactccgctcgctcattc	tctgccatcttgagtggta
Cyp7a1	ggagcttatttcaaagtatcagg	ttggccagcactctgtaatg
Fasn	caacatgggacaccctgag	gttgtggaagtgcaggtagg
Gck	gtgaggtcggcatgattgt	tccaccagctccacattct
G6pc	tctgtcccggatctaccttg	gaaagtttcagccacagcaa
Hmgcr	tgccacactctgcactaaaga	ctgagagggtccgacttgctt
Ldlr	gatggctatacctaccctcaa	tgctcatgccacatcgtc
Mttp	agcgtgtctgcaaaggatg	aatgaaggccaggaagctct
Pck1	atgtgtgggcatgacatt	aaccggtttctgggtgat
Pgc1a	gaaagggccaaacagagaga	gtaaatcacacggcgctctt
Pparg	gaaagacaacggacaaatcacc	gggggtgatatgtttgaacttg
Scd1	ttccctctgcaagctctac	cagagcgctggcatgtagt
Srebf1	ggttttgaacgacatcgaaga	cgggaagtactgtcttggt
Bmal1	tcagatgacgaactgaaacacc	cggtcacatcctacgacaaa
Clock	ccagtcagttggtccatcatt	tggtcctaactgagctgaaa
Dbp	gcattccaggccatgagact	ccagtacttctatccttctgt
Npas2	cccaggagttaccagtgcag	gaggaatgcagagcagtcg
Per1	gcttcgtggacttgacacct	tgctttagatcggcagtggt
Per2	caacacagacgacagcatca	tcctggctcctccttaacac
Reverba	ccctggactccaataacaaca	tgccattggagctgtcact
Actb	ggaggggggtgaggtgtt	gtgtgcacttttattgggtctcaa

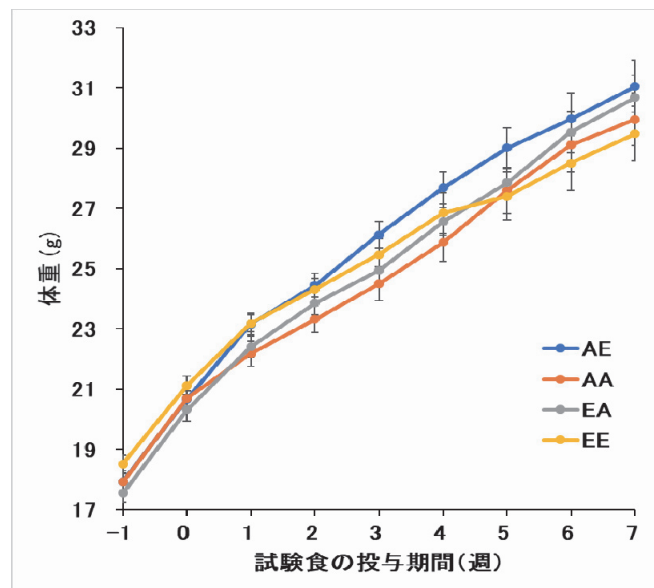


図1 試験期間中の体重変化（実験①）
 平均値±標準誤差（各群8匹）。群間有意差は認められなかった。

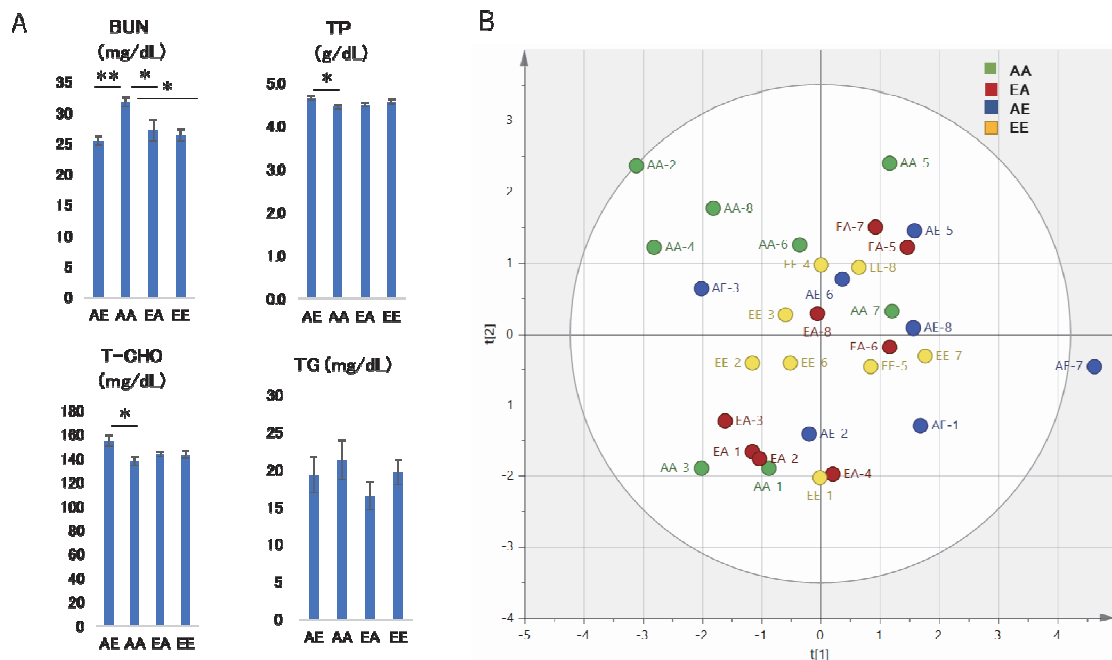


図2 血液解析の結果（実験①）
 A. 血清の解析結果を群ごとに平均値±標準誤差（各群8匹）でグラフ化したもの。Tukey's post hoc testにより $p < 0.05$ の群間差を*で示す。B. 全個体の全項目データを利用して主成分分析した結果（群ごとに色分け）。

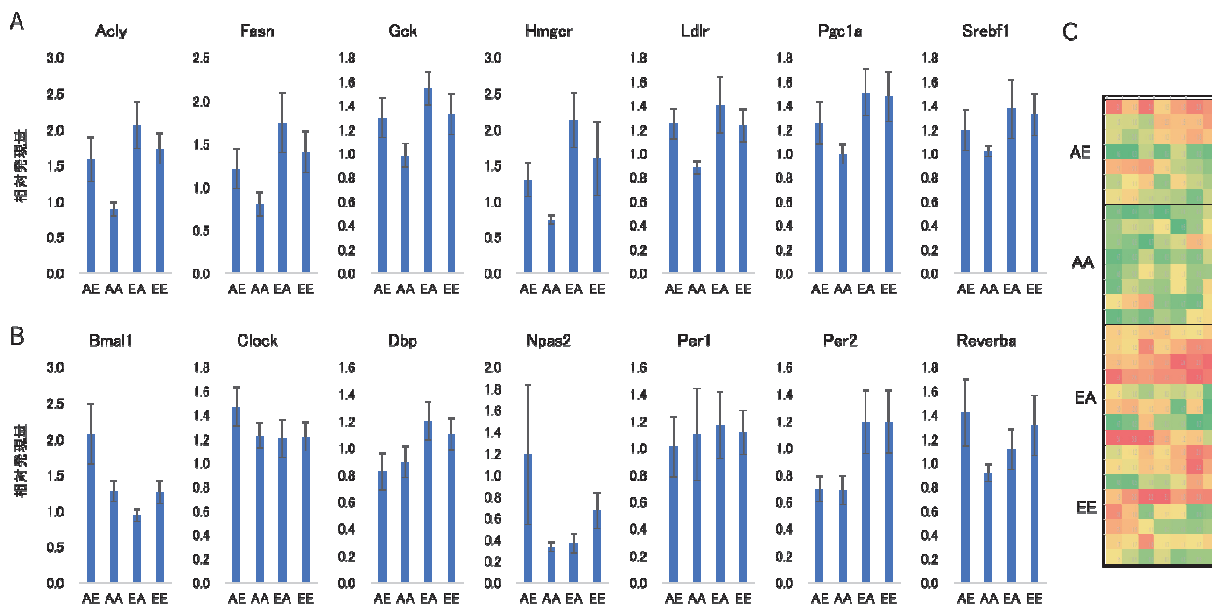


図3 肝臓における遺伝子発現解析結果（実験①）
 平均値±標準誤差（各群8匹）A. 脂質・糖代謝関連遺伝子 B. 時計遺伝子 C. Aに載せた遺伝子について個体毎の発現をヒートマップ化したもの。

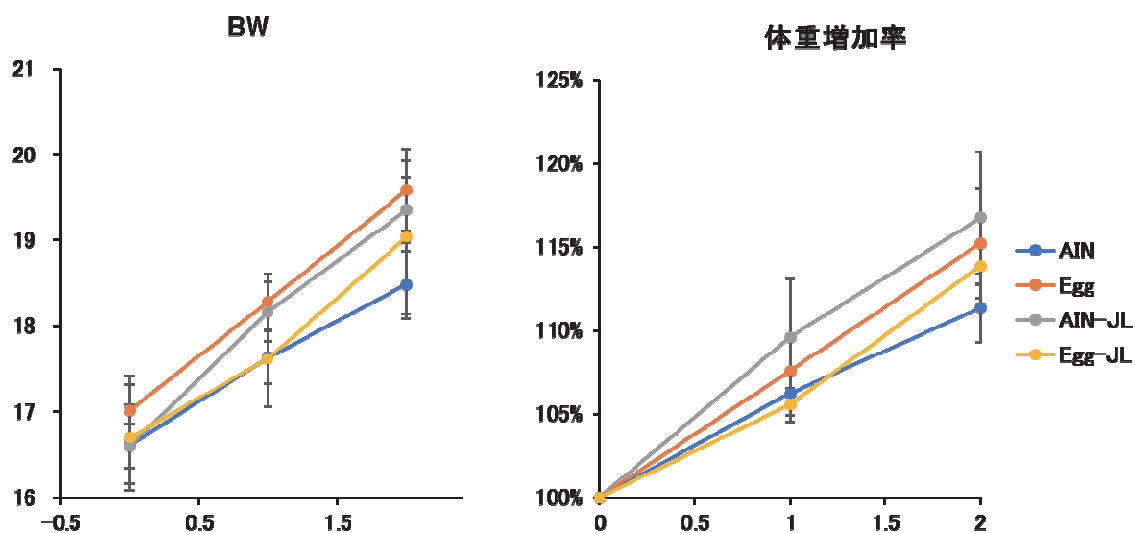


図4 試験期間中の体重変化と増加率（実験②）
 平均値±標準誤差（各群6匹）。JLは時差群を表す。

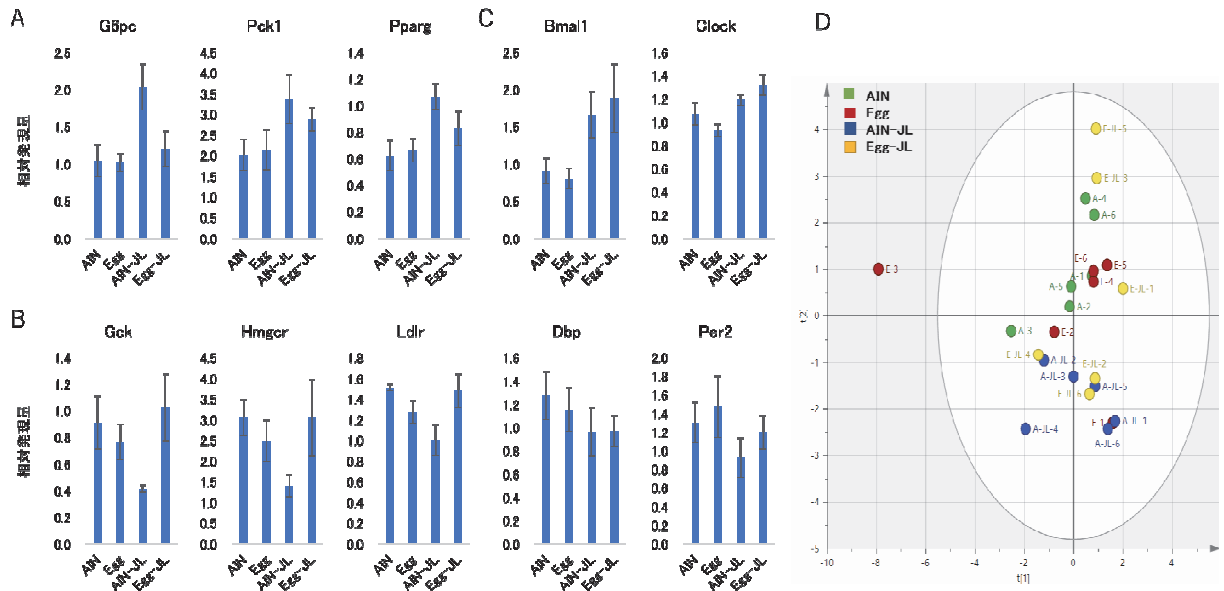


図5 肝臓における遺伝子発現解析結果（実験②）

平均値±標準誤差（各群6匹）。脂質・糖代謝関連遺伝子のうち、AIN-JL群で発現上昇したもの（A）と発現低下したもの（B）、および時計遺伝子（C）。A、Bに記載した6個の遺伝子を含む12個の脂質・糖代謝関連遺伝子を利用して主成分分析した結果（D）。